



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월26일
(11) 등록번호 10-2825852
(24) 등록일자 2025년06월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7007137
- (22) 출원일자(국제) 2021년08월30일
심사청구일자 2024년08월27일
- (85) 번역문제출일자 2023년02월28일
- (65) 공개번호 10-2023-0061372
- (43) 공개일자 2023년05월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/048267
- (87) 국제공개번호 WO 2022/051232
국제공개일자 2022년03월10일
- (30) 우선권주장
63/073,843 2020년09월02일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02015160893 A1
W02020061574 A1

- (73) 특허권자
4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트
455, 5858 호턴 스트리트
- (72) 발명자
크린, 데이비드, H.
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트
455, 5858 호턴 스트리트 4디 몰레큘러 테라퓨틱스
아이엔씨.내
코터만, 멜리사 A.
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트
455, 5858 호턴 스트리트 4디 몰레큘러 테라퓨틱스
아이엔씨.내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
신관호

전체 청구항 수 : 총 33 항

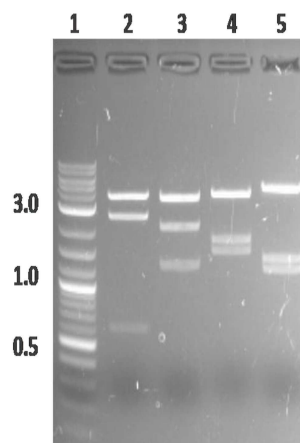
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 코돈 최적화된 RPGRORF15 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시 내용은 코돈 최적화된 RPGRorf15 서열, 벡터, 및 코돈 최적화된 RPGRorf15 서열을 포함하는 숙주 세포, 및 대상체에게 코돈 최적화된 RPGRorf15 서열을 투여하는 것을 포함하는 XLRP와 같은 망막 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2800/22 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)

(72) 발명자

샤피, 데이비드

미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455,
5858 호턴 스트리트 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이
엔씨.내

프랜시스, 피터

미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455,
5858 호턴 스트리트 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이
엔씨.내

명세서

청구범위

청구항 1

서열 식별 번호 2의 인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자(retinitis pigmentosa GTPase regulator)(RPGR) 단백질 및 인간에서의 발현에 최적화된 코돈을 인코딩하는 핵산으로서,

상기 핵산은 서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이와 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열은 적어도 0.89의 코돈 적응 지수(codon adaptation index)를 갖는, 핵산.

청구항 3

제 1항에 있어서,

서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 4

제 1항에 따른 핵산을 포함하는 발현 카세트로서, 뉴클레오타이드 서열이 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결되는, 발현 카세트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 발현 제어 서열은 구성적 프로모터(constitutive promoter)를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 발현 제어 서열은 간상체 및 추상체에서 핵산의 우선적 발현을 지시하는 프로모터를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 7

제 6항에 있어서,

5'로부터 3'에 (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 8

제 7항에 있어서,

5' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 6으로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 SV40 폴리아데닐화 서열은 서열 식별 번호 8로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 3' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 7로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 9

제 8항에 있어서,

서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이와 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된, 발현 카세트.

청구항 10

제 1항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 벡터는 재조합 아데노-관련(rAAV) 벡터인, 벡터.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 rAAV 벡터는 혈청형 2, 5 또는 8의 AAV 캡시드 또는 이의 변이체를 포함하는, 벡터.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 rAAV 벡터는 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 AAV2 캡시드 변이체를 포함하는, 벡터.

청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 rAAV 벡터는 5'로부터 3'에 (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열 및 (d) AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 15

제 14항에 있어서,

5' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 6으로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 SV40 폴리아데닐화 서열은 서열 식별 번호 8로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 3' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 7로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는, 벡터.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 rAAV 벡터는 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이와 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 rAAV 벡터는 (i) 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 18

제 1항에 따른 핵산을 포함하는 시험관 내(in vitro) 숙주 세포.

청구항 19

제 18항에 있어서,
상기 숙주 세포는 포유동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 20

제 19항에 있어서,
상기 숙주 세포는 CHO 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, HeLa 세포, BHK21 세포 또는 Vero 세포이며/이거나
상기 숙주 세포는 현탁액 또는 세포 스택 배양에서 성장되고/되거나 상기 숙주 세포는 광수용체 세포, 망막 신경절 세포, 아교 세포, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 또는 망막 색소 상피 세포인, 숙주 세포.

청구항 21

제 10항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서,
XLRP를 치료하는데 사용하기 위한, 벡터.

청구항 22

(i) AAV 캡시드 및 (ii) 5'로부터 3'에 (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 감염성 rAAV.

청구항 23

제 22항에 있어서,
5' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 6으로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 SV40 폴리아데닐화 서열은 서열 식별 번호 8로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 3' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 7로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 감염성 rAAV.

청구항 24

제 23항에 있어서,
rAAV는 (i) 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된 핵산을 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 감염성 rAAV.

청구항 25

제 22항에 있어서,
벡터가 안구주위, 유리체내, 맥락막위 또는 망막하 주사에 의해 대상체에게 투여되고/되거나 상기 벡터는 대상체에게 약 10^{10} 벡터 게놈(vector genome)(vg)/eye 내지 약 10^{13} vg/eye의 투여량으로 투여되는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 감염성 rAAV.

청구항 26

제 25항에 있어서,
상기 벡터는 rAAV 벡터이며 대상체에게 약 3×10^{11} vg/eye의 투여량 또는 약 1×10^{12} vg/eye의 투여량으로 투여되는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 감염성 rAAV.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 핵산, 제 4항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트, 또는 제 10항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 따른 벡터, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 34

(i) AAV 캡시드 및 (ii) 5'로부터 3'에 (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1로 표시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함하는 감염성 rAAV를 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 35

제 34항에 있어서,

5' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 6으로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 상기 SV40 폴리아데닐화 서열은 서열 식별 번호 8로 표시된 뉴클레오타이드 서열 및/또는 3' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 7로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 36

제 35항에 있어서,

rAAV는 (i) 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된 핵산을 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 37

제 34항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 10^9 벡터 게놈(vector genome)(vg)과 10^{14} vg 사이의 rAAV를 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 38

제 37항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 10^{10} 벡터 게놈(vector genome)(vg)과 10^{13} vg 사이의 rAAV을 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 39

제 37항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 약 3×10^{11} 벡터 게놈(vector genome)(vg) 또는 약 1×10^{12} vg의 rAAV을 포함하는, XLRP를 치료하는데 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 9월 2일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/073,843의 우선권을 주장하며, 그 전체 개시 내용은 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0003] **EFS-WEB을 통한 서열 목록 제출**

[0004] 2021년 8월 11일경에 생성된 "090400-5012-W0-Sequence-Listing"이라는 제목의 컴퓨터 판독 가능 텍스트 파일은 약 37KB의 파일 크기로 이 출원에 대한 서열 목록을 포함하며 이로써 전부 참고로 포함된다.

배경 기술

[0005] **본 발명의 배경**

[0006] X-연관 색소성 망막염(X-linked retinitis pigmentosa)(XLRP)은 상대적으로 심각하고 유전적으로 이질적인 유전성 망막 변성이다. XLRP 사례의 약 70%는 색소성 망막염 GTPase 조절인자(Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator)(RPGR) 유전자의 돌연변이로 인해 발생한다. RPGR 유전자는 광범위하게 발현되는 몇 가지 별개의 대안적으로-접합된(spliced) 전사체를 인코딩한다. 인코딩된 단백질의 기능은 잘 알려져 있지 않지만 연구 결과 섬모(cilia)라고 하는 세포 구조에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0007] 하나의 RPGR 이소형은 567개 아미노산의 Gly- 및 Glu-풍부(rich) 카르복실 말단 도메인인 ORF15라고 하는 독특한 3' 영역을 함유한다. RPGR 유전자의 엑손(exon) 1-13과 ORF15 영역을 포함하는 RPGR 단백질의 이 버전은 주로 망막의 광수용체에서 발현된다. RPGR의 ORF15 영역의 돌연변이는 모든 XLRP 사례의 약 60%를 차지한다.

[0008] 몇몇 전임상 연구는 XLRP 질병 표현형을 구제하기 위해 RPGRorf15의 야생형 cDNA의 사용을 지지한다. 그러나, 야생형 서열의 열악한 서열 안정성은 벡터 생산 동안 서열 무결성을 유지하는 것에 대한 도전 과제이고 인간 광수용체에서 야생형 서열의 최적이지 아닌 발현 수준은 XLRP를 치료하기 위한 유전자 치료 접근법에 대한 도전 과제이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0009] **발명의 요약**

[0010] 인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자(RPGR) 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 분자가 개시된다. 일 양태에서, 본 개시 내용은 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 또는 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하며 서

열 식별 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RPGR 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된 핵산이 제공된다. 관련 실시 양태에서, 핵산은 달리 동일한 세포에서 야생형 RPGR 핵산 서열(예를 들어, 서열 식별 번호 3)의 발현 수준과 비교하여 더 높은 수준으로 발현된다.

[0011] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 코돈 최적화된 핵산 분자는 야생형 RPGR cDNA(GenBank Accession No. NM_001034853; 서열 식별 번호 3)에 비해 증가된 인간 코돈 적응 지수(codon adaptation index)를 갖는다. 일부 실시 양태에서, 코돈 최적화된 핵산 분자는 적어도 약 0.85, 적어도 약 0.88, 또는 적어도 약 0.89의 인간 코돈 적응 지수를 갖는다.

[0012] 특정 실시 양태에서, 핵산은 서열 식별 번호 3의 G/C 뉴클레오타이드의 백분율과 비교하여 더 높은 백분율의 G/C 뉴클레오타이드를 함유한다. 다른 실시 양태에서, 핵산은 최대 약 59%, 최대 약 58%, 또는 최대 약 57%인 G/C 뉴클레오타이드의 백분율을 함유한다. 일부 양태에서, 핵산의 평균 G/C 함량은 약 55% 내지 약 59%, 약 56% 내지 약 58%이다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 평균 G/C 함량은 약 57%이다.

[0013] 다른 실시 양태에서, 핵산은 제한 없이 TATA-박스 및 스플라이스(splice) 부위를 포함하는 네거티브 시스-작용 부위의 제거 및 최적 코돈의 빈도 증가로부터 선택된 서열 식별 번호 3에 대한 하나 이상의 최적화된 매개변수를 포함한다.

[0014] 다른 실시 양태에서, 핵산은 적어도 하나의 전사 제어 서열, 바람직하게는 핵산에 이종성(heterologous)인 전사 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 양태에서, 전사 제어 서열은 예를 들어 인간 간상체 광수용체-특이적 인간 G 단백질 결합 수용체 로돕신 키나아제 1(human rod photoreceptor-specific human G-protein coupled receptor rhodopsin kinase 1)(hGRK) 프로모터 또는 인간 광수용체간 레티노이드-결합 단백질(interphotoreceptor retinoid-binding protein)(IRBP) 프로모터와 같은 광수용체 세포에서 핵산의 세포-특이적 발현을 초래하는 세포- 또는 조직-특이적 프로모터이다. 바람직한 실시 양태에서, 전사 제어 서열은 인간 간상체 광수용체-특이적 인간 G 단백질 결합 수용체 로돕신 키나아제 1(hGRK) 프로모터를 포함한다. 다른 양태에서, 전사 조절 서열은 많은 세포 유형에서 핵산의 유사한 발현 수준을 초래하는 구성적(constitutive) 프로모터(예를 들어, CAG, CBA, CMV 또는 PGK 프로모터)이다. 바람직한 실시 양태에서, 전사 제어 서열은 Young *et al.*, Investigative Ophthalmology and Visual Science, 44(9):4076-4085 (2003)에 기술된 바와 같은 인간 G 단백질 결합 수용체 키나아제(hGRK, 로돕신 키나아제(Rhodopsin Kinase)로도 알려짐) 프로모터를 포함한다. 특히 바람직한 실시 양태에서, hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4의 서열을 포함하거나 이와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다:

[0015] GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTGTCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGCGGCCCTTGGAGGAAGGGCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATCCAAGCA GCTCAGGGGATTGCTTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCTAAGCGTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGTGTGTCAGCCCCGGG(서열 식별 번호 4)

[0016] 관련된 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하며, 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된, 발현 카세트가 본원에서 제공된다.

[0017] 관련된 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 벡터가 본원에서 제공된다. 바람직한 실시 양태에서, 벡터는 재조합 아데노 관련(rAAV) 발현 벡터이다. 일부 실시 양태에서, rAAV 벡터는 천연 캡시드(예를 들어, AAV 혈청형 2 또는 AAV 혈청형 5 또는 AAV 혈청형 8의 캡시드)를 포함한다. 다른 실시 양태에서, rAAV 벡터는 천연 AAV 캡시드(예를 들어, 혈청형 2, 5 또는 8의 AAV 캡시드에 대한 하나 이상의 변형을 포함함)에 비해 변형된(예를 들어, 하나 이상의 펩티드 삽입 및/또는 하나 이상의 아미노산 치환(예를 들어, 티로신에서 페닐알라닌으로) 및/또는 아미노산 삽입 또는 아미노산 결실을 포함함) 캡시드를 포함한다.

[0018] 다른 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 일부 양태에서, 숙주 세포는 제한 없이 CHO 세포, HEK293 세포, HeLa 세포, BHK21 세포, Vero 세포 또는 V27 세포를 포함하는 포유동물 세포이다. 다른 양태에서, 숙주 세포는 광수용체 세포(예를 들어 간상체; 추상체), 망막 신경절 세포(retinal ganglion cell)(RGC), 아교 세포(예를 들어 물러 아교 세포(Muller glial cell), 소교 세포(microglial cell)), 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포, 또는 망막 색소 상피(retinal pigmented epithelium)(RPE) 세포이다. 관련된 실시 양태에서, 본 개시 내용은 서열 식별 번호 2의 폴리펩타이드가 핵산 분자에 의해 발현되는 조건 하에서 숙

주 세포를 배양하는 것을 포함하는 서열 식별 번호 2의 폴리펩타이드의 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 폴리펩타이드의 발현은 서열 식별 번호 3의 뉴클레오타이드 서열(비교자 서열)을 포함하는 기준 핵산을 포함하는 동일한 조건 하에서 배양된 숙주 세포에 비해 증가된다.

[0019] 또 다른 실시 양태에서, 본 개시 내용은 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하며 서열 식별 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 분리된(isolated) 핵산 분자 또는 그러한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 서열 식별 번호 2의 폴리펩타이드의 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 폴리펩타이드의 발현은 서열 식별 번호 3의 뉴클레오타이드 서열(비교자 서열)을 포함하는 기준 핵산 분자 또는 기준 핵산 분자를 포함하는 벡터에 비해 증가된다.

[0020] 일부 실시 양태에서, 본 개시 내용은 인간 대상체에게 본원에 개시된 핵산 분자 또는 벡터를 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 불충분한 RGRP ORF15 활성과 관련된 안구 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 망막 장애는 X-연관 색소성 망막염이다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1**은 pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40의 제한 분해(restriction digest)의 겔 전기영동을 예시한다. 맥시프리프(Maxiprep) DNA를 다양한 효소로 분해하고 아가로스 겔 전기영동으로 분석했다: 레인 1 = 2-log 래더(ladder); 레인 2 = BsrGI-H+BglIII; 레인 3 = Pml + Sph-HF; 레인 4 = HindIII-HF + Sph-HF; 레인 5 = Pst. 생성된 제한 단편은 모든 분해(3.9, 2.5, 0.6kb의 레인 2 단편; 3.7, 2.1, 1.3kb의 레인 3 단편; 3.9, 1.7 및 1.5kb의 레인 4 단편; 4.6, 1.4 및 1.2kb의 레인 5 단편)에서 예측된 단편과 일치했다. 킬로베이스(kilobase) 쌍의 눈에 띄는 2-log 래더 밴드의 크기는 겔의 왼쪽에 표시된다.

도 2는 pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40으로 형질감염된 HEK293T 세포로부터의 세포 용해물의 웨스턴 블롯이다. HEK293 세포에서 인간 RPGRorf15 단백질의 발현을 지정된 1차 항체(Sigma; CT-15; Polyglut GT335)로 평가했다. 각 항체에 대해 레인 1 = 형질감염되지 않은 대조군; 레인 2 = pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40; 레인 3 = pAAV-PGK-cohRPGRorf15-SV40. 화살표는 hRPGRorf15 단백질을 나타낸다. 분자량 마커(킬로달톤(kilodalton) 단위)가 왼쪽에 표시된다.

도 3. hGRK1 프로모터의 제어 하에 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화 RPGRorf15를 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 비리온을 사용한 형질도입은 XLRP-iPSC 유래 광수용체 세포에서 cohRPGRorf15(서열 식별 번호 1) 전사 수준의 강력한 증가를 유도한다. pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40 및 서열 식별 번호 9의 캡시드를 포함하는 rAAV로 형질도입 후 30일에 MOI 50,000로 형질도입 후 XLRP-iPSC 유래 광수용체 배양물로부터 추출된 RNA에 대해 디지털 액적(droplet) PCR을 수행하였다. hRPGR1-19(내부 대조군) 및 cohRPGRorf15 전사체 수준을 결정하고 설정된 임계값을 초과하는 카피/밀리리터(copy/mL)로 정량화하고 로그 스케일로 플로팅했다. 형질도입 후, 코돈 최적화된 hRPGRorf15(서열 식별 번호 1) 전사체 수준은 통계적으로 hRPGR1-19보다 컸다. NT=비-형질도입, MOI=다중 감염, hRPGR1-19=인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자 엑손 1-19, 구성적 이소형, cohRPGRorf15 = 코돈 최적화된 인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자 오픈 리딩 프레임 15, 서열 식별 번호 1의 망막 특이적 이소형. MOI 50,000 hRPGR1-19와 비교하여 *p<0.05, NT cohRPGRorf15와 비교하여 †p<0.05. 에러 바 ± 표준 편차. n=환자당 3명. 로그 스케일의 Y축.

도 4. hGRK 프로모터의 제어 하에 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15를 포함하는 rAAV를 사용한 형질도입은 XLRP 광수용체 배양물에서 hRPGRorf15 단백질 수준을 증가시킨다. XLRP-iPSC 유래 광수용체 배양물을 MOI 50,000로 형질도입하고 단백질 용해물을 형질도입 30일 후에 수확했다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯은 로딩 대조군인 α-tubulin(튜블린)으로 정규화된 두 환자 모두에 대해 비-형질도입 세포(NT)와 비교하여 127kDa으로 hRPGRorf15의 증가를 보였다. 밴드 강도를 정량화하고 환자 간에 평균을 냈다. rAAV를 사용한 형질도입은 hRPGRorf15 단백질의 상당한 증가를 가져왔다. NT와 비교하여 *p<0.05. 에러 바 ± 표준 편차. n= 환자당 3명.

도 5. XLRP 광수용체 배양물에서 hGRK 프로모터의 제어 하에 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15를 포함하는 rAAV로 형질도입한 후 hRPGRorf15의 글루타밀화(Glutamylation). XLRP-iPSC 유래 광수용체 배양물을 MOI 50,000로 형질도입하고 단백질 용해물을 형질도입 30일 후에 수확했다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석은 로딩 대조군인 α-tubulin으로 정규화된 두 환자 모두에 대해 비형질도입 세포(NT)와 비교하여 127kDa 단백질, hRPGRorf15의 글루타밀화 증가를 보였으며, α-튜블린 밴드 강도는 정량화되었고 환자 간에 평균을 냈다. rAAV를 사용한 형질도입은 hRPGRorf15 단백질의 글루타밀화를 상당히 증가시켰다. GT335= 항-글루타밀화 항체, NT=

비-형질도입, MOI= 다중 감염, hRPGRorf15= 인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자 오픈 리딩 프레임 15, 망막 특이적 이소형. NT와 비교하여 *p<0.05. 에러 바 ± 표준 편차. n=환자당 3명.

도 6. 구성적 프로모터는 XLRP 광수용체 배양물에서 hRPGRorf15 단백질 및 글루타밀화의 증가를 유도한다. XLRP-iPSC 유래 광수용체 배양물을 5,000, 10,000 및 20,000의 MOI로 PGK 프로모터의 제어 하에 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15를 포함하는 rAAV로 형질도입했다. 형질도입 30일 후 단백질 용해물을 수확했다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯은 로딩 대조군인 α-튜불린으로 정규화된 환자 78명에 대한 비-형질도입 (NT) 대조군과 비교하여 hRPGRorf15의 증가 및 127kDa로 글루타밀화를 나타냈다. 밴드 강도를 정량화했다. 형질도입은 hRPGRorf15 단백질의 상당한 증가를 가져왔다. NT= 비-형질도입, MOI= 다중 감염, hRPGRorf15= 인간 색소성 망막염 GTPase 조절인자 오픈 리딩 프레임 15, 망막 특이적 이소형, GT335= 항글루타밀화 항체. NT와 비교하여 *p<0.05. 에러 바 ± 표준 편차. n=3.

도 7A-도 7G은 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 서열 및 인코딩된 아미노산 서열이다.

도 8은 하기 실시예에 기재된 rAAV 내에 함유된 이식유전자 카세트의 개략도이다. 이식유전자 카세트는 5' AAV2 ITR, 인간 로돕신 키나아제(일명 hGRK) 프로모터, 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 인간 RPGRorf15 cDNA, 후기 SV40 폴리아데닐화 신호 및 3' AAV2 ITR을 포함하고 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

도 9는 안구 염증의 정량화를 통한 4D-125(도 8에 도시된 이식유전자 카세트 및 서열 식별 번호 9의 캡시드 단백질 포함)의 안전성을 예시한 것으로, 이는 수성 플레어(aqueous flare), 수성 세포 및 유리체 세포에 의해 평가되었다. 고용량에서 일시적인 경미한 안구 염증의 검안경 징후가 관찰되었다. 이러한 변화는 전신 스테로이드 치료의 증가에 반응했다. 4D-125와 관련된 것으로 간주되는 부정적 소견은 없었다. IOP 값은 다른 검사 간격에서 모든 동물의 정상 한계 내에 있었다. 황반 형태를 포함한 ERG 값과 OCT 이미지도 정상 범위 내에 있었다.

도 10은 4D-125가 유리체내 투여된 NHP에서 3개의 부검 시점에서 qPCR에 의해 측정된 바와 같은 선택된 망막, 안구 및 비안구 조직에서의 백터 게놈 생물학적 분포(biodistribution)를 예시한다. LOD = 검출 하한; 모든 샘플 "BLOD"는 시각화 목적으로 LOD 값으로 그래프로 표시된다.

도 11은 4D-125가 유리체내 투여된 NHP에서 3개의 부검 시점에서 RT-qPCR에 의해 측정된 바와 같은 선택된 망막, 안구 및 비안구 조직에서의 RPGR 이식유전자 mRNA 발현을 예시한다. LOD = 검출 하한; 모든 샘플 "BLOD"는 시각화 목적으로 LOD 값으로 그래프로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 정의

[0023] 본원에 사용된 "코돈 적응 지수"는 코돈 사용 편향(bias)의 척도를 지칭한다. 코돈 적응 지수(codon adaptation index)(CAI)는 기준 유전자 세트에 대한 주어진 단백질 코딩 유전자 서열의 편차를 측정한다(Sharp P M and Li W H, Nucleic Acids Res. 15(3):1281-95 (1987)). CAI는 유전자 서열의 길이에 걸쳐 각 코돈과 연관된 무게의 기하 평균을 결정함으로써 계산된다(코돈에서 측정):

$$CAI = \exp\left(1/L \sum_{l=1}^L \ln(w_l(l))\right), \tag{I}$$

[0024] ...

[0025] 각 아미노산에 대해, CAI에서 각 코돈의 무게는, 관찰된 코돈 빈도(fi)와 해당 아미노산에 대한 동의 코돈 (synonymous codon) 빈도(fj) 사이의 비율로 계산된다:

$$w_i = \frac{f_i}{\max(f_j)} \quad ij \in [\text{synonymous codons for amino acid}] \tag{II}$$

[0026] ...

[0027] 용어 "분리된(isolated)"은 그의 기원 환경(자연적으로 존재하는 환경)에서 제거된 생물학적 물질(세포, 핵산 또는 단백질)을 지정한다. 예를 들어, 식물 또는 동물에서 자연 상태로 존재하는 폴리뉴클레오타이드는 분리되지 않지만, 그것이 자연적으로 존재하는 인접 핵산으로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드는 "분리된" 것

로 간주된다.

- [0028] 용어 "4D-125"는 (i) 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질 및 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 AAV 입자를 지칭한다.
- [0029] 용어 "R100"은 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 지칭한다.
- [0030] 본원에 사용된 "코딩 영역" 또는 "코딩 서열"은 아미노산으로 번역 가능한 코돈으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일부이다. 비록 "정지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)은 전형적으로 아미노산으로 번역되지 않지만, 코딩 영역의 일부로 간주될 수 있지만 임의의 측면 서열, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 부위(terminator), 인트론(intron) 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 코딩 영역의 경계는 생성된 폴리펩타이드의 아미노 말단을 인코딩하는 5' 말단의 시작 코돈 및 생성된 폴리펩타이드의 카복실 말단을 인코딩하는 3' 말단의 번역 정지 코돈에 의해 전형적으로 결정된다. 2개 이상의 코딩 영역은 단일 폴리뉴클레오타이드 구조물에, 예를 들어, 단일 벡터에, 또는 별개의 폴리뉴클레오타이드 구조물에, 예를 들어, 별개의 (상이한) 벡터에 존재할 수 있다. 따라서 단일 벡터는 단일 코딩 영역만 포함할 수 있거나 둘 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 용어 "조절 영역"은 코딩 영역의 상류(5' 비-코딩 서열), 내부 또는 하류(3' 비-코딩 서열)에 위치하며, 전사, RNA 프로세싱, 안정성, 또는 연관된 코딩 영역의 번역에 영향을 미치는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 조절 영역은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, RNA 프로세싱 부위, 이펙터 결합 부위 및 스텝-루프 구조를 포함할 수 있다. 코딩 영역이 진핵 세포에서 발현되도록 의도된 경우, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 서열은 일반적으로 코딩 서열의 3'에 위치할 것이다.
- [0032] 본원에 사용된 용어 "핵산"은 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산 분자"와 상호교환 가능하며 뉴클레오타이드의 중합체를 의도한다.
- [0033] 유전자 산물, 예를 들어, 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 코딩 영역과 작동 가능하게 회합된 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 제어 요소를 포함할 수 있다. 작동 가능한 회합(association)에서 유전자 산물, 예를 들어, 폴리펩타이드에 대한 코딩 영역은 유전자 산물의 발현이 조절 영역(들)의 영향 또는 제어 하에 놓이도록 하는 방식으로 하나 이상의 조절 영역과 회합된다. 예를 들어, 프로모터 기능의 유도가 코딩 영역에 의해 인코딩되는 유전자 산물을 인코딩하는 mRNA의 전사를 초래하는 경우, 및 프로모터와 코딩 영역 사이의 연결 특성이 유전자 산물의 발현을 지시하는 프로모터의 능력을 방해하지 않거나 전사되는 DNA 주형(template)의 능력을 방해하지 않는 경우, 코딩 영역과 프로모터는 "작동 가능하게 회합" 된다. 프로모터 외에 다른 전사 제어 요소, 예를 들어 인핸서, 오퍼레이터, 리프레서 및 전사 종결 신호는 또한 유전자 산물 발현을 지시하기 위해 코딩 영역과 작동 가능하게 회합될 수 있다.
- [0034] "전사 제어 서열"은 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현을 제공하는 프로모터, 인핸서, 터미네이터 등과 같은 DNA 조절 서열을 지칭한다. 다양한 전사 제어 영역이 당업자에게 공지되어 있다. 이들은 제한없이, 사이토메갈로바이러스(인트론-A와 함께 전 초기(immediate early) 프로모터), 유인원 바이러스 40(초기 프로모터) 및 레트로바이러스(예를 들어, Rous 육종 바이러스)로부터의 프로모터 및 인핸서 세그먼트와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 척추동물 세포에서 기능하는 전사 제어 영역을 포함한다. 다른 전사 제어 영역에는 진핵 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열뿐만 아니라 액틴, 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 베타-글로빈과 같은 척추동물 유전자에서 유래된 것을 포함한다. 추가의 적합한 전사 제어 영역은 조직-특이적 프로모터 및 인핸서뿐만 아니라 림포카인(lymphokine)-유도성 프로모터(예를 들어, 인터페론 또는 인터루킨에 의해 유도될 수 있는 프로모터)를 포함한다.
- [0035] 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 당업자에게 공지되어 있다. 이들은 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 피코르나바이러스(picornaviruses)에서 유래된 요소(특히, 내부 리보솜 진입 부위, 또는 CITE 서열로 지칭되는 IRES)가 포함되지만 이에 국한되지 않는다.
- [0036] 본원에 사용된 용어 "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 유전자 산물, 예를 들어 RNA 또는 폴리펩타이드를 생성하는 과정을 지칭한다. 이는 폴리뉴클레오타이드의 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 소형 헤어핀 RNA(shRNA), 소형 간섭 RNA(siRNA) 또는 임의의 다른 RNA 산물로의 전사, 및 mRNA의 폴리펩타이드로의 번역을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 발현은 "유전자 산물"을 생성한다. 본원에 사용된 유전자 산물은 핵산, 예를 들어 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 전사체로부터 번역되는 폴리펩타이드일 수 있다. 본원에 기재된 유전자 산물은 전사 후 변형, 예를 들어 폴리아데닐화 또는 스플라이싱이 있는 핵산, 또는 번역 후 변형, 예를 들어 메틸화, 글리코실화, 지질의 추가, 다른 단백질 서브유닛과의 회합 또는 단백질 분해 절단이 있는 폴리펩타이드를

추가로 포함한다.

- [0037] "벡터"는 핵산의 숙주 세포 내로의 클로닝 및/또는 전달을 위한 임의의 비히클을 지칭한다. 벡터는 부착된 분절(segment)의 복제를 가져오기 위해 또 다른 핵산 분절이 부착될 수 있는 레플리콘(replicon)일 수 있다. 용어 "벡터"는 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo)에서 세포 내로 핵산을 도입하기 위한 바이러스 및 비바이러스 비히클 둘 다를 포함한다. 예를 들어, 플라스미드, 변형된 진핵생물 바이러스, 또는 변형된 박테리아 바이러스를 포함하는 다수의 벡터가 공지되어 있고 당업계에 사용된다. 적절한 벡터로의 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 적절한 폴리뉴클레오타이드 단편(fragment)을 상보적 응집 말단을 갖는 선택된 벡터에 결합함으로써 달성될 수 있다.
- [0038] 벡터는 벡터를 포함하는 세포의 선택 또는 식별을 제공하는 선택 가능한 마커(marker) 또는 리포터(reporter)를 인코딩하도록 조작될 수 있다. 선택 가능한 마커 또는 리포터의 발현은 벡터에 함유된 다른 코딩 영역을 통합하고 발현하는 숙주 세포의 식별 및/또는 선택을 허용한다. 당업계에 공지되고 사용되는 선택 가능한 마커 유전자의 예는 암피실린(ampicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamycin), 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygroscopicin), 바이알라포스 제초제(bialaphos herbicide), 설푼아미드(sulfonamide) 등에 대한 내성을 제공하는 유전자; 및 표현형 마커로 사용되는 유전자, 즉, 안토시아닌 조절 유전자(anthocyanin regulatory genes), 이소펜타닐 트랜스퍼라제 유전자(isopentanyl transferase gene) 등을 포함한다. 당업계에 공지되고 사용되는 리포터의 예는 루시페라아제(luciferase)(Luc), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein)(GFP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase)(CAT), -갈락토시다아제(galactosidase)(LacZ), -글루쿠로니다제(glucuronidase)(Gus) 등을 포함한다. 선택 가능한 마커도 리포터로 간주될 수 있다.
- [0039] 사용될 수 있는 진핵 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 폭스바이러스, 예를 들어, 백시니아 바이러스 벡터, 배칼로바이러스 벡터, 또는 헤르페스바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-바이러스 벡터에는 플라스미드, 리포솜, 전하를 띤 지질(사이토펙틴(cytofectins)), DNA-단백질 복합체 및 생체고분자(biopolymer)가 포함된다.
- [0040] "프로모터"와 "프로모터 서열"은 혼용되어 사용되며 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 제어할 수 있는 DNA 서열을 지칭한다. 일반적으로 코딩 서열은 프로모터 서열의 3'에 위치한다. 프로모터는 완전히 천연 유전자로부터 유래되거나, 자연에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성되거나, 합성 DNA 분절을 포함할 수도 있다. 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 유형에서, 또는 상이한 발달 단계에서, 또는 상이한 환경 또는 생리학적 조건에 반응하여 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해된다. 대부분의 경우 대부분의 세포 유형에서 유전자가 발현되도록 하는 프로모터를 일반적으로 "구성적 프로모터"라고 지칭한다. 유전자가 특정 세포 유형에서 발현되도록 하는 프로모터는 일반적으로 "세포-특이적 프로모터" 또는 "조직-특이적 프로모터"로 지칭된다. 특정 발달 또는 세포 분화 단계에서 유전자가 발현되도록 하는 프로모터는 일반적으로 "발달-특이적 프로모터" 또는 "세포 분화-특이적 프로모터"로 지칭된다. 프로모터를 유도하는 작용제, 생물학적 분자, 화학물질, 리간드, 빛 등으로 세포를 노출 또는 치료한 후 유도되어 유전자가 발현되도록 하는 프로모터는 일반적으로 "유도성 프로모터" 또는 "조절 가능한 프로모터"라고 한다. 대부분의 경우 조절 서열의 정확한 경계가 완전히 정의되지 않았기 때문에 길이가 다른 DNA 단편이 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있음이 추가로 인식된다.
- [0041] 용어 "플라스미드"는 종종 세포의 중심 대사의 일부가 아닌 유전자를 보유하고 일반적으로 원형 이중 가닥 DNA 분자의 형태로 존재하는 염색체 외 요소를 지칭한다. 이러한 요소는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA의 자율 복제 서열, 계승 통합 서열, 파지 또는 뉴클레오타이드 서열, 선형, 원형 또는 초나선형일 수 있으며, 이는 임의의 공급원으로부터 유래되며, 다수의 뉴클레오타이드 서열이 적절한 3' 비번역 서열과 함께 선택된 유전자 산물에 대한 프로모터 단편 및 DNA 서열을 세포 내로 도입할 수 있는 독특한 구조로 연결되거나 재조합된다.
- [0042] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 다른 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에 대해 특정 백분율 "서열 동일성"을 가지며, 이는 정렬될 때, 두 서열을 비교할 때 염기 또는 아미노산의 백분율이 동일함을 의미한다. 서열 유사성은 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 서열 동일성을 결정하기 위해, 월드 와이드 웹(ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)에서 이용 가능한 BLAST를 포함하는 컴퓨터 프로그램 및 방법을 사용하여 서열을 정렬할 수 있다. 또 다른 정렬 알고리즘은 미국 위스콘신주 매디슨의 GCG(Genetics Computing Group) 패키지로 사용 가능한 FASTA이다. 정렬을 위한 기타 기술은 Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc. 에 기재됐다. 특히 흥미로운 것은 서열의 간

격을 허용하는 정렬 프로그램이다. Smith-Waterman은 서열 정렬의 간격을 허용하는 알고리즘 유형 중 하나이다. Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)를 참조. 또한 Needleman 및 Wunsch 정렬 방법을 사용하는 GAP 프로그램을 사용하여 서열을 정렬할 수 있다. J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970) 참조.

[0043] 일 실시 양태에서, 본 발명은 서열 식별 번호 2(인간 RGPGR ORF15)의 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 변형된 핵산 분자를 제공하며, 여기서 핵산 서열은 코돈 최적화된다. 또 다른 실시 양태에서, 서열 식별 번호 2의 폴리펩타이드를 인코딩하고 코돈 최적화에 적용되는 출발 핵산 서열은 서열 식별 번호 3으로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 바람직한 실시 양태에서, 서열 식별 번호 2의 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열은 인간 발현에 최적화된 코돈이다. 서열 식별 번호 1은 인간 발현에 최적화된 서열 식별 번호 3의 코돈 최적화된 버전이다:

[0044] ATGAGAGAACCCGAGGAAGTATGATGCCCGACTCTGGCGCCGTGTTTACCTTCGGCAAGAGCAAGTTCGCCGAGAACACCCCGCAAGTTCTGGTTCAAGAAG
 GACGTGCCAGTGCACCTGAGCTGCGGAGATGAACACTCTGCCGTGGTACCCGCAACAACAAGCTGTACATGTTCCGCGAGCAACAAGTGGGGCCAGCTCGGC
 CTGGGATCTAAGTCTGCCATCAGCAAGCCTACCTGCGTGAAGGCCCTGAAGCCTGAGAAAAGTGAAGTGGCCGCTGCGGCAGAAAATCACACCCTGGTTTCT
 ACCGAAGGCGGAATGTGTATGCCACCGCGGAAACAATGAGGGACAGCTTGGACTGGGCGACCCGAGGAAAGAACACCTTCCACGTGATCAGCTTTTTTC
 ACCAGCGAGCACAAGATCAAGCAGCTGAGCGCCGGCTCTAATACCTCTGCCGCTCTGACAGAGGACGGCAGACTGTTTATGTGGGGCGACAATTCTGAGGGC
 CAGATCGACTGAAGAACGTGTCCAATGTGTGCGTGCCCGCAAGTGACAATCGCAAGCCTGTGTCTTGGATCAGTGGCGCTACTACCACAGCGCCTTT
 GTGACAAACCGATGGCGAGCTGTATGTGTTCCGCGAGCCAGAGAATGGCAAGCTGGGACTGCCTAACCCAGCTGTGGGCAATCACAGAACCCCTCAGCTGGTG
 TCTGAGATCCCCGAAAAGTGATCCAGGTGGCTGTGGCGGAGAGCACACAGTGGTGTGACAGAGAATGCCGTGTACACCTTGGCTGGCCAGTTTGA
 CAACTCGACTGGGAACCTTCTGTTCGAGACAAGCGAGCCAAAGTATCGAGAATCCGGGACCAGACCATCAGTACATCAGCTGTGGCGAGAACCAC
 ACAGCCCTGATCACAGACATCGGCTGTATACACATTCGCGCAGCGAAGGCATGGAAGCTCGGACTTGGCCTGAAAAGTTCACCAACCACTTCATCCCT
 ACGCTGTGACGAACTTCTGCGGTTTATTGTGAAGCTGGTGGCTGCGGAGGATGCCACATGGTGGTTTTGTGTCGCCCTCACAGAGCGTGGCCAAAGAG
 ATTGAGTTCGACGAGATCAACGATACCTGCCTGAGCGTGGCCACCTTCTGCCTTACAGCAGCCTGACATCTGGCAACGTGTGACAGGACACTGAGCGCC
 AGAATGCGCAGACGGAAAGAGAGAGAAGCCCCGACAGCTTACGATGAGAAGAACCCTGCCTCCAATCGAGGGCACACTGGGCTGTCTGCTGCTTTCTG
 CCTAACAGCTGTTCCCCAGATGACGCGAGAGAAAAGTGAAGAGAGCGTGTGAGCGAGCAGGATCTGATGACGCTGAGGAACCCGACTACCTGCTGGAC
 GAGATGACCAAGAGGCGGAGATCGACAACAGCAGCACAGTGGAAAGCCTGGGCGAGACAACCGACATCTGAACATGACCCACATCATGAGCTGAACAGC
 AACGAGAAGTCTCTGAAGCTGAGCCCGTGCAGAAGCAGAAGAAGCAGCAGACCATCGGCGAGCTGACACAGGATACTGCCCTGACCGAGAACGACGACAGC
 GACGAGTACGAAGAGATGAGCGAGATGAAGGAAGGCAAGGCTGCAAGCAGCACGTGTCCAGGGCATCTTTATGACCCAGCCTGCCACCACCATCGAGGCC
 TTTCCGACGAGGAAGTGGAAATCCCGAGGAAAAAGAGGGCGCGAGGACAGCAAAGGCAACCGCATGAGGAACAAGAGGTGGAAGCCAACGAAGAGAAAC
 GTGAAGGTGACGCGGACGCGAAAGAAAAGACCCAGATCCTGAGCGACGACCTGACCGATAAGGCCGAGGTTTTCCGAGGGCAAAGCAAGTCTGTGGGAGAA
 GCCGAGGATGGACCTGAAGGCCGCGAGATGGAACCTGTGAAGAAGGATCTAGCGGAGCGGAGACTGGCAGGATGAGGAACCGGAGAAGGGCGAGAAAGAC
 AAAGGAGAGGCGAGATGGAAGACCCGCGAGGGCGAAAAAGAGTGGCCGAGAAAGAGGAATGGAAGAAACGCGACGGCGAAGAACAAGAGCAGAAAGAA
 AGAGAGCAGGGCCACCAGAAAGAACGGAATCAAGAGATGGAAGAAGGCGGAGGAAGAACCGGCAAGGGGAAGAAGAGGAAGGCGACCGAGAGGAAGAA
 GAAGAGAAAAGGCGAAGGCAAGAAGAAGGCGAGGGCGAAGAGGTGGAAGGCGAGCGTAAAAAGAAGAGGGCGAACGCAAGAAGAAGAACGCGCCGGA
 AAAGAGGAAAAGGCGAGGAAGAGGGCGACCAAGGCGAAGGCGAGGAAGAAGAACTGAAGGCGAGGGGAAGAGAAAGAGGAAGGCGGCAAGTCAAGGC
 GGAGAGGTTGAAGAAGGCAAGGCGAGCGAGAAGAGGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAGGAAGAGGAAGGCGAAGGCGAAGGGAAGGCGAAGGGGAA
 GAAGAAGAAGGCGAAGGCAAGGGCGAAGAGGAGGGCGAAGAAGGCGAGGGCGAAGAGGGCGAAGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGAAGAAGGCGAA
 GCGAAGGCGAGGAAGAAGGCGAAGGGCGAAGGGGAAGAAGAGGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGAGGAAGGCGAA
 GGCAAAGGGGAAGAAGAAGGCGAGGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAGGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGATGGCGAAGGCGAAGGCGAAGGGAAGAG
 GGCGAGTGGGAGGGCGAAGAAGAGGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGAGGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAGGAAGAGGAAGGCG
 GAAGGCGAAGGGGAAGAAGAAGAGGGCGAAGAAGAAGGCGAAGAGGAAGGCGAAGGGGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAAGAAGAGGAAGAGGGCGAA
 GTTGAAGGCGAGGTTGAGGGCGAAGAAGGCGAAGGCGAAGGGGAAGAAGAAGGCGAGGAAGAAGGGGAAGAGAGAGAAAAAGAAGGCGAGGGCGAAGAA
 AACCGCCGAAACCGCAAGAGGAAGAGGAAGAAGAGGGCAAGTACCAAGAGACTGGCGAGGAAGAGAACGAGCGCAGGATGGCGAAGAGTACAAGAGGTG
 TCCAAGATCAAGGGCAGCGTGAAGTACGGCAAGCACAAGACCTACCAGAAGAAGTCCGTACCAACACGCAAGGCAATGGAAGAAGAACAGCGGAGCAAGATG
 CCGTGCAGTCCAAGAGGCTGTGAAGAATGCCCTAGCGGCAGCAAGAAATCTGGAACAATGTGCTGCCCCACTACCTCGAGCTGAAGTGA (서열 식
 별 번호 1)

[0045] 일부 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 TGA 정지 코돈이 결여된(즉, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 1-3456으로 구성됨) 인간 RGPGRORF15를 인코딩하는 코돈 최적화된 서열이 제공된다.

[0046] 일 양태에서, 본 개시 내용은 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하며 서열 식별 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RPGR 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클

대한 코돈 빈도를 계산한 다음, 코돈을 폴리펩타이드 서열에 무작위로 할당함으로써 수동으로 수행될 수 있다. 또한, 다양한 알고리즘과 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용하여 최적의 서열을 계산할 수 있다.

- [0055] 비-바이러스 벡터
- [0056] 일부 실시 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 핵산을 포함하는 비-바이러스 벡터(예를 들어, 발현 플라스미드)가 제공된다. 바람직하게는, 비-바이러스 벡터는 서열 식별 번호 1의 핵산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 플라스미드이다.
- [0057] 바이러스 벡터
- [0058] 바람직한 실시 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형된(코돈 최적화된) 핵산을 포함하는 바이러스 벡터가 제공된다. 바람직하게는, 바이러스 벡터는 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 핵산 서열, 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 적합한 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스바이러스 및 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0059] 바람직한 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 rep 및 cap 유전자가 삭제 및/또는 변형된 RPGRorf15 유전자 서열 및 그의 관련 발현 제어 서열에 의해 대체된 AAV 계통과 같은 과보바이러스 계통의 일부를 포함한다. 변형된 인간 RPGRorf15 유전자 서열은, 바이러스 rep 및 cap 단백질을 인코딩하는 핵산 대신에, 일반적으로 바이러스 복제에 적합한 1개 또는 2개의 AAV TR 또는 TR 요소에 인접하여 삽입된다(예를 들어, 측면에 배치된다)(Xiao et al., 1997, J. Virol. 71(2): 941-948). 표적 세포에서 변형된 RPGRorf15 유전자 서열의 조직-특이적 발현을 촉진하는 데 사용하기에 적합한 다른 조절 서열이 또한 포함될 수 있다.
- [0060] 일부 바람직한 실시 양태에서, AAV 바이러스 벡터는 5'로부터 3'에 (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 본원에 기술된 바와 같은 코돈 최적화된 RPGRorf15 유전자 (d) 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함한다. 특히 바람직한 실시 양태에서, AAV 바이러스 벡터는 서열 식별 번호 5의 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 핵산(이식유전자 카세트)을 포함한다:
- [0061] TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCACTGAGG CCGGGCGACC AAAGGTCGCC 60
- [0062] CGACGCCCGG GCTTTGCCCG GGCGGCCTCA GTGAGCGAGC GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG 120
- [0063] GCCAACTCCA TCACTAGGGG TTCCTATCGA TTGAATTCCC CGGGGATCCG GGCCCCAGAA 180
- [0064] GCCTGGTGGT TGTTTGTCTT TCTCAGGGGA AAAGTGAGGC GGCCCTTGG AGGAAGGGGC 240
- [0065] CGGGCAGAAT GATCTAATCG GATTCCAAGC AGCTCAGGGG ATTGTCTTTT TCTAGCACCT 300
- [0066] TCTTGCCACT CCTAAGCGTC CTCCGTGACC CCGGCTGGGA TTTAGCCTGG TGCTGTGTCA 360
- [0067] GCCCCGGGTC TAGAGTCGAC CTGCAGAAGC TTCCACCATG AGAGAACCCG AGGAACTGAT 420
- [0068] GCCCGACTCT GCGGCCGTGT TTACCTTCGG CAAGAGCAAG TTCGCCGAGA ACAACCCCGG 480
- [0069] CAAGTTCTGG TTCAAGAAGC ACGTGCCAGT GCACCTGAGC TGCAGGAGATG AACACTCTGC 540
- [0070] CGTGGTCACC GGCAACAACA AGCTGTACAT GTTCGGCAGC AACAACTGGG GCCAGCTCGG 600
- [0071] CCTGGGATCT AAGTCTGCCA TCAGCAAGCC TACCTGCGTG AAGGCCCTGA AGCCTGAGAA 660
- [0072] AGTGAAACTG GCCGCTGCG GCAGAAATCA CACCCTGGTT TCTACCGAAG GCGGCAATGT 720
- [0073] GTATGCCACC GCGGAAACA ATGAGGGACA GCTTGGACTG GGCGACACCG AGGAAAGAAA 780
- [0074] CACCTTCCAC GTGATCAGCT TTTTACCAG CGAGCACAAG ATCAAGCAGC TGAGCGCCGG 840
- [0075] CTCTAATACC TCTGCCGCTC TGACAGAGGA CGGCAGACTG TTTATGTGGG GCGACAATTC 900
- [0076] TGAGGGCCAG ATCGGACTGA AGAACGTGTC CAATGTGTGC GTGCCCCAGC AAGTGACAAT 960
- [0077] CGGCAAGCCT GTGTCTTGA TCAGCTGCGG CTACTACCAC AGCGCCTTTG TGACAACCGA 1020

| | | |
|--------|--|------|
| [0078] | TGGCGAGCTG TATGTGTTTCG GCGAGCCAGA GAATGGCAAG CTGGGACTGC CTAACCAGCT | 1080 |
| [0079] | GCTGGGCAAT CACAGAACCC CTCAGCTGGT GTCTGAGATC CCCGAAAAAG TGATCCAGGT | 1140 |
| [0080] | GGCCTGTGGC GGAGAGCACA CAGTGGTGCT GACAGAGAAT GCCGTGTACA CCTTTGGCCT | 1200 |
| [0081] | GGGCCAGTTT GGACAACTCG GACTGGGAAC CTTCCTGTTC GAGACAAGCG AGCCCAAAGT | 1260 |
| [0082] | GATCGAGAAC ATCCGGGACC AGACCATCAG CTACATCAGC TGTGGCGAGA ACCACACAGC | 1320 |
| [0083] | CCTGATCACA GACATCGGCC TGATGTACAC ATTCGGCGAC GGAAGGCATG GAAAGCTCGG | 1380 |
| [0084] | ACTTGGCCTG GAAAACCTCA CCAACCACTT CATCCCTACG CTGTGCAGCA ACTTCCTGCG | 1440 |
| [0085] | GTTTCATTGTG AAGCTGGTGG CCTGCGGAGG ATGCCACATG GTGGTTTTTG CTGCCCTCA | 1500 |
| [0086] | CAGAGGCGTG GCCAAAGAGA TTGAGTTCGA CGAGATCAAC GATACCTGCC TGAGCGTGGC | 1560 |
| [0087] | CACCTTCCTG CCTTACAGCA GCCTGACATC TGGCAACGTG CTGCAGAGGA CACTGAGCGC | 1620 |
| [0088] | CAGAAATGCGC AGACGGGAAA GAGAGAGAAG CCCCGACAGC TTCAGCATGA GAAGAACCCT | 1680 |
| [0089] | GCCTCCAATC GAGGGCACAC TGGGCCTGTC TGCCTGCTTT CTGCCTAACA GCGTGTCCC | 1740 |
| [0090] | CAGATGCAGC GAGAGAAACC TGCAAGAGAG CGTGCTGAGC GAGCAGGATC TGATGCAGCC | 1800 |
| [0091] | TGAGGAACCC GACTACCTGC TGGACGAGAT GACCAAAGAG GCCGAGATCG ACAACAGCAG | 1860 |
| [0092] | CACAGTGGAA AGCCTGGGCG AGACAACCGA CATCCTGAAC ATGACCCACA TCATGAGCCT | 1920 |
| [0093] | GAACAGCAAC GAGAAGTCTC TGAAGCTGAG CCCCGTGCAG AAGCAGAAGA AGCAGCAGAC | 1980 |
| [0094] | CATCGGCGAG CTGACACAGG ATACTGCCCT GACCGAGAAC GACGACAGCG ACGAGTACGA | 2040 |
| [0095] | AGAGATGAGC GAGATGAAGG AAGGCAAGGC CTGCAAGCAG CACGTGTCCC AGGGCATCTT | 2100 |
| [0096] | TATGACCCAG CCTGCCACCA CCATCGAGGC CTTTTCCGAC GAGGAAGTGG AAATCCCCGA | 2160 |
| [0097] | GGAAAAAGAG GGCGCCGAGG ACAGCAAAGG CAACGGCATT GAGGAACAAG AGGTGGAAGC | 2220 |
| [0098] | CAACGAAGAG AACGTGAAGG TGCACGGCGG ACGGAAAGAA AAGACCGAGA TCCTGAGCGA | 2280 |
| [0099] | CGACCTGACC GATAAGGCCG AGGTTTCCGA GGGCAAAGCC AAGTCTGTGG GAGAAGCCGA | 2340 |
| [0100] | GGATGGACCT GAAGCCGCG GAGATGGAAC CTGTGAAGAA GGATCTAGCG GAGCCGAGCA | 2400 |
| [0101] | CTGGCAGGAT GAGGAACGCG AGAAGGGCGA GAAAGACAAA GGCAGAGGCG AGATGGAAG | 2460 |
| [0102] | ACCCGGCGAG GGCGAAAAAG AGCTGGCCGA GAAAGAGGAA TGGAAGAAAC GCGACGGCGA | 2520 |
| [0103] | AGAACAAGAG CAGAAAGAAA GAGAGCAGGG CCACCAGAAA GAACGGAATC AAGAGATGGA | 2580 |
| [0104] | AGAAGGCGGC GAGGAAGAAC ACGGCGAAGG GGAAGAAGAG GAAGGCGACC GAGAGGAAGA | 2640 |
| [0105] | AGAAGAGAAA GAAGGCGAAG GCAAAGAAGA AGGCGAGGGC GAAGAGGTGG AAGGCGAGCG | 2700 |
| [0106] | TGAAAAAGAA GAGGGCGAAC GCAAGAAAAGA AGAACGCGCC GGAAAAGAGG AAAAAGGCGA | 2760 |
| [0107] | GGAAGAGGGC GACCAAGGCG AAGGCGAGGA AGAAGAACT GAAGGCAGAG GGAAGAGAA | 2820 |
| [0108] | AGAGGAAGGC GGCGAAGTCG AAGGCGGAGA GGTGAAGAA GGCAAAGGCG AGCGAGAAGA | 2880 |
| [0109] | GGAAGAAGAA GAAGGCGAAG GCGAGGAAGA GGAAGGCGAA GGCGAAGAGG AAGAAGGCGA | 2940 |
| [0110] | AGGGGAAGAA GAAGAAGGCG AAGGCAAGGG CGAAGAGGAG GGCGAAGAAG GCGAGGGCGA | 3000 |
| [0111] | AGAGGAGGGC GAAGAAGGCG AAGGCGAGGG CGAAGAAGAA GAAGGCGAAG GCGAAGGCGA | 3060 |
| [0112] | GGAAGAAGGC GAAGGCGAAG GGAAGAAGA GGAAGGCGAA GGCGAAGGCG AAGAAGAAGG | 3120 |
| [0113] | CGAAGGCGAG GGCGAAGAGG AAGAAGGCGA AGGCAAAGGG GAAGAAGAAG GCGAGGAAGG | 3180 |

- [0114] CGAAGGCGAA GGCAGGAAG AAGAAGCGA AGGCGAGGCG GAAGATGGCG AAGGCGAAGG 3240
- [0115] CGAAGAGGAA GAGGGCGAGT GGGAGGGCGA AGAAGAGGAA GGCGAAGGCG AGGGCGAAGA 3300
- [0116] GGAAGGCGAA GGCAGGGCG AAGAAGCGA AGGCGAAGGC GAGGAAGAGG AAGGCGAAGG 3360
- [0117] CGAAGGGGAA GAAGAAGAGG GCGAAGAAGA AGGCGAAGAG GAAGGCGAAG GGAAGAAGA 3420
- [0118] AGGCGAAGGC GAAGGCGAAG AAGAGGAAGA GGGCGAAGTT GAAGGCGAGG TTGAGGGCGA 3480
- [0119] AGAAGGCGAA GGCGAAGGGG AAGAAGAAGA AGGCGAGGAA GAAGGGAAG AGAGAGAAAA 3540
- [0120] AGAAGGCGAG GGCGAAGAAA ACCGCCGAA CCGCGAAGAG GAAGAGGAAG AAGAGGGCAA 3600
- [0121] GTACCAAGAG ACTGGCGAGG AAGAGAACGA GCGGCAGGAT GGCGAAGAGT ACAAGAAGGT 3660
- [0122] GTCCAAGATC AAGGGCAGCG TGAAGTACGG CAAGCACAAG ACCTACCAGA AGAAGTCCGT 3720
- [0123] CACCAACACG CAAGGCAATG GAAAAGAACA GCGGAGCAAG ATGCCCGTGC AGTCCAAGAG 3780
- [0124] GCTGCTGAAG AATGGCCCTA GCGGCAGCAA GAAATTCTGG AACAATGTGC TGCCCCACTA 3840
- [0125] CCTCGAGCTG AAGTGAGCCT CGAGCAGCGC TGCTCGAGAG ATCTGCGGCC GCGAGCTCGG 3900
- [0126] GGATCCAGAC ATGATAAGAT ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAATA GAATGCAGTG 3960
- [0127] AAAAAATGC TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG 4020
- [0128] CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCAATTT ATGTTTCAGG TTCAGGGGGA 4080
- [0129] GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA GCAAGTAAAA CCTCTACAAA TGTGGTATGG CTGATTATGA 4140
- [0130] TCAATGCATC CTAGCCGGAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG 4200
- [0131] CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC TTTGGTCGCC 4260
- [0132] CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAA 4303 (서열 식별 번호 5)
- [0133] 서열 식별 번호 5의 이식유전자 카세트의 구성요소 및 이들 각각의 위치는 하기 표 2에서 확인된다:
- [0134] [표 2]

| Location (bp) | Component | Length (bp) |
|---------------|----------------|-------------|
| 1-145 | 5' ITR | 145 |
| 170-368 | GRK promoter | 199 |
| 398-3856 | RPGRorf15 cDNA | 3459 |
| 3899-4143 | SV40 PolyA | 245 |
| 4159-4304 | 3' ITR | 145 |

- [0135]
- [0136] 5' ITR은 하기 서열을 갖는다:
- [0137] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCT(서열 식별 번호 6)
- [0138] 3' ITR은 하기 서열을 갖는다:
- [0139] AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA(서열 식별 번호 7)
- [0140] SV40 폴리아데닐화 서열은 하기 서열을 갖는다:
- [0141] GGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAATACTAGAAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT TTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGC AAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCA(서열 식별 번호 8)

- [0142] 당업자는 이식유전자를 포함하고 바이러스 복제에 필요한 바이러스 단백질이 결여된 AAV 벡터는(예를 들어, cap 및 rep) 이러한 단백질이 바이러스 복제 및 패키징에 필요하기 때문에 복제할 수 없음을 이해할 것이다. 헬퍼(Helper) 바이러스는 일반적으로 아데노바이러스 또는 단순 포진 바이러스를 포함한다. 대안적으로, 아래에서 논의되는 바와 같이, 다양한 헬퍼 요소 및/또는 세포를 인코딩하는 하나 이상의 핵산으로 세포를 형질감염시키는 것을 포함하여 헬퍼 기능(E1a, E1b, E2a, E4, 및 VA RNA)이 패키징 세포에 제공될 수 있으며/거나 세포가 헬퍼 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, HEK 293은 인간 세포를 아데노바이러스 5 DNA로 형질전환하여 생성되었으며 현재 E1 및 E3을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다수의 아데노바이러스 유전자를 발현한다(예를 들어, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36:59-72 참조). 따라서, 이러한 헬퍼 기능은 예를 들어 이를 인코딩하는 플라스미드에 의해 세포에 공급할 필요 없이 HEK 293 패키징 세포에 의해 제공될 수 있다.
- [0143] 바이러스 벡터는 DNA 또는 RNA 구조물과 같은 임의의 적합한 핵산 구조물일 수 있고 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 이중화(duplexed)일 수 있다(예를 들어, WO 2001/92551에 기재된 바와 같은 자가 상보적).
- [0144] 패키징된 바이러스 벡터의 바이러스 캡시드 성분은 파보바이러스 캡시드일 수 있다. AAV Cap 및 키메라 캡시드가 선호된다. 예를 들어, 바이러스 캡시드는 AAV 캡시드(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV1.1, AAV2.5, AAV6.1, AAV6 .3.1, AAV9.45, AAVrh10, AAVrh74, RHM4-1, AAV2-TT, AAV2-TT-S312N, AAV3B-S312N, AAV-LK03, 램 AAV, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 양 AAV, 염소 AAV, 새우 AAV 및 현재 알려져 있거나 나중에 발견되는 기타 AAV일 수 있다. 예를 들어, Fields et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4.sup.th ed., Lippincott-Raven Publishers) 참조.
- [0145] 일부 실시 양태에서, 패키징된 바이러스 벡터의 바이러스 캡시드 성분은 천연 AAV 캡시드의 변이체이다(즉, 천연 AAV 캡시드에 대해 하나 이상의 변형을 포함함). 일부 실시 양태에서, 캡시드는 AAV2, AAV5 또는 AAV8 캡시드의 변이체이다. 바람직한 실시 양태에서, 캡시드는 미국 특허 출원 공개 번호 2019/0255192A1에 기재된 것과 같은 AAV2 캡시드의 변이체이다(예를 들어, 서열 식별 번호 42-59 중 어느 것의 아미노산 서열을 포함함). 특히 바람직한 실시 양태에서, 캡시드는 하기 아미노산 서열을 갖는 VP1 캡시드 단백질을 포함한다:
- [0146] MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPGRPPPKAAERHKDDSRGLVLPQYKYLGPVNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDGRVITTSRTWALPTYNHLKYQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRHFCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLRSNTNPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLNVNPGPAMASHKDDDEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEERTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAI SDQTKHARQAATADVNTQGVLP GMVWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAF I TQYSTGQVSVEI EWELQKENS KRWNPEI QYTSNY NKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL(서열 식별 번호 9)
- [0147] 서열 식별 번호 9의 변이체 AAV 캡시드 단백질은 천연 AAV2 캡시드에 비해 다음과 같은 변형을 포함한다: (i) 회합된(assembled) 캡시드(단위 VP1 단백질) 내부에 위치하는 아미노산 위치 34에서 프롤린(P)에서 알라닌(A)으로의 돌연변이 캡시드 및 (ii) VP1, VP2 및 VP3에 존재하는 아미노산 위치 588에 10개의 아미노산(류신-알라닌-이소류신-세린-아스파르트산-글루타민-트레오닌-리신-히스티딘-알라닌/LAISDQTKHA)의 삽입.
- [0148] AAV Cap 단백질의 완전 보체(full complement)에는 VP1, VP2 및 VP3이 포함된다. AAV VP 캡시드 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 ORF는 완전 보체 AAV Cap 단백질 미만을 포함할 수 있거나 AAV Cap 단백질의 전체 보체가 제공될 수 있다.
- [0149] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명은 치료적 생체 내 유전자 요법에 사용하기 위한 조상(ancestral) AAV 벡터의 용도를 제공한다. 구체적으로, 인시리코(in silico)-유래 서열은 데 노보(de novo)로 합성되었고 생물학적 활성에 대해 특성화됐다. 이러한 노력으로 9개의 기능성 추정 조상 AAV가 생성되고 AAV 혈청형 1, 2, 8 및 9의 예측된 조상인 Anc80이 확인됐다(Zinn et al., 2015, Cell Reports 12:1056-1068). 바이러스 입자로 회합하는 것 외에도 이러한 조상 서열의 예측 및 합성은 WO 2015/054653에 기재된 방법을 사용하여 달성할 수 있으며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다. 특히, 조상 바이러스 서열로부터 조립된 바이러스 입자의 사용은 현대의 바이러스 또는 이의 일부보다 현대 인간 집단의 기존 면역에 대해 감소된 감수성을 나타낼 수 있다.
- [0150] 본 발명은 본 발명의 패키징된 바이러스 벡터를 생성하기 위해 배양될 수 있는 "숙주 세포"에 의해 포함되는 패키징 세포를 포함한다. 본 발명의 패키징 세포는 일반적으로 이중성 (1) 바이러스 벡터 기능(들), (2) 패키징

기능(들), 및 (3) 헬퍼 기능(들)을 갖는 세포를 포함한다. 이러한 각 구성 요소 기능은 다음 섹션에서 설명한다.

- [0151] 초기에, 벡터는 당업자에게 공지된 여러 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, WO 2013/063379 참조). 바람직한 방법은 Grieger, et al. 2015, *Molecular Therapy* 24(2):287-297에 기재되며, 그 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 간단히 말해서, HEK293 세포의 효율적인 형질감염이 출발점으로 사용되며, 여기서 적격한 임상 마스터 세포 은행의 부착성(adherent) HEK293 세포주는 신속하고 확장 가능한 rAAV 생산을 가능하게 하는 진탕 플라스크 및 WAVE 생물반응기에서 동물 성분이 없는 현탁 조건에서 성장하는 데 사용된다. 삼중 형질감염 방법(예를 들어, WO 96/40240)을 사용하여, 현탁액 HEK293 세포주는 형질감염 후 48시간에 수확될 때 입자(vg)/세포 또는 10^{14} vg/L 이상의 세포 배양물을 함유하는 10^5 개 이상의 벡터 계놈을 생성한다. 보다 구체적으로, 삼중 형질감염은 패키징 세포가 3개의 플라스미드로 형질감염된다는 사실을 의미한다: 하나의 플라스미드는 AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하고, 다른 플라스미드는 다양한 헬퍼 기능(예를 들어, 아테노바이러스 또는 E1a, E1b, E2a, E4, 및 VA RNA와 같은 HSV 단백질 인코딩하며, 그리고 또 다른 플라스미드는 이식유전자와 이의 다양한 제어 요소(예를 들어, 변형된 RPGRorf15 유전자 및 hGRK 프로모터)를 인코딩한다.
- [0152] 원하는 수율을 달성하기 위해, 성장 및 형질감염 모두 지원하는 적합한 무혈청 현탁액 배지의 선택, 형질감염 시약의 선택, 형질감염 조건 및 세포 밀도와 같은 다수의 변수가 최적화된다. 이온 교환 크로마토그래피 방법을 기반으로 하는 보편적인 정제 전략도 개발되어 AAV 혈청형 1-6, 8, 9 및 다양한 키메라 캡시드의 고순도 벡터 준비를 초래했다. 이 사용자 친화적인 프로세스는 1주일 이내에 완료될 수 있으며, 높은 전체 입자 대 빈 입자 비율(>90% 전체 입자)을 초래하며, 정제 후 수율(> 1×10^{13} vg/L) 및 임상 적용에 적합한 순도를 제공하며. 모든 혈청형 및 키메라 입자와 관련하여 보편적이다. 이 확장 가능한 제조 기술은 환자에게 투여된 망막 혈관신생(AAV2), 혈우병 B(scAAV8), 거대 축삭 신경병증(scAAV9) 및 색소성 망막염(AAV2)을 위한 GMP I상 임상 AAV 벡터를 제조하는 데 활용됐다. 또한, 형질감염 후 수많은 시점에서 배양 배지로부터 rAAV를 수확하는 것을 수반하는 관류 방법을 구현함으로써 전체 벡터 생산이 최소 5배 증가한다.
- [0153] 패키징 세포는 패키징 및 벡터 기능과 함께 바이러스 벡터 기능을 포함한다. 바이러스 벡터 기능은 일반적으로 rep 및 cap이 삭제되고 변형된 RPGRorf15 서열 및 관련 발현 제어 서열에 의해 대체된 AAV 계놈과 같은 파보바이러스 계놈의 일부를 포함한다. 바이러스 벡터 기능은 패키징을 위한 바이러스 벡터의 복제를 초래하기에 충분한 발현 제어 서열을 포함한다. 전형적으로, 바이러스 벡터는 파보바이러스 계놈의 일부, 예를 들어 rep 및 cap이 삭제되고 이식유전자 및 그의 관련 발현 제어 서열에 의해 대체된 AAV 계놈을 포함한다. 이식유전자는 일반적으로 삭제된 바이러스 rep 및 cap ORF 대신 2개의 AAV TR이 측면에 위치한다. 조직-특이적 프로모터 및 표적 세포에서 이식유전자의 조직-특이적 발현을 촉진하는 데 사용하기에 적합한 다른 조절 서열과 같은 적절한 발현 조절 서열이 포함된다. 이식유전자는 전형적으로 치료용 폴리펩타이드 또는 마커 폴리펩타이드를 생산하기 위해 발현될 수 있는 핵산 서열이다.
- [0154] 바이러스 벡터에 사용하기 위해 선택된 말단 반복부(terminal repeats) (TR(s))(분해성 및 비-분해성)는 바람직하게는 AAV 서열이고, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5 및 6이 바람직하다. 분해 가능한 AAV TR은 TR이 원하는 기능, 예를 들어 바이러스 패키징, 통합 및/또는 프로바이러스 보호(rescure) 등을 매개하는 한, 야생형 TR 서열을 가질 필요가 없다(예를 들어, 야생형 서열은 삽입, 삭제, 절단 또는 미스센스 돌연변이에 의해 변경될 수 있음). TR은, Samulski et al.의 미국 특허 제5,478,745호에 기재되어 있으며 이의 전체 개시 내용은 참고로 본원에 전체적으로 포함되는 "Double-D sequence"와 같은, AAV 역 말단 반복부로서 기능하는 합성 서열일 수 있다. 반드시 그런 것은 아니지만 일반적으로 TR은 동일한 파보바이러스에서 유래하며, 예를 들어, 두 TR 서열은 모두 AAV2에서 유래한다.
- [0155] 패키징 기능은 캡시드 성분을 포함한다. 캡시드 성분은 바람직하게는 AAV 캡시드 또는 키메라 AAV 캡시드 기능과 같은 파르보바이러스 캡시드로부터 유래한다. 적합한 파르보바이러스 바이러스 캡시드 성분의 예는 자울 파르보바이러스 또는 디펜도바이러스(Dependovirus)와 같은 파르보바이러스과(Parvoviridae) 계통의 캡시드 성분이다. 예를 들어, 캡시드 성분은 AAV 캡시드, 예를 들어 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10, AAVrh74, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4, RHM15-6, AAV Hu.26, AAV1.1, AAV2.5, AAV6.1, AAV6.3.1, AAV9.45, AAV2i8, AAV2G9, AAV2i8G9, AAV2-TT, AAV2-TT-S312N, AAV3B-S312N 및 AAV-LK03 및 아직 확인되지 않은 기타 신규 캡시드, 또는 인간이 아닌 영장류 출처로부터 선택될 수 있다. 캡시드 구성요소는 둘 이상의 AAV 캡시드로부터의 구성요소를 포함할 수 있다.
- [0156] 패키징된 바이러스 벡터는 일반적으로 벡터 DNA의 패키징 및 형질도입된 세포에서 변형된 RPGRorf15 유전자 서

열의 후속 발현을 야기하기에 충분한 본원에서 "이식유전자" 또는 "이식유전자 발현 카세트"로 지칭되는 TR 요소에 의해 플랭킹된 변형된 RPRorf15 유전자 서열 및 발현 조절 서열을 포함한다. 바이러스 벡터 기능은 예를 들어 플라스미드 또는 앰플리콘(amplicon)의 성분으로서 세포에 공급될 수 있다. 바이러스 벡터 기능은 세포주 내에서 염색체외에 존재할 수 있고/있거나 세포의 염색체 DNA에 통합될 수 있다.

[0157] 전기천공, 인산칼슘 침전, 미세주사, 양이온성 또는 음이온성 리포솜, 및 핵 위치 파악 신호와 조합된 리포솜을 포함하나 이에 제한되지 않는, 복제 및 패키징을 위해 바이러스 벡터 기능을 보유하는 뉴클레오타이드 서열을 세포 숙주 내로 도입하는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 바이러스 벡터 기능이 바이러스 벡터를 사용한 형질감염에 의해 제공되는 실시 양태에서; 바이러스 감염을 생성하는 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0158] 패키징 기능은 바이러스 벡터 복제 및 패키징을 위한 유전자를 포함한다. 따라서, 예를 들어 패키징 기능은 필요에 따라 바이러스 유전자 발현, 바이러스 벡터 복제, 통합 상태에서부터 바이러스 벡터의 보호, 바이러스 유전자 발현 및 바이러스 입자로의 바이러스 벡터 패키징에 필요한 기능을 포함할 수 있다. 패키징 기능은 플라스미드 또는 앰플리콘, 배큘로바이러스(Baculovirus) 또는 HSV 헬퍼 구성물과 같은 유전적 구성물을 사용하는 패키징 세포에 함께 또는 별도로 공급될 수 있다. 패키징 기능은 패키징 세포 내에서 염색체외에 존재할 수 있지만 바람직하게는 세포의 염색체 DNA에 통합된다. 예에는 AAV Rep 및 Cap 단백질을 인코딩하는 유전자가 포함된다.

[0159] 헬퍼 기능은 바이러스 벡터의 패키징을 개시하는 데 필요한 패키징 세포의 활성 감염을 확립하는 데 필요한 헬퍼 바이러스 요소를 포함한다. 예에는 바이러스 벡터를 패키징하기에 충분한 아데노바이러스, 배큘로바이러스 및/또는 헤르페스 바이러스에서 유래된 기능이 포함된다. 예를 들어, 아데노바이러스 헬퍼 기능은 일반적으로 아데노바이러스 구성요소 E1a, E1b, E2a, E4 및 VA RNA를 포함한다. 패키징 기능은 패키징 세포에 필요한 바이러스 감염에 의해 제공될 수 있다. 패키징 기능은 플라스미드 또는 앰플리콘과 같은 유전적 구성물을 사용하여 패키징 세포에 함께 또는 별도로 공급될 수 있다. 예를 들어, Rabinowitz et al., 2002, J. Virol. 76:791에 기재된 pXR 헬퍼 플라스미드 및 Grimm et al., 1998, Human Gene Therapy 9:2745-2760에 기재된 pDG 플라스미드 참조. 패키징 기능은 패키징 세포 내에서 염색체외에 존재할 수 있지만 바람직하게는 세포의 염색체 DNA(예를 들어, HEK 293 세포의 E1 또는 E3)에 통합된다.

[0160] 임의의 적합한 헬퍼 바이러스 기능이 사용될 수 있다. 예를 들어, 패키징 세포가 곤충 세포인 경우 배큘로바이러스는 헬퍼 바이러스의 역할을 할 수 있다. 헤르페스(Herpes) 바이러스는 AAV 패키징 방법에서 헬퍼 바이러스로도 사용될 수 있다. AAV Rep 단백질(들)을 인코딩하는 하이브리드 헤르페스 바이러스는 유리하게는 더 확장 가능한 AAV 벡터 생산 계획(scheme)을 용이하게 할 수 있다.

[0161] 전기천공, 인산칼슘 침전, 미세주사, 양이온성 또는 음이온성 리포솜, 및 핵 위치 파악 신호와 조합된 리포솜을 포함하나 이에 제한되지 않는, 복제 및 패키징을 위해 헬퍼 기능을 보유하는 뉴클레오타이드 서열을 세포 숙주 내로 도입하는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 헬퍼 기능이 바이러스 벡터를 사용한 형질감염 또는 헬퍼 바이러스를 사용한 감염에 의해 제공되는 실시 양태에서; 바이러스 감염을 생성하는 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0162] 당업계에 공지된 임의의 적합한 허용 또는 패키징 세포가 패키징된 바이러스 벡터의 생산에 사용될 수 있다. 포유동물 세포 또는 곤충 세포가 바람직하다. 본 발명의 실행에서 패키징 세포의 생산에 유용한 세포의 예는, 예를 들어 VERO, WI38, MRC5, A549, HEK 293 세포와 같은 인간 세포주(구성적 프로모터의 제어 하에 기능적 아데노바이러스 E1을 발현함), B-50 또는 임의의 다른 HeLa 세포, HepG2, Saos-2, HuH7 및 HT1080 세포주를 포함한다. 일 양태에서, 패키징 세포는 현탁 배양에서 성장할 수 있고, 보다 바람직하게는 세포는 무혈청 배양에서 성장할 수 있다. 일 실시 양태에서, 패키징 세포는 무혈청 배지에서 현탁액으로 성장하는 HEK293이다. 또 다른 실시 양태에서, 패키징 세포는 미국 특허 제9,441,206호에 기재되고 수탁번호 PTA 13274로 수탁된 HEK293 세포이다. WO 2002/46359에 개시된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 rAAV 패키징 세포주가 당업계에 공지되어 있다. 또 다른 양태에서, 패키징 세포는 세포 스택(예를 들어, HEK293 세포가 접종된 10층 세포 스택)의 형태로 배양된다.

[0163] 패키징 세포로 사용하기 위한 세포주는 곤충 세포주를 포함한다. AAV의 복제를 가능하게 하고 배양물에서 유지될 수 있는 임의의 곤충 세포가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예는 Sf9 또는 Sf21 세포주와 같은 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda), 도로소피마 종(Drosophila spp.) 세포주, 또는, 예를 들어, 아에데스 알보픽투스(Aedes albopictus) 유래 세포주와 같은 모기 세포주를 포함한다. 바람직한 세포주는 Spodoptera frugiperda Sf9 세포주이다. 이중성 폴리펩타이드의 발현을 위한 곤충 세포의 사용, 이러한 세포에 핵산을 도입하는 방법, 및 배양에서 이러한 세포를 유지하는 방법에 관한 교시를 위해 하기 참조문헌이 본원에 포함된다: Methods in Molecular Biology, ed. Richard, Humana Press, N J (1995); O'Reilly et al., Baculovirus

Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford Univ. Press (1994); Samulski et al., 1989, J. Virol. 63:3822-3828; Kajigaya et al., 1991, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 4646-4650; Ruffing et al., 1992, J. Virol. 66:6922-6930; Kimbauer et al., 1996, Virol. 219:37-44; Zhao et al., 2000, Virol. 272:382-393; 및 Samulski et al., U.S. Pat. No. 6,204,059.

- [0164] 본 발명에 따른 바이러스 캡시드는 당업계에서 공지된 임의의 방법을 사용하여, 예를 들어, 배칼로바이러스로부터의 발현에 의해 생성될 수 있다(Brown et al., (1994) Virology 198:477-488). 추가 대안으로서, 본 발명의 바이러스 벡터는, 예를 들어, Urabe et al., 2002, Human Gene Therapy 13:1935-1943에 기재된 바와 같이 rep/cap 유전자 및 rAAV 주형을 전달하기 위해 배칼로바이러스 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 생산될 수 있다.
- [0165] 또 다른 양태에서, 본 발명은 곤충 세포에서 rAAV 생산 방법을 제공하며, 여기서 배칼로바이러스 패키징 시스템 또는 벡터는 이들 유전자를 배칼로바이러스 벡터의 다면체 코딩 영역으로 조작함으로써 그리고 숙주 세포로의 형질감염에 의한 바이러스 재조합체 생성함으로써 AAV Rep 및 Cap 코딩 영역을 보유하도록 구성될 수 있다. 특히 AAV에 대한 배칼로바이러스 생산을 사용할 때, 바람직하게는 AAV DNA 벡터 생성물은 AAV ITR에 대한 돌연변이를 사용하지 않는 자가-상보성 AAV 유사 분자이다. 이것은 곤충 세포에서 비효율적인 AAV rep 니킹(nicking)의 부산물인 것으로 보이며, 이는 기능적인 Rep 효소 활성의 결여로 인해 자가-상보성 DNA 분자를 생성한다. 숙주 세포는 배칼로바이러스에 감염된 세포이거나 배칼로바이러스 헬퍼 기능을 인코딩하는 추가 핵산이 내부에 도입되었거나 이러한 배칼로바이러스 헬퍼 기능을 포함한다. 이러한 배칼로바이러스 바이러스는 AAV 구성요소를 발현할 수 있고 후속적으로 캡시드의 생산을 촉진할 수 있다.
- [0166] 생산 동안, 패키징 세포는 일반적으로 바이러스 벡터의 복제 및 패키징을 초래하기에 충분한 헬퍼 기능 및 패키징 기능과 함께 하나 이상의 바이러스 벡터 기능을 포함한다. 이러한 다양한 기능은 플라스미드 또는 앰플리콘과 같은 유전적 구성물을 사용하여 패키징 세포에 함께 또는 별도로 공급될 수 있으며, 세포주 내에 염색체외에 존재하거나 세포의 염색체에 통합될 수 있다.
- [0167] 세포에는 이미 통합된 언급된 기능 중 임의의 하나 이상이 제공될 수 있다: 예를 들어, 염색체외로 통합되거나 세포의 염색체 DNA에 통합된 하나 이상의 벡터 기능을 갖는 세포주, 염색체외로 통합되거나 세포의 염색체 DNA에 통합된 하나 이상의 패키징 기능을 갖는 세포주, 또는 염색체외로 통합되거나 세포의 염색체 DNA에 통합된 하나 이상의 헬퍼 기능을 가진 세포주.
- [0168] rAAV 벡터는 컬럼 크로마토그래피 또는 염화세슘 구배와 같은 당업계의 표준 방법에 의해 정제될 수 있다. rAAV 벡터를 정제하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 Clark et al., 1999, Human Gene Therapy 10(6):1031-1039; Schenpp and Clark, 2002, Methods Mol. Med. 69:427-443; U.S. Pat. No. 6,566,118 및 WO 98/09657에 기재되어 있다.
- [0169] 치료 방법(Treatment methods)
- [0170] 특정 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 이러한 핵산 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여함으로써 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 XLRP의 치료를 위한 방법이 제공된다.
- [0171] 관련 양태에서, XLRP의 치료에 사용하기 위한, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다.
- [0172] 다른 관련 양태에서, 약제의 제조를 위한, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산의 용도가 제공된다.
- [0173] 다른 관련 양태에서, XLRP의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산의 용도가 제공된다.
- [0174] 일부 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열은 인간 G 단백질 결합 수용체 로돕신 키나아제 1(hGRK) 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 바람직한 실시 양태에서, hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4의 서열을 갖는다.
- [0175] 일부 실시 양태에서, 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또

는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열은 발현 카세트의 일부를 형성한다. 일부 양태에서, 발현 카세트는 5'로부터 3'에: (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15 유전자 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함한다. 바람직한 실시 양태에서, 5' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 6으로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖고/갖거나 hGRK 프로모터는 서열 식별 번호 4로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖고/갖거나 SV40 폴리아데닐화 서열은 서열 식별 번호 8로 표시된 뉴클레오타이드 서열 갖고/갖거나 3' AAV2 말단 반복부는 서열 식별 번호 7로 표시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 발현 카세트는 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.

- [0176] 추가 실시 양태에서, 대상체에게 치료 유효량의 재조합 AAV(rAAV) 비리온, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 투여함으로써 XLRP의 치료를 필요로 하는 대상체에서 XLRP를 치료하는 방법이 제공되며, rAAV 비리온은 (i) 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 및 (ii) AAV 캡시드를 포함한다.
- [0177] 관련 실시 양태에서, (i) 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 및 (ii) XLRP의 치료를 위한 AAV 캡시드를 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 비리온의 용도가 제공된다.
- [0178] 다른 관련 실시 양태에서, (i) 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 및 (ii) XLRP의 치료를 위한 약제의 제조용 AAV 캡시드를 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 비리온의 용도가 제공된다.
- [0179] 일부 실시 양태에서, rAAV 비리온은 천연 AAV2, AAV4, AAV5 또는 AAV8 캡시드를 포함한다. 다른 실시 양태에서, rAAV 비리온은 AAV2, AAV4, AAV5, 또는 AAV8에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는 변이체 AAV 캡시드를 포함한다. 바람직한 실시 양태에서, AAV 캡시드는 서열 식별 번호 9의 서열을 포함한다.
- [0180] 일부 실시 양태에서, rAAV 비리온은 (i) 천연 AAV2 캡시드 또는 이의 변이체 및 (ii) 5'로부터 3'에: (a) AAV2 말단 반복부, (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15 유전자 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 바람직한 실시 양태에서, rAAV는 (i) 서열 식별 번호 9의 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 6의 5' AAV2 말단 반복부, 서열 식별 번호 4의 hGRK 프로모터, 서열 식별 번호 8의 SV40 폴리아데닐화 서열 및 서열 식별 번호 7의 3' AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함한다. 특히 바람직한 실시 양태에서, rAAV는 (i) 서열 식별 번호 9의 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0181] 특히 바람직한 실시 양태에서, XLRP의 치료에서 또는 XLRP의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 rAAV의 용도가 제공되며, 여기서 rAAV는 (i) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 및 (ii) 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드를 포함한다. 일부 양태에서, rAAV는 유리체내 주사에 의해 투여된다.
- [0182] 다른 특히 바람직한 실시 양태에서, 대상체에게 (i) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 및 (ii) 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드를 포함하는 rAAV의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 XLRP의 치료 방법이 제공된다. 일부 양태에서, rAAV는 유리체내 주사에 의해 투여된다.
- [0183] 다른 양태에서, 임의로 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0184] 일부 실시 양태에서, 약학적 조성물은 구성적 프로모터, 바람직하게는 서열 식별 번호 4의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일, 또는 100% 동일한 서열을 갖는 hGRK 프로모터에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.
- [0185] 다른 양태에서, 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 (i) AAV 캡시드 및 (ii) 5'로부터 3'에: (a) AAV2 말단 반복부 (b) hGRK 프로모터 (c) 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15 유전자 (d) SV40 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 감염성 rAAV를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 관련

실시 양태에서, 약학적 조성물은 10^9 vg 내지 10^{14} vg, 바람직하게는 10^{10} vg 내지 10^{13} vg의 rAAV를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 3×10^{11} vg 또는 약 1×10^{12} vg의 rAAV를 포함한다.

[0186] 바람직한 실시 양태에서, 약학적 조성물은 (i) 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 6의 5' AAV2 말단 반복부 및/또는 서열 식별 번호 4의 hGRK 프로모터 및/또는 서열 식별 번호 8의 SV40 폴리아데닐화 서열 및/또는 서열 식별 번호 7의 AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함하는 rAAV를 포함한다. 관련 실시 양태에서, 약학적 조성물은 10^9 vg 내지 10^{14} vg, 바람직하게는 10^{10} vg 내지 10^{13} vg의 rAAV를 포함하고, 더욱 바람직하게는 약 3×10^{11} vg 또는 약 1×10^{12} vg의 rAAV를 포함한다.

[0187] 일부 실시 양태에서, 인간 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 감염성 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체의 하나 이상의 광수용체 세포에서 RPGR을 발현시키는 방법이 제공되며, 여기서 RPGR은 하나 이상의 광수용체 세포에서 발현된다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 감염성 rAAV의 유효량은 10^9 vg/eye 내지 10^{14} vg/eye 이고/이거나 rAAV의 단일 용량이 인간 대상체에게 유리체내로(양측 또는 일측) 투여되고/되거나 rAAV는 서열 식별 번호 9의 캡시드를 포함하고/하거나 rAAV는 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중성 핵산을 포함한다.

[0188] 특히 바람직한 실시 양태에서, 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 (i) 서열 식별 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드 및 (ii) 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된 핵산을 포함하는 감염성 rAAV를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 관련 실시 양태에서, 약학적 조성물은 10^{10} vg 내지 10^{13} vg의 rAAV를 포함하며, 바람직하게는 약 3×10^{11} vg 또는 약 1×10^{12} vg의 rAAV를 포함한다.

[0189] 일부 실시 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 또는 감염성 rAAV는 XLRP를 갖는 인간에게 안구주위 또는 안구내(유리체내, 맥락막위 또는 망막하) 주사에 의해 투여되고, 이에 의해 대상체에서 XLRP가 치료된다. 다른 실시 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 또는 감염성 rAAV는 XLRP를 갖는 인간에게 망막하 또는 유리체내로 투여되고, 이에 의해 대상체에서 XLRP가 치료된다. 바람직한 실시 양태에서, XLRP를 갖는 인간 대상체는 본원에 기재된 바와 같은 rAAV의 단일 유리체내 주사(양측 또는 일측)를 투여받는다.

[0190] 관련 양태에서, 치료된 대상체에서 XLRP의 치료는 (i) 대조군에 비해(예를 들어, 치료 전 치료된 환자에서 기준선 측정에 비해, 핵산 또는 rAAV가 일방적으로 투여되는 경우 치료되지 않은 눈에 비해, 또는 XLRP 환자의 치료되지 않은 동시(concurrent) 또는 과거(historical) 대조군에 비해) 시각 기능 또는 기능적 시력의 개선(즉, 증진(gain)) 및/또는 (ii) 대조군(예: 동일한 환자의 치료되지 않은 눈 또는 치료되지 않은 대조군)과 비교하여, 예를 들어 치료 후 6개월, 12개월 또는 24개월에 치료된 눈에서 시각 기능 상실 및/또는 망막 변성의 감소를 포함한다. 이러한 개선은 시력 검사, 미세 시야 측정 및 기타 시야 검사, 광간섭 단층 촬영 스캔 및 안저 자가형광 영상과 같은 해부학적 검사, 망막 전기생리학, 및/또는 삶의 질(quality of life)(QoL) 평가를 포함하되 이에 국한되지 않는 적절한 안과 검사로 평가할 수 있다.

[0191] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 또는 rAAV(또는 이를 포함하는 약학적 조성물)의 유효량은 인간 환자에서 XLRP를 치료하는 데 유효한 양이다. 관련 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV의 유효량은 10^9 내지 10^{14} rAAV 입자(또는 벡터 게놈(vector genome)(vg))/eye, 바람직하게는 10^{10} 내지 10^{13} vg/eye, 또는 1×10^{11} vg/eye 내지 5×10^{12} vg/eye, 더욱 바람직하게는 약 3×10^{11} vg/eye 또는 약 1×10^{12} vg/eye이다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 약 3×10^{11} vg/eye 또는 약 1×10^{12} vg/eye의 단일 용량이 XLRP를 갖는 인간 환자에게 유리체내로 투여되고, 이에 의해 XLRP가 치료된다.

[0192] **실시예**

[0193] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시 양태를 예시하고 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하도록 의도되지 않는다. 본 발명이 바람직한 실시예와 관련하여 기술되었지만, 본 발명의 다양한 수정은 본 출원을 읽는 것으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

[0194] **실시예 1 - 안정성이 개선된 RPGRorf15 cDNA 서열의 코돈 최적화**

성이 제한 분해 후에 검출되었다.

[0201] 코돈 사용 편향, GC 함량, AT-풍부 또는 GC-풍부 영역, mRNA 2차 구조, RNA 불안정성 모티프(motif), 비밀 스플라이싱(cryptic splicing) 부위, 내부 카이(chi) 부위 및 리보솜 결합 부위, 반복 서열을 포함하지만 이에 국한되지 않는 파라미터를 포함하는 다른 최적화 알고리즘을 사용하여 두 번째 코돈 최적화된 hRPGRorf15 서열을 개발했다. 코돈 적응 지수(CAI)를 0.89로 업그레이드하여 인간의 코돈 사용 편향을 변경했다. 평균 GC 함량은 천연 서열의 59.16에서 최적화된 서열의 57로 최적화되어 mRNA의 반감기를 연장시켰다. 본원에서 서열 식별 번호 1로 표시된 생성된 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 개선된 코돈 사용, 변경된 GC 함량, 더 나은 mRNA 안정성 및 음성 시스 작용 요소의 변형을 함유한다.

[0202] 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열(서열 식별 번호 5는 (i) 5' AAV2 ITR(서열 식별 번호 6); (ii) hGRK 프로모터(서열 식별 번호 4)의 제어 하에 코돈 최적화된 hRPGRorf15 cDNA(서열 식별 번호 1); (iii) SV40 후기 polyA 요소(서열 식별 번호 8) 및 (iv) 3' AAV2 ITR(서열 식별 번호 7)를 포함한다)을 포함하는, AAV 플라스미드(pAAV-GRK 프로모터-cohRPGRorf15-SV40)를 구축했다.

[0203] pAAV-GRK 프로모터-cohRPGRorf15-SV40 DNA를 다음과 같이 제조하였다. GenScript의 플라스미드 DNA(20ng)를 사용하여 적격 *대장균*(Cat. #C3040H, New England BioLabs, Ipswich, MA)을 형질전환하고 세포를 Kanamycin 50 µg/ml 플레이트(#L1025, Teknova, Hollister, CA)에 도포했다. 생성된 콜로니로부터 Miniprep 배양물을 성장시키고, GeneJET Plasmid Miniprep 키트(Cat. #0503, ThermoFisher, Waltham, MA)로 DNA를 제조하고 제한 분해하여 양성 클론을 확인했다. Terrific Broth의 50ml 배양액을 하나의 양성 클론에서 성장시키고 Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit(Cat. #12362, Qiagen, Hilden, Germany)로 DNA를 제조했다. pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40의 maxiprep를 다중 제한 효소로 분해하여 플라스미드의 정체를 확인했다. 제한 분해의 겔 전기영동과 예상 단편이 도 1에 도시되어 있다. 모든 실제 단편이 예상 단편과 일치했다. 발현 카세트의 서열은 Sanger DNA 서열로 검증되었다.

[0204] 결론: 제한 분해에 의해 정확하게 매핑된 pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40의 maxiprep 및 이의 완전성은 Sanger DNA 서열에 의해 검증되었다. 따라서, 서열 식별 번호 1로 표시된 코돈 최적화된 hRPGRorf15 서열은 서열 식별 번호 3의 천연 서열 및 서열 식별 번호 10의 코돈 최적화된 서열 모두에 비해 우수한 안정성을 나타낸다.

[0205] **실시예 2 - 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 hRPGRorf15로부터 발현된 인간 RPGRorf15 단백질의 발현 및 활성화**

[0206] pAAV-GRK-cohRPGRorf15-SV40으로부터 발현된 인간 RPGRorf15 단백질의 발현 및 활성을 형질감염된 HEK293T 세포에서 평가하였다.

[0207] 간단히 말해서, HEK293T 세포를 1.0ml DMEM/10% FBS 배지에서 2.0×10^5 세포/웰로 12-웰 플레이트에 시딩하였다. HEK293T 세포는 높은 형질감염성과 단백질 발현때문에 사용되었다. 다음날, 3.0µl FuGene6(Cat.# E2691, Promega, Madison, WI)과 복합체화된 1.0µg AAV 플라스미드 DNA를 중복 웰의 세포에 첨가하였다. 형질감염 2일 후, 세포를 PBS로 세척하고 1x Halt Protease Inhibitor(ThermoFisher)를 함유하는 0.25ml 1x Passive Lysis Buffer(Promega)에서 용해하고 실온에서 15분 동안 흔들었다. 세포 파편(debris)은 4°C에서 10분 동안 12,000g의 마이크로 원심분리기에서 원심분리하여 펠렛으로 만들었다. 상청액을 수집하고 -20°C에 보관하였다. 무-플라스미드 및 pAAV-PGK 프로모터-cohRPGRorf15-SV40 샘플을 각각 음성 및 양성 대조군으로서 형질감염에 포함시켰다. pAAV-PGK 프로모터-cohRPGRorf15-SV40은 코돈 최적화된 hRPGRorf15가 hGRK 프로모터가 아닌 유비쿼터스 프로모터 3-포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터에 작동 가능하게 연결된다는 점을 제외하고는 앞서 언급한 AAV 벡터와 동일하다.

[0208] 세포 용해물(20µl)을 10µl 4x LDS, 4µl 10x 환원제 및 6µl 물(최종 부피 = 40µl)과 혼합하고 70°C에서 10분 동안 변성시켰다. 샘플을 12-웰 Bolt 4-12% Bis-Tris Plus 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen, NW04122BOX)에 로딩하고 200V에서 32분 동안 1x MOPS 버퍼에서 실행했다. 분리된 단백질을 iBlot 2 장치(ThermoFisher)를 사용하여 10분 동안 니트로셀룰로오스 필터로 옮기고 1차(primary) anti-RPGR(Sigma HPA001593 1:2000 및 GenScript CT-15 U1729DC260_16 1:500) 및 anti-polyglutamylation GT335(AG -20B-0020 1:500, Adipogen, San Diego, CA)로 프로빙했으며, 이는 iBind Flex 장치(ThermoFisher)를 사용했다. 2차 항체는 항-RPGR 1차 항체에 대한 HRP-접합 염소 항-토끼(ThermoFisher 31460) 및 항-폴리글루타미드 1차 항체에 대한 HRP-접합 염소 항-마우스(ThermoFisher 31430)였다. 단백질을 SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate(ThermoFisher 34076)로 시각화하고 ChemiDoc MP(BioRad, Hercules, CA)에서 이미지화했다. 사용된 모든 항체는 아래 표 3에 나열되어 있다.

[0209] [표 3] 웨스턴 블롯 항체

| Antibody | Host species | Vendor | Catalog # | Dilution |
|--------------------------------|--------------|-----------|---------------|----------|
| Anti-RPGR polyclonal | Rabbit | Sigma | HPA001593 | 1:2,000 |
| Anti-CT-15 | Rabbit | GenScript | U1729DC260_16 | 1:500 |
| Anti-Polyglutamylolation GT335 | Mouse | Adipogen | AG-20B-0020 | 1:500 |
| HRP anti-Rabbit IgG (H+L) | Goat | Thermo | 31460 | 1:5,000 |
| HRP anti-Mouse IgG (H+L) | Goat | Thermo | 31430 | 1:5,000 |

[0210]

[0211] 도 2는 형질감염된 HEK293T 세포로부터의 용해물의 대표적인 웨스턴 블롯의 이미지를 보여준다. CT-15 및 Sigma 항체는 RPGR로 형질감염되었지만 형질감염되지 않은 용해물에는 존재하지 않는 RPGRorf15로 보이는 동일한 135-140kd 중을 검출하며, 올바른 크기이며 폴리글루타미드화 검출 항체 GT335에 의해 인식된다. 광수용체 세포에서 우선적으로 활성화되지 않는 유비쿼터스 PGK 프로모터에 의해 구동될 때 발현이 더 높다.

[0212] 결론 - 형질감염된 HEK293T 세포로부터의 용해물의 웨스턴 블롯 분석은 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 hRPGRorf15로부터 발현된 정확한 크기의 hRPGRorf15 단백질의 발현 및 폴리-글루타미드화를 입증한다.

[0213] **실시예 3 - 인간 XLRP의 시험관 내 모델에서 hRPGRorf15의 기능적 발현**

[0214] 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 코돈 최적화된 인간 RPGRorf15 핵산으로 X-연관 색소성 망막염 (XLRP) 질환 표현형의 교정을 평가하기 위해 인간 시험관 내 모델 시스템을 생성했다. 이를 위해, 인간 G-단백질 결합 수용체 로돕신 키나아제 1(hGRK) 프로모터(즉, 서열 식별 번호 5의 서열을 갖는, 실시예 1 및 2에 기술된 AAV 벡터 백본(backbone)) 및 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 변이체 캡시드 단백질에 의해 구동되는 서열 식별 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 AAV 벡터를 구축했다. RPGRorf15의 발현을 광수용체로 제한하기 위해 hGRK 프로모터를 선택했다.

[0215] 말초 혈액 단핵 세포(Peripheral blood mononuclear cell)(PBMC)를 XLRP를 가진 개체로부터 채취한 전혈(whole blood)로부터 분리하고 CytoTune iPS 2.0 Sendai 재프로그래밍 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)(iPSC)로 재프로그래밍했다. 만능 줄기 세포의 다능성은 Sox2, Oct4 및 Nanog를 포함하는 iPSC 마커를 검사하는 면역세포화학에 의해 확인되었다. 유도 만능 줄기세포는 이후 Gonzalez-Cordero *et al.*, Stem Cell Report, 9, 820:837 (2017); Gonzalez Cordero *et al.*, Human Gene Therapy, 29(1) (2018); 및 Meyer *et al.*, Stem Cells, 29(8):1206-1218 (2011)에 기재된 방법에 의해 광수용체로 분화되었다. 광수용체 분화는 특정 마커, 리커버린(Recoverin) 및 로돕신을 검사하는 면역세포화학에 의해 확인되었다. 광수용체는 hRPGRorf15 단백질 발현 및 기능성을 부여하는 것으로 알려진, hRPGRorf15 단백질의 글루타미드화가 부족한 것으로 확인되었다.

[0216] 면역세포화학은 다음과 같다: 세포를 4°C에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)(PFA)(Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX)로 고정시켰다. 모든 항체 염색은 0.2% Triton-X100(Sigma-Aldrich), 2% 소혈청 알부민(Millipore Sigma, Burlington, MA) 및 5% 염소 혈청(Thermo Fisher Scientific)을 갖는 PBS의 차단 용액에서 수행되었다. 1차 항체 배양은 4°C에서 밤새 수행되었다. 그런 다음 세포를 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 배양한 다음 실온에서 5분 동안 PBS에서 DAPI(Sigma Aldrich)로 대조염색했다. Zeiss Axio Observer.D1 Fluorescent Microscope를 사용하여 세포를 이미지화했다. Zeiss Zen 2 소프트웨어(Carl Zeiss Microscopy LLC, White Plains, NY)를 사용하여 이미지 처리를 수행했다. 1차 및 2차 항체 목록은 표 4에 제공된다:

[0217] [표 4]

| Antibody | Host | Company-Catalog No. | Dilution |
|--|--------|------------------------------|----------|
| <i>Primary Antibodies</i> | | | |
| OCT4 | Mouse | Millipore- MAB4401 | 1:50 |
| Nanog | Rabbit | Abcam- ab21624 | 1:50 |
| SOX2 | Rabbit | Abcam- ab92494 | 1:50 |
| Beta-Tubulin III | Mouse | Sigma- T8578 | 1:200 |
| HNF4- α | Rabbit | Santa Cruz-SC-8987 | 1:100 |
| A-SMA | Mouse | Sigma Aldrich- A2547 | 1:500 |
| Recoverin | Rabbit | EMD Millipore- AB5585 | 1:100 |
| Rhodopsin | Mouse | Abcam- AB98887 | 1:100 |
| RPGR | Rabbit | Sigma- HPA001593 | 1:2000 |
| GT335 | Mouse | Fisher Adipogen- 50-463-394# | 1:4000 |
| Alpha Tubulin | Rabbit | Abcam- ab52866 | 1:4000 |
| <i>Secondary Antibodies</i> | | | |
| Alexa Fluor488 anti-rabbit | Goat | Invitrogen-A11078 | 1: 500 |
| Alexa Fluor555 anti-rabbit | Goat | Invitrogen-A21428 | 1:500 |
| Alexa Fluor680 anti-rabbit | Goat | Invitrogen-A21109 | 1:500 |
| Alexa Fluor488 anti-mouse | Goat | Invitrogen-A11029 | 1:500 |
| Alexa Fluor555 anti-mouse | Goat | Invitrogen-A21422 | 1:500 |
| Alexa Fluor680 anti-mouse | Goat | Invitrogen-35518 | 1:500 |
| Horseradish Peroxidase anti-Rabbit IgG (H+L) | Goat | Thermo- 31460 | 1:5000 |
| Horseradish Peroxidase anti-Mouse IgG (H+L) | Goat | Thermo- 31430 | 1:5000 |

[0218]

[0219]

XLRP-iPSC 유래 병든(diseased) 광수용체 내로의 형질도입 후 코돈 최적화된 RPGRorf15 이식유전자의 전사체 수준을 평가하기 위해, XLRP 광수용체(PR)를 분석의 검출 한계 이상의 수준을 보장하기 위해 50,000의 감염 다중도(MOI, 세포당 바이러스 계놈)로 전술한 AAV 벡터로 형질도입하였다. 형질도입 30일 후 RNA를 분리하고 cDNA를 합성했다. 준비된 샘플에서 디지털 액적 PCR을 실행하고 액적당 전사 수준을 copy/mL 값으로 분석했다. 프라이머/프로브 세트의 전사체를 포함하는 설정된 임계값 이상의 액적 수의 정량화를 검사했다. 내인성 인간 RPGR1-19 구성적 이소형(hRPGR1-19)으로부터 코돈 최적화된 인간 RPGRorf15 이식유전자를 특이적으로 분화하기 위해 2개의 프라이머/프로브 세트를 생성하였다.

[0220]

형질도입되지 않은 XLRP 병에 걸린 세포는 예상대로 낮은 배경 수준의 cohRPGRorf15 전사체를 발현했다. AAV 벡터로 형질도입한 후 세포는 hRPGR1-19와 비교하여 cohRPGRorf15 전사체 수준이 400배 이상 증가한 것으로 나타났다. 형질도입된 세포는 형질도입되지 않은 세포 cohRPGRorf15 수준과 비교하여 cohRPGRorf15 전사체가 1000배 이상 증가한 것으로 나타났다. 형질도입되지 않은 세포는 cohRPGRorf15보다 hRPGR1-19 수준이 더 높았다. 도 3을 참조. 분석은 3회 수행되었으며 수준은 평균화되었다. 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 hRPGRorf15를 포함하는 AAV 벡터로의 형질도입은 광수용체 배양물에서 cohRPGRorf15의 전사 수준을 상당히 증가시켰다.

[0221]

AAV 벡터를 사용한 XLRP-iPSC 유래 광수용체 세포의 형질도입에 의해 생성된 코돈 최적화된 인간 RPGRorf15 이식유전자의 단백질 수준을 평가하기 위해, XLRP-iPSC 유래 병든 광수용체를 50,000 vg/cell의 MOI로 형질도입하였다. 형질도입 30일 후 세포 용해물을 수집하고 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 hRPGRorf15 단백질 수준을 평가했다. 밴드 강도는 정량화되었으며 도 4에 히스토그램으로 표시되어 있다. AAV 벡터를 사용한 형질도입은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 인간 RPGRorf15 단백질의 발현의 상당한 증가를 이끌어냈다.

[0222]

광수용체에 외인성으로 도입된 cohRPGRorf15 단백질이 기능적인지 여부를 결정하기 위해, 기능의 대용물인 글루

타밀화를 조사하였다. 공개된 연구에 따르면 hRPGRorf15의 글루타밀화와 단백질 기능은 강한 상관관계가 있다.(Fischer et al., 2017; Rao et al., 2016; Sun et al., 2016). XLRP-iPSC 유래 병든 PR은 50,000 vg/cell의 MOI로 형질도입되었다. 형질도입 30일 후 세포 용해물을 수집하고 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 발현된 hRPGRorf15 단백질의 글루타밀화를 평가하였다. 글루타밀화는 글루타밀화 특이적 항체인 GT335로 막(membrane)을 프로빙하고 hRPGRorf15 크기, 127kDa로 양성 밴딩 패턴을 조사하여 결정되었다. 밴드 강도를 정량화하여 도 5에 히스토그램으로 표시했다. 코돈 최적화된 hRPGRorf15 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 AAV 벡터를 사용한 PR 세포의 형질도입은 두 XLRP 환자 유래 병든 광수용체에서 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 인간 RPGRorf15 단백질의 글루타밀화에서 상당한 증가를 가져왔다.

[0223] 높은 MOI를 사용한 웨스턴 블롯에서 검출된 낮은 hRPGRorf15 단백질 수준으로 인해, hRPGRorf15 코돈 최적화된 이식유전자(cohRPGRorf15)의 용량 반응이 확인되었다. 이를 위해, 유비쿼터스 프로모터 3-포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 및 서열 식별 번호 9의 캡시드에 작동 가능하게 연결된 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 RPGRorf15 서열을 포함하는 AAV 벡터를 구성하였다(이 AAV 벡터는 프로모터를 제외하고 상기 기재된 AAV 벡터와 동일하다). 병든 광수용체는 3개의 MOI, 5,000, 10,000 및 20,000로 형질도입되었다. 형질도입 30일 후 세포 용해물을 수집하고 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 hRPGRorf15 단백질 수준 및 글루타밀화(GT335 = 항글루타밀화 항체)를 평가했다. 밴드 강도를 정량화하고 히스토그램으로 표시했다(도 6). 높은 가변성이 있었지만, 배양물의 이질성으로 인해, hRPGRorf15 단백질 및 hRPGRorf15의 글루타밀화는 cohRPGRorf15 발현을 유도하기 위한 구성적 프로모터를 사용하여 더 낮은 MOI로 관찰되었다.

[0224] 결론 - iPSC 유래 광수용체를 사용한 시험관 내 연구는 서열 식별 번호 1의 코돈 최적화된 hRPGRorf15의 AAV-매개 전달이 인간 XLRP 병든 광수용체에서 인간 RPGRorf15 전사체 및 이식유전자 발현을 회복시킨다는 것을 입증하였다. 또한, 4D-125의 형질도입 후 발현되는 RPGRorf15 단백질은 번역 후 글루타밀화되었다. 공개된 문헌에 따르면 글루타밀화는 RPGRorf15의 기능을 부여한다.

[0225] **실시예 4 - 비인간 영장류에서 유리체내 투여를 통해 R100에 의해 전달된 코돈 최적화된 RPGRorf15 cDNA 서열의 안전성 및 생물학적 분포 평가**

[0226] **재료 및 방법**

[0227] *GLP 독성학 및 생물학적 분포 연구*

[0228] 2 내지 14세의 수컷 시노몰구스 마카크(*cynomolgus macaques*)(*macaca fascicularis*)에게 100 μ l/eye의 총 용량 부피에 대해 공막을 통해 각각의 눈에 2회 50 μ l 유리체내 주사를 통해 투여하였다. 1x10¹¹ vg/eye 및 1x10¹² vg/eye의 용량을 평가했다. 동물을 케타민(Ketamine) IM으로 마취시키고 통증을 제거하기 위해 국소 안과용 용액을 제공하였다. 20-80mg의 메틸프레드니솔론(methylprednisolone)을 주사 후 매주 IM 주사에 의해 투여하였다. 안락사는 투여 후 3주, 13주 및 26주에 훈련된 수의사 직원에 의해 수행되었다.

[0229] 4D-125(서열 식별 번호 9의 캡시드 단백질 및 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이중성 핵산을 포함하는 rAAV) 게놈 생물학적 분포를 모든 주요 안구 구획(망막, 시신경, 모양체, 홍채, 섬유주대) 및 주요 전신 기관(고환 포함)에서 검증된 GLP-compliant qPCR 분석을 사용하여 평가했다. 게놈이 검출된 조직에서 적격 한 GLP-compliant RT-qPCR 분석으로 이식유전자 발현을 평가했다.

[0230] 본 연구에서 수행된 일련의 독성학 평가는 임상 안구 평가(SD-OCT 이미징 및 ERG를 포함하는 완전한 안과 검사), 전신 평가, 임상 병리학, 육안 병리학 및 현미경 병리학이었다. 항-캡시드 및 항-이식유전자 항체 반응을 결정하기 위해 분석을 검증하였다. R100 캡시드(서열 식별 번호 9의 변이체 캡시드 단백질 포함) 및 발현된 단백질에 대한 세포 반응을 검출하기 위해 ELISpot 분석을 검증하였다.

[0231] *중화 항체 분석*

[0232] 2v6.11 세포를 감염 24시간 전에 3x10⁴ 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. CAG 프로모터에 의해 구동되는 반딧불이 루시페라아제(firefly luciferase)를 인코딩하는 rAAV 벡터를 감염 전에 개별 혈청 샘플과 함께 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음, 세포를 1,000의 게놈 MOI로 감염시켰다. Luc-Screen Extended-Glow Luciferase Reporter Gene Assay System(Invitrogen) 또는 ONE-Glo Luciferase Assay System(Promega)을 사용하여 감염 48시간 후 루시페라아제 활성을 평가하고 BioTek Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader 및 Gen5 소프트웨어를 사용하여 정량화했다.

[0233] 연구에 등록하기 전에, 비인간 영장류(non-human primate)(NHP) 혈청을 R100에 대한 중화 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다. NHP는 샘플이 1:10 혈청 희석에서 AAV 형질도입의 50% 미만 중화를 초래했을 때 연구에 등록되었다.

[0234] AAV 제조

[0235] 제조합 R100 바이러스 벡터는 HEK293 세포에서 일시적 형질감염에 의해 생성되었다. 세포는 FBS가 보충된 DMEM에서 배양되었고 5% CO₂ 환경에서 37°C로 유지되었다. 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)(PEI)을 사용하여 세포를 삼중으로 형질감염시켰다(페이로드, 캡시드 및 헬퍼 플라스미드). 형질감염 48-96시간 후, 바이러스 입자를 세포 및/또는 상청액으로부터 수확하고 세포를 미세유동화를 통해 용해시켰다. 세포 용해물 및/또는 상청액을 효소 처리하여 플라스미드 및 숙주 세포 DNA를 퇴화한 다음 접선 흐름 여과(tangential flow filtration)(TFF)에 의해 정화 및 농축했다. 그런 다음 TFF 잔류물을 정제를 위해 친화성 수지 컬럼에 로딩했다. pH 구배 용리 후, 친화성 후 물질을 완충제 교환한 다음, 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제(필요한 경우)했다. 이어서 정제된 rAAV를 0.001% 폴리소르베이트(polysorbate)-20과 함께 DPBS로 제형화하고 멸균 여과하고 충전하여 rAAV 약물 제품을 수득하였다.

[0236] 결과

[0237] 4D-125 전달은 안전하며 NHP에서 치료적 이식유전자의 발현을 초래한다

[0238] 4D-125(R100.GRK-cohRPGRorf15)은 1-2상 임상 시험으로 진행되었다. 이 제품에 대한 시험용 신약(Investigational New Drug)(IND) 가능 데이터에는 6개월 우수 실험실 관리기준(Good Laboratory Practices)(GLP) 독성학 및 생물학적 분포 연구에서의 평가가 포함된다(표 5). 총 30개 눈 중 30개 눈의 NHP에 단일 눈 투여로 유리체내 주사를 시행하였다.

[0239] [표 5] 우수 실험실 관리기준(GLP) 독성학 및 생물학적 분포 연구

| 4DMT Study Number | Lot Number | Number | Gender | Eye(s) | Dose | In-Life |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------|--------------|----------|
| 4DEP000008.01 | N/A | 1 | Male | OD | vehicle | 3 weeks |
| | 4DEP000008.01 | 5 | Male | OD | 1E+11 vg/eye | |
| | | 5 | Male | OD | 1E+12 vg/eye | |
| 4D18-08 | N/A | 1 | Male | OD | vehicle | 13 weeks |
| | 4DEP000008.01 | 5 | Male | OD | 1E+11 vg/eye | |
| | | 5 | Male | OD | 1E+12 vg/eye | |
| 4DEP000008.01 | N/A | 1 | Male | OD | vehicle | 26 weeks |
| | 4DEP000008.01 | 5 | Male | OD | 1E+11 vg/eye | |
| | | 5 | Male | OD | 1E+12 vg/eye | |

[0240]

[0241] 임상 관찰, 조직병리학, OCT 또는 ERG에 의해 결정된 바와 같이, 어느 용량 수준에서든 4D-125에서 유의한 독성이 관찰되지 않았다. 단일 눈에 4D-125를 투여한 결과 투여 직후 기간으로 제한되고 3주차까지 해결된 경미한 정도의 전포도막염만 발생했다(도 9); 어떤 경우에는 전신 스테로이드 용량이 일시적으로 증가했다.

[0242] 매우 높은 수준의 벡터 게놈이 모든 시점(3주, 왼쪽 패널; 13주, 중간 패널; 26주, 오른쪽 패널)에서 치료된 눈의 망막에 존재하여 안구 조직에서 벡터의 지속성을 나타낸다(도 10). 망막 이외에, 모든 시점에서 안방수, 유리체액, 홍채/모양체 및 시신경 샘플 내에서 치료된 눈에서 벡터 게놈이 검출되었다. 비안구 조직은 일반적으로 간, 비장 및 림프절에서 낮은 수준을 제외하고는 검출 가능한 벡터 게놈이 없었다(도 10). R100 벡터 유래 이식 유전자 발현은 저용량 및 고용량 그룹 모두에서 치료된 망막 및 홍채/모양체에서 검출되었다(도 11). 유전자 발현은 용량-의존적이었고 3주에서 13주까지 증가했으며 26주에 안정적으로 유지되었다(도 11, 각각 왼쪽, 중간 및 오른쪽 패널). 26주차에 어떤 비안구 벡터 발현도 검출되지 않았다(도 11).

[0243] ELISpot 분석을 사용하여 세포 면역 반응을 평가한 결과, 어떤 동물도 R100 캡시드 펩티드 또는 이식유전자 펩티드에 대해 유의미한 반응을 나타내지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 4D-125를 투여한 대부분의 동물은 투여 후 항-캡시드 항체 반응을 생성했다(데이터는 표시되지 않음).

[0244] 요약

[0245] 4D-125(R100.GRK-cohRPGRorf15)는 최근 유전성 망막 질환 x-연관 색소성 망막염(NCT04517149)에 대한 임상 시

험으로 해석되었다. 이 치료제는 GLP 독성학 및 생물학적 분포 연구에서 평가되었다(표 5). 총 30개의 NHP가 단일 눈 투여 주사되었고; 총 30개의 NHP 눈에 주사되었다. 유의미한 테스트 기사 관련 부작용이나 T 세포 반응은 보고되지 않았다. 경증에서 중등도의 일시적인 코르티코스테로이드(corticosteroid) 반응성 전포도막염이 관찰되었다. 이식유전자 발현은 망막에 국소화되었고, 평가된 전신 장기 중 어느 것에서도 발현이 검출되지 않았다. 유리체내 주사에 의해 이 제품의 안전성, 약력학 및 효능(연속 시야 검사 및 광간섭 단층 촬영 스캔 포함)을 결정하기 위한 인체 임상 시험이 진행 중이다.

[0246] **실시예 5 - 인간 X-연관 색소성 망막염 환자에서 유리체내 투여를 통해 R100에 의해 전달된 코돈 최적화된 RPRorf15 cDNA 서열의 안전성 평가**

[0247] 초기 1상 용량 증가(dose escalation) 안전성 및 내약성 데이터 요약

[0248] 임상 시험 설계 및 등록

[0249] 임상 시험은 2가지 용량 수준(3E11 또는 1E12 vg/eye)에서 4D-125의 단일 유리체내 주사의 안전성, 내약성 및 생물학적 활성을 평가하도록 설계된 표준 "3+3" 용량-증가를 사용하였다. 용량 증가 코호트(cohort)에 걸쳐 총 6명의 환자가 등록되었으며 각 용량 수준에서 3명이 등록되었다. 환자는 테이퍼(taper)로 표준 면역 억제 요법을 받았다. 조정은 조사관에 의해 결정되었다. 기재된 결과는 투여 후 4-9개월 사이의 데이터 컷오프를 기반으로 한다.

[0250] 초기 내약성 및 부작용 프로파일

[0251] 4D-125는 응급 치료가 필요한 중대한 부작용(treatment-emergent adverse event)(AE) 요약 표(표 6)에 약속된 바와 같이 평가 기간 내내 내약성이 양호하였다:

[0252] [표 6] 부작용 요약

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Patient # enrolled | 6 |
| Doses | 3E11 or 1E12 vg/eye |
| Follow-up at data cut-off (months) | 4-9 months |
| Dose-Limiting Toxicities (DLTs) | 0 (0%) |
| Serious AE | 0 (0%) |
| Any CTCAE Grade ≥ 3 | 0 (0%) |
| Retinal AE (Any Grade) | 0 (0%) |
| Uveitis CTCAE Grade 2 (moderate) | 1/6 (17%) |
| Uveitis CTCAE Grade 1 (mild) | 2/6 (33%) |

[0253]

[0254] 임상 평가

[0255] 예비 생물학적 활성은 망막 민감도를 측정하기 위한 미세 시야 측정(microperimetry)(MP) 및 타원대 영역(ellipsoid zone area)(EZA)을 측정하기 위한 SD-OCT를 사용하여 평가되었다. 7명의 대상체(연령 중앙값 42.5세, 범위 27-56세)는 4.2-12.5개월의 추적 관찰 기간 동안 4D-125(3×10^{11} vg/eye(n=3) 및 1×10^{12} vg/eye(n=4))를 받았다. 안내 염증(대상체 4/7)은 경증 또는 중등도, 일시적(지속 기간 0.9-1.6개월) 및 스테로이드 반응성이었다. 대부분의 대상체는 진행된 질병을 가졌으며 2명만이 양쪽 눈의 기준선(baseline)(BL)에서 측정 가능한 EZA와 평균 MP 망막 민감도(mean MP retinal sensitivity)(mMPRS)를 모두 갖고 적어도 4개월의 추적 관찰을 했다. 두 대상체 모두 치료를 받은 눈과 치료를 받지 않은 눈에서 mMPRS(9개월에 +1.65dB 대 +0.25dB 및 4개월에 +0.50dB 대 +0.10dB; BL 값 1.5-3.2dB) 및 > 7dB 감도를 얻는 유전자좌의 수(9개월에 6 대 1 및 4개월에 3 대 0)의 BL에서 더 크게 증가했다. BL EZA의 상대적인 감소는 두 대상체에 대해 치료된 눈과 치료되지 않은 눈에 더 적었다(9개월에서 -12.4% 대 -16.2% 및 6개월에서 -20.2% 대 -28.7%).

[0256] 1/2상 연구 동안, 필요에 따라 혈액 검사 및 전신 검사와 함께 상세한 안과 평가 및 망막 영상화를 포함하여 환자의 안구 및 전신 상태를 면밀히 모니터링했다. 예비 효능 징후를 감지하기 위해 다양한 시각 기능 및 해부학적 평가가 수행된다. 이러한 평가에는 타원대(ellipsoid zone)(EZ) 영역, 안저 자가형광, 미세 시야 측정, 정적 자동 시야 측정 및 최고 교정 시력(best corrected visual acuity)(BCVA)의 측정이 포함되지만 이에 국한되지

않는다.

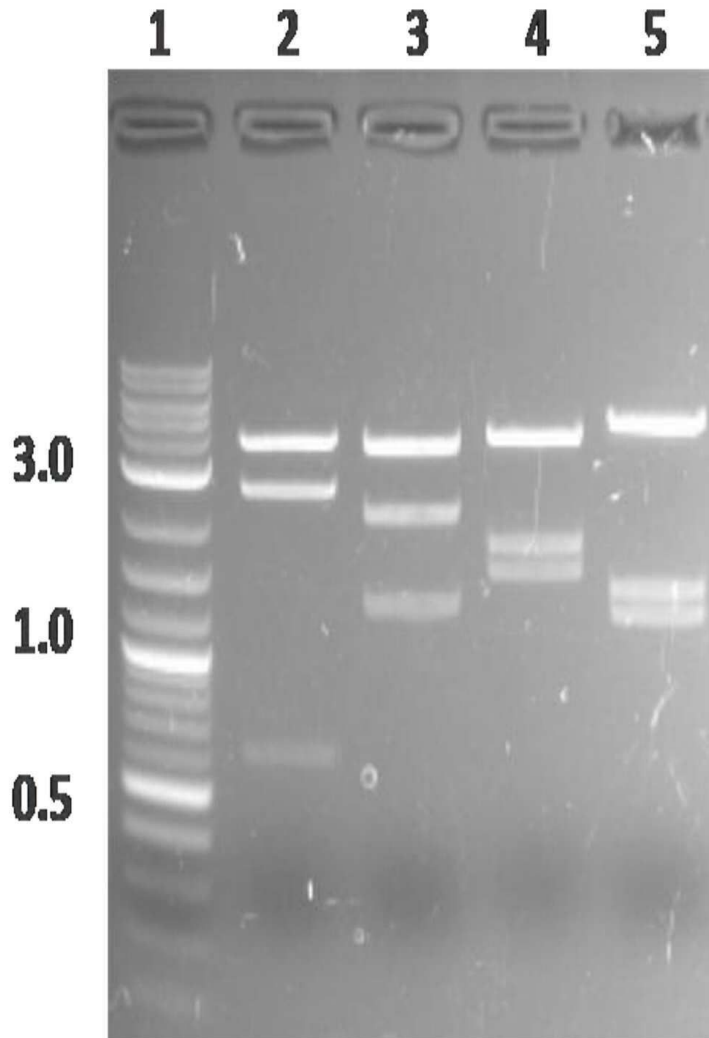
[0257] 결론

[0258] 유리체내로 투여된 4D-125는 경증 또는 중등도의 일시적인 스테로이드 반응성 안구내 염증에 내약성이 양호했다. 미세 시야 측정 및 SD-OCT를 기반으로 2명의 평가 가능한 용량 증량 대상체에서 생물학적 활동의 예 비 징후가 관찰되었다. 이러한 소견은 진행 중인 1/2상 연구에서 질병이 덜 진행된 XLRP 대상체에서 1×10^{12} vg/eye 용량으로 용량 확장을 지원한다.

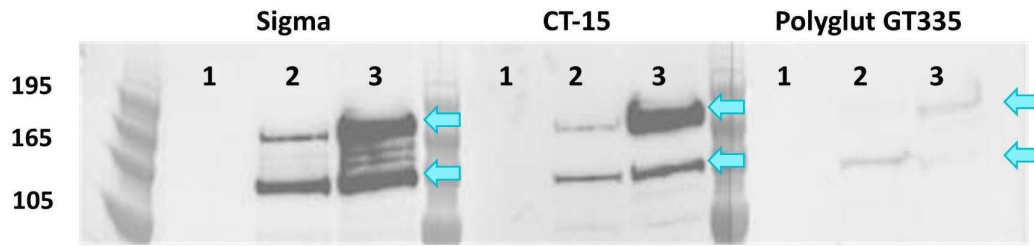
[0259] 본 발명의 재료 및 방법이 바람직한 실시 양태와 관련하여 기재되었지만, 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나 지 않고 본원에 설명된 방법에 변형이 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 당업자에게 자명한 그러한 모든 유사한 대체물 및 수정은 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

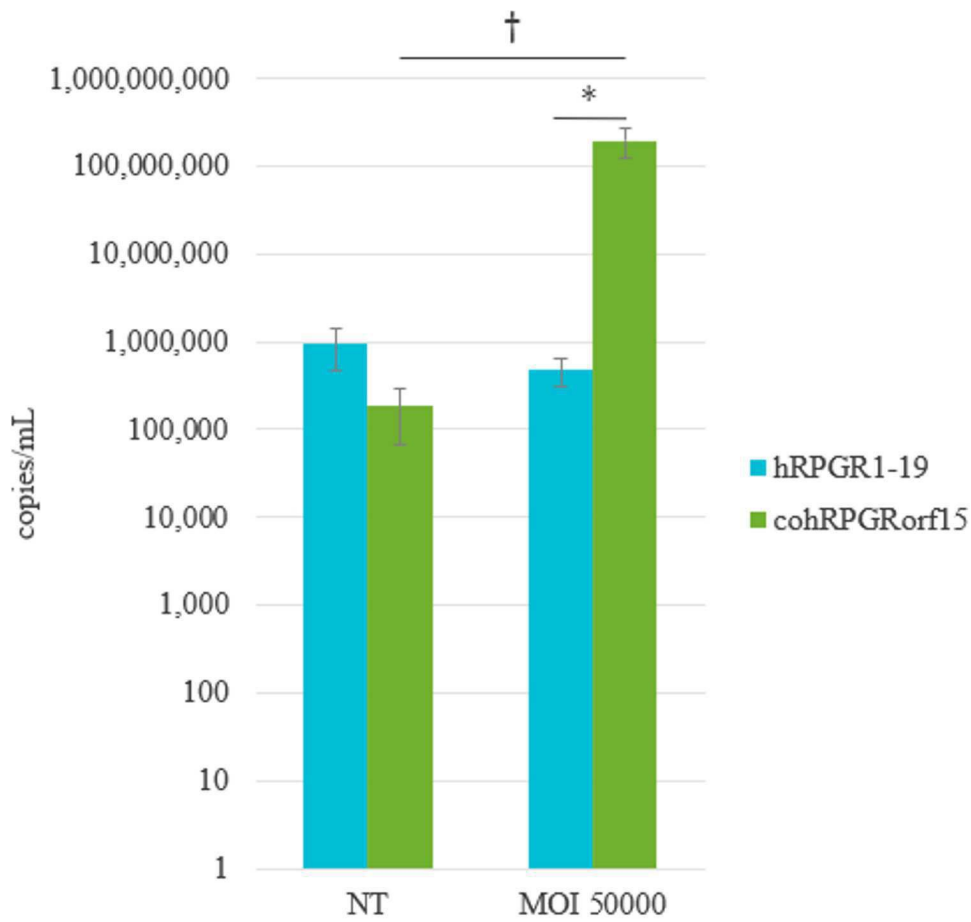
도면1



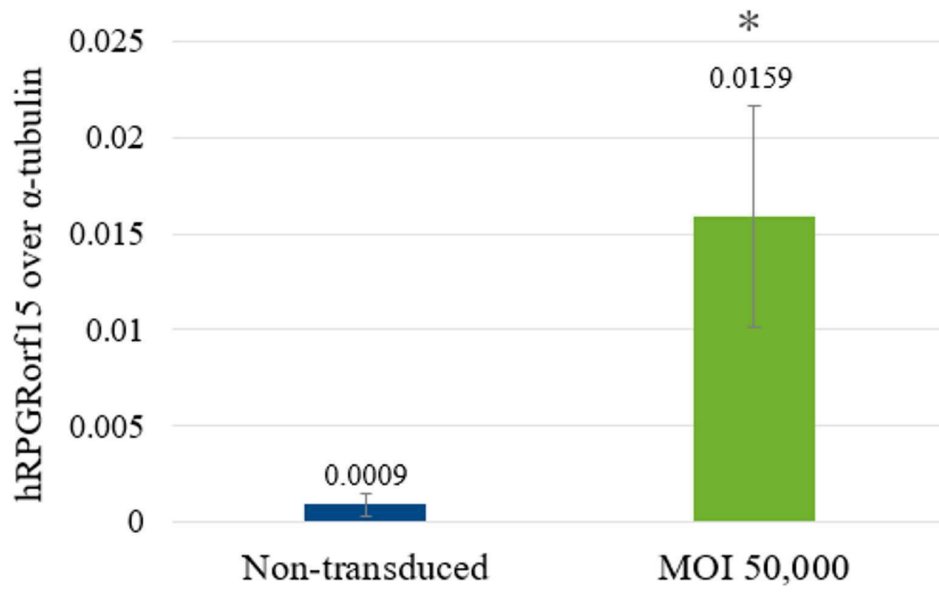
도면2



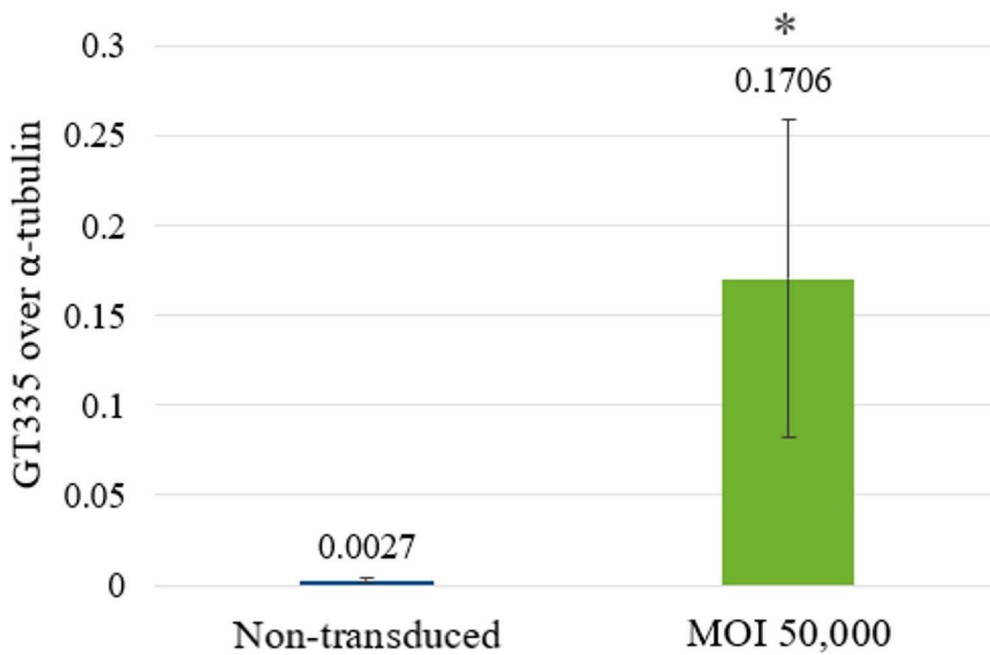
도면3



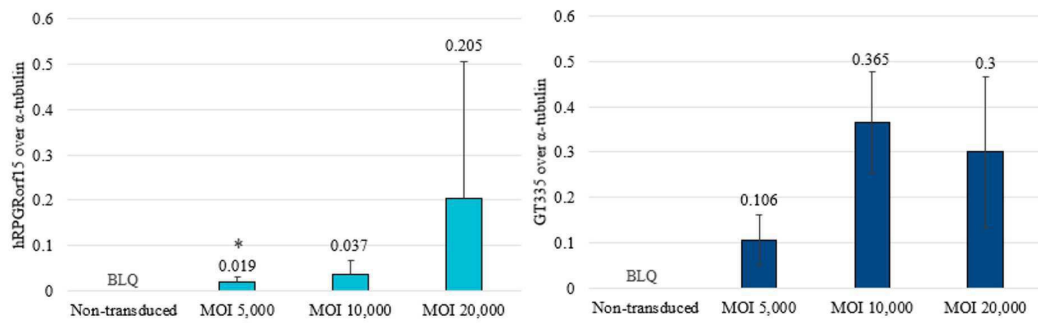
도면4



도면5



도면6



도면7a

NarI
KasI

ATGAGAGAACCCGAGGAACCTGATGCCCGACTCTGGCGCCGTGTTTACCTTCGGCAAGAGC
 1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACTCTCTTGGGCTCTTGGCTGACTACGGGCTGAGACCGCGGCACAAATGGAAGCCGTTCTCG
M R E P E E L M P D S G A V F T F G K S
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19

AAGTTCGCGGAGAACAACCCCGCAAGTTCTGGTTCAAGAACGACGTGCCAGTGCACCTG 61 --
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCAAGCGGCTCTTGGTGGGCGGTTCAAGACCAAGTTCTTGTGTCACGGTCACGTGGAC
K F A E N N P G K F W F K N D V P V H L
21 23 25 27 29 31 33 35 37 39

BstEII

AGCTGCGGAGATGAACACTCTGCCGTGGTCACCGGCAACAACAAGCTGTACATGTTCCGGC
 121-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGACCGCTCTACTTGTGAGACGGCACCAGTGGCCGTTGTTGTCGACATGTACAAGCCG
S C G D E H S A V V T G N N K L Y M F G
41 43 45 47 49 51 53 55 57 59

BspMI

AGCAACAACCTGGGGCCAGCTCGGCCTGGGATCTAAGTCTGCCATCAGCAAGCCTACCTGC
 181-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTTGTTGACCCCGTTCGAGCCGGACCCCTAGATTTCAGACGGTAGTCGTTCCGGATGGACG
S N N W G Q L G L G S K S A I S K P T C
61 63 65 67 69 71 73 75 77 79

GTGAAGGCCCTGAAGCCTGAGAAAGTGAAACTGGCCGCTGCGGCAGAAATCACACCCTG 241 -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTTCCGGGACTTCGGACTCTTTCACTTTGACCGCGGACGCCGCTTTTAGTGTGGGAC
V K A L K P E K V K L A A C G R N H T L
81 83 85 87 89 91 93 95 97 99

GTTTCTACCGAAGCGGCAATGTGTATGCCACCGCGGAAACAATGAGGGACAGCTTGA 301 -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAAGATGGCTTCCGCGGTTACACATACGGTGGCCGCTTTGTTACTCCCTGTTCGAACCT
V S T E G G N V Y A T G G N N E G Q L G
101 103 105 107 109 111 113 115 117 119

BclI

CTGGGCGACACCGAGGAAAGAAACACCTTCCACGTGATCAGCTTTTTTACCAGCGAGCAC
 361-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACCCGCTGTGGCTCCTTCTTGTGGAAGGTGCACTAGTCGAAAAAGTGGTCGCTCGTG
L G D T E E R N T F H V I S F F T S E H
121 123 125 127 129 131 133 135 137 139

PvuII

AAGATCAAGCAGCTGAGCGCCGCTCTAATACCTCTGCCGCTCTGACAGAGGACGGCAGA
 421-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCTAGTTCGTCGACTCGCGCCGAGATTATGGAGACGGCGAGACTGTCTCCTGCCGCTCT
K I K Q L S A G S N T S A A L T E D G R
141 143 145 147 149 151 153 155 157 159

CTGTTTATGTGGGCGACAATTCTGAGGGCCAGATCGGACTGAAGAACGTGTCCAATGTG 481 -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACAAATACACCCCGTGTAAAGACTCCCGGTCTAGCCTGACTTCTGACAGGTTACAC
L F M W G D N S E G Q I G L K N V S N V
161 163 165 167 169 171 173 175 177 179

도면7b

(cont'd)

PvuII

TGCGTGC CCCAGCAAGTGACAATCGGCAAGCCTGTGTCTTGGATCAGCTGCGGCTACTAC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGCACGGGGTCGTTCACTGTTAGCCGTTCCGGACACAGAACCTAGTCGACGCCGATGATG
C V P Q Q V T I G K P V S W I S C G Y Y
181 183 185 187 189 191 193 195 197 199

Pf1MI

CACAGCGCCTTGTGACAACCGATGGCGAGCTGTATGTGTTCGGCGAGCCAGAGAATGGC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGTCGCGGAAACTGTTGGCTACCGCTCGACATACACAAGCCGCTCGGTCTCTTACCG
H S A F V T T D G E L Y V F G E P E N G
201 203 205 207 209 211 213 215 217 219

PvuII
Pf1MI *PvuII*

AAGCTGGGACTGCCTAACACAGCTGCTGGGCAATCACAGAACCCCTCAGCTGGTGTCTGAG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGACCCTGACGGATTGGTCGACGACCCGTTAGTGTCTTGGGGAGTCGACCACAGACTC
K L G L P N Q L L G N H R T P Q L V S E
221 223 225 227 229 231 233 235 237 239

ATCCCCGAAAAAGTGATCCAGTGGCCTGTGGCGGAGAGCACACAGTGGTGTGACAGAG 721 -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGGGGCTTTTCACTAGGTCACCGGACCCGCTCTCGTGTGTCACCACGACTGTCTC
I P E K V I Q V A C G G E H T V V L T E
241 243 245 247 249 251 253 255 257 259

AATGCCGTGTACACCTTTGGCCTGGGCCAGTTTGGACAACCTCGGACTGGGAACCTTCCTG 781 -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTACGGCACATGTGGAAACCGGACCCGGTCAAACCTGTTGAGCCTGACCTTGGGAAGGAC
N A V Y T F G L G Q F G Q L G L G T F L
261 263 265 267 269 271 273 275 277 279

PvuII

TTCGAGACAAGCGAGCCCAAAGTGATCGAGAACATCCGGGACCAGACCATCAGCTACATC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGCTCTGTTCGCTCGGGTTCACTAGCTCTTGTAGGCCCTGGTCTGGTAGTCGATGTAG
F E T S E P K V I E N I R D Q T I S Y I
281 283 285 287 289 291 293 295 297 299

BclI

AGCTGTGGCGAGAACCACACAGCCCTGATCACAGACATCGGCCTGATGTACACATTCCGC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGACACCGCTCTTGGTGTGTCGGGACTAGTGTCTGTAGCCGACTACATGTGTAAGCCG
S C G E N H T A L I T D I G L M Y T F G
301 303 305 307 309 311 313 315 317 319

GACGGAAGGCATGAAAGCTCGGACTTGGCCTGGAAAACCTCACCAACCACTTCATCCCT 961
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGCCTTCCGTACCTTTCGAGCCTGAACCGGACCTTTTGAAGTGGTGGTGAAGTAGGGA
D G R H G K L G L G L E N F T N H F I P
321 323 325 327 329 331 333 335 337 339

Pf1MI

ACGCTGTGCAGCAACTTCCTGCGGTTTCATTGTGAAGCTGGTGGCCTGCGGAGGATGCCAC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGCACACGTCGTTGAAGGACGCCAAGTAACACTTCGACCACCGGACGCTCCTACGGTG
T L C S N F L R F I V K L V A C G G C H
341 343 345 347 349 351 353 355 357 359

도면7c

(cont'd)

ATGGTGGTTTTTGTGTCGCCCTCACAGAGGCGTGGCCAAAGAGATTGAGTTCGACGAGATC
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACCACCAAAAACGACGGGGAGTGTCTCCGCACCGGTTTCTCTAACTCAAGCTGCTCTAG
M V V F A A P H R G V A K E I E F D E I
361 363 365 367 369 371 373 375 377 379

BspMI
 AACGATACCTGCCTGAGCGTGGCCACCTTCCTGCCTTACAGCAGCCTGACATCTGGCAAC
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGCTATGGACGGACTCGCACCGGTGGAAGGACGGAATGTCGTGCGACTGTAGACCGTTG
N D T C L S V A T F L P Y S S L T S G N
381 383 385 387 389 391 393 395 397 399

PstI
 GTGCTGCAGAGGACTGAGCGCCAGAATGCGCAGACGGGAAAGAGAGAAGCCCCGAC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAGCAGTCTCCTGTGACTCGCGGTCTTACGCGTCTGCCCTTTCTCTCTTGGGGCTG
V L Q R T L S A R M R R R E R E R S P D
401 403 405 407 409 411 413 415 417 419

AGTTTCAGCATGAGAAGAACCCTGCCTCCAATCGAGGGCACACTGGGCTGTCTGCCTGC
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGAAGTCGFACTCTTCTTGGGACGGAGTTAGCTCCCCTGTGACCCGGACAGACGGACG
S F S M R R T L P P I E G T L G L S A C
421 423 425 427 429 431 433 435 437 439

BspMI
 TTTCTGCCTAACAGCGTGTTCCTCCAGATGCAGCGAGAGAAACCTGCAAGAGAGCGTGCTG
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAGACGGATTGTGCGACAAGGGTCTACGTCGCTCTCTTTGGACGTTCTCTCGCACGAC
F L P N S V F P R C S E R N L Q E S V L
441 443 445 447 449 451 453 455 457 459

BspMI
 AGCGAGCAGGATCTGATGCAGCCTGAGGAACCCGACTACCTGCTGGACGAGATGACCAAA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGCTCGTCTAGACTACGTCGGACTCCTTGGGCTGATGGACGACCTGCTCTACTGGTTT
S E Q D L M Q P E E P D Y L L D E M T K
461 463 465 467 469 471 473 475 477 479

GAGGCCGAGATCGACAACAGCAGCACAGTGGAAAGCCTGGGCGAGACAACCGACATCCTG
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCGGGCTCTAGCTGTTGTCGCTGTACCTTTTCGGACCCGCTCTGTTGGCTGTAGGAC
E A E I D N S S T V E S L G E T T D I L
481 483 485 487 489 491 493 495 497 499

AACATGACCCACATCATGAGCCTGAACAGCAACGAGAAGTCTCTGAAGCTGAGCCCCGTG
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGTACTGGGTGTAGTACTCGGACTTGTGCTGCTTTCAGAGACTTCGACTCGGGGCAC
N M T H I M S L N S N E K S L K L S P V
501 503 505 507 509 511 513 515 517 519

CAGAAGCAGAAGAAGCAGCAGACCATCGGCGAGCTGACACAGGATACTGCCCTGACCGAG
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCTTCGTCTTCTTCTGTCGCTGTTAGCCGCTCGACTGTGTCCTATGACGGGACTGGCTC
Q K Q K K Q Q T I G E L T Q D T A L T E
521 523 525 527 529 531 533 535 537 539

도면7d

(cont'd)

StuI

1621 AACGCACGACGCGACGAGTACGAAGAGATGAGCGAGATGAAGGAAGGCAAGGCCTGCAAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGCTGTGTGCTGCTCATGCTTCTCTACTCGCTCTACTTCCGTTCCGGACGTTCC
 N D D S D E Y E E M S E M K E G K A C K
 541 543 545 547 549 551 553 555 557 559

StuI

1681 CAGCACGTGTCCCAGGGCATCTTTATGACCCAGCCTGCCACCACCATCGAGGCCTTTTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGTGCACAGGGTCCCCTAGAAATACTGGGTCCGACGGTGGTGGTAGCTCCGAAAAGG
 Q H V S Q G I F M T Q P A T T I E A F S
 561 563 565 567 569 571 573 575 577 579

NarI
KasI

1741 GACGAGGAAGTGGAAATCCCCGAGGAAAAAGAGGGCGCCGAGGACAGCAAAGGCAACGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGCTCCTTACCTTTAGGGGCTCCTTTTCTCCCGGGCTCCTGTCTGTTCCGTTGCCG
 D E E V E I P E E K E G A E D S K G N G
 581 583 585 587 589 591 593 595 597 599

1801 ATTGAGGAACAAGAGGTGGAAGCCAACGAAGAGAACGTGAAGGTGCACGGCGGACGGAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAACTCCTTGTTCACCTTCGGTTGCTTCTTTCACCTTCCACGTGCGCCTGCCTTT
 I E E Q E V E A N E E N V K V H G G R K
 601 603 605 607 609 611 613 615 617 619

1861 GAAAAGACCGAGATCCTGAGCGACGACCTGACCGATAAGGCCGAGGTTTCCGAGGGCAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTCTGGCTCTAGGACTCGCTGCTGGACTGGCTATTCCGGCTCCAAGGCTCCCGTTT
 E K T E I L S D D L T D K A E V S E G K
 621 623 625 627 629 631 633 635 637 639

SacII

1921 GCCAAGTCTGTGGGAGAAGCCGAGGATGGACCTGAAGGCCGCGGAGATGGAACCTGTGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGTTCCAGACACCTTCTCGGCTCCTACCTGGACTTCCGGCGCCTTACCTTGGACACTT
 A K S V G E A E D G P E G R G D G T C E
 641 643 645 647 649 651 653 655 657 659

1981 GAAGGATCTAGCGGAGCCGAGCACTGGCAGGATGAGGAACGCGAGAAGGGCGAGAAAGAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCCCTAGATCGCCTCGGCTCGTGACCGTCCCTACTCCTTGGCTCTTCCGCTCTTCTCTG
 E G S S G A E H W Q D E E R E K G E K D
 661 663 665 667 669 671 673 675 677 679

2041 AAAGGCAGAGGCGAGATGAAAAGACCCGGCGAGGGCGAAAAAGAGTGGCCGAGAAAAGAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTCCGTTCCGCTCTACCTTTCTGGGCGCTCCCGCTTTTCTCGACCGGCTCTTCTCTC
 K G R G E M E R P G E G E K E L A E K E
 681 683 685 687 689 691 693 695 697 699

2101 GAATGGAAGAAACCGGACGGCGAAGAACAAGAGCAGAAAAGAGAGCAGGGCCACCAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTACCTTCTTTGGCTGCGCTTCTTGTCTCGTCTTCTTCTCTCGTCCCGGTGGTC
 E W K K R D G E E Q E Q K E R E Q G H Q
 701 703 705 707 709 711 713 715 717 719

도면7e

(cont'd)

AAAGAACGGAATCAAGAGATGGAAGAAGGCGGCGAGGAAGAACACGGCGAAGGGGAAGAA
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCTTGCCCTTAGTTCTCTACCTTCTCCGCCGCTCCTTCTTGCCCGCTTCCCCTTCTT
 K E R N Q E M E E G G E E E H G E G E E
 721 723 725 727 729 731 733 735 737 739

GAGGAAGGCGACCAGAGGAAGAAGAAGAAAGAGGCGAAGGCAAAGAAGAAGGCGAG
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCCTTCCGCTGGCTCTCCTTCTTCTTCTTCTTCCGCTTCCGTTCTTCTTCCGCTC
 E E G D R E E E E E K E G E G K E E G E
 741 743 745 747 749 751 753 755 757 759

GGCGAAGAGGTGGAAGGCGAGCGTGAAAAAGAAGAGGGCGAACGCAAGAAAGAAGACGC
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGCTTCTCCACTTCCGCTCGCACTTTTCTTCTCCCGCTTCCGTTCTTCTTCTTGGC
 G E E V E G E R E K E E G E R K K E E R
 761 763 765 767 769 771 773 775 777 779

GCCGGAAAAGAGGAAAAAGGCGAGGAAGAGGGCGACCAAGGCGAAGGCGAGGAAGAAGAA
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGCCTTTCTCCTTTTCCGCTCCTTCTCCCGCTGGTTCGCTTCCGCTCCTTCTTCTT
 A G K E E K G E E E G D Q G E G E E E E
 781 783 785 787 789 791 793 795 797 799

ACTGAAGGCAGAGGGGAAGAGAAGAGGAAGGCGGCGAAGTCGAAGGCGAGAGGTTGAA
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGACTTCCGCTCTCCCCTTCTTCTTCTCCTTCCGCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCCACTT
 T E G R G E E K E E G G E V E G G E V E
 801 803 805 807 809 811 813 815 817 819

GAAGGCAAAGGCGAGCGAGAAGAGGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAGGAAGAGGAAGGC
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCCGTTTCCGCTCGCTCTTCTCCTTCTTCTTCCGCTTCCGCTCCTTCTCCTTCCG
 E G K G E R E E E E E K E G E G E E E E G
 821 823 825 827 829 831 833 835 837 839

GAAGGCGAAGAGGAAGAAGGCGAAGGGGAAGAAGAAGGCGAAGGCAAGGCGAAGAG
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCGCTTCTCCTTCTTCCGCTTCCCTTCTTCTTCTTCCGCTTCCGTTCCGCTTCTC
 E G E E E E G E G E E E E G E G K G E E
 841 843 845 847 849 851 853 855 857 859

GAGGGCGAAGAAGGCGAGGGCGAAGAGGGGCGAAGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGAA
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCCGCTTCTTCCGCTCCGCTTCTCCTCCGCTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCTT
 E G E E G E G E E E G E E G E G E G E E
 861 863 865 867 869 871 873 875 877 879

GAAGAAGGCGAAGGCGAAGGCGAGGAAGAAGGCGAAGGCGAAGGGGAAGAAGAGGAAGGC
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTCCTTCTTCCGCTTCCGCTTCCCTTCTTCTCCTTCCG
 E E G E G E G E E E G E G E G E E E E G
 881 883 885 887 889 891 893 895 897 899

GAAGGCGAAGGCGAAGAAGAAGGCGAAGGCGAGGGCGAAGAGGAAGAAGGCGAAGGCAA
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCCGCTTCCGCTTCTTCTTCCGCTTCCGCTCCGCTTCTCCTTCTTCCGCTTCCGTTT
 E G E G E E E G E G E G E E E E E G E G K
 901 903 905 907 909 911 913 915 917 919

도면7f

(cont'd)

```

GGGGAAGAAGAAGGCCGAGGAAGGCCGAAGGCCGAGGAAGAAGAAGGCCGAAGCCGAG
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCTTCTTCTCCGCTCCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTCCTTCTTCTCCGCTTCCGCTC
  G E E E G E E G E G E G E E E E G E G E
 921  923  925  927  929  931  933  935  937  939

GGCGAAGATGGCGAAGGCCGAAGGCCGAAGGAGGAGGGCGAGTGGGAGGGCGAAGAAGAG
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGCTTCTACCGCTTCCGCTTCCGCTTCTCCTTCTCCCGCTCACCTCCCGCTTCTTCTC
  G E D G E G E G E E E E E G E W E G E E E
 941  943  945  947  949  951  953  955  957  959

GAAGGCGAAGGCCGAGGGCGAAGGAGGCGAAGGCCGAGGGCGAAGAAGGCCGAAGCCGAA
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTCCGCTTCCGCTCCTCCGCTTCTCCTTCCGCTTCCGCTCCTCCGCTTCTTCCGCTTCCGCTT
  E G E G E G E E E E G E G E G E E G E G E
 961  963  965  967  969  971  973  975  977  979

GGCGAGGAAGAGGAAGGCCGAAGGCCGAAGGGGAAGAAGAAGGGCGAAGAAGAAGCCGAA
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGCTCCTTCTCCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCTTCTTCTCCGCTTCTTCTTCCGCTT
  G E E E E G E G E G E E E E G E E E G E
 981  983  985  987  989  991  993  995  997  999

GAGGAAGGCCGAAGGGGAAGAAGAAGGCCGAAGGCCGAAGGCCGAAGAAGGAGGAGCCGAA
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCTTCCGCTTCCGCTTCTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCTTCTTCTTCTTCCGCTT
  E E G E G E E E G E G E G E E E E E G E
1001 1003 1005 1007 1009 1011 1013 1015 1017 1019

GTTGAAGGCCGAGGTTGAGGGCGAAGAAGGCCGAAGGCCGAAGGGGAAGAAGAAGAAGCCGAG
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAACTTCCGCTCCTCACTCCGCTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCTTCTTCTTCTTCCGCTC
  V E G E V E G E G E G E G E G E E E E G E
1021 1023 1025 1027 1029 1031 1033 1035 1037 1039

GAAGAAGGGGAAGAGAGAGAAAAAGAAGGCCGAGGGCGAAGAAAACCCCGGAACCCGCGAA
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTCTTCCGCTTCTTCTTCTTTTCTTCCGCTCCTCCGCTTCTTTTGGCGGCTTGGCGCTT
  E E G E E R E K E G E G E E N R R N R E
1041 1043 1045 1047 1049 1051 1053 1055 1057 1059

GAGGAAGAGGAAGAAGAGGGCAAGTACCAAGAGACTGGCGAGGAAGAGAACGAGCGGCAG
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCTTCTCCTTCTTCTCCGCTTCTGTTCTCTGACCGCTCCTTCTTCTTCTGCTCGCCGTC
  E E E E E G K Y Q E T G E E E N E R Q
1061 1063 1065 1067 1069 1071 1073 1075 1077 1079

GATGGCGAAGAGTACAAGAAGGTGTCCAAGATCAAGGGCAGCGTGAAGTACGGCAAGCAC
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACCGCTTCTCATGTCTTCCACAGGTTCTAGTTCCGCTCGCACTTCTATGCCGTTCTGTG
  D G E E Y K K V S K I K G S V K Y G K H
1081 1083 1085 1087 1089 1091 1093 1095 1097 1099

AAGACCTACCAGAAGAAGTCCGTCACCAACACGCAAGGCAATGGAAAAGAACAGCGGAGC
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTGGATGGTCTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTACCTTTTCTTGTGCGCTCG
  K T Y Q K K S V T N T Q G N G K E Q R S
1101 1103 1105 1107 1109 1111 1113 1115 1117 1119

```

도면7g

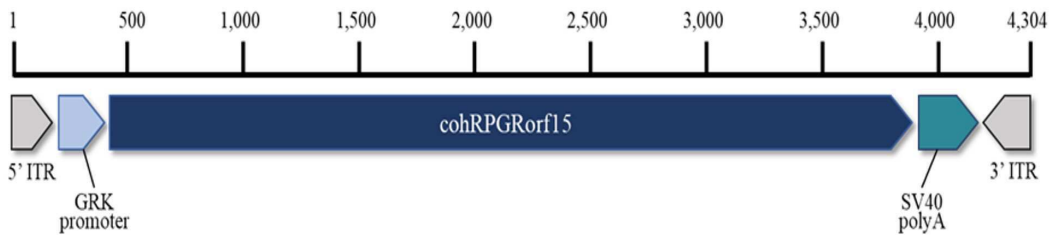
(concluded)

```

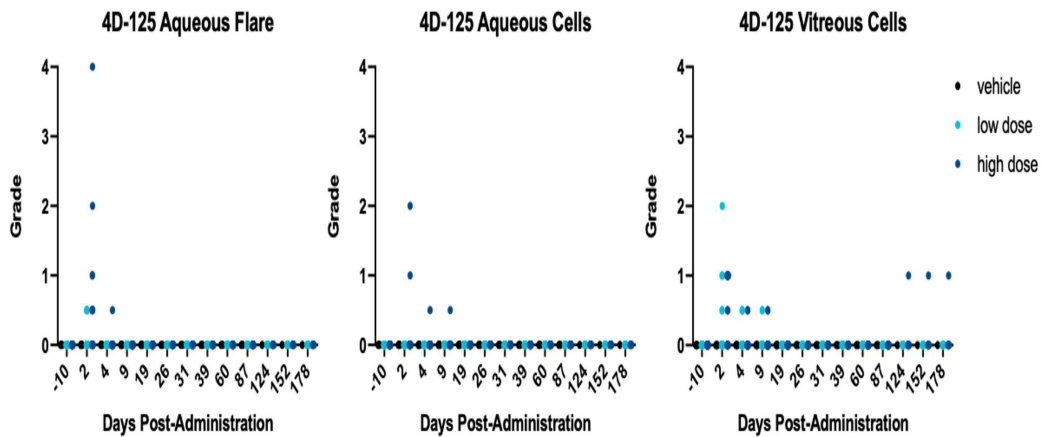
AAGATGCCCGTGCAGTCCAAGAGGCTGCTGAAGAATGGCCCTAGCGGCAGCAAGAAATTC
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTACGGGCACGTCAGGTTCTCCGACGACTTCTTACCGGGATCGCCGTCGTTCTTTAAG
K M P V Q S K R L L K N G P S G S K K F
1121 1123 1125 1127 1129 1131 1133 1135 1137 1139

XhoI
TGGAAACAATGTGCTGCCCCACTACCTCGAGCTGAAGTGA
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTTGTTACAGACGGGGTGATGGAGCTCGACTTCACT
W N N V L P H Y L E L K *
1141 1143 1145 1147 1149 1151 1153
    
```

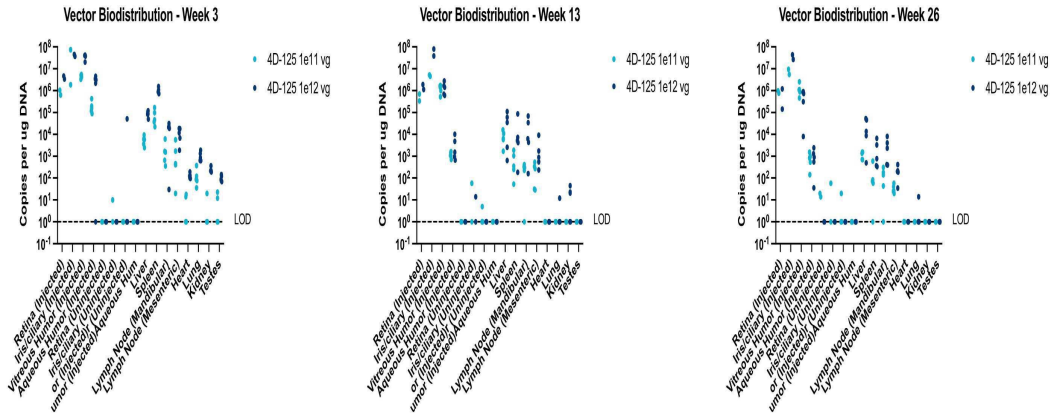
도면8



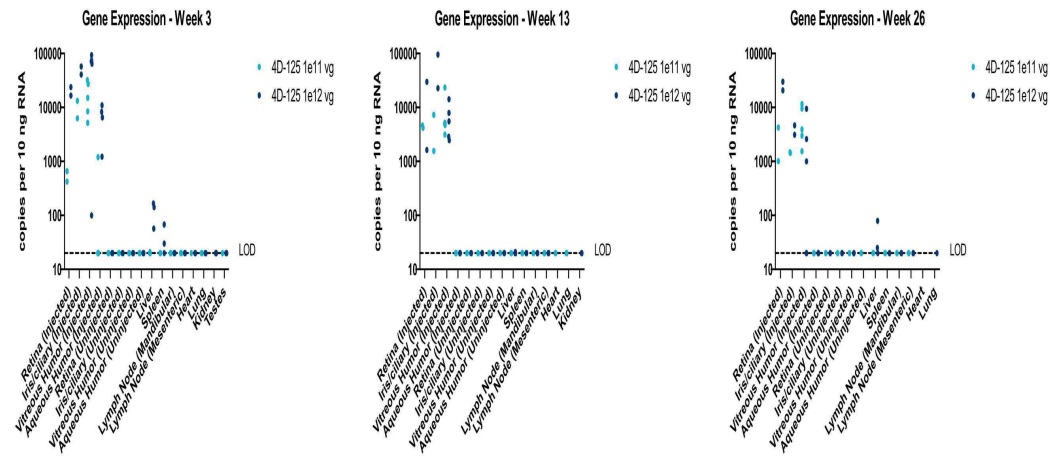
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> 4D Molecular Therapeutics, Inc.
- <120> CODON OPTIMIZED RPRGRF15 GENES AND USES THEREOF
- <130> 090400-5012 WO
- <150> US 63/073,843
- <151> 2020-09-02
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 3459
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> codon-optimized RPGRorf15

<400> 1

atgagagaac ccgaggaact gatgcccac tctggcgcg tgtttacctt cggcaagagc 60
aagttcgcg agaacaacct cggcaagttc tggttcaaga acgacgtgcc agtgcacctg 120
agctgcggag atgaacactc tgccgtggtc accggcaaca acaagctgta catgttcggc 180

agcaacaact ggggccagct cggcctggga tctaagtctg ccatcagcaa gcctacctgc 240
gtgaaggccc tgaagctga gaaagtgaaa ctggccgcct gcggcagaaa tcacacctg 300
gtttctaccg aaggcggcaa tgtgtatgcc accggcggaa acaatgaggg acagcttggg 360
ctgggcgaca ccgaggaag aaacaccttc cacgtgatca gctttttcac cagcgcagc 420
aagatcaagc agctgagcgc cggctcta atctctgccg ctctgacaga ggacggcaga 480
ctgtttatgt ggggcgacaa ttctgagggc cagatcggac tgaagaact gtccaatgtg 540
tgcgtgcccc agcaagtgac aatcggcaag cctgtgtctt ggatcagctg cggctactac 600

cacagcgctt ttgtgacaac cgatggcgag ctgtatgtgt tcggcgagcc agagaatggc 660
aagctgggac tgctaacca gctgctgggc aatcacagaa cccctcagct ggtgtctgag 720
atccccgaaa aagtgatcca ggtgcctgtt ggcggagagc acacagtgtt gctgacagag 780
aatgcccgtg acacctttgg cctgggccag ttggacaac tcggactggg aaccttctg 840
ttcgagacaa gcgagcccaa agtgcagcag aacatccggg accagacat cagctacatc 900
agctgtggcg agaaccacac agccctgatc acagacatcg gcctgatgta cacattcggc 960
gacggaagge atggaaagct cggacttggc ctggaaaact tcaccaacca ctatcatcct 1020

acgctgtgca gcaacttctt gcggttcatt gtgaagctgg tggcctgcgg aggatgccac 1080
atggtggttt ttgctgcccc tcacagagge gtggccaaag agattgagtt cgacgagatc 1140
aacgatacct gcctgagcgt ggccaccttc ctgccttaca gcagcctgac atctggcaac 1200
gtgctgcaga ggacactgag cgccagaatg cgcagacggg aaagagagag aagccccgac 1260
agcttcagca tgagaagaac cctgcctcca atcgagggca cactgggcct gtctgcctgc 1320
tttctgccta acagcgtgtt cccagatgc agcgagagaa acctgcaaga gagcgtgctg 1380
agcgagcagg atctgatgca gcctgaggaa cccgactacc tgctggacga gatgacacaa 1440

gaggccgaga tcgacaacag cagcacagtg gaaagcctgg gcgagacaac cgacatcctg 1500
aacatgacct acatcatgag cctgaacagc aacgagaagt ctctgaagct gagccccgtg 1560
cagaagcaga agaagcagca gaccatcggc gagctgacac aggatactgc cctgaccgag 1620
aacgacgaca gcgacgagta cgaagagatg agcgagatga aggaaggcaa ggcctgcaag 1680
cagcacgtgt cccagggcat ctttatgacc cagcctgcca ccaccatcga ggccttttcc 1740

gacgaggaag tggaaatccc cgaggaaaaa gagggcgccg aggacagcaa aggcaacggc 1800
 attgaggaac aagaggtgga agccaacgaa gagaacgtga aggtgcacgg cggacggaaa 1860

gaaaagaccg agatcctgag cgacgacctg accgataaagg ccgaggtttc cgagggcaaa 1920
 gccaaagtctg tgggagaagc cgaggatgga cctgaaggcc gcggagatgg aacctgtgaa 1980
 gaaggatcta gcggagccga gcactggcag gatgaggaac gcgagaaggc cgagaaagac 2040
 aaaggcagag gcgagatgga aagacccggc gagggcgaaa aagagctggc cgagaaagag 2100
 gaatggaaga aacgcgacgg cgaagaacaa gacgagaaag aaagagagca gggccaccag 2160
 aaagaacgga atcaagagat ggaagaaggc ggcgaggaag aacacggcga aggggaagaa 2220
 gaggaaggcg accgagagga agaagaagag aaagaaggcg aaggcaaaga agaaggcgag 2280

ggcgaagagg tggaaaggca gcgtgaaaaa gaagaggcg aacgcaagaa agaagaacgc 2340
 gccggaaaag aggaaaaagg cgaggaagag ggcgaccaag gcgaaggcga ggaagaagaa 2400
 actgaaggca gaggggaaga gaaagaggaa ggcggcgaag tcgaaggcgg agaggttgaa 2460
 gaaggcaaaag gcgagcgaga agaggaagaa gaagaaggcg aaggcgagga agaggaaggc 2520
 gaaggcgaag aggaagaagg cgaaggggaa gaagaagaag gcgaaggcaa gggcgaagag 2580
 gagggcgaag aaggcgaggc cgaagaggag ggcgaagaag gcgaaggcga gggcgaagaa 2640
 gaagaaggcg aaggcgaagg cgaggaagaa ggcgaaggcg aagggaaga agaggaaggc 2700

gaaggcgaag gcgaagaaga aggcgaaggc gagggcgaag aggaagaagg cgaaggcaaa 2760
 ggggaagaag aaggcgagga aggcgaaggc gaaggcgagg aagaagaagg cgaaggcgag 2820
 ggcgaagatg gcgaaggcga aggcgaagag gaagaggcg agtgggaggg cgaagaagag 2880
 gaaggcgaag gcgagggcga agaggaaggc gaaggcgagg gcgaagaagg cgaaggcgaa 2940
 ggcgaggaag aggaaggcga aggcgaaggg gaagaagaag agggcgaaga agaaggcgaa 3000
 gaggaaggcg aagggaaga agaaggcgaa ggcgaaggcg aagaagagga agaggcgaa 3060
 gttgaaggcg aggttgaggc cgaagaaggc gaaggcgaag gggaagaaga agaaggcgag 3120

gaagaagggg aagagagaga aaaagaaggc gagggcgaag aaaaccgccc gaacccgaa 3180
 gaggaagagg aagaagagg caagtaccaa gagactggcg aggaagagaa cgagcggcag 3240
 gatggcgaag agtacaagaa ggtgtccaag atcaaggca gcgtgaagta cggcaagcac 3300
 aagacctacc agaagaagtc cgtcaccaac acgcaaggca atggaagaaga acagcggagc 3360
 aagatgcccc tgcagtccaa gaggtctgtg aagaatggcc ctacggcgag caagaattc 3420
 tgaacaatg tgctgcccc ctacctgag ctgaagtga 3459

<210> 2

<211> 1152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

 Ser Trp Ile Ser Cys Gly Tyr Tyr His Ser Ala Phe Val Thr Thr Asp
 195 200 205
 Gly Glu Leu Tyr Val Phe Gly Glu Pro Glu Asn Gly Lys Leu Gly Leu
 210 215 220

465 470 475 480
 Glu Ala Glu Ile Asp Asn Ser Ser Thr Val Glu Ser Leu Gly Glu Thr
 485 490 495
 Thr Asp Ile Leu Asn Met Thr His Ile Met Ser Leu Asn Ser Asn Glu
 500 505 510

 Lys Ser Leu Lys Leu Ser Pro Val Gln Lys Gln Lys Lys Gln Gln Thr
 515 520 525
 Ile Gly Glu Leu Thr Gln Asp Thr Ala Leu Thr Glu Asn Asp Asp Ser
 530 535 540
 Asp Glu Tyr Glu Glu Met Ser Glu Met Lys Glu Gly Lys Ala Cys Lys
 545 550 555 560
 Gln His Val Ser Gln Gly Ile Phe Met Thr Gln Pro Ala Thr Thr Ile
 565 570 575

 Glu Ala Phe Ser Asp Glu Glu Val Glu Ile Pro Glu Glu Lys Glu Gly
 580 585 590
 Ala Glu Asp Ser Lys Gly Asn Gly Ile Glu Glu Gln Glu Val Glu Ala
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Val Lys Val His Gly Gly Arg Lys Glu Lys Thr Glu
 610 615 620
 Ile Leu Ser Asp Asp Leu Thr Asp Lys Ala Glu Val Ser Glu Gly Lys
 625 630 635 640

 Ala Lys Ser Val Gly Glu Ala Glu Asp Gly Pro Glu Gly Arg Gly Asp
 645 650 655
 Gly Thr Cys Glu Glu Gly Ser Ser Gly Ala Glu His Trp Gln Asp Glu
 660 665 670
 Glu Arg Glu Lys Gly Glu Lys Asp Lys Gly Arg Gly Glu Met Glu Arg
 675 680 685
 Pro Gly Glu Gly Glu Lys Glu Leu Ala Glu Lys Glu Glu Trp Lys Lys
 690 695 700

 Arg Asp Gly Glu Glu Gln Glu Gln Lys Glu Arg Glu Gln Gly His Gln
 705 710 715 720

tcatgtggag atgaacattc tgctgttgtt accggaata ataaacttta catgtttggc 180
 agtaacaact ggggtcagtt aggattagga tcaaagtcag ccatcagcaa gccaacatgt 240
 gtcaaagctc taaaacctga aaaagtgaat ttagctgcct gtggaaggaa ccacaccctg 300

 gtgtcaacag aaggaggcaa tgtatatgca actggtggaa ataatgaagg acagtggggg 360
 cttggtgaca ccgaagaaag aaacactttt catgtaatta gcttttttac atccgagcat 420
 aagattaage agctgtctgc tggatctaact acttcagctg ccctaactga ggatggaaga 480
 ctttttatgt ggggtgacaa ttccgaaggg caaattggtt taaaaaatgt aagtaatgct 540
 tgtgtccctc agcaagtgcac cattgggaaa cctgtctcct ggatctcttg tggatattac 600
 cattcagctt ttgtaacaac agatggtgag ctatatgtgt ttggagaacc tgagaatggg 660
 aagttaggtc ttccaatca gctcctgggc aatcacagaa caccagct ggtgtctgaa 720

 attccggaga aggtgatcca agtagcctgt ggtggagagc ataactgtgt tctcacggag 780
 aatgctgtgt ataccttgg gctgggacaa tttggtcagc tgggtcttgg cacttttctt 840
 ttgaaactt cagaacccaa agtcattgag aatattaggg atcaacaat aagttatatt 900
 tcttggggag aaaatcacac agctttgata acagatatcg gccttatgta tacttttggg 960
 gatggtcgcc acggaatatt aggacttggg ctggagaatt ttaccaatca cttcattcct 1020
 actttgtgct ctaatttttt gaggtttata gttaaattgg ttgcttggg tggatgtcac 1080
 atggtagttt ttgctgctcc tcatcgtggt gtggcaaaag aaattgaatt cgatgaaata 1140

 aatgatactt gcttactgtt ggcgactttt ctgccgtata gcagtttaac ctgagaaat 1200
 gtactgcaga ggactctatc agcacgtatg cggcgaagag agaggagag gctcaccagat 1260
 tctttttcaa ttaggagaac actacctcca atagaaggga ctcttggcct ttctgcttgt 1320
 tttctccca attcagctt tccacgatgt tctgagagaa acctccaaga gagtgtctta 1380
 tctgaacagg acctcatgca gccagaggaa ccagattatt tgctagatga aatgaccaa 1440
 gaagcagaga tagataattc ttcaactgta gaaagccttg gagaactac tgatatctta 1500
 aacatgacac acatcatgag cctgaattcc aatgaaaagt cattaaaatt atcaccagtt 1560

 cagaaacaaa agaacaaca aacaattggg gaactgacgc aggatacagc tcttactgaa 1620
 aacgatgata gtgatgaata tgaagaaatg tcagaaatga aagaaggaa agcatgtaaa 1680
 caacatgtgt cacaaggat tttcatgacg cagccagcta cgactatcga agcattttca 1740
 gatgaggaag tagagatccc agaggagaag gaaggagcag aggattcaaa aggaaatgga 1800
 atagaggagc aagaggtaga agcaaatgag gaaaatgtga aggtgcatgg aggaagaaag 1860
 gagaaaaacag agatcctatc agatgacctt acagacaaag cagaggtgag tgaaggcaag 1920

gcaaaatcag tgggagaagc agaggatggg cctgaaggta gaggggatgg aacctgtgag 1980

gaaggtagtt caggagcaga acactggcaa gatgaggaga gggagaaggg ggagaaagac 2040

aagggtagag gagaaatgga gaggccagga gagggagaga aggaactagc agagaaggaa 2100

gaatggaaga agagggatgg ggaagagcag gagcaaaagg agaggagca gggccatcag 2160

aaggaagaa accaagagat ggaggaggga ggggaggagg agcatggaga aggagaagaa 2220

gaggaggag acagagaaga ggaagaagag aaggaggag aagggaaga ggaaggagaa 2280

ggggaagaag tggaggaga acgtgaaaag gaggaaggag agaggaaaa ggaggaaaga 2340

gcggggaagg aggagaaagg agaggaagaa ggagaccaag gagaggggga agaggagaa 2400

acagaggga gaggggagga aaaagaggag ggagggaag tagaggagg ggaagt agag 2460

gaggggaaag gagagaggga agaggaagag gaggagggtg agggggaaga ggaggaggg 2520

gagggggaag aggaggaagg ggagggggaa gaggaggaag gagaagggaa aggggagga 2580

gaagggaag aaggagaagg ggaggaagaa ggggaggaag gagaagggga gggggaagag 2640

gaggaaggag aaggggaggg agaagaggaa ggagaagggg agggagaaga ggaggaaaga 2700

gaaggggagg gagaagagga aggagaaggg gagggagaag aggaggaagg agaagggaaa 2760

ggggaggagg aaggagagga aggagaaggg gagggggaag aggaggaagg agaagggaa 2820

ggggaggatg gagaagggga gggggaagag gaggaaggag aatgggaggg ggaaggagag 2880

gaaggagaag gggaggggga agaggaagga gaagggaag gggaggaagg agaaggggag 2940

ggggaagagg aggaaggaga aggggagggg gaagaggagg aaggggaaga agaaggggag 3000

gaagaaggag agggagagga agaaggggag ggagaagggg aggaagaaga ggaaggggaa 3060

gtggaagggg aggtggaagg ggaggaagga gagggggaag gagaggaaga ggaaggagag 3120

gaggaaggag aaaaaaggga aaaggagggg gaaggagaag aaaacaggag gaacagagaa 3180

gaggaggagg aagaagaggg gaagtatcag gagacaggcg aagaagagaa tgaaaggcag 3240

gatggagagg agtacaaaa agtgagcaaa ataaaaggat ctgtgaaata tggcaaacat 3300

aaaacatatc aaaaaagtc agttactaac acacagggaa atgggaaaga gcagagggtcc 3360

aaaatgccag tccagtcaaa acgactttta aaaaacgggc catcaggttc caaaaagttc 3420

tggaataatg tattaccaca ttacttggaa ttgaagtaa 3459

<210> 4

<211> 199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGRK promoter

<400> 4
 gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggccccttg 60
 gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaate ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120

 ttctagcacc ttcttgccac tctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg 180
 gtgctgtgtc agccccggg 199
 <210> 5
 <211> 4303
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cohRPGR expression cassette
 <400> 5
 ttggcactc ccctctcgcg cgctcgctcg ctactgagg cgggcgacc aaaggtcgcc 60
 cgacgcccg gctttgccg ggcgcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
 gccaaactca tcaactagggg ttctatcga ttgaattccc cggggatccg ggccccagaa 180
 gcctggtggt tgtttgtcct tctcagggga aaagtgaggc ggccccttgg aggaaggggc 240

 cgggcagaat gatctaate gattccaagc agctcagggg attgtctttt tctagcacct 300
 tcttgccact ctaagcgtc ctccgtgacc cggctggga tttagcctgg tgctgtgtca 360
 gccccgggtc tagagtcgac ctgcagaagc ttccaccatg agagaaccg aggaactgat 420
 gcccgactct ggcgccgtgt ttaccttcgg caagagcaag ttcgccgaga acaaccgg 480
 caagtcttgg ttcaagaacg acgtgccagt gcacctgagc tgcggagatg aacactctgc 540
 cgtggtcacc ggcaacaaca agctgtacat gttcggcagc aacaactggg gccagctcgg 600
 cctgggatct aagtctgcca tcagcaagcc tacctgcgtg aaggccctga agcctgagaa 660

 agtgaactg gccgcctcgc gcagaaatca caccctggtt tctaccgaag gcggcaatgt 720
 gtatgccacc ggcggaaaca atgagggaca gcttgactg ggcgacaccg aggaaagaaa 780
 caccttccac gtgateagct ttttaccag cgagcacaag atcaagcagc tgagcgccgg 840
 ctctaatacc tctgccgctc tgacagagga cggcagactg tttatgtggg gcgacaattc 900
 tgagggccag atcggactga agaactgtc caatgtgtgc gtgccccagc aagtgacaat 960
 cggcaagcct gtgtcttggg tcagctgcgg ctactaccac agcgcctttg tgacaaccga 1020
 tggcgagctg tatgtgttcg gcgagccaga gaatggcaag ctgggactgc ctaaccagct 1080

 gctgggcaat cacagaacc ctcagctggt gctgagatc cccgaaaaag tgatccaggt 1140
 ggccctgtggc ggagagcaca cagtgtgtc gacagagaat gccgtgtaca cctttgcct 1200

gggccagttt ggacaactcg gactgggaac cttcctgttc gagacaagcg agcccaaagt 1260
 gatcgagaac atccgggacc agaccatcag ctacatcagc tgtggcgaga accacacagc 1320
 cctgatcaca gacatcggcc tgatgtacac attcggcgac ggaaggcatg gaaagctcgg 1380
 acttggcctg gaaaacttca ccaaccactt catccctacg ctgtgcagca acttcctgcg 1440
 gttcattgtg aagctggigg cctgcggagg atgccacatg gtggtttttg ctgccctca 1500

 cagaggcgtg gccaaagaga ttgagttcga cgagatcaac gatacctgcc tgagcgtggc 1560
 caccttcctg ccttacagca gcctgacatc tggcaactg ctgcagagga cactgagcgc 1620
 cagaatgcgc agacgggaaa gagagagaag ccccgacagc ttcagcatga gaagaacct 1680
 gcctccaatc gagggcacac tgggcctgtc tgctgtctt ctgcctaaca gcgtgttccc 1740
 cagatgcagc gagagaaacc tgcaagagag cgtgctgagc gagcaggatc tgatgcagcc 1800
 tgaggaacc gactacctcg tggacgagat gaccaaagag gccgagatcg acaacagcag 1860
 cacagtggaa agcctgggcg agacaaccga catcctgaac atgaccaca tcatgacct 1920

 gaacagcaac gagaagtctc tgaagctgag ccccgctcag aagcagaaga agcagcagac 1980
 catcggcgag ctgacacagg atactgccct gaccgagaac gacgacagcg acgagtacga 2040
 agagatgagc gagatgaagg aaggcaaggc ctgcaagcag cacgtgtccc agggcatctt 2100
 tatgaccag cctgccacca ccatcgaggc cttttccgac gaggaagtgg aaatccccga 2160
 ggaaaaagag ggcgccgagg acagcaaagg caacggcatt gaggaacaag aggtggaagc 2220
 caacgaagag aacctgaagg tgcacggcgg acggaaagaa aagaccgaga tctgagcga 2280
 cgacctgacc gataaggccg aggtttccga gggcaaagcc aagtctgtgg gagaagccga 2340

 ggatggacct gaaggcccg gagatggaac ctgtgaagaa ggatctagcg gagccgagca 2400
 ctggcaggat gaggaacgcg agaaggcgga gaaagacaaa ggcagaggcg agatgaaaag 2460
 acccgcgag ggcgaaaaag agctggccga gaaagaggaa tggaagaaac gcgacggcga 2520
 agaacaagag cagaaagaaa gagagcaggg ccaccagaaa gaacggaatc aagagatgga 2580
 agaaggcggc gaggaagaac acggcgaagg ggaagaagag gaaggcgacc gagaggaaga 2640
 agaagagaaa gaaggcgaag gcaaagaaga aggcgagggc gaagaggtgg aaggcgagcg 2700
 tgaaaaagaa gagggcgaac gcaagaaaga agaacgcgcc ggaaaagagg aaaaaggcga 2760

 ggaagagggc gaccaaggcg aaggcgagga agaagaaact gaaggcagag gggaagagaa 2820
 agaggaaggc ggcgaagtcg aaggcggaga ggttgaagaa ggcaaaggcg agcgagaaga 2880
 ggaagaagaa gaaggcgaag gcgaggaaga ggaaggcga ggcaagagg aagaaggcga 2940
 aggggaagaa gaagaaggcg aaggcaaggg cgaagaggag ggcaagaag gcgagggcga 3000
 agaggagggc gaagaaggcg aaggcgaggg cgaagaagaa gaaggcgaag gcgaaggcga 3060

ggaagaaggc gaaggcgaag gggaagaaga ggaaggcgaa ggcgaaggcg aagaagaagg 3120
cgaaggcgag ggcgaagagg aagaaggcga aggcgaaggg gaagaagaag gcgaggaagg 3180

cgaaggcgaa ggcgaggaag aagaaggcga aggcgagggc gaagatggcg aaggcgaagg 3240
cgaagaggaa gagggcgagt gggagggcga agaagaggaa ggcgaaggcg agggcgaaga 3300
ggaaggcgaa ggcgagggcg aagaaggcga aggcgaaggc gaggaagagg aaggcgaagg 3360
cgaaggggaa gaagaagagg gcgaagaaga aggcgaagag gaaggcgaag gggaagaaga 3420
aggcgaaggc gaaggcgaag aagaggaaga gggcgaagtt gaaggcgagg ttgagggcga 3480
agaaggcgaa ggcgaagggg aagaagaaga aggcgaggaa gaagggaag agagagaaaa 3540
agaaggcgag ggcgaagaaa accgccgaa ccgcaagag gaagaggaag aagagggcaa 3600

gtaccaagag actggcgagg aagagaacga gcggcaggat ggcgaagagt acaagaaggt 3660
gtccaagatc aaggcgagc tgaagtacgg caagcacaag acctaccaga agaagtcctg 3720
caccaacacg caaggcaatg gaaaagaaca gcggagcaag atgccctgc agtccaagag 3780
gctgctgaag aatggcccta gcggcagcaa gaaattctgg aacaatgtgc tgccccacta 3840
cctcgagctg aagtgagcct cgagcagcgc tctcgagag atctgcggcc gcgagctcgg 3900
ggatccagac atgataagat acattgatga gtttgacaa accacaacta gaatgcagtg 3960
aaaaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag 4020

ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga 4080
ggtgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtatgg ctgattatga 4140
tcaatgcate ctagccggag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4200
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 4260
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caa 4303

<210> 6
<211> 145
<212> DNA
<213> adeno-associated virus 2
<400> 6

ttggccactc cctctctcgc cgctcgcctc ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccg gctttgcccg ggcgcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaaactcca tcactagggg ttctt 145

<210> 7
<211> 145

<212> DNA
 <213> adeno-associated virus 2
 <400> 7
 aggaaccct agigatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60
 ccgcccgggc aaagcccggg cgteggggcga ccttttggtcg cccggcctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgcag agaggggagtg gccaa 145

<210> 8
 <211> 245

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SV40 polyadenylation sequence
 <400> 8
 ggggatccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 60
 tgaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 120
 agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg 180
 gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgigtgat ggctgattat 240
 gatca 245

<210> 9
 <211> 745

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223>
 > rAAV variant capsid protein

<400> 9
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Ala Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

agctgtggcg atgagcactc cgccgtgggtg acaggcaaca ataagctgta catgttcggc 180
 tctaacaatt ggggacagct gggcctggga agcaagtccg ccatcagcaa gccaacctgc 240
 gtgaaggccc tgaagcccga gaaggtgaag ctggccgcct gtggcagaaa ccacacactg 300
 gtgagcaccg agggaggaaa cgtgtacgca acaggaggca acaatgaagg ccagctgggc 360
 ctgggcgaca cagaggagag gaataccttt cacgtgatca gcttctttac ctccgagcac 420
 aagatcaagc agctgtccgc cggctctaac acaagcggcg ccctgaccga ggacggccgc 480

 ctgttcatgt ggggcgataa tagcgagggc cagatcggcc tgaagaacgt gtccaacgtg 540
 tgcgtgcctc agcaggtgac catcggcaag ccagtgtcct ggatctcttg tggctactat 600
 cacagcgcct tcgtgaccac agatggcgag ctgtacgtgt ttggagagcc agagaacggc 660
 aagctgggcc tgcctaacca gctgctgggc aatcaccgga caccacagct ggtgtccgag 720
 atccctgaga aagtgatcca ggtggcatgc ggaggagagc acacagtggg gctgaccgag 780
 aatgccgtgt ataccttcgg cctgggacag ttggacagc tgggcctggg cacattcctg 840
 tttgagacaa gcgagccaaa agtgatcgag aacatccgcg accagacaat cagctacatc 900

 tcctgcgggc agaatecac agccctgatc accgacatcg gcctgatgta tacctttggc 960
 gatggccggc acggcaagct gggcctgggc ctggagaact tcacaaatca ctttatccc 1020
 accctgtgct ctaacttctt gcggttcac gtgaagctgg tggcctgcgg cggtgtcac 1080
 atggtggtgt tcgcagcacc tcacagggga gtggccaagg agatcgagtt tgacgagatc 1140
 aacgatacat gcctgtccgt ggccaccttc ctgccataca gctccctgac atccggcaat 1200
 gtgctgcagc gcaccctgtc tgccaggatg cggagaaggg agaggagcg gtcccctgac 1260
 tctttcagca tgaggcggac actgccacct atcgaggga ccctgggcct gtctgctgc 1320

 ttctgccta acagcgtgtt cccaagatgt agcgagagga atctgcagga gtctgtgctg 1380
 agcgagcagg atctgatgca gccagaggag cccgactacc tgctggatga gatgacaaag 1440
 gaggccgaga tcgacaactc tagcaccgtg gagagcctgg gcgagacaac agatatcctg 1500
 aatatgacac acatcatgtc cctgaactct aatgagaagt ctctgaagct gagcccagtg 1560
 cagaagcaga agaagcagca gaccatcggc gagctgacce aggacacagc cctgaccgag 1620
 aacgacgatt ctgatgagta tgaggagatg agcgagatga aggagggcaa gcctgtlaag 1680
 cagcacgtgt cccaggcat cttcatgacc cagccagcca ccacaatcga ggccctttct 1740

 gacgaagagg tggagatccc cgaggagaag gagggcggcg aggatagcaa gggcaatggc 1800
 atcgaggagc aggaggtgga ggccaacgag gagaatgtga aggtgcacgg cggcagaaag 1860
 gagaagacag agatcctgtc cgacgatctg accgacaagg ccgaggtgtc cgagggcaag 1920
 gccaatctg tgggagaggc agaggacgga ccagaggac gcggcgatgg aacctgcgag 1980

gagggatcct ctggagcaga gcactggcag gacgaagaaa gagagaaggg cgagaaggat 2040
aagggcagag gagagatgga gaggcctgga gagggagaga aggagctggc agagaaggag 2100
gagtggaaga agagggacgg cgaggagcag gacgagaagg agagagagca gggccaccag 2160

aaggagagga accaggagat ggaggaggga ggagaggagg agcacggcga gggagaggag 2220
gagggaggcg atagagagga agaaggagg aaggaggagg agggcaagga ggaaggcgag 2280
ggagaggagg tggagggaga aagggagaag gagggaggag agcgcaagaa ggaagaaaga 2340
gcaggcaagg aagagaaggg agaggaggag ggcgatcagg gcgaaggaga ggaggaggag 2400
acagagggaa ggggagagga gaaggaggag ggaggaggag tcgaaggagg agaagtggag 2460
gagggcaagg gcgaaagaga agaggaggag gaggaaggcg agggcgaaga agaggagggc 2520
gagggcgagg aagaaggagg cgaggcgaa gaggaagaag gcgagggcaa gggcgaggag 2580

gagggcgaag aaggcgaagg ggaggaggag ggcgaaggagg gagaggcgga gggcgaggag 2640
gaagaaggcg aaggcgaagg cgaagaaga ggagaaggag agggcgaaga ggaggaaggc 2700
gaaggagaag gagaggagga aggagaaggg gagggcgaag agggaggagg agaaggcaag 2760
ggagaagaag aaggcgaaga aggcgaggga gaaggcgagg aagaagaagg cgagggagag 2820
ggagaggacg gcgaaggcga gggcgaggaa gaggaaggag agtgggagg cgaggaagag 2880
gagggagaag gagaaggcga agaagaaggg gaaggagagg gcgaggaagg agaaggcga 2940
ggcgaaggagg aggaggggga aggggagggc gaggaggaag agggagaaga ggaaggcga 3000

gaagagggag aaggcgaaga ggaaggagaa ggcgagggag aagaagagga ggaggcgag 3060
gtcgaaggcg aggtggagg cgaagagggg gaaggcgaag gcgaggagga ggaaggggaa 3120
gaagaaggcg aggagagaga gaaagaaggc gagggcgagg agaacagaag gaatcgcgaa 3180
gaagaaggag aagaaggagg caagtaccag gagacaggcg aggaggagaa cgagcggcag 3240
gatggcgagg agtataagaa ggtgtccaag atcaaggct ctgtgaagta cggcaagcac 3300
aagacctatc agaagaagag cgtgaccaac acacaggca atggcaagga gcagcgcagc 3360
aagatgctg tgcagtcaa gcggctgctg aagaatggcc cctctgggag caagaagttt 3420

tggaataatg tcctgccaca ctacctggag ctgaaatga 3459