



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월01일

(11) 등록번호 10-2609571

(24) 등록일자 2023년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/405 (2006.01) A61K 35/30 (2015.01)

A61K 38/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/405 (2013.01)

A61K 35/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7008895

(22) 출원일자(국제) 2017년08월29일

심사청구일자 2020년08월28일

(85) 번역문제출일자 2019년03월27일

(65) 공개번호 10-2019-0075906

(43) 공개일자 2019년07월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/049158

(87) 국제공개번호 WO 2018/044912

국제공개일자 2018년03월08일

(30) 우선권주장

62/380,871 2016년08월29일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20150223679 A1*

WO2014160281 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

웨인 스테이트 유니버시티

미국 미시간주 48202 디트로이트 웨스트 워렌 애비뉴 42

(72) 발명자

판 주오-후아

미국 48084 미시간주 트로이 랜서 드라이브 2140

(74) 대리인

김진희, 김태홍

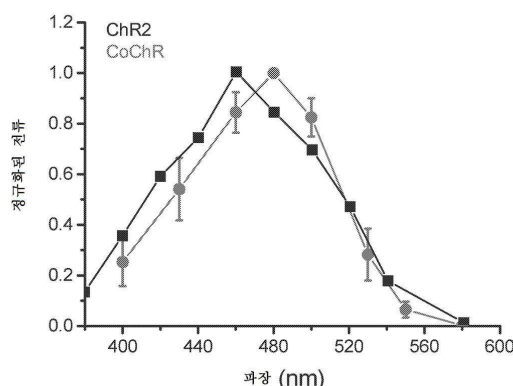
전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 개선된 광 민감성을 갖는 채널옵신 변이체에서의 돌연변이의 확인 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 돌연변이체 CoChop 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 또는 폴리펩타이드 분자를 포함하는 조성물 및 키트를 제공한다. 본 발명의 방법은 광변환을 보존하거나 개선하거나 복원하도록 대상체에게 돌연변이체 CoChop을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물 및 방법은 손상된 시력을 갖는 대상체에게 제공되어서, 시력을 정상 수준으로 복원시킨다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C12N 5/0621 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 3, 5, 6 및 8 내지 10 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드로서, 상기 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드는, 세포막에서 발현되고 활성화 광과 접촉할 때, 서열 번호 2의 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드와 비교하여, 이온 플럭스의 더 높은 수준 및 양성자 플럭스의 더 높은 수준 중 적어도 하나를 갖는 것인 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항의 폴리펩타이드를 포함하는 단리된 재조합 세포.

청구항 3

제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자로서, 핵산 서열이 촉진자 서열에 작동 가능하게 연결된 것인 핵산 분자.

청구항 4

제3항의 핵산 분자를 포함하는 단리된 재조합 세포로서, 세포는 시험관내, 생체외 또는 생체내의 것이며; 임의로, 세포는 광수용체, 양극성 세포, 간체 양극성 세포, 온 타입 추체 양극성 세포, 망막 결절종 세포, 감광성 망막 결절종 세포, 수평 세포, 아마크린 세포 또는 AII 아마크린 세포인 단리된 재조합 세포.

청구항 5

제3항의 핵산 분자를 포함하는 비 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 아데노 연관된 바이러스 벡터 (AAV) 또는 재조합 아데노 연관된 바이러스 (rAAV) 벡터인 발현 벡터.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 재조합 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 또는 AAV12 벡터인 발현 벡터.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 핵산 분자가 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것인 발현 벡터.

청구항 10

시력의 개선 또는 복원에 사용하기 위한, 제6항 또는 제7항의 발현 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 11

황반변성 또는 색소성 망막염의 치료에 사용하기 위한, 제6항 또는 제7항의 발현 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. 119(c) 하에 2016년 8월 29일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/380,871호(이의 내용은 그 전문이 참고로 본 명세서에 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003]

정부 지원

[0004]

본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)/국립 안과 협회(National Eye Institute) 승인 NIH EY 17130 하에 미국 정부 지원에 의해 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 소정의 권한을 갖는다.

[0005] 전자로 제출된 텍스트 파일의 설명

[0006] 본 명세서와 전자로 제출된 텍스트 파일의 내용은 본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능한 포맷 카피(파일명: RTRO-707/001WO_ SeqList_ST25.txt, 2017년 8월 29일 날짜 기록됨) 파일 크기 24kb.

[0007] 기술분야

[0008] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학의 분야에 관한 것이다. 채널옵신 변이체 유전자(Channelopsin variant gene: CoChop)에서의 돌연변이가 확인되었다. 돌연변이체 CoChop 유전자를 포함하는 조성물은 치료학적 방법에서 사용된다. 예를 들어, 돌연변이체 CoChop 유전자를 포함하는 조성물은 시력 상실을 개선하고 복원시킨다.

배경 기술

[0009] 망막은 광수용체(또는 광수용체 세포, 간체 및 추체)로 이루어진다. 광수용체는 광변환 또는 시각 시스템 내에서 사건의 캐스케이드를 전파하는 전기 및 화학 신호로 (전자기 방사선 형태의) 광의 전환을 담당하여서, 궁극적으로 우리의 세상의 표시를 생성하는, 고도로 특수화된 뉴런이다.

[0010] 광수용체 손실 또는 퇴행은, 완전히 저해하지 않으면, 망막 내의 시각 정보의 광변환을 심각하게 손상시킨다. 광수용체 세포의 손실 및/또는 광수용체 세포 기능의 손실은 시력의 감소, 광 민감성의 감소 및 실명의 주요 원인이다. 시력 상실을 경험하는 대상체의 망막의 광민감성을 복원하는 조성물 및 방법에 대해 당해 분야에서 오래 느낀 수요가 존재한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 서열 번호 2의 아미노산 서열 및 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 단리된 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드를 제공한다. 본 명세서에 개시된 CoChR 돌연변이체(예를 들어, 돌연변이체 CoChop)의 이점은 이 돌연변이체 폴리펩타이드가 활성화를 위해 야생형 CoChR(서열 번호 2)보다 더 적은 광을 요한다는 것이다. 따라서, 동일한 광도에서, 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스의 더 높은 수준은 야생형에서보다 돌연변이체 CoChR 폴리펩타이드에서 관찰된다. 몇몇 실시형태에서, 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드는 세포막에서 발현되고 (예를 들어, 활성화를 위한 임계치 위의) 활성화 광과 접촉할 때 서열 번호 2의 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드와 비교하여 이온 플럭스의 더 높은 수준 및 양성자 플럭스의 더 높은 수준 중 어느 하나를 갖는다. 광 활성화된 이온 채널 폴리펩타이드는 서열 번호 3 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는다. 임의로, 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환, 결실 또는 삽입을 추가로 포함한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 임의로, 핵산 서열은 촉진자 서열에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명에 따른 핵산을 함유하는 벡터가 본 발명에 또한 포함된다.

[0013] 본 발명에 따른 폴리펩타이드 또는 핵산을 함유하는 세포가 본 발명에 또한 포함된다. 세포는 예를 들어 광수용체, 양극성 세포, 간체 양극성 세포, 온 타입 추체 양극성 세포, 망막 결절종 세포, 감광성 망막 결절종 세포, 수평 세포, 아마크린 세포 또는 AII 아마크린 세포이다. 세포는 시험관내, 생체의 또는 생체내이다.

[0014] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 막에서 본 발명의 폴리펩타이드를 발현시키고, 숙주 막의 전도도를 변경하기에 적합한 조건 하에 폴리펩타이드를 광과 접촉시킴으로써 막의 전도도를 변경시키는 방법을 제공한다. 숙주 막은 세포막, 예컨대 뉴런 세포, 신경계 세포, 심장 세포, 순환 세포, 시각 시스템 세포 또는 청각적 시스템 세포의 세포막이다.

[0015] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 질병 또는 질환은 예를 들어 손상, 뇌 손상, 척수 손상, 간질, 대사 장애, 심장 기능이상, 시력 상실, 실명, 난청, 청력 손실 또는 신경학적 질환이다.

[0016] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 폴리펩타이드를 대상체에게 투여함으로써 시력을 개선하거나 복원하는 방법을 특징으로 한다. 대상체는 눈 질병, 예컨대 황반변성 또는 망막세포 변성증을 겪고 있다.

[0017] 시력의 개선 또는 복원은 예를 들어 광 민감성의 증가; 광전류를 유발하는 데 필요한 임계치 광도의 저하; 시각

피질에서의 시각 유발된 전위의 증가; 및 시각적으로 안내된 행동, 예컨대 시선운동 반응(optomotor response)을 유발하기 위한 임계치 광도의 저하를 포함한다.

[0018] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 폴리펩타이드를 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 망막세포 변성증 또는 연령 관련 황반변성을 치료하는 방법을 제공한다. 조성물은 유리체내 또는 망막하 주사에 의해 투여된다.

[0019] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 명확할 것이고, 하기 상세한 설명 및 청구항에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0020] **도 1:** HEK 세포 판독에서의 CoChR 및 ChR2의 스펙트럼 곡선의 비교. CoChR의 피크 스펙트럼은 ChR2의 것보다 약간 더 적색 이동된 약 480nm이다.

도 2: HEK 세포 판독에서의 CoChR 및 ChR2의 광 유발된 전류의 샘플 판독. A-D, wt-ChR2(A), 및 이의 3개의 돌연변이체, ChR2-L132C(B), ChR2-L132C/T159C(C) 및 ChR2-L132C/T159C(D)의 광 유발된 전류. 전류는 ND = 0, 2.5, 3.0 및 4.0에서 중성 밀도(neutral density: ND) 필터로 증분 광도에 의해 유발되었다. 적색 트레이스는 2.5 중성 밀도(ND)(4.1×10^{15} 개의 광자/cm²)로 460nm에서 광에 의해 유발되었다. E 및 F, wt-CoChR(E), 및 이의 돌연변이체, CoChR-L112C(F)의 광 유발된 전류. 적색 트레이스는 2.5 중성 밀도(ND)(4.8×10^{15} 개의 광자/cm²)로 480nm에서 유발되었다.

도 3: HEK 세포 판독에서 wt-CoChR 및 이의 더 광 민감성인 돌연변이체, CoChR-L112C(서열 번호 3), CoChR-T139C(서열 번호 5), CoChR-L112C/T139C(서열 번호 8), CoChR-T145A/S146A(서열 번호 6), CoChR-L112C/H94E(서열 번호 9) 및 CoChR-L112C/H94E/K264T(서열 번호 10)에 대한 전류 진폭의 비교. 전류는 ND = 2.5(4.8×10^{15} 개의 광자/cm²)로 480nm에서 광에 의해 유발되고, wt-CoChR의 것으로 정규화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 도시되어 있다.

도 4: HEK 세포 판독에서 wt-CoChR 및 이의 더 광 민감성인 돌연변이체, CoChR-L112C, CoChR-T139C, CoChR-L112C/T139C, CoChR-T145A/S146A, CoChR-L112C/H94E 및 CoChR-L112C/H94E/K264T에 대한 감퇴 시간 상수(오프율)의 비교. 전류는 ND = 0(1.2×10^{18} 개의 광자/cm²)으로 10ms 광 펄스에 의해 유발되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 도시되어 있다.

도 5: HEK 세포 판독에서 wt-CoChR 및 이의 더 광 민감성인 돌연변이체, CoChR-L112C, CoChR-L112C/T139C, CoChR-L112C/H94E 및 CoChR-L112C/H94E/K264T에 대한 광 유발된 전류 진폭 및 감퇴 시간 상수(또는 오프율)의 관계.

도 6: 다중 전극 어레이 판독에 의한 망막 결절종 세포에서의 ChR2-L132C/T159C, wt-CoChR 및 CoChR-L112C의 광 민감도의 비교. 광도는 중성 밀도(ND) 및 광자/cm²로 도시되어 있다.

도 7: ChR2-L132C/T159S와 CoChR-L112C 바이러스 벡터 주사된 마우스 사이의 복원된 시선운동 반응의 광 민감성의 비교를 위한 시선운동 행동 시험. ChR2-L132C/T159S 및 CoChR-L112C에 대한 시선운동 반응을 유발하는 데 필요한 스펙트럼 주파수 및 임계치 광도의 관계. 실험 마우스 라인을 사용하여 실험을 수행하였다. 홈 메이드 시선운동 검정 시스템에서 시선운동 시험을 수행하였다. 약 470nm의 파장을 갖는 청색 LED에 의해 광 자극을 생성하였다. CoChR-L112C 발현 마우스에 대해 시선운동 반응을 유발하기 위한 임계치 광도는 2 내지 3×10^{13} 개의 광자/cm²에서 올림되고, ChR2-L132C/T159S 발현 마우스에 대해 1 내지 2×10^{14} 개의 광자/cm²에서 올림된다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 도시되어 있다.

도 8: 시선운동 행동 시험에 기초하여 CoChR-L112C 바이러스 벡터 주사된 마우스에 대한 대비 민감성 곡선. 실험 마우스 라인을 사용하여 실험을 수행하였다. 가상 시선운동 시스템(OptoMotry; CerebralMechanics(캐나다 레스브리지 AB))에서 시선운동 시험을 수행하였다. 플랫폼 내부의 발광은 약 150럭스이었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 도시되어 있다.

도 9: AAV 벡터 전달을 통해 매개된 망막 뉴런에서의 wt-CoChR 및 CoChR-L112C의 장기간 안정한 발현. A 및 B, 형광 영상은 바이러스 주사 후 1개월에 C57BL/6J 마우스에서 망막 결절종 세포에서의 wt-CoChR 및 이의 돌연변이체 CoChR-L112C의 발현을 보여준다. C 및 D, 형광 영상은 바이러스 주사 후 6개월에 rd1 마우스에서 망막 결

절종 세포에서의 wt-CoChR 및 이의 돌연변이체 CoChR-L112C의 발현을 보여준다. E-G, 형광 영상은 바이러스 주사 후 9개월에 낮은(E) 및 높은(F) 배율에서의 전조직 표본(whole-mount) 및 망막 수직 섹션(G)에서 조망된 실험 마우스 라인의 망막에서의 CoChR-L112C의 발현을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은, 부분적으로, CoChop인 클로로모나스 오오가마(*Chloromonas oogama*)인 녹조류로부터의 채널오피신 변이체에서의 돌연변이가 증가된 광 민감성을 생성시킨다는 예상치 못한 발견에 기초한다. 본 발명에 따른 CoChop 돌연변이체 아미노산 및 핵산 서열은 본 명세서에서 mCoChop이라 칭해진다. 야생형 CoChop는 예를 들어 제 W02015/161308호(이의 내용은 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 본 발명에 따른 mCoChop 아미노산 및 핵산 서열은 광 활성화된 이온 채널이 필요한 임의의 분야에서 유용하다.
- [0022] 특정한 실시형태에서, 본 발명은 망막 퇴행성 질병, 예컨대 망막세포 변성증 또는 연령 관련 황반변성의 치료를 위한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 추가적으로, 망막 퇴행성 질병의 직접적인 결과인 다른 질병 및 장애는 또한 본 발명의 방법에 의해 치료된다. 예를 들어, 진행된 망막세포 변성증 및 다른 망막 퇴행성 질환은 황반변성을 발생시킨다.
- [0023] CoChop인 채널오피신 변이체는 127개의 조류 전사체의 신생 서열분석을 통해 처음에 확인되었다. CoChop는 HEK293 세포에서 광전류를 합성하고 스크리닝함으로써 확인되었다. (W0 제2015/161308호, 및 문헌[Klapoetke et al. Nature Methods vol.11, No.3 2014](각각의 내용은 그 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다.)
- [0024] 본 명세서에 언급된 바대로, "CoChop"는 채널오피신을 코딩하는 유전자를 의미하고, 이것은 이후 망막에 결합하면 채널로돕신(CoChR)을 형성한다. 본 발명의 유전자 작제물은 주로 CoChop(즉, 망막 없음)을 의미하고, 본 명세서에 개시된 모든 CoChop 돌연변이체(mCoChop)는 기능성 채널로돕신(ChR)을 형성한다. 본 명세서에 개시된 방법은 외인성 망막 유 또는 무 하에 세포에 mCoChop을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 세포(즉, 망막 뉴런)에서의 mCoChop의 발현 시, 내인성으로 이용 가능한 망막은 본 발명의 mCoChop 단백질에 결합하여서 기능성 광 게이팅된 채널을 형성하는 것으로 이해된다. 그러므로, 본 명세서에 언급된 바와 같은, Chop 단백질은 또한 ChR과 동의어일 수 있다.
- [0025] 하기 서열은 야생형 CoChop 돌연변이체 CoChop 단백질, 및 본 발명의 상기 WT 및 돌연변이체 Chop 단백질을 코딩하고, 본 발명의 WT 및 돌연변이체 ChR을 형성하는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예를 제공한다.

야생형 CoChR 핵산 서열(서열 번호 1)

```
ATGCTGGGAAACGGCAGCGCCATTGTGCCTATCGACCAGTGCCTTTTGCCCTGGCTTGGACCGACAGCCTG
GGAAGCGATACAGAGCAGCTGGTGGCCAAACATCCTCCAGTGGTTCGCGCTTCGGCTTCAGCATCCTGATC
CTGATGTTCTACGCTACAGACTTGGAGAGCCACTTGCCTTGGGAGGAGGTCTACGCTCTGTTGCGTC
GAGCTGACCAAGGTCATCATCGAGTTCTCCACGAGTTCGACGACCCAGCATGCTGTACCTGGCTAAC
GGACACCGAGTCCAGTGGCTGAGATACGACAGAGTGGCTGCTGACTTGTCCCGTCATCCTGATCCACCTG
AGCAACCTGACAGGCTGAAGGACGACTACAGCAAGCGGACCATGAGGCTGCTGCTGTCAGACGTGGGA
ACCATCGTGTGGGGAGGTACAAAGCGCCATGAGCACAGGCTACGTCAGGTCATCTTCTTCGTGCTGGGT
TGCACTCTACGGCGCCAAACCTTCTTCCACGCGCCAAAGGTGTATATCGAGAGCTACCACTGGTGCCA
AAGGGCAGACCTAGAACCGTCTGCGGATCATGGCTTGGCTGTTCTTCTCTGTCTTGGGGCATGTTCCCC
GTGCTGTTCTGCTGGGACCAAGGATTCGACGCCATCAGCGTGTACGGCTCTACCATTGGCCACACC
ATCATCGACCTCATGAGCAAGAAATGTTGGGGCCCTGCTGGGACACTATCTGAGAGTGTGTATCCACCAG
CACATCATCATCTACGCGGACATCCGCAAGAACCAAGATCAACGTGGCCGGCGAGGAGATGGAAGTG
GAGACCATGGTGGACAGGAGGACGAGGAGACAGT
```

[0026]

야생형 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 2)

```
MLNGSAIVPIDQCFLAWTDSLSGSDTEQLVANILQWFAGFSLILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCCV
ELTKVIEFFHEFDDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILHLNLTLKDDYSKRTMRLLVSDVG
TIVWGATSAMSTGVYKVIFFVLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP
VLFVVGPEGFDAISVYGSITGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRLVLIHQHIIYIGDIRKKTKINVAGEEMEV
ETMVDQDEETV
```

[0027]

[0028]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 3) L112C
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCCV ELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLVSDVG TIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP VLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVE ETMVDQEDEETV

[0029]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 4) C68S/V69I
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCSI ELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLVSDVG TIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP VLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVE ETMVDQEDEETV

[0030]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 5) T139C
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCCV ELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLVSDVG CIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP VLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVE ETMVDQEDEETV

[0031]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 6) T145A/S146A
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCCV ELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLVSDVG TIVWGA AA AMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP VLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVE ETMVDQEDEETV

[0032]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 7) C68T/V69L
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEEVYVCTL ELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMRLLVSDVG TIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRPRTVVRIMAWLFFLSWGMFP VLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVE ETMVDQEDEETV

[0033]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 8) L112C/T139C
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEE VYVCCVELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGHRVQWLRVYAEWLLTCPVICHLSNLTGLKDDYS KRTMRLLVSDVGCIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRP RTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLI HQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVEETMVDQEDEETV

[0034]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 9) L112C/H94E
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEE VYVCCVELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGERVQWLRVYAEWLLTCPVICHLSNLTGLKDDYS KRTMRLLVSDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRP RTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLI HQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVEETMVDQEDEETV

[0035]

돌연변이체 CoChR 아미노산 서열(서열 번호 10) L112C/H94E/K264T
MLGNGSAIVPIDQCFCCLAWTDSLGSDEQLVANILQWFAFGFSILILMFYAYQWTRATCGWEE VYVCCVELTKVIEFFHEFDPSMLYLANGERVQWLRVYAEWLLTCPVICHLSNLTGLKDDYS KRTMRLLVSDVGTIVWGATSAMSTGYVKVIFVFLGCIYGANTFFHAAKVYIESYHVVPKGRP RTVVRIMAWLFFLSWGMFPVLFVVGPEGFDAISVYGSTIGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLI HQHIIYGDIRKKTINVAGEEMEVEETMVDQEDEETV

[0036]

본 발명은 또한 생물학적 활성 단편 또는 보존적 아미노산 치환을 코딩하는 CoChop 단백질 및 핵산 또는 CoChop의 다른 돌연변이 변이체를 포함한다. 야생형 CoChop의 더 작은 단편(여기서, 적어도 하나의 아미노산은 돌연변이되거나 보존적으로 치환됨)은 또한 본 발명에서 유용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 CoChop 폴리펩타이드 및 핵산은 약 275개의 아미노산 길이, 250개의 아미노산 길이, 225개의 아미노산 길이, 200개의 아미노산 길이, 175개의 아미노산 길이, 또는 160개의 아미노산 길이 또는 이들 이하일 수 있다.

[0037]

몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 하나 이상의 CoChop 폴리펩타이드의 유도체, 변이체 또는 돌연변이체를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체는 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 몇몇 실시형태에서,

1개 내지 20개의 아미노산은 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체는 네이티브 치료학적 펩타이드 물질의 아미노산 서열과 비교하여 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 또는 약 10개의 아미노산 치환을 함유한다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체는 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 하나 이상의 아미노산 결실을 함유한다. 몇몇 실시형태에서, 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 1개 내지 20개의 아미노산은 결실된다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체는 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 또는 약 10개의 아미노산 결실을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 1개 내지 10개의 아미노산은 어느 한 말단에서 결실된다. 몇몇 실시형태에서, 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 비교하여 1개 내지 10개의 아미노산은 말단 둘 다에서 결실된다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체의 아미노산 서열은 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 적어도 약 70% 동일하다. 몇몇 실시형태에서, 유도체, 변이체 또는 돌연변이체의 아미노산 서열은 네이티브 폴리펩타이드의 아미노산 서열(예를 들어, 서열 번호 2)과 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일하다.

[0038] 본 발명의 돌연변이체 CoChop 단백질은 또한 더 느린 채널 동역학을 입증한다. 더 높은 광 민감도는 더 느린 채널 동역학과 상관되는 것으로 밝혀져서, 광 민감도와 채널 동역학 사이의 트레이드-오프(trade-off)를 나타낸다. 본 발명의 ChR 단백질은 형성하는 mCoChop 단백질은 채널 동역학을 개선하거나 탈활성화 속도를 증가시킬 수 있는 추가적인 돌연변이 또는 변형을 또한 포함할 수 있다. 특히 바람직한 CoChop 돌연변이체는 광 민감도의 임계치를 채널 동역학과 균형화시킨다.

[0039] 예를 들어, 본 발명의 돌연변이체 ChR 단백질은 채널 오픈 상태의 연장을 통해 더 큰 광 민감도를 달성한다. 결과적으로, 각각의 돌연변이체 ChR 채널은 동일한 광도에 의해 활성화될 때 야생형 ChR 채널보다 높은 광전류를 전도한다. 따라서, 돌연변이체 채널은 야생형 ChR 채널의 활성화에 필요한 것보다 낮은 광도에 의해 활성화된다. 정량적으로, 돌연변이체 ChR 단백질을 발현하는 망막 결절종 세포의 검출 가능한 스파이킹 활성화는 야생형 ChR을 발현하는 망막 결절종 세포로부터의 스파이킹 활성을 유발하는 데 필요한 광도보다 1.5 내지 2 log 단위 낮은 광도에 의해 유발될 수 있다. 따라서, 돌연변이체 ChR 단백질을 활성화하는 데 필요한 광도는 일반 야외 조명 조건의 범위에 가깝거나 이것에 해당한다.

[0040] 핵산, 벡터 및 재조합 바이러스

[0041] 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 이를 요하는 대상체 또는 환자에서 세포로의 mCoChop을 코딩하는 핵산(돌연변이체 CoChop)의 전달을 제공한다. 몇몇 경우에, 핵산의 전달은 유전자 치료라 칭해질 수 있다.

[0042] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 mCoChop 핵산의 전달에 대한 임의의 적합한 방법을 제공한다. 몇몇 경우에, 핵산의 전달은 임의의 적합한 "벡터"를 사용하여 수행될 수 있다(때때로 또한 "유전자 전달" 또는 "유전자 운반" 비히클이라 칭해짐). 벡터, 전달 비히클, 유전자 전달 비히클 또는 유전자 운반 비히클은 표적 세포에 전달되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 적합한 거대분자 또는 분자의 복합체를 의미할 수 있다. 몇몇 경우에, 표적 세포는 핵산 또는 유전자가 전달되는 임의의 세포일 수 있다. 전달되는 폴리뉴클레오타이드는 유전자 치료에서의 관심 대상의 코딩 서열, 예컨대 mCoChop 유전자를 포함할 수 있다.

[0043] 예를 들어, 적합한 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 아데노바이러스, 아데노 연관된 바이러스(adeno-associated viruse: AAV) 및 레트로바이러스, 리포솜, 표적 세포에 폴리뉴클레오타이드의 전달을 매개할 수 있는 다른 지질 함유 복합체 및 다른 거대분자 복합체를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0044] 몇몇 경우에, 벡터는 유기 또는 무기 분자일 수 있다. 몇몇 경우에, 벡터는 소분자(즉, 5kD 미만) 또는 거대분자(즉, 5kD 초과)일 수 있다. 예를 들어, 벡터는 불활성 비생물학적 활성 분자, 예컨대 금속 입자를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 경우에, 벡터는 금 입자일 수 있다.

[0045] 몇몇 양태에서, 벡터는 하나 이상의 핵산을 도입시키는 재조합 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바대로, 핵산은 폴리뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 핵산 및 폴리뉴클레오타이드는 상호 교환되어 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 핵산은 mCoChop의 발현을 위해 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, RNA 핵산은 관심 대상의 유전자(예를 들어, mCoChop), 인

트론, 비번역된 영역, 종결 서열 등의 전사체를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 경우에, DNA 핵산은 서열, 예컨대 하이브리드 촉진자 유전자 서열, 강한 구성적 촉진자 서열, 관심 대상의 유전자(예를 들어, mCoChop), 비번역된 영역, 종결 서열 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 경우에, DNA 및 RNA의 조합을 사용할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서의 본 개시내용에 기재된 바와 같은, 용어 "발현 작제물"은 핵산 코딩 서열의 일부 또는 전부가 전사될 수 있는 유전자 산물을 코딩하는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 유전자 작제물의 임의의 유형을 포함하도록 의도된다. 전사체는 단백질로 번역될 수 있다. 몇몇 양태에서, 이것은 부분적으로 번역되거나 번역되지 않을 수 있다. 소정의 양태에서, 발현은 유전자 산물로의 유전자의 전사 및 mRNA의 번역 둘 다를 포함한다. 다른 양태에서, 발현은 관심 대상의 핵산 코딩 유전자의 전사를 오직 포함한다.

[0047] 일 양태에서, 본 개시내용은 mCoChop의 발현을 매개하기 위해 벡터로서 재조합 바이러스, 예컨대 아테노 연관된 바이러스(rAAV)를 제공한다.

[0048] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 pfu(플라크 형성 단위)로서 측정될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조성물 및 방법의 재조합 바이러스, 또는 바이러스 벡터의 pfu는 약 10^8 내지 약 5×10^{10} pfu일 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} 및 5×10^{10} pfu이다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 기껏해야 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} 및 5×10^{10} pfu이다.

[0049] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 벡터 계놈으로서 측정될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^{10} 내지 3×10^{12} 개의 벡터 계놈이다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^9 내지 3×10^{13} 개의 벡터 계놈이다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} 개의 벡터 계놈이다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} 개의 벡터 계놈이다.

[0050] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 감염 다중도(multiplicity of infection: MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 몇몇 경우에, MOI는 핵이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 계놈의 비율 또는 배수를 의미할 수 있다. 몇몇 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 몇몇 경우에, MOI는 1×10^5 내지 1×10^7 일 수 있다. 몇몇 경우에, MOI는 1×10^4 내지 1×10^8 일 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI이다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이다.

[0051] 몇몇 양태에서, 핵산은 바이러스의 사용 없이(즉, 비바이러스 벡터에 의해) 전달될 수 있고, 핵산의 분량으로서 측정될 수 있다. 일반적으로, 핵산의 임의의 적합한 양은 본 개시내용의 조성물 및 방법과 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 핵산은 적어도 약 1pg, 10pg, 100pg, 1pg, 10pg, 100pg, 200pg, 300pg, 400pg, 500pg, 600pg, 700pg, 800pg, 900pg, 1μg, 10μg, 100μg, 200μg, 300μg, 400μg, 500μg, 600μg, 700μg, 800μg, 900μg, 1ng, 10ng, 100ng, 200ng, 300ng, 400ng, 500ng, 600ng, 700ng, 800ng, 900ng, 1mg, 10mg, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg, 800mg, 900mg, 1g, 2g, 3g, 4g 또는 5g일 수 있다. 몇몇 경우에, 핵산은 기껏해야 약 1pg, 10pg, 100pg, 1pg, 10pg, 100pg, 200pg, 300pg, 400pg, 500pg, 600pg, 700pg, 800pg, 900pg, 1μg, 10μg, 100μg, 200μg, 300μg, 400μg, 500μg, 600μg, 700μg, 800μg, 900μg, 1ng, 10ng, 100ng, 200ng, 300ng, 400ng, 500ng, 600ng, 700ng, 800ng, 900ng, 1mg, 10mg, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg, 800mg, 900mg, 1g, 2g, 3g, 4g 또는 5g일 수 있다. 몇몇 양태에서, 자가 상보성(self-complementary: sc) 벡터를 사용할 수 있다. 자가 상보성 AAV 벡터의 사용은 바이러스 제2-가닥 DNA 합성에 대한 요건을 우회할 수 있고, 문헌[Wu, Hum Gene Ther. 2007, 18(2):171-82](본 명세서에 참고로 포함됨)에 의해 제공된 바대로, 전이 유전자 단백질의 발현의 더 높은 속도를 발생시킬 수 있다.

- [0052] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 아데노 연관된 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 헬퍼 의존적 아데노바이러스, 레트로바이러스, 단순 포진 바이러스, 렌티바이러스, 수두 바이러스, 재팬-리포솜 적혈구응집반응 바이러스(hemagglutination virus of Japan-liposome: HVJ) 복합체, 몰로니 췌장 백혈병 바이러스 및 HIV 기반 바이러스(이들로 제한되지는 않음) 중 적어도 하나의 사용을 포함하는 임의의 적합한 바이러스 핵산 전달 시스템을 제공한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 강한 진핵 촉진자를 포함한다.
- [0053] 일반적으로, 임의의 적합한 바이러스 벡터는 본 개시내용의 조성물 및 방법과 사용하기 위해 최적화되도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스(Ad) 또는 아데노 연관된 바이러스(AAV)로부터 유래된 바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 인간 및 비인간 바이러스 벡터 둘 다를 사용할 수 있고, 재조합 바이러스 벡터는 인간에서 이것이 복제 결핍일 수 있도록 변경될 수 있다. 벡터가 아데노바이러스인 경우, 벡터는 mCoChop 단백질을 코딩하는 유전자에 작동 가능하게 연결된 촉진자를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 인간에서 복제 결핍이다.
- [0054] 2개의 바이러스 벡터 시스템의 유리한 특성을 조합하기 위해, 하이브리드 바이러스 벡터는 mCoChop 단백질을 코딩하는 핵산을 표적 세포 또는 조직에 전달하도록 사용될 수 있다. 하이브리드 벡터의 작제를 위한 표준 기법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 기법은 예를 들어 문헌[Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.] 또는 재조합 DNA 기술을 기재하는 임의의 수의 실험실 매뉴얼에서 발견될 수 있다. AAV 및 아데노바이러스 ITR의 조합을 함유하는 아데노바이러스 캡시드에서의 이중 가닥 AAV 게놈은 세포를 형질도입하도록 사용될 수 있다. 또 다른 변형에서, AAV 벡터는 "장이 없는", "헬퍼 의존적" 또는 "고역량" 아데노바이러스 벡터에 위치할 수 있다. 아데노바이러스/AAV 하이브리드 벡터는 문헌[Lieber et al., J. Virol. 73:9314-9324, 1999]에 기재되어 있다. 레트로바이러스/아데노바이러스 하이브리드 벡터는 문헌[Zheng et al., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000]에 기재되어 있다.
- [0055] 아데노바이러스 내에 함유된 레트로바이러스 게놈은 표적 세포 게놈 내에 통합하고 안정한 유전자 발현을 실행할 수 있다.
- [0056] 복제 결핍 재조합 아데노바이러스 벡터는 공지된 기법에 따라 제조될 수 있다. 문헌[Quantin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584 (1992); Stratford-Perricadet, et al., J. Clin. Invest., 90:626-630 (1992); 및 Rosenfeld, et al., Cell, 68:143-155 (1992)]을 참조한다.
- [0057] 추가로 바람직한 벡터는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학 접합체를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 레트로바이러스 벡터는 몰로니 췌장 백혈병 바이러스 및 HIV 기반 바이러스를 포함한다. 몇몇 경우에, HIV 기반 바이러스 벡터를 사용할 수 있고, 여기서 HIV 기반 바이러스 벡터는 gag 및 pol 유전자가 HIV 게놈 기원이고 env 유전자가 또 다른 바이러스 기원인 적어도 2개의 벡터를 포함한다. DNA 바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 이 벡터는 수두 벡터, 예컨대 오르토폭스 또는 아비포스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 예컨대 단순 포진 I 바이러스(HSV) 벡터[Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.: 90 7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA: 87:1149 (1990)], 아데노바이러스 벡터[LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)] 및 아데노 연관된 바이러스 벡터[Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)](본 명세서에 참고로 포함됨)를 포함한다.
- [0058] 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는 단순 포진 바이러스(HSV) 기반 벡터를 포함한다. 하나 이상의 즉시 초기(immediate early: IE) 유전자가 고갈된 HSV 벡터는 일반적으로 비세포독성이고, 표적 세포에서 잠복과 유사한 상태로 계속되고, 효율적인 표적 세포 형질도입을 제공하므로 유리하다. 재조합 HSV 벡터는 비상동성 핵산의 대략 30kb를 혼입할 수 있다.
- [0059] 레트로바이러스, 예컨대 C형 레트로바이러스 및 렌티바이러스는 또한 본 개시내용에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는, 문헌[Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 및 Fong et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000](본 명세서에 참고로 포함됨)에 의해 제공된 바대로, 췌장 백혈병 바이러스(MLV)에 기초할 수 있다. MLV 기반 벡터는 바이러스 유전자 대신에 비상동성 (치료학적) DNA의 8kb 이하를 함유할 수 있다. 문헌[Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 및 Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150-8157, 1998](본 명세서에 참고로 포함됨)에 의해 제공된 바대로, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 기반 벡터를 포함하는 복제 결핍 렌티바이러스 기반 벡터(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는, 추가적인 레트

로바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 활성으로 분열하는 및 비분열하는 세포 둘 다를 감염시킬 수 있다는 점에서 유리할 수 있다. 이것은 또한 인간 상피 세포를 형질도입하는 데 있어서 매우 효율적일 수 있다.

- [0060] 본 개시내용에서 사용하기 위한 렌티바이러스 벡터는 인간 및 비인간(SIV 포함) 렌티바이러스로부터 유래될 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 예는 벡터 전파에 필요한 핵산 서열, 및 mCoChop 유전자에 작동 가능하게 연결된 조직-특이적 촉진자를 포함한다. 핵산 서열은 바이러스 LTR, 프라이머 결합 부위, 폴리푸린 트랙트, att 부위 및 캡슐화 부위를 포함할 수 있다.
- [0061] 렌티바이러스 벡터는 임의의 적합한 렌티바이러스 캡시드로 패키징될 수 있다. 상이한 바이러스로부터의 또 다른 것에 의한 하나의 입자 단백질의 치환은 "위형화"라 칭해진다. 벡터 캡시드는 다른 바이러스로부터의 바이러스 외피 단백질, 예를 들어 쥬과 백혈병 바이러스(MLV) 또는 수포성 구내염 바이러스(VSV)를 함유할 수 있다. VSV G-단백질의 사용은 높은 벡터 역가를 생성시키고, 벡터 바이러스 입자의 더 높은 안정성을 생성시킨다.
- [0062] 알파바이러스 기반 벡터, 예컨대 쉼리키 포레스트 바이러스(semliki forest virus: SFV) 및 신드비스 바이러스(sindbis virus: SIN)로부터 제조된 것은 또한 본 개시내용에서 사용될 수 있다. 알파바이러스의 사용은 문헌 [Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 및 Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0063] 재조합, 복제 결핍 알파바이러스 벡터는 높은 수준의 비상동성 (치료학적) 유전자 발현을 할 수 있으므로 유리할 수 있고, 넓은 표적 세포 범위를 감염시킬 수 있다. 알파바이러스 레프리콘은 이의 비리온 표면에, 동족 결합 파트너를 발현하는 표적 세포에 선택적 결합을 허용하는, 기능성 비상동성 리간드 또는 결합 도메인을 디스플레이함으로써 특정한 세포 유형에 표적화될 수 있다. 알파바이러스 레프리콘은 잠복 및 따라서 표적 세포에서의 장기간 비상동성 핵산 발현을 확립할 수 있다. 레프리콘은 또한 표적 세포에서 일시적 비상동성 핵산 발현을 나타낼 수 있다.
- [0064] 수두 바이러스 벡터는 세포의 세포질로 유전자를 도입할 수 있다. 아비폭스 바이러스 벡터는 유전자 또는 핵산의 오직 단기간 발현을 발생시킬 수 있다. 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관된 바이러스 벡터 및 단순 포진 바이러스(HSV) 벡터는 본 개시내용의 조성물 및 방법과 사용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 몇몇 양태에서 아데노 연관된 바이러스보다 더 단기간의 발현(예를 들어, 약 1개월 미만)을 발생시킬 수 있고, 훨씬 더 긴 발현을 나타낼 수 있다. 선택된 특정한 벡터는 표적 세포 및 치료되는 질환에 따라 달라질 수 있다.
- [0065] 아데노 연관된 바이러스(AAV)는 작은 비외피 단일 가닥 DNA 바이러스이다. 이것은 비병원균성 인간 파르보바이러스이고, 헬퍼 바이러스, 예를 들어 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스, 백시니아 바이러스 및 복제를 위한 CMV에 의존할 수 있다. 야생형(wt) AAV에 대한 노출은 연관되지 않거나, 임의의 인간 발병을 발생시키는 것으로 공지되어 있고, 일반 집단에서 흔하여, 아데노바이러스 감염과 연관되어 삶의 처음 10년에 보통 생긴다.
- [0066] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "AAV"는 아데노 연관된 바이러스를 의미하고, "rAAV"는 재조합 아데노 연관된 바이러스를 의미한다.
- [0067] 몇몇 경우에, 야생형 AAV는 rep 및 cap 유전자를 코딩한다. rep 유전자는 바이러스 복제에 필요하고, cap 유전자는 캡시드 단백질의 합성에 필요하다. 대안적인 번역 시작 및 스플라이싱 부위의 조합을 통해, 작은 게놈은 4개의 rep 및 3개의 cap 유전자 산물을 발현할 수 있다. 인버티드 말단 반복부(게놈을 플랭킹하는 145bp ITR)에서의 rep 유전자 산물 및 서열은 이 과정에서 중요할 수 있다. 현재까지, AAV의 11개의 혈청형이 단리되었다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 임의의 적합한 AAV 혈청형의 사용을 제공한다. 몇몇 양태에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV2.5, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, 및 이의 하이브리드로 이루어진 군으로부터 선택된다. AAV2는 본 개시내용의 조성물 및 방법과 사용될 수 있다.
- [0068] AAV2는 가장 규명된 것이다. rAAV2는 동물의 많은 종의 눈에서 장기간 전이유전자 발현을 매개할 수 있는 것으로 나타났다. 래트에서, rAAV 매개된 리포터 유전자(녹색 형광 단백질)는 주사 후 18개월에 여전히 존재하였다. 원숭이에서, 동일한 리포터 유전자는 주사 후 17개월에 존재하였다.
- [0069] 벡터는 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조정하거나, 그렇지 않으면 표적화된 세포에 유리한 특성을 제공하는 성분 또는 작용기를 포함할 수 있다. 이러한 다른 성분은 예를 들어 세포에 대한 결합 또는 표적화에 영향을 미치는 성분(세포 유형 또는 조직 특이적 결합을 매개하는 성분을 포함); 세포에 의한 벡터 핵산의 흡수에 영향을 미치는 성분; 흡수 후 세포 내의 폴리뉴클레오타이드의 국제화에 영향을 미치는 성분(예컨대, 핵 국제화를 매개하는 물질); 및 폴리뉴클레오타이드의 발현에 영향을 미치는 성분을 포함한다. 이러한 성분은 또한

취해진 세포를 검출하거나 이를 선택하도록 사용될 수 있고, 벡터에 의해 전달된 핵산을 발현하는, 마커, 예컨대 검출 가능한 및/또는 선택 가능한 마커를 포함할 것이다. 이러한 성분은 벡터의 천연 특징(예컨대, 결합 및 흡수를 매개하는 성분 또는 작용기를 갖는 소정의 바이러스 벡터의 사용)으로 제공될 수 있거나, 벡터는 이러한 작용기를 제공하도록 변형될 수 있다.

[0070] 선택 가능한 마커는 양성, 음성 또는 이작용성일 수 있다. 양성 선택 가능한 마커는 마커를 보유하는 세포에 대한 선택을 허용하는 한편, 음성 선택 가능한 마커는 임의로 제거되는 마커를 보유하는 세포를 허용한다. 이작용성(즉, 양성/음성) 마커(예를 들어, 문헌[1992년 5월 29일자로 공개된 WO 제92/08796호(Lupton, S.); 및 1994년 12월 8일자로 공개된 WO 제94/28143호(Lupton, S.)] 참조)를 포함하는, 다양한 이러한 마커 유전자가 기재되어 있다. 음성 선택 가능한 마커의 예는 항생제, 예컨대 암피실린 또는 카나마이신에 대한 내성 유전자의 포함을 포함할 수 있다. 이러한 마커 유전자는 유전자 치료 맥락에서 유리할 수 있는 제어의 부가된 조치를 제공할 수 있다. 많은 다양한 이러한 벡터는 당해 분야에 공지되어 있고, 일반적으로 이용 가능하다.

[0071] 본 개시내용의 방법에 맞는 많은 바이러스 벡터에서, 하나 이상의 촉진자는 하나 초과와 비상동성 유전자가 벡터에 의해 발현되도록 벡터에서 포함될 수 있다. 추가로, 벡터는 신호 펩타이드를 코딩하는 서열 또는 표적 세포로부터의 mCoChop 단백질의 발현을 수월하게 하는 다른 모이어티를 포함할 수 있다.

[0072] 유전자 산물을 코딩하는 핵산은 촉진자의 전사 제어 하에 있을 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같은, "촉진자"는 유전자의 전사를 개시시키는 데 필요한 적합한 DNA 서열을 의미한다. 구절 "전사 제어 하"는 RNA 중합효소 개시 및 유전자의 발현을 제어하기 위해 촉진자가 핵산에 대해 정확한 위치 및 배향에 있다는 것을 의미한다. 몇몇 경우에, 촉진자는 "강한" 또는 구성적 활성 촉진자를 포함할 수 있다. 예를 들어, CMV 촉진자는 당해 분야에 공지된 바대로 구성적 활성 촉진자로서 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, CMV 촉진자는 발현을 촉진하기 위한 추가적인 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0073] 몇몇 경우에, 촉진자는 "약한" 촉진자, 또는 강한 촉진자보다 mCoChop 단백질의 더 낮은 수준을 생성시키는 서열을 의미할 수 있다. 몇몇 경우에, 촉진자는 촉진자가 mCoChop의 선택적 발현을 추진시키도록 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 사용된 바와 같은 다른 서열과 조합되어 사용되는 촉진자 또는 다른 조절 요소는 눈 세포 또는 눈 조직에서 mCoChop의 선택적 발현을 추진시키도록 사용될 수 있다.

[0074] 추가로, "촉진자"는 RNA 중합효소에 대한 개시 부위 주위에 존재할 수 있는 임의의 추가적인 적합한 전사 제어 모듈을 의미하도록 본 명세서에서 상호 교환되어 또한 사용될 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 전이유전자의 발현을 위한 임의의 적합한 촉진자 및 전사 제어 모듈을 사용할 수 있다. 추가적인 전사 제어 모듈은 HSV 타이미딘 키나제(tk) 및 SV40 초기 전사 유닛과 같은 요소를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일반적으로, 촉진자는 각각 대략 7 내지 20bp의 DNA, 또는 20 내지 5000bp의 DNA로 이루어진 별개의 기능성 모듈로 이루어질 수 있고, 전사 활성화자 또는 억제자 단백질에 대한 하나 이상의 인식 부위를 함유한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 임의의 적합한 조절 서열 또는 이들의 조합을 제공한다. 몇몇 경우에, 이 전사 제어 모듈 서열은 인핸서 또는 억제자 서열이라 칭해지거나 이것으로서 확인될 수 있다.

[0075] 각각의 촉진자에서의 적어도 하나의 모듈은 RNA 합성에 대한 시작 부위를 배치시키도록 작용한다. 하나의 예는 TATA 박스이다. 다른 예는 TATA 박스가 결여된 몇몇 촉진자, 예컨대 포유류 말단 데옥시뉴클레오티딜 전환효소 유전자에 대한 촉진자 및 SV40 후기 유전자에 대한 촉진자를 포함할 수 있고, 시작 부위 위에 있는 별개의 요소는 개시의 장소를 고정하도록 돕는다.

[0076] 추가적인 촉진자 요소는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 일반적으로, 이것은 시작 부위의 상류에 30 내지 110bp 영역에 위치하지만, 다수의 촉진자는 또한 시작 부위의 하류에 기능성 요소를 함유할 수 있다. 촉진자 요소 사이의 간격은 자주 융통성이 있을 수 있어서, 요소가 서로에 대해 인버티드되거나 이동될 때 촉진자 기능은 보존된다. 예를 들어 tk 촉진자에서, 촉진자 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 떨어져 50bp로 증가할 수 있다. 촉진자에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하도록 협동적으로 또는 독립적으로 기능하도록 위치할 수 있다.

[0077] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 표적화된 세포에서 관심 대상의 핵산 서열의 발현의 제어를 위해 임의의 적합한 서열을 제공한다. 따라서, 인간 세포가 표적화된 경우, 핵산 코딩 영역은 인접하게 그리고 인간 세포에서 발현될 수 있는 촉진자의 제어 하에 조작될 수 있다. 일반적으로, 이러한 촉진자는 인간 또는 바이러스 촉진자를 포함할 수 있다.

[0078] 본 개시내용의 다양한 양태에서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기(IE) 인핸서, 닭 β -액틴 촉진자,

닭 β -액틴 엑손 1, 하이브리드 닭 β -액틴 및 토끼 β -글로빈 인트론, 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 신호는 관심 대상의 코딩 서열(예를 들어, mCoChop)의 발현의 높은 수준을 얻도록 사용될 수 있다.

[0079] 관심 대상의 코딩 서열의 발현을 달성하기 위해 당해 분야에 널리 공지된 다른 바이러스 또는 포유류 세포 또는 박테리아 파지 촉진자의 사용은 또한 고려되고, 단 발현의 수준은 소정의 목적에 충분하다. 몇몇 양태에서, 원핵생물 조절 서열, 예컨대 T7 RNA 중합효소 촉진자 서열은 벡터에 존재할 수 있다. 다른 양태에서, 벡터는 이러한 조절 서열이 없다. 공지된 특성을 갖는 촉진자를 사용함으로써, 형질주입 또는 형질전환 후 관심 대상의 단백질 발현의 수준 및 패턴은 최적화될 수 있다.

[0080] 특정한 생리학적 또는 합성 신호에 반응하여 조절된 촉진자의 선택은 유전자 산물의 유도성 발현을 허용할 수 있다. 예를 들어, 다중시스템성 벡터가 사용될 때 전이유전자 또는 전이유전자들의 발현이 벡터가 제조된 세포에 독성인 경우에, 하나 이상의 전이유전자의 발현을 금지하거나 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 생산자 세포주에 독성일 수 있는 전이유전자의 예는 아포토시스 촉진 및 사이토카인 유전자이다. 몇몇 유도성 촉진자 시스템은 전이유전자 산물이 독성일 수 있는 바이러스 벡터의 제조에 이용 가능하다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 촉진자 서열, 조절 서열 및 전이유전자의 임의의 적합한 조합을 제공한다. 몇몇 경우에, 서열의 조합은 세포에 독성을 발생시킬 수 없다. 몇몇 경우에, 서열의 조합은 세포에 높은 독성을 발생시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 서열의 조합은 세포에서의 독성의 보통의 수준을 발생시킬 수 있다.

[0081] 몇몇 상황에서, 유전자 치료 벡터에서 전이유전자의 발현을 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 다양한 강도의 활성을 갖는 상이한 바이러스 촉진자는 원하는 발현의 수준에 따라 사용될 수 있다. 포유류 세포에서, CMV 즉시 초기 촉진자는 강한 전사 활성화를 제공하도록 사용될 수 있다. 덜 강력한 CMV 촉진자의 변형된 버전은 전이유전자의 발현의 감소된 수준이 원해질 때 또한 사용되었다. 조절 세포에서의 전이유전자의 발현이 원해질 때, 레트로바이러스 촉진자, 예컨대 MLV 또는 MMTV로부터의 LTR(긴 말단 반복부)이 대개 사용된다. 원하는 효과에 따라 사용될 수 있는 다른 바이러스 촉진자는 SV40, RSV LTR, HIV-1 및 HIV-2 LTR, 예컨대 E1A, E2A 또는 MLP 영역으로부터의 아데노바이러스 촉진자, AAV LTR, 꽃양배추 모자이크 바이러스, HSV-TK 및 조류 육종 바이러스를 포함한다.

[0082] 몇몇 경우에, 촉진자 또는 조절 서열 요소는 눈 세포 또는 눈 조직에서의 선택적 발현을 지시하도록 사용될 수 있다. 특정한 눈 세포 유형, 예컨대 망막 색소 상피 세포에서 발견되는, 예를 들어 촉진자, 서열 요소 또는 조절 서열은 적합한 발현 작제물(예를 들어, RPE65 또는 VMD2 촉진자)에서 사용될 수 있다.

[0083] 적절한 촉진자의 선택은 용이하게 달성될 수 있다. 몇몇 경우에, 높은 발현, 또는 강한 촉진자를 사용할 수 있다.

[0084] 발현을 증대시킬 수 있는 다른 요소, 예컨대 발현의 높은 수준을 발생시키는 인핸서 또는 시스템, 예컨대 tat 유전자 및 tar 요소가 또한 포함될 수 있다. 이 카세트는 이후 벡터, 예를 들어 플라스미드 벡터, 예컨대, pUC19, pUC118, pBR322, 또는 예를 들어 이. 콜라이 복제 기원을 포함하는 다른 공지된 플라스미드 벡터로 삽입될 수 있다. 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, (1989)]을 참조한다. 촉진자는 하기에 기재되어 있다. 플라스미드 벡터는 또한 선택 가능한 마커, 예컨대 암피실린 내성에 대한 베타-락타마제 유전자를 포함할 수 있고, 단 마커 폴리펩타이드는 처리되는 유기체의 대사에 부정적으로 영향을 미치지 않는다. 카세트는 합성 전달 시스템, 예컨대 WO 제95/22618호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 시스템에서 핵산 결합 모이어티에 또한 결합될 수 있다. 일반적으로, 촉진자 서열 및/또는 임의의 연관된 조절 서열은 적어도 약 150bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1000bp, 2000bp, 3000bp, 4000bp, 5000bp 또는 10000bp를 포함할 수 있다. 촉진자 서열 및 임의의 연관된 조절 서열은 기껏해야 약 150bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1000bp, 2000bp, 3000bp, 4000bp, 5000bp 또는 10000bp를 포함할 수 있다.

[0085] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스 또는 플라스미드는 사이토메갈로바이러스(CMV) 촉진자, 라우스 육종 바이러스(RSV) 촉진자, 및 MMT 촉진자, EF-1 알파 촉진자, UB6 촉진자, 닭 베타-액틴 촉진자, CAG 촉진자, RPE65 촉진자 및 옵션 촉진자로부터 선택된 촉진자를 포함한다.

[0086] 몇몇 양태에서, 항생제 마커는 재조합 바이러스의 제조를 위한 공정에 사용된다. 항생제 내성 마커는 재조합 바이러스의 생성에서 양성 형질전환 세포를 확인하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 내성을 부여하는 마커는 카나마이신, 겐타마이신, 암피실린, 클로르암페니콜, 테트라사이클린, 독시사이클린 또는 하이그로마이신을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 양태에서, 항생제 내성유전자는 비-베타-락탐 항생제 내성유전자,

예컨대 카나마이신이다.

- [0087] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 복제 기원 서열을 코딩하는 서열, 예컨대 본 명세서에 제공된 것을 포함한다. 복제 기원 서열은 일반적으로 플라스미드를 전파시키기에 유용한 서열을 제공한다.
- [0088] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 인헨서, 예컨대 본 명세서에 제공된 것을 포함한다. 바람직하게는, 인헨서는 CMV 즉시 초기 인헨서이다.
- [0089] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 polyA(폴리아데닐화) 서열, 예컨대 본 명세서에 제공된 것(예를 들어, SV40 polyA 서열)을 포함한다. 일반적으로, 임의의 적합한 polyA 서열은 전이유전자(즉, mCoChop)의 원하는 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에, 본 개시내용은 SV40 polyA 서열 또는 SV40 polyA 서열의 일부를 포함하는 서열을 제공한다. 몇몇 경우에, 본 개시내용은 하나 이상의 polyA 서열 또는 서열 요소의 조합을 포함하는 polyA 서열을 제공한다. 몇몇 경우에, polyA 서열을 사용하지 않는다. 몇몇 경우에, 하나 이상의 polyA 서열은 비번역된 영역(UTR), 3' UTR 또는 종결 서열이라 칭해질 수 있다. 바람직하게는, SV40 polyA 서열을 사용한다.
- [0090] polyA 서열은 1 내지 10bp, 10 내지 20bp, 20 내지 50bp, 50 내지 100bp, 100 내지 500bp, 500bp 내지 1Kb, 1Kb 내지 2Kb, 2Kb 내지 3Kb, 3Kb 내지 4Kb, 4Kb 내지 5Kb, 5Kb 내지 6Kb, 6Kb 내지 7Kb, 7Kb 내지 8Kb, 8Kb 내지 9Kb 및 9Kb 내지 10Kb 길이를 포함할 수 있다. polyA 서열은 적어도 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb, 및 10Kb의 길이를 포함할 수 있다. polyA 서열은 기껏해야 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb 및 10Kb의 길이를 포함할 수 있다.
- [0091] 몇몇 경우에, polyA 서열은 세포에서의 전이유전자의 mRNA 반감기, 전이유전자의 mRNA의 안정성 또는 전사 조절(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 단백질 발현에 영향을 미치는 다양한 매개변수에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들어, polyA 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체를 증가시키도록 변경될 수 있고, 이는 증가된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다. 몇몇 경우에, polyA 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체를 감소시키도록 변경될 수 있고, 이는 감소된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다.
- [0092] 본 개시내용의, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 구제역 질환 바이러스(FMDV) 요소의 사용은 다중유전자, 또는 폴리시스트론성, 메시지를 생성하도록 사용될 수 있다. IRES 요소는 5' 메틸화된 Cap 의존적 번역의 리보솜 스캐닝 모델을 우회하고 내부 부위에서 번역을 시작시킬 수 있다. 피코르나바이러스 패밀리의(폴리오바이러스 및 뇌척수염)의 2개의 구성원으로부터의 IRES 요소는 포유류 메시로부터의 IRES과 또한 기재되어 있다. IRES 요소는 비상동성 오픈 리딩 프레임에 연결될 수 있다. 다수의 오픈 리딩 프레임은 각각 IRES에 의해 분리되어 함께 전사될 수 있어서, 폴리시스트론성 메시지를 생성한다. IRES 요소 덕분에, 각각의 오픈 리딩 프레임은 효율적인 번역을 위해 리보솜에 접근 가능할 수 있다. 다수의 유전자는 단일 메시지를 전사시키도록 단일 촉진자/인헨서를 사용하여 효율적으로 발현될 수 있다. 유전자 치료 전달 벡터에서의 2개의 단백질의 동시발현을 위한 대안적인 시스템은 FMDV 2A 시스템이다. FMDV 2A 시스템은 2개의 유전자가 피코르나바이러스 구제역 질환 바이러스로부터의 2A 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있는 레트로바이러스 플라스미드 벡터를 사용한다. 전사 및 번역은 바이시스트론성 mRNA 및 2개의 독립적인 단백질 산물을 생성시킨다.
- [0093] 임의의 비상동성 오픈 리딩 프레임은 IRES 요소에 연결될 수 있다. 이것은 분비된 단백질, 독립적인 유전자에 의해 코딩된 다중 아단위 단백질, 세포내 또는 막 결합된 단백질 및 선택 가능한 마커에 대한 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 몇몇 단백질의 발현은 단일 작제물 및 단일 선택 가능한 마커에 의해 세포로 동시에 조작될 수 있다.
- [0094] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 인간 mCoChop 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0095] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 눈 세포에서 mCoChop 단백질의 선택적 발현을 지시할 수 있는 조절 핵산 단편을 포함한다.
- [0096] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 하나 이상의 비번역된 영역(UTR) 또는 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 임의의 적합한 UTR 서열은 전이유전자(즉,

mCoChop)의 원하는 최적 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에, UTR 영역 또는 서열은 네이티브 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, UTR 서열은 인간 게놈 서열 또는 이의 일부에서 발견되는 바와 같은 인간 mCoChop 유전자의 상류(5' UTR) 또는 하류(3'UTR)에서 발견된 바와 같은 서열일 수 있다. 다른 경우에, UTR 서열은 예컨대 mCoChop 이외의 유전자의 상류 또는 하류에서 발견된 비네이티브 서열을 포함하거나, 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같은 하나 이상의 UTR 서열 요소의 조합을 추가로 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 5' UTR 서열을 사용한다. 몇몇 경우에, 오직 3' UTR 서열을 사용한다. 몇몇 경우에, UTR 서열을 사용하지 않는다.

[0097] UTR 서열은 1 내지 10bp, 10 내지 20bp, 20 내지 50bp, 50 내지 100bp, 100 내지 500bp, 500bp 내지 1Kb, 1Kb 내지 2Kb, 2Kb 내지 3Kb, 3Kb 내지 4Kb, 4Kb 내지 5Kb, 5Kb 내지 6Kb, 6Kb 내지 7Kb, 7Kb 내지 8Kb, 8Kb 내지 9Kb 및 9Kb 내지 10Kb 길이를 포함할 수 있다. UTR 서열은 적어도 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb 및 10Kb 길이를 포함할 수 있다. UTR 서열은 기껏해야 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb 및 10Kb 길이를 포함할 수 있다.

[0098] 몇몇 경우에, 5'UTR 및/또는 3'UTR 중 어느 하나의 변이는 단백질 발현의 원하는 수준에 최적화될 수 있다. 몇몇 경우에, 3'UTR 서열은 세포에서의 전이유전자의 mRNA 반감기, 전이유전자의 mRNA의 안정성 또는 2차 구조 또는 조건적 조절(예를 들어, 번역을 조정하기 위한 다양한 인자의 결합)(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 단백질 발현에 영향을 미치는 다양한 매개변수에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 3'UTR 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체의 반감기를 증가시키도록 변경될 수 있고, 이는 증가된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 3'UTR 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체의 반감기를 감소시키도록 변경될 수 있고, 이는 감소된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다.

[0099] 일반적으로, 3' UTR 서열은 다양한 서열 요소를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 서열 요소, 예컨대 하나 이상의 폴리아데닐화 신호, 링커 서열, 스페이서 서열, SECIS 요소, AU 농후 또는 ARE 서열 또는 miRNA 또는 RNAi 결합 서열, 전사 종결자 서열, 3' 종결 서열 또는 변이체 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는 3' UTR 서열을 제공한다.

[0100] 몇몇 경우에, 5'UTR 서열은 세포에서의 전이유전자의 mRNA 반감기, 전이유전자의 mRNA의 안정성 또는 2차 구조 또는 전사 조절(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 단백질 발현에 영향을 미치는 다양한 매개변수에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 5'UTR 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체의 번역 효율을 증가시키도록 변경될 수 있고, 이는 증가된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 5'UTR 서열은 전이유전자의 mRNA 전사체의 번역 효율을 감소시키도록 변경될 수 있고, 이는 감소된 단백질 발현을 발생시킬 수 있다.

[0101] 일반적으로, 5' UTR 서열은 다양한 서열 요소를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 서열 요소, 예컨대 하나 이상의 리보솜 결합 부위(RBS), 링커 서열, 스페이서 서열, 조절 서열, 조절 반응 요소, 리보스위치, 번역 개시를 촉진하거나 저해하는 서열, mRNA 운반체 또는 변이체에 대한 조절 서열 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는 5' UTR 서열을 제공한다.

[0102] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 하나 이상의 링커 또는 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 링커 서열 또는 스페이서 서열은 상호 교환되어 사용될 수 있다. 일반적으로, 링커 서열 또는 스페이서 서열은 적어도 2개의 서열 요소 사이에 비인접한 서열을 생성하도록 사용된 임의의 적합한 서열일 수 있다. 일반적으로, 임의의 적합한 링커 또는 스페이서 서열은 비인접한 서열을 생성하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에, 링커 서열은 무작위로 생성된 서열일 수 있다. 몇몇 경우에, 링커 서열은 단백질 발현에 부정적으로 영향을 미칠 수 있는 2차 구조 또는 분자내 상호작용의 형성을 막도록 최적화된 비특이적 서열일 수 있다. 몇몇 경우에, 링커 서열은 인트론, 조절 서열, 인핸서 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 임의의 추가적인 기능적 서열 요소를 포함할 수 있다. 링커 서열에서의 기능적 요소는 바이러스의 원하는 최적 생성 및/또는 전이유전자 발현의 발현에 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 링커 서열은 클로닝 부위, 이전의 클로닝 부위의 나머지 또는 다른 무의미한 서열이고, 임의의 2개의 서열 요소 사이의 이러한 링커의 삽입은 선택적이다.

[0103] 링커 서열은 1 내지 10bp, 10 내지 20bp, 20 내지 50bp, 50 내지 100bp, 100 내지 500bp, 500bp 내지 1Kb, 1Kb 내지 2Kb, 2Kb 내지 3Kb, 3Kb 내지 4Kb, 4Kb 내지 5Kb, 5Kb 내지 6Kb, 6Kb 내지 7Kb, 7Kb 내지 8Kb, 8Kb 내지

9Kb, 및 9Kb 내지 10Kb의 길이를 포함할 수 있다. 링커 서열은 적어도 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb 및 10Kb의 길이를 포함할 수 있다. 링커 서열은 기껏해야 1bp, 2bp, 3bp, 4bp, 5bp, 6bp, 7bp, 8bp, 9bp, 10bp, 20bp, 30bp, 40bp, 50bp, 60bp, 70bp, 80bp, 90bp, 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1Kb, 2Kb, 3Kb, 4Kb, 5Kb, 6Kb, 7Kb, 8Kb, 9Kb 및 10Kb의 길이를 포함할 수 있다.

[0104] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스는 바이러스 벡터의 비리온으로 재조합 유전자 발현 카세트를 패키징하기 위해 사용된 인버티드 말단 반복부(ITR) 서열을 포함한다. 몇몇 경우에, ITR은 아테노 연관된 바이러스(AAV) 유래이다. 몇몇 경우에, ITR은 AAV 혈청형 2 유래이다.

[0105] 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드는 하기 순서로 핵산을 포함한다: a) 제1 ITR 서열; b) 인핸서 서열; c) 촉진자 서열; d) 제1 엑손 서열; e) 인트론 서열; f) 제2 엑손 서열; g) mCoChop을 코딩하는 서열; h) polyA 서열; 및 i) 제2 ITR 서열. 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 재조합 바이러스 및/또는 플라스미드의 몇몇 양태에서, 촉진자 서열은 촉진자/인핸서 서열을 포함한다. 몇몇 양태에서, mCoChop을 코딩하는 서열은 인간 mCoChop 단백질 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 재조합 바이러스를 생성하기 위해 사용된 플라스미드는 복제 기원 서열을 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 플라스미드는 항생제 내성유전자에 대한 서열을 추가로 포함한다.

[0106] **약제학적 조성물**

[0107] 약제학적 조성물은 원하는 진단학적 결과 또는 치료학적 또는 예방적 효과를 달성하도록 인간 환자에 대한 투여에 적합한 하나 이상의 활성 성분, 및 하나 이상의 부형제, 담체, 안정화제 또는 벌크화제를 함유하는 제제이다. 저장 안정성 및 취급의 편의성을 위해, 약제학적 조성물은 환자에 대한 투여 전에 식염수 또는 물에 의해 재구성될 수 있는 동결건조된(즉, 냉동 건조된) 또는 진공 건조된 분말로서 제제화될 수 있다. 대안적으로, 약제학적 조성물은 수성 용액으로서 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물은 단백질성 활성 성분을 함유할 수 있다. 다양한 부형제, 예컨대 알부민 및 젤라틴은 약제학적 조성물에 존재하는 단백질 활성 성분을 안정화시키고 노력하도록 다른 정도의 성공으로 사용된다. 추가로, 동결건조의 냉동 조건 하에 단백질 변성을 감소시키도록 저온보호제, 예컨대 알코올을 사용한다.

[0108] 내부 사용에 적합한 약제학적 조성물은 무균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 무균 수성 용액 또는 분산액 및 무균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 식염수, 정균 물 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 무균이어야 하고, 용이한 주사 가능성이 존재하는 정도로 유체이어야 한다. 이것은 제조 및 저장의 조건 하에 안정해야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에틸렌(예를 들어, 글라이세롤, 프로필렌 글라이콜, 및 액체 폴리에틸렌 글라이콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트(Tween.TM.), 나트륨 도데실 설페이트(황산 라우릴 나트륨), 라우릴 다이메틸 아민 옥사이드, 세틸트라이메틸암모늄 브로마이드(CTAB), 폴리에톡실화 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄, 옥톡시놀(Triton X100.TM.), N,N-다이메틸도데실아민-N-옥사이드, 헥사데실트라이메틸암모늄 브로마이드(HTAB), 폴리옥실 10 라우릴 에터, Brij 721.TM., 담즙산염(나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 콜레이트), 플루론산(F-68, F-127), 폴리옥실 캐스터유(Cremophor.TM.) 노닐페놀 에톡실레이트(Tergitol.TM.), 사이클로텍스트린 및 에틸벤즈에토늄 클로라이드(Hyamane.TM.)의 사용에 의해 유지될 수 있다. 유기체의 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장성 물질, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 내부 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 발생될 수 있다.

[0109] 무균 용액은 필요한 바대로 상기 열거된 성분의 하나 또는 조합과 적절한 용매 중에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입한 후, 무균 여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 무균 비히클로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 무균 주사용 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우에, 제조의 방법은 이의 이전에 무균 여과된 용액으로부터의 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 냉동 건조이다.

[0110] 일 양태에서, 활성 화합물은 신체로부터 신속한 제거에 대해 화합물을 보호하는 담체, 예컨대 서방형 제제, 예

를 들어 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템에 의해 제조된다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언하이드라이드, 폴리글라이콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스터 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제제의 제조를 위한 방법은 당업자에게 명확할 것이다. 재료는 또한 상업적으로 얻어질 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단일클론 항체에 의해 감염된 세포로 표적화된 리포솜을 포함)은 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이것은 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바대로 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0111] 약제학적 조성물은 투여에 대한 설명서와 함께 용기, 팩 또는 분배기에 포함될 수 있다.

[0112] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 용액, 에멀션, 및 리포솜 함유 제제를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이 조성물은 미리 형성된 액체, 자가 유화 고체 및 자가 유화 반고체(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다.

[0113] 본 개시내용의 소정의 조성물은 또한 제제에서 담체 화합물을 혼입한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "담체 화합물" 또는 "담체"는 불활성이지만(즉, 특히 생물학적 활성을 보유하지 않음), 예를 들어 생물학적 활성 핵산을 분해하거나 순환으로부터 이의 제거를 촉진함으로써, 생물학적 활성을 갖는 핵산의 생체이용률을 감소시키는 생체내 과정에 의해 핵산으로서 인식된 핵산 또는 이의 유사체를 의미할 수 있다. 핵산 및 담체 화합물(일반적으로 후자 물질은 과량)의 동시 투여는, 아마도 일반 수용체에 대한 핵산과 담체 화합물 사이의 경쟁으로 인해, 간, 신장 또는 다른 순환의 저장소에서 회수된 핵산의 양의 실질적인 감소를 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 간 조직에서의 부분적으로 포스포로티오에이트올리고뉴클레오타이드의 회수는 폴리이노신산, 황산텍스트란, 폴리아이티드산 또는 4-아세트아미도-4'이소티오사이아노-스틸벤-2,2'다이선폰산과 동시 투여될 때 감소할 수 있다(Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

[0114] 벡터 또는 재조합 바이러스(비리온)는 포유류 환자, 특히 인간에 대한 투여를 위해 약제학적 조성물로 혼입될 수 있다. 벡터 또는 비리온은 바람직하게는 3 내지 8의 범위, 더 바람직하게는 6 내지 8의 범위, 가장 바람직하게는 6.8 내지 7.2의 범위의 pH에서 비독성의 불활성의 약제학적으로 허용 가능한 수성 담체 중에 제제화될 수 있다. 이러한 무균 조성물은 재구성 시 허용 가능한 pH를 갖는 수성 완충제 중에 용해된 치료학적 분자를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터 또는 비리온을 포함할 것이다.

[0115] 몇몇 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제, 예를 들어 식염수, 인산염 완충 식염수, 포스페이트 및 아미노산, 중합체, 폴리올, 당, 완충제, 보존제 및 다른 단백질과 혼합된 치료학적 유효량의 벡터 또는 비리온을 포함한다. 예시적인 아미노산, 중합체 및 당 등은 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 화합물, 폴리에틸렌 글라이콜 모노스테아레이트 화합물, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스터, 수크로스, 프락토스, 텍스트로스, 말토스, 글루코스, 만니톨, 텍스트란, 소르비톨, 이노시톨, 갈락시톨, 자일리톨, 락토스, 트레할로스, 소 또는 인간 혈청 알부민, 시트레이트, 아세테이트, 링커 및 헹크 용액, 시스테인, 아르기닌, 카르니틴, 알라닌, 글리신, 라이신, 발린, 류신, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 및 글라이콜이다. 바람직하게는, 이 제제는 -60℃에서 적어도 14개월 동안 안정하다.

[0116] 몇몇 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 완충제, 예컨대 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 인산나트륨/황산나트륨, 트리스 완충제, 글리신 완충제, 무균수 및 당업자에게 공지된 다른 완충제, 예컨대 문헌[Good et al. (1966) Biochemistry 5:467]에 의해 기재된 것을 포함한다. 바람직한 약제학적 조성물은 인산나트륨, 염화나트륨 및 소르비탈을 함유한다. 가장 바람직한 약제학적 조성물은 10mM 인산나트륨, 350mM 염화나트륨 및 5% (v/v) 소르비탈을 함유한다. 아데노바이러스 벡터 전달 시스템에 함유된 mCoChop을 포함하는 약제학적 조성물에서 완충제의 pH는 6.5 내지 7.75, 6.5 내지 7.5, 6.8 내지 7.4 또는 6.8 내지 7.2의 범위일 수 있다.

[0117] 몇몇 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 약 1 내지 10%, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10%(v/v)의 양으로 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 텍스트란을 포함한다. 바람직하게는, 소르비톨은 약 3 내지 6%(v/v)이고, 가장 바람직하게는, 소르비톨은 약 5%(v/v)이다.

[0118] 투여 전에, 약제학적 조성물은 제조 동안 사용된 성분, 예를 들어 배양 성분, 숙주 세포 단백질, 숙주 세포 DNA, 플라스미드 DNA가 없고, 실질적으로 마이코플라즈마, 내독소 및 미생물 오염이 없다. 바람직하게는, 약제학적 조성물은 10 미만, 5, 3, 2 또는 1 CFU/면봉을 갖는다. 가장 바람직하게는, 조성물은 0 CFU/면봉을 갖는다. 약제학적 조성물에서의 내독소 수준은 20 EU/ml 미만, 10 EU/ml 미만 또는 5 EU/ml 미만이다.

- [0119] 약제학적 조성물은 투여 전에 충분히 채워진 캡시드를 가져야 한다. 약제학적 조성물 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 이것 초과로 채워진 캡시드를 갖는다.
- [0120] **키트**
- [0121] 본 개시내용에 유용한 조성물 및 시약은 본 개시내용의 적용을 수월하게 하도록 키트에 포장될 수 있다. 몇몇 양태에서, 본 방법은 본 개시내용의 재조합 핵산을 포함하는 키트를 제공한다. 몇몇 양태에서, 본 방법은 본 개시내용의 재조합 바이러스를 포함하는 키트를 제공한다. 설명서는 키트 인서트에 인쇄된, 하나 이상의 용기에 인쇄된, 및 전자 저장 매체, 예컨대 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체에 제공된, 전자로 저장된 설명서(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 임의의 원하는 형태일 수 있다. 사용자가 정보를 통합하고 조절 용량을 계산하게 허용하는 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체에서의 소프트웨어 패키지가 또한 임의로 포함된다.
- [0122] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 더욱 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 질병의 치료에서 키트를 제공한다.
- [0123] 일 양태에서, 키트는 (a) 본 명세서에 제공된 재조합 바이러스, 및 (b) 세포 또는 개체에게 치료학적 유효량의 재조합 바이러스를 투여하기 위한 설명서를 포함한다. 몇몇 양태에서, 키트는 재조합 바이러스를 투여하기 위한 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 용액을 포함할 수 있다. 임의로, 키트는 라벨 또는 별개의 인서트의 형태의 적합한 조작 매개변수를 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 재조합 바이러스의 용량을 준비하기 위해 의사 또는 실험실 기술자에게 알리는 표준 설명서를 가질 수 있다.
- [0124] 임의로, 키트는 표준 또는 제어 정보를 추가로 포함할 수 있어서, 환자 샘플은 재조합 바이러스의 시험 양이 임의로 치료학적 양인지를 결정하기 위해 제어 정보 표준과 비교될 수 있고, 키트는 투여를 위한 장치, 예컨대 시린지, 필터 침, 연장 배관, 캐놀라 및 망막하 주사기를 추가로 포함할 수 있다.
- [0125] 재조합 바이러스는 임의의 적합한 수단에 의해 생성될 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물은 포유류 세포, 곤충 세포, 동물 세포 또는 진균 세포를 포함하는 형질전환 세포의 사용을 포함하는 다양한 수단을 통해 재조합 바이러스의 생성을 제공한다.
- [0126] 예를 들어, 몇몇 양태에서, 재조합 바이러스는 재조합 바큇로바이러스를 통한 곤충 세포의 형질주입을 통해 생성될 수 있다. 몇몇 경우에, 재조합 바큇로바이러스는 중간체로서 생성될 수 있어서, 바큇로바이러스는 다른 바이러스, 예컨대 AAV 또는 rAAV2 바이러스의 생성에 필요한 서열을 함유할 수 있다. 몇몇 경우에, 하나 이상의 바큇로바이러스는 본 개시내용의 조성물 및 치료 방법에서 사용된 재조합 바이러스의 생성에서 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 곤충 세포, 예컨대 Sf9, 하이-파인브(High-Five) 또는 Sf21 세포주를 사용할 수 있다. 몇몇 경우에, 세포주는 일시적 방법(즉, 안정하게 통합된 전이유전자가 없는 감염)을 이용하여 생성될 수 있다. 다른 경우에, 세포주는 안정한 세포주의 생성(즉, 전이유전자가 숙주 세포 게놈으로 안정하게 통합된 감염)을 통해 생성될 수 있다. 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 부착성 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포를 사용하여 제조된다. 대안적인 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 현탁액 적응된 HEK293 세포를 사용하여 제조된다. 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 곤충 세포에서 바큇로바이러스 발현 시스템(BYES)을 사용하여 제조된다. 몇몇 양태에서, 벡터는 헤르페스-헬퍼 바이러스를 사용하여 제조된다. 몇몇 양태에서, 벡터는 프로듀서-클론 방법을 이용하여 제조된다. 몇몇 양태에서, 벡터는 Ad-AAV를 사용하여 제조된다.
- [0127] 일반적으로, 임의의 적합한 방법은 본 명세서에 사용된 바와 같은 약제학적 조성물에서 사용하기 위해 재조합 바이러스의 생화학 정제에서 사용될 수 있다. 재조합 바이러스는 직접적으로 세포로부터 또는 숙주 세포를 둘러싼 배양 배지로부터 수확될 수 있다. 바이러스는 다양한 생화학 수단, 예컨대 겔 여과, 여과, 크로마토그래피, 친화도 정제, 구배 초원심분리 또는 크기 배제 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 재조합 바이러스는 약제학적 조성물로 조제 전에 임의의 적합한 수단을 이용하여 내용물(즉, 정제), 순도 또는 효력(즉, 활성)에 대해 시험될 수 있다. 방법은 면역검정, ELISA, SDS-PAGE, 웨스턴 블롯, 노던 블롯, 써던 블롯 또는 PCR, HUVEC 검정 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0128] **치료 방법**
- [0129] 본 mCoChop 단백질 및 핵산, 및 생성된 ChR 단백질이 의도되고 시력의 하나 이상의 매개변수를 개선하도록 사용될 수 있는 눈 질환은 눈의 전방 및 후방 세그먼트 둘 다에 영향을 미치는 발달 비정상을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 전방 세그먼트 질환은 녹내장, 백내장, 각막 이상증, 추체각막을 포함한다. 후방 세그먼트

질환은 광수용체 기능이상에 의해 생긴 실명 장애 및/또는 망막 이영양증 및 퇴행에 의해 생긴 사멸을 포함한다. 망막 장애는 선천성 야맹증, 황반변성, 예컨대 연령 관련 황반변성, 선천성 추체 이영양증 및 색소성 망막염(RP) 관련된 장애의 큰 그룹을 포함한다. 이 장애는 다양한 연령에서 생기는 망막에서의 광수용체 세포, 간체 및 추체의 유전적 소인의 사멸을 포함한다. 이들 중에서, 중증 망막병증, 예컨대 연령에 따라 진행되고 어린이 및 초기 성인에서 실명을 야기하는 RP의 하위유형 자체 및 RP 연관된 질병, 예컨대 태어나서 처음 1년처럼 조기의 유년기 동안에 시력 상실을 대개 발생시키는 LCA의 유전적 하위유형이 있다. 후자의 장애는 일반적으로 광수용체 세포, 간체 및 추체의 중증 감소, 및 대개 완전한 소실을 특징으로 한다. (Trabulsi, EI, ed., *Genetic Diseases of the Eye*, Oxford University Press, NY, 1998).

[0130] 특히, 기능 소실에도 불구하고 눈 조직 구조의 장기간 보존 및 기능 소실과 대상체의 눈 세포에서의 정상 유전자의 결함 또는 부재 사이의 연관을 특징으로 하는, 눈 장애, 예컨대 RPE 연관된 망막병증으로 인해 시력을 상실한 대상체에 대한 적어도 부분 시력의 치료 및/또는 복원에 유용한 본 발명의 mCoChop 및 ChR 단백질. 다양한 이러한 눈 장애, 예컨대 어린이 발병 실명 질병, 망막세포 변성증, 황반변성 및 당뇨병성 망막병증, 및 당해 분야에 공지된 눈 실명 질병은 공지되어 있다. 이들 다른 장애, 및 상기와 동일한 실명을 차후에 특징으로 하는 현재 공지되지 않은 원인작용의 실명 장애는 본 발명의 CoChop 및 ChR 단백질에 의해 또한 성공적으로 치료될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명에 의해 치료되는 특정한 눈 장애는 상기 언급된 장애 및 이렇게 아직 규명되지 않은 다수의 질병을 포함할 수 있다.

[0131] 특정한 실시형태에서, 본 개시내용은 약제학적 유효량의 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물을 이러한 치료를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 망막 퇴행성 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 망막 퇴행성 질병은 망막세포 변성증 또는 연령 관련 황반변성(AMD), 습성 AMD, 건성 AMD이다. 추가로, 망막 퇴행성 질환의 직접적인 결과인 다른 질병 및 장애는 또한 본 발명의 방법에 의해 치료된다.

[0132] 몇몇 실시형태에서, 건성 AMD를 치료할 수 있다. 몇몇 경우에, 건성 AMD는 나중에 망막 아래에 망막 색소 상피의 위축증 및 눈의 중앙 부분에서의 후속하는 광수용체의 소실을 특징으로 하는 중앙 지도형 위축이라 칭해질 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 AMD의 임의의 및 모든 형태의 치료를 제공한다.

[0133] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 약제학적 유효량의 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물을 이러한 치료를 요하는 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 본 명세서에 사용된 바와 같은 AMD 또는 망막세포 변성증의 예방적 치료를 위한 방법을 제공한다. 본 개시내용은 AMD를 발생시킬 위험에 있거나, 질병의 초기 증상을 제시하는 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용은 MD를 발생시키거나, 질병의 초기 증상을 제시할 위험에 있는 환자, 예컨대 망막 퇴행성 질환을 갖는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이것은 동시에 또는 순차적으로 눈의 치료를 포함할 수 있다. 동시의 치료는 치료가 동일한 시간에 각각의 눈에 투여된다는 것 또는 눈 둘 다가 치료 주치의 또는 다른 건강관리 제공자에 동일한 방문 동안에 치료된다는 것을 의미할 수 있다. AMD의 증상을 제시한 눈의 건강한 타안에서, 또는 AMD를 발생시키는 것에 유전적 소인을 갖는 환자에서 환자가 AMD를 발생시킬 더 높은 위험을 갖는다는 것이 입증되었다. 본 개시내용은 타안에서 AMD의 예방에서 예방적 치료로서 사용될 수 있다.

[0134] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물(예를 들어, 뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 발현하거나 상기 뉴클레오타이드를 함유하는 세포, 약제학적 조성물 등)은 환자에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법을 이용하여 생성된 돌연변이체 CoChop 조성물은 질병 또는 장애를 경감시키거나, 이의 발병을 지연시킨다. 몇몇 실시형태에서, 질병 또는 장애는 퇴행성 질병 또는 장애이다. 몇몇 실시형태에서, 질병 또는 장애는 눈 장애이다. 몇몇 실시형태에서, 눈 질환은 AMD, 황반변성 또는 망막세포 변성증이다. 몇몇 실시형태에서, 질병 또는 장애는 손상, 뇌 손상, 척수 손상, 간질, 대사 장애, 심장 기능이상, 시력 상실, 실명, 난청, 청력 손실 또는 신경학적 질환이다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물은 시력 상실을 복원하도록 환자에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물은 시력 상실을 예방하거나, 지연시키거나, 경감시키도록 환자에게 투여된다.

[0135] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물은 환자에게 1회 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 벡터, 핵산, 또는 세포는 약 2회, 약 3회, 약 4회, 약 5회, 약 6회, 약 7회, 약 8회, 약 9회, 약 10회, 약 20회, 약 40회 또는 이것 초과 횟수로 환자에게 투여된다. 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물은 질병 또는 장애 증상이 개선할 때까지 투여된다.

[0136] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서 시력 상실을 개선하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 경감시킨다. 몇몇

실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 시력 상실을 개선하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 경감시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 시력 상실과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 시력 상실을 개선하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 경감시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 시력 상실과 비교하여 약 1일, 약 1주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 시력 상실을 개선하거나, 예방하거나, 지연시키거나, 경감시킨다.

[0137] 몇몇 실시형태에서, 시력 상실은 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 시력 상실을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 개선하거나, 예방하거나, 경감시키거나, 지연시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 방법에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 시력 상실을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 개선하거나, 예방하거나, 경감시키거나, 지연시킨다.

[0138] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서 광 민감도를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 광 민감도를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 광 민감도 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 광 민감도를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 광 민감도와 비교하여 약 1일, 약 1주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 광 민감도를 증가시킨다.

[0139] 몇몇 실시형태에서, 광 민감도는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 광 민감도를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 방법에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 광 민감도를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다.

[0140] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서의 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서 광전류를 유발하는 데 필요한 광도와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주,

약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서 광전류를 유발하는 데 필요한 광도와 비교하여 약 1일, 약 1주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 감소시킨다.

[0141] 몇몇 실시형태에서, 광전류를 유발하는 데 필요한 광도는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 방법에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 광전류를 유발하는 데 필요한 광도를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다.

[0142] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 1일 내지 10년에서 치료된 환자에서 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스와 비교하여 약 1일, 약 1주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 증가시킨다.

[0143] 몇몇 실시형태에서, 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 방법에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 이온 플럭스 및/또는 양성자 플럭스를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다.

[0144] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서 시각 피질에서의 시각 유발된 전위와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서 시각 피질에서의 시각 유발된

전위와 비교하여 약 1일, 약 1주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 증가시킨다.

[0145] 몇몇 실시형태에서, 시각 피질에서의 시각 유발된 전위는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가한다. 몇몇 실시형태에서, 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 조성물에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 다른 방법에 의해 치료된 대조군 또는 환자와 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 시각 피질에서의 시각 유발된 전위를 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 증가시킨다.

[0146] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서 질병 또는 장애 증상을 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 질병 또는 장애 증상은 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 측정된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 질병 또는 장애 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 질병 또는 장애 증상을 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 질병 또는 장애 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 질병 또는 장애 증상을 감소시킨다.

[0147] 몇몇 실시형태에서, 질병 또는 장애 증상은 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 질병 또는 장애 증상과 비교하여 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 질병 또는 장애 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 질병 또는 장애 증상을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 질병 또는 장애 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 질병 또는 장애 증상을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다.

[0148] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자와 비교하여 치료된 환자에서의 AMD의 증상을 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 증상은 흐린 시력, 시력 감소, 부분 시력 상실 및/또는 약광에서 볼 수 없음이다. 몇몇 실시형태에서, AMD 증상은 1일 내지 10년에 치료된 환자에서 측정된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 AMD 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 AMD 증상을 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 AMD 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 AMD 증상을 감소시킨다.

[0149] 몇몇 실시형태에서, AMD 증상은 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 AMD 증상과 비교하여 약 1%,

약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 AMD 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 20주, 약 30주, 약 40주, 약 50주, 약 60주, 약 70주, 약 80주, 약 90주, 약 100주, 약 1년, 약 2년 또는 약 3년에 AMD 증상을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 돌연변이체 CoChop 조성물의 투여는 비치료된 환자 또는 치료 전의 동일한 환자에서의 AMD 증상과 비교하여 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 5년 또는 약 10년 또는 이것 초과 동안 AMD 증상을 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소시킨다.

[0150] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "대상체" 또는 "개체" 또는 "환자"는 질병 또는 장애를 갖거나, 질병 또는 장애 등을 갖는 것으로 의심되는 개체를 언급한다. 대상체, 개체 또는 환자는 본 개시내용에서 상호 교환되어 사용될 수 있고, 포유류 및 비포유류를 포함한다. 포유류의 예는 포유류 유형의 임의의 구성원: 인간, 비인간 영장류, 예컨대 침팬지, 및 다른 유인원 및 원숭이 중; 농장 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 가축 동물, 예컨대 토끼, 개 및 고양이; 실험실 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 및 기니아 피그 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 비포유류의 예는 조류, 어류 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물의 몇몇 양태에서, 포유류는 인간이다.

[0151] 치료의 효율은 예를 들어 각각의 눈의 최고의 보정 시력을 평가함으로써 확립될 것이다. 시력 시험은 전자 시력(Electronic visual acuity: EVA) ETDRS(당뇨병성 망막병증 연구에 대한 초기 치료) 방법론, 또는 손 이동 및 광 인지의 저시력 평가를 이용하여 수행된다.

[0152] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "시력"은 구별 또는 행동에 대한 자극으로서 광을 유용하게 검출하는 유기체의 능력으로서 정의된다. 시력은 하기를 포함하도록 의도된다:

[0153] 1. 광 검출 또는 인지 - 광이 존재하는지 또는 아닌지를 분간하는 능력;

[0154] 2. 광 보호 - 광 자극이 오는 방향을 분간하는 능력;

[0155] 3. 해상 - 그레이팅 또는 철자 표적에서 다른 밝기 수준(즉, 대비)을 검출하는 능력; 및

[0156] 4. 인식 - 표적 내에 다른 대비를 참조하여 시각 표적의 형상을 인식하는 능력.

[0157] 따라서, "시력"은 광의 존재를 단순히 검출하는 능력을 포함한다. 본 발명의 돌연변이체 CoChop을 코딩하는 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 시력을 개선하거나 복원하도록 사용될 수 있고, 여기서 시력의 개선 또는 복원은 예를 들어 광 검출 또는 인지의 증가, 광 자극에 반응한 광 민감도 또는 광민감도의 증가, 광 자극이 오는 방향을 분간하는 능력의 증가, 다른 밝기 수준을 검출하는 능력의 증가, 시각 표적의 형상을 인식하는 능력의 증가 및 망막으로부터 피질로의 시각 유발된 전위 또는 투과의 증가를 포함한다. 그러므로, 시력의 개선 또는 복원은 시력의 완전 복원을 포함하거나 포함하지 않을 수 있고, 즉 여기서 본 발명에 의해 치료되는 환자의 시력은 이환되지 않은 개체의 시력의 정도로 복원된다. 하기 기재된 동물 연구에 기재된 시력 복원은, 인간 조건에서, 완전 시력의 복원 없이, 시력의 하나의 양태(즉, 광 민감도, 또는 시각 유발된 전위)를 증가시킴으로써 시각 기능의 낮은 중점에 사람을 배치할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 수준에서의 배치는 이 개체가 완전 실명과 비교하여 시각 독립성의 매우 개시된 수준을 이들에게 제공하는 잠재적으로 낮은 차수 해상 업무에서 및 이동도에서 훈련되므로 상당한 이익일 것이다. 특정한 매일의 업무를 달성하고, 일반 이동도, 역량 및 삶의 질을 개선하기 위해 본 조성물 및 방법을 이용하여 시력이 개선된, 시각적으로 손상된 개체에 의해 심지어 기본적인 광 인자가 사용될 수 있다.

[0158] 시력의 복원의 정도는 예를 들어 CoChop을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 투여하기 전에 및 바람직하게는 후에 시력의 측정을 통해 결정될 수 있다. 시력은 당해 분야에 널리 공지된 임의의 다수의 방법 또는 아직 확립되지 않은 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 본 발명에 의해 개선되거나 복원된 바와 같은 시력은 임의의 하기 시각 반응에 의해 측정될 수 있다:

[0159] 1. 광 자극에 대한 노출 후 대상체에 의한 광 검출 반응, 여기서 광이 켜질 때 대상체 개체에 의한 광의 일반 방향에서의 표시 또는 이동의 신뢰할 만한 반응에 대한 증거가 추구됨;

- [0160] 2. 광 자극에 대한 노출 후 대상체에 의한 광 보호 반응, 여기서 광이 켜질 때 개체에 의한 광의 특정한 방향에서의 표시 또는 이동의 신뢰할 만한 반응에 대한 증거가 추구됨;
- [0161] 3. 하기에 의해 입증된 바대로, 밝은 대 어두운 패턴화된 시각 자극을 해상하는 대상체의 역량을 측정하는 밝은 대 어두운 패턴화된 시각 자극의 대상체에 의한 광 해상:
- [0162] a. 입증 가능한 신뢰할 만한 광동적으로 생성된 안전양 눈 이동 및/또는 표적의 트래킹을 나타내는 관련된 머리 또는 몸 이동의 존재(상기 참조), 및/또는
- [0163] b. 패턴 시각 자극을 분간하도록, 그리고 예를 들어, 가리키기 또는 간체 또는 버튼의 누름을 포함하는, 구두 또는 비구두 수단에 의한 이러한 분간을 나타내도록 신뢰 가능한 능력의 존재; 또는
- [0164] 4. 시각 유발된 전위(VEP)라 또한 칭해지는, 복원된 망막으로부터 시각 피질의 전기 투과의 종점인, 광 플래시 자극 또는 패턴 시각 자극에 대한 시각 피질 반응의 전기 기록. 측정은 시각 피질의 영역에서 두피 표면에서, 피질 표면에서 전기 기록, 및/또는 시각 피질의 세포 내의 기록에 의할 수 있다.
- [0165] 따라서, 본 발명에 따른 시력의 개선 또는 복원은 망막 세포에서의 광 자극에 반응하여 광전류 또는 전기 반응의 진폭 또는 동역학의 증가, 망막 세포의 광 민감도의 증가(즉, 광 자극에 반응하여 광전류 또는 전기 반응을 개시시키는 데 필요한 임계치 광도를 낮춤으로써, 광전류를 유발하기에 적거나 더 낮은 광을 요함), 광 유발된 스파이킹 또는 스파이크 점화의 수 또는 진폭의 증가, 망막 또는 망막 세포로부터 시각 피질 또는 뇌로 전파된 시각 유발된 전위의 증가를 포함하는 시각 피질에 대한 광 반응의 증가를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0166] 실명 인간 눈 질환의 인식된 동물 모델을 포함하여, 본 발명의 다양한 매개변수를 평가하기 위한 시험관내 및 생체내 연구 둘 다를 사용할 수 있다. 인간 망막병증, 예를 들어 어린이 실명의 큰 동물 모델이 유용하다. 본 명세서에 제공된 예는 당해 분야의 당업자가 이 방법이 일련의 망막 질병을 치료하는 데 유사하게 사용될 수 있다는 것을 용이하게 기대하게 허용한다.
- [0167] 다른 사람들에 의한 이전의 연구가 망막 퇴행이 유전자 치료 기법에 의해 지연될 수 있다는 것을 입증하지만, 본 발명은 행동 매개변수를 포함하는, 시력의 다양한 매개변수를 생성하거나 개선하는 것으로 예상된, 기능의 분명한 생리학적 회복을 입증한다.
- [0168] 행동 조치는 공지된 동물 모델 및 시험, 예를 들어 수중 미로에서의 성과를 이용하여 얻어질 수 있고, 여기서 시력이 보존되거나 다양한 정도로 복원된 대상체는 광을 향해 헤엄칠 수 있다(Hayes, JM *et al.*, 1993, *Behav Genet* 23:395-403).
- [0169] 실명이 성인 삶 동안 유도되거나, 선천성 실명이 시력을 상실하기 전에 개체가 시력을 경험하기에 충분히 천천히 진행되는 모델에서, 다양한 시험에서의 대상체의 훈련이 수행될 수 있다. 이러한 방식으로, 이 시험이 시력 복원 효과에 대한 본 조성물 및 방법의 효율을 시험하기 위해 시력 상실 후 재투여될 때, 동물은 실명 상태에 있으면서 처음부터 업무를 학습하지 않아야 한다. 다른 행동 시험은 학습을 요하지 않고, 소정의 행동의 본능에 의존한다. 예는 광동적 안전양 시험이다(Balkema GW *et al.*, 1984, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 25:795-800; Mitchiner JC *et al.*, 1976, *Vision Res*. 16:1169-71).
- [0170] 본 발명은 시력을 개선하거나 복원하는 것으로 당해 분야에 공지된 시력 치료의 다른 형태와 조합되어 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 망막 임플란트, 피질 임플란트, 외측 슬상핵 임플란트 또는 시신경 임플란트를 포함하는 시각 인공삽입물의 사용. 따라서, 본 방법을 이용한 생존한 망막 뉴런의 유전적 변형 이외에, 치료되는 대상체는 분자 방법이 사용되기 전에, 이와 동시에, 또는 후에 시각 인공삽입물이 제공될 수 있다. 시각 인공삽입의 유효성은 개체의 훈련에 의해 개선될 수 있어서, 본 명세서에 고려되는 바대로 환자 세포의 CoChop 형질전환의 잠재적인 영향을 증대시킨다. 훈련 방법, 예컨대 (i) 다양한 수준의 광 및/또는 패턴 자극, 및/또는 (ii) 당업자에 의해 이해되는 것처럼 일반 광원 또는 물체로부터의 환경 자극을 인식하도록 대상체를 훈련함으로써 특징지어지는 습관화 훈련; 및 훈련 없는 것보다 더 효과적으로 시각적으로 국소인 물체를 검출하고 상기 물체 중에서 이동하도록 대상체를 훈련함으로써 특징지어지는 배향 및 이동도 훈련. 사실, 저시력 재활치료의 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 시각 자극 기법이 여기서 적용 가능하다.
- [0171] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 돌연변이체 CoChop 단백질 및 표적화된 유전자 발현 이외에 상이한 오피신 유전자의 사용은 추가로 광 민감도를 증가시키거나 시력을 개선할 수 있다. 시각 정보는 2개의 경로를 통해 망막을 거쳐 처리된다: 광 커짐을 신호전달하는 ON 경로 및 광 꺼짐을 신호전달하는 OFF 경로. ON 및 OFF 경로의 존재는

대비 민감도의 증대에 중요하다. ON 경로에서의 시각 신호는 ON-추체 양극성 세포로부터 ON 결절중 세포로 의존한다. ON-추체 양극성 세포 및 ON-결절중 세포 둘 다는 광에 반응하여 탈극성화된다. 다른 한편, OFF 경로에서의 시각 신호는 OFF-추체 양극성 세포로부터 OFF 결절중 세포로 운반된다. OFF-추체 양극성 세포 및 OFF-결절중 세포 둘 다는 광에 반응하여 저극성화된다. 약광에서 보는 능력(암순응 시력)을 담당하는 간체 양극성 세포는 ON 양극성 세포(광에 반응하여 탈극성화)이다. 간체 양극성 세포는 AII 아마크린 세포(ON 타입 망막 세포)를 통해 ON OFF 추체 양극성 세포로 시력 신호에 기초한다.

[0172] 따라서, 이중 로돕신 시스템은 시각 처리 및 시력에 일체인 ON 및 OFF 경로를 요약하도록 사용될 수 있다. 간단히, 본 발명의 CoChop 단백질은 ON 타입 망막 뉴런(즉, ON 타입 결절중 세포 및/또는 ON 타입 양극성 세포)에 특이적으로 표적화될 수 있는 한편, 저극성화 광 센서(즉, 할로로돕신 또는 당해 분야에 공지된 다른 클로라이드 펌프)는 ON 및 OFF 경로를 생성하도록 OFF 타입 망막 뉴런(즉, OFF 타입 결절중 세포 및/또는 OFF 타입 양극성 세포)에 표적화될 수 있다. 바람직한 세포 하위집단에 대한 특정한 표적화는 상이한 세포 유형 특이적 촉진자의 사용을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, CoChop 발현은 ON 타입 망막 뉴런(즉, ON 타입 결절중 세포 및/또는 ON 타입 양극성 세포)에서 표적화된 발현에 대해 mGluR6 촉진자에 의해 추진될 수 있는 한편, 저극성화 채널, 예컨대 할로로돕신, 발현은 OFF 타입 망막 뉴런(즉, OFF 타입 결절중 세포 및/또는 OFF 타입 양극성 세포)에서 표적화된 발현에 대해 NK-3 촉진자에 의해 추진될 수 있다.

[0173] 망막에서 ON 및 OFF 경로를 복원하기 위한 대안적인 접근법은 간체 양극성 세포 또는 AII 아마크린에 탈극성화 광 센서를 발현시킴으로써 달성된다. 이 접근법에서, 간체 양극성 세포 또는 AII 아마크린 세포의 탈극성화는 추체 양극성 세포의 수준에서 및 망막 결절중 세포의 하류에서 ON 및 OFF 반응을 발생시킬 수 있다. 따라서, 망막에서 고유한 ON 및 OFF 경로가 유지될 수 있다.

[0174] 전달 방법

[0175] 몇몇 양태에서, 약제학적 조성물은 특정한 질병 또는 장애를 치료하거나 예방하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 눈 장애를 치료할 때, 약제학적 조성물은 임의의 방향 방법을 이용하여 유리체내 부위에 투여된다. 몇몇 경우에, 전달 방법은 주입, 예컨대 미국 특허 공보 제 2010008170호(전문이 참고로 포함됨)에 기재된 것에 의할 수 있다. 몇몇 경우에, 유리체에 대한 직접 투여는 시린지를 통한 액체 약제학적 조성물의 주사를 포함한다. 또 다른 예에서, 직접 투여는 벡터 또는 재조합 바이러스에 대한 전달에 대한 캐놀라 또는 다른 적합한 기체를 통한 주사를 수반할 수 있다. 다른 예에서, 직접 투여는 전이유전자, 예컨대 mCoChop의 전달을 위한 적합한 벡터를 추가로 포함하는 임플란트를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 임플란트는 망막에서 또는 근처에서 직접적으로 이식될 수 있다.

[0176] 일반적으로, 벡터는 눈내(유리체내) 주사된 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 구체적으로, 벡터는 편평부(pars plana)를 통해 경공막으로 주사된다.

[0177] 정의

[0178] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 본 개시내용의 조성물 및 방법은, 달리 표시되지 않는 한, 당해 분야의 당업자의 지식 내에 있는, 분자 생물학(재조합 기법 포함), 세포 생물학, 생화학, 면역화학 및 안과용 기법의 종래의 기법 및 설명을 이용할 수 있다. 이러한 종래의 기법은 대상체에서의 망막 또는 시력의 관찰 및 분석, 재조합 바이러스의 클로닝 및 전파, 약제학적 조성물의 조제를 위한 방법, 및 생화학 정제 및 면역화학을 포함한다. 적합한 기법의 특정한 예시는 본 명세서에서 예에 참조될 수 있다. 그러나, 동등한 종래의 절차는 물론 또한 사용될 수 있다. 이러한 종래의 기법 및 설명은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Green, et al., Eds., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV) (1999); Weiner, et al., Eds., Genetic Variation: A Laboratory Manual (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., PCR Primer: A Laboratory Manual (2003); Bowtell and Sambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual (2003); Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2004); Sambrook and Russell, Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2006); 및 Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (모두 Cold Spring Harbor Laboratory Press로부터); Stryer, L., Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); Nelson and Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000); 및 Berg et al., Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002)](이들 모두 모든 목적을 위해 본 명세서에 전문이 참고로 포함됨)에서 발견될 수 있다.

- [0179] 본 명세서에 사용된 바대로, 단수 형태 "일", "하나" 및 "이"는, 문맥이 명확히 달리 표시하지 않는 한, 복수 형태를 포함하도록 의도된다. 더욱이, 용어 "포함하는", "포함한다", "갖는", "갖는다", "가지는", 또는 이의 변형어가 상세한 설명 및/또는 청구항에 사용되는 정도로, 이러한 용어는 용어 "포함하는"과 유사한 방식으로 포함인 것으로 의도된다.
- [0180] 범위가 "약" 하나의 특정한 값으로부터, 및/또는 "약" 또 다른 특정한 값으로 본 명세서에서 표시될 수 있다. 이러한 범위가 표시될 때, 또 다른 경우는 하나의 특정한 값으로부터 및/또는 다른 특정한 값으로 포함한다. 유사하게, 값이 선행사 "약"의 사용에 의해 근사치로서 표시될 때, 특정한 값이 또 다른 경우를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 각각의 범위의 종점이 다른 종점과 관련하여 그리고 다른 종점과 독립적으로 둘 다에서 중요한 것으로 추가로 이해될 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "약"은 특정한 용법의 맥락 내에 기재된 숫자 값으로부터 15% 플러스 또는 마이너스인 범위를 의미한다. 예를 들어, 약 10은 8.5 내지 11.5의 범위를 포함할 것이다. 용어 "약"은 또한 값의 측정에서의 통상적인 오차 또는 부정확성을 설명한다.
- [0181] 용어 "망막 퇴행성 질병"은 광수용체 퇴행과 연관된 모든 질병을 포함한다. 망막 퇴행성 질병은 망막세포 변성증, 연령 관련 황반변성, 바르데트-비델 증후군(Bardet-Biedel syndrome), 베슨-코른와이그 증후군(Bassen-Kornzweig syndrome), 베체트병, 맥락막결손, 망막 위축, 레베르 선천성 흑내장(Leber congenital amaurosis), 레프선 증후군(Refsun syndrome), 스타르가르트병 또는 우셔 증후군(Usher syndrome)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0182] 본 발명의 맥락에서, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 이러한 용어가 적용되는 장애 또는 질환, 또는 이러한 장애 또는 질환(예를 들어, 망막 퇴행성 질병)의 하나 이상의 증상의 진행의 역전, 경감, 저해, 또는 이의 예방을 의미한다.
- [0183] 본 발명에 따르면, 용어 "환자" 또는 "이를 요하는 환자"는 망막 퇴행성 질병에 의해 이환되거나 또는 이환될 것 같은 인간 또는 비인간 포유류에 대해 의도된다.
- [0184] 본 명세서에 의도된 바대로, 표현 "단리된 핵산"은 단리된 핵산의 임의의 유형을 의미하고, 이것은 특히 천연 또는 합성, DNA 또는 RNA, 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 특히, 핵산이 합성인 경우, 이것은 특히 핵산의 분해에 대한 저항을 증가시키기 위한 염기 또는 결합의 비천연 변형을 포함할 수 있다. 핵산이 RNA인 경우, 변형은 특히, 예를 들어 (2'-데옥시리보스 또는 2'-데옥시리보스-2'-플루오로리보스를 생성시키도록) 하이드록실 모이어티를 억제함으로써, 또는 (2'-O-메틸-리보스를 생성시키도록) 알킬기, 예컨대 메틸기에 의해 하이드록실 모이어티를 치환함으로써, 하이드록실 모이어티의 반응성을 감소시키도록, 리보스 골격의 2' 위치를 변형시키는 것 또는 이의 말단을 캡핑하는 것을 포함한다.
- [0185] 용어 "채널로돕신"은 광 게이팅된 이온 채널로서 작용하는 레티닐리덴 단백질(로돕신)의 하위패밀리를 의미한다. 몇몇은 단세포 녹조류에서 감각 광수용체로서 작용하여서, 광에 반응하여 주광성 이동을 제어한다. 다른 유기체의 세포에서 발견되어, 이것은 광이 전기 여기성, 세포내 산성, 칼슘 인플럭스 및 다른 세포 과정을 제어하게 한다. 이것은 7 막관통(7TM) 영역 및 긴 C-말단 연장에 의해 많은 다른 로돕신보다 크다. 조류에서, 이것은 광원을 향해 또는 이로부터 멀리 조류를 지시하기 위한 시각 단백질로서 그리고 광합성 성장에 최적인 광 조건을 발견하도록 작용한다. 7TM 영역은 광 추진된 펌프(박테리오토돕신, 아르케오토돕신 및 할로로돕신) 또는 센서로서 작용하는 다른 미생물(원핵생물) 로돕신에 약간의 상동성을 나타낸다. 상기 용어는 또한 채널로돕신에 상동성인 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0186] 2개의 아미노산 서열 또는 핵산 서열은, 아미노산 또는 핵산 서열의 80% 초과, 바람직하게는 85% 초과, 바람직하게는 90% 초과가 동일하거나, 약 90% 초과, 바람직하게는 95% 초과가 유사(기능상 동일)할 때, "실질적으로 상동성" 또는 "실질적으로 유사"하다. 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 동일성(%)을 결정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 겹은 제2 아미노 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에서 도입될 수 있다). 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드는 비교된다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 2개의 서열 사이의 동일성(%)은 서열이 공유한 동일한 위치의 수의 함수이다. 일 실시형태에서, 2개의 서열은 동일한 길이이다. 2개의 서열 사이의 동일성(%)의 결정은 수학 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 바람직하게는, 유사한 또는 상동성 서열은 예를 들어 GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7(위스콘신주 매디슨)) 파일업(pileup) 프로그램, 또는 임의의 서열 비교 알고리즘, 예컨대 BLAST, FASTA 등을

이용하여 정렬에 의해 확인된다.

[0187] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "벡터"는 이것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 벡터의 일 유형은 추가적인 DNA 분절이 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 벡터의 또 다른 유형은 추가적인 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 소정의 벡터(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터)는 이것이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다. 다른 벡터(예를 들어, 비에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포로의 도입 시 숙주 세포의 게놈으로 통합되고, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더구나, 소정의 벡터, 발현 벡터는 이것이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다.

[0188] **다른 실시형태**

[0189] 본 발명이 이의 상세한 설명과 연결되어 기재되어 있지만, 하기 설명은 첨부된 청구항의 범위에 의해 한정된 본 발명의 범위를 예시하고 제한하지 않도록 의도된다. 다른 양태, 이점 및 변형은 하기 청구항의 범위 내에 있다.

[0190] 본 명세서에 언급된 특허 및 과학 문헌은 당해 분야의 당업자에게 이용 가능한 지식을 확립한다. 본 명세서에 인용된 모든 미국 특허 및 공개 또는 비공개 미국 특허 출원은 그 전문이 참고로 포함된다. 본 명세서에 인용된 모든 공개 외래 특허 및 특허 출원은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다. 본 명세서에 인용된 모든 다른 공개 참고문헌, 문헌, 필사본 및 과학 문헌은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0191] 본 발명이 이의 바람직한 실시형태를 참고하여 특히 도시되고 기재되어 있지만, 당업자에 의해 첨부된 청구항에 의해 포함된 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0192] 본 개시내용은 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 예시된다.

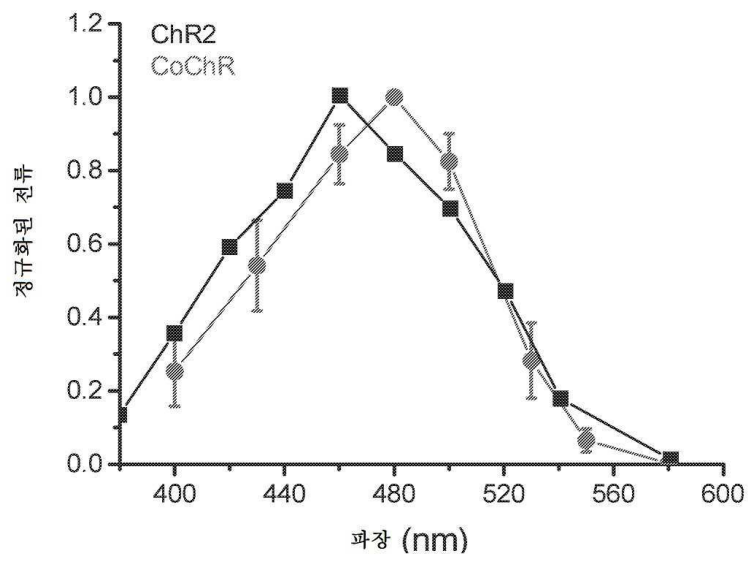
[0193] **실시예**

[0194] **실시예 1- 돌연변이체 CoChop 폴리펩타이드의 생성 및 분석**

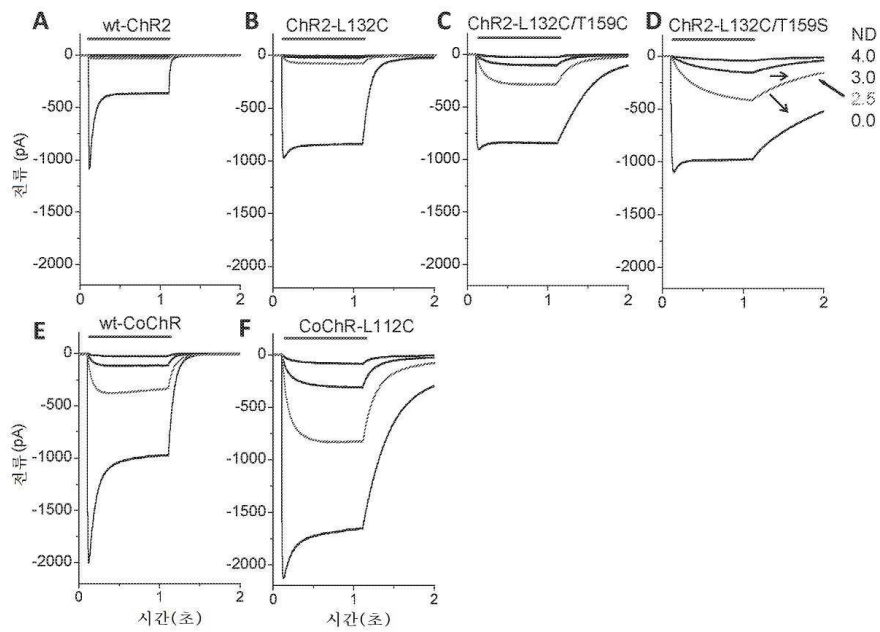
[0195] 채널로돕신(ChR), 예컨대 ChR2는 시력 복원을 위한 유망한 광유전적 광 센서이다. 시력 복원에서 ChR2를 사용하기 위한 주요 장애는 이의 낮은 광 민감도이다. 본 발명자들은 이전에 ChR2-L132C/T159S인 가장 광 민감성 ChR2 돌연변이체를 포함하는 부위 지정 돌연변이유발을 통해 이의 동역학을 최적화함으로써 더 광 민감성 ChR2를 만들었다. 최근에, 다수의 ChR 변이체는 조류의 신생 전사체 서열분석에 의해 보고되었다(Klapoetke et al., 2014 *Nat. Methods* 11(3): 338-46). 본 발명자들은 CoChR인 변이체 중 하나가 큰 광전류를 나타낸다는 것을 발견하였다. 본 발명에서, 본 발명자들은 부위 지정 돌연변이유발을 통해 몇몇의 고도로 광 민감한 CoChR 돌연변이체(즉, 돌연변이체 CoChop)를 만들었다. 이 돌연변이체는 CoChR-L112C(서열 번호 3), CoChR-T139C(서열 번호 5), C68S/V69I(서열 번호 4), C68T/V69I(서열 번호 7), CoChR-T145A/S146A(서열 번호 6), CoChR-L112C/T139C(서열 번호 8), CoChR-L112C/H94E(서열 번호 9) 및 CoChR-L112C/H94E/K264T(서열 번호 10)를 포함한다. CoChR 및 이의 돌연변이체는 480nm에서 피크 스펙트럼을 갖는 ChR2보다 약간의 적색 이동된 스펙트럼 곡선을 나타낸다(도 1). (CoChR-L112C에 대해 도시된 바와 같은) CoChR 돌연변이체의 광 민감도는, HEK 세포에서의 전기생리학 기록(도 2 내지 도 5) 및 망막 뉴런으로부터의 다중 전극 어레이 기록(도 6) 및 생체내 실험 마우스로부터의 시선운동 행동 시험(도 7)에 기초하여, ChR2-L132C/T159S인 가장 광 민감한 ChR2 돌연변이체보다 훨씬 더 높다. 더욱이, 시선운동 반응 분위기 광 조건 하에(도 8) CoChR-L112C 발현 마우스에 대해 관찰될 수 있다. 또한, CoChR-L112C 돌연변이체의 장기간 안정한 발현은 망막 뉴런에서 관찰되었다(도 9).

도면

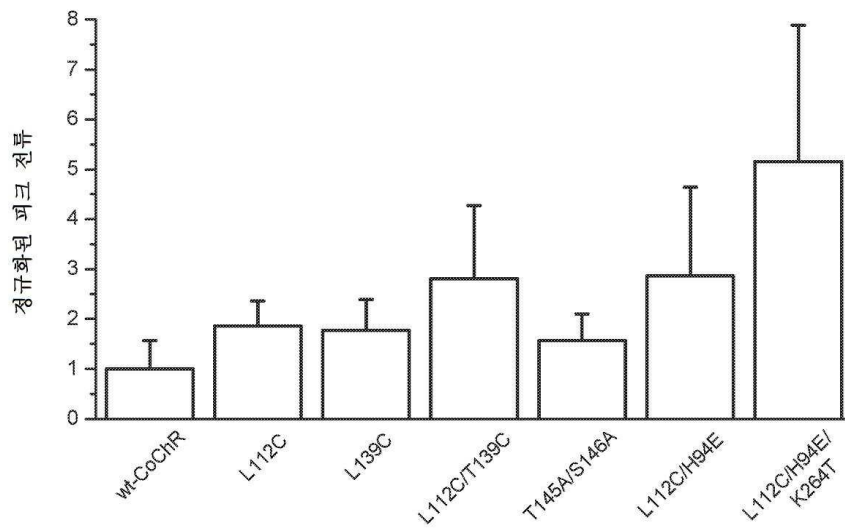
도면1



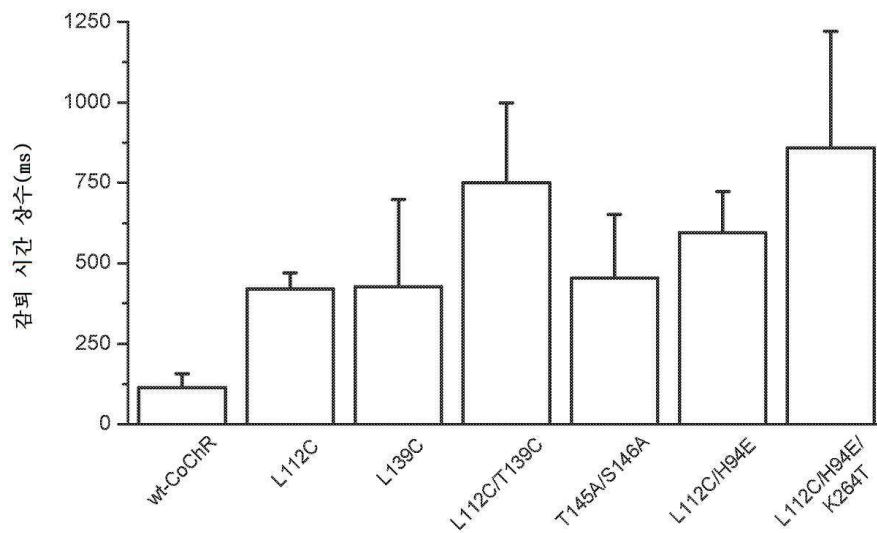
도면2



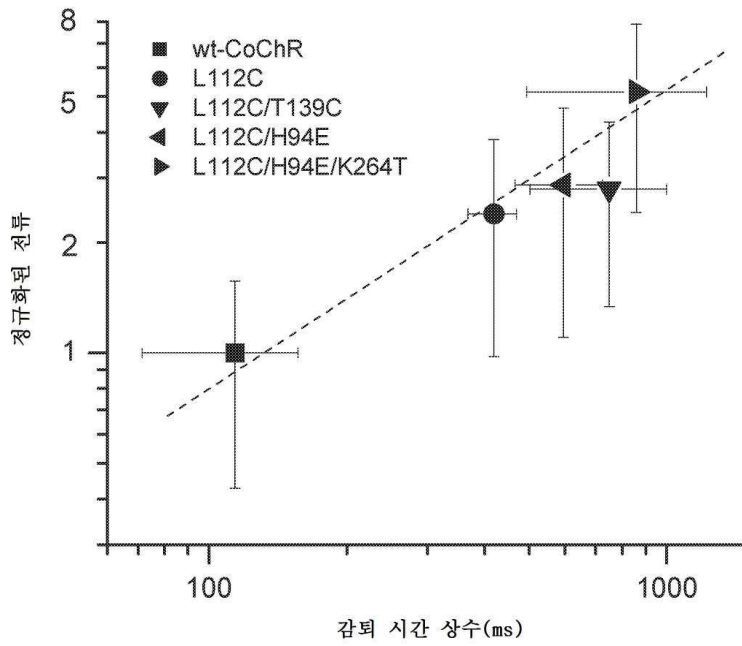
도면3



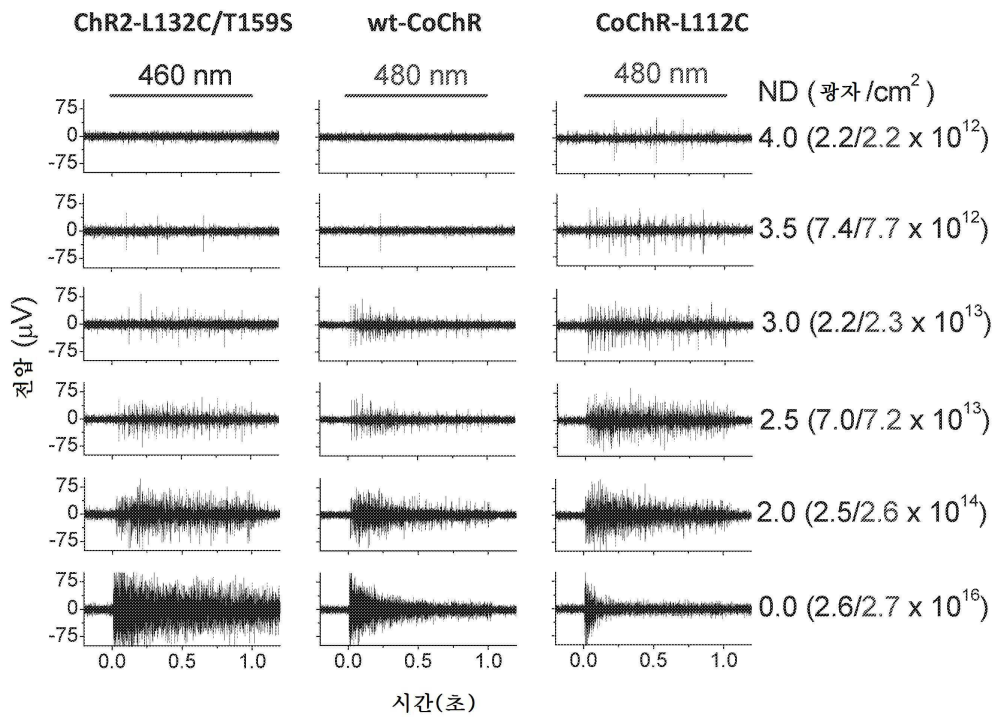
도면4



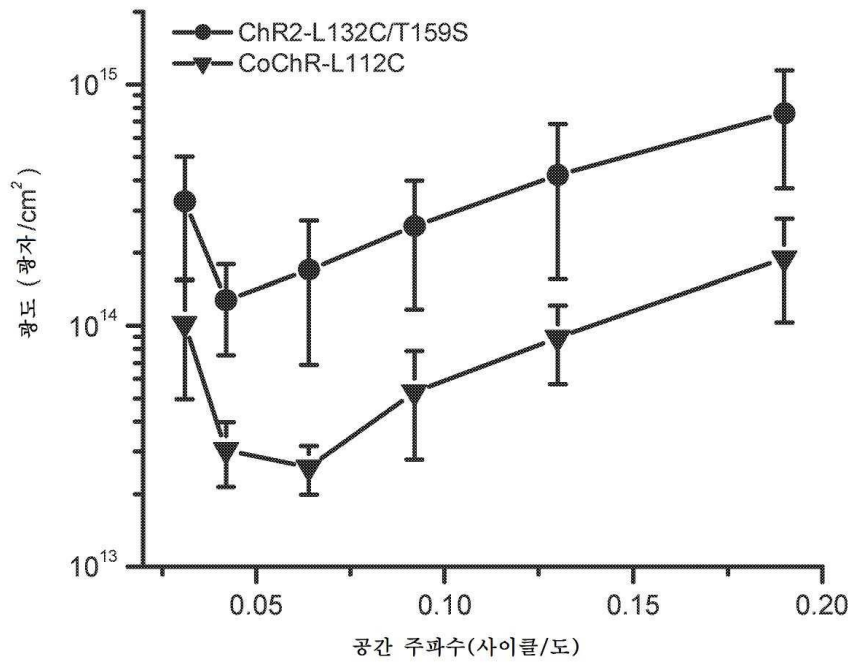
도면5



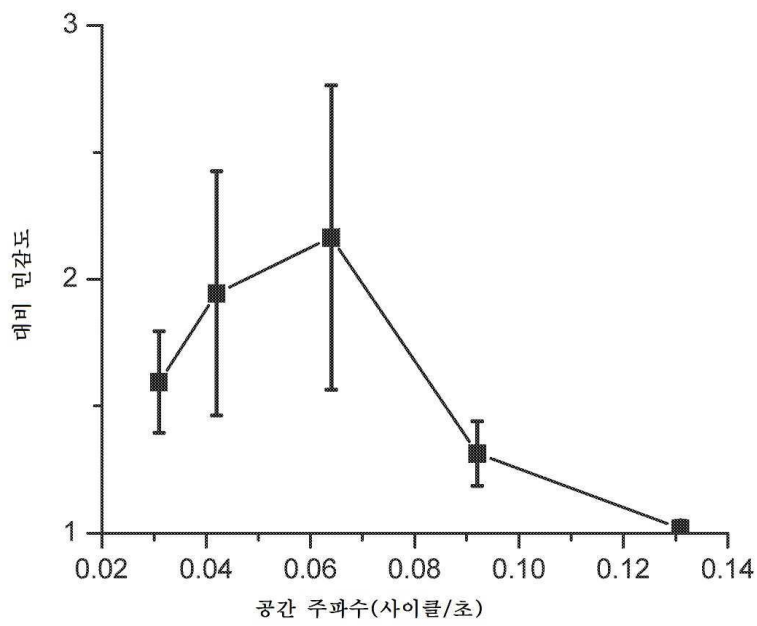
도면6



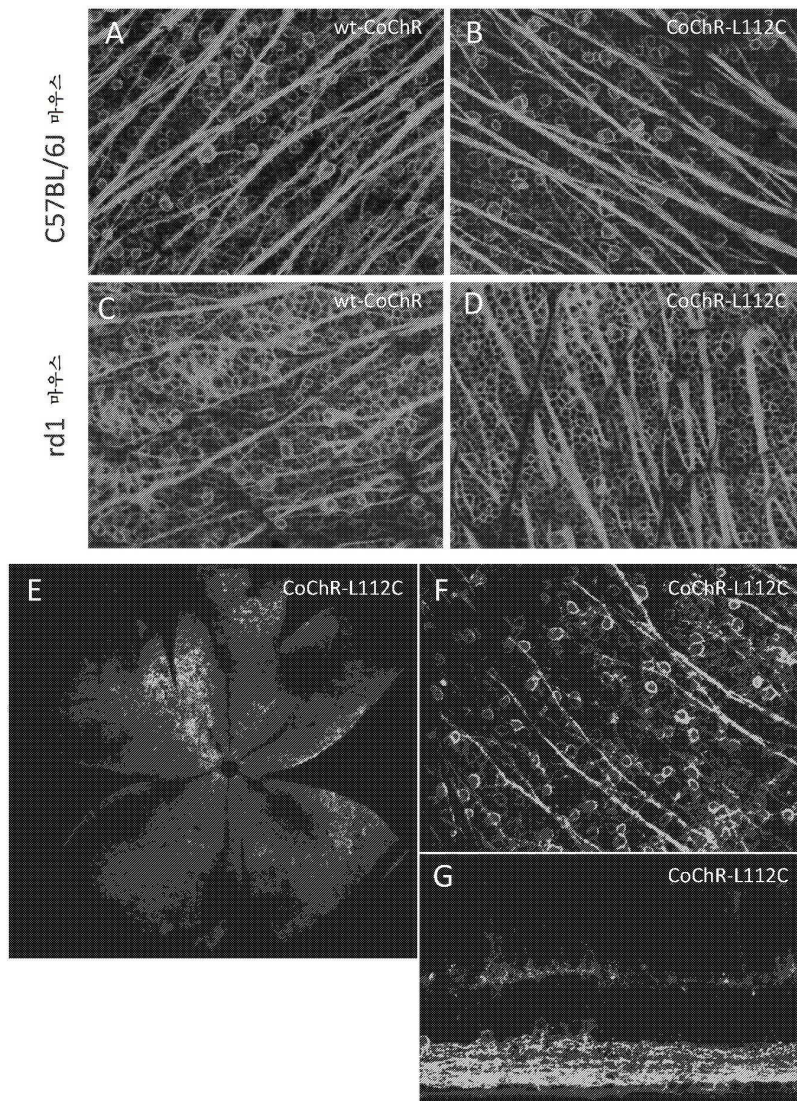
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> RetroSense Therapeutics

<120> IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN CHANNELOPSIN VARIANTS HAVING
IMPROVED LIGHT SENSITIVITY AND METHODS OF USE THEREOF

<130> RTRO-707/001WO

<150> US 62/380,871

<151> 2016-08-29

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 864

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 1

atgctgggaa acggcagcgc cattgtgcct atcgaccagt gcttttgctt ggcttggacc	60
gacagcctgg gaagcgatac agagcagctg gtggccaaca tccctcagtg gttcgcttc	120
ggcttcagca tctgatcct gatgttctac gcctaccaga cttggagagc cacttcgggt	180
tgggaggagg tctacgtctg ttgcgtcgag ctgaccaagg tcatcatcga gttcttcac	240
gagttcgacg accccagcat gctgtacctg gctaaccggac accgagtcca gtggctgaga	300
tacgcagagt ggctgtgac ttgtcccgct atcctgatcc acctgagcaa cctgacaggc	360
ctgaaggacg actacagcaa gcggaccatg aggctgctgg tgtcagacgt gggaaccatc	420
gtgtggggag ctacaagcgc catgagcaca ggctacgtca aggtcatctt cttcgtgctg	480
ggttgcatct acggcgccaa caccttcttc cagccgcca aggtgtatat cgagagctac	540
cacgtggtgc caaagggcag acctagaacc gtcgtgcgga tcatggcttg gctgttcttc	600
ctgtcttggg gcatgttccc cgtgctgttc gtcgtgggac cagaaggatt cgacgccatc	660
agcgtgtacg gctctacat tggccacacc atcatcgacc tcatgagcaa gaattgttg	720
ggcctgctgg gacactatct gagagtgtg atccaccagc acatcatcat ctacggcgac	780
atccgaaga agaccaagat caacgtggcc ggcgaggaga tggaagtgga gaccatggtg	840
gaccaggagg acgaggagac agtg	864

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 2

Met	Leu	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Ile	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Phe	Cys
1				5					10					15	
Leu	Ala	Trp	Thr	Asp	Ser	Leu	Gly	Ser	Asp	Thr	Glu	Gln	Leu	Val	Ala
				20					25					30	
Asn	Ile	Leu	Gln	Trp	Phe	Ala	Phe	Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Ile	Leu	Met
				35					40					45	

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val
50 55 60

Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His
65 70 75 80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val
85 90 95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu
100 105 110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg
115 120 125

Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala
130 135 140

Thr Ser Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu
145 150 155 160

Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr
165 170 175

Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val
180 185 190

Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val
195 200 205

Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly
210 215 220

Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp
225 230 235 240

Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile
245 250 255

Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu
260 265 270

Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
275 280 285

<210> 3

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic sequence

<400> 3

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys

1 5 10 15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala

20 25 30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35 40 45

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val

50 55 60

Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His

65 70 75 80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val

85 90 95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Cys

100 105 110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg

115 120 125

Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala

130 135 140

Thr Ser Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu

145 150 155 160

Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr

165 170 175

Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val

180 185 190

Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val

195 200 205

Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly

210

215

220

Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp

225

230

235

240

Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile

245

250

255

Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu

260

265

270

Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val

275

280

285

<210> 4

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 4

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys

1

5

10

15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala

20

25

30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35

40

45

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val

50

55

60

Tyr Val Cys Ser Ile Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His

65

70

75

80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val

85

90

95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu

100

105

110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg

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

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

Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile
 245 250 255
 Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu
 260 265 270
 Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
 275 280 285

<210> 5

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 5

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys

1 5 10 15
 Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala
 20 25 30
 Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35 40 45
 Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val
 50 55 60
 Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His

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

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

 195 200 205
 Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly
 210 215 220
 Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile
 245 250 255
 Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu

 260 265 270
 Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
 275 280 285

<210> 6

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 6

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys

1 5 10 15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala

20 25 30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35 40 45

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val

50 55 60

Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His

65 70 75 80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val

85 90 95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu

100 105 110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg

115 120 125

Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala

130 135 140

Ala Ala Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu

145 150 155 160

Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr

165 170 175

Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val

180 185 190

Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val

195 200 205

Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly
210 215 220

Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp
225 230 235 240

Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile
245 250 255

Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu
260 265 270

Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
275 280 285

<210> 7

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 7

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys
1 5 10 15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala
20 25 30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met
35 40 45

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val

50 55 60

Tyr Val Cys Thr Leu Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His
65 70 75 80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val
85 90 95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu
100 105 110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg

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

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

245 250 255
Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu
260 265 270
Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
275 280 285

<210> 8

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 8

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys
1 5 10 15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala
20 25 30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35	40	45
Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val		
50	55	60
Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His		
65	70	75
		80
Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly His Arg Val		
85	90	95
Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Cys		
100	105	110
Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg		
115	120	125
Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala		
130	135	140
Thr Ser Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu		
145	150	155
Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr		
165	170	175
Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val		
180	185	190
Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val		
195	200	205
Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly		
210	215	220
Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp		
225	230	235
Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile		
245	250	255
Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu		
260	265	270
Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val		
275	280	285

<210> 9

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 9

Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys

1 5 10 15

Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala

20 25 30

Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met

35 40 45

Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val

50 55 60

Tyr Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Ile Ile Glu Phe Phe His

65 70 75 80

Glu Phe Asp Asp Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly Glu Arg Val

85 90 95

Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Cys

100 105 110

Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg

115 120 125

Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala

130 135 140

Thr Ser Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu

145 150 155 160

Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr

165 170 175

Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val

180 185 190

Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val

195 200 205

Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly
 210 215 220
 Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp

 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile
 245 250 255
 Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu
 260 265 270
 Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val
 275 280 285
 <210> 10
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> synthetic sequence
 <400> 10
 Met Leu Gly Asn Gly Ser Ala Ile Val Pro Ile Asp Gln Cys Phe Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Trp Thr Asp Ser Leu Gly Ser Asp Thr Glu Gln Leu Val Ala
 20 25 30
 Asn Ile Leu Gln Trp Phe Ala Phe Gly Phe Ser Ile Leu Ile Leu Met
 35 40 45
 Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val
 50 55 60

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

115	120	125	
Thr Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala			
130	135	140	
Thr Ser Ala Met Ser Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile Phe Phe Val Leu			
145	150	155	160
Gly Cys Ile Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr			
165	170	175	
Ile Glu Ser Tyr His Val Val Pro Lys Gly Arg Pro Arg Thr Val Val			
180	185	190	
Arg Ile Met Ala Trp Leu Phe Phe Leu Ser Trp Gly Met Phe Pro Val			
195	200	205	
Leu Phe Val Val Gly Pro Glu Gly Phe Asp Ala Ile Ser Val Tyr Gly			
210	215	220	
Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser Lys Asn Cys Trp			
225	230	235	240
Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His Gln His Ile Ile			
245	250	255	
Ile Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Ile Asn Val Ala Gly Glu			
260	265	270	
Glu Met Glu Val Glu Thr Met Val Asp Gln Glu Asp Glu Glu Thr Val			
275	280	285	