



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0172610
(43) 공개일자 2023년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7042363 (분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년09월16일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7010012
원출원일자(국제) 2015년09월16일
심사청구일자 2020년09월16일
(85) 번역문제출일자 2023년12월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/050515
(87) 국제공개번호 WO 2016/044478
국제공개일자 2016년03월24일
(30) 우선권주장
62/051,299 2014년09월16일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코퍼레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
피찬, 피터
미국 02461 매사추세츠주 뉴턴 앤드류 스트리트 10
스카리아, 에이브러햄
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내
아딘저, 제프리
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내
(74) 대리인
양영준, 김영

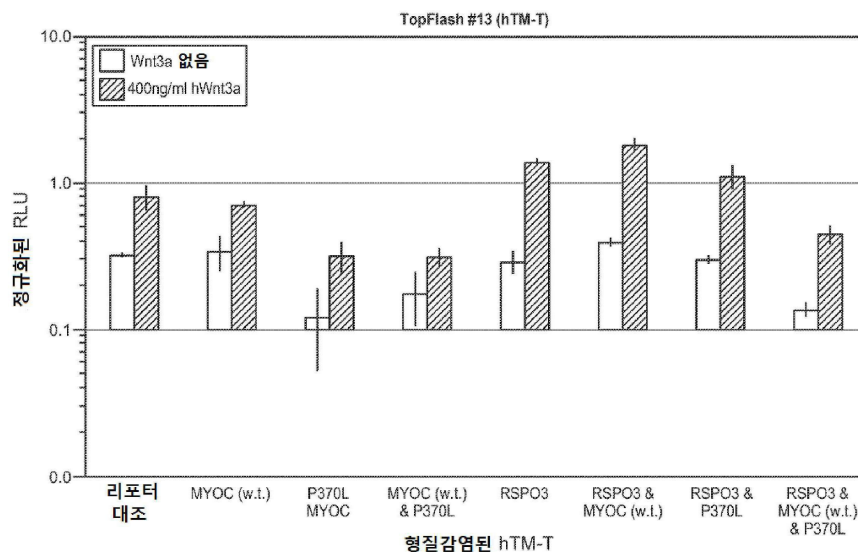
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 아데노-관련 바이러스 벡터

(57) 요약

아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 사용하여 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서 AAV 벡터는 R-스폰딘 1(RSP01), R-스폰딘 2(RSP02), R-스폰딘 3(RSP03) 또는 R-스폰딘 4(RSP04) 및/또는 마이오실린(MYOC)을 표적으로 하는 RNAi를 암호화한다. 일 양태에서, 바이러스 입자는 인간 대상의 눈에 투여된다. RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04 및/또는 MYOC RNAi를 암호화하는 바이러스 입자가 고려된다. 일부 양태에서, 섬유주대로 형질도입되는 변종 AAV2 입자가 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 48/0075 (2013.01)

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/06 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유류의 눈에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 물질을 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호-참조
- [0002] 본 출원은 이로써 전체가 참조로 도입되는 2014년 9월 16일자 출원된 미국 가출원번호 62/051,299의 우선권 이익을 주장한다.
- [0003] 아스키 텍스트 파일의 서열목록 제출
- [0004] 아스키 텍스트 파일 상의 다음 제출 내용은 전체가 본원에 참조로 도입된다: 컴퓨터 판독 가능한 형태(CRF)의 서열목록(파일명: 159792012540SeqList.txt, 기록일: 2015년 9월 15일, 크기: 31 KB).
- [0005] 기술분야
- [0006] 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 AAV 벡터의 이용 방법 및 AAV 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 마이오실린(MYOC) 돌연변이는 약 2% 내지 4%의 원발성 개방각 녹내장(POAG; 약 90,000 미국인 환자)을 차지한다. 특히, 녹내장 MYOC 돌연변이 P370L 또는 Y437H는 10% 내지 30%의 유전형 POAG(JOAG; 약 6,000 미국인 환자)를 차지하고 증가된 안내압(IOP), 망막 신경절 세포 사멸, 및 시신경 두부(OH) 손상과 관련된 다(Shimizu *et al.* (2000) *Am. J. Ophthalmol.* 130:165-77; Fan and Wiggs (2010) *J. Clin. Invest.* 120:3064-72).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] MYOC 돌연변이와 녹내장 사이의 관련에도 불구하고, 눈의 기능에 대한 MYOC 돌연변이의 효과는 불명확하게 남아 있다. 이에 따라, 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 새로운 치료적 전략을 밝히기 위해 MYOC 및 돌연변이 MYOC 기능의 추가적 이해가 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 포유류의 눈에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 물질을 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 섬유주대(trabecular meshwork, TM) 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈에서 R-스폰딘 1(RSP01), R-스폰딘 2(RSP02), R-스폰딘 3(RSP03), 및/또는 R-스폰딘 4(RSP04) 활성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈에서 하나 이상의 RSP0 활성을 증가시키는 하나 이상의 추가 물질과 조합하여 사용된다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP01을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP01 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP01은 절단된 RSP01이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP02를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP02 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP02는 절단된 RSP02이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP03를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP03 또

는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP03는 절단된 RSP03이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP04를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP04 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 본 물질은 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP04는 절단된 RSP04이다.

[0010] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류의 눈에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 제2 물질을 투여하는 것을 제공한다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, 억제성 핵산은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC shRNA이다.

[0011] 일부 양태에서, 본 발명의 물질은 포유류의 눈에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 포유류의 눈의 TM에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, 본 물질은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, 억제성 핵산은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi이다. 추가의 구현예에서, MYOC RNAi는 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC shRNA이다.

[0012] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 방법은 포유류의 눈에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 제2 물질을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈에서 R-스폰딘 1(RSP01), R-스폰딘 2(RSP02), R-스폰딘 3(RSP03), 또는 R-스폰딘 4(RSP04) 활성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP01을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP01 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP01은 절단된 RSP01이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP02를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP02 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP02는 절단된 RSP02이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP03를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP03 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP03는 절단된 RSP03이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 포유류의 눈의 TM에서 RSP04를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP04 또는 이의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 제2 물질은 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 구현예에서, RSP04는 절단된 RSP04이다.

[0013] 일부 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 포유류의 눈에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 물질 및 포유류에서 마이오실린의 발현을 감소 또는 억제시키는 물질을 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자, 및 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하고, 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC shRNA(MYOC shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 MYOC를 표적으로 하는 shRNA이다. 일부 구현예에서, shRNA는 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다.

[0014] 일부 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는

재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대 세포에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대 세포에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대 세포에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자, 및 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대 세포에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하고, 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대 세포에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 마이오실린(MYOC) 녹내장이다.

[0015] 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 마이오실린에서의 돌연변이와 관련된다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 인간 마이오실린에서의 돌연변이와 관련된다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H, 및 I477S로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 P370L 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 Y437H 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 원발성 개방각 녹내장(POAC)이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 유전형 원발성 개방각 녹내장(JOAC)이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 치료는 마이오실린(MYOC) 녹내장의 증상을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장의 증상을 감소시키는 것은 안압 감소, 섬유주대에서 MYOC의 축적 감소, 고안압 감소, 또는 섬유주대로부터 방수 유출 증가이다.

[0016] 일부 구현예에서, RSP01은 인간 RSP01이다. 일부 구현예에서, RSP01은 인간 RSP01과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:8과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:11과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:12와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02는 인간 RSP02이다. 일부 구현예에서, RSP02는 인간 RSP02와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:9와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:13과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:14와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP03는 인간 RSP03이다. 일부 구현예에서, RSP03는 인간 RSP03과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:1과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:15와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:16의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP03는 SEQ ID NO:17과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04는 인간 RSP04이다. 일부 구현예에서, RSP04는 인간 RSP04와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:10과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:18의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:18과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:12와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴(CBA) 프로모터이다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 발명의 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi는 인간 MYOC을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNAi는 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 또는 소형 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 MYOC shRNA이다. 일부 구현예에서, shRNA는 SEQ ID NO:6으로 제시되는 MYOC의 아미노산 서열을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, shRNA는 SEQ ID NO:7의 루프 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 추가의 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 발현은 포유류의 눈에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 발현은 포유류의 섬유주대의 세포에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC는 야생형 MYOC이다. 일부 구현예에서, MYOC는 돌연변이 MYOC이다. 일부 구현예에서, MYOC는 야생형 MYOC 및 돌연변이 MYOC이다. 추가의 구현예에서, 돌연변이 MYOC는 인간 MYOC의 P370L 및/또는 Y437H 아미노산 치환에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H, 및 I477S로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0018] 위에 기술되는 구현예 및 양태의 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0164106에 기술된 ShH10와 같은 변종 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2013/0323226에 기술된 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0066783에 기술된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 번호 8,283,151 또는 국제 공개번호 WO/2003/042397에 기술된 AAV 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 하나 이상의 위치 R484, R487, K527, K532, R585 또는 R588에서 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV 입자는 클레이드 A-F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV 혈청형 2 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV 혈청형 2 캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 역위 말단 반복(inverted terminal repeat, ITR)을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV 혈청형 2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 포함한다. 다른 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 rAAV 바이러스 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함하고, 여기에서 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV2 캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, rAAV 입자의 적어도 1×10^9 개놈 카피가 포유류에 투여된다. 일부 구현예에서 AAV는 포유류의 눈의 각막, 망막 및/또는 공막에 투여된다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 유리체내 주사 및/또는 전방내 주사에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV는 눈의 하나 보다 많은 위치에 투여된다.

[0020] 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공하는데, 여기에서 포유류는 인간이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 원발성 개방각 녹내장(POAG)이다. 일부 구현예

에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 유년형 원발성 개방각 녹내장(JOAC)이다.

[0021] 본 발명의 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 약제학적 조성물에 존재한다. 추가의 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0022] 위의 방법의 일부 구현예에서, 물질(예를 들어, AAV 입자)은 R-스폰딘(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04)의 활성을 증가시키는 하나 이상의 추가의 물질과 조합하여 사용된다.

[0023] 일부 양태에서, 본 발명은 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자를 제공하는데, 여기에서 AAV 벡터는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하고, 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다.

[0024] 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP01이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 8, 11, 및/또는 12의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 8, 11, 및/또는 12의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP02이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 9, 13, 및/또는 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 9, 13, 및/또는 14의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP03이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 1, 및/또는 15 내지 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 1, 및/또는 15 내지 17의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04를 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04는 인간 RSP04이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 10, 18, 및/또는 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 10, 18, 및/또는 19의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 추가의 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 답 β -액틴(CBA) 프로모터이다.

[0025] 일부 구현예에서, 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산은 RNAi이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)는 인간 MYOC를 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNAi는 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 또는 소형 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 shRNA이다. 일부 구현예에서, RNAi(예를 들어, shRNA)는 SEQ ID NO:6으로 제시되는 MYOC의 아미노산 서열을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNAi(예를 들어, shRNA)는 SEQ ID NO:7의 루프 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 추가의 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 답 β -액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 발현은 포유류의 눈에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 발현은 포유류의 섬유주대의 세포에서 MYOC의 발현을 감소 또는

는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC는 야생형 MYOC이다. 일부 구현예에서, MYOC는 돌연변이 MYOC이다. 일부 구현예에서, MYOC는 야생형 MYOC 및 돌연변이 MYOC이다. 추가의 구현예에서, 돌연변이 MYOC는 인간 MYOC의 E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H, 및 I477S 아미노산 치환에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 MYOC는 인간 MYOC의 P370L 및/또는 Y437H 아미노산 치환에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 원발성 개방각 녹내장(POAC)과 관련된다. 일부 구현예에서, 마이오실린 돌연변이는 유전형 원발성 개방각 녹내장(JOAC)과 관련된다.

[0026] 위에 기술된 구현예 및 양태의 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0164106에 기술된 ShH10와 같은 변종 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2013/0323226에 기술된 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0066783에 기술된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 번호 8,283,151 또는 국제 공개번호 WO/2003/042397에 기술된 AAV 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 하나 이상의 위치 R484, R487, K527, K532, R585 또는 R588에서 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV 입자는 클레이드 A-F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV 혈청형 2 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV 혈청형 2 캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 역위 말단 반복(ITR)을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV 혈청형 2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 포함한다. 다른 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 rAAV 바이러스 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함하고, 여기에서 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV2 캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다.

[0027] 본 발명은 본원에 기술되는 임의의 재조합 AAV 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에 기술되는 임의의 방법에 적절한 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기술된 재조합 AAV 입자 및 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 원발성 개방각 녹내장(POAC)이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 유전형 원발성 개방각 녹내장(JOAC)이다.

[0028] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 키트를 제공하는데, 여기에서 키트는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 바이러스 입자; AAV 벡터를 포함하는 rAAV 바이러스 입자(여기에서 AAV 벡터는 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 억제성 핵산(예를 들어, shRNA를 포함하는 MYOC RNAi)을 암호화하는 핵산을 포함); 및/또는 AAV 벡터를 포함하는 rAAV 바이러스 입자(여기에서 AAV 벡터는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하고, 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)을 암호화하는 핵산을 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 데 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 키트는 완충제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 본 발명의 키트는 포유류에서 MYOC의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 인간 MYOC의 발현을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 SEQ ID NO:6으로 제시되는 MYOC의 아미노산 서열을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNAi는 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 또는 소형 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 일부 구현예에서, RNAi는 shRNA이다. 일부 구현예에서, MYOC shRNA는 SEQ ID NO:7의 루프 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 키트는 AAV 벡터를 포함하는데, 여기에서 AAV 벡터는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP01이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 8, 11, 및/또는 12의 아미

노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP01 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP01 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 8, 11, 및/또는 12의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP02이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 9, 13, 및/또는 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP02 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP02 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 9, 13, 및/또는 14의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP03이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 1, 및/또는 15 내지 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP03 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP03 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 1, 및/또는 15 내지 17의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04 또는 이의 기능적 변종은 인간 RSP04이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 10, 18, 및/또는 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 RSP04 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함하고, RSP04 또는 이의 기능적 변종은 SEQ ID NO: 10, 18, 및/또는 19의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β -액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 MYOC RNAi를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 MYOC RNAi를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β -액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi의 발현은 포유류의 눈에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi의 발현은 포유류의 섬유주대의 세포에서 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다.

[0030] 일부 구현예에서, 본원에 기술되는 AAV 입자는 R-스폰딘(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04)의 활성을 증가시키는 하나 이상의 추가의 물질과 조합하여 사용될 수 있다.

[0031] 일부 구현예에서, 본 발명의 키트는 벡터 및 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0164106에 기술된 ShH10와 같은 변종 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2013/0323226에 기술된 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0066783에 기술된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 번호 8,283,151 또는 국제 공개번호 WO/2003/042397에 기술된 AAV 캡시드를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 하나 이상의 위치 R484, R487, K527, K532, R585 또는 R588에서 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, AAV 입자는 클레이드 A-F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV 혈청형 2 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 혈청형 2 캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 역위 말단 반복(ITR)을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV 혈청형 2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 rAAV 바이러스 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함하고, 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV2

캡시드는 AAV2 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다.

- [0032] 위의 키트의 일부 구현예에서, 키트의 AAV 입자는 R-스폰딘(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04)의 활성을 증가시키는 하나 이상의 추가의 물질과 조합하여 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 키트는 본원에 기술되는 AAV 입자 및 R-스폰딘(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04)의 활성을 증가시키는 하나 이상의 추가의 물질을 포함한다.
- [0033] 본 발명은 본원에 기술되는 임의의 방법에서의 사용에 적절한 키트를 제공한다. 본 발명은 본원에 기술되는 임의의 제조법 AAV 입자를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 양태에서, 본원에 기술되는 키트는 마이오실린(MYOC) 녹내장의 치료에 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 본원에 기술되는 키트는 완충제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다.
- [0034] 일부 양태에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 AAV 혈청형 2(AAV2) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류의 눈의 섬유주대로 핵산(예를 들어, 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산)을 전달하는 방법을 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 AAV2 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 시각 장애를 치료하는 방법을 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 유리체내 및/또는 전방내로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 눈의 섬유주대의 세포로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 눈의 섬유주대에서 발현된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산을 암호화한다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 눈의 섬유주대와 관련된 장애이다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 마이오실린(MYOC) 녹내장이다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다.
- [0035] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류의 눈의 섬유주대로 핵산(예를 들어, 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산)을 전달하기 위한 제조법 AAV2 입자를 제공하는데, 여기에서 AAV2 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 시각 장애를 치료하기 위한 제조법 AAV2 입자를 제공하는데, 여기에서 AAV2 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 눈의 섬유주대의 세포로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 눈의 섬유주대에서 발현된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산을 암호화한다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 눈의 섬유주대와 관련된 장애이다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 마이오실린(MYOC) 녹내장이다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다.
- [0036] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류의 눈의 섬유주대로 핵산(예를 들어, 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산)을 전달하기 위한 제조법 AAV2 입자의 용도를 제공하는데, 여기에서 AAV2 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 시각 장애를 치료하기 위한 제조법 AAV2 입자의 용도를 제공하는데, 여기에서 AAV2 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 유리체내 및/또는 전방내로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 눈의 섬유주대의 세포로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 눈의 섬유주대에서 발현된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산을 암호화한다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 눈의 섬유주대와 관련된 장애이다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 마이오실린(MYOC) 녹내장이다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다.
- [0037] 일부 양태에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 입자를 포함하는, 포유류의 눈의 섬유주대로 핵산(예를 들어, 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산)을 전달하는 키트를 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 입자를 포함하는, 포유류에서 시각 장애를 치료하기 위한 키트를 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 치료적 이식유전자를 암호화하는 핵산을 포함하고, AAV2 입자는 AAV2의 VP1를 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 유리체내 및/또는 전방내로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 눈의 섬유주

대의 세포로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 눈의 섬유주대에서 발현된다. 일부 구현예에서, 치료적 이식유전자는 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산을 암호화한다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 눈의 섬유주대와 관련된 장애이다. 일부 구현예에서, 시각 장애는 마이오실린(MYOC) 녹내장이다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다.

[0038] 특허 출원 및 공보를 포함하여 본원에 인용되는 모든 문헌은 전체가 참조로 도입된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 MYOC 돌연변이체 P370L 및 Y437H가 분비되지 않고 야생형 MYOC ("wtMYOC")의 분비를 차단하는 것을 나타낸다. wtMYOC 및/또는 MYOC 돌연변이체(표시된)를 발현하는 구성체로 형질감염된 293 세포로부터의 세포 용해물 또는 세포 배양 배지는 항-인간 MYOC 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 탐색되었다.

도 2는 MYOC 돌연변이체 P370L이 분비되지 않고 야생형 MYOC ("wtMYOC")의 분비를 293T 및 SV40 T-항원-형질전환된 인간 섬유주대("hTM-T") 세포 둘 다에서 차단하는 것을 보여준다. wtMYOC 및/또는 P370L MYOC(표시된)를 발현하는 구성체로 형질감염된 293T 또는 hTM-T 세포로부터의 세포 용해물 또는 세포 배양 배지는 항-인간 MYOC 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 탐색되었다.

도 3은 Wnt 신호전달에 대한 wtMYOC, P370L MYOC, 또는 Y437H 발현의 효과를 나타낸다. 각각의 실험에서, "mWnt3a 없음" 막대는 좌측에 있고, "w mWnt3a - 400 ng/ml" 막대는 우측에 있다.

도 4는 RSP03 발현이 P370L 또는 Y437H MYOC와의 공동-발현으로 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있음을 보여준다. 각각의 실험에서, "mWnt3a 없음" 막대는 좌측에 있고, "mWnt3a - 400 ng/ml" 막대는 우측에 있다.

도 5는 RSP03 발현이 P370L MYOC와의 공동-발현으로 hTM-T 세포에서의 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있음을 보여준다. 각각의 실험에서, "mWnt3a 없음" 막대는 좌측에 있고, "400 ng/ml hWnt3a" 막대는 우측에 있다.

도 6은 293T 세포에서 MYOC 발현에 대한 MYOC shRNA의 효과를 보여준다. 293T 세포로부터의 세포 용해물 또는 세포 배양 배지는 항-인간 MYOC 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 검출되었다. 세포는 wtMYOC(라인 1); wtMYOC 및 MYOC shRNA #79(2); wtMYOC 및 MYOC shRNA #93(3); wtMYOC 및 스크램블 shRNA 대조(4); 또는 EGFP(5)를 발현하는 플라스미드로 형질감염되었다. 55/57 kD 밴드는 전체-크기 MYOC 단백질의 글리코실화(57 kD) 및 비-글리코실화(55 kD) 형태를 나타낸다. 22 kD 밴드는 칼페인 II 절단 산물의 N-말단을 나타낸다.

도 7은 hTM-T 세포에서 MYOC 발현에 대한 MYOC shRNA의 효과를 보여준다. hTM-T 세포로부터의 세포 용해물 또는 세포 배양 배지는 항-인간 MYOC 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 검출되었다. 세포는 wtMYOC(라인 1); P370L MYOC(2); wtMYOC 및 P370L MYOC(3); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 Grp94 shRNA #1(4); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 Grp94 shRNA #2(5); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 MYOC shRNA #53(6); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 pGIPZ MYOC shRNA #79(7); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 pGIPZ MYOC shRNA #93(8); wtMYOC 및 P370L MYOC 및 스크램블 shRNA 대조(9); 또는 EGFP(10)를 발현하는 플라스미드로 형질감염되었다.

도 8은 RSP03 발현 및 MYOC 발현억제가 P370L MYOC와의 공동-발현으로 Wnt 신호전달을 상승적으로 회복시키는 것을 보여준다. 293T 세포는 표시된 대로 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC"), 더하기 P370L MYOC, Grp94 shRNA, pGIPZ MYOC shRNAs #79(첫 번째) 및 #93(두 번째), 및/또는 RSP03 플라스미드로 공동-형질감염되었다. Wnt 신호전달은 제조함 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭되었고 TOP-Flash 분석으로 측정되었다. 루시페라제 활성(평균±SD, n=1-3 복제 웰)은 형질감염 후 측정되었고 구성요소로 발현된 레닐라(Renilla) 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화되었다. 각각의 실험에서, "Wnt 첨가 없음" 막대는 좌측에 있고, "400 ng/ml Wnt3a 첨가" 막대는 우측에 있다.

도 9는 MYOC 발현억제가 P370L 또는 Y437H MYOC와의 공동-발현으로 Wnt 신호전달을 회복시키는 것을 보여준다. 293T 세포는 표시된 대로 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC"), 더하기 P370L MYOC, Y437H MYOC, MYOC shRNA, 및/또는 스크램블 대조 shRNA("pGIPZ-Null")와 공동-형질감염되었다. Wnt 신호전달은 제조함 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭되었고 TOP-Flash 분석으로 측정되었다. 루시페라제 활성(평균±SD, n=1-3 복제 웰)은 형질감염 후 측정되었고 구성요소로 발현된 레닐라(Renilla) 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화되었다. 각각의 실험에서, "Wnt 첨가 없음" 막대는 좌측에 있고, "400 ng/ml Wnt3a 첨가" 막대는 우측에 있다.

도 10은 캡시드 단백질의 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 입자 및 야생형 AAV2 바이러스 입자(상단 패

널)에 의한 섬유주대의 세포의 시험관내(좌측 패널) 및 생체내(우측 패널) 형질도입을 보여준다.

도 11은 표시된 대로 푸린(furin)-유사 Cys 풍부 도메인, 트롬보스폰딘 유형 1 도메인, 및 C-말단의 양으로 하전된 도메인을 나타내는 인간 RSP0 패밀리의 단백질의 도메인 다이어그램을 보여준다(도면은 Kim, K.A. *et al.* (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596로부터 개작됨).

도 12는 **도 11**에 수록된 단백질 도메인을 나타내는 인간 RSP0 패밀리의 유전자의 도메인 다이어그램을 보여준다. 아미노산 서열 넘버링을 보여주고, 각각의 패밀리의 구성원에 대하여 시험된 절단된 돌연변이체는 표시된 바와 같다(도면은 Kim, K.A. *et al.* (2006) *Cell Cycle* 5:23-26로부터 개작됨).

도 13a는 신호 서열, FU1, FU2, 및 TSP1 도메인이 표시된 전체-길이 인간 RSP03(SEQ ID NO:1)의 서열을 보여준다.

도 13b는 신호 서열, FU1, 및 FU2 도메인이 표시된 활성 인간 RSP03 단편(SEQ ID NO:16)의 서열을 보여준다. 사용된 단편은 신호 펩티드가 결여되어 SEQ ID NO:16의 아미노산 22 내지 146에 상응하고, His 태그를 포함하여 15 kDa이다.

도 13c는 신호 서열, FU1, FU2, TSP1, 및 BR 도메인이 표시된 전체-길이 hRSP03의 도메인 구조를 보여준다. 각 도메인의 추정되는 기능은 아래 수록된다.

도 13d는 전체-길이 hRSP03 및 hRSP03 단편의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도 14는 시험된 hRSP03 단편을 보여준다. 신호 서열, FU1, FU2, TSP1, 및 BR 도메인이 표시된 전체-길이 hRSP03의 도메인 구조 및 각 도메인의 추정되는 기능 또한 아래 제공된다.

도 15는 전체-길이 RSP03 및 RSP03 단편의 발현이 Y437H MYOC과의 공동-발현으로 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있는 것을 보여준다.

도 16은 RSP0 패밀리의 구성원의 발현이 Wnt3a의 첨가 없이도 Y437H MYOC와의 공동-발현으로 Wnt 신호전달을 유도할 수 있음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040]

본 발명은 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서는, 예를 들어 R-스폰딘 1(RSP01), R-스폰딘 2(RSP02), R-스폰딘 3(RSP03), 및/또는 R-스폰딘 4(RSP04)의 발현에 의해; 포유류의 눈에서 wnt 신호전달이 증가된다. 일부 구현예에서는, 예를 들어 MYOC 발현을 표적으로 하는 RNAi의 사용에 의해; 마이오실린(MYOC)(예를 들어, 돌연변이 마이오실린)의 발현이 억제된다. 일부 양태에서, AAV 입자는 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함한다. 다른 양태에서, rAAV 입자는 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자 및 포유류에서 마이오실린의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자의 혼합물을 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04, 및/또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 사용하는, 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 키트 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 재조합 AAV 입자, 조성물 및 키트를 제공한다.

[0041]

일부 양태에서, 본 발명은 섬유주대의 세포로 형질도입되는 AAV2를 표적으로 하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 R471A 돌연변이를 포함하는 rAAV2 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 돌연변이된 캡시드 단백질(예를 들어, R471A 아미노산 치환)을 포함하는 AAV2 바이러스 입자를 사용하는, 섬유주대와 관련된 안과 질환(예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장)을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0042]

I. 일반적인 기술

[0043] 예를 들어, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology*(F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); the series *Methods in Enzymology*(Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach*(M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual*(Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*(R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis*(M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook*(J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture*(J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*(A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer vector for Mammalian Cells*(J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*,(Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology*(J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology*(Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology*(C.A. Janeway et al., 2004); *Antibodies*(P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach*(D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*(P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual*(E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies*(M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology*(V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011)에 기술된 널리 활용되는 방법과 같이, 본원에 기술되거나 언급된 기술 및 절차는 일반적으로 잘 알려져 있고, 해당 분야의 당업자에 의해 통상적인 방법을 이용하여 흔히 채용된다.

[0044] II. 정의

[0045] 본원에 사용된 "백터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 리보뉴클레오티드이거나 데옥시리보뉴클레오티드이든, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머 형태를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-, 이중-, 또는 여러-가닥의 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 푸린 및 피리미딘 염기를 포함하는 폴리머, 또는 기타 천연의, 화학적 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연적인, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. (RNA 또는 DNA에서 전형적으로 발견될 수 있는) 핵산의 백본은 당 및 인산기, 또는 변형되거나 치환된 당 또는 인산기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 핵산의 백본은 포스포라미데이트와 같은 합성 서브유닛의 폴리머를 포함할 수 있어, 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이트(P-NH₂) 또는 혼합된 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머가 될 수 있다. 또한, 이중-가닥의 핵산은, 상보적인 가닥을 합성하고 이러한 가닥들을 적절한 조건하에서 어닐링하거나, 적절한 프라이머와 함께 DNA 중합효소를 사용하여 새롭게(de novo) 상보적인 가닥을 합성함으로써, 화학적 합성의 단일 가닥의 폴리뉴클레오티드 생성물로부터 얻을 수 있다.

[0047] 용어 "폴리펩티드"와 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위하여 상호교환적으로 사용되고, 최소한의 길이로 한정되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 폴리머는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 전체-길이 단백질 및 이의 단편 둘 다 이러한 정의에 의해 포괄된다. 또한, 이 용어는 폴리펩티드의 발현-후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 나아가, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩티드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하기만 하면, 고유한 서열에 대한 결실, 부가 및 치환(일반적으로 사실상 보존적인 치환)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위-특이적 돌연변이 유도를 통해서와 같이 계획적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우연적일 수 있다.

[0048] "재조합 바이러스 백터"는 하나 이상의 이중 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 백터를 지칭한다. 재조합 AAV 백터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나, 바람직하게는 두 개의, 역위 말단 반복 서열(inverted terminal repeat sequence; ITR)이 측면에 있다.

[0049] "재조합 AAV 백터(rAAV 백터)"는 적어도 하나, 바람직하게는 두 개의, AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)이 측면에

있는, 하나 이상의 이중 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 rAAV 벡터는 적절한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적절한 헬퍼 기능을 발현하고), AAV rep 및 cap 유전자 생성물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질을 발현하는 숙주 세포 내에 존재할 때 복제될 수 있고, 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 안으로(예를 들어, 염색체 내 또는 클로닝이나 형질감염에 사용되는 플라스미드와 같은 또 다른 벡터 내) 도입될 때, 이러한 rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적절한 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "구조"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 벡터는 지질과 복합된, 리포솜 내에 캡슐화된, 그리고, 구현예에서, 바이러스 입자, 특히 AAV 입자 내에 캡시드화된, 선형의 인공 염색체, 플라스미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 많은 임의의 형태일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "제조합 아데노-관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성할 수 있다. AAV 헬퍼 기능(즉, AAV가 숙주 세포에 의해 복제 및 패키징되도록 허용하는 기능)은 AAV 복제 및 패키징을 돕는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 많은 형태로 제공될 수 있다. 다른 AAV 헬퍼 기능은 해당 분야에 알려져 있다.

[0050] "rAAV 바이러스" 또는 "rAAV 바이러스 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질을 및 캡시드화된 rAAV 벡터 게놈으로 구성되는 바이러스 입자를 지칭한다.

[0051] "이중"은 비교 대상이 되거나, 내부로 도입 또는 편입되는 개체의 나머지와는 유전자형으로 구분되는 개체로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 유전자 조작 기술에 의해 상이한 세포 유형으로 도입된 핵산은 이중 핵산이다(그리고 발현될 때, 이중 폴리펩티드를 암호화할 수 있다). 마찬가지로, 바이러스 벡터 내로 도입되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 부분)은 벡터에 대해 이중 뉴클레오티드 서열이다.

[0052] 용어 "이식유전자(transgene)"는 세포 내로 도입되고, RNA로 전사될 수 있고, 임의로 적절한 조건 하에서 번역되고/되거나 발현될 수 있는 핵산을 지칭한다. 양태에서, 이는 도입된 세포에 요구되는 특성을 제공하거나, 그렇지 않으면 요구되는 치료적 또는 진단적 결과를 유도한다. 또 다른 양태에서, 이는 siRNA와 같이, RNA 간섭을 매개하는 분자로 전사될 수 있다.

[0053] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "게놈 입자(gp)", "게놈 당량", 또는 "게놈 카피"는 감염성 또는 기능성과 무관하게, 제조합 AAV DNA 게놈을 포함하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 제제 내의 게놈 입자의 수는 본원의 실시예에 기술된 것과 같은 절차, 또는 예를 들어, Clark et al.(1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al.(2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278에 기술된 것과 같은 절차로 측정할 수 있다.

[0054] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자", 또는 "복제 단위"는 예를 들어, McLaughlin et al.(1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973에 기술된 바와 같이, 복제 중심 검정으로도 알려져 있는, 감염 중심 검정으로 측정되는 감염성 및 복제 능력이 있는 제조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0055] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본원의 실시예에 기술된 것과 같은, 또는 예를 들어, Xiao et al.(1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; 또는 Fisher et al.(1996) *J. Virol.*, 70:520-532(LFU 검정)에 기술된 것과 같은 기능적 검정으로 측정된, 기능성 이식유전자 생성물의 생산을 가져오는 감염성 제조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0056] "역위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 해당 분야에서 널리 이해되는 용어로, 반대 방향의 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다.

[0057] 당해 분야에서 널리 이해되는 용어인 "AAV 역위 말단 반복(ITR)" 서열은 고유한 단일-가닥의 AAV 게놈의 양 말단에 존재하는 대략 145 개 뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽 125 개 뉴클레오티드는 두 가지 대안적인 방향 중 하나로 존재할 수 있어, 상이한 AAV 게놈들 사이에, 그리고 단일 AAV 게놈의 양 말단 사이에 이질성을 초래한다. 또한, 가장 바깥쪽의 125 개 뉴클레오티드는 몇 개의 더 짧은 자가-상보성(self-complementarity) 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 지칭됨)을 포함하여, ITR의 이 부분 내에서 가닥내 염기-쌍이 형성될 수 있도록 한다.

[0058] "말단 분해 서열(terminal resolution sequence)" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 중에 AAV rep 단백질을 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이가 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단에 불응한다.

[0059] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 (결함이 있는 파코바이러스인) AAV가 복제되어 숙주 세포에 의해 패키징될 수 있게 하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 우두 바이러스와 같은 폭스바이러스를 포함하는, 이러한 많은 헬퍼 바이러스가 확인되어 있다. 아데노바이러스는 많은 상이한 서브그룹을 포함하지만,

서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 흔히 사용된다. 인간, 비인간 포유류 및 조류 기원의 여러 아데노바이러스가 알려져 있으며, ATCC와 같은 기탁기관으로부터 입수 가능하다. ATCC와 같은 기탁기관으로부터도 이용 가능한 헤르페스 패밀리의 바이러스로는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인-바르 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 가성 광견병 바이러스(PRV)를 포함한다.

[0060] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열과 관련된 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고, 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하기 위하여, 필요한 경우 갭을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한, 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로서 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부분으로 고려하지 않는다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 백분율 결정의 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1에 기술된 것들로, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여, 해당 분야의 기술 내인 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN 플러스(Scientific and Educational Software, Pennsylvania)이다. 해당 분야의 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하기 위하여 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬 측정을 위한 적절한 변수를 결정할 수 있다. 본원의 목적을 위해, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 이와, 또는 이에 대하여, 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (이는 대안적으로는 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 이와, 또는 이에 대하여, 특정 %의 아미노산 서열 동일성을 가지거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라고 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다: 100 곱하기 분수 X/Y, 여기에서 X는 서열 정렬 프로그램의 A와 B 정렬에서 그 프로그램에 의한 동일한 매치로 기록된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임은 이해할 것이다. 본원의 목적을 위해, 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이와, 또는 이에 대하여, 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성 % (이는 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이와, 또는 이에 대하여 특정 %의 핵산 서열 동일성을 나타내거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C라고 표현될 수도 있다)는 다음과 같이 계산된다: 100 곱하기 분수 W/Z, 여기서 W는 서열 정렬 프로그램의 C와 D 정렬에서 그 프로그램에 의한 동일한 매치로 기록된 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D에서의 뉴클레오티드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임은 이해할 것이다.

[0061] "분리된" 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 그것이 자연적인 환경 구성요소로부터 확인되고, 분리되고/분리되거나 회수되었음을 의미한다.

[0062] "유효량"은 임상 결과를 포함하는, 유익한 또는 원하는 결과(예를 들어, 증상의 개선, 임상적 종말점의 달성 등)를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 1 회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질환 상태의 측면에서, 유효량은 질환을 개선하거나, 안정화하거나, 또는 진행을 지연시키기에 충분한 양이다. 예를 들어, rAAV 입자의 유효량은 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산과 같은 이중 핵산의 원하는 양을 발현한다.

[0063] "개체" 또는 "대상"은 포유류이다. 포유류에는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 그리고 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 원숭이와 같은 비-인간 영장류), 토끼, 그리고 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 개체 또는 대상은 인간이다.

[0064] 본원에 사용된 "치료"는 유익한 또는 원하는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 원하는 임상 결과는 검출 가능하든 검출 불가능하든, 증상의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된 (예를 들어, 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산(예를 들어, 전이) 예방, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화 및 (부분적 또는 전체적이든) 차도를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존에 비해 연장되는 생존을 의미할 수 있다.

[0065] 본원에서 사용되는 용어 "섬유주대(trabecular meshwork)"는 눈으로부터 혈액으로 수양액을 배출하는 기능을 하는 각막 및 홍채 가까이 위치한 스폰지-유사 조직을 지칭한다. 눈으로부터 혈액으로 수양액을 배출하는 기능을 하는 각막 및 홍채 가까이 위치한 스폰지-유사 조직. 섬유주대는 수양액을 실렘관(Schlemm's canal)으로 통과시키는 내피를 싸고 있는 공간(섬유주대 공간)을 포함한다. 이는 보통 두 부분: 각막 및 공막과 접촉하고 실렘관으로 열린 각공막 섬유주 및 전방에 면하는 포도막 섬유주로 구분된다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "망막 중심"은 외부 황반 및/또는 내부 황반 및/또는 중심와를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "망막 중심 세포 유형"은, 예를 들어 RPE 및 광수용기 세포와 같은 망막 중심의 세포 유형을 지칭

한다.

- [0067] 용어 "황반"은 말초 망막과 비교하여 상대적으로 더 높은 농도의 광수용기 세포, 특히 간상체 및 추상체를 포함하는 영장류의 망막 중심의 영역을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "외부 황반"은 "말초 황반"으로 지칭될 수도 있다. 본원에서 사용되는 용어 "내부 황반"은 "중심 황반"으로 지칭될 수도 있다.
- [0068] 용어 "중심와(fovea)"는, 말초 망막 및 황반과 비교하여 상대적으로 더 높은 농도의 광수용기 세포, 특히 추상 세포를 포함하는, 직경이 대략 0.5 mm 이하의 영장류의 망막 중심에 있는 작은 영역을 지칭한다.
- [0069] 본원에서 사용되는 용어 "망막하 공간"은 광수용기 세포와 망막 색소 상피 세포 사이의 망막 위치를 지칭한다. 망막하 공간은 임의의 액체의 망막하 주사 전과 같이 잠재적 공간일 수 있다. 망막하 공간은 또한 잠재적 공간으로 주입되는 액체를 포함할 수 있다. 이 경우, 액체는 "망막하 공간과 접촉"한다. "망막하 공간과 접촉"하는 세포는 RPE 및 광수용기 세포와 같이 망막하 공간에 접하는 세포를 포함한다.
- [0070] 본원에서 사용되는 용어 "수포(bleb)"는 눈의 망막하 공간 내의 액체 공간을 지칭한다. 본 발명의 수포는 단일 공간으로 액체의 단일 주사에 의해, 동일 공간으로 하나 이상의 액체의 다중 주사에 의해, 또는 다중 공간으로 다중 주사에 의해 생성될 수 있는데, 이는 위치 전환시 망막하 공간의 원하는 부분에 걸쳐 치료적 효과를 달성하기 위해 유용한 전체 액체 공간을 생성한다.
- [0071] "닭 β-액틴(CBA) 프로모터"는 닭 β-액틴 유전자(예를 들어, 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*) 베타 액틴, GenBank Entrez Gene ID 396526)로부터 유래되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "닭 β-액틴 프로모터"는 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소, 닭 β-액틴 유전자의 프로모터 및 제1 엑손 및 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체, 예를 들어 Miyazaki, J., *et al.* (1989) *Gene* 79(2):269-77에 기술된 서열을 포함하는 프로모터를 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "CAG 프로모터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0072] "마이오실린(MYOC)"은 세포골격 기능, 세포 접착, 세포 신호전달, 및 세포 이동에 연루된 단백질(또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자)를 지칭하는 것으로, 섬유주대 유도 글루코코르티코이드 반응, GPOA, TIGR, GLC1A, JOAG, 및 JOAG1으로도 알려져 있다. 마이오실린은 많은 상이한 세포 유형에서 분비되는 단백질로서 발현된다. 눈에서, 마이오실린은 안내압(IOP)의 조절에 매우 중요한 조직인 섬유주대에 의해 수양액으로 분비되는 것으로 생각된다. 위에 기술된 바와 같이, 마이오실린에서의 돌연변이가 원발성 개방각 녹내장 사례의 서브셋, 특히 이 질환의 유전형의 이유가 되는 것으로 생각된다.
- [0073] 본원에서 사용되는 "마이오실린"은 전체-길이 전구체뿐 아니라 임의의 가공된 형태의 단백질(예를 들어, 세포로부터 분비된 성숙 단백질을) 지칭할 수 있다. 마이오실린 단백질의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 마이오실린, 예를 들어, NCBI 참조 서열 NP_000252, NP_034995, NP_001041495, 및 NP_001265779를 제한 없이 포함할 수 있다. 마이오실린 유전자의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 마이오실린 유전자, 예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 4653(MYOC, a.k.a. GPOA, JOAG, TIGR, GLC1A, 및 JOAG1), GenBank Entrez Gene ID 17926(Myoc, a.k.a. TIGR, GLC1A, 및 AI957332), GenBank Entrez Gene ID 490344, 및 GenBank Entrez Gene ID 101087632를 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0074] "R-스폰딘 1(RSP01)"은 Wnt 신호전달의 조절에 연루된 R-스폰딘 패밀리의 구성원을 지칭한다. 용어 "RSP01"은 RSP01 단백질 또는 RSP01 단백질을 암호화하는 유전자를 지칭할 수 있다. 트롬보스폰딘 유형 1 반복(TSR-1)-포함 단백질의 슈퍼패밀리의 구성원인 R-스폰딘은 신호 펩티드, TSR-1 도메인, 및 2 개의 류린-유사 반복을 포함한다. 정확한 기전은 명확하지 않지만, R-스폰딘 패밀리의 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 활성화시키는 것으로 생각된다. R-스폰딘과 Wnt 신호전달 사이의 연결에 관한 추가 설명을 위해서는, 예를 들어, Kim, K.A. *et al.* (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. *et al.* (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 및 de Lau, W.B., *et al.* (2012) *Genome Biol.* 13(3):242를 참조한다.
- [0075] 본원에서 사용되는 "RSP01"은 전체-길이 전구체뿐 아니라 임의의 가공된 형태의 단백질(예를 들어, 세포로부터 분비된 성숙 단백질을) 지칭할 수 있다. RSP01 단백질의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP01, 예를 들어, NCBI 참조 서열 NP_001229837, NP_619624, XP_00562890, 및 XP_003989918을 제한 없이 포함할 수 있다. RSP01 유전자의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP01 유전자, 예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 284654(RSP01, a.k.a. RSP0 및 CRISTIN3), GenBank Entrez Gene ID 192199(Rspo1, a.k.a. Rspodin 및 R-

spondin), GenBank Entrez Gene ID 608179, 및 GenBank Entrez Gene ID 101091033을 제한 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RSP01은 RSP01의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP01 변종은 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실(예를 들어, 절단)을 포함하지만, 전체-길이 RSP01의 하나 이상의 활성(예를 들어, Wnt 신호전달 활성화, 이의 분석은 본원에 기술 및/또는 예시됨)과 관련하여 일부 또는 모든 활성을 유지할 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP01 변종은 절단된 RSP01이다. 절단된 RSP01 폴리펩티드의 예로는 SEQ ID NO:11 및 12, 또는 신호 펩티드가 절여된 SEQ ID NO:11 및 12의 가공된 형태를 제한 없이 포함한다.

[0076] "R-스폰딘 2(RSP02)"는 Wnt 신호전달의 조절에 연루된 R-스폰딘 패밀리의 구성원을 지칭한다. 용어 "RSP02"는 RSP02 단백질 또는 RSP02 단백질을 암호화하는 유전자를 지칭할 수 있다. 트롬보스폰딘 유형 1 반복(TSR-1)-포함 단백질의 수퍼패밀리의 구성원인 R-스폰딘은 신호 펩티드, TSR-1 도메인, 및 2 개의 푸린-유사 반복을 포함한다. 정확한 기전은 명확하지 않지만, R-스폰딘 패밀리의 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 활성화시키는 것으로 생각된다. R-스폰딘과 Wnt 신호전달 사이의 연결에 관한 추가 설명을 위해서는, 예를 들어, Kim, K.A. *et al.* (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. *et al.* (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 및 de Lau, W.B., *et al.* (2012) *Genome Biol.* 13(3):242를 참조한다.

[0077] 본원에서 사용되는 "RSP02"는 전체-길이 전구체뿐 아니라 임의의 가공된 형태의 단백질(예를 들어, 세포로부터 분리된 성숙 단백질)을 지칭할 수 있다. RSP02 단백질의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP02, 예를 들어, NCBI 참조 서열 NP_848660, NP_766403, XP_005627927, 및 XP_004000104를 제한 없이 포함할 수 있다. RSP02 유전자의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP02 유전자, 예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 340419(RSP02, a.k.a. *CRISTIN2*), GenBank Entrez Gene ID 239405(*Rspo2*, a.k.a. *ftls*, *AA673245*, *D430027K22* 및 *2610028F08Rik*), GenBank Entrez Gene ID 482004, 및 GenBank Entrez Gene ID 101087380을 제한 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RSP02는 RSP02의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP02 변종은 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실(예를 들어, 절단)을 포함하지만, 전체-길이 RSP02의 하나 이상의 활성(예를 들어, Wnt 신호전달 활성화, 이의 분석은 본원에 기술 및/또는 예시됨)과 관련하여 일부 또는 모든 활성을 유지할 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP02 변종은 절단된 RSP02이다. 절단된 RSP02 폴리펩티드의 예로는 SEQ ID NO:13 및 14, 또는 신호 펩티드가 절여된 SEQ ID NO:13 및 14의 가공된 형태를 제한 없이 포함한다.

[0078] "R-스폰딘 3(RSP03)"은 Wnt 신호전달의 조절에 연루된 R-스폰딘 패밀리의 구성원을 지칭한다. 용어 "RSP03"은 RSP03 단백질 또는 RSP03 단백질을 암호화하는 유전자를 지칭할 수 있다. 트롬보스폰딘 유형 1 반복(TSR-1)-포함 단백질의 수퍼패밀리의 구성원인 R-스폰딘은 신호 펩티드, TSR-1 도메인, 및 2 개의 푸린-유사 반복을 포함한다. 정확한 기전은 명확하지 않지만, RSP03는 Wnt 신호전달을 활성화시키는 것으로 생각되고, 마우스 및 제노푸스에서 RSP03 기능의 손실은 Wnt 기능 표현형의 손실을 야기한다(Kazanskaya, O., *et al.* (2008) *Development* 135:3655-64). R-스폰딘과 Wnt 신호전달 사이의 연결에 관한 추가 설명을 위해서는, 예를 들어, de Lau, W.B., *et al.* (2012) *Genome Biol.* 13(3):242를 참조한다.

[0079] 본원에서 사용되는 "RSP03"은 전체-길이 전구체뿐 아니라 임의의 가공된 형태의 단백질(예를 들어, 세포로부터 분리된 성숙 단백질)을 지칭할 수 있다. RSP03 단백질의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP03, 예를 들어, NCBI 참조 서열 NP_116173, NP_082627, XP_005615677, 및 XP_003986583을 제한 없이 포함할 수 있다. RSP03 유전자의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP03 유전자, 예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 84870(RSP03, a.k.a. *PWTSR*, *THSD2*, 및 *CRISTIN1*), GenBank Entrez Gene ID 72780(*Rspo3*, a.k.a. *Thsd2*, *Cristin1*, *AW742308*, 및 *2810459H04Rik*), GenBank Entrez Gene ID 476287, 및 GenBank Entrez Gene ID 101085635를 제한 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RSP03는 RSP03의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP03 변종은 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실(예를 들어, 절단)을 포함하지만, 전체-길이 RSP03의 하나 이상의 활성(예를 들어, Wnt 신호전달 활성화, 이의 분석은 본원에 기술 및/또는 예시됨)과 관련하여 일부 또는 모든 활성을 유지할 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP03 변종은 절단된 RSP03이다. 절단된 RSP03 폴리펩티드의 예로는 SEQ ID NO:15 내지 17, 또는 신호 펩티드가 절여된 SEQ ID NO:15 내지 17의 가공된 형태를 제한 없이 포함한다.

[0080] "R-스폰딘 4(RSP04)"는 Wnt 신호전달의 조절에 연루된 R-스폰딘 패밀리의 구성원을 지칭한다. 용어 "RSP04"는 RSP04 단백질 또는 RSP04 단백질을 암호화하는 유전자를 지칭할 수 있다. 트롬보스폰딘 유형 1 반복(TSR-1)-포함 단백질의 수퍼패밀리의 구성원인 R-스폰딘은 신호 펩티드, TSR-1 도메인, 및 2 개의 푸린-유사 반복을 포함한다. 정확한 기전은 명확하지 않지만, R-스폰딘 패밀리의 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 활성화시키는 것으로 생각된다. R-스폰딘과 Wnt 신호전달 사이의 연결에 관한 추가 설명을 위해서는, 예를 들어, Kim, K.A. *et al.*

(2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. *et al.* (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. and Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; 및 de Lau, W.B., *et al.* (2012) *Genome Biol.* 13(3):242를 참조한다.

- [0081] 본원에서 사용되는 "RSP04"는 전체-길이 전구체뿐 아니라 임의의 가공된 형태의 단백질(예를 들어, 세포로부터 분리된 성숙 단백질)을 지칭할 수 있다. RSP04 단백질의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP04, 예를 들어, NCBI 참조 서열 NP_001025042, NP_001035779, XP_542937, 및 XP_011279253을 제한 없이 포함할 수 있다. RSP04 유전자의 예로는 인간, 마우스, 개, 및 고양이 RSP03 유전자, 예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 343637(*RSP04*, a.k.a. *CRISTINA* 및 *C20orf182*), GenBank Entrez Gene ID 228770(*Rspo4*, a.k.a. *A730099F22* 및 *A930029K19Rik*), GenBank Entrez Gene ID 485813, 및 GenBank Entrez Gene ID 101091527을 제한 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RSP04는 RSP04의 기능적 변종이다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP04 변종은 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실(예를 들어, 절단)을 포함하지만, 전체-길이 RSP04의 하나 이상의 활성(예를 들어, Wnt 신호전달 활성, 이의 분석은 본원에 기술 및/또는 예시됨)과 관련하여 일부 또는 모든 활성을 유지할 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 RSP04 변종은 절단된 RSP04이다. 절단된 RSP04 폴리펩티드의 예로는 SEQ ID NO:18 및 19, 또는 신호 펩티드가 절여된 SEQ ID NO:18 및 19의 가공된 형태를 제한 없이 포함한다.
- [0082] 본원에서 사용되는 "RNA 간섭(RNAi)"은, 전형적으로 특이적 mRNA 분자의 파괴를 야기함으로써, RNA 분자가 유전자 발현을 억제하는 생물학적 과정이다. RNAi의 예로는 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 소형 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함한다.
- [0083] 본원에서 사용되는 "소형 헤어핀 RNA" 또는 "짧은 헤어핀 RNA"(shRNA)는, 예를 들어 RNA 간섭에 의해, 표적 유전자 발현을 억제시키기 위해 사용될 수 있는 헤어핀 급전화를 만드는 RNA 분자이다.
- [0084] "Wnt 신호전달"은 Wnt 단백질과 프리즐드(Frizzled, Fz) 패밀리 수용체 사이의 상호작용에 의해 조절되는 일군의 관련된 세포 신호전달 경로를 지칭한다(검토를 위해서는, 예를 들어, Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:781-810 참조). 이들 경로는 광범위한 발생 및 발병 과정에 연루된다. 본원에서 사용되는 용어 "Wnt 신호전달"은 달리 특정되지 않는 한, 표준 Wnt 경로, Wnt/평면 세포 극성(PCP) 경로, 및/또는 Wnt/갈슘 경로의 일부 또는 전체를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 표준 Wnt 경로에서 Wnt의 프리즐드/LRP 수용체 복합체로의 결합은 흩어진(Dishevelled, Dsh), 액틴, 선종성 결장 폴립증(APC), 및 글리코겐 신타제 키나아제(GSK-3) 활성의 조절을 야기하여, 궁극적으로 베타-카테닌의 분해를 억제한다. 다음에 베타-카테닌은 핵으로 전위하고, 예를 들어, 림포이드 인핸서-결합 인자 1/T 세포-특이적 전사 인자(LEF/TCF) 전사 인자와 함께, 유전자 전사를 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 베타-카테닌 활성은(예를 들어, Molenaar, M., *et al.* (1996) *Cell* 86(3):391-9에 특성화된 것과 같은 TOP-Flash 분석에 의해) Wnt 신호전달을 위한 판독으로 분석될 수 있다.
- [0085] 본원에서 값 또는 매개변수의 "약(about)"에 대한 언급은 그 값 또는 매개변수 그 자체를 대상으로 하는 구현예를 포함한다(그리고 설명한다). 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다.
- [0086] 본원에서 사용되는 관사의 단수형 "a", "an" 및 "the"는 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.
- [0087] 본원에 기술된 본 발명의 양태 및 구현예는, 양태 및 구현예를 "포함하는", 이들로 "이루어지는" 및/또는 이들로 "필수적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0088] **III. 치료의 방법**
- [0089] 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달된다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 원발성 개방각 녹내장(POAC)이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장은 유년형의 원발성 개방각 녹내장(JOAC)이다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간(예를 들어, POAC가 있는 인간 또는 JOAC가 있는 인간)이다. 일부 구현예에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 포유류는 돌연변이된 MYOC를 갖는다. 일부 구현예에서, 돌연변이된 MYOC는 인간 MYOC의 E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H, 및 I477S에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서 돌연변이된 MYOC 유전자는 인간 MYOC의 P370L 및/또는 Y437H 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자의 유효량을 인간의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 인간에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장의 증상을 감소; 예를 들어, 안내압을 감

소, 섬유주대에서 MYOC의 축적을 감소, 고안압을 감소, 또는 섬유주대로부터 방수 배출을 증가시키기 위하여 사용된다.

[0090] 일부 양태에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC)의 발현을 표적으로 하는 MYOC RNAi를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자를 포유류의 눈에 투여하는 단계를 포함하는, 시각 장애를 갖는 포유류에서 섬유주대에서의 Wnt 신호전달을 증진시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, Wnt 신호전달은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi를 발현하는 하나 이상의 바이러스 입자를 사용하여 증진되는데; 예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및 MYOC RNAi는 동일한 rAAV 바이러스 계통으로부터, 또는 상이한 재조합 바이러스 계통을 갖는 rAAV 벡터로부터 발현될 수 있다.

[0091] **치료적 벡터**

[0092] 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되며; 예를 들어, 치료적 벡터는 치료적 핵산 및/또는 치료적 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 치료적 핵산 및/또는 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 치료적 AAV 벡터는 표준 합성 및 재조합 방법을 사용하여 해당 분야에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 자극하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 돌연변이 MYOC의 존재 중에 Wnt 신호전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 인간 돌연변이 MYOC의 존재 중에 Wnt 신호전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 녹내장과 관련된 인간 돌연변이 MYOC의 존재 중에 Wnt 신호전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 MYOC는 P370L 및/또는 Y437H 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이된 MYOC는 인간 MYOC의 E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H, 및 I477S에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위한 rAAV 벡터를 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 R-스폰딘(RSP0) 폴리펩티드(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종)를 암호화한다. 일부 구현예에서, RSP01 폴리펩티드는 인간 RSP01이다. 일부 구현예에서, RSP01은 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열, 또는 이의 기능적 변종을 포함한다. RSP01 기능적 변종의 예로는 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실을 갖는 RSP01을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP01은 Wnt 신호전달을 자극하는 능력을 유지하면서(예를 들어, 돌연변이 MYOC의 존재 중에), SEQ ID NO:8의 아미노산 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 치환, 부가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP01은 SEQ ID NO:8과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP01은 절단된 RSP01이다. 일부 구현예에서, 절단된 RSP01은 하나 이상의 푸린-유사 Cys-풍부 도메인(예를 들어, FU1 및/또는 FU2)을 포함하지만 다음 중 하나 이상이 결여될 수 있다: 신호 펩티드, 트롬보스폰딘 유형 1 도메인(예를 들어, TSR-1 또는 TSP1), 및/또는 양으로 하전된 C-말단 도메인(예를 들어, 이분 NLS 및/또는 BR 도메인을 포함하는; 참조를 위해 도 11 내지 13c 참조). 특정 구현예에서, 절단된 RSP01은 SEQ ID NO:11 및/또는 12, 또는 신호 펩티드가 결여된 SEQ ID NO:11 및/또는 12의 가공된 형태를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 절단된 RSP01은 SEQ ID NO:11 및/또는 12와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02 폴리펩티드는 인간 RSP02이다. 일부 구현예에서, RSP02는 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열, 또는 이의 기능적 변종을 포함한다. RSP02 기능적 변종의 예로는 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실을 갖는 RSP02를 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP02는 Wnt 신호전달을 자극하는 능력을 유지하면서(예를 들어, 돌연변이 MYOC의 존재 중에), SEQ ID NO:9의 아미노산 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 치환, 부가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP02는 SEQ ID NO:9와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP02는 절단된 RSP02이다. 일부 구현예에서, 절단된 RSP02는 하나 이상의 푸린-유사 Cys-풍부 도메인(예를 들어, FU1 및/또는 FU2)을 포함하지만 다음 중 하나 이상이 결여될 수 있다: 신호 펩티드, 트롬보스폰딘 유형 1 도메인(예를 들어, TSR-1 또는 TSP1), 및/또는 양으로 하전된 C-말단 도메인(예를 들어, 이분 NLS 및/또는 BR 도메인을 포함하는; 참조를 위해 도 11 내지 13c 참조). 특정 구현예에서, 절단된 RSP02는 SEQ ID NO:13 및/또는 14, 또는 신호 펩티드가 결여된 SEQ ID NO:13 및/또는 14의 가공된 형태를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 절단된 RSP02는 SEQ ID NO:13 및/또는 14와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을

갖는다. 일부 구현예에서, RSP03 폴리펩티드는 인간 RSP03이다. 일부 구현예에서, RSP03은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열, 또는 이의 기능적 변종을 포함한다. RSP03 기능적 변종의 예로는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실을 갖는 RSP03을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP03은 Wnt 신호전달을 자극하는 능력을 유지하면서(예를 들어, 돌연변이 MYOC의 존재 중에), SEQ ID NO:1의 아미노산 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 치환, 부가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP03은 SEQ ID NO:1와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP03은 절단된 RSP03이다. 일부 구현예에서, 절단된 RSP03은 하나 이상의 퓨린-유사 Cys-풍부 도메인(예를 들어, FU1 및/또는 FU2)을 포함하지만 다음 중 하나 이상이 결여될 수 있다: 신호 펩티드, 트롬보스폰딘 유형 1 도메인(예를 들어, TSR-1 또는 TSP1), 및/또는 양으로 하전된 C-말단 도메인(예를 들어, 이분 NLS 및/또는 BR 도메인을 포함하는; 참조를 위해 **도 11 내지 13c** 참조). 특정 구현예에서, 절단된 RSP03은 SEQ ID NO:15, 16, 및/또는 17, 또는 신호 펩티드가 결여된 SEQ ID NO:15, 16, 및/또는 17의 가공된 형태를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 절단된 RSP03은 SEQ ID NO:15, 16, 및/또는 17과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04 폴리펩티드는 인간 RSP04이다. 일부 구현예에서, RSP04는 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열, 또는 이의 기능적 변종을 포함한다. RSP02 기능적 변종의 예로는 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실을 갖는 RSP02를 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP04는 Wnt 신호전달을 자극하는 능력을 유지하면서(예를 들어, 돌연변이 MYOC의 존재 중에), SEQ ID NO:10의 아미노산 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 치환, 부가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 변종 RSP04는 SEQ ID NO:10과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, RSP04는 절단된 RSP04이다. 일부 구현예에서, 절단된 RSP04는 하나 이상의 퓨린-유사 Cys-풍부 도메인(예를 들어, FU1 및/또는 FU2)을 포함하지만 다음 중 하나 이상이 결여될 수 있다: 신호 펩티드, 트롬보스폰딘 유형 1 도메인(예를 들어, TSR-1 또는 TSP1), 및/또는 양으로 하전된 C-말단 도메인(예를 들어, 이분 NLS 및/또는 BR 도메인을 포함하는; 참조를 위해 **도 11 내지 13c** 참조). 특정 구현예에서, 절단된 RSP04는 SEQ ID NO:18 및/또는 19, 또는 신호 펩티드가 결여된 SEQ ID NO:18 및 19의 가공된 형태를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 절단된 RSP04는 SEQ ID NO:18 및/또는 19와 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%보다 큰 동일성을 갖는다.

[0094] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닥 β-액틴(CBA) 프로모터이다.

[0095] 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되며; 예를 들어, 치료적 벡터는 치료적 핵산 및/또는 치료적 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 치료적 핵산 및/또는 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 치료적 AAV 벡터는 표준 합성 및 재조합 방법을 사용하여 해당 분야에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료적 핵산은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 인간 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 인간 MYOC는 P370L 아미노산 치환 및/또는 Y437 아미노산 치환을 포함한다. 치료적 핵산의 비제한적 예는 RNAi, 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 소형 헤어핀 RNA(shRNA) 및/또는 리보자임(해머헤드 및 헤어핀 리보자임과 같은)을 포함한다. 일부 구현예에서, MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화하는 이중 핵산은 MYOC(예를 들어, 야생형 및 돌연변이 MYOC)의 발현을 감소 또는 억제시키는 shRNA이다.

[0096] 일부 양태에서, 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되고, 벡터는 하나 이상의 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 표준 합성 및 재조합 방법을 사용하여 해당 분야에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 치료적 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 자극한다.

- [0097] 일부 양태에서, 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되고, 벡터는 하나 이상의 치료적 폴리펩티드 및 하나 이상의 치료적 핵산을 암호화하는 핵산을 포함한다. 치료적 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 표준 합성 및 제조 방법 사용하여 해당 분야에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 표적으로 하고 치료적 핵산은 MYOC 발현을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 인간 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 인간 MYOC는 P370L 아미노산 치환 및/또는 Y437 아미노산 치환을 포함한다. 치료적 핵산의 비제한적 예는 RNAi, siRNA, miRNA, shRNA 및/또는 리보자임을 포함한다.
- [0098] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 유전자 치료의 방법을 제공하는데, 여기에서 하나 이상의 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자가 포유류에 투여되고, 하나 이상의 치료적 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자가 포유류에 투여된다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 표적으로 하고 치료적 핵산은 MYOC 발현을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 치료적 폴리펩티드는 Wnt 신호전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산은 돌연변이 인간 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 인간 MYOC는 P370L 아미노산 치환 및/또는 Y437 아미노산 치환을 포함한다. 치료적 핵산의 비제한적 예는 RNAi, siRNA, miRNA, shRNA 및/또는 리보자임을 포함한다. 하나 이상의 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자 및 하나 이상의 치료적 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류에 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 하나 이상의 치료적 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자가 투여되기 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료적 폴리펩티드를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 하나 이상의 치료적 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자가 투여된 후에 투여된다.
- [0099] 본 발명의 핵산은 세포내 단백질이거나, 세포 멤브레인에 고정되거나, 세포 내에 남아있거나, 본 발명의 벡터로 형질도입된 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 벡터를 수용한 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드에서; 바람직하게 폴리펩티드는 가용성(즉, 세포에 부착되지 않은)이다. 예를 들어, 가용성 폴리펩티드는 막관통 영역이 없고 세포로부터 분비된다. 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 확인 및 제거하기 위한 기술은 해당 분야에 알려져 있다.
- [0100] 본 발명에 따라 투여될 수 있는 벡터는 또한, 벡터의 핵산으로부터 전사될 때 본 발명의 질환 상태와 관련된 비정상 또는 과잉 단백질; 예를 들어, MYOC의 번역 또는 전사에 간섭함으로써 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료할 수 있는 RNA(예를 들어, shRNA, RNAi, 리보자임, miRNA, siRNA, 안티센스 RNA)를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 예시에서, 본 발명의 핵산은 비정상 및/또는 과잉 단백질을 암호화하는 mRNA의 고도로 특이적인 제거 또는 감소에 의해 질환을 치료하는 RNA를 암호화할 수 있다. 치료적 RNA 서열은, 다양한 형태의 유전적 망막 변성에서 존재하는 것과 같은 비정상 및/또는 과잉 단백질을 암호화하는 mRNA의 고도로 특이적인 제거 또는 감소에 의해 질환을 치료할 수 있는 소형 헤어핀 RNA (shRNA), RNAi, 소형 억제성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 및/또는 리보자임(해머헤드 및 헤어핀 리보자임과 같은)을 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 이들 서열을 암호화하는 핵산 및 치료적 RNA 서열의 예는, 예를 들어, 이의 개시가 전체로서 본원에 참조로 도입되는 미국 특허 번호 6,225,291에 기술된 것들을 포함한다.
- [0101] 본 발명의 일부 구현예에서, 치료적 RNA 서열은 MYOC의 발현을 표적으로 하는 RNAi(예를 들어, shRNA) 서열이다. 일부 구현예에서, MYOC의 발현을 표적으로 하는 RNAi(예를 들어, shRNA) 서열은 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시키는 RNAi(예를 들어, shRNA) 서열이다. 일부 구현예에서, RNAi(예를 들어, shRNA)는 인간 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, RNAi(예를 들어, shRNA)는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 MYOC의 발현을 감소 또는 억제시킨다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)는 MYOC의 QAMSVIH(SEQ ID NO:6) 아미노산 서열을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 MYOC의 발현을 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) 하나 보다 많은 RNAi(예를 들어, shRNA)를 포함하는 벡터를 암호화한다. 일부 구현예에서, MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 루프 서열은 핵산 서열 AATAGTGAAGCCACAGATGTATT(SEQ ID NO:7)을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 MYOC의 발현을 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) 1, 2, 3, 4, 또는 5 이상의 RNAi(예를 들어, shRNA)를 포함하는 벡터를

암호화한다.

[0102] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유류의 눈에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 섬유주대의 세포에서 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β -액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다.

[0103] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 본원에 기술되는 임의의 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 본원에 기술되는 임의의 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산은 상이한 rAAV 게놈에 존재한다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산은 동일한 rAAV 게놈에 존재한다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산은 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산은 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산에 대하여 5'이다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산은 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산에 대하여 3'이다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 핵산 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되는데, 여기에서 핵산은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종과 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA) 핵산 사이에 내부 리보솜 유입점(IRES)을 포함한다.

[0104] **rAAV 조성물**

[0105] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술되는 임의의 rAAV 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일반적으로 본 발명의 방법 및 시스템에서의 사용을 위한 조성물은, 바람직하게는 약제학적으로 허용 가능한 부형제에, 폴리펩티드 및/또는 RNA를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자의 유효량을 포함한다. 해당 분야에 잘 알려져 있듯이, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 약물학적으로 유효한 물질의 투여를 용이하게 하고 액체 용액 또는 현탁액으로서, 유액으로서, 또는 사용 전 액체 중에 현탁 또는 용해시키기 적절한 고체 형태로서 공급될 수 있는 상대적으로 불활성인 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 밀도를 부여하거나 희석제로서 작용할 수 있다. 적절한 부형제로는 안정화제, 습윤 및 유화제, 삼투압을 변화시키기 위한 염, 캡슐화제, pH 완충 물질, 및 완충제가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 부형제는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는, 눈으로의 직접적 투여에 적절한 임의의 약제학적 물질을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 소르비톨, 임의의 다양한 TWEEN 화합물, 그리고 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용 가능한 염은, 예를 들어 염화수소산, 브롬화수소산, 인산염, 황산염 등과 같은 광산염; 그리고 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등과 같은 유기산의 염이 그 안에 포함될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제의 철저한 논의는 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub. Co., N.J. 1991)에서 이용 가능하다.

[0106] 일반적으로, 이들 조성물은 눈 주사(예를 들어, 유리체내, 전방내, 망막하)에 의한 투여를 위해 제형화된다. 따라서, 이들 조성물은 바람직하게는 염수, 링거의 평형 염 용액(Ringer's balanced salt solution, pH 7.4) 등과 같은 약제학적으로 허용 가능한 비히클과 조합된다. 비록 요구되지는 않지만, 조성물은 정확한 양의 투여에 적절한 단위 제형으로 선택적으로 공급될 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장의 치료를 위한 rAAV의 약제학적 제형을 제공한다. 일부 구현예에서, 제형은 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 제형은 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 제형은 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 제형은 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자, 및 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포함한다.

- [0108] **rAAV의 눈 전달 방법**
- [0109] 일부 양태에서, 본 발명은 포유류의 눈에 rAAV 입자를 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 RSP01, RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터, 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 유리체내 및/또는 전방내 주사에 의해 눈으로 전달된다. rAAV 입자를 눈에 투여하는 방법은 해당 분야에 알려져 있다.
- [0110] 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되는데, 여기에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)는 눈의 섬유주대에서 발현된다. 일부 구현예에서, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자는 포유류의 눈으로 전달되어, 여기에서 눈의 다른 부분에 형질도입된다(예를 들어, 망막 신경절 세포). R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드를 포함하는 rAAV 입자의 사용은 섬유주대의 세포의 형질 도입을 용이하게 할 수 있다.
- [0111] 눈의 세포(예를 들어, 섬유주대의 세포)를 치료적 폴리펩티드 또는 핵산 서열을 포함하는 벡터로 안전하고 효과적으로 형질도입하는 것에 의해, 본 발명의 방법은 개체; 예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 인간을 치료하기 위해 사용될 수 있는데, 여기에서 형질도입된 세포는 마이오실린(MYOC) 녹내장(예를 들어, POAC 또는 JOAC)을 치료하기에 충분한 양으로 치료적 폴리펩티드 또는 RNA 서열을 생산한다. 일부 구현예에서, 눈의 세포의 형질도입은 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 AAV 캡시드 단백질의 R471A 아미노산 치환을 포함하는 rAAV2 입자를 사용하는 것에 의해 개선된다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 섬유주대의 세포의 증가된 형질도입; 예를 들어, 섬유주대의 세포의 약 10%, 25%, 50%, 75%, 100% 또는 그 사이의 임의 숫자 보다 많은 형질도입을 보여준다.
- [0112] 유효량의 rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태)는 치료의 목적에 따라 투여된다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입이 원하는 치료적 효과를 달성할 수 있다면, 치료의 목적은 일반적으로 이 수준의 형질도입에 부합하거나 초과한다. 일부 경우에, 이 수준의 형질도입은 단지 약 1 내지 5%의 표적 세포(예를 들어, 섬유주대의 세포), 일부 구현예에서 적어도 약 20%의 원하는 조직 유형의 세포, 일부 구현예에서 적어도 약 50%, 일부 구현예에서 적어도 약 80%, 일부 구현예에서 적어도 약 95%, 일부 구현예에서 적어도 약 99%의 원하는 조직 유형의 세포의 형질도입에 의해 달성될 수 있다. 지침으로서, 주사 당 투여되는 입자의 수는 일반적으로 약 1×10^6 내지 약 1×10^{14} 입자 사이, 약 1×10^7 내지 약 1×10^{13} 입자 사이, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{12} 입자 사이 또는 약 1×10^9 입자, 약 1×10^{10} 입자, 또는 약 1×10^{11} 입자이다. rAAV 조성물은 하나 이상의 눈 주사에 의해, 동일 절차 동안 또는 수일, 수주, 수개월, 또는 수년 간격으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 벡터가 인간을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0113] AAV 바이러스 입자에 의해 형질도입된 눈의 세포를 확인하기 위한 방법은 해당 분야에 알려져 있고; 예를 들어, 면역조직화학 또는 증진된 녹색 형광 단백질과 같은 표지의 사용이 바이러스 입자; 예를 들어 아미노산의 하나 이상의 치환을 갖는 rAAV 캡시드를 포함하는 바이러스 입자의 형질도입을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 방법은 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 개체; 예를 들어, POAC 또는 JOAC가 있는 인간을 치료하기 위해 포유류에 AAV 바이러스 입자의 유효량을 유리체내 및/또는 전방내 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 눈의 세포(예를 들어, 섬유주대의 세포)에서 이중 핵산의 발현을 허용하도록 눈에서 하나 이상의 위치로 주사된다. 일부 구현예에서, 조성물은 눈에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 위치 중 임의의 하나로 주사된다.
- [0115] 일부 구현예에서 rAAV 캡시드를 포함하는 rAAV 바이러스 입자는 하나보다 많은 위치에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 다중 주사는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간 또는 24 시간 이하의 간격을 둔다.
- [0116] **망막하 전달의 방법**
- [0117] 망막하 전달의 방법은 해당 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 도입되는 WO 2009/105690 참조. 간단하게, rAAV 입자(예를 들어, rAAV2 입자)를 중심와 및 황반의 망막하로 전달하기 위한 일반적인 방법은 다음의 간략한 개요로 예시될 수 있다. 이 예시는 단지 이 방법의 특정 특징을 예시함을 의미하고, 어떤 방식으로든

한정을 의미하지 않는다.

- [0118] 일반적으로, rAAV 벡터는 수술 현미경을 사용하는 직접적 관찰 하에 안내로(망막하로) 주사되는 조성물의 형태로 전달될 수 있다. 일부 구현예에서 벡터는 rAAV 입자에 캡시드화되는데, 여기에서 rAAV 입자는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸과 상호작용하는(예를 들어, HSPG 결합을 감소 또는 억제 또는 제거시키는) 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 rAAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 캡시드, 그리고 이중 핵산 및 적어도 하나의 AAV 역위 말단 반복을 포함하는 rAAV 벡터를 포함한다. 이 절차는 유리체절제에 이어서, 망막하 공간으로 하나 이상의 작은 망막절개를 통해 미세 캐놀라를 사용한 rAAV 벡터 현탁액의 주사를 포함할 수 있다.
- [0119] 간단하게는, 수술 동안 (예를 들어, 식염수의) 주입에 의해 정상적인 구체 용적을 유지하기 위해 주입 캐놀라를 제자리에 봉합시킬 수 있다. 유리체절제는 적절한 구멍 크기(예를 들어 20 내지 27 게이지)의 캐놀라를 사용하여 수행되는데, 여기에서 제거되는 유리체 겔의 용적은 주입 캐놀라로부터 식염수 또는 다른 등장성 용액의 주입에 의해 대체된다. 유리체절제는, (1) 이의 피질(뒤쪽의 유리양 멤브레인)의 제거가 캐놀라에 의한 망막의 관통을 유리하게 하고; (2) 이의 제거 및 액체(예를 들어, 식염수)로의 대체가 벡터의 안내 주사를 수용하기 위한 공간을 생성하고, 그리고 (3) 이의 조절된 제거는 망막 찢어짐 및 미리 계획하지 않은 망막 분리의 가능성을 감소시키기 때문에 유리하게 수행된다.
- [0120] 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 적절한 구멍 크기(예를 들어, 27 내지 45 게이지)의 캐놀라를 사용하는 것에 의해 망막 중심 외부의 망막하 공간으로 직접 주사되어, 망막하 공간에 수포를 생성한다. 다른 구현예에서, rAAV 조성물의 망막하 주사는 망막 중심 외부의 망막하 공간으로 적절한 액체(식염수 또는 링거액과 같은)의 작은 용적(예를 들어, 약 0.1 내지 약 0.5 mL)의 망막하 주사 다음에 온다. 망막하 공간으로의 이러한 초기 주사는 망막하 공간 내에 초기 액체 수포를 형성하여, 초기 수포의 위치에서 국제화된 망막 분리를 야기한다. 이러한 초기 액체 수포는 망막하 공간으로 rAAV 조성물의 표적화된 전달을 용이하게 하고(rAAV 전달 전 주사 평면을 한정함으로써), 맥락막으로의 rAAV 전달 가능성 및 유리체강으로의 rAAV 주사 또는 역류 가능성을 최소화할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 초기 액체 수포에 하나 이상의 rAAV 조성물 및/또는 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 액체를 추가로 주사할 수 있는데, 동일 또는 추가의 미세 구멍 캐놀라로 초기 액체 수포에 이들 액체를 직접적으로 투여하는 것에 의한다.
- [0121] rAAV 조성물 및/또는 초기 작은 용적의 액체의 안내 투여는 시린지에 부착된 미세 구멍 캐놀라(예를 들어, 27 내지 45 게이지)를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 이 시린지의 플런저는 발 페달을 누르는 것과 같은 기계화된 장치에 의해 구동될 수 있다. 미세 구멍 캐놀라는 표적으로 하는 망막의 구역(그러나 망막 중심의 외부)에 따라 각각의 대상에서 사전-결정된 위치에 망막으로 유리체강을 가로질러 공막절개를 통해 진행된다. 직접적인 시각화 하에서 벡터 현탁액은 감각신경 망막 아래 기계적으로 주사되어, 자동-밀봉 비-팽창 망막절개로 국제화된 망막 분리를 야기한다. 위에서 언급한 바와 같이, rAAV 조성물은 망막하 공간으로 직접적으로 주사될 수 있어 망막 중심 외부에 수포를 생성하거나, 벡터가 망막 중심 외부에서 초기 수포로 주사될 수 있어, 이의 팽창(및 망막 분리 구역의 팽창)을 야기한다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물의 주사에 이어 다른 액체의 수포로의 주사가 뒤따른다.
- [0122] 이론에 구애받지 않고, 망막하 주사(들)의 속도 및 위치는 황반, 중심와 및/또는 아래의 RPE 세포를 손상시킬 수 있는 국제화된 전달력을 야기할 수 있다. 망막하 주사는 전달력을 최소화 또는 회피하는 속도로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 15 내지 17 분에 걸쳐 주사된다. 일부 구현예에서, 벡터는 약 17 내지 20 분에 걸쳐 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 20 내지 22 분에 걸쳐 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 35 내지 약 65 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 35 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 40 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 45 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 50 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 55 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 60 μl /분의 속도로 주사된다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 약 65 μl /분의 속도로 주사된다. 해당 분야의 당업자는 수포의 주사 속도 및 시간은, 예를 들어 망막 중심의 세포로 접근하기 위해 충분한 망막 분리를 생성하는데 필요한 수포의 크기 또는 rAAV 조성물의 용적, rAAV 조성물을 전달하는 데 사용되는 캐놀라의 크기, 그리고 본 발명의 캐놀라의 위치를 안전하게 유지하기 위한 능력에 의해 지시될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0123] 본 발명의 일부 구현예에서, 망막의 망막하 공간으로 주사되는 조성물의 용량은 1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl , 7 μl , 8 μl , 9 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 25 μl , 50 μl , 75 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500

μl , 600 μl , 700 μl , 800 μl , 900 μl , 또는 1 mL, 또는 그 사이의 임의의 양의 대략 임의의 하나보다 많다.

[0124] 하나 또는 복수(예를 들어, 2, 또는 3 이상) 수포가 생성될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 시스템에 의해 생성되는 수포 또는 수포들의 총 용적은 눈의 액체 용적, 예를 들어 전형적인 인간 대상에서 약 4 mL를 초과할 수 없다. 최적의 조작을 위한 충분한 의존도의 수포를 생성하고 망막 중심의 세포 유형을 노출시키기에 충분한 크기의 망막 분리를 용이하게 하기 위해, 각각의 개별 수포의 총 용적은, 바람직하게는 적어도 약 0.3 mL, 그리고 더욱 바람직하게는 적어도 약 0.5 mL이다. 해당 분야의 당업자는 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 수포를 생성시키는 데 있어서 안구 구조에 대한 손상을 회피하기 위해 적절한 안내압이 유지되어야 함을 인정할 것이다. 각각의 개별 수포의 크기는, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 1.2 mL, 약 0.8 내지 약 1.2 mL, 약 0.9 내지 약 1.2 mL, 약 0.9 내지 약 1.0 mL, 약 1.0 내지 약 2.0 mL, 약 1.0 내지 약 3.0 mL일 수 있다. 따라서, 일 실시예에서, 총 3 mL의 rAAV 조성물 현탁액을 주사하기 위해, 각각 약 1 mL의 3 개 수포가 형성될 수 있다. 조합에서 모든 수포의 총 용적은, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 3.0 mL, 약 0.8 내지 약 3.0 mL, 약 0.9 내지 약 3.0 mL, 약 1.0 내지 약 3.0 mL, 약 0.5 내지 약 1.5 mL, 약 0.5 내지 약 1.2 mL, 약 0.9 내지 약 3.0 mL, 약 0.9 내지 약 2.0 mL, 약 0.9 내지 약 1.0 mL일 수 있다.

[0125] 수포의 원래의 위치 가장자리 바깥의 표적 망막 구역(예를 들어, 망막 중심)에 안전하고 효과적으로 형질도입하기 위해, 수포가 형질도입의 표적 구역으로 재배치되도록 수포를 조작할 수 있다. 수포의 조작은 수포의 용적에 의해 생성되는 수포의 의존도, 수포를 포함하는 눈의 재배치, 하나 이상의 수포를 함유하는 눈 또는 눈들이 있는 인간의 두부의 재배치, 및/또는 액체-공기 교환에 의해 일어날 수 있다. 이것은 특히 망막 중심과 관련되는데, 이 구역이 전형적으로 망막하 주사에 의한 분리에 저항하기 때문이다. 일부 구현예에서 액체-공기 교환이 수포의 재배치에 이용되는데; 주입 캐놀라로부터의 액체는 공기에 의해, 예를 들어, 망막의 표면으로 공기를 불어서, 일시적으로 교체된다. 공기의 용적이 유리체강 액체를 망막의 표면으로부터 몰아내므로, 유리체강의 액체는 캐놀라 밖으로 흐를 수 있다. 유리체강 액체로부터의 일시적인 압력의 부재는 수포가 이동하여 눈의 의존 부분으로 내려가도록 한다. 안구를 적절히 배치시킴으로써 망막하 rAAV 조성물의 수포는 인접 구역(예를 들어, 황반 및/또는 중심와)을 포함하도록 조작된다. 일부 경우에, 수포의 질량은 액체-공기 교환의 사용 없이도 아래로 내려가도록 하기에 충분하다. 원하는 위치로의 수포의 이동은 대상의 머리의 위치를 변경시키는 것에 의해 더욱 용이하게 될 수 있어, 수포가 눈에서 원하는 위치로 내려가도록 허용한다. 일단 수포의 원하는 배치가 달성되면, 액체는 유리체강으로 돌아간다. 액체는 적절한 액체, 예를 들어, 신선한 식염수이다. 일반적으로, 망막하 rAAV 조성물은 망막유착 내지 망막절개 없이, 그리고 안내 탐폰 없이도 원위치에 남아있을 수 있고, 망막은 약 48 시간 이내에 자발적으로 재부착될 것이다.

[0126] 눈의 세포(예를 들어, 섬유주대의 세포)를 치료적 폴리펩티드 또는 RNA 서열을 포함하는 벡터로 안전하고 효과적으로 형질도입하는 것에 의해, 본 발명의 방법은 개체; 예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 인간을 치료하기 위해 사용될 수 있는데, 여기에서 형질도입된 세포는 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기에 충분한 양으로 치료적 폴리펩티드 또는 RNA 서열을 생산한다.

[0127] 효과적인 양의 rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태로)는 치료의 목적에 따라 투여된다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입이 원하는 치료적 효과를 달성할 수 있다면, 치료의 목적은 일반적으로 이 수준의 형질도입에 부합하거나 초과한다. 일부 경우에, 이 수준의 형질도입은 단지 약 1 내지 5%의 표적 세포, 일부 구현예에서 적어도 약 20%의 원하는 조직 유형의 세포, 일부 구현예에서 적어도 약 50%, 일부 구현예에서 적어도 약 80%, 일부 구현예에서 적어도 약 95%, 일부 구현예에서 적어도 약 99%의 원하는 조직 유형의 세포의 형질도입에 의해 달성될 수 있다. 위에 논의된 바와 같이, HSPG와 상호작용하는 rAAV 캡시드의 하나 이상의 아미노산의 치환은 rAAV 형질도입을 개선한다. 지침으로서, 주사 당 투여되는 입자의 수는 일반적으로 약 1×10^6 내지 약 1×10^{14} 입자 사이, 약 1×10^7 내지 약 1×10^{13} 입자 사이, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{12} 입자 사이 또는 약 1×10^{11} 입자이다. rAAV 조성물은 하나 이상의 망막하 주사에 의해, 동일 절차 동안 또는 수일, 수주, 수개월, 또는 수년 간격으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 벡터가 인간을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 효과적인 양의 rAAV 바이러스 입자의 눈으로의 투여는 대략 임의의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 100% 또는 그 사이의 임의의 %보다 많은 눈 세포가 형질도입되는 결과를 야기한다. 일부 구현예에서, 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 25% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 50%, 또는 약 30% 내지 약 50%의 눈 세포가 형질도입된다. rAAV 캡시드를 포함하는 AAV 바이러스 입자에 의해 형질도입된 눈 세포를 확인하는 방법은 해당 분야에 알려져 있으며; 예를 들어, 면역조직화학 또는 증진된 녹색 형광 단백질과 같은 표지의 사용이 바이러스 입자의 형질도입을 검

출하기 위해 사용될 수 있다.

- [0129] 일부 구현예에서, 효과적인 양의 rAAV 바이러스 입자의 섬유주대로의 투여는 대략 임의의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 100% 또는 그 사이의 임의의 %보다 많은 섬유주대 세포가 형질도입되는 결과를 야기한다. 일부 구현예에서, 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 25% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 50%, 또는 약 30% 내지 약 50%의 섬유주대 세포가 형질도입된다. rAAV 캡시드를 포함하는 AAV 바이러스 입자에 의해 형질도입된 섬유주대 세포를 확인하는 방법은 해당 분야에 알려져 있으며; 예를 들어, 면역조직화학 또는 증진된 녹색 형광 단백질과 같은 표지의 사용이 바이러스 입자의 형질도입을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0130] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 방법은 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 개체; 예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 인간을 치료하기 위해 유효량의 AAV 바이러스 입자를 포유류의 눈에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 눈 세포에서 이중 핵산의 발현을 허용하도록 눈에서 하나 이상의 위치로 주사된다. 일부 구현예에서, 조성물은 눈에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 위치 중 임의의 하나로 주사된다.
- [0131] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 방법은 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 개체; 예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장이 있는 인간을 치료하기 위해 유효량의 AAV 바이러스 입자를 포유류의 섬유주대에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 섬유주대 세포에서 이중 핵산의 발현을 허용하도록 섬유주대에서 하나 이상의 위치로 주사된다. 일부 구현예에서, 조성물은 섬유주대에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 위치 중 임의의 하나로 주사된다.
- [0132] 일부 구현예에서 rAAV 바이러스 입자는 하나보다 많은 위치에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 다중 주사는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간 또는 24 시간 이하의 간격을 둔다.
- [0133] *유리체내 주사의 방법*
- [0134] 유리체내 주사를 위한 일반적 방법은 다음의 간략한 개요에 의해 예시될 수 있다. 이 예시는 단지 이 방법의 특정 특징을 예시함을 의미하고, 어떤 방식으로든 한정을 의미하지 않는다. 유리체내 주사를 위한 절차는 해당 분야에 알려져 있다(예를 들어, Peyman, G.A., *et al.* (2009) *Retina* 29(7):875-912 및 Fagan, X.J. and Al-Qureshi, S. (2013) *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41(5):500-7 참조).
- [0135] 간단하게, 유리체내 주사를 위한 대상은 동공 확장, 눈의 살균, 및 마취제 투여에 의해 절차가 준비될 수 있다. 해당 분야에 알려진 임의의 적절한 산동제가 동공 확장에 사용될 수 있다. 적절한 동공 확장은 처치 전에 확인될 수 있다. 살균은 눈 살균 처치, 예를 들어, 포비돈-요오드(BETADINE®)과 같은 요오드-함유 용액의 적용에 의해 달성될 수 있다. 유사한 용액이 눈꺼풀, 속눈썹, 및 임의의 다른 근처 조직(예를 들어, 피부)을 세정하기 위해 또한 사용될 수 있다. 리도카인 또는 프로파라카인과 같은 임의의 적절한 마취제가 임의의 적절한 농도로 사용될 수 있다. 마취제는 국소 점안제, 젤 또는 젤리, 및 마취제의 결막하 적용을 포함하지만 이에 제한되지 않는 해당 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0136] 주사 전에, 구역으로부터 속눈썹을 치우기 위해 살균된 눈꺼풀 검경을 사용할 수 있다. 주사 부위는 시린지로 표시될 수 있다. 주사 부위는 환자의 수정체를 기반으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 주사 부위는 인공수정체 또는 무수정체 환자에서 가장자리로부터 3 내지 3.5 mm, 그리고 유수정체 환자에서 가장자리로부터 3.5 내지 4 mm일 수 있다. 환자는 주사 부위 반대 방향으로 볼 수 있다.
- [0137] 주사 중에, 바늘은 공막에 수직으로 눈의 중심을 향해 삽입될 수 있다. 바늘은 끝이 망막하 공간보다는 유리체 공간에서 끝나도록 삽입될 수 있다. 해당 분야에 알려진 주사를 위한 적절한 용량이 사용될 수 있다. 주사 후, 눈을 항생제와 같은 살균제로 처치할 수 있다. 눈은 또한 과량의 살균제를 제거하기 위해 세척될 수 있다.
- [0138] *전방내 주사의 방법*
- [0139] 눈의 전방내 주사 방법은 해당 분야에 알려져 있다. 전방내 주사의 비-제한적 예는 Buie, *et al.*, (2010) *IOVS* 51(1):236-248에 제공된다.
- [0140] 유리체내 또는 전방내 주사에 의한 rAAV 전달의 효율은 본원에 기술된 몇 가지 기준에 의해 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법을 사용하여 대상에서 처치 후, 대상은 예를 들어, 질환 상태의 하나 이상의 징후 또는 증상의 진행에서의 개선 및/또는 안정화 및/또는 지연에 대하여 본원에 기술되는 것을 포함하는 하나 이상의 임상적 매개변수에 의해 평가될 수 있다. 이러한 시험의 예는 해당 분야에 알려져 있고, 객관적 및 주관

적(예를 들어, 대상이 보고하는) 측정을 포함한다. 예를 들어, 대상의 시각 기능에 대한 처치의 효능을 측정하기 위해, 다음 중 하나 이상이 평가될 수 있다: 대상의 주관적인 특질의 시력 또는 개선된 중심 시력 기능(예를 들어, 능숙하게 읽고 얼굴을 인식하는 대상의 능력에 있어서의 개선), 대상의 시각 이동성(예를 들어, 미로에서 길을 찾는 데 필요한 시간의 감소), 시력(예를 들어, 대상의 LogMAR 점수에서의 개선), 미소시야측정(예를 들어, 대상의 dB 점수에서의 개선), 암-순응 시야측정(예를 들어, 대상의 dB 점수에서의 개선), 미세 매트릭스 매핑(예를 들어, 대상의 dB 점수에서의 개선), 골드만(Goldmann) 시야측정(예를 들어, 암점 구역(즉, 맹목 구역)의 크기 감소 및 더 작은 표적을 분해하는 능력의 개선), 플리커 감도(예를 들어, Hertz의 개선), 자가형 광 및 전기생리적 측정(예를 들어, ERG의 개선). 일부 구현예에서, 시각 기능은 대상의 시각 이동성에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 시각 기능은 대상의 시력에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 시각 기능은 미소시야측정에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 시각 기능은 암-순응 시야측정에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 시각 기능은 ERG에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 시각 기능은 대상의 주관적 시력의 특질에 의해 측정된다.

[0141] 본원에 기술되는 임의의 방법 또는 조성물에서, 마이오실린(MYOC) 녹내장의 의학적 시험은 본원에 기술되는 처치의 효능을 평가하거나 본원에 기술되는 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 환자를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 마이오실린(MYOC) 녹내장을 진단 또는 모니터링하기 위한 많은 의학적 시험이 해당 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 검안경검사, 레이저 편광계, 시각 간섭성 단층촬영, 및/또는 스캐닝 레이저 단층촬영이 마이오실린(MYOC) 녹내장에 의해 손상될 수 있는 시신경을 검사하기 위해 사용될 수 있다. 안압은 안압측정법에 의해 측정될 수 있다. 후도계는 중심 각막 두께를 측정하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 얇은 중심 각막 두께는 마이오실린(MYOC) 녹내장이 예측될 수 있다). 시계 시험은 시계를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0142] 위에 기술된 바와 같이, 마이오실린 돌연변이는 원발성 개방각 마이오실린(MYOC) 녹내장(POAG)과 연루된다. 따라서, POAG를 진단하기 위한 의학적 시험은 본원에 기술되는 처치의 효능을 평가하거나 본원에 기술되는 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 환자를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 해당 분야에 알려진 POAG 진단용 의학적 시험은, 예를 들어 POAG를 다른 형태의 마이오실린(MYOC) 녹내장(폐쇄각 녹내장과 같은)으로부터 구분하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 전방각경검사는 POAG의 진단에 도움을 주는 평가를 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0143] 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 처치의 효능은 동물 모델에서 시험될 수 있다. 마이오실린(MYOC) 녹내장에 대한 동물 모델은 해당 분야에 알려져 있다. 예를 들어, Y437H 인간 MYOC 또는 Y423H 마우스 MYOC를 발현하는 마우스는 POAG와 유사한 마이오실린(MYOC) 녹내장 증상을 발생시키는 것으로 보여졌다(Zode *et al.* (2011) *J. Clin. Invest.* 121(9):3542-53 및 Senatorov, V., *et al.* (2006) *J. Neurosci.* 26(46):11903-14 참조). 또한, 산화 질소 수용체 가용성 구아닐레이트 사이클라제의 알파 서브유닛이 결여된 마우스는 POAG의 다른 모델이다(Buys, E.S., *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(3):e60156). 래트 모델 또한 개발되었으며; 아테노바이러스 유전자 전사를 통해 전달된 인간 TGF-베타를 발현하는 래트는 증가된 IOP를 보여준다(Shepard, A.R., *et al.* (2010) *Invest. Ophthalmol.* 51(4):2067-76). 영장류, 개, 및 제브라피쉬 모델을 포함하여, POAG의 다양한 양태에 대한 다른 동물 모델의 추가 설명은 Bouhenni, R.A., *et al.* (2012) *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:692609에서 발견될 수 있다.

[0144] 일부 시각 장애에는 "영양 세포(nurse cell)" 현상이 있는데, 여기에서는 한 유형의 세포의 기능을 개선하는 것이 다른 기능을 개선한다. 예를 들어, 본 발명의 rAAV에 의한 망막 중심의 RPE의 형질도입은 다음에 간상체의 기능을 개선할 수 있고, 차례로 개선된 간상체 기능은 개선된 추상체 기능을 초래한다. 따라서, 한 유형의 세포의 처치는 다른 것의 개선된 기능을 야기할 수 있다. 마이오실린(MYOC) 녹내장에서, TM의 형질도입에 의한 IOP의 감소는 신경절 세포 구조 및 기능의 퇴화를 감소시킬 것이다.

[0145] 특정 rAAV 벡터 및 조성물의 선택은, 개인의 병력 및 치료되는 개체 및 병태의 특징을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 많은 상이한 인자에 의존한다. 이러한 특징의 평가 및 적절한 치료 요법의 디자인은 궁극적으로 처방 의사의 책임이다.

[0146] 본 발명의 조성물(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 AAV 바이러스 입자)은 단독으로, 또는 시각 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 순차적 투여의 간격은 적어도(또는 대안으로서, 이보다 적은) 수분, 수시간, 또는 수일 단위일 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 점유주대로 투여될 수 있다. 추가 치료제의 비-제한적 예는 잘라탄(Xalatan), 루미간(Lumigan), 트라바탄 Z(Travatan Z) 및 레스쿨라(Rescula)와 같은 프로스타글란딘; 티모프틱 XE(Timoptic XE), 이스타롤(Istalol) 및 베토프틱 S(Betoptic S)를 포함하는 베타-차단제; 아이오피딘

(Iopidine), 알파간(Alphagan), 및 알파간-P(Alphagan-P)를 포함하는 알파-아드레날린 효능제; 트루소프트(Trusopt) 및 아조프트(Azopt), 디아목스(Diamox), 네프타잔(Neptazane) 및 다라니드(Daranide)를 포함하는 탄산무수화 효소 억제제; 필로카르핀(pilocarpine), 카바콜(carbachol), 에코티오페이트(echothiophate) 및 데메카리움(demecarium)을 포함하는 부교감신경흥분제; 프로핀(Propine)을 포함하는 에피네프린; 또는 코소프트(Cosopt), 콤비간(Combigan) 및 듀오트라브(DuoTrav)를 포함하는 조합 치료제를 포함한다.

IV. 발현 구성체

본 발명은 이중 핵산을 포함하는 rAAV 벡터의 망막하 전달에 의한 눈으로의 이중 핵산의 전달 방법을 제공하는데, 여기에서 rAAV 벡터는 HSPG와 상호작용하는 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함하는 rAAV 캡시드에 캡시드화된다. 일부 구현예에서, 이중 핵산(예를 들어, 이식유전자)은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나아제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β -글로빈 프로모터(CAG 프로모터; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9) 및 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-alpha) 프로모터(Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23 and Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 β -글루쿠코니다아제 프로모터 또는 닭 β -액틴(CBA) 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함한다. 프로모터는 항시성, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 눈의 세포에서 이중 핵산을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 광수용기 세포 또는 RPE에서 이중 핵산을 발현할 수 있다. 구현예에서, 프로모터는 로돕신 키나아제(RK) 프로모터; 예를 들어, 인간 RK 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 옹신 프로모터; 예를 들어, 인간 옹신 프로모터 또는 마우스 옹신 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 CBA 프로모터의 조절 하에 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포유류의 눈에 투여하는 것에 의해 포유류(예를 들어, 인간)에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 CBA 프로모터의 조절 하에 MYOC(예를 들어, 인간 MYOC)를 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포유류의 눈에 투여하는 것에 의해 포유류(예를 들어, 인간)에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 CBA 프로모터의 조절 하에 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및 CBA 프로모터의 조절 하에 MYOC(예를 들어, 인간 MYOC)를 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포유류의 눈에 투여하는 것에 의해 포유류(예를 들어, 인간)에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 rAAV 바이러스 입자로 패키징하기 위해 치료적 폴리펩티드 및/또는 핵산을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열의 도입을 위한 재조합 바이러스 게놈의 용도를 고려한다. 재조합 바이러스 게놈은 치료적 폴리펩티드 및/또는 핵산의 발현을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, ITR, 리보솜 결합 요소, 종결부위, 인핸서, 선택 표지, 인트론, 폴리A 신호, 및/또는 복제의 개시점을 포함할 수 있다.

일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가-상보성(self-complementing) 게놈을 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 자가-상보성 게놈을 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자가-상보성 AAV 게놈의 사용 방법은 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 7,765,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 그리고 Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111에 기술되며, 이들 각각은 전체가 본원에 참조로 도입된다. 자가-상보성 게놈을 포함하는 rAAV는 이의 부분적 상보성 서열(예를 들어, 이식유전자의 상보성 코딩 및 비-코딩 가닥)로 인해 신속하게 이중 가닥 DNA 분자를 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 제1 이중 핵산 서열 및 제2 이중 핵산 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오타이드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCACGCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:20)을 포함한다. 돌연변이된 ITR은 말단 분해 서열(terminal resolution sequence)을 포함하는 D 영역의 결

실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 게놈의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이된 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 못할 것이고, 이처럼, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 게놈이 바이러스 캡시드 안에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이된 AAV ITR, 제1 이중 폴리뉴클레오티드에 역방향인 제2 이중 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR.

[0152] VI. 바이러스 입자 및 바이러스 입자를 생산하는 방법

[0153] rAAV 바이러스 입자

[0154] 본 발명은 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하기 위해 rAAV 입자를 이용하는 방법을 제공하고 rAAV 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는, 하나 또는 두 개의 ITR이 측면에 있는, 본원에서 기술되는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV 입자이다. 이러한 핵산은 AAV 입자 내에 캡시드화된다. 또한, AAV 입자는 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 관심 코딩 서열(들)(예를 들어, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 핵산) 전사 방향으로 작동 가능하게 연결된 성분, 전사 개시 및 종결 서열을 포함하는 조절 서열을 포함하고, 이에 의해 발현 카세트를 형성한다. 발현 카세트는 5' 및 3' 말단 상에서 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열과 측면을 접한다. "기능적 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 구조, 복제 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 모두 전체로서 본원에 참조로 도입되는, Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; 및 Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16 참조. 본 발명의 일부 양태를 실시하기 위해, 재조합 벡터는 적어도 rAAV에 의한 감염을 위한 캡시드화 및 물리적 구조에 필수적인 AAV의 서열 모두를 포함한다. 본 발명의 벡터에 사용하기 위한 AAV ITR은 (예를 들어, Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801에 기술된 것과 같은) 야생형 뉴클레오티드 서열을 가질 필요가 없으며, 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, 이 AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 40 가지가 넘는 혈청형의 AAV가 현재 공지되어 있으며, 새로운 혈청형 및 현존하는 혈청형의 변종이 계속해서 확인되고 있다. Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; 및 Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810 참조. 임의의 AAV 혈청형의 사용이 본 발명의 범위 내에서 고려된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터이다. 일부 구현예에서, AAV 내의 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 역위 말단 반복(ITR) 등의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 내의 핵산은 본원에 기술된 바와 같이, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종; MYOC RNAi(예를 들어, shRNA); 또는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및 MYOC를 추가로 암호화한다. 예를 들어, AAV 내의 핵산은 본원에서 고려되는 임의의 AAV 혈청형의 적어도 하나의 ITR을 포함할 수 있고, 그리고 SEQ ID NO:6을 표적으로 하고 SEQ ID NO:7의 루프 서열을 포함하는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA) 및/또는 SEQ ID NO:8, 11, 및/또는 12를 포함하는 RSP01; SEQ ID NO:9, 13, 및/또는 14를 포함하는 RSP02; SEQ ID NO:1, 15, 16, 및/또는 17을 포함하는 RSP03; 및 SEQ ID NO:10, 18, 및/또는 19를 포함하는 RSP04 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 추가로 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 SEQ ID NO:8, 11, 또는 12와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성인 RSP01; SEQ ID NO:9, 13, 또는 14와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성인 RSP02; SEQ ID NO:1 또는 15 내지 17과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성인 RSP03; 또는 SEQ ID NO:10, 18, 또는 19와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성인 RSP04를 암호화한다.

[0155] 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0164106에 기술된 ShH10와 같은 변종 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2013/0323226에 기술된 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 미국 출원공보 2012/0066783에 기술된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1

캡시드, 또는 미국 특허 번호 8,283,151 또는 국제 공개 No. WO/2003/042397에 기술된 AAV 캡시드의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 R484, R487, K527, K532, R585 또는 R588의 하나 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드를 포함한다. 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 클레이드 A-F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 섬유주대의 형질도입을 허용하는 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 섬유주대의 형질도입을 허용하는 돌연변이 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV2의 캡시드 단백질을 포함하는데, 여기에서 캡시드 단백질은 AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함한다(Lochrie *et al.*, *J Virol* (2006) 80(2):821-834). 일부 구현예에서, 본 발명은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 벡터; AAV2의 VP1을 기반으로 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함하는 AAV2 캡시드; 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다.

[0156] 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 조성물 및 방법을 제공하는데, 여기에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 바이러스 입자는 포유류의 눈으로 전달되어 눈의 상이한 부분이 형질도입될 수 있고(예를 들어, 망막), MYOC RNAi를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 R471A 바이러스 입자는 포유류의 눈으로 전달되어 섬유주대의 세포가 형질도입된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 조성물 및 방법을 제공하는데, 여기에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 R471A 바이러스 입자 및 MYOC RNAi를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 R471A 바이러스 입자는 포유류의 눈으로 전달되어 섬유주대의 세포가 형질도입된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 조성물 및 방법을 제공하는데, 여기에서 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하고 MYOC RNAi를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV2 R471A 바이러스 입자는 포유류의 눈으로 전달되어 섬유주대의 세포가 형질도입된다.

[0157] 일부 양태에서, 본 발명은 이식유전자를(예를 들어, 치료적 이식유전자를 눈의 섬유주대로) 전달하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 조성물 및 방법은 돌연변이 캡시드를 포함하는 rAAV2 입자를 사용하는데, 여기에서 캡시드는 AAV2의 VP1에 대하여 넘버링하여 R471A 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 조성물 및 방법은 안과 질환; 예를 들어, 마이오실린(MYOC) 녹내장과 같은 섬유주대와 관련되는 안과 질환의 치료에 사용될 수 있다.

[0158] 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질환 조직) 내의 특이적 세포 유형을 표적으로 하기 위해 상이한 AAV 혈청형이 사용된다. rAAV 입자는 동일 혈청형 또는 혼합된 혈청형의 바이러스 핵산 및 바이러스 단백질을 포함할 수 있다.

[0159] 자가-상보성 AAV 바이러스 계놈

[0160] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가-상보성(self-complementing) 계놈을 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 자가-상보성 계놈을 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자가-상보성 AAV 계놈의 사용 방법은 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 7,765,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 그리고 Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111에 기술되며, 이들 각각은 전체가 본원에 참조로 도입된다. 자가-상보성 계놈을 포함하는 rAAV는 이의 부분적 상보성 서열(예를 들어, 이식유전자의 상보성 코딩 및 비-코딩 가닥)로 인해 신속하게 이중 가닥 DNA 분자를 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 AAV 계놈을 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공하는데, 여기에서 rAAV 계놈은 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, miR-708 및/또는 로돕신 코딩 가닥) 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, miR-708의 안티센스 가닥 및/또는 로돕신 비코딩 또는 안티센스 가닥)을 포함하고, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 그의 길이의 대부분 또는 전체를 따라 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 가닥내 염기쌍 형성을 용이하게 하는 서열; 예를 들어 헤어핀 DNA 구조에 의해 연결된다. 예를 들어 siRNA 분자 내 헤어핀 구조가 해당 분야에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:20)을 포함한다. 돌연변이된 ITR은 말단 분해 서열(terminal resolution sequence)을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 계놈의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 계놈을 절단하지 못할 것이고, 이처럼, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 계놈이 바이러스 캡시드 안에

패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이된 AAV ITR, 제1 이중 폴리뉴클레오티드에 역방향인 제2 이중 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR. 일부 구현예에서, 본 발명은 기능성 AAV2 ITR, RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열, D 영역의 결실을 포함하고 기능적 말단 분해 서열이 결합된 돌연변이된 AAV2 ITR, 제1 폴리뉴클레오티드 서열의 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열 및 기능성 AAV2 ITR을 포함하는 재조합 바이러스 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공한다.

[0161] AAV 입자의 생산

[0162] rAAV 입자는 해당 분야에 알려진 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,566,118; 6,989,264; 및 6,995,006을 참조한다. 본 발명의 실시에서, rAAV 입자를 생산하기 위한 숙주 세포는 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 미생물 및 효모를 포함한다. 숙주 세포는 또한, AAV rep 및 cap 유전자가 숙주 세포 내에 안정적으로 유지되는 패키징 세포 또는 AAV 벡터 게놈이 안정적으로 유지되는 생산자 세포(producer cell)일 수 있다. 예시적인 패키징 및 생산자 세포는 293, A549 또는 HeLa 세포로부터 유래된다. AAV 벡터는 해당 분야에 알려진 표준 기술을 사용하여 정제되고 제형화된다.

[0163] 일부 양태에서, (a) rAAV 입자가 생산되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하되, 여기에서 숙주 세포는 (i) 하나 이상의 AAV 패키지 유전자로서, 이때, 각각의 상기 AAV 패키징 유전자는 AAV 복제 및/또는 캡시드화 단백질을 암호화하고; (ii) 적어도 하나의 AAV ITR과 측면을 접한, 본원에 기술된 바와 같은 치료적 폴리펩티드 및/또는 핵산을 암호화하는 핵산을 포함하는 rAAV 프로-벡터; 및 (iii) AAV 헬퍼 기능을 포함하고; 그리고 (b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 입자를 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 임의의 rAAV 입자를 생산하는 방법이 제공된다.

[0164] 추가적인 구현예에서, rAAV 입자는 정제된다. 본원에서 사용되는 용어 "정제된"은 rAAV 입자들이 자연적으로 존재하거나 당초 제조되는 곳에 존재할 수도 있을 다른 성분들 중 적어도 일부가 결합된 rAAV 입자의 제조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 분리된 rAAV 입자는 배양 용해물 또는 생산 배양 상등액과 같은, 공급원 혼합물로부터 그것을 농축시키는 정제 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 농축은 예를 들어, 용액 내에 존재하는 DNase-저항성 입자(DRP) 또는 게놈 카피(gc)의 비율, 또는 감염력에 의해서와 같이 다양한 방법으로 측정될 수 있거나, 생산 배양 오염물 또는, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등을 포함하는 공정-중 오염물을 포함하는 오염물과 같은, 공급원 혼합물에 존재하는, 제2의 잠재적인 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다.

[0165] 또한, 치료적 폴리펩티드 및/또는 치료적 핵산을 암호화하는 이중 핵산을 포함하는 rAAV 입자를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공되는데, 여기에서 rAAV 입자는 HSPG와 상호작용하는 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함하는 rAAV 캡시드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 약제학적 조성물은 본원에 기술되는 임의의 투여 방식, 예를 들어 망막하 투여에 적절할 수 있다.

[0166] 일부 구현예에서, 본원에 기술되는 rAAV 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 인간에 투여하기에 적합하다. 이러한 담체는 해당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 및 1570-1580 참조). 일부 구현예에서, 본원에 기술되는 rAAV 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 눈 주사에 적합하다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 물 그리고, 낙화생유, 대두유, 팥유 등과 같은, 석유, 동물, 식물, 또는 합성 유래의 것들을 포함하는 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 식염수 및 수용성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액 또한 액체 담체로서, 특히 주사 가능한 용액을 위하여 이용될 수 있다. 약제학적 조성물은 추가적인 성분, 예를 들어, 보존제, 완충제, 등장화제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤 또는 정화제, 증점제 등을 더 포함할 수 있다. 본원에 기술되는 약제학적 조성물은 단일의 단위 제형 또는 다중투여 형태로 포장될 수 있다. 조성물은 일반적으로 멸균되고 실질적으로 등장성인 용액으로 제형화된다.

[0167] VII. 시스템 및 키트

[0168] 본원에 기술되는 rAAV 조성물은 본원에 기술되는 발명의 방법 중 하나에서의 사용을 위해 고안된 시스템 내에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은 a) 유효량의 rAAV 입자를 포함하는 조성물로, 여기에서 벡터는 치료적 폴리펩티드 및/또는 치료적 RNA 및 적어도 하나의 AAV 말단 반복을 암호화하는 이중 핵산을 포함하고; 및 b) rAAV의 눈 전달을 위한 장치를 포함하는, 개체의 눈으로 벡터를 전달하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 구

현예에서, rAAV 입자는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 MYOC 발현을 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) 하나 이상의 MYOC RNAi(들)(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종, 및 MYOC 발현을 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) 하나 이상의 MYOC RNAi(들)(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 키트 또는 시스템은 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종을 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자, 및 MYOC 발현을 표적으로 하는(예를 들어, 감소 또는 억제시키는) 하나 이상의 MYOC RNAi(들)(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 포함한다.

[0169] 일반적으로, 본 시스템은 미세-구멍 캐놀라, 여기에서 캐놀라는 27 내지 45 게이지이고, 하나 이상의 시린지(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 이상), 및 본 발명의 방법에서의 사용에 적절한 하나 이상의 액체(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 이상)를 포함한다.

[0170] 미세 구멍 캐놀라는 망막하 공간으로 주사되는 벡터 현탁액 및/또는 다른 액체의 망막하 주사를 위해 적절하다. 일부 구현예에서, 캐놀라는 27 내지 45 게이지이다. 일부 구현예에서, 미세-구멍 캐놀라는 35 내지 41 게이지이다. 일부 구현예에서, 미세-구멍 캐놀라는 40 또는 41 게이지이다. 일부 구현예에서, 미세-구멍 캐놀라는 41-게이지이다. 캐놀라는 임의의 적절한 유형의 캐놀라, 예를 들어 de-Juan® 캐놀라 또는 Eagle® 캐놀라일 수 있다.

[0171] 시린지는 액체의 전달을 위한 캐놀라와 연결될 수 있다면, 임의의 적절한 시린지일 수 있다. 일부 구현예에서, 시린지는 Accurus® 시스템 시린지이다. 일부 구현예에서, 시스템은 하나의 시린지를 갖는다. 일부 구현예에서, 시스템은 2 개의 시린지를 갖는다. 일부 구현예에서, 시스템은 3 개의 시린지를 갖는다. 일부 구현예에서, 시스템은 4 개 이상의 시린지를 갖는다.

[0172] 시스템은, 예를 들어 발 페달로 작동될 수 있는, 자동화된 주사 펌프를 추가로 포함할 수 있다.

[0173] 본 발명의 방법에서의 사용에 적절한 액체는 본원에 기술되는 것, 예를 들어, 각각 본원에 기술되는 하나 이상의 벡터의 유효량을 포함하는 하나 이상의 액체, 초기 수포를 생성하기 위한 하나 이상의 액체(예를 들어, 식염수 또는 다른 적절한 액체), 및 하나 이상의 치료제를 포함하는 하나 이상의 액체를 포함한다.

[0174] 본 발명의 방법에서의 사용에 적절한 액체는 본원에 기술되는 것, 예를 들어, 각각 본원에 기술되는 하나 이상의 벡터의 유효량을 포함하는 하나 이상의 액체, 초기 수포를 생성하기 위한 하나 이상의 액체(예를 들어, 식염수 또는 다른 적절한 액체), 및 하나 이상의 치료제를 포함하는 하나 이상의 액체를 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8 mL보다 크다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 적어도 약 0.9 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 적어도 약 1.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 적어도 약 1.5 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 적어도 약 2.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8보다 크고 약 3.0 mL까지이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8보다 크고 약 2.5 mL까지이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8보다 크고 약 2.0 mL까지이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8보다 크고 약 1.5 mL까지이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.8보다 크고 약 1.0 mL까지이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.9 내지 약 3.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.9 내지 약 2.5 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.9 내지 약 2.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.9 내지 약 1.5 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 0.9 내지 약 1.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 1.0 내지 약 3.0 mL이다. 일부 구현예에서, 유효량의 벡터를 포함하는 액체의 용량은 약 1.0 내지 약 2.0 mL이다.

[0176] 초기 수포를 생성하기 위한 액체는, 예를 들어 약 0.1 내지 약 0.5 mL일 수 있다. 일부 구현예에서, 시스템의 모든 액체의 총 용량은 약 0.5 내지 약 3.0 mL이다.

[0177] 일부 구현예에서, 시스템은 단일 액체(예를 들어, 유효량의 벡터를 포함하는 액체)를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 2 개의 액체를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 3 개의 액체를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 4 개 이상의 액체를 포함한다.

[0178] 본 발명의 시스템은 추가로 키트로 포장될 수 있는데, 여기에서 키트는 사용 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

일부 구현예에서, 키트는 rAAV 입자의 조성물의 망막하 전달을 위한 장치를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사용 설명서는 본원에 기술되는 방법의 하나에 따른 설명을 포함한다. 일부 구현예에서, 사용 설명서는 RSP01, RSP02, RSP03, RSP04 폴리펩티드, 또는 이의 기능적 변종 및/또는 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)를 암호화하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자의 유리체내 및/또는 전방내 전달을 위한 설명을 포함한다.

[0179] 실시예

[0180] 본 발명은 다음 실시예를 참조함으로써 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 기술되는 실시예 및 구현예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며, 다양한 변형 또는 이의 관점의 변화가 해당 분야의 당업자에게 시사될 것이고, 본 출원의 정수 및 견지 그리고 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함된다는 점이 이해된다.

[0181] **실시예 1: 녹내장 MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및 Y437H)는 MYOC의 분비를 차단한다**

[0182] MYOC 돌연변이체가 어떻게 눈의 기능에 영향을 미치는지를 이해하기 위해, 특히 IOP에 기여할 수 있는 섬유주대 세포와 같은 세포는 마이오실린(MYOC) 녹내장의 발병에 대한 통찰을 제공할 것이다. MYOC 기능의 이해는 또한 마이오실린(MYOC) 녹내장의 잠재적 치료 전략을 발견하는 데 도움을 줄 수 있다. 본원에 기술되는 결과는 MYOC 돌연변이체가 야생형 MYOC 발현을 감소시키고 Wnt 신호전달을 차단하는 것을 나타낸다. 또한, 이들 결과는 R-스폰딘 3(RSP03)의 발현 및/또는 MYOC의 발현 억제제가 돌연변이체 MYOC의 발현에 의해 차단된 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있음을 시사한다.

[0183] 방법

[0184] **플라스미드 벡터**

[0185] MYOC 및 RSP03 플라스미드를 위해, MYOC cDNA가 Clone DB- Sanofi Oncology에 의해 제공되었다. RSP03 cDNA는 Clone DB- Sanofi Oncology에 의해 제공되었다.

[0186] pCBA2-in-MYOC P370L의 구축을 위해, QUIKCHANGE[®] II 키트(Agilent, Santa Clara)를 사용하여 프라이머 5'-ACCACGGACAGTTCTGTATTCTTGGGGTGG-3'(SEQ ID NO:21) 및 5'-CCACCCCAAGAATACAGGAAGTGTCCGTGGT-3'(SEQ ID NO:22), 그리고 제조자의 권고에 따라 원하는 단일 염기 치환을 도입하였다.

[0187] pCBA2-in-MYOC Y437H의 구축을 위해, QUIKCHANGE[®] Lightning 키트(Agilent, Santa Clara)를 사용하여 프라이머 5'-TCTGTGGCACCTTGCACACCGTCAGCAGC-3'(SEQ ID NO:23) 및 5'-GCTGCTGACGGTGTGCAAGGTGCCACAGA-3'(SEQ ID NO:24), 그리고 제조자의 권고에 따라 원하는 단일 염기 치환을 도입하였다.

[0188] Grp94 shRNA 플라스미드는 OriGene Technologies, Inc.(Cat. No. TR312309)로부터 얻었다. pGIPZ-MYOC 플라스미드(Dharmacon GE Life Sciences)는 Clone DB- Sanofi Oncology에 의해 제공되었다. GIPZ 마이크로RNA-조정된 shRNA 컬렉션(Stegmeier, *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:13212-7). GIPZ shRNA 디자인은 천연의 miR-30 1차 전사체를 기반으로 하여 내인성 RNAi 경로에 의한 처리를 가능하게 하고 최소화된 세포 독성으로 특이적 유전자 발현 억제를 야기한다. 비-표적화, 널(null) shRNA를 발현하는 구성요소 shRNAir 벡터인 pGIPZ-Null 플라스미드는 Clone DB- Sanofi Oncology에 의해 제공되었다.

[0189] **세포 배양 및 재조합 단백질**

[0190] HEK293 세포(Microbix Biosystems Inc.)를 DMEM, 10% FCS, 및 5% CO₂에서 배양하였다. HEK293T(293T) 세포주는 ATCC로부터 얻었고 DMEM, 10% FCS, 및 5% CO₂에서 배양하였다.

[0192] ***1차 인간 섬유주대(hTM) 세포의 부동화**

[0193] SV40 대형 T-항원(SV40 Tag)이 AAV2-SV40 T-항원 벡터의 형질도입을 통해 부동화에 사용되었다. 완전 섬유아세포 성장 배지(ScienCell)에서 유지된 계대 7 hTM 세포(ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA)를 10 cm 세포 배양 플레이트에 접종하고 1×10⁵ DRP의 AAV2-SV40-Tag("hTM-T" 표시) 또는 AAV2-EGFP(음성 대조, "hTM-ENT" 표시) 중 하나로 24 시간 동안 형질도입시켰다. 일단 세포가 융합에 도달하면, 2×15 cm 플레이트(P8)에서 계대 배양하였다. 세포를 대략 매 3 내지 4 일마다 반복적으로 계대 배양하였다. 계대 10에서 세포수

를 결정하기 위해 부분표본을 채취하였다. hTM-ENT로부터의 2.5×10^5 총 세포와 비교하여, hTM-T 세포로부터의 총 세포수는 5.2×10^6 이었다.

[0194] SV40 T-항원의 존재를 결정하기 위해 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 간단하게는, 500 μ L 세포의 현탁액을 원심 분리하고, 생성된 세포 펠릿을 프로테아제 억제제 각테일을 함유하는 100 μ L RIPA 완충액으로 용해시켰다. 5 μ L의 세포 용해물을 SDS-PAGE로 분석한 다음 iBlot 신속 전송 시스템(Life Technologies)을 사용하여 면역블로팅하였다. 블롯을 TBS 무 단백질 차단제(protein free blocker; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 차단시키고 단클론 항-SV40 T-항원 항체(GeneTex, Irvine, CA)와 배양하였다. 다음에 블롯을 항-마우스 HRP 표지된 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)와 배양하였다. 면역반응성 밴드를 수퍼시그널 웨스트 펠토 화학발광 기질(Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher)을 사용하여 가시화하였다. SV40 T-항원에 상응하는 현저한 80 kDa 밴드가 hTM-T로부터 검출되었으나, hTM-ENT 세포로부터는 아니어서, SV40 T-항원의 존재 및 발현을 나타내었다. 293T 세포로부터의 용해물은 80 kDa SV40 T-항원 밴드를 또한 포함하는 양성 대조로서 작용하였다. hTM-T 세포를 확장시키고 셀 뱅크(cell bank)를 세포 동결 배지(Life Technologies, Grand Island, NY) 중 계대 12(1×10^6 세포에서 10 바이알) 및 이후 계대 18(10^6 세포에서 46 바이알)에서 동결시켰다.

[0195] hTM-T 특성화

[0196] hTM-T 및 1차 hTM 세포의 비교는 세포 형태학, 집단 배증 시간, 및 플라스미드 형질감염 효율에 있어서 현저한 차이를 보여주었다. 1차 hTM 세포는 긴 방추 세포체로 더 크고 섬유아세포-유사로 보인 반면, 부동화된 hTM-T 세포는 더 작고, 입방체 형상이고, 비교적 균일한 크기였다. hTM-T 세포주는 1차 세포보다 대략 3 내지 4 배 더 빠르게 나타나는 집단 배증으로 증가된 성장률을 나타내었다. 또한 hTM-T 세포는 20 세포 계대 넘게 계속 증식한 반면, 1차 hTM 세포는 계대 10까지 감소된 성장률을, 그리고 결국 계대 12까지 성장 정지를 나타내었다. 형질감염 효율은 유사한 세포 밀도의 두 세포 유형으로 EGFP 플라스미드 및 리포펙타민을 사용하여 결정하였다. 간단하게는, 제조자의 프로토콜에 따라 하위용합성 hTM-T 또는 hTM 세포를 EGFP 플라스미드로 리포펙타민 2000(Life Technologies)을 사용하여 형질감염시켰다. 비록 hTM-T 세포가 세포 배양 표면적 mm² 당 더 큰 세포수를 가졌다 하더라도, 1차 hTM 세포(약 5%)와 비교하여 명백하게 더 큰 백분율의 EGFP+hTM-T 세포(약 50%)가 존재하였다.

[0197] 웨스턴 블로팅

[0198] 293T 또는 hTM-T 세포를 wtMYOC, MYOC 돌연변이체 P370L 및 Y437H, RSP03, 및/또는 shRNA를 발현하는 플라스미드로 리포펙타민 2000(Life Technologies)을 사용하여 형질감염시켰다. 간단하게는, 세포를 프로테아제 억제제 각테일을 함유하는 50 내지 100 μ L RIPA 완충액으로 용해시켰다. 10 내지 13 μ L의 세포 용해물을 SDS-PAGE로 분석한 다음 iBlot 신속 전송 시스템(Life Technologies)을 사용하여 면역블로팅하였다. 블롯을 트리스 완충 식염수, 0.05% Tween 20(TBST), 0.2% I-블록(카세인-기반의 차단 시약; Life Technologies)을 사용하여 차단시키고 마우스 항-인간 MYOC 항체와 배양하였다. 다음에 블롯을 항-마우스 HRP 표지된 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)와 배양하였다. 면역반응성 밴드를 ECL 화학발광 기질(Thermo Fisher)을 사용하여 가시화시키고 BioMax XAR 필름(Carestream Health)에서 Kodak X-Omat 2000 프로세서로 현상하여 가시화시켰다.

[0199] 루시퍼라제 리포터 분석

[0200] 293T 또는 hTM-T 세포를 Costar 96 웰 백색 또는 흑색 벽 플레이트에 2×10^4 세포/웰로 접종하였다. 형질감염은 세포 접종 1 내지 2 일 후에 제조자의 프로토콜에 따라 Fugene HD 형질감염 시약(Promega, Madison, WI)을 사용하여 수행하였다.

[0201] 간단하게는, 40:1 비율의 Tcf/lef 조절된 반딧불이 루시퍼라제 리포터 유전자 및 사이토메갈로바이러스(CMV) 구동의 레닐라(*Renilla*) 루시퍼라제 유전자를 포함하는 Topflash 리포터 플라스미드(Millipore, Billerica, MA)를 표적 플라스미드와 1:1 혼합하였다. 8 μ L의 Fugene HD 시약을 첨가하고, 샘플을 즉시 와류 처리한 다음 15 분 동안 실온에서 배양하였다. 플라스미드 DNA 복합체를 세포에 첨가하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 샘플을 400 ng/mL의 재조합 인간 또는 마우스 wnt3a 단백질(R&D Systems)로 자극 또는 비자극하고 추가로 20 내지 24 시간 동안 배양하였다. Wnt 신호전달을 제조자의 프로토콜에 따라 이중 루시퍼라제 분석 시스템(Dual Luciferase Assay System; Promega)을 사용하여 측정하였다. 흡광도를 Centro XS³ 960 마이크로플레이트 광도계(Berthold Technologies, Oak Ridge, TN)에서 측정하고 상대적 광 단위(RLU)로서 보고하였다. 형질감염 효율을

조절하기 위해, 반딧불이 루시퍼라제 RLU를 레닐라 루시퍼라제 RLU에 대하여 정규화하였다. 모든 샘플은 3중 웰에서 시행되었다.

[0202] 결과

[0203] 야생형 MYOC(wtMYOC)는 배양된 세포로부터 분리되지만, MYOC의 5 가지 상이한 돌연변이 형태를 발현하는 세포로부터는 거의 또는 전혀 MYOC가 분리되지 않고, 정상 및 돌연변이 MYOC와 배양된 세포의 공동-형질감염은 wtMYOC 분비를 억제하는 것으로 보고되었다(Jacobson *et al.* (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10(2):117-25). MYOC 분비에 대한 돌연변이 MYOC 발현의 효과를 조사하기 위해, 293 세포를 야생형 MYOC, P370L 돌연변이 MYOC, 또는 Y437H 돌연변이 MYOC를 발현하는 플라스미드로 형질감염시켰다.

[0204] 도 1에서 보듯이, 야생형 MYOC를 발현하는 293 세포는 세포 용해물 둘 다에서 검출 가능한 MYOC 단백질 발현을 보여주었고("세포"로 표시된 아래 블롯 참조) 세포 배양 배지로 분리되었다("배지"로 표시된 위 블롯 참조). 그러나, P370L 또는 Y437H MYOC를 발현하는 플라스미드로 형질감염된 세포는 세포내 발현은 보였지만 세포 배양 배지로의 분비는 없었다. 또한, 야생형 MYOC 및 P370L 또는 Y437H MYOC 중 하나를 발현하는 플라스미드와 293 세포의 공동-형질감염은 세포 배양 배지로의 MYOC 분비의 결여를 야기하였다. 이들 결과는 P370L 및 Y437H 돌연변이체는 293 세포로부터 분리되지 못하고 또한 야생형 MYOC의 분비를 차단시킬 수 있음을 시사한다.

[0205] 이들 결과가 인간 눈 세포에서 관찰되는지 여부를 결정하기 위해 추가의 실험을 착수하였다. 위에 기술한 바와 같이, 인간 섬유주대 세포주를 SV40 대형 T-항원(hTM-T 세포)의 AAV-매개 발현으로 부동화하였다. 293T 및 hTM-T 세포를 야생형 MYOC를 발현하는 플라스미드, P370L MYOC를 발현하는 플라스미드, 또는 둘 다의 플라스미드로 형질감염시켰다. 도 2는 이들 세포에서 세포내 또는 분리된 MYOC의 존재를 탐색하는 웨스턴 블롯을 보여준다. 야생형 MYOC는 293T 및 hTM-T 세포에 의해 발현되고 분리된 반면, P370L MYOC는 293T 및 hTM-T 세포 둘 다에 의해 발현되었지만 분리되지 않았다. P370L MYOC는 또한 293T 및 hTM-T 세포 둘 다에서 야생형 MYOC의 분비를 차단하였다.

[0206] 이들 결과는 녹내장 MYOC 돌연변이체(예를 들어, P370L 및 Y437H)가 인간 세포에서 야생형 MYOC의 분비를 차단할 수 있음을 나타낸다. 더욱이, 돌연변이 MYOC는 또한 hTM 세포에서 MYOC 분비를 차단할 수 있다.

[0207] 실시예 2: 녹내장 MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및 Y437H)는 Wnt 신호전달을 차단한다

[0208] MYOC는 프리즐드(Fzd) 패밀리의 Wnt 수용체, 분리된 프리즐드-관련 단백질(sFRP) 패밀리의 Wnt 길항제, 및 Wnt 억제 인자 1(WIF-1)과 같은 Wnt 신호전달 경로의 구성요소와 상호작용하는 것으로 생각되는데, 이들은 스트레스 섬유의 형성을 자극하는 액틴 세포골격의 조직화를 조절한다(Kwon *et al.* (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29:2139-54). 스트레스 섬유의 형성은 섬유주대(TM)의 신축성 및 IOP 조절에 매우 중요하다. 그러나, 정확히 어떻게 MYOC가 Wnt 신호전달과 연결되는지, 그리고 어떻게 이 연결이 IOP에 영향을 주는지는 불명확하다. 세포 생리학적 실험에 근거하여, 모세포 단백질로서의 마이오실린 역할이 제안되었다(Resch and Fautsch, 2009; Koch *et al.*, 2014). 다른 그룹에서는 마이오실린이 희돌기교세포 분화의 매개체이고 마우스에서 시신경의 수초형성에 관여하는 것을 보여주었다(Kwon *et al.*, 2014).

[0209] MYOC는 Wnt 신호전달의 조절자로서 작용할 수 있고 Wnt 단백질은 그 기능을 수행함으로써 마이오실린의 부재를 보상할 수 있다는 것이 시사되었다(Kwon *et al.* (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29:2139-54). 몇 그룹에서는 마이오실린의 작용과 b-카테닌-비 의존성 기전을 통해 작용하는 Wnt 단백질 사이의 유사성을 보고하였다(Kwon and Tomarev(2011) *J. Cell. Physiol.* 226(12):3392-402). 녹내장 TM(GTM) 세포에서 감소된 Wnt 신호전달은 더 높은 내인성 수준의 sFRP1에 기인하는 것으로 보고되었다(Wang *et al.* (2008) *J. Clin. Invest.* 118:1056-64; Lin and Hankenson (2011) *J. Cell. Biochem.* 112:3491-501). 다른 그룹에서는 Wnt 신호전달 경로가 망막 세포주 RGC-5를 상승된 압력으로부터 보호하는 것을 보여주었다(Fragoso *et al.* (2011) *Cell. Mol. Neurobiol.* 31(1):163-73).

[0210] 녹내장 MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 또는 Y437H)가 TM에서의 Wnt 신호전달에 임의의 영향을 미치는지 여부는 문헌으로부터 불명확하다. 하나의 보고에서는, TOP-Flash Wnt 신호전달 분석에 의해 측정된 바와 같이, TM으로부터 MYOC 분비를 억제하는 녹내장 MYOC 돌연변이의, TM에서의 Wnt 신호전달에 대한 효과는 불명확하다고 명시하였다(Mao *et al.* (2012) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53(11):7043-51). 다른 그룹에서는, TOP-Flash Wnt 신호전달 분석에서 보여주는 바와 같이, P370L이 Caco-2 세포에서 Wnt 신호전달에 대한 자극 효과를 갖는다고 보고하였다(Shen *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7(9):e44902).

[0211] 대조적으로, 본 발명자들은 베타-카테닌 활성을 보고하는 TOP-Flash Wnt 신호전달 분석에서 보여주는 바와

같이, MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및 Y437H)가 293 및 TM 세포에서 Wnt 신호전달에 대하여 억제 효과를 갖는 것을 발견하였다.

[0212] Wnt 신호전달에 대한 MYOC P370L 및 Y437H 돌연변이체의 효과를 평가하기 위해, 293T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC ("MYOC"), P370L MYOC, 또는 Y437H MYOC 플라스미드로 공동-형질감염시켰다. Wnt 신호전달을 재조합 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭시키고 TOP-Flash 분석에 의해 측정하였다. 루시페라제 활성(평균±SD, n = 4)을 형질감염 후 측정하였고 구성요소로 발현된 레닐라 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화하였다.

[0213] 도 3에서 보듯이, 293T 세포의 재조합 마우스 Wnt3 자극은 TOP-Flash 리포터의 증가를 야기하였다. TOP-Flash에 의해 분석된 바와 같이, 야생형 MYOC의 발현은 Wnt 신호전달을 간섭하지 않았다. 그러나, 야생형 MYOC와 P370L MYOC 또는 Y437H MYOC 중 하나와의 공동-발현은 293T 세포에서 TOP-Flash 활성화를 차단하였다. 이들 결과는 녹내장 MYOC 돌연변이체(예를 들어, P370L 및 Y437H)의 발현이 인간 세포에서 Wnt 신호전달을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0214] 실시예 3: 녹내장 MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및 Y437H)에 의해 차단된 Wnt 신호전달의 회복

[0215] 본 실시예는 녹내장 MYOC 돌연변이체 P370L 및 Y437H가 인간 세포에서 Wnt 신호전달을 차단하도록 작용하는 것을 보여준다. Wnt 신호전달이 이들 MYOC 돌연변이체를 발현하는 세포에서 회복될 수 있는 잠재적 기전을 조사하기 위해 추가의 실험을 착수하였다.

[0216] R-스폰딘 3(RSP03)은 Wnt 신호전달을 활성화시키는 RSP03 유전자에 의해 암호화되는 단백질이고, RSP03의 발현이 돌연변이 MYOC 발현에 의해 억제된 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. 이들 실험을 위해, 위의 도 3과 유사하게 293T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC"), P370L MYOC, Y437H MYOC, 및/또는 RSP03 플라스미드로 표시된 바와 같이 공동-형질감염시켰다. Wnt 신호전달을 재조합 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭시키고, TOP-Flash 분석으로 측정하였다. 루시페라제 활성(평균±SD, n = 3)을 형질감염 후 측정하였고 구성요소로 발현된 레닐라 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화하였다.

[0217] 도 4에서 보듯이, RSP03 발현은 TOP-Flash에 의해 측정되는 바와 같이 Wnt 신호전달의 증가를 야기하였다. 중요하게는, RSP03와 P370L MYOC 또는 Y437H MYOC 중 하나의 공동-발현이 P370L MYOC 또는 Y437H MYOC 단독의 발현 후 관찰되는 Wnt 신호전달의 억제와 비교하여 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있었다. 293T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC"), P370L MYOC, Y437H MYOC, 및/또는 RSP03 플라스미드로 표시된 바와 같이 공동-형질감염시켰다. Wnt 신호전달을 재조합 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭시키고, TOP-Flash 분석으로 측정하였다. 루시페라제 활성을 형질감염 후 측정하였고 구성요소로 발현된 레닐라 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화하였다.

[0218] 유사한 효과가 hTM 세포에서 관찰되는지 여부를 시험하기 위해, hTM-T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC w.t."), P370L MYOC, 및/또는 RSP03 플라스미드로 공동-형질감염시켰다. Wnt 활성은 위에 기술된 바와 같이 TOP-Flash 분석에 의해 측정하였다(루시페라제 활성은 평균±SD, n = 3으로 보여준다). 도 5는 P370L MYOC의 발현이 Wnt 신호전달의 감소를 야기하고 야생형 MYOC 공동-발현 hTM-T 세포에서 Wnt 신호전달을 감소시킬 수 있음을 보여준다. RSP03의 발현은 P370L MYOC 단독 또는 야생형 MYOC와 조합된 P370L MYOC를 발현하는 hTM-T 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시킬 수 있었다. 도 4 및 5에서 보여주는 결과는 RSP03의 발현이 293T 및 hTM-T 세포와 같이 녹내장 MYOC 돌연변이체를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달을 회복시키는 것을 나타낸다.

[0219] 놀랍게도, 녹내장 MYOC 돌연변이체의 발현에 의한 Wnt 억제는 MYOC 발현 억제(예를 들어, RNAi에 의한)에 의해 역전될 수 있다는 것이 또한 발견되었다. MYOC 발현에 대한 MYOC shRNA의 효과를 293T 세포에서 시험하였다. 도 6에서 보듯이, MYOC shRNA는 스크램블 shRNA 대조와 비교하여 야생형 MYOC를 발현하는 세포에서 MYOC 단백질 발현을 감소시켰다. 이러한 감소는 세포내 및 분비된 MYOC 둘 다에서 관찰되었다.

[0220] 도 7은 hTM-T 세포에서 MYOC shRNA의 효과를 보여준다. MYOC shRNA는 야생형 및 P370L 돌연변이 MYOC를 공동-발현하는 hTM-T 세포에서 MYOC 단백질 발현을 감소시켰다. 이러한 감소는 세포내 및 분비된 MYOC 둘 다에서 관찰되었다. 대조적으로, Grp94를 표적으로 하는 shRNA는 MYOC 발현에 대하여 효과가 없었다. Grp94는 분비된 단백질의 처리 및 수송에 관여하는 분자 샤프론이고, 일부 사례의 MYOC 녹내장 환자에 대한 치료제로서 제안되었는데, Grp94가 MYOC 돌연변이체의 제거를 용이하게 하는 것으로 생각되었기 때문이다(Suntharalingam et al., (2012) *J. Biol. Chem.* 287(48):40661-9). 스크램블 shRNA 대조도 유사하게 MYOC 발현에 대한 효과가 없었다.

- [0221] MYOC shRNA는 MYOC 발현에 영향을 미치기 때문에, Wnt 신호전달에 대한 이의 효과를 다음에 조사하였다. 도 8에서 보듯이, P370L MYOC의 발현은 293T 세포에서 Wnt 신호전달을 감소시켰다. Grp94 shRNA 및 스크램블 shRNA 대조는 P370L MYOC에 의해 억제된 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 없었다. 대조적으로, MYOC shRNA는 P370L MYOC를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달을 대략 야생형 수준으로 증가시켰다(즉, TOP-Flash에 의해 측정시, P370L MYOC를 발현하지 않는 대조 세포에서 관찰되는 Wnt 신호전달의 수준). RSP03의 발현이 또한 P370L MYOC를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 것이 발견되었으며, RSP03와 MYOC RNAi(예를 들어, shRNA)의 발현의 조합은 P370L MYOC를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달의 상승적 증가를 유도하였다.
- [0222] 비록 Grp94의 억제가 MYOC 돌연변이체의 효과를 감소시키기 위한 기전으로서 제안되었다 하더라도, 본원에 기술되는 이들 결과는 RSP03 및/또는 MYOC shRNA의 발현이 MYOC 돌연변이체 발현의 존재시 Wnt 신호전달의 탈-억압에 더욱 효과적일 수 있음을 나타낸다.
- [0223] Y437H MYOC를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달에 대한 MYOC shRNA의 효과를 또한 조사하였다. 도 9에서 보듯이, P370L 또는 Y437H MYOC의 발현은 293T 세포에서 Wnt 신호전달을 감소시켰다. 그러나, MYOC shRNA는 P370L 또는 Y437H MYOC 중 하나를 발현하는 세포에서 Wnt 신호전달을 회복시킬 수 있었다. 이 효과는 스크램블 shRNA 대조의 발현에서는 관찰되지 않았다.
- [0224] 요약하면, 이들 결과는 MYOC 돌연변이체(예를 들어, P370L 및 Y437H)에 의해 차단된 Wnt 신호전달은 R-스폰딘 3(RSP03) 발현 및/또는 MYOC 억제(예를 들어, RNAi에 의한)에 의해 회복될 수 있음을 나타낸다.
- [0225] **실시예 4: AAV2 R471A는 섬유주대의 세포를 형질도입시킨다**
- [0226] AAV 입자가 섬유주대의 세포를 형질도입시킬 수 있는지를 결정하기 위해, EGFP를 암호화하는 AAV2 벡터를 R471A 아미노산 치환(VP1을 기반으로 넘버링하여)을 포함하는 AAV2 입자의 야생형 AAV2 입자로 패키징하였다. 바이러스 입자는 hTM 세포(위에 기술된)를 AAV2 EGFP 및 AAV2 R471A EGFP로 처리하여 시험관내 평가하였다. 도 10(좌측 패널)에서 보듯이, AAV2 R471A EGFP는 야생형 AAV2와 비교하여 더 높은 TM 세포 형질도입을 보였다. 생체내 TM 세포 형질도입을 평가하기 위해, AAV2 EGFP 및 AAV2 R471A EGFP를 마우스의 눈으로 주사하였다. 다음에 마우스를 희생시키고 EGFP 발현을 분석하였다. 도 10(우측 패널)에서 보듯이, AAV2 R471A EGFP는 야생형 AAV2와 비교하여 더 높은 TM 세포 형질도입을 보였다.
- [0227] **실시예 5: 마이오실린(MYOC) 녹내장의 동물 모델에서 RSP03 발현 또는 MYOC shRNA**
- [0228] 위의 실시예는 녹내장 MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및 Y437H)가 Wnt 신호전달을 차단하고, 이러한 Wnt 신호전달의 억제가 R-스폰딘3(RSP03) 발현 또는 MYOC shRNA에 의해 역전될 수 있음을 보여준다. 임의의 특정 이론에 구애받지 않고, MYOC 돌연변이(예를 들어, P370L 및/또는 Y437H)는 TM에서 Wnt 신호전달에 영향을 미칠 수 있고, 이에 의해 IOP를 조절하고 POAG에 기여하는 것으로 생각된다. 다음 실험에서는 R-스폰딘 3(RSP03) 발현 또는 MYOC shRNA가 AAV2 벡터를 통해 전달되어 이 질환의 마우스 모델에서 녹내장 증상을 개선할 수 있는지 여부를 시험한다.
- [0229] POAG의 마우스 모델을 사용하여 마이오실린(MYOC) 녹내장을 치료하는 데 있어서 눈으로의 R-스폰딘 3(RSP03) 발현 및/또는 MYOC shRNA의 AAV-매개 전달의 효능을 조사하였다. 예를 들어, Y437H MYOC를 발현하는 마우스 모델이 사용될 수 있다(Zode *et al.* (2011) *J. Clin. Invest.* 121(9):3542-53 참조). 이 모델에서, 인간 Y437H MYOC는 형질전환 마우스에서 CMV 프로모터의 조절 하에 발현된다. 이 시스템을 사용하여, Y437H MYOC를 섬유주대 및 공막과 같은 마이오실린(MYOC) 녹내장 관련 조직에서 발현시킨다. 이들 마우스는 지극히 정상적인 눈 형태학을 나타내지만 3 개월령 이후에는, 증가된 IOP 및 시신경의 진행성 액손 퇴화와 같은 마이오실린(MYOC) 녹내장-유사 증상을 보이기 시작한다.
- [0230] GFP, 마우스 RSP03, 마우스 MYOC를 표적으로 하는 shRNA(플라스미드 pGIPZ #93으로부터의 루프 서열 및 MYOC shRNA 표적; Dharmacon, GE Healthcare), 또는 스크램블 shRNA를 발현하는 이식유전자를 AAV2 계놈으로, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 서열을 또한 포함하는 플라스미드 pCBA(2)-int-BGH로부터의 하이브리드 닥 β-엑틴(CBA) 프로모터의 조절 하에 클로닝한다(Xu, R., *et al.* (2001) *Gene Ther.* 8:1323-32). 다음에 이 발현 카세트는 AAV2 역위 말단 반복(ITR)을 포함하는 바이러스 감염 전(pre-viral) 플라스미드 벡터 pAAVSP70로 클로닝한다(Ziegler, R.J., *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 9:231-40). ITR과 측면을 접한 영역을 포함하는 플라스미드 sp70.BR/sFLT01 내 생성된 AAV 계놈의 전체 크기는 4.6 kb이다.
- [0231] AAV2 계놈을 섬유주대의 감염을 허용하도록 R471A 돌연변이가 있는 AAV2 캡시드로, 또는 망막 신경절 세포의 감

염을 허용하도록 야생형 AAV2 캡시드로 패키징시킨다. AAV2 게놈을 AAV2 야생형 또는 R471A 캡시드로 3중 형질 감염 방법을 이용한 "거트리스(gutless)" 벡터 접근을 사용하여 패키징한다(예를 들어, Xiao *et al.* (1998) *J. Virol.*, 3:2224-32 참조). 간단하게는, rep 및 cap 유전자를, 둘 다 5' 및 3' 역위 말단 반복(ITR) 사이에 샌드위치된 치료적 유전자 및 이의 조절 요소로 교체한다. rep 및 cap 유전자는 별개의 플라스미드에 트랜스로 제공되고 제3 플라스미드가 요구되는 아데노바이러스 헬퍼 유전자에 기여한다. 대안으로서, 요구되는 헬퍼 유전자는 아데노바이러스 결핍 복제에 의해 제공되고/되거나 아데노바이러스 헬퍼 유전자가 안정적으로 숙주 세포 게놈으로 통합된다. 임의의 특정 이론에 구애받지 않고, 바이러스 캡시드가 완전히 조립된 다음 ITR과 측면을 접한 벡터 게놈이 캡시드 기공을 통해 캡시드로 삽입되는 것으로 상정된다(Myers & Carter (1980) *Virology*, 102:71-82). 게놈-함유 캡시드는 다음에 주사를 위해 제형화된다.

[0232] 인간 Y437H MYOC를 발현하는 형질전환 마우스를 대략 3 개월령까지 성장시킨 다음 처치군으로 무작위 할당한다. 마우스를 마취시키고 GFP, 마우스 RSP03, 마우스 MYOC를 표적으로 하는 shRNA, 또는 스크램블 shRNA를 암호화하는 AAV 벡터를 유리체내 또는 전방내 주사로 주사하였다. 한 처치군에서는, 망막 신경절 세포에서의 효과를 시험하기 위해 마우스는 마우스 RSP03를 발현하는 야생형 AAV2 캡시드를 갖는 AAV2 벡터의 주사, 그리고 반대쪽 눈에 GFP를 발현하는 야생형 AAV2 캡시드를 갖는 AAV2 벡터의 주사를 받는다. 한 처치군에서는, 섬유주대에서의 효과를 시험하기 위해 마우스는 마우스 MYOC를 표적으로 하는 shRNA를 발현하는 R471A AAV2 캡시드를 갖는 AAV2 벡터의 주사, 그리고 반대쪽 눈에 스크램블 shRNA를 발현하는 R471A AAV2 캡시드를 갖는 AAV2 벡터의 주사를 받는다. 한 처치군에서, 마우스는 한 눈에 마우스 RSP03를 발현하는 AAV 벡터와 마우스 MYOC를 표적으로 하는 shRNA를 발현하는 AAV 벡터의 혼합물의 주사, 그리고 반대쪽 눈에 GFP를 발현하는 AAV 벡터 및/또는 스크램블 shRNA를 발현하는 AAV 벡터의 주사를 받는다. 한 처치군에서, 마우스는 한 눈에 마우스 RSP03를 발현하고 마우스 MYOC를 표적으로 하는 shRNA를 발현하는 AAV 벡터의 주사, 그리고 반대쪽 눈에 GFP를 발현하고 스크램블 shRNA를 발현하는 AAV 벡터의 주사를 받는다.

[0233] 마우스는 실험적 처치를 받은 눈을 대조 처치를 받은 눈과 비교하여, 마이오실린(MYOC) 녹내장 증상에 대한 주사 후 규칙적인 간격으로 검사받는다. IOP는 안압측정에 의해 측정된다(Kim, C.Y., *et al.* (2007) *Eye (Lond.)* 21(9):1202-9). 각막 두께는 초음파 후도계로 측정한다(Lively, G.D., *et al.* (2010) *Physiol. Genomics* 42(2):281-6). 홍채각막각은 전방각경검사에 의해 평가한다. 망막 신경절 세포 기능은 패턴 망막전위도검사(PERG)를 사용하여 시각적 자극에 대한 패턴 망막전위도검사 반응을 분석함으로써 측정한다(Zode *et al.* (2011) *J. Clin. Invest.* 121(9):3542-53). 마우스를 희생시키고 다른 표현형 특성화를 위해 눈을 해부할 수 있다. 예를 들어, 망막 신경절 세포 수 및/또는 형태학을 면역형광 현미경 및/또는 투과형 전자 현미경으로 평가한다.

[0234] **실시예 6: 녹내장 MYOC 돌연변이에 의해 차단된 Wnt 신호전달을 회복시키기 위한 RSP0 패밀리 단백질의 용도**

[0235] 실시예 3에서 보여주는 바와 같이, MYOC 돌연변이체(예를 들어, P370L 및 Y437H)에 의해 차단된 Wnt 신호전달은 R-스폰딘 3(RSP03) 발현에 의해 회복될 수 있다. 이러한 Wnt 신호전달의 회복에 내재된 기전을 더욱 이해하기 위해, 상이한 RSP0 패밀리 구성원 및 변종의 Wnt 신호전달 회복 능력을 조사하였다.

[0236] **도 11 및 12**에서 보여주는 바와 같이, 인간 RSP0 패밀리 단백질 hRSP01, 2, 3, 및 4는 푸린-유사 Cys 풍부 도메인, 트롬보스폰딘 유형 I 도메인, 및 C-말단의 양으로 하전된 도메인을 포함하는 유사한 도메인 구조를 공유한다. Wnt 신호전달의 회복에 요구되는 기능적 도메인을 조사하기 위해, 인간 RSP03의 몇 가지 절단된 변종을 생성하였다. 변종, 및 각각의 변종에 포함 및 제외된 특이적 도메인은 **도 11, 12, 13a 및 14**에 나타낸다.

[0237] Wnt 신호전달에 대한 RSP03 변종의 효과를 시험하기 위해, **도 15**에 표시된 바와 같이 293T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC("MYOC") 또는 Y437H MYOC로 공동-형질감염시키고, 또한 전체 길이 또는 부분적 RSP03 플라스미드로 형질감염시켰다. Wnt 신호전달을 재조합 인간 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭시키고, TOP-Flash 분석으로 측정하였다. 루시페라제 활성(평균±SD, n = 3)을 형질감염 후 측정하였고 구성요소로 발현된 레닐라 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화하였다.

[0238] 실시예 3에 기술된 것과 같이, 돌연변이 MYOC Y437H는 TOP-Flash 분석으로 측정되듯이 293T 세포에서 Wnt 신호전달을 억제한다. **도 15**는 이 분석에서 다양한 hRSP03 절단된 변종의 Wnt 신호전달에 대한 효과를 보여준다. **도 15**에서 보듯이, 시험된 모든 hRSP03 형태는 부분적 및 전체-길이 둘 다 Wnt 회복 활성을 갖고, 전체-길이 RSP03는 많은 절단된 형태보다 더 강력한 활성을 나타내었다.

[0239] Wnt 신호전달에 대한 상이한 RSP0 패밀리 구성원의 효과를 시험하기 위해, **도 16**에 표시된 바와 같이 293T 세포를 TOP-Flash 리포터 구성체 및 wtMYOC ("MYOC") 또는 Y437H MYOC로 공동-형질감염시키고, 또한 전체 길이 또

는 부분적 RSP01, RSP02 또는 RSP04 플라스미드로 형질감염시켰다(RSP01, 2, 3, 및 4 절단된 형태의 설명에 대해서는 도 12 참조). Wnt 신호전달을 재조합 마우스 Wnt3a(400 ng/mL)의 첨가 후 증폭시키고, TOP-Flash 분석으로 측정하였다. 루시페라제 활성(평균±SD, n = 3)을 형질감염 후 측정하였고 구성요소로 발현된 레닐라 루시페라제 수준의 형질감염 대조로 정규화하였다.

[0240] 이들 연구의 결과는 도 16에 나타낸다. 이들 결과는 전체-길이 및 절단된 RSP01, 2, 및 4 또한 Wnt 회복 활성을 갖고, 전체-길이 RSP0들은 절단된 형태보다 더 강력한 활성을 나타낸 것을 보여준다. 모든 RSP0 패밀리 구성원 및 형태는 Wnt3a와 작용하였다.

[0241] 서열

[0242] RSP03 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)

MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGM
KQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCCTCFNKNFCTKCKSGFYHLHGKCLDNCPEGLEANNHT
MECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQK
GERGKKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLESSKEIPEQRENKQQQKKRKVQDKQKSVSVSTVH (SEQ ID NO:1)

[0243]

[0244] RSP03 폴리뉴클레오티드 서열

ATGCACTTGCGACTGATTTCTTGGCTTTTTATCATTTTGAACTTTATGGA
 ATACATCGGCAGCCAAAACGCCTCCCGGGGAAGGCGCCAGCGAAGAATGC
 ATCCTAACGTTAGTCAAGGCTGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGAT
 TACAATGGATGTTTGTTCATGTAAGCCCAGACTATTTTTTGTCTCTGGAAAG
 AATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTCTTCATGTCCAAGTGGAT
 ATTATGGAACTCGATATCCAGATATAAATAAGTGTACAAAATGCAAAGCT
 GACTGTGATACCTGTTTCAACAAAAATTTCTGCACAAAATGTAAAAGTGG
 ATTTTACTTACACCTTGGAAGTGCCTTGACAATTGCCCAGAAGGGTTGG
 AAGCCAACAACCATACTATGGAGTGTGTGTCAGTATTGTGCACTGTGAGGTC
 AGTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACGAAGAAGGGAACAAACATGTGG
 CTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATACAGCATCCTT
 CAGCAAAGGGTAACCTGTGTCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
 GTGCAAAGGAAGAAGTGTGAGAAGGGAACGAGGAAAAAAGGAAGGGA
 GAGGAAAAAGAAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTG
 ACAGCAAAAGTCTGGAATCCAGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAAC
 AAACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAAGATAAACAGAAATCGGTATC
 AGTCAGCACTGTACACTAG (SEQ ID NO:2)

[0245]

[0246] MYOC 폴리펩티드 서열

MRFFCARCCSFGPEMPAVQLLLLAQLVWDVGARTALRLKANDQSGRCQYTFVSASPNESSCPEQSQAM
 SVIHNLRDSSSTQRLDLEATKARLSSLESLLHQLTLDQAARPQETQEGLQRELGLRRERDQLETQTREL
 ETAYSNLLRDKSVLEEEKKRLRQENENLARRLESSQEVARLRRGQCPQTRDTARAVPPGSREVSTWNL
 DTLAFQELKSELTEVPASRLKESPSGYLRSGEGDTGCGELVWVGEPLTLRTAETTTGKYGVWMDPKPT
 YPYTQETTWRIDTVGTDVRQVFEYDLISQFMQGYPSKVHILPRPLESTGAVVYSGSLYFQGAESRTVIRY
 ELNTEVTKAEKEIPGAGYHGQFPYSWGGYTDIDLAVDEAGLWVIYSTDEAKGAIVLSKLNPNENLELEQT
 WETNIRKQSVANAFICGTLYTVSSYTSADATVNFAYDTGTGISKTLTIPFKNRYKYSSMIDYNPLEKKLF
 AWDNLNMVTYDIKLSKM (SEQ ID NO:3)

[0247]

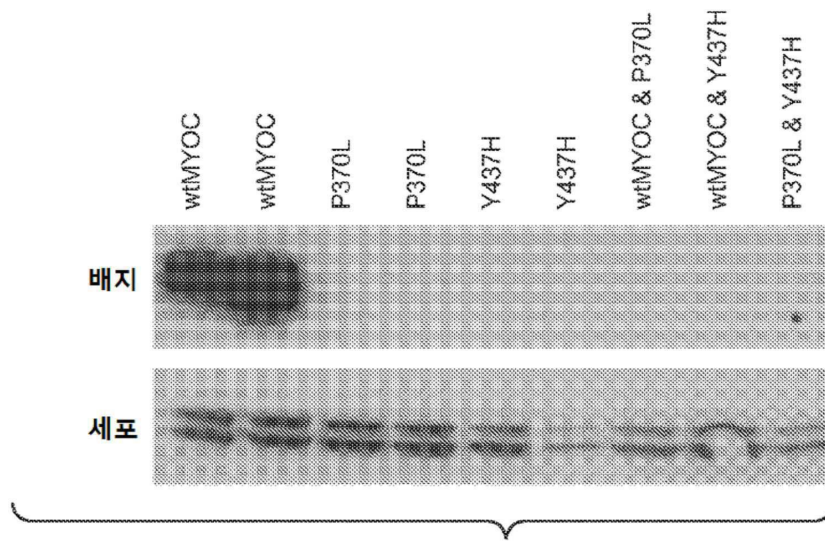
- [0248] MYOC cDNA 서열
- ATGAGGTTCTTCTGTGCACGTTGCTGCAGCTTTGGGCCTGAGATGCCAGCTGTCCAGCTGCTGCTTCT
GGCCTGCCTGGTGTGGGATGTGGGGGCCAGGACAGCTCAGCTCAGGAAGGCCAATGACCAGAGTGG
CCGATGCCAGTATACCTTCAGTGTGGCCAGTCCCAATGAATCCAGCTGCCAGAGCAGAGCCAGGC
CATGTCAGTCATCCATAACTTACAGAGAGACAGCAGCACCCAACGCTTAGACCTGGAGGCCACCAA
AGCTCGACTCAGCTCCCTGGAGAGCCTCCTCCACCAATTGACCTTGGACCAGGCTGCCAGGCCCCAG
GAGACCCAGGAGGGGCTGCAGAGGGAGCTGGGCACCTGAGGCGGGAGCGGGACCAGCTGGAAAC
CCAAACCAGAGAGTTGGAGACTGCCTACAGCAACCTCCTCCGAGACAAGTCAGTTCTGGAGGAAGA
GAAGAAGCGACTAAGGCAAGAAAATGAGAATCTGGCCAGGAGGTTGGAAAGCAGCAGCCAGGAGG
TAGCAAGGCTGAGAAGGGGCCAGTGTCCCGAGACCCGAGACACTGCTCGGGCTGTGCCACCAGGCT
CCAGAGAAGTTTCTACGTGGAATTTGGACACTTTGGCCTTCCAGGAACTGAAGTCCGAGCTAACTGA
AGTTCTTGCTTCCCGAATTTTGAAGGAGAGCCCATCTGGCTATCTCAGGAGTGGAGAGGGAGACAC
CGGATGTGGAGAACTAGTTTGGGTAGGAGAGCCTCTCACGCTGAGAACAGCAGAAACAATTACTGG
CAAGTATGGTGTGTGGATGCGAGACCCCAAGCCACCTACCCCTACACCCAGGAGACCACGTGGAG
AATCGACACAGTTGGCACGGATGTCCGCCAGGTTTTTGGATATGACCTCATCAGCCAGTTTATGCAG
GGCTACCCTTCTAAGGTTACATACTGCCTAGGCCACTGGAAAGCACGGGTGCTGTGGTGTACTCGG
GGAGCCTCTATTCCAGGGCGCTGAGTCCAGAACTGTCATAAGATATGAGCTGAATACCGAGACAG
TGAAGGCTGAGAAGGAAATCCCTGGAGCTGGCTACCACGGACAGTTCCCGTATTCTTGGGGTGGCT
ACACGGACATTGACTTGGCTGTGGATGAAGCAGGCCTCTGGGTCAATTTACAGCACCGATGAGGCCA
AAGGTGCCATTGTCTCTCCAAACTGAACCCAGAGAATCTGGAATCGAACAACCTGGGAGACAA
ACATCCGTAAGCAGTCAGTCGCCAATGCCCTCATCTGTGGCACCTTGTACACCGTCAGCAGCTA
CACCTCAGCAGATGCTACCGTCAACTTTGCTTATGACACAGGCACAGGTATCAGCAAGACCCTGACC
ATCCATTCAAGAACCGCTATAAGTACAGCAGCATGATTGACTACAACCCCTGGAGAAGAAGCTC
TTTGCTGGGACAACCTGAACATGGTCACTTATGACATCAAGCTCTCCAAGATGTAG (SEQ ID NO:4)
- [0249]
- [0250] MYOC shRNA 표적 서열
- GGCCATGTCAGTCATCCAT (SEQ ID NO:5)
- [0251] QAMSVIH (SEQ ID NO:6)
- [0252] shRNA 루프 서열
- AATAGTGAAGCCACAGATGTATT (SEQ ID NO:7)
- [0253]
- [0254] RSP01 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
- MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
GVCLPSCPYPGYFDARNPDMNKICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCPACPEGSSAANGTMEC
SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRGSEERTRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCVRRVPCPEGQKR
RKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGQQQQQQGTVGPLTSAGPA (SEQ ID NO:8)
- [0255]
- [0256] RSP02 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
- MQFRLEFSAIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQ
YGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME
CVEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTILCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRT
KAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDRANQ (SEQ ID NO:9)
- [0257]
- [0258] RSP04 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
- MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGNGCTGCIHSEENGSTCQQLFLFIRREGIRQYKCLH
DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGKCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECELG
PWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPQRPQPGERSPGQKKGRKDR
RPRKDRKLDRLDVRPRQPLQP (SEQ ID NO:10)
- [0259]
- [0260] RSP01 절단 1-135 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
- MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
GVCLPSCPYPGYFDARNPDMNKICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCPACPEGSSA (SEQ ID
NO:11)
- [0261]

- [0262] RSP01 절단 1-206 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRI~~SAEG~~SQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQV
 GVCLPSCPPGYFDARNPDMNKICKIEHCEACFSHN~~FK~~CKEGLYLHKGRCPACPEGSSAANGTMEC
 SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPC (SEQ ID
 NO:12)
- [0263]
- [0264] RSP02 절단 1-134 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MOFRLFSFALJILNCMDYSHCQGNRWRRSKRAS~~YVSN~~PICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQ
 YGEC~~LH~~SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENC~~DS~~CF~~SK~~DFCTKCKVGFYLHRGRCFDEC~~PD~~GFAP (SEQ ID
 NO:13)
- [0265]
- [0266] RSP02 절단 1-203 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MOFRLFSFALJILNCMDYSHCQGNRWRRSKRAS~~YVSN~~PICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQ
 YGEC~~LH~~SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENC~~DS~~CF~~SK~~DFCTKCKVGFYLHRGRCFDEC~~PD~~GFAPLEETME
 CVEGCEVGHWSEWGTC~~SR~~NNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTILCPTIAESRRCKMTMRHC (SEQ ID
 NO:14)
- [0267]
- [0268] RSP03 절단 1-135 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMK
 QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEA (SEQ ID
 NO:15)
- [0269]
- [0270] RSP03 절단 1-146 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMK
 QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
 CVSIV (SEQ ID NO:16)
- [0271]
- [0272] RSP03 절단 1-206 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMK
 QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
 CVSIVHCEVSEWNPWPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKC (SEQ ID
 NO:17)
- [0273]
- [0274] RSP04 절단 1-128 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENG~~CS~~TCQQLFLFIRREGIRQY~~GK~~CLH
 DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCF~~SQ~~DFCIRCKRQFYLYKGKCLPTCPPGTLA (SEQ ID NO:18)
- [0275]
- [0276] RSP04 절단 1-195 폴리펩티드 서열(신호 서열은 밑줄침)
MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENG~~CS~~TCQQLFLFIRREGIRQY~~GK~~CLH
 DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCF~~SQ~~DFCIRCKRQFYLYKGKCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECELG
 PWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCP~~IQ~~RP (SEQ ID NO:19)
- [0277]
- [0278] 돌연변이된 ITR 폴리뉴클레오티드 서열
 CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTT
 TGCCCGGGCG (SEQ ID NO:20)
- [0279]
- [0280] MYOC370L 정방향 돌연변이생성 프라이머(치환은 밑줄침)
 ACCACGGACAGTTCCTGTATTCTTGGGGTGG (SEQ ID NO:21)
- [0281]

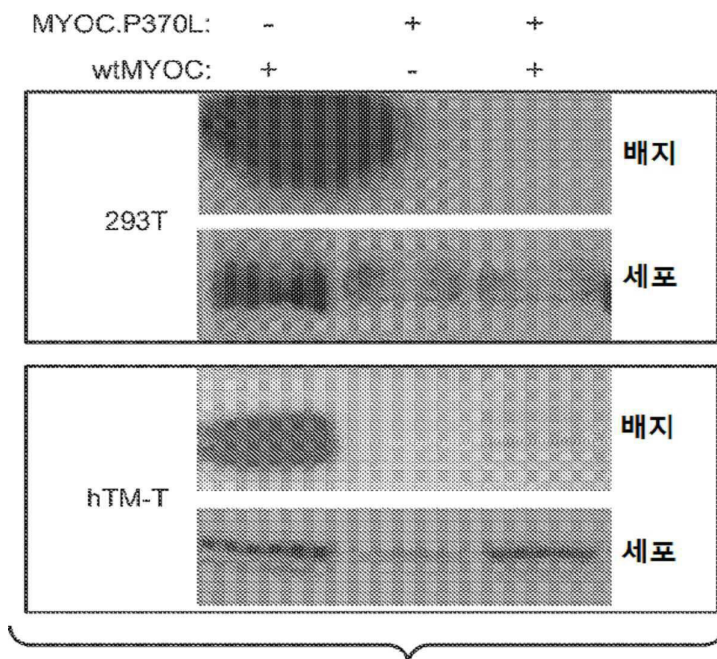
- [0282] MYOC370L 역방향 돌연변이생성 프라이머(치환은 밑줄침)
 CCACCCCAAGAATACAGGAAGTGTCCGTGGT (SEQ ID NO:22)
- [0283]
- [0284] MYOCY437H 정방향 돌연변이생성 프라이머(치환은 밑줄침)
 TCTGTGGCACCTTGCACACCGTCAGCAGC (SEQ ID NO:23)
- [0285]
- [0286] MYOCY437H 역방향 돌연변이생성 프라이머(치환은 밑줄침)
 GCTGCTGACGGTGTGCAAGGTGCCACAGA (SEQ ID NO:24)
- [0287]

도면

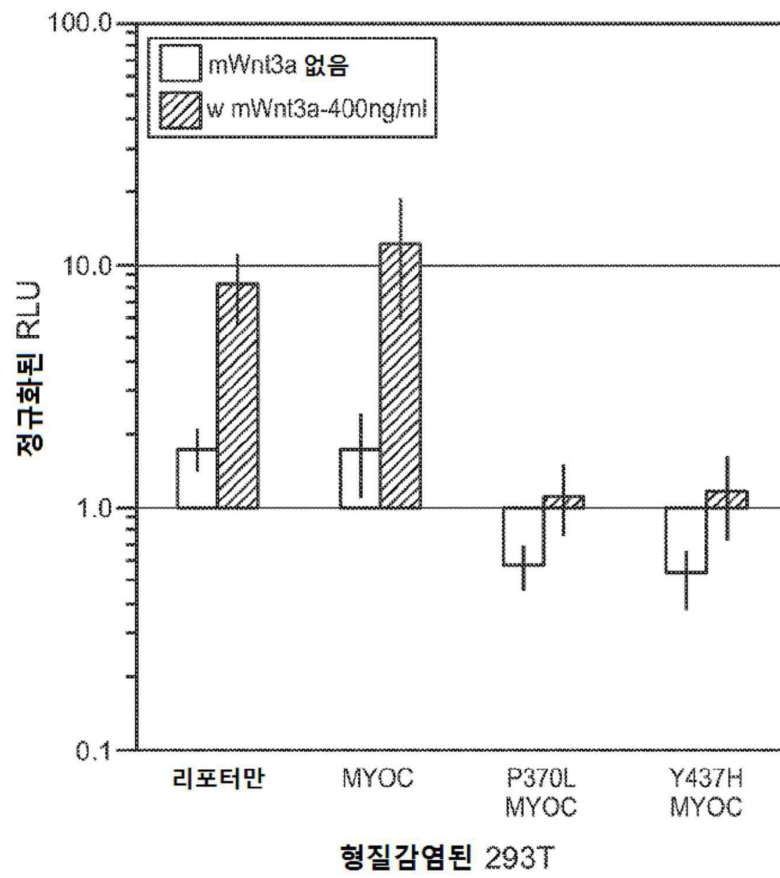
도면1



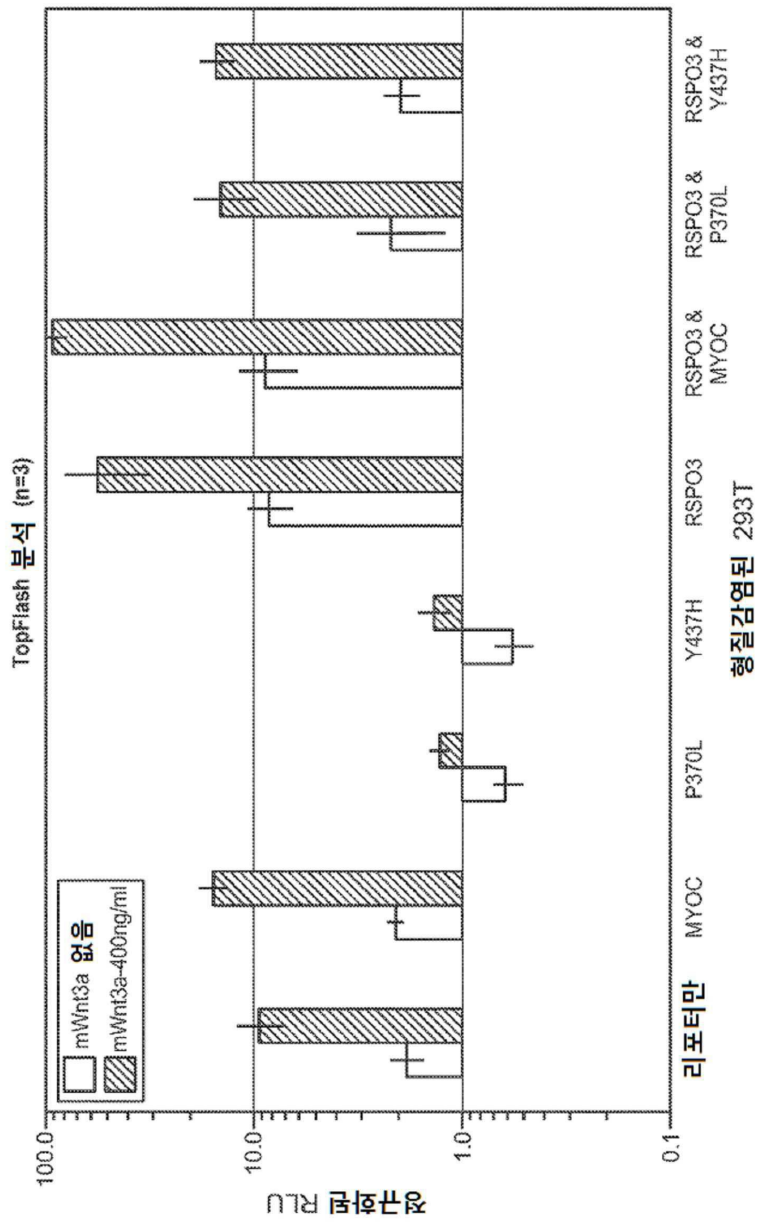
도면2



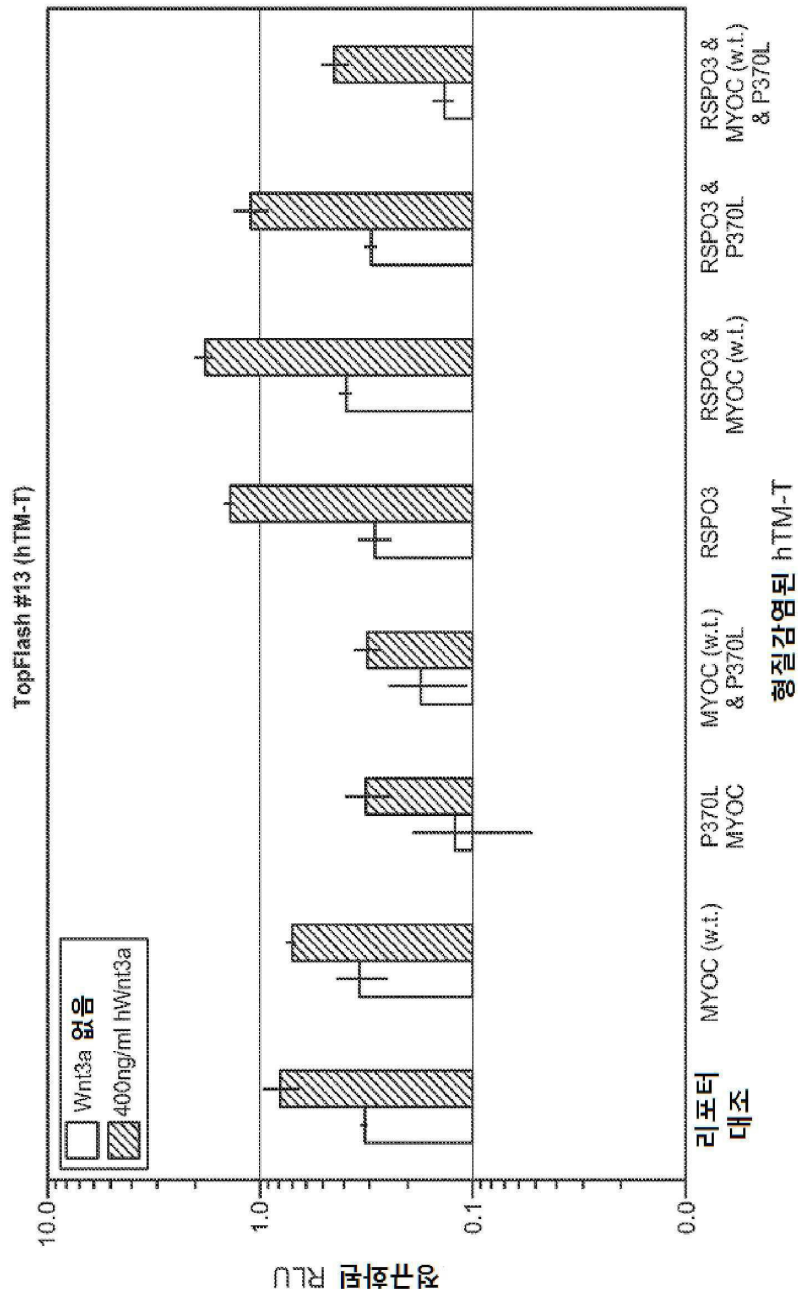
도면3



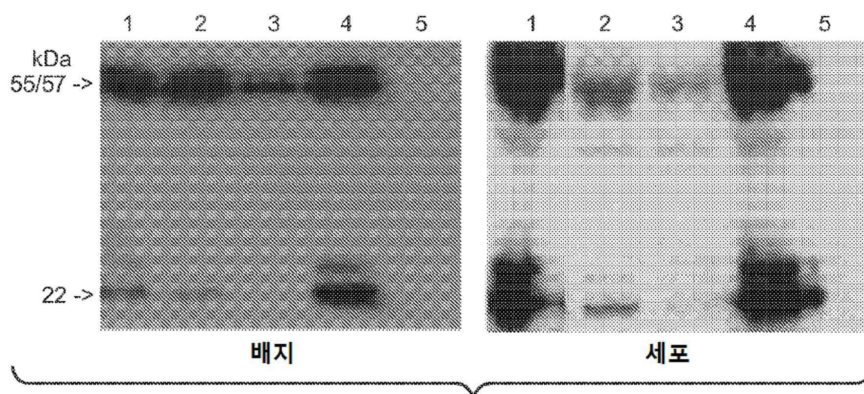
도면4



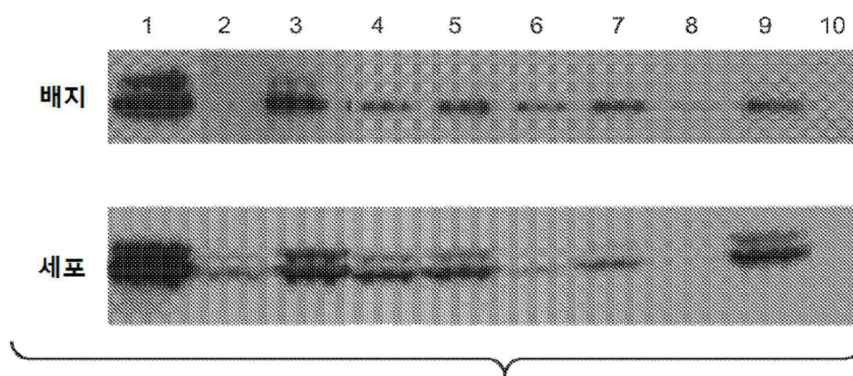
도면5



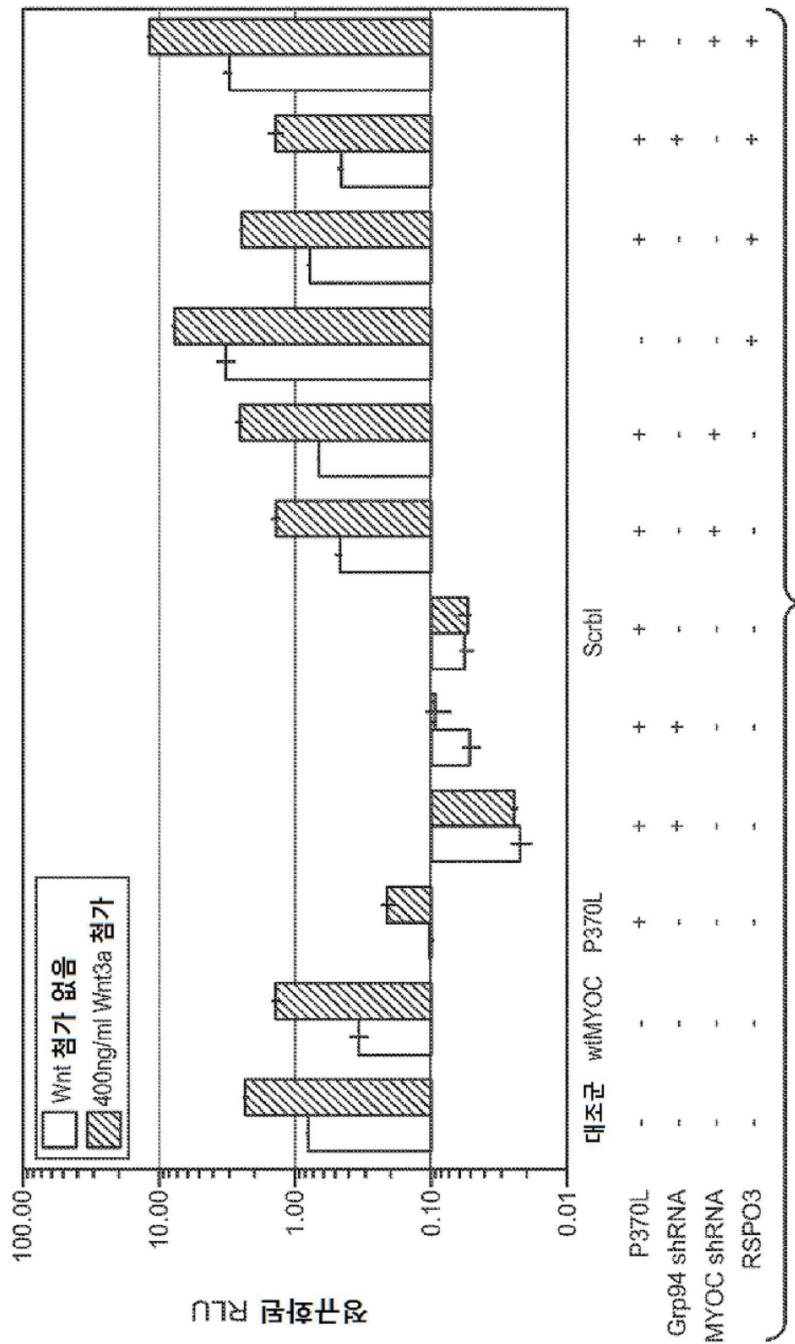
도면6



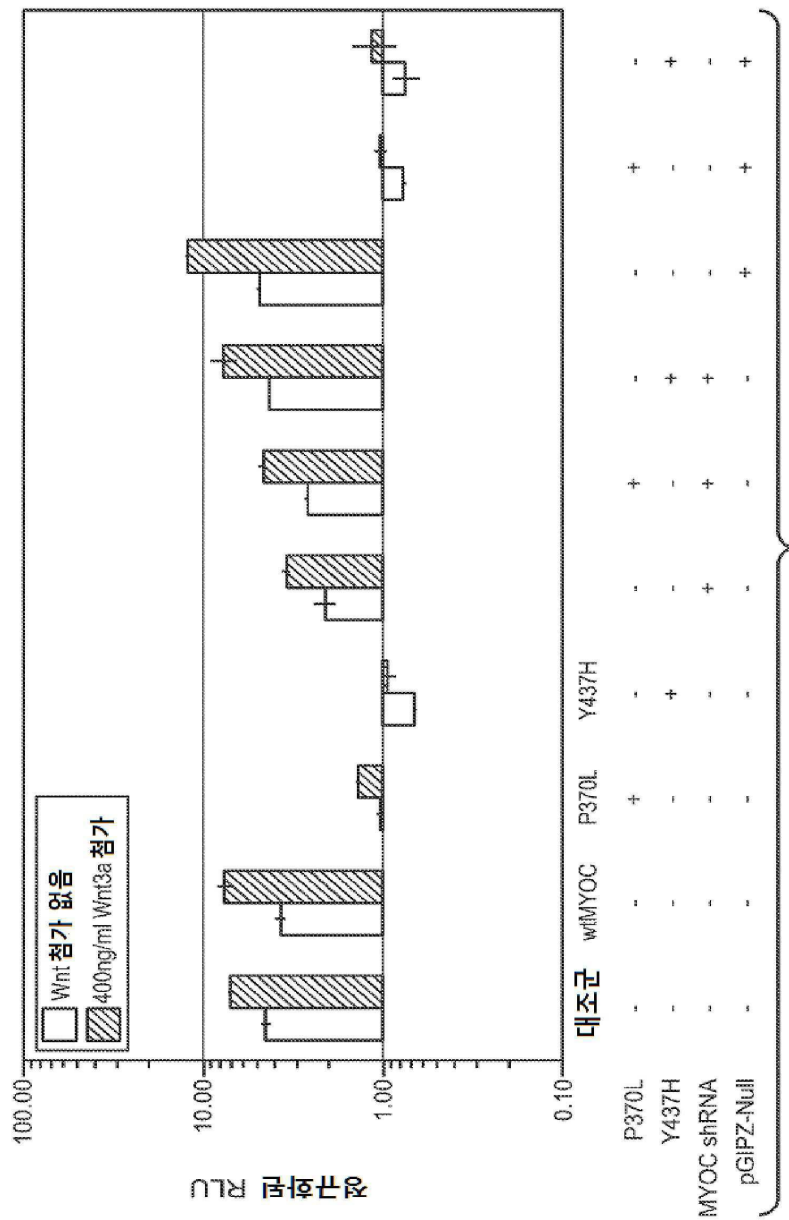
도면7



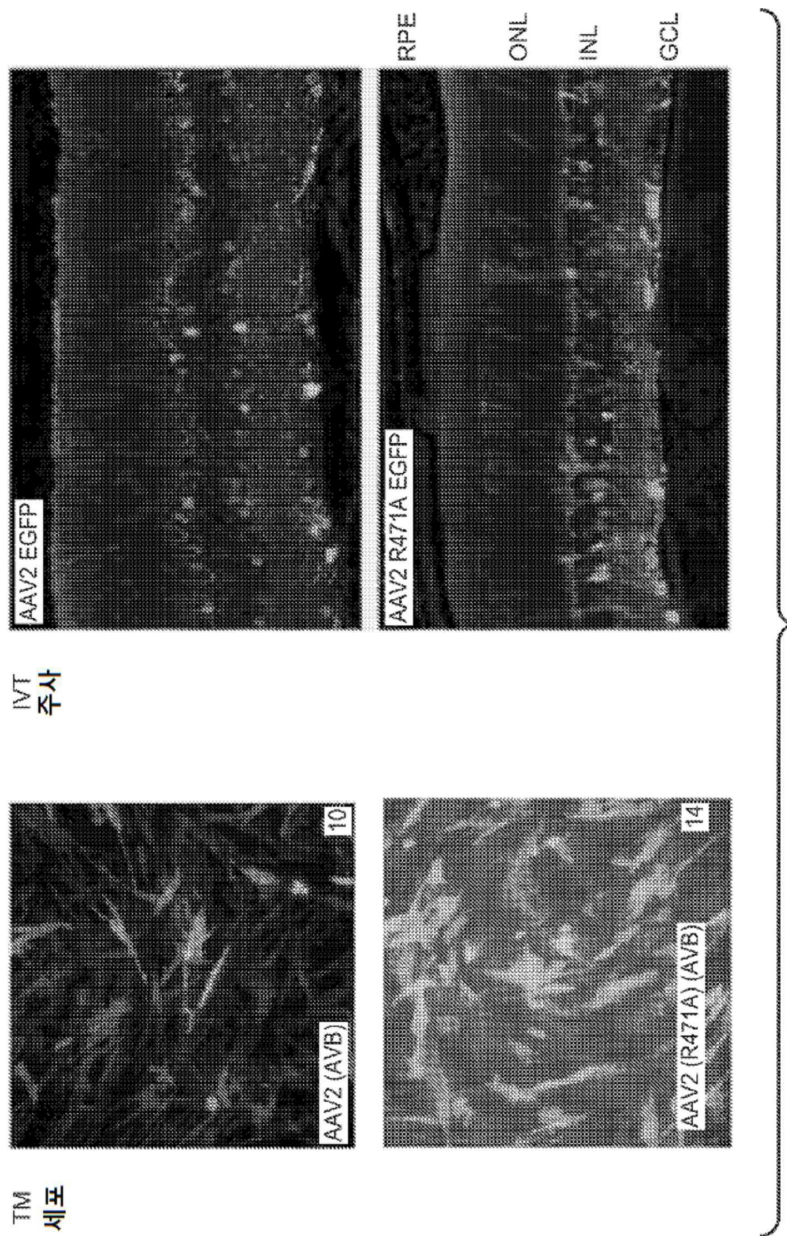
도면8



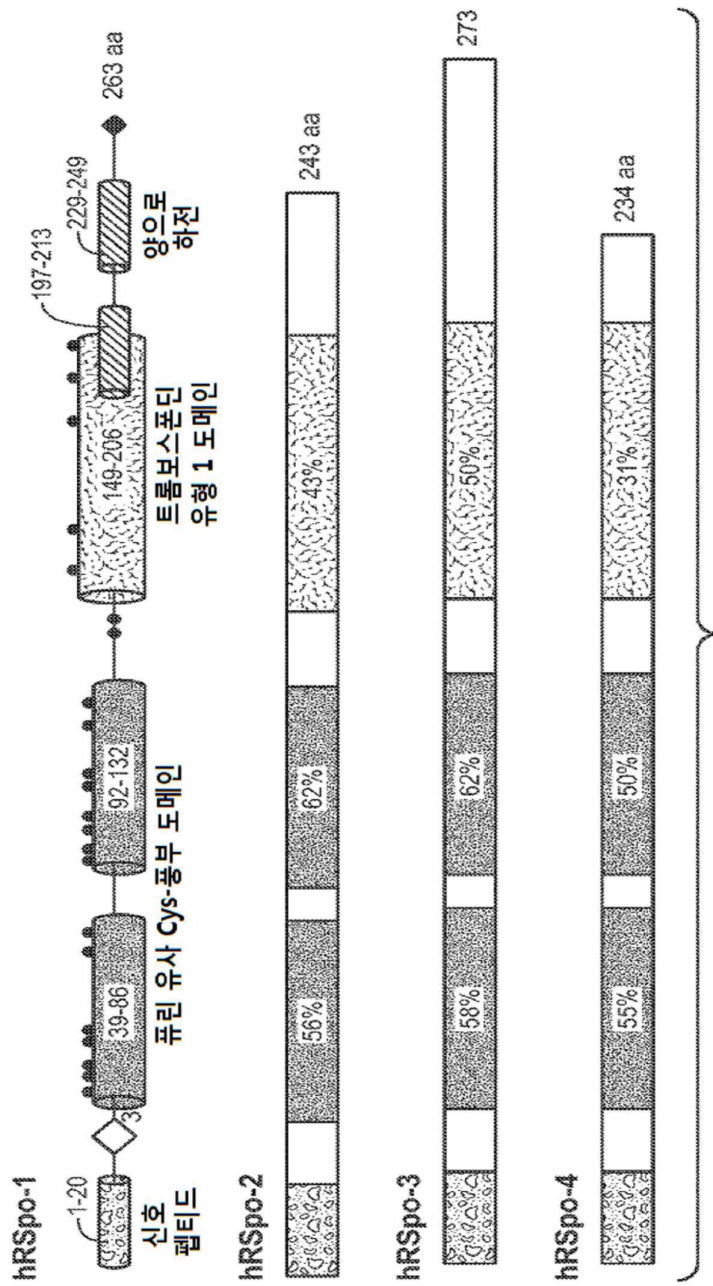
도면9



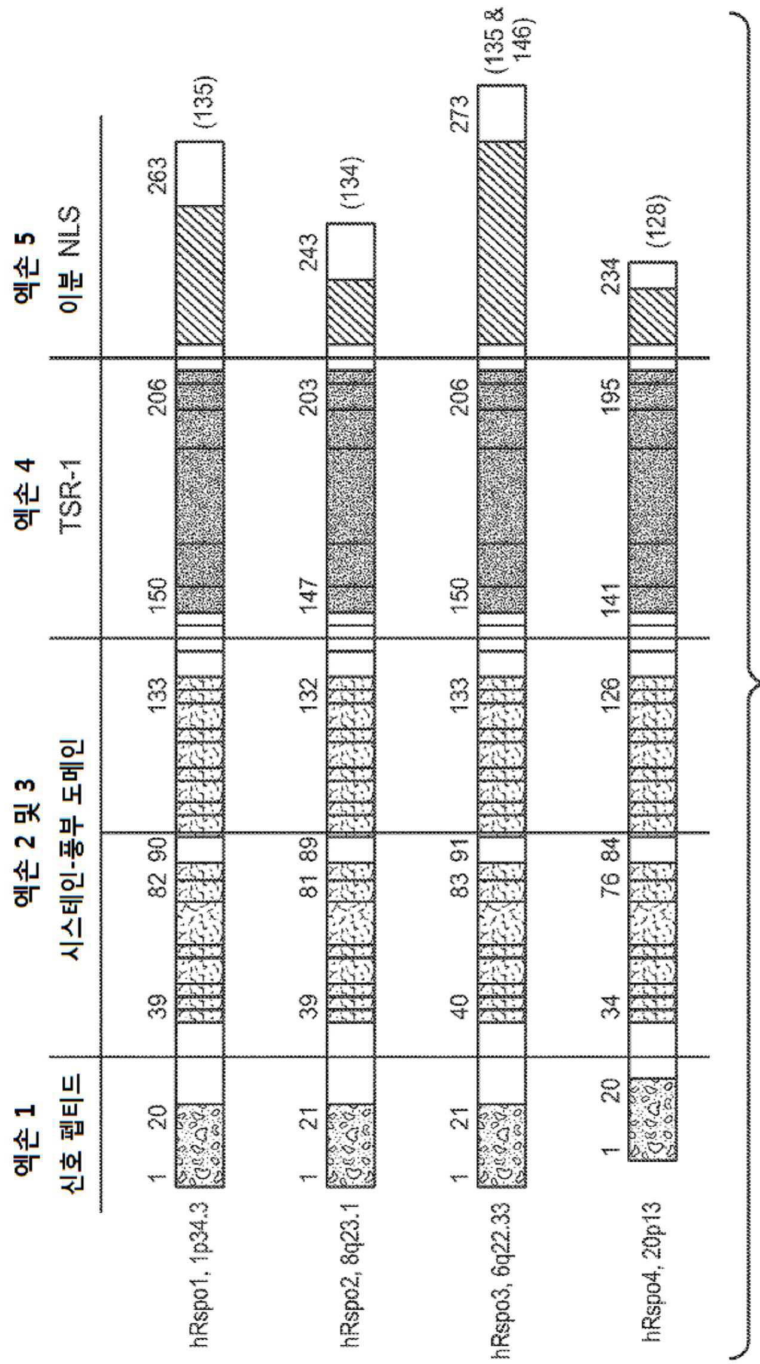
도면10



도면11



도면12



도면13a

신호	FU 1	FU 2	TSP1
[MHLRLISWLEIILNEMEYIGSDNASRGRQRMMH]P	PNVSQGCQGGCATC		
SDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPGYGJ	TRYPD	[NKCTKCK	
ADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGKCLDNCPEGLEA	NNHTMECVSIV	HC	
EVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETR			
[KCTVQRKKCQ]KGERGKKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLESKEIPEQ			

RENKQQQOKKRKVQDKQKSVSVTVH*	201	272
----------------------------	-----	-----

도면13b

신호

FU 1

MHLRLISWLFILNFMMEYIGSQNASRGRRRQRRMHIPNVSQGCGGCATC

SDYNGCLSCPKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYGYTRYPD[NKCTKCK] FU 2

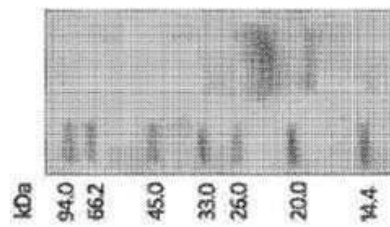
ADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLIHLGKCLDNCPEGLEANNNHTMECVSIV

135 146

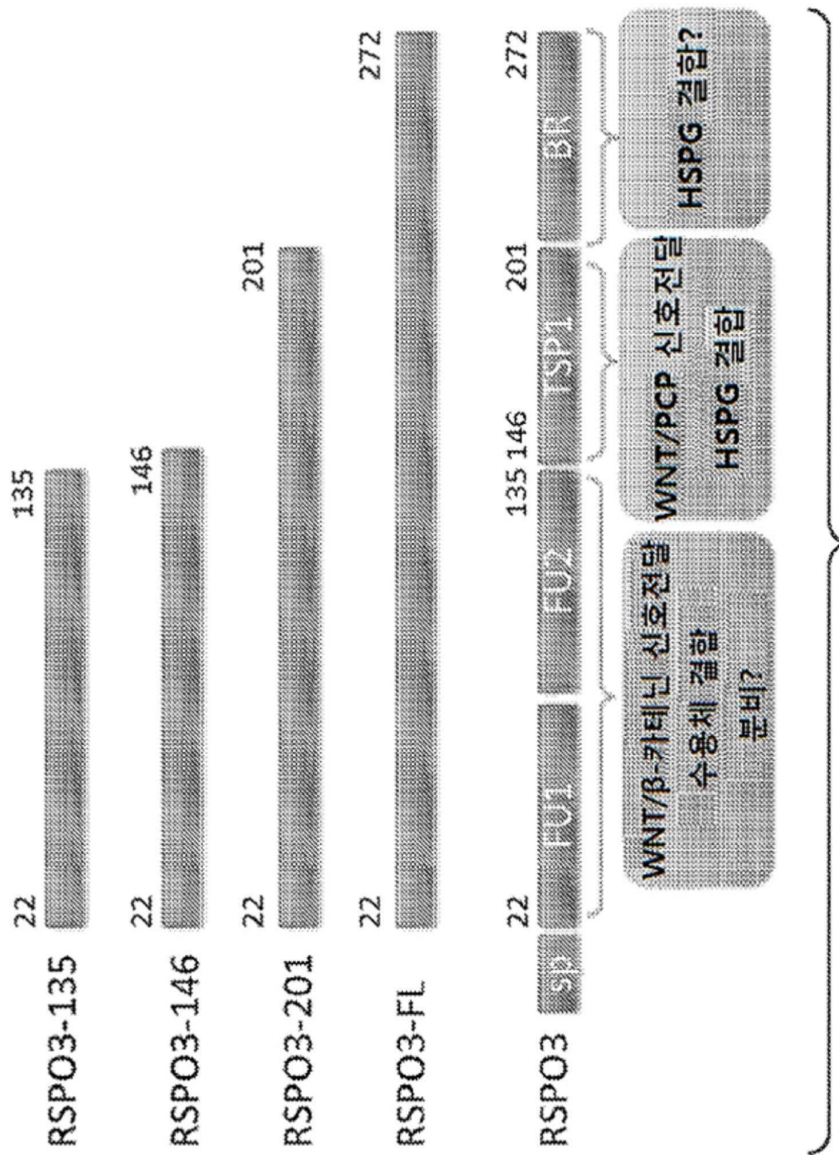
도면13c



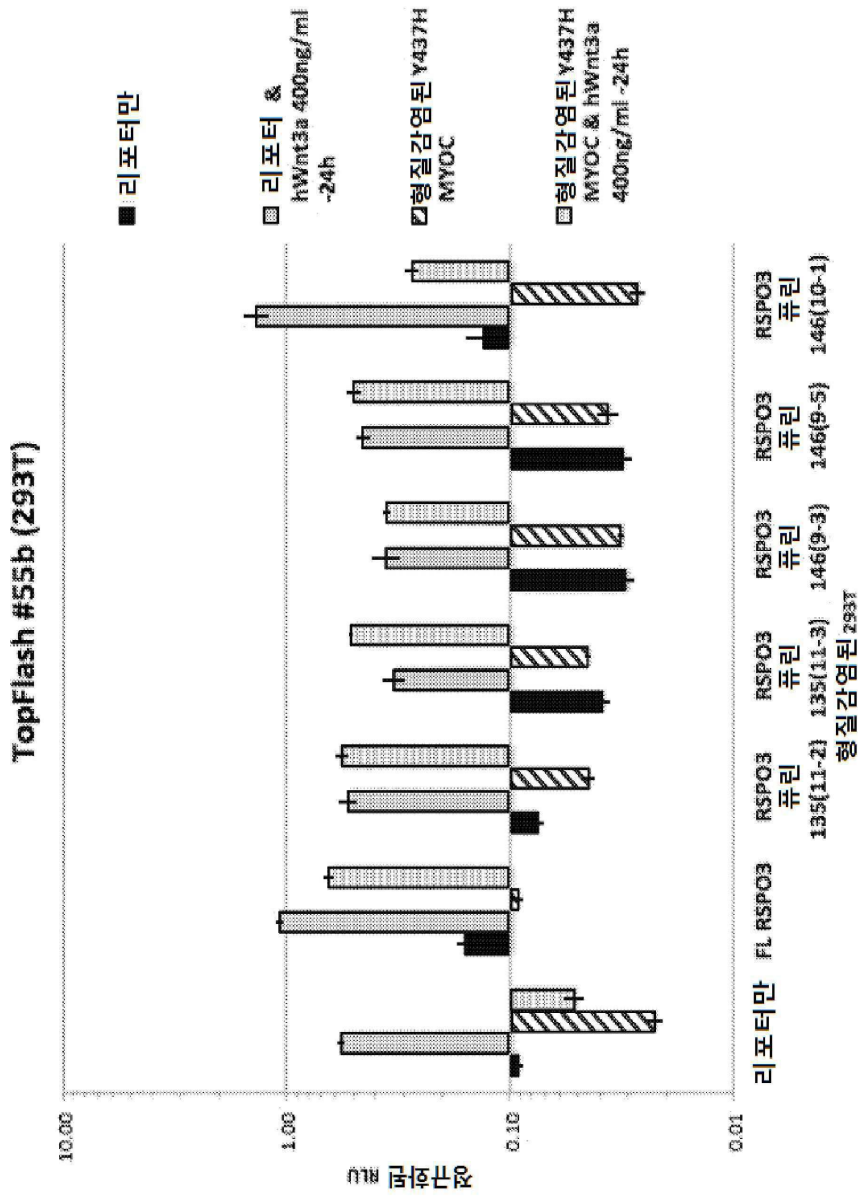
도면13d



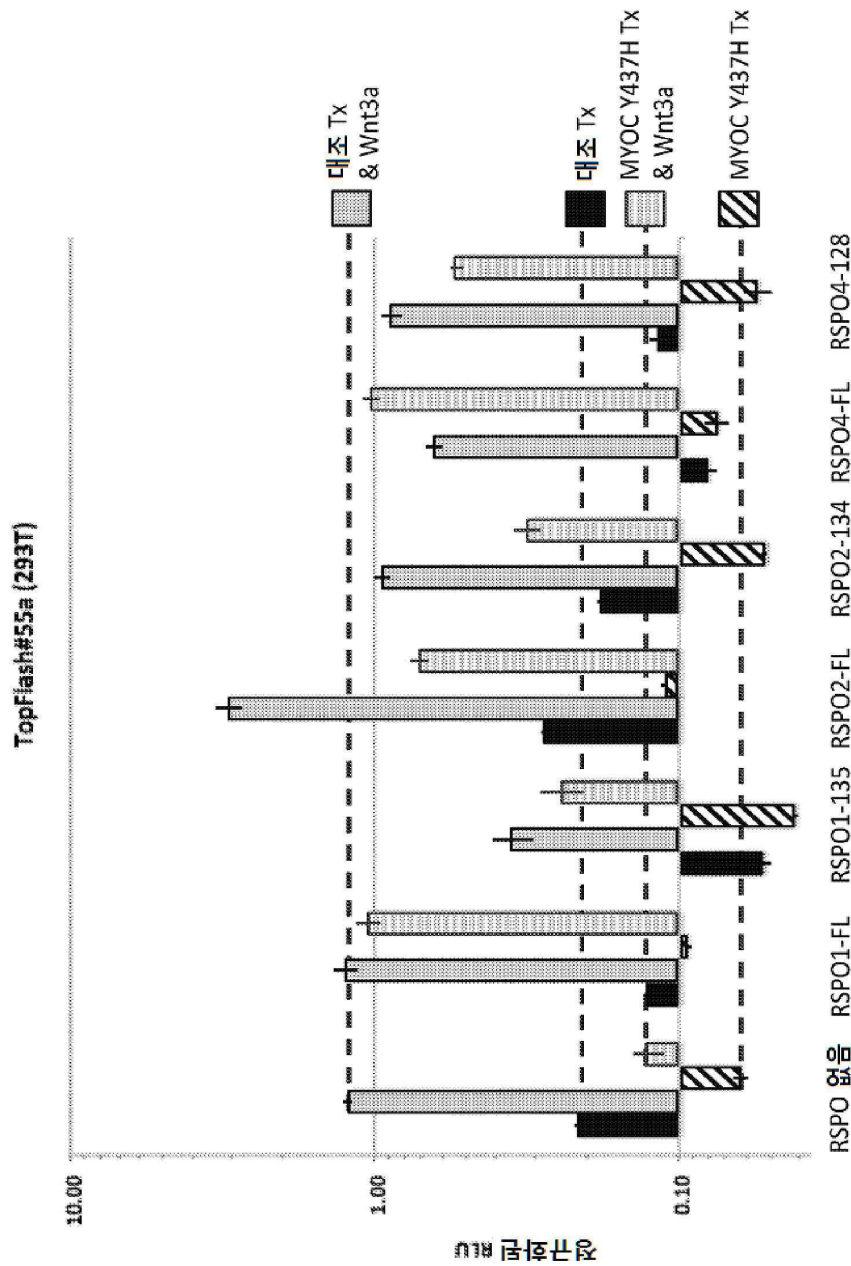
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PECHAN, Peter

SCARIA, Abraham

ARDINGER, Jeffery

<120> ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS FOR
TREATING MYOCILIN (MYOC) GLAUCOMA

<130> 159792012540

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> 62/051,229

<151> 2014-09-16

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys

35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala

50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys

65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr

145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val

165 170 175
 Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190
 Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205

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

<210> 2

<211> 819

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgcacttgc gactgatttc ttggcttttt atcattttga actttatgga atacatcggc 60
 agccaaaacg cctcccgggg aaggcgccag cgaagaatgc atcctaactg tagtcaaggc 120
 tgccaaggag gctgtgcaac atgctcagat tacaatggat gtttgtcatg taagcccaga 180
 ctattttttg ctctggaaag aattggcatg aagcagattg gagtatgtct ctcttcatgt 240
 ccaagtggat attatggaac tcgatatcca gatataaata agtgtacaaa atgcaaagct 300
 gactgtgata cctgtttcaa caaaaatttc tgcacaaaat gtaaaagtgg attttactta 360
 caccttgga aagtccttga caattgccca gaagggttgg aagccaacaa ccatactatg 420

 gagtgtgtca gtattgtgca ctgtgaggtc agtgaatgga atccttggag tccatgcacg 480
 aagaaggga aaacatgtgg cttcaaaaga gggactgaaa cacgggtccg agaaataata 540
 cagcatcctt cagcaaaggg taacctgtgt cccccaacaa atgagacaag aaagtgtaca 600
 gtgcaaagga agaagtgtca gaagggagaa cgaggaaaaa aaggaaggga gaggaaga 660
 aaaaaaccta ataaaggaga aagtaaagaa gcaatacttg acagcaaaag tctggaatcc 720
 agcaaagaaa tccagagca acgagaaaac aaacagcagc agaagaagcg aaaagtccaa 780
 gataaacaga aatcggtatc agtcagcact gtacactag 819

<210> 3

<211> 502

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Phe Phe Cys Ala Arg Cys Cys Ser Phe Gly Pro Glu Met Pro

1 5 10 15

Ala Val Gln Leu Leu Leu Leu Ala Cys Leu Val Trp Asp Val Gly Ala

20 25 30

Arg Thr Ala Gln Leu Arg Lys Ala Asn Asp Gln Ser Gly Arg Cys Gln

35 40 45

Tyr Thr Phe Ser Val Asp Asn Glu Ser Ser Cys Pro Glu Gln Ser Gln

50 55 60

Ala Met Ser Val Ile His Asn Leu Gln Arg Asp Ser Ser Thr Gln Arg

65 70 75 80

Leu Asp Leu Glu Ala Thr Lys Ala Arg Leu Ser Ser Leu Glu Ser Leu

85 90 95

Leu His Gln Leu Thr Leu Asp Gln Ala Ala Arg Pro Gln Glu Thr Gln

100 105 110

Glu Gly Leu Gln Arg Glu Leu Gly Thr Leu Arg Arg Glu Arg Asp Gln

115 120 125

Leu Glu Thr Gln Thr Arg Glu Leu Glu Thr Ala Tyr Ser Asn Leu Leu

130 135 140

Arg Asp Lys Ser Val Leu Glu Glu Glu Lys Lys Arg Leu Arg Gln Glu

145 150 155 160

Asn Glu Asn Leu Ala Arg Arg Leu Glu Ser Ser Ser Gln Glu Val Ala

165 170 175

Arg Leu Arg Arg Gly Gln Cys Pro Gln Thr Arg Asp Thr Ala Arg Ala

180 185 190

Val Pro Pro Gly Ser Arg Glu Val Ser Thr Trp Asn Leu Asp Thr Leu

195 200 205

Ala Phe Gln Glu Leu Lys Ser Glu Leu Thr Glu Val Pro Ala Ser Arg
210 215 220
Ile Leu Lys Glu Ser Pro Ser Gly Tyr Leu Arg Ser Gly Glu Gly Asp
225 230 235 240
Thr Gly Cys Gly Glu Leu Val Trp Val Gly Glu Pro Leu Thr Leu Arg
245 250 255
Thr Ala Glu Thr Ile Thr Gly Lys Tyr Gly Val Trp Met Arg Asp Pro
260 265 270
Lys Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gln Glu Thr Thr Trp Arg Ile Asp Thr
275 280 285
Val Gly Thr Asp Val Arg Gln Val Phe Glu Tyr Asp Leu Ile Ser Gln
290 295 300
Phe Met Gln Gly Tyr Pro Ser Lys Val His Ile Leu Pro Arg Pro Leu
305 310 315 320
Glu Ser Thr Gly Ala Val Val Tyr Ser Gly Ser Leu Tyr Phe Gln Gly
325 330 335
Ala Glu Ser Arg Thr Val Ile Arg Tyr Glu Leu Asn Thr Glu Thr Val
340 345 350
Lys Ala Glu Lys Glu Ile Pro Gly Ala Gly Tyr His Gly Gln Phe Pro
355 360 365
Tyr Ser Trp Gly Gly Tyr Thr Asp Ile Asp Leu Ala Val Asp Glu Ala
370 375 380
Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ser Thr Asp Glu Ala Lys Gly Ala Ile Val
385 390 395 400
Leu Ser Lys Leu Asn Pro Glu Asn Leu Glu Leu Glu Gln Thr Trp Glu
405 410 415
Thr Asn Ile Arg Lys Gln Ser Val Ala Asn Ala Phe Ile Ile Cys Gly
420 425 430
Thr Leu Tyr Thr Val Ser Ser Tyr Thr Ser Ala Asp Ala Thr Val Asn
435 440 445
Phe Ala Tyr Asp Thr Gly Thr Gly Ile Ser Lys Thr Leu Thr Ile Pro

Phe Lys Asn Arg Tyr Lys Tyr Ser Ser Met Ile Asp Tyr Asn Pro Leu
465 470 475 480

Glu Lys Lys Leu Phe Ala Trp Asp Asn Leu Asn Met Val Thr Tyr Asp
 485 490 495

Ile Lys Leu Ser Lys Met
 500

<210> 4

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic Construct

<400> 4

atgaggttct tctgtgcacg ttgctgcagc tttgggcctg agatgccagc tgtccagctg 60
ctgcttctgg cctgcctggt gtgggatgtg gggggccagga cagctcagct caggaagggc 120
aatgaccaga gtggccgatg ccagtatacc ttcagtgtgg ccagtcctaa tgaatccagc 180
tgcccagagc agagccaggc catgtcagtc atccataact tacagagaga cagcagcacc 240
caacgcttag acctggaggc caccaaagct cgactcagct ccctgggagag cctcctccac 300
caattgacct tggaccaggc tgccaggccc caggagacc caggaggggct gcagagggag 360

ctgggcaccc tgaggcgggg gcgggaccag ctggaaaccc aaaccagaga gttggagact 420
gcctacagca acctcctccg agacaagtca gttctggagg aagagaagaa gcgactaagg 480
caagaaaatg agaatctggc caggagggtt gaaagcagca gccaggagggt agcaaggctg 540
agaagggggc agtgtccca gacccgagac actgctcggg ctgtgccacc aggctccaga 600
gaagtttcta cgtggaattt ggacactttg gccttcagg aactgaagtc cgagctaact 660
gaagttcctg ctccccgaat tttgaaggag agcccatctg gctatctcag gagtggagag 720
ggagacaccg gatgtggaga actagtttgg gtaggagagc ctctcacgct gagaacagca 780
gaaacaatta ctggcaagta tgggtgtgtg atgcgagacc ccaagcccac ctacccctac 840

accaggaga ccacgtggag aatcgacaca gtggcacgg atgtccgcca ggtttttgag 900
tatgacctca tcagccagtt tatgcagggc tacccttcta aggttcacat actgcctagg 960
ccactggaaa gcacgggtgc tgtggtgtac tcggggagcc tctatttcca gggcgctgag 1020
tcagaactg tcataagata tgagctgaat accgagacag tgaaggetga gaaggaaatc 1080

cctggagctg gctaccacgg acagtccccg tattcttggg gtggctacac ggacattgac 1140
 ttggctgtgg atgaagcagg cctctgggtc atttacagca ccgatgaggc caaagggtgcc 1200
 attgtcctct ccaaactgaa cccagagaat ctggaactcg aacaaacctg ggagacaaac 1260
 atccgtgaagc agtcagtcgc caatgccttc atcatctgtg gcaccttgta caccgtcagc 1320

agctacacct cagcagatgc taccgtcaac ttgtcttatg acacaggcac aggtatcagc 1380
 aagaccctga ccatccatt caagaaccgc tataagtaca gcagcatgat tgactacaac 1440
 cccctggaga agaagctctt tgcctgggac aacttgaaca tggtcactta tgacatcaag 1500
 ctctccaaga ttagtag 1515

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

ggccatgtca gtcattccat 19

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Gln Ala Met Ser Val Ile His

1 5

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

aatagtgaag ccacagatgt att 23

<210> 8

<211> 259

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Val Leu Ser Trp Thr His Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala

20 25 30

Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val

35 40 45

Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg

50 55 60

Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly

65 70 75 80

Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys

85 90 95

Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys

100 105 110

Lys Glu Gly Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly

115 120 125

Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys

130 135 140

Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln

145 150 155 160

Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu

165 170 175

His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr

180 185 190

Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg

195 200 205

Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala

210 215 220
Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly
225 230 235 240
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala
245 250 255
Gly Pro Ala

<210> 9

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
20 25 30
Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
35 40 45
Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
50 55 60
Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
65 70 75 80

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

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

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu
 210 215 220
 Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240
 Ala Asn Gln

<210> 10

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp
 1 5 10 15
 Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly

20 25 30
 Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
 35 40 45
 Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
 50 55 60
 Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile
 65 70 75 80
 Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
 85 90 95
 Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr

100 105 110
 Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
 115 120 125
 His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp
 130 135 140
 Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala

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

 210 215 220
 Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro
 225 230
 <210> 11
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 11
 Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Val Leu Ser Trp Thr His Leu Thr
 1 5 10 15
 Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala
 20 25 30

 Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val
 35 40 45
 Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg
 50 55 60

Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly
 65 70 75 80
 Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys
 85 90 95

Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys
 100 105 110
 Lys Glu Gly Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
 115 120 125
 Ser Ser Ala
 130

<210> 12

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Val Leu Ser Trp Thr His Leu Thr
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala
 20 25 30
 Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val
 35 40 45
 Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg
 50 55 60
 Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly
 65 70 75 80

Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys
 85 90 95

Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys
 100 105 110
 Lys Glu Gly Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly

115 120 125
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys
130 135 140

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

<210> 13

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
1 5 10 15
Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
20 25 30
Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
35 40 45
Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
50 55 60
Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
65 70 75 80
Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
85 90 95
Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys

115

120

125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro

130

<210> 14

<211> 203

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met

1

5

10

15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala

20

25

30

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys

35

40

45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg

50

55

60

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser

65

70

75

80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys

85

90

95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys

100

105

110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys

115

120

125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly

130

135

140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn

145

150

155

160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile

165

170

175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Leu Cys Pro Thr Ile Ala Glu

180

185

190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys

195

200

<210> 15

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1

5

10

15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

20

25

30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys

35

40

45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala

50

55

60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys

65

70

75

80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

85

90

95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100

105

110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115

120

125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala

130

135

<210> 16

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys

35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala

50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys

65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130 135 140

Ile Val

145

<210> 17

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys

35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala

50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys

65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr

145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val

165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro

180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys

195 200 205

<210> 18

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp

1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly

20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser

35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg

50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile

65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu

85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr

100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala

115 120 125

<210> 19

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp

1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly

20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser

35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg

50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile

65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu

85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr

100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala

115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp

130 135 140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala

145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu

165 170 175

Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile

180 185 190

Gln Arg Pro

195

<210> 20

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

cactccctct ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60

ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

accacggaca gttcctgtat tcttgggtg g

31

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

ccacccaag aatacaggaa ctgtccgtg t

31

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

tctgtggcac cttgcacacc gtcagcagc

29

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

gtgtgtgacg gtgtgcaagg tgccacaga

29