



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월26일
(11) 등록번호 10-2786552
(24) 등록일자 2025년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7023349
(22) 출원일자(국제) 2019년01월14일
심사청구일자 2022년01월12일
(85) 번역문제출일자 2020년08월12일
(65) 공개번호 10-2020-0141435
(43) 공개일자 2020년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2019/050092
(87) 국제공개번호 WO 2019/138250
국제공개일자 2019년07월18일
(30) 우선권주장
1800546.2 2018년01월12일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
W02015142941 A1
W02011034947 A2
KR1020160135754 A

(73) 특허권자
유씨엘 비즈니스 리미티드
영국, 더블유씨1이 6바티 런던, 고위 스트리트,
유니버시티 칼리지 런던
(72) 발명자
알리 로빈
영국 그레이터 런던 이씨1위 9이엘 런던 베스 스트리트 11-43 유씨엘 인스티튜트 오브 오프탈몰로지
마츠키 타카야키
영국 그레이터 런던 이씨1위 9이엘 런던 베스 스트리트 11-43 유씨엘 인스티튜트 오브 오프탈몰로지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 49 항

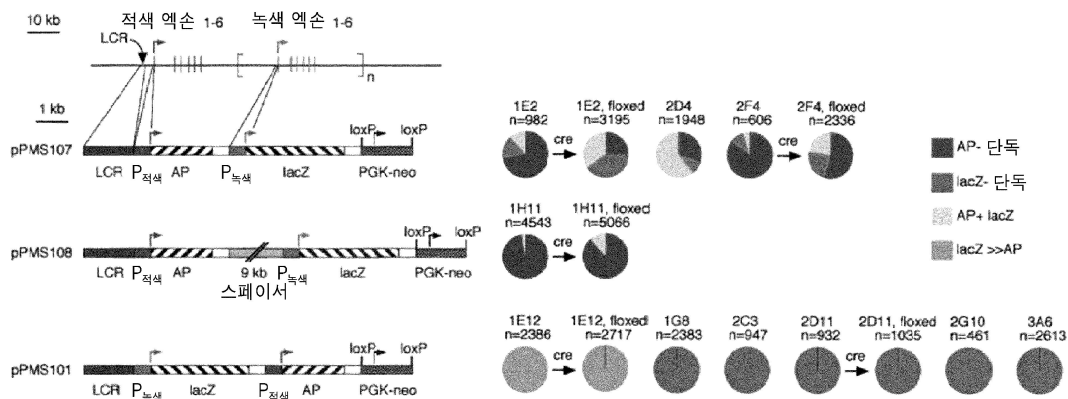
심사관 : 김현미

(54) 발명의 명칭 망막 질환 치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 원추세포 이영양증, 원추세포-간상세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애의 예방 및/또는 치료에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2800/22 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

(72) 발명자

스미스 알렉산더

영국 그레이터 런던 이씨1위 9이엘 런던 배스 스트
리트 11-43 유씨엘 인스티튜트 오브 오프탈몰로지

조르지아디스 아나스타시오스

영국 그레이터 런던 이씨1위 9이엘 런던 배스 스트
리트 11-43 유씨엘 인스티튜트 오브 오프탈몰로지

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 하기를 포함하는 LCR(유전자좌 제어 영역)

(i) 서열번호 1; 또는

(ii) 상기 서열 (a)(i)와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 서열; 및

(b) 하기를 포함하는 프로모터 요소

(i) 서열번호 17의 적어도 마지막 200개의 뉴클레오타이드를 갖는 서열; 또는

(ii) 서열번호 2의 적어도 마지막 200개의 뉴클레오타이드를 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열; 또는

(iii) 상기 서열 (b)(ii)와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열;

을 5'에서 3' 방향으로 포함하는 2500 개 이하의 뉴클레오타이드 길이의 폴리뉴클레오타이드 분자로서,

상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성을 나타내는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 서열 (b)(iii)는 상기 서열 (b)(ii)와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 LCR은 서열번호 1의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 LCR은 서열번호 1의 서열과 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 LCR은 서열번호 1의 서열과 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 (b)는

(i) 서열번호 17의 적어도 마지막 500개의 뉴클레오타이드를 갖는 서열, 또는

(ii) 서열번호 2의 적어도 마지막 500개의 뉴클레오타이드를 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열; 또는

(iii) 상기 서열 (ii)와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열을 포함하고,

상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성을 나타내는 것인 폴리뉴클레오타이드 분

자.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 서열 (b)(iii)는 상기 서열 (b)(ii)와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열로서, 서열번호 2의 1934번째 뉴클레오타이드 내지 1939번째 뉴클레오타이드에 해당하는 뉴클레오타이드가 서열번호 16으로 대체된 것인 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 요소는 서열번호 17의 적어도 마지막 200개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 요소는 서열번호 17의 적어도 마지막 500개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터 요소는 서열번호 3을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 4 또는 서열번호 15를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 15, 또는 서열번호 15와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터 요소는 서열번호 5를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 6을 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는:

- (a) 서열번호 1을 포함하는 LCR; 및
- (b) 서열번호 3을 포함하는 프로모터 요소를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 16

청구항 1의 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 원추세포 광수용체-특이적 방식으로 발현될 서열에 작동 가능하게 연결된 것인 발현 구조체.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *GNAT2*, *KCNV2* 또는 *CACNA2D4*인 것인 발현 구조체.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14, 또는 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회

복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14, 또는 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14, 또는 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 21

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 8, 또는 서열번호 8에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 22

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 8, 또는 서열번호 8에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 23

청구항 17에 있어서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 8, 또는 서열번호 8에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 기능을 갖는 서열을 포함하는 것인 발현 구조체.

청구항 24

청구항 1에 따른 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 벡터.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 바이러스 벡터인 것인 벡터.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터인 것인 벡터.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 벡터는 AAV 게놈 또는 이의 유도체, 및 AAV 캡시드를 포함하는 것인 벡터.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 벡터는 AAV 게놈 또는 이의 유도체를 포함하고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 원추세포 광수용체-특이적 방식으로 발현될 서열에 작동 가능하게 연결되고, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 *CNGA3*인 것인 벡터.

청구항 30

청구항 27에 있어서, 상기 유도체는 키메라, 서플 또는 캡시드 변형 유도체인 것인 벡터.

청구항 31

청구항 27에 있어서, 상기 AAV 게놈은 AAV의 자연 유래 혈청형 또는 단리물 또는 클레드(clade)로부터 유래된

것인 것인 벡터.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 AAV 게놈은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래되거나, 또는 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래되거나, 또는 상기 AAV 게놈은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래되고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래되는 것인 벡터.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 게놈은 AAV2로부터 유래되고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 34

청구항 24의 벡터를 함유하는 숙주 세포.

청구항 35

청구항 34에 있어서, HEK293 또는 HEK293T 세포인 것인 숙주 세포.

청구항 36

청구항 16에 따른 발현 구조체를 포함하는 벡터.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 바이러스 벡터인 것인 벡터.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터인 것인 벡터.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 벡터는 AAV 게놈 또는 이의 유도체, 및 AAV 캡시드를 포함하는 것인 벡터.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 벡터는 AAV 게놈 또는 이의 유도체를 포함하고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 원주세포 광수용체-특이적 방식으로 발현될 서열에 작동 가능하게 연결되고, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 *CNGA3*인 것인 벡터.

청구항 42

청구항 39에 있어서, 상기 유도체는 키메라, 서플 또는 캡시드 변형 유도체인 것인 벡터.

청구항 43

청구항 39에 있어서, 상기 AAV 게놈은 AAV의 자연 유래 혈청형 또는 단리물 또는 클레드(clade)로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 AAV 게놈은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래되거나, 또는 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래되거나, 또는 상기 AAV 게놈은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래되고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 계놈은 AAV2로부터 유래되고, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 46

청구항 36의 벡터를 함유하는 숙주 세포.

청구항 47

청구항 46에 있어서, HEK293 또는 HEK293T 세포인 것인 숙주 세포.

청구항 48

청구항 24 내지 33 및 36 내지 45 중 어느 한 항에 따른 벡터를 포함하는, 색맹의 예방 또는 치료 방법에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 상기 벡터를 환자에게 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사 투여하는 것에 의한 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 망막 질환, 특히 원추세포 이영양증, 원추세포-간상세포 이영양증 및 색맹의 치료 및/또는 예방을 위한 요법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마우스 및 인간을 포함한 많은 포유 동물 중에서, 희미한 조명 하에서 시력을 매개하는 간상세포 광수용체의 수는 원추세포 광수용체의 수보다 훨씬 많다. 그러나 조명이 낮과 밤 내내 원추세포를 작동시킬 수 있는 산업화된 세계에서는 간상세포-매개 시력이 덜 중요하다. 출생 시부터 간상세포 기능이 없는 많은 환자는 우연히로만 확인되며, 실제로는 그들의 비정상적인 시력을 인식할 수 없다. 대조적으로, 원추세포 기능 장애가 존재하는 경우, 환자는 항상 증상이 있고 종종 원추세포 기능 장애의 정도에 의존하는 시각 장애를 겪는다.

[0003] 일부 조건에서, 원추세포만 또는 대부분의 원추세포가 손실되거나 기능 장애가 발생하며 간상세포는 상대적으로 보존된 상태로 유지된다. 이러한 상태는 원추세포 이영양증 또는 원추세포-간상세포 이영양증 (CRD)으로 알려져 있다. 원추세포 또는 원추세포-간상세포 이영양증은 원추세포의 원발성 손실, 또는 때로는 간상세포와 원추세포 둘 모두의 손실이 수반되는 것을 특징으로 하는 선천적 망막 이영양증이다. 증상은 시력 손실, 밝은 빛에 대한 민감성 및 낮은 색각을 포함한다. 예를 들어, 색맹은 출생 시부터 원추세포 기능이 완전히 없으나 아마도 정상적인 간상세포 기능을 가진 중증의 유전성 망막 이영양증이다. *CNGA3*, *CNGB3* 및 *PDE6C*를 포함한 여러 유전자의 돌연변이가 상기 질환과 관련이 있다. 질환 유발 유전자 각각은 광수용체 세포의 과분극을 일으킴으로써 빛을 전기 신호로 번역하는 원추세포 광변환 단계의 필수 성분을 암호화한다. 예를 들어, 원추세포 광수용체 세포에서 *CNGA3* 또는 *CNGB3* 단백질의 결핍은 세포가 빛에 반응하여 과분극 할 수 없게 한다. 결과적으로, 상기 세포는 처음에는 생존하지만 기능하지 않으며, 환자는 출생 시부터 낮은 시력, 색각 부족 및 광선기피증으로 고통받는다. 다양한 그룹이 *CNGA3*-결손 마우스에서 원추세포의 생존 및 기능 뿐만 아니라 시력을 향상시키는 요법 프로토콜을 개발하였다.

[0004] 원추세포 이영양증의 발병에 관련된 원인 유전자의 다른 예는 *KCNV2*, *PDE6H*, *GNAT2* 및 *CACNA2D4*를 포함한다. *KCNV2* 유전자는 칼륨 전압-게이트 채널 변형 서브패밀리 V 구성원 2 단백질 (potassium voltage-gated channel modifier subfamily V member 2 protein)을 암호화한다. *KCNV2*의 돌연변이는 비범한 간상세포 전기 망막 전위도 (ERG)를 갖는 원추세포 이영양증 또는 망막 원추세포 이영양증 유형 3B, 밝은 빛의 섬광에 반응하여 비범한 ERG와 함께 평생 시력 손실을 유발하는 삼염색체 열성 장애와 관련이 있다. *PDE6H* 유전자는 원추세포-특이적 cGMP 포스포디에스테라제의 억제 (감마) 서브유닛을 암호화한다. 이 유전자의 돌연변이는 망막 원추세포 이영양증 타입 3A (RCD3A)와 관련이 있다. *GNAT2* 유전자는 트랜스듀신의 원추세포-특이적 알파 서브유닛을

암호화한다. 유전자에서의 돌연변이는 소아 발병 원추세포 이영양증을 유발할 수 있다. *CACNA2D4* 유전자는 전압-의존적, 알파-2/델타 서브유닛 4인 칼슘 채널을 암호화한다. 유전자에서의 돌연변이는 비-진행성 원추세포 기능 장애 (망막 원추세포 이영양증 4, RCD4)를 유발할 수 있다.

[0005] 연령-관련 황반 변성 (AMD)에서, 시각 장애는 주로 중심 황반의 원추세포가 많은 중심와 (fovea) 의 변성에 의해 발생한다. 따라서, 환자는 중심 시야 및 시력을 잃지만, 종종 비교적 잘 보존된 주변 황반을 가지며, 따라서 중심와 외부의 원추세포 부족에 의해 제한되는 유용한 잔존 시력을 갖는다.

[0006] 원추세포-간상세포 이영양증과 같은 망막 장애를 치료 또는 예방하기 위해, 원추세포 생존 및 기능을 개선할 수 있는 요법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 원추세포 광수용체에서 유전자를 발현시키기 위한 핵산, 전사 제어 단위 (TCU), 최적화된 유전자 서열, 발현 구조체 및 벡터를 제공한다.

[0008] 본원에 개시된 TCU는 M/L-옵신 유전자와 제어 영역 (LCR)의 제어 하에 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편을 포함하고 3 가지 인간 원추세포 유형 모두에서 높은 수준의 발현을 유도하는데 유용하다.

[0009] 원추세포 광수용체에서 유전자를 발현시키기 위해 최적화된 TCU의 제어 하에 인간 *CNGA3* 유전자를 포함하는 발현 구조체가 또한 제공되며, 여기서 상기 TCU는 M/L-옵신 유전자와 제어 영역의 제어 하에 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편을 포함한다.

[0010] 일부 구체예에서, 상기 TCU 및 발현 구조체는 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편에서 전사 시작 부위의 바로 다운스트림에 있는 6 bp의 돌연변이(돌연변이 "M8")를 포함하고, 여기서 상기 돌연변이는 시간이 지남에 따라 이 돌연변이를 포함하는 벡터 및 발현 구조체의 치료 효과를 증가시킬 수 있다.

[0011] *CNGA3* 유전자의 코돈-최적화된 서열이 추가로 제공되며, 이는 서열번호 8로 제공된다.

[0012] 본원에 개시된 발현 구조체를 포함하는 바이러스 벡터와 같은 벡터가 또한 제공된다. 상기 발현 구조체는 바람직하게는 아데노바이러스 혈청형 8 (AAV8) 또는 대안적인 강한 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터를 사용하여 전달된다.

[0013] 본 발명은 또한, 색맹과 같은 원추세포 이영양증을 포함하나 이에 제한되지 않는 망막 장애 또는 이영양증의 치료 및/또는 예방을 위해 핵산, 전사 조절 단위 (TCU), 최적화된 유전자 서열, 발현 구조체 및 벡터를 사용하는 방법을 제공한다.

[0014] 따라서, 일 양상에서 본 발명은:

[0015] 5'에서 3' 방향으로 하기를 포함하는 2500 개 이하 뉴클레오타이드 길이의 전사 제어 단위 (TCU)를 제공한다:

[0016] (a) 하기를 포함하는 유전자와 제어 영역 (LCR)

[0017] (i) 서열번호 1; 또는

[0018] (ii) 상기 서열 (a)(i)와 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열; 및

[0019] (b) 하기를 포함하는 프로모터 요소

[0020] (i) 서열번호 2 또는 서열번호 17의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드; 또는

[0021] (ii) 상기 서열 (b)(i)와 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열;

[0022] 상기 TCU는 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성을 나타낸다.

[0023] 상기 양상에 따르면, 프로모터 요소 (b)는 서열번호 2 또는 서열번호 17의 적어도 마지막 200 개 또는 마지막 500 개 뉴클레오타이드, 또는 서열번호 2 또는 서열번호 17의 마지막 200 개 또는 마지막 500 개 뉴클레오타이드와 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 선택적으로 포함할 수 있다.

[0024] 상기 양상 중 어느 하나에 따르면, 프로모터 요소 (b)는 서열번호 3의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 선택적으로 상기 프로모터 요소 (b)는 또한 서열번호 3의 뉴클레오타이드 1 내지 35로부터 선택된 적어

도 10 개의 인접한 뉴클레오타이드의 서열 또는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 1 내지 35와 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 적어도 10 개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함하는 서열을 포함한다.

- [0025] 상기 양상 중 어느 하나에 따르면, 프로모터 요소 (b)는 서열번호 3 [hG1.7에서 529 bp 프로모터 요소] 또는 서열번호 5 [hG1.4에서 247 bp 프로모터 요소] 또는 서열번호 3 또는 서열번호 5와 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 양상 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로모터 요소는 서열번호 16 [M8 돌연변이]를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 양상 중 어느 하나에 따르면, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 1934 내지 1939 (GGGCCG)에 상응하는 뉴클레오타이드는 서열번호 16으로 대체될 수 있다.
- [0027] 일 양상에 따르면, 상기 TCU는 서열번호 4 [4 개의 뉴클레오타이드가 누락된 hG1.7 프로모터 구조체의 변이체], 서열번호 6 [hG1.4 구조체] 또는 서열번호 15 [생성물에서의 hG1.7 프로모터 구조체]를 포함한다.
- [0028] 본 발명은 또한 본원에 기재된 TCU를 포함하는 발현 구조체를 제공하며, 여기서 상기 TCU는 원추세포 광수용체-특이적 방식으로 발현되도록 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일 구체예에서, 상기 TCU에 작동 가능하게 연결된 서열은 CNGA3, CNGB3, PDE6C, PDE6H, GNAT2, KCNV2 또는 CACNA2D4를 암호화하는 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14를 포함하거나, 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14와 적어도 80 %의 서열 동일성을 갖고, 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 능력을 갖는다. 일 구체예에서, 상기 작동 가능하게 연결된 서열은 서열번호 8 [CNGA3 코돈 최적화된 서열]을 포함하거나, 또는 서열번호 8과 적어도 80 %의 서열 동일성을 가지며 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 능력을 갖는다.
- [0029] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산, TCU, 프로모터 단편, 코돈 최적화된 유전자 및/또는 발현 구조체를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0030] 일부 구체예에서, 상기 벡터는 AAV 벡터이고 및/또는 AAV 게놈 또는 이의 유도체를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 유도체는 키메라, 서플 또는 캡시드 변형된 유도체이다. 일 구체예에서, 상기 AAV 게놈은 자연적으로 유래된 혈청형 또는 AAV의 단리 또는 클레드 (clade)로부터 유래된다. 일 구체예에서, 상기 AAV 게놈은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래되고 및/또는 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된다. 바람직한 구체예에서, 상기 게놈은 AAV2로부터 유래되고 상기 캡시드는 AAV8로부터 유래된다. 일 구체예에서, AAV 벡터는 CNGA3를 암호화하는 유전자를 운반한다.
- [0031] 본 발명은 또한 본원에 개시된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포 뿐만 아니라 본원에 개시된 바와 같은 핵산 또는 바이러스 벡터를 생성하는 숙주 세포를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 숙주 세포는 HEK293 또는 HEK293T 세포이다.
- [0032] 본원에 기재된 핵산 또는 벡터 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 또한 제공된다.
- [0033] 본 발명은 또한 망막 장애를 예방 또는 치료하는 방법에서 본원에 기재된 핵산, 벡터, 최적화된 유전자 서열 및/또는 발현 구조체를 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본원에 기재된 핵산, 벡터, 최적화된 유전자 서열 및/또는 발현 구조체는 망막 장애의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 사용된다. 치료적 유효량의 본원에 개시된 벡터를 투여하는 것을 포함하는, 망막 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 망막 장애를 치료 또는 예방하는 방법이 또한 제공된다. 일 구체예에서, 상기 망막 장애는 색맹이다. 일부 구체예에서, 상기 벡터는 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사에 의해 환자에게 투여된다.
- [0034] **서열의 간단한 설명**
- [0035] 서열번호 1은 인간 M/L 옥신 유전자좌 제어 영역의 1.2 kb 단편의 DNA 서열을 나타낸다.
- [0036] 서열번호 2는 인간 M 옥신 프로모터의 2.0 kb 단편의 DNA 서열을 나타낸다.
- [0037] 서열번호 3은 인간 M 옥신 프로모터의 500 bp 단편의 DNA 서열을 나타낸다.
- [0038] 서열번호 4는 인간 M/L 옥신 유전자좌 제어 영역의 1.2 kb 단편 및 이에 이은 인간 M 옥신 프로모터의 500 bp 단편으로 구성된 hG1.7(M8) 구조체의 변이체의 DNA 서열을 나타내고, 상기 옥신 프로모터 단편은 상기 M8 돌연변이를 포함한다.
- [0039] 서열번호 5는 인간 M 옥신 프로모터의 200 bp 단편의 DNA 서열을 나타낸다.

- [0040] 서열번호 6은 인간 M/L 옵션 유전자와 제어 영역의 1.2 kb 단편 및 이에 이은 인간 M 옵션 프로모터의 200 bp 단편으로 구성된 hG1.4(M8) 구조체의 cDNA 서열을 나타내고, 상기 옵션 프로모터 단편은 상기 M8 돌연변이를 포함한다.
- [0041] 서열번호 7은 인간 *CNGA3* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0042] 서열번호 8은 인간 *CNGA3* 유전자의 코돈-최적화된 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0043] 서열번호 9는 인간 *PDE6C* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0044] 서열번호 10은 인간 *PDE6H* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0045] 서열번호 11은 인간 *GNAT2* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0046] 서열번호 12는 인간 *KCNV2* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0047] 서열번호 13은 인간 *CACNA2D4* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0048] 서열번호 14는 인간 *CNGB3* 유전자의 cDNA 서열을 나타낸다.
- [0049] 서열번호 15는 인간 M/L 옵션 유전자와 제어 영역의 1.2 kb 단편 및 이에 이은 서열 GATC 및 인간 M 옵션 프로모터의 500 bp 단편을 포함하는 hG1.7(M8) 구조체의 DNA 서열을 나타내고, 상기 옵션 프로모터 단편은 M8 돌연변이를 포함한다.
- [0050] 서열번호 16은 M8 돌연변이의 서열을 나타낸다.
- [0051] 서열번호 17은 M8 돌연변이를 포함하는 인간 M 옵션 프로모터의 2.0 kb 단편의 DNA 서열을 나타낸다.
- [0052] 개시된 폴리뉴클레오티드 서열의 서로 다른 적용은 당업계의 특정 요구에 맞추어질 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 것이며, 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0053] 또한, 본 명세서 및 첨부된 청구 범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 그 내용이 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "폴리뉴클레오티드"에 대한 언급은 "폴리뉴클레오티드들"를 포함하고, "프로모터"에 대한 언급은 "프로모터들"을 포함하며, "벡터"에 대한 언급은 두개 이상의 이러한 벡터들을 포함한다. "M/L 옵션" 및 "L/M 옵션"은 녹색 및 적색 옵션을 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다.
- [0054] 상기 또는 하기에 관계없이 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 그 전문이 본원에 참조로 통합된다.
- [0055] **전사 제어 단위 (TCU)**
- [0056] 일 양상에서, 본 발명은 원추세포 광수용체 세포에서 유전자의 발현에 최적화된 TCU를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 M/L 옵션 유전자와 제어 영역 (LCR)의 단편을 포함하는 TCU를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 상기 TCU는 인간 M/L 옵션 유전자와 제어 영역 (LCR)의 단편을 포함한다.
- [0057] 다른 구체예에서, 본 발명은 M 옵션 프로모터 또는 이의 단편과 같은 프로모터 영역을 포함하는 TCU를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본원에 개시된 TCU는 인간 M 옵션 프로모터 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0058] 일부 구체예에서, 상기 TCU는 인간 M/L 옵션 유전자와 제어 영역 (LCR) 단편 및/또는 변이체 및 인간 M-옵션 프로모터또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 TCU는 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성을 갖는다.
- [0059] 일 구체예에서, 상기 TCU는 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 원추세포 광수용체-특이적 발현을 부여하는 서열번호 1 유래의 전형적으로 연속하는 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCR을 포함한다. 서열번호 1에 대해 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 또는 적어도 99 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 LCR이 추가로 고려된다. 일부 구체예에서, 상기 LCR은 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실 또는 삽입을 포함하고, 여기서 상기 결실 또는 삽입은 변형된 LCR에 작동 가능하게 연결된 유전자 페이로드 (payload)의 원추세포 광수용체-특이적 발현을 막지 않는다.
- [0060] 일 구체예에서, 상기 TCU는 M 옵션 프로모터 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 M 옵션 프로모터 또는 이의 단편은 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열상의 원추세포 광수용체-특이적 발현을 부여하는 서열번호 2 또는 서열번호 17 유래의 전형적으로 연속하는 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 M 옵션

신 프로모터 또는 이의 단편은 예를 들어, 서열번호 2 또는 서열번호 17의 최대 1200 개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 17의 1100 개 이하, 1000 개 이하, 900 개 이하, 800 개 이하, 700 개 이하, 600 개 이하, 500 개 이하, 400 개 이하, 300 개 이하, 또는 200 개 이하의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터의 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 17의 적어도 200, 300, 400 또는 500 개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 서열번호 2 또는 서열번호 17의 적어도 200 개, 적어도 300 개, 적어도 400 개 또는 적어도 500 개의 인접한 뉴클레오타이드와 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 또는 적어도 99 %의 서열 동일성을 갖는 M-옵신 프로모터의 단편이 추가로 고려된다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입을 포함하고, 여기서 상기 결실 또는 삽입은 변형된 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편에 작동 가능하게 연결된 유전자 페이로드의 원추세포 광수용체-특이적 발현을 막지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편은 기본적으로 서열번호 2 또는 서열번호 17로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 17로 구성된다.

[0061] 바람직하게는, 상기 TCU는 서열번호 3을 포함하는 M-옵신 프로모터의 단편 또는 서열번호 3과 실질적으로 동일한 서열을 포함한다. 서열번호 3의 적어도 200 개, 적어도 300 개, 적어도 400 개, 또는 적어도 500 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 M-옵신 프로모터의 단편 또는 서열번호 3의 적어도 200 개, 적어도 300 개, 적어도 400 개, 또는 적어도 500 개의 뉴클레오타이드와 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 적어도 99 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 TCU가 추가로 고려된다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터의 단편은 기본적으로 서열번호 3으로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터의 단편은 서열번호 3으로 구성된다.

[0062] 일부 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 3의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드, 또는 서열번호 3의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드에 대해 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열 및 서열번호 3의 뉴클레오타이드 1-35의 적어도 10 개, 적어도 15 개, 적어도 20 개, 적어도 25 개, 적어도 30 개 또는 적어도 35 개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 3의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드 또는 서열번호 3의 적어도 200 개의 뉴클레오타이드에 대해 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 서열 및 서열번호 3의 뉴클레오타이드 1-35에 상응하는 적어도 10 개, 적어도 15 개, 적어도 20 개, 적어도 25 개, 적어도 30 개 또는 적어도 35 개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0063] 바람직하게는, 상기 TCU는 서열번호 5 또는 서열번호 5와 실질적으로 동일한 서열을 포함하는 M-옵신 프로모터의 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터의 단편은 기본적으로 서열번호 5로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 M-옵신 프로모터의 단편은 서열번호 5로 구성된다.

[0064] 상기 TCU에서 사용하기 위해 고려되는 추가적인 프로모터 및 이의 단편은 상기 서열과 서열이 다르지만 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성을 유지하는 프로모터 또는 프로모터 단편이다. 이러한 서열은 상기 정의된 서열번호 2 또는 서열번호 17로부터의 연속 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 또는 적어도 99 % 서열 동일성을 갖는다. 변이체의 서열 동일성 백분율은 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 17의 상응하는 부분의 전체 길이에 걸쳐 측정되거나 또는 변이체 서열과 정렬된 서열번호 2 또는 서열번호 17의 500 개, 600 개, 700 개, 800 개, 900 개, 1000 개, 1100 개 또는 1200 개의 뉴클레오타이드 구획에 걸쳐 측정된다. 추가로 서열번호 3 및/또는 서열번호 5와 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 % 또는 적어도 99 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 프로모터 및 이의 단편이 고려된다.

[0065] 서열 동일성은 임의의 적합한 알고리즘을 사용하여 계산될 수 있다. 예를 들어, PILEUP 및 BLAST 알고리즘을 사용하여 예를 들어 Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10에 기재된 바와 같이 동일하거나 상응하는 서열 확인 (전형적으로 이들의 기본 설정)과 같은 유사성 계산 또는 서열 배열(line up)을 할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공공연하게 이용 가능하다. 이 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 마디와 정렬될 때 일부 양의 값인 임계값 점수 T와 일치하거나 만족하는 쿼리 서열에서 길이 W의 짧은 마디를 식별하여 우선 높은 점수 서열 쌍 (HSP)을 식별하는 것을 포함한다. T는 이웃 마디 점수 임계값 (상기 Altschul et al)으로 지칭된다. 이러한 초기 이웃 마디 적중은 이를 포함하는 HSP를 찾기 위한 검색을 시작하기 위한 시드 역할을 한다. 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한, 마디 적중은 각 서열을 따라 양방향으로 확장된다. 각 방향으로의 마디 적중에 대한 확장은 다음과 같은 경우 중지된다: 누적 정렬 점수가 최대 달성된 값에서 수량 X만큼 떨어진 경우; 하나 이상의 음의 점수 잔기 정렬의 누적으로 인해 누적 점수가 0 이하로 된

경우; 또는 서열의 끝에 도달한 경우. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 감도와 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 기본적으로 마디 길이 (W) 11, BLOSUM62 점수 매트릭스 (Henikoff 및 Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 참조) 정렬 (B) 50, 예상 (E) 10, M=5, N=4, 및 두 가닥의 비교를 사용한다.

- [0066] BLAST 알고리즘은 두 서열 사이의 유사성에 대한 통계적 분석을 수행한다; 예를 들어, Karlin 및 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787를 참조. BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 가장 작은 합 확률 ($P(N)$)이며, 이는 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 일치이 우연히 발생할 확률의 표시를 제공한다. 예를 들어, 제 1 서열과 제 2 서열의 비교에서 가장 작은 합 확률이 약 1 미만, 바람직하게는 약 0.1 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 서열은 다른 서열과 유사한 것으로 간주된다. 대안적으로, UWGCG 패키지는 동일성을 계산 (예를 들어, 기본 설정에 사용되는) 하는데 사용될 수 있는 BESTFIT 프로그램을 제공한다 (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).
- [0067] 일부 구체예에서, 상기 TCU는 M8 돌연변이 서열 TCTAGA (서열번호 16)를 포함하는 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 16의 1, 2, 4, 5 또는 6 개의 뉴클레오티드를 포함하는 M-옵신 프로모터 또는 이의 단편을 포함한다. 예를 들어, 서열번호 2의 뉴클레오티드 1934 내지 1939 (GGGCCG)에 상응하는 뉴클레오티드는 서열번호 16으로 대체될 수 있다.
- [0068] 일부 구체예에서, 상기 TCU는 M/L 옵신 LCR 및/또는 M-옵신 프로모터 영역에서 자연적으로 발견되지 않는 추가적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 추가적인 뉴클레오티드 서열은 LCR 또는 M-옵신 프로모터 영역의 5' 또는 3' 일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 서열은 LCR과 M-옵신 프로모터 영역 사이에 위치된다. 일 구체예에서, 상기 서열 "GATC"는 LCR 영역과 M-옵신 영역 사이에 위치된다.
- [0069] 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 4를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 6을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 15를 포함한다.
- [0070] 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 15와 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 또는 적어도 99 %의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 TCU가 추가로 고려된다.
- [0071] 일 구체예에서, 상기 TCU는 기본적으로 서열번호 4로 구성된다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 기본적으로 서열번호 6으로 구성된다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 기본적으로 서열번호 15로 구성된다.
- [0072] 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 4로 구성된다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 6으로 구성된다. 일 구체예에서, 상기 TCU는 서열번호 15로 구성된다.
- [0073] 원추세포 광수용체-특이적 프로모터 활성이 유지되는 한, 상기 TCU는 더 큰 서열 내의 어느 곳에서도 추가로 위치될 수 있다. 구체예에서, 본원에 기재된 TCU는 본원에 기재된 바와 같이 원추세포 광수용체-특이적 방식으로 발현되기 위해 유전자 (예를 들어, 페이로드)에 5' 또는 5' 바로 옆에 위치한다.
- [0074] 상기 TCU는 또한, 하나 이상의 추가 프로모터, 인핸서 및/또는 LCR과 같은 다른 조절 요소와 함께 협력하여(in tandem) 사용될 수 있다.
- [0075] 상기 TCU는 단리된 핵산 분자 형태로 제공될 수 있다.
- [0076] 본 개시가 제공하는 TCU는 원추세포 광수용체-특이적 방식에서 원추세포 광수용체에서 유전자 (페이로드)의 발현을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 원추세포 광수용체-특이적 발현은 원추세포 광수용체에만 존재하지만 다른 세포 유형에서는 현저하게 발현되지 않는 발현으로 정의될 수 있다. 원추세포 광수용체-특이적 발현은 다른 세포 유형, 특히 간상세포 광수용체 세포보다 원추세포 광수용체에서 약 10 배 이상, 20 배 이상, 50 배 이상 또는 100 배 이상 큰 발현으로 정의될 수 있다. 원추세포 광수용체 및 다른 세포 유형에서의 발현은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 표준 기술에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, RNA 발현 수준은 정량적 실시간 PCR에 의해 측정될 수 있다. 단백질 발현은 웨스턴 블롯팅 또는 면역 조직 화학에 의해 측정될 수 있다. 본원에 제공된 TCU는 모든 원추세포 광수용체 서브타입에서 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 제공한다.
- [0077] 본 개시가 제공하는 TCU는 참조 TCU 또는 프로모터와 비교하여 원추세포 광수용체에서 현저하게 증가된 유전자의 발현을 유도하기 위해 사용될 수 있다. 현저하게 증가된 발현은, 참조 TCU 또는 원래의 M-옵신 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는 프로모터에 의해 유도된 발현과 비교할 때, 원추세포 광수용체에서의 유전자 발현의 약 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 200 배 또는 300 배 이상으로 정의될 수 있다. 원추세포 광수용체 및 다른

세포 유형에서의 발현은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 표준 기술에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, RNA 발현 수준은 정량적 실시간 PCR에 의해 측정될 수 있다. 단백질 발현은 웨스턴 블롯팅 또는 면역 조직 화학에 의해 측정될 수 있다.

[0078] 본 개시에 의해 제공되는 TCU는 GFP와 같은 원추세포 광수용체에서 정상적으로 발현되지 않는 단백질을 발현하는 뉴클레오티드 서열을 포함하여 원추세포 광수용체에서 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 단백질의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다.

[0079] 예를 들어, 본 개시에서 제공된 TCU는, 원추세포의 정상 기능에 필수적인 단백질인 구아닌 뉴클레오티드-결합 단백질 G(t) 서브유닛 알파-2 (GNAT2), 시클릭 뉴클레오티드-게이트 양이온 채널 알파-3 (CNGA3), 시클릭 뉴클레오티드-게이트 양이온 채널 베타-3 (CNGB3), 원추세포 cGMP-특이적 3',5'-시클릭 포스포디에스테라아제 서브유닛 알파' (PDE6C), 망막 원추세포 로돕신-민감성 cGMP 3',5'-시클릭 포스포디에스테라아제 서브유닛 감마 (PDE6H), 칼륨 전압-게이트 채널 서브패밀리 V 구성원 2 (KCNV2) 및 전압-의존성 칼슘 채널 서브유닛 알파-2/델타-4 (CACNA2D4)를 포함하나 이에 제한되지 않는 원추세포 광수용체의 정상 기능에 필요한 원추세포 광수용체에서의 유전자를 발현시키는데 유용하다. 이와 같이, 본 발명은 원추세포 광수용체에서 예를 들어 *GNAT2*, *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *KCNV2* 및 *CACNA2D4* 유전자를 발현시키기 위한 TCU 및 방법을 제공한다. 상기 *PDE6C*, *GNAT2*, *CNGA3* 및 *CNGB3* 유전자는 색맹에 기여하는 4 가지 유전자이다. PDE6C는 원추세포 cGMP-특이적 3',5'-시클릭 포스포디에스테라아제의 알파 서브유닛이다. GNAT2는 원추세포 광변환 단계의 필수 요소인 원추세포 트랜스듀신(cone transducin)의 알파 성분이다. CNGA3는 빛에 반응하여 닫히고, 그리하여 원추세포를 과분극시키는 원추세포 시클릭 뉴클레오티드-게이트 이온 채널의 알파 서브유닛이다. CNGB3은 빛에 반응하여 닫히고, 그리하여 원추세포를 과분극시키는 원추세포 시클릭 뉴클레오티드-게이트 이온 채널의 베타 서브유닛이다.

[0080] 발현 구조체

[0081] 본 발명은 또한 원추세포 광수용체-특이적 방식으로 발현될 유전자 서열과 같은 서열에 작동 가능하게 연결된, 본원에 개시된 TCU를 포함하는 발현 구조체를 제공한다.

[0082] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 병렬을 지칭하며, 여기서 기재된 구성 요소는 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계로 존재한다. 암호화 서열에 "작동 가능하게 연결된" 제어 서열은 암호화 서열의 발현이 제어 서열과 양립되는 조건 하에서 달성되는 방식으로 결합된다. 동일하거나 상이한 폴리뉴클레오티드의 다중 카피가 발현 구조체에 도입될 수 있다. 발현 구조체는 암호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 단백질 발현을 유도할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열로서 정의될 수 있다.

[0083] 따라서, 상기 발현 구조체는 예를 들어 *PDE6H*, *PDE6C*, *GNAT2*, *KCNV2*, *CACNA2D4*, *CNGA3* 또는 *CNGB3* 암호화 서열, 예를 들어 서열번호 7 내지 14로부터 선택된 폴리뉴클레오티드, 또는 서열번호 7 내지 14로부터 선택된 서열로부터 번역된 단백질의 기능성을 보유하는 서열번호 7 내지 14의 변이체를 포함할 수 있다.

[0084] 서열번호 7 내지 14로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드의 변이체는 핵산 서열에서 자연적으로 발생하는 변이체를 포함하여 서열번호 7 내지 14의 서열의 임의의 변이체로서 정의될 수 있다. 상기 변이체는 서열번호 7 내지 14 중 어느 하나에 대해 적어도 약 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 것으로 정의될 수 있으며, 여기서 상기 변이체 서열로부터 번역된 폴리펩티드는 그의 기능성을 보유한다. 상기 변이체는 서열번호 7 내지 14 중 어느 하나에 대해 적어도 약 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 것으로 정의될 수 있으며, 여기서 상기 변이체 서열로부터 번역된 폴리펩티드는 원추세포 광수용체 기능을 회복하는 능력을 갖는다. 구체예에서, 상기 변이체는 암호화 서열의 코돈 최적화된 버전이다.

[0085] 본 개시에 의해 고려되는 발현 구조체는 원추세포 광수용체 기능을 회복할 수 있다. 원추세포 광수용체 기능 회복은 원추세포 광수용체 기능의 적어도 약 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 %를 회복하는 것으로 정의될 수 있다. 원추세포 광수용체 기능은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 표준 기술, 예를 들어 망막 반응의 망막 전위도 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0086] 원추세포 광수용체 기능의 회복은 또한 원추세포 생존을 연장하는 것으로 정의될 수 있다. 원추세포 생존의 연장은 원추세포 광수용체가 기능하는 시간이 원추세포 이영양증에 의해 영향을 받는 원추세포 광수용체와 비교하여 약 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % 또는 100 % 초과 연장시키는 것으로 정의될 수 있다. 원추세포 광수용체 기능은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 표준 기술, 예를 들어 망막 반응의 망막 전위도 분석에 의해 분석될 수 있다. 원추세포 생존 연장의 예는 또한

ERG 활성 개선 또는 ERG 활성 손실 둔화, 망막 민감성 개선 또는 망막 민감도의 점진적 손실 둔화/중지, 광수용체 세포의 손실 둔화 또는 중지, 시력 개선 또는 시력 손실 둔화/중지를 포함한다.

[0087] 본 발명의 발현 구조체는 *CNGA3* 유전자에 작동 가능하게 연결된 TCU를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 *CNGA3* 유전자 서열은 서열번호 7을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 *CNGA3* 유전자는 코돈-최적화된 서열을 포함한다. "코돈-최적화"는 표적 유기체, 예를 들어 인간에서의 발현을 향상시키기 위해 자연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드 서열을 변경하는 과정에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예에서, 서열번호 7의 인간 *CNGA3* 유전자는 최적화되어 서열번호 8을 생성하였다. 서열번호 8의 최적화된 *CNGA3* cDNA에서, 희귀 코돈은 보다 빈번하게 발생하는 것 및/또는 고도로 발현된 인간 유전자에서 흔히 발견되는 것으로 대체되었다.

[0088] 일 구체예에서, 상기 발현 구조체는 서열번호 8에 작동 가능하게 연결된 TCU를 포함한다.

[0089] **백터**

[0090] 본 발명은 본원에 개시된 핵산, TCU, 프로모터 및 이의 단편, 최적화된 유전자 및 발현 구조체를 포함하는 백터를 제공한다. 상기 백터는 임의의 유형일 수 있으며, 예를 들어 플라스미드 백터 또는 미니 원형 DNA일 수 있다.

[0091] 치료의 효능은 일반적으로 기증된 DNA의 적절하고 효율적인 전달에 의존한다. 이 과정은 일반적으로 바이러스 백터에 의해 매개된다. 이와 같이, 본 발명은 예를 들어 단순 포진 바이러스, 아데노 바이러스 또는 렌티 바이러스에 기초할 수 있는 바이러스 백터를 제공한다. 상기 바이러스 백터는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 백터 또는 이의 유도체일 수 있다. AAV는 일반적으로 비-병원성이므로 특히 매력적인 백터이다; 대다수의 사람들은 그들의 생애 동안 부작용 없이 이 바이러스에 감염되었다. 해부학적 장벽 및 면역 조절 인자의 결과인 안구 조직의 면역 특권은, 눈을 부정적인 면역 반응으로부터 크게 벗어나게 한다.

[0092] 일 구체예에서, 상기 바이러스 백터는 자연적으로 유래된 혈청형, AAV의 단리 또는 클레드, 또는 이의 유도체로부터의 AAV 계통을 포함한다.

[0093] "AAV 계통"은 AAV 바이러스 입자의 생성에 필요한 기능을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 이들 기능은 AAV 계통의 AAV 바이러스 입자로의 캡슐화 (encapsidation)를 포함하여, 숙주 세포에서 AAV에 대한 복제 및 패키징 사이클에서 작동하는 기능을 포함한다. 자연적으로 발생하는 AAV 바이러스는 복제-결합이 있으며 복제 및 패키징 사이클을 완료하기 위해 인 트랜스 (in trans)에서 헬퍼 기능 제공에 의존한다. 따라서, AAV *rep* 및 *cap* 유전자의 추가적인 제거와 함께, 본 발명의 백터의 AAV 계통은 복제-결합이 있다.

[0094] 상기 AAV 계통은 단일-가닥 형태, 포지티브 (positive) 또는 네거티브 (negative)-센스 (sense), 또는 대안적으로 이중-가닥 형태일 수 있다. 상기 이중-가닥 형태의 사용은 표적 세포에서 DNA 복제 단계를 우회할 수 있게 하여 전이 유전자 발현을 가속화 할 수 있다.

[0095] 상기 AAV 계통은 임의의 자연적으로 유래된 혈청형 또는 AAV의 단리 또는 클레드로부터 유래될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 자연에서 발생하는 AAV 바이러스는 다양한 생물학적 시스템에 따라 분류될 수 있다.

[0096] 일반적으로 AAV 바이러스는 혈청형 측면에서 언급된다. "혈청형"은 캡시드 표면 항원의 발현 프로파일로 인해 다른 변이체 아종과 구별하기 위해 사용될 수 있는 구별되는 반응성을 갖는 AAV의 변이체 아종에 해당한다. 전형적으로, 특정 AAV 혈청형을 갖는 바이러스는 임의의 다른 AAV 혈청형에 특이적인 중화 항체와 효과적으로 교차 반응하지 않는다. AAV 혈청형에는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 및 AAV11, 또한 영양류 너에서 최근 확인된 Rec2 및 Rec3와 같은 재조합 혈청형이 포함된다. 본 발명의 백터에서, 상기 계통은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 상기 캡시드는 또한 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 상기 계통 및 캡시드는 동일한 혈청형 또는 상이한 혈청형으로부터 유래될 수 있다.

[0097] 일 구체예에서, 본원에 개시된 백터의 계통은 AAV 혈청형 2 (AAV2), AAV 혈청형 4 (AAV4), AAV 혈청형 5 (AAV5) 또는 AAV 혈청형 8 (AAV8)로부터 유래된다. 사용될 수 있는 다른 AAV 백터는 AAV44.9 및 AAV-Anc80으로부터 유래된 백터를 포함한다. 상기 계통은 헤파린 설페이트 프로테오글리칸 수용체를 통해 표적 세포에 결합하는 AAV2로부터 유래되는 것이 가장 바람직하지만, 본 발명에서 사용하기에 특히 관심있는 다른 혈청형은 눈에서 망막 색소 상피와 같은 조직을 효율적으로 형질 도입시키는 AAV4, AAV5 및 AAV8을 포함한다.

[0098] 본 발명에서 사용하기 위한 ITR 서열, *rep* 또는 *cap* 유전자를 포함하는 AAV 계통 또는 AAV 계통의 요소의 서열은 AAV 전체 계통 서열에 대한 하기 등록 번호로부터 유래될 수 있다: 아데노-관련 바이러스 1 NC_002077, AF063497; 아데노-관련 바이러스 2 NC_001401; 아데노-관련 바이러스 3 NC_001729; 아데노-관련 바이러스 3B

NC_001863; 아데노-관련 바이러스 4 NC_001829; 아데노-관련 바이러스 5 Y18065, AF085716; 아데노-관련 바이러스 6 NC_001862; 조류 AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; 조류 AAV 변종 DA-1 NC_006263, AY629583; 소 AAV NC_005889, AY388617.

- [0099] AAV 바이러스는 또한 클레드 또는 클론의 측면에서 언급될 수 있다. 이는 자연적으로 유래된 AAV 바이러스의 계통 발생 관계, 및 전형적으로 공통 조상으로 거슬러 올라갈 수 있는 AAV 바이러스의 계통 발생 그룹을 지칭하며, 그의 모든 자손을 포함한다. 또한, AAV 바이러스는 특정 단리물, 즉 자연에서 발견된 특정 AAV 바이러스의 유전적 단리물과 관련하여 언급될 수 있다. 상기 용어 유전자 단리물은 다른 자연 발생 AAV 바이러스와 제한된 유전자 혼합을 겪음으로써 유전자 수준에서 인식 가능한 구별되는 집단을 정의하는 AAV 바이러스 집단을 설명한다.
- [0100] 본 발명에서 사용될 수 있는 AAV의 클레드 및 단리물의 예는 하기를 포함한다: 클레드 A: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609,
- [0101] Clade B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,
- [0102] Clade C: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623,
- [0103] Clade D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, Cy2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013,
- [0104] Clade E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rh61 AY530572, Rh52 AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556,
- [0105] Clade F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, Clonal Isolate AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.
- [0106] 통상의 기술자는 일반적인 지식에 기초하여 본 발명에서 사용하기에 적합한 AAV의 혈청형, 클레드, 클론 또는 단리물을 선택할 수 있다.
- [0107] 그러나, 본 발명은 또한 아직 확인되거나 특성화되지 않은 다른 혈청형의 AAV 계놈의 사용을 포함한다는 것을 이해해야 한다. 상기 AAV 혈청형은 AAV 바이러스의 감염 (또는 트로피즘 (tropism))의 조직 특이성을 결정한다. 따라서, 본 발명에 따라 환자에게 투여되는 AAV 바이러스에 사용하기에 바람직한 AAV 혈청형은 표적 원추세포 광수용체 세포의 감염에 대한 자연적인 트로피즘(tropism) 또는 높은 감염 효율을 갖는 것들이다.
- [0108] 바이러스 유전자를 포함한 야생형 AAV는 그들의 계놈 물질을 숙주 세포의 염색체 19에 삽입한다. 상기 AAV 단일 가닥 DNA 계놈은 2 개의 역 말단 반복부위 (inverted terminal repeats: ITR) 및 2 개의 오픈 리딩 프레임 포함하며, 구조적 (cap) 및 패키징 (rep) 유전자를 포함한다.
- [0109] 전형적으로, 자연적으로 유래된 혈청형 또는 AAV의 단리물 또는 클레드의 AAV 계놈은 하나 이상의 역 말단 반복부위 (ITR)을 포함한다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 2 개의 ITR을 포함하고, 바람직하게는 계놈의 각 말단에 하나씩 포함한다. ITR 서열은 *in cis*에서 기능적 복제 기점을 제공하고 세포의 계놈으로부터 벡터의 통합 및 절제를 가능하게 한다. 바람직한 ITR 서열은 AAV2의 그것 및 이의 변이체이다. 상기 AAV 계놈은 전형적으로 AAV 바이러스 입자에 대한 패키징 기능을 암호화하는 *rep* 및/또는 *cap* 유전자와 같은 패키징 유전자를 포함한다. 상기 *rep* 유전자는 하나 이상의 단백질 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40 또는 이의 변이체를 암호화한다. 상기 *cap* 유전자는 하나 이상의 VP1, VP2 및 VP3와 같은 캡시드 단백질 또는 이의 변이체를 암호화한다. 이들 단백질은

AAV 바이러스 입자의 캡시드를 구성한다. 캡시드 변이체는 하기에서 논의된다.

- [0110] 치료 목적을 위해, 상기 ITR은 치료 유전자 이외에 *in cis*로 제공될 수 있다. 따라서 상기 AAV 바이러스는 변형될 수 있다: 바이러스 유전자가 게놈으로부터 제거되어 재조합 AAV (rAAV)를 생성할 수 있다. 상기 rAAV는 치료 유전자 및 적어도 하나의 ITR을 포함한다. 상기 바이러스 유전자의 제거는 rAAV가 이의 게놈을 숙주 세포 DNA에 능동적으로 삽입할 수 없게 한다. 대신에, 상기 rAAV 게놈은 ITR을 통해 융합하여 원형, 에피솜 구조를 형성하거나, 기존 염색체 틈에 삽입된다. 바이러스 생산을 위해, rAAV로부터 제거된 구조적 및 패키징 유전자는 헬퍼 플라스미드 형태로 *in trans*로 공급된다.
- [0111] 바람직하게는, 상기 AAV 게놈은 환자에게 투여할 목적으로 유도체화 될 것이다. 이러한 유도체화는 당업계에서 표준적이고 본 발명은 AAV 게놈의 임의의 공지된 유도체, 및 당업계에 공지된 기술을 적용함으로써 생성될 수 있는 유도체의 사용을 포함한다.
- [0112] AAV 게놈의 유도체는 인 *비보*에서 본 발명의 벡터로부터 Rep-1 전이 유전자의 발현을 허용하는 임의의 절단 또는 변형된 AAV 게놈의 형태를 포함한다. 전형적으로, 최소한의 바이러스 서열을 포함하면서 상기 기능을 유지하기 위해 AAV 게놈을 상당히 절단하는 것이 가능하다. 이는 야생형 바이러스와 벡터의 재조합 위험을 감소시키고 또한 표적 세포에서 바이러스 유전자 단백질의 존재에 의한 세포 면역 반응의 유발을 피하기 위해 안전상의 이유로 바람직하다.
- [0113] 전형적으로, 유도체는 적어도 하나의 역 말단 반복부위 (ITR), 바람직하게는 2 개 이상의 ITR을 포함할 것이다. 하나 이상의 ITR은 상이한 혈청형을 갖는 AAV 게놈으로부터 유래되거나, 키메라 또는 돌연변이체 ITR 일 수 있다. 바람직한 돌연변이체 ITR은 *trs* (말단 분해능 부위)가 결실된 것이다. 이러한 결실은 게놈의 연속 복제를 허용하여 암호화 서열 및 상보적 서열들 다를 포함하는 단일 가닥 게놈, 즉 자가-상보적 AAV 게놈을 생성한다. 이것은 표적 세포에서 DNA 복제의 우회를 허용하고, 따라서 전이 유전자 발현을 가속화 시킬 수 있다.
- [0114] 하나 이상의 ITR은 바람직하게는 본 발명의 프로모터 및 전이 유전자를 포함하는 발현 구조체 카세트 측면에 존재할 것이다. 하나 이상의 ITR의 포함은 본 발명의 벡터의 바이러스 입자로의 패키징을 돕기 위해 바람직하다. 바람직한 구체예에서, ITR 요소는 유도체에서 천연 AAV 게놈으로부터 보유된 유일한 서열일 것이다. 따라서, 유도체는 바람직하게는 천연 게놈의 *rep* 및/또는 *cap* 유전자 및 천연 게놈의 임의의 다른 서열을 포함하지 않을 것이다. 이는 상기 기재된 이유 및 벡터가 숙주 세포 게놈 내로 통합될 가능성을 감소시키기 위해 바람직하다. 또한, 상기 AAV 게놈의 크기를 감소시키는 것은 전이 유전자 이외에 벡터 내에 다른 서열 요소 (예를 들어, 조절 요소)를 통합시키는데 있어 유연성 증가를 가능하게 한다.
- [0115] 따라서, AAV2 게놈과 관련하여, 하나의 역 말단 반복부위 (ITR) 서열, 복제 (*rep*) 및 캡시드 (*cap*) 유전자 부분은 본 발명의 유도체에서 제거될 수 있다. 그러나, 인 *비트로* 구체예를 포함하는 일부 구체예에서, 유도체는 하나 이상의 *rep* 및/또는 *cap* 유전자 또는 AAV 게놈의 다른 바이러스 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0116] 유도체는 하나 이상의 자연 발생 AAV 바이러스의 키메라, 서플 또는 캡시드-변형된 유도체일 수 있다. 본 발명은 동일한 벡터 내에서 상이한 혈청형, 클레드, 클론 또는 AAV의 단리물로부터의 캡시드 단백질 서열의 제공을 포함한다. 본 발명은 하나의 혈청형의 게놈을 다른 혈청형의 캡시드에 패키징하는 것, 즉 슈도타이핑 (pseudotyping)을 포함한다.
- [0117] 키메라, 서플 또는 캡시드-변형 유도체는 전형적으로 바이러스 벡터에 하나 이상의 원하는 기능성을 제공하도록 선택될 것이다. 따라서, 이들 유도체는 유전자 전달 효율 증가, 면역원성 (체액성 또는 세포성) 감소, 변경된 트로피즘 범위 및/또는 AAV2 게놈과 같은 자연 발생 AAV 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 벡터와 비교하여 특정 세포 유형의 개선된 표적화를 나타낼 수 있다. 유전자 전달 효율의 증가는 세포 표면에서의 개선된 수용체 또는 공-수용체 결합, 개선된 내재화, 세포 내 및 핵 내로의 개선된 수송, 개선된 바이러스 입자의 탈외피 (uncoating) 및 단일 가닥 게놈의 이중 가닥 형태로의 개선된 전환에 의해 영향을 받을 수 있다. 증가된 효율은 또한 변경된 트로피즘 범위 또는 특정 세포 집단의 표적화와 관련될 수 있어서, 벡터 용량은 필요하지 않은 조직으로의 투여에 의해 희석되지 않는다.
- [0118] 키메라 캡시드 단백질은 자연 발생 AAV 혈청형의 2 개 이상의 캡시드 암호화 서열 사이에서 재조합에 의해 생성된 것을 포함한다. 이는 예를 들어 하나의 혈청형의 비-감염성 캡시드 서열이 상이한 혈청형의 캡시드 서열과 공동-형질 감염되는 마커 회복 접근법에 의해 수행될 수 있고, 원하는 특성을 갖는 캡시드 서열을 선별하기 위해 지시된 선별이 사용된다. 상기 상이한 혈청형의 캡시드 서열은 세포 내 상동성 재조합에 의해 변경되어 신규한 키메라 캡시드 단백질을 생성할 수 있다.

- [0119] 키메라 캡시드 단백질은 또한 2 개 이상의 캡시드 단백질 사이, 예를 들어 상이한 혈청형의 2 개 이상의 캡시드 단백질 사이에 특정 캡시드 단백질 도메인, 표면 루프 또는 특정 아미노산 잔기를 전달하기 위해 캡시드 단백질 서열의 조작에 의해 생성되는 것을 포함한다.
- [0120] 서플 또는 키메라 캡시드 단백질은 또한 DNA 서플링 또는 오류 발생 용이 PCR(error-prone PCR)에 의해 생성될 수 있다. 하이브리드 AAV 캡시드 유전자는 예를 들어, 다수의 상이한 혈청형의 캡시드 단백질을 암호화하는 관련 AAV 유전자의 서열을 무작위로 단편화한 후, 자가-프라이밍 중합 효소 반응에서 단편을 재조합 함으로써 생성될 수 있으며, 이는 또한 서열 상동성 영역에서 교차(crossovers)를 야기할 수 있다. 여러 혈청형의 캡시드 유전자를 서플링함으로써 이러한 방식으로 생성된 하이브리드 AAV 유전자의 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 기능성을 갖는 바이러스 클론을 확인할 수 있다. 유사하게, 오류 발생 용이 PCR을 사용하여 AAV 캡시드 유전자를 무작위로 돌연변이시켜 원하는 특성에 대해 선택될 수 있는 다양한 변이체 라이브러리를 생성할 수 있다.
- [0121] 캡시드 유전자의 서열은 또한 천연 야생형 서열에 대해 특정 결실, 치환 또는 삽입을 도입하도록 유전자 변형될 수 있다. 특히, 캡시드 유전자는 캡시드 암호화 서열의 오픈 리딩 프레임 내에 또는 캡시드 암호화 서열의 N-및/또는 C-말단에, 미관련 단백질 또는 펩티드의 서열의 삽입에 의해 변형될 수 있다.
- [0122] 상기 미관련 단백질 또는 펩티드는 유리하게는 특정 세포 유형에 대한 리간드로서 작용하여 표적 세포에 대한 개선된 결합을 제공하거나 특정 세포 집단에 대한 벡터의 표적화의 특이성을 개선시키는 것일 수 있다.
- [0123] 상기 미관련 단백질은 또한 생산 공정의 일부로서 바이러스 입자의 정제, 즉 에피토프 또는 친화력 태그를 보조하는 단백질일 수 있다. 삽입 부위는 전형적으로 바이러스 입자의 다른 기능, 예를 들어 바이러스 입자의 내재화, 수송을 방해하지 않도록 선택될 것이다. 당업자는 일반적인 지식에 기초하여 삽입하기에 적합한 부위를 식별할 수 있다.
- [0124] 본 발명은 추가로 천연 AAV 계통과 다른 순서 및 구성으로 AAV 계통의 서열을 제공하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 AAV 서열 또는 유전자를 다른 바이러스의 서열 또는 하나 이상의 바이러스의 서열로 구성된 키메라 유전자로 대체하는 것을 포함한다. 이러한 키메라 유전자는 상이한 바이러스 종의 두 개 이상의 관련 바이러스 단백질로부터의 서열로 구성될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 벡터는 본 발명의 프로모터 및 발현 구조체를 포함하는 바이러스 벡터의 형태를 갖는다.
- [0126] 의심의 여지를 피하기 위해, 본 발명은 또한 본 발명의 벡터를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공한다. 본 발명의 AAV 입자는 하나의 혈청형의 ITR을 갖는 AAV 계통 또는 유도체가 상이한 혈청형의 캡시드에 패키징된 트랜스 캡시드화 된 형태를 포함한다. 본 발명의 AAV 입자는 또한 2 개 이상의 상이한 혈청형으로부터의 변형되지 않은 캡시드 단백질의 혼합물이 바이러스 외피를 구성하는 모자이크 형태를 포함한다. 상기 AAV 입자는 또한 캡시드 표면에 흡착된 리간드를 갖는 화학적으로 변형된 형태를 포함한다. 예를 들어, 이러한 리간드는 특정 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0127] AAV2 계통은, 모든 AAV 혈청형의 계통과 같이, 다수의 상이한 캡시드 단백질로 둘러싸일 수 있다. AAV2는 천연 AAV2 캡시드 (AAV2/2)로 패키징되거나 다른 캡시드로 슈도 타이핑 (pseudotyped) 될 수 있다 (예를 들어, AAV1 캡시드 내의 AAV2 계통을 갖는 AAV2/1 또는 AAV8 캡시드 내의 AAV2 계통을 갖는 AAV2/8).
- [0128] 바람직한 구체예에서, 상기 AAV 캡시드는 AAV8로부터 유래된다. 작동 가능하게 연결된 서열이 *CNGA3* 유전자인 특히 바람직한 구체예에서, 상기 캡시드는 AAV8이거나, AAV5 이외의 다른 캡시드인 것이 바람직하다.
- [0129] AAV는 혈청형 특이적 수용체-매개 세포 내 이입 (endocytosis)을 통해 세포를 형질 도입시킨다. rAAV 전이 유전자 발현의 동역학에 영향을 미치는 주요 요인은 엔도솜 내에서 바이러스 입자 탈외피 속도이다. 이것은 결국 유전 물질을 둘러싼 캡시드의 유형에 따라 달라진다. 탈외피 후, 선형 단일 가닥 rAAV 계통은 상보적 가닥의 드노보 (*de novo*) 합성을 통해 이중 가닥 분자를 형성함으로써 안정화된다. 자기-상보적 DNA의 사용은 이중 가닥 전이 유전자 DNA를 생성함으로써 이 단계를 우회할 수 있다. 자기-상보적인 AAV2/8 유전자 발현은 단일 가닥 AAV2/8에 비해 더 빠른 개시 및 더 높은 진폭인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 제 2 가닥 합성과 관련된 시간 지연을 피함으로써, 표준 단일 가닥 구조체로부터의 전이 유전자 발현과 비교할 때 유전자 발현 수준이 증가된다. 다른 AAV 슈도타입에서 자기-상보적 DNA의 효과를 조사한 후속 연구에서도 비슷한 결과가 나왔다. 이 기술에 대한 한 가지 주의 사항은, AAV의 패키징 용량이 약 4.8kb이므로 자기-상보적 재조합 계통의 크기를 적절하게 조정해야 한다는 것이다 (즉, 2.3kb 이하).
- [0130] 패키징 용량을 변경하는 것 외에도, 다른 AAV 캡시드를 갖는 AAV2 계통을 슈도타이핑 하는 것은 세포 특이성 및

전이 유전자 발현의 동역학을 변경할 수 있다. 예를 들어, AAV2가 AAV4 캡시드로 슈도타이핑 될 때, 전이 유전자 발현은 RPE 세포에 특이적으로 표적화된다. 또한, AAV2/8은 AAV2/2 또는 AAV2/5보다 광수용체를 보다 효율적으로 형질 도입하는 것으로 보고되어 있다.

[0131] **백터의 준비**

[0132] 본 발명의 백터는 치료를 위한 백터의 제공을 위해 당업계에 공지된 표준 수단에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 잘 확립된 공공 도메인 (public domain) 형질 감염, 패키징 및 정제 방법을 사용하여 적합한 백터 제제를 제조할 수 있다.

[0133] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 백터는 본 발명의 프로모터 또는 이의 변이체 이외에 자연 발생 AAV 바이러스의 전체 게놈을 포함할 수 있다. 그러나, 일반적으로 유도체화 된 게놈, 예를 들어 적어도 하나의 역 말단 반복부위 (ITR)를 갖지만 *rep* 또는 *cap*과 같은 AAV 유전자가 결여될 수 있는 유도체가 사용될 것이다.

[0134] 이러한 구체예에서, 유도체화 된 게놈의 AAV 바이러스 입자로의 조립을 제공하기 위해, AAV 및/또는 헬퍼 바이러스 기능을 제공하는 추가 유전자 구조체가 유도체화 된 게놈과 조합하여 숙주 세포에 제공될 수 있다. 이들 추가 구조체는 전형적으로 구조적 AAV 캡시드 단백질, 즉 *cap*, VP1, VP2, VP3을 암호화하는 유전자, 및 *rep*와 같은 AAV 라이프 사이클에 필요한 다른 기능을 암호화하는 유전자를 포함할 것이다. 추가 구조체 상에 제공된 구조적 캡시드 단백질의 선별은 패키징된 바이러스 백터의 혈청형을 결정할 것이다.

[0135] 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 패키지 바이러스 백터는 AAV8 캡시드 단백질과 조합된 유도체화된 AAV2 게놈을 포함한다.

[0136] 상기 언급된 바와 같이, AAV 바이러스는 복제 능력이 없고 따라서 헬퍼 바이러스 기능, 바람직하게는 아데노 바이러스 헬퍼 기능을 하나 이상의 추가 구조체 상에 제공하여 AAV 복제를 허용할 수 있다. *rep*, *cap* 및 Ad 헬퍼 기능을 포함하는 단일 구조체를 사용하는 당업자에게 알려진 시스템도 있으므로 추가 헬퍼 구조체가 필요하지 않다.

[0137] 상기 모든 추가 구조체는 숙주 세포에서 플라스미드 또는 다른 에피솜 요소로서 제공될 수 있거나, 또는 대안적으로 하나 이상의 구조체가 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있다.

[0138] 본 발명의 전사 제어 유닛은 예를 들어 *CNGA3* 유전자의 돌연변이에 의해 발생할 수 있는 원추세포 광수용체 기능의 손실을 회복하는 능력을 갖는다. "회복"은 일반적으로 망막 장애 또는 이영양증 표현형의 진행의 개선 또는 진행 둔화, 예를 들어, 원추세포 광수용체에서 *CNGA3* 단백질의 존재 회복, ERG 활성 개선 또는 ERG 활성 손실 둔화, 망막 민감성 개선 또는 망막 민감성의 점진적 손실 둔화/중지, 광수용체 세포의 손실 둔화 또는 중지, 시력 개선 또는 시력 손실 둔화/중지를 의미한다.

[0139] 본 발명의 전사 제어 유닛의 특성은 또한 실시예에서의 기술에 기초한 기술을 사용하여 시험될 수 있다. 특히, 본 발명의 전사 제어 유닛은 본 발명의 백터로 조립될 수 있고 마우스와 같은 *CNGA3*-결손 시험 동물의 망막에 전달될 수 있으며, 효과는 관찰되고 대조군과 비교된다. 바람직하게는, 대조군은 동일한 동물의 다른 눈일 것이며, 이는 본 발명의 서열이 아닌 리포터 유전자를 포함하는 것과 같은 대조군 백터로 처리되거나 처리되지 않은 것이다. 이어서, 치료된 눈의 광수용체 세포가 대조군 백터로 처리되거나 처리되지 않은 눈의 광수용체보다 빛에 더 민감하다는 것을 확인하기 위해 빛에 대한 망막 반응의 망막 전위도 분석을 사용할 수 있다. 치료된 눈의 빛에 대한 민감도는 예를 들어 처리되지 않았거나 대조군-처리된 눈의 민감도보다 적어도 1.1, 1.2, 1.5, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 또는 1000 배 더 클 수 있다.

[0140] **치료 방법 및 의약 용도**

[0141] 일 양상에서, 본 발명은 핵산 분자 (예를 들어, TCU, 프로모터 및 이의 단편, 코돈-최적화 유전자, 발현 구조체 및 백터) 뿐만 아니라, 망막 장애 또는 이영양증의 치료 및/또는 예방이 필요한 환자에서 망막 장애 또는 이영양증의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.

[0142] 망막은 망막 색소 상피 (RPE) 세포층과 3 겹의 신경 감각 세포; 즉, (외부에서 내부로), 외부 핵층 (간상세포 및 원추세포 광수용체 세포를 포함함), 내부 핵층 (양극성 세포를 포함함) 및 신경절 세포층으로 구성된다. 망막 장애 또는 이영양증은 광수용체 세포의 점진적 손실 및 수반되는 시력 손실을 특징으로 하는 망막 질환으로 정의될 수 있다. 상기 망막 장애 또는 이영양증은 유전된 망막 장애 또는 이영양증일 수 있다.

[0143] 일 구체예에서, 원추세포-간상세포 이영양증 및/또는 원추세포 이영양증의 치료 및/또는 예방을 위한 핵산 분자

및 방법이 제공된다. 원추세포-간상세포 이영양증은 원추세포 광수용체 세포의 점진적인 손실 및 수반되는 시력 손실을 특징으로 하는 질환으로 정의될 수 있으며, 유전될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 망막 장애는 색맹 또는 황반 변성이다. 상기 황반 변성은 연령-관련 황반 변성 (AMD), 예를 들어 습식 또는 신혈관 AMD 또는 지도형 위축 (geographic atrophy), 유전된 황반 변성 상태 또는 유전된 원추세포 이영양증일 수 있다.

[0144] 용어 "환자" 및 "개체"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 환자는 바람직하게는 포유 동물이다. 상기 포유 동물은 상업적으로 양식된 동물, 예컨대 말, 소, 양 또는 돼지, 실험실 동물, 예를 들어 마우스 또는 랫트, 또는 애완 동물, 예를 들어 고양이, 개, 토끼 또는 기니피그일 수 있다. 상기 환자는 보다 바람직하게는 인간이다. 상기 개체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 상기 개체는 바람직하게는 망막 장애 또는 이영양증의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로 확인된다.

[0145] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료된", "치료하는" 또는 "치료"는 치료적 처리 및 예방적 또는 예방적 조치 둘 다를 지칭하며, 여기서 목적은 바람직하지 않은 생리학적 상태, 장애 또는 질환을 예방하거나 늦추는 (감소시키는) 것이거나 또는 이롭거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 이롭거나 바람직한 임상 결과는 증상 완화; 상태, 장애 또는 질환의 정도의 감소; 상태, 장애 또는 질환의 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음); 상태, 장애 또는 질환의 진행 둔화 또는 발병 지연; 상태, 장애 또는 질환 상태의 개선; 및 검출되거나 검출되지 않음의 여부에 관계없이 완화 (부분 또는 전체 여부 관계없이) 또는 상태, 장애 또는 질환의 향상 또는 개선을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 치료에는 과도한 부작용 없이 임상적으로 유의한 반응을 이끌어내는 것이 포함된다.

[0146] 상기 환자는 무증상일 수 있거나 및/또는 질환에 대한 소인을 가질 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 또한 개체가 색맹을 포함하나 이에 제한되지 않는 원추세포 이영양증과 같은 망막 장애의 발병 위험 또는 망막 장애가 있는지의 여부를 식별하는 단계를 포함하는 방법 또는 용도를 제공한다. 본원에 개시된 바와 같은 예방적 유효량의 벡터와 같은 핵산은 상기 개체에게 투여될 수 있다. 이와 같이, 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산은 색맹을 포함하나 이에 제한되지 않는 원추세포-간상세포 이영양증과 같은 하나 이상의 망막 장애 증상의 발병을 예방 또는 지연시키기 위해 투여될 수 있다. 대안적으로, 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산은 일단 질환의 증상이 개체에서 나타난 경우, 즉 질환의 기존 증상을 치료하기 위해 투여될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 치료적 유효량의 벡터와 같은 핵산은 이러한 개체에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 "치료적 유효량"은 포유 동물에 투여될 때 원하는 치료 효과를 생성하는데 효과적인 본원에 제시된 핵산의 양을 의미한다. 일 구체예에서, 본 발명은 망막 장애 또는 이영양증을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하며, 여기서 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산은 치료적 유효량으로 필요한 환자에게 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 망막 장애 또는 이영양증은 색맹을 포함하나 이에 제한되지 않는 원추세포 이영양증이다.

[0147] 본 발명은 또한 색맹을 포함하나 이에 제한되지 않는 원추세포 이영양증과 같은 망막 장애 또는 이영양증의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 본원에 개시된 바와 같은 치료적 유효량의 벡터와 같은 핵산을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 원추세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0148] **투여 방법**

[0149] 일반적으로, 본원에 개시된 바와 같이 전형적으로 주사에 의한 벡터와 같은 핵산의 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 전달이 바람직하다. 따라서 망막, 망막하 공간 또는 유리체내 공간으로의 전달이 바람직하다.

[0150] 따라서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 바와 같은 치료적 유효량의 벡터와 같은 핵산을 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사에 의해 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 원추세포 이영양증, 특히 색맹을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0151] 관련 양상에서, 본 발명은 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사에 의해 상기 벡터를 환자에게 투여함으로써 원추세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애를 치료 또는 예방하는 방법에서 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산의 용도를 제공한다.

[0152] 추가로, 본 발명은 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사에 의한 원추세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산의 용도를 제공한다.

[0153] 본 발명은 또한 원추세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산을 제공하며, 여기서 상기 벡터는 망막, 망막하 공간 또는 유리체내 공간으로 직접 투여된다.

- [0154] 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산의 투여는 전형적으로 직접적인 망막 또는 망막하 주사에 의한 것이다. 여기에는 원추세포 광수용체 세포로의 직접적인 전달이 포함된다.
- [0155] 상기 전달은 전형적으로 원추세포-간상세포 이영양증, 특히 색맹과 같은 망막 장애를 앓고 있는 환자에서 퇴행성 망막에 직접적으로 또는 망막하에 이루어진다.
- [0156] 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산은 다른 세포 집단에 들어 가지 않고 상기 표적 세포를 형질 도입할 수 있다. 유리체내 주사가 또한 본 발명의 벡터를 전달하는데 사용될 수 있다.
- [0157] 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산의 용량은 다양한 파라미터, 특히 치료될 환자의 연령, 체중 및 상태; 투여 경로; 및 필요한 요법에 따라 결정될 수 있다. 또한, 의사는 임의의 특정 환자에 대해 필요한 투여 경로 및 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0158] 전형적인 단일 용량은 형질 도입을 필요로 하는 잔여 망막 조직의 양에 따라 10^{10} 내지 10^{12} 의 게놈 입자이다. 게놈 입자는 본원에서 서열 특이적 방법 (실시간 PCR과 같은)으로 정량될 수 있는 단일 가닥 DNA 분자를 포함하는 AAV 캡시드로 정의된다. 상기 용량은 단일 용량으로 제공될 수 있지만, 다른 눈 또는 본원에 개시된 바와 같은 벡터와 같은 핵산이 어떠한 이유로든 (수술 합병증과 같은) 정확한 망막 영역을 표적으로 하지 않을 수 있는 경우에 반복될 수 있다. 상기 치료는 바람직하게는 각각의 눈에 대한 단일 영구 치료이지만, 예를 들어 몇 년에 걸쳐 및/또는 상이한 AAV 혈청형을 갖는 반복 주사가 고려될 수 있다.
- [0159] **숙주 세포**
- [0160] 본 발명은 추가적으로 핵산, 예를 들어 벡터 또는 바이러스 벡터, 또는 본원에 개시된 AAV 바이러스 입자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산을 생성하기 위해 임의의 적합한 숙주 세포를 사용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 세포는 형질 감염된 포유 동물 세포이지만 다른 세포 유형, 예를 들어 곤충 세포도 사용될 수 있다. 포유 동물 세포 생산 시스템의 관점에서, HEK293 및 HEK293T가 AAV 벡터에 바람직하다. BHK 또는 CHO 세포가 또한 사용될 수 있다.
- [0161] **약학적 조성물 및 투여량**
- [0162] 본 발명은 또한 본원에 개시된 벡터와 같은 핵산뿐만 아니라 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 보조제, 완충제, 안정제 및/또는 당업자에게 공지된 다른 물질을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 물질은 무독성이어야하며 활성 성분의 효능을 방해해서는 안된다. 또한, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 보조제, 완충제, 안정제 및/또는 당업자에게 공지된 다른 물질 및 핵산 서열, 플라스미드, 벡터 또는 본원에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0163] 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로, 즉 여기서 직접적인 망막, 망막하 또는 유리체내 주사에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0164] 약학적 조성물은 전형적으로 액체 형태이다. 액체 약학적 조성물은 일반적으로 액체 담체, 예컨대 물, 석유, 동물성 또는 식물성 오일, 미네랄 오일 또는 합성 오일을 포함한다. 생리 식염수, 염화 마그네슘, 텍스트로오스 또는 다른 당류 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 포함될 수 있다. 경우에 따라, 플루론산 (PF68) 0.001 %와 같은 계면 활성제가 사용될 수 있다.
- [0165] 고통 부위에서의 주사를 위해, 활성 성분은 발열원이 없고 (pyrogen-free) 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 수용액의 형태일 것이다. 당업자는, 예를 들어 염화나트륨 주사제, 링거 주사제, 젖산 링거 주사제, 하트만 용액과 같은 등장성 비히클을 사용하여 적합한 용액을 제조할 수 있다. 방부제, 안정제, 완충제, 산화 방지제 및/또는 다른 첨가제가 필요에 따라 포함될 수 있다.
- [0166] 지연 방출을 위해, 상기 벡터는 당업계에 공지된 방법에 따라 생체 적합성 중합체로부터 형성된 마이크로 캡슐 또는 리포솜 담체 시스템과 같이 서방형으로 제형화된 약학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0167] 투여량 및 투여 용법은 조성물의 투여를 담당하는 의사의 정상적인 기술 내에서 결정될 수 있다. 활성제(들)의 투여량은 사용 이유, 개별 개체 및 투여 방식에 따라 달라질 수 있다. 투여량은 개체의 체중, 개체의 연령 및 건강, 및 화합물(들) 또는 조성물에 대한 내성에 기초하여 조정될 수 있다.
- [0168] **조합 요법**
- [0169] 본원에 개시된 핵산, TCU, 프로모터, 코돈-최적화된 유전자, 발현 구조체, 벡터 및/또는 약학적 조성물은 색맹

을 포함하나 이에 제한되지 않는 망막 이영양증과 같은 망막 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 임의의 다른 방법과 함께 조합하여 사용될 수 있다.

[0170] **키트**

[0171] 본원에 개시된 핵산, TCU, 프로모터, 코돈-최적화된 유전자, 발현 구조체, 벡터 및/또는 약학적 조성물은 키트로 패키징 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0172] 도 1은 녹색 (M) 흡신 코어 프로모터에 대한 유전자와 제어 영역 (LCR)의 위치 효과를 평가하기 위한 유전자 변형 마우스에서의 인 비보 (*in vivo*) 리포터 유전자 발현 연구의 결과를 나타낸다. 좌측 상단: LCR, 전사 단위 및 엑손의 위치를 나타내는 정상적인 인간 적색 및 녹색 색소 유전자 배열. 좌측 하단: 10 배 확대 규모로 표시된 변형된 시각 색소 유전자 배열. 시작 위치 및 전사 방향은 화살표로 표시되었다. P_{red} =인간 적색 색소 유전자 프로모터. P_{green} =인간 녹색 색소 유전자 프로모터. AP는 인간 태반 알칼리 포스파타아제. lacZ는 이. 콜라이 (*E. coli*) β -갈락토시다아제. 우측: 좌측에 나타낸 구조체에 대한 키메라 또는 생식선-전이 마우스에서 AP (적색) 단독, lacZ (진녹색) 단독, AP 및 lacZ (노란색) 모두, 또는 lacZ>>AP (연녹색)을 발현하는 전이 유전자-발현 세포의 분율을 나타내는 파이 차트. 동일한 ES 세포주로부터 유래된 상이한 마우스로부터의 세포 수를 모아 단일 파이 차트를 생성하였다. 생식선 cre 마우스로의 교배에 의해 PGK-neo 마커가 절제된 마우스 라인의 세포 수는 상응하는 모계 라인에 대한 파이 차트의 우측에 바로 나타났다.

도 2는 적색 (L-) 및 녹색 (M-) 흡신 프로모터 (박스형, 상단)의 염색체 배열의 개략도를 나타낸다. 이전에 개발된 전사 단위 (pR2.1 및 PR1.7) 뿐만 아니라 이 연구에 개시된 조작된 전사 제어 단위의 개략도. LCR=유전자와 제어 영역.

도 3은 hG1.4 TCU의 제어하에 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하는 AAVssh10 벡터로 형질 도입된 원추세포의 형질 도입 패턴을 나타낸다. AAVssh10-hG1.4(M8)-GFP로 형질 도입된 인간 배아 줄기 세포-유래 망막의 냉동 절편이 나타나 있다. 원추세포의 형질 도입 패턴을 GFP 이미징 (A)에 의해 시각화 하였다. GFP (B')와 청색 흡신 (S-흡신; B) 및 GFP (C')와 적색/녹색 흡신 (L/M-흡신; C)의 공동-국소화는 청색 흡신 (S-흡신) 또는 적색/녹색 흡신 (L/M 흡신)에 결합하는 항체를 사용한 염색 후 표시되었다.

도 4는 TCU에서 M8 서열의 포함이 *CNGA3* 녹아웃 (knockout) 마우스에서 광순응 반응의 회복을 향상시킨다는 것을 나타낸다. M8 서열의 유무에 따른 상이한 TCU에 의해 구동되는 코돈 최적화된 *CNGA3* (coCNGA3) 구조체를 보유하는 AAV2/8 벡터로 처리된 *Cnga3* 녹아웃 마우스의 광순응 망막 전위도 (ERG) 반응이 나타나 있다. 주사 후 1개월 (좌측 막대) 및 2개월 (우측 막대)에서의 ERG 반응이 나타나 있다. 2주차에 처리된 가장 우측에 있는 그룹을 제외하고 모든 동물을 1개월령에 처리하였다.

도 5는 코돈-최적화된 *CNGA3*이 야생형 *CNGA3* 유전자보다 *CNGA3* 녹아웃 마우스에서 광순응 반응을 보다 효과적으로 회복한다는 것을 나타낸다. 코돈 최적화된 *CNGA3* ("co") 및 야생형 *CNGA3* 구조체 ("non-co")를 보유하는 AAV2/8 벡터로 처리된 *Cnga3* 녹아웃 마우스에서의 광순응 ERG 반응.

도 6은 hG1.4 TCU의 제어하에 *CNGA3*을 발현하는 AAV2/8 벡터가 *CNGA3* 녹아웃 마우스에서 원추세포 기능을 회복시키는 데 효과적임을 나타낸다. (A) AAV8-처리 및 처리되지 않은 *Cnga3* 녹아웃 마우스의 광순응 ERG 자취. A-파 및 B-파가 주석 달려있다. Y 축은 μV 를 나타낸다. 광도 설정: 10 Cds m^{-2} . (B) AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 또는 AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3로 처리된 *Cnga3* 녹아웃 마우스의 광순응 ERG 반응. 광도 설정: 10 Cds m^{-2} .

도 7은 처리 후 최대 6개월까지 2개의 상이한 최적화된 TCU 하에서 *CNGA3*을 발현하는 AAV2/8 벡터를 사용한 망막 민감성의 장기 인 비보 회복을 나타낸다. *Cnga3* 결손 마우스는 2주령에 AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n=14) 또는 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n=13) (두개 모두 역가 $1 \times 10^{12} \text{ vg/ml}$)으로 망막하에 주사되었다. 미처리 (n=3). 광도 설정: 10 Cds m^{-2} .

도 8은 hG1.7 TCU의 제어하에 *CNGA3*을 발현하는 AAV2/8 벡터로 처리한 후 3-4개월의 인 비보 원추세포의 생존 증가를 나타낸다. 3-4개월령의 C57BL/6J 마우스 (A) 또는 2주령에서 AAV2/8-hG1(M8).coCNGA3을 주사하지 않은 (B) 또는 주사된 (C) 같은 연령의 *Cnga3* 결손 마우스의 평면 고정 망막의 단일 평면 공 초점 이미지. 상기 망막은 원추세포 아레스틴 (arrestin)으로 염색되고 세척되었다. 스케일 바: $5 \mu m$.

도 9는 hG1.7 TCU의 제어하에 CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터로 처리한 후 13 개월의 인 비보 원추세포의 장기 증가된 생존을 나타낸다. 2 주령에서 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3가 주사된 14 개월령의 Cnga3-결손 마우스로부터의 평면 고정 망막의 Z-투영 공 초점 이미지 (A, B) 또는 단일 평면 공 초점 이미지 (C, D). 미처리된 것은 이 연령에서 양성 PNA 염색을 나타내지 않았다. 망막 평면 고정은 PNA (A, C) 및 원추세포 아레스틴 (B, D)으로 염색되고 세척되었다. 스케일 바: 10 μm (A, B), 5 μm (C, D).

도 10은 hG1.7 TCU의 제어하에 CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터로 처리한 후 3-4 개월의 인 비보 원추세포 및 지지 뉴런 (양극 세포) 사이의 시냅스 완전성 개선의 정량화를 나타낸다. 시냅스 마커 Gpr179의 신호 강도를 사용하여 평가를 수행하였다. Gpr179 염색의 신호 강도 분석은 3-4 개월령의 C57BL/6J 마우스 또는 2 주령에 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3을 주사하지 않거나 주사한 동일한 연령의 Cnga3 결손 마우스로부터의 평면 고정 망막의 단일 평면 공 초점 이미지에서 수행되었다. 상기 망막은 Gpr179 및 PNA로 염색되고 세척되었다. Gpr179 염색은 여러 원추세포 뿌리 (cone pedicle) 연관 Gpr179 염색 (PNA 염색을 사용하여 원추세포 뿌리를 확인하는 데 사용함) 및 10 개 이상의 간상세포 소구체 연관 Gpr179 염색 (A)에 손으로 그린 선을 그려서 추적했다. 신호 강도가 출력되었다 (B; 흰색 선:Gpr179, 적색 선:PNA). 각각의 시발점으로부터의 신호 강도 피크를 평균화하고, 원추세포 뿌리 대 간상세포 소구체 연관 Gpr179 비 (CP/RS)를 계산하였다. 4 개의 다른 위치에서의 CP/RS를 통계 분석에 사용했다 (본페로니 다중 비교 검정 (Bonferroni 's Multiple Comparison Test) (ns: $p>0.05$, **: $p\leq 0.01$, *: $p\leq 0.05$)). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (C).

도 11은 AAV8 벡터에서 hG1.4 TCU의 제어하에 CNGA3의 발현이 각각 AAV 벡터 Anc80L65, AAV44.9 또는 AAV5와 비교하여 CNGA3 결손 마우스에서 개선된 ERG 반응을 유도한다는 것을 나타낸다. (A). Anc80L65 및 AAV8의 비교. hG1.4(M8).coCNGA3 발현 카세트를 보유한 AAV-Anc80L65 또는 AAV8을 2 주령의 Cnga3-결손 마우스에 전달하였다. **: $p\leq 0.01$, *: $p\leq 0.05$. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (B). 4 주령의 Cnga3-결손 마우스에서 CNGA3의 전달에 대한 AAV8 및 AAV44.9의 비교. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (C) AAV5 및 AAV8의 비교. hG1.4(M8).coCNGA3 발현 카세트를 보유하는 AAV5 또는 AAV8을 2 주령의 Cnga3-결손 마우스에 전달하였다. **: $p\leq 0.01$, *: $p\leq 0.05$. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 12는 공지된 원추세포 프로모터에 대해 관찰된 발현 수준과 비교하여 M8 돌연변이를 보유하는 TCU hG1.4 및 hG1.7에 대한 개선된 발현 수준을 나타낸다. (A) 17-19 주령의 hEB를 2 개의 상이한 녹색 옵신 프로모터 (hG1.4 및 hG1.7)하에 eGFP 발현 AAVShH10로 형질 도입하고 2 주 후에 수집하였다 (각 프로모터에 대해 $n=6-8$). 분리 후, 세포는 GFP 양성 세포에서 상대적인 중앙 형광 강도 (MFI)에 대해 유세포 분석으로 분석되었다 (당일 실험에서 분석된 AAV ShH10-eGFP로 형질 도입된 hEB에서의 상대적 MFI는 AAV ShH10-1.7L-eGFP로 형질 도입된 EB에서의 MFI에 대한 비로 계산되었다). 별표(*)는 유의미한 차이를 나타낸다 ($p\leq 0.01$). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. (B) AAV2/8-CAR-CNGA3로 처리되거나 처리되지 않은 채로 남겨진 Cnga3 녹아웃 마우스의 광순응 ERG 반응. Y 축은 μV 를 나타낸다. 광도 설정: 10 Cds m^{-2} .

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0173] **재료 및 방법**
- [0174] **플라스미드 제조**
- [0175] 녹색 원추세포 옵신 (*Green Cone Opsin*) 프로모터의 개선된 버전을 만들기 위해, 1250-bp 유전자와 제어 영역 (*Locus Control Region*) (LCR) (Smallwood et al., 2002)은 녹색 옵신 코어 프로모터의 다양한 단편 (bp -480 내지 +40)과 함께 모체 플라스미드 pAAV/CMV.eGFP 내로 조합되어, pAAV/hG1.7.eGFP 플라스미드 구조체 및 pAAV/hG1.4.eGFP를 생성하였다. 'M8' 돌연변이 프로모터를 보유하는 벡터 구조체를 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 생성시켰다.
- [0176] 치료 유전자 구조체에 대해, pUC57 플라스미드 (GenScript에 의해 생성됨)로부터 코돈- 및 코작 (Kozak)-최적화된 CNGA3 서열을 다양한 녹색 (M) 원추세포 옵신 프로모터 구조체를 보유하는 pAAV 플라스미드로 클로닝함으로써 pAAV/coCNGA3을 생성시켰다.
- [0177] **코돈 최적화**
- [0178] 코돈 최적화는 GenScript 소유의 OptimumGene™ 코돈 최적화 도구를 통해 달성되었다.
- [0179] **바이러스 생성 프로토콜 AAV2/8 및 AAV2/5**

- [0180] 재조합 AAV2 혈청형 8 바이러스 및 AAV2 혈청형 5 바이러스를, 앞서 기재한 293T 세포의 삼중 형질 감염 방법을 사용하여 생성시켰다 (Gao et al. 2002). 293T 세포 플레이트의 145 cm^2 플레이트 (바이러스 배치 당 20 플레이트)를 10 분간 배양 후, 1:1:3 비율의 관심 플라스미드:바이러스 캡시드 플라스미드:헬퍼 플라스미드 DNA가 포함된 혼합물, 폴리에틸렌이민 (PEI - Polysciences Inc., Eppelheim, Germany) 및 DMEM으로 형질 감염시켰다. 상기 형질 감염된 세포를 24 시간 동안 두었다. 형질 감염 48 시간 후, 세포를 수집하고, 원심 분리에 의해 농축하고, TD 완충액 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM K₂HPO₄, 3.5 mM MgCl₂, 25 mM Tris 염기 [pH=7.5])에 재현탁시켰다. 이어서, 3-4 냉동-해동 사이클, 및 그런 다음 벤조나아제 (Sigma Aldrich, Dorset, UK) 처리에 의해 용해시킨 후, 연속적인 원심 분리 및 주사기 여과 단계에 의해 세포 잔여물을 제거하였다.
- [0181] 이온 교환 크로마토그래피 (Davidoff et al. 2004에 기초한 방법을 사용하여)에 의해 정제를 수행하였다. 용리액을 Vivaspin 4 10kDa 농축기 튜브 (Sartorius Stedim Biotech, Fisher Scientific, Loughborough, UK)에서 농축하고, PBS-MK로 세척한 다음 100-150 μ l 부피로 농축하고 -80 °C (장기) 또는 +4 °C (단기) 보관용으로 분취하였다.
- [0182] **인간 줄기 세포 유래 망막 오가노이드의 생성 및 형질 도입**
- [0183] 인간 H9 배아 줄기 세포 (ESC) 라인을 E8 배지 및 겔트렉스 (geltrex)로 코팅된 6 웰 플레이트에서 지지 세포 없는 (Feeder-free) 조건으로 유지시켰다. hESC를 디스파아제 및 콜라게나아제 용액을 사용하여 분리시켰다. ESC 덩어리를 수집하고 E8 배지에 재현탁시켰다. 망막 신경 상피 분화를 위해, FGF가 없는 배지가 2 일 동안 배양물에 첨가될 때 융합될 때까지 인간 ESC를 유지시켰다. 전신경(proneural) 유도 배지 (상급 DMEM/F12, MEM 비-필수 아미노산, N2 보충제, 100mM 글루타민 및 Pen/Strep)를 안포 (optic vesicles)가 관찰될 때까지 첨가하였다. 소낭을 수동으로 절제하고 망막 분화 배지 (레티노산이 없는 DMEM, F12, Pen/Strep 및 B27)가 담겨 있는 96 웰 플레이트에 보관하고, 6 주차에 분화 배지에 FBS, 타우린 및 글루타맥스를 보충하고 10 주차에 RA를 첨가하였다.
- [0184] eGFP를 구동하는 녹색 원추세포 흡인 프로모터 (*Green Cone Opsin promoter*) 구조체를 보유하는 AAV 벡터 (혈청형 SsH10)를 1.2×10^{11} vg/웰 (1-3 오가노이드/웰)로 배지에 첨가하였다. 오가노이드는 수집 및 분석 전에 추가 28 일 동안 배양되었다.
- [0185] **면역 조직 화학**
- [0186] 각막 천공에 의한 고정을 위해 눈을 준비한 후, 1 % 파라포름알데히드 (PFA, pH 7.4)에 침지시켰다. 망막 오가노이드를 1 % 파라포름알데히드 (PFA, pH 7.4)에 침지시켜 고정시켰다. 용액으로부터 제거되기 전에, 실온에서 최대 1 시간 동안 눈을 고정시킨 채로 두고, 눈의 앞뒤가 매립 튜브 내에서 수평-수직 축에 매달린 상태로 최적 절단 온도 (OCT) 매립 매트리스에 완전히 침지시켰다. 이어서, 이를 절편이 필요할 때까지 냉동하여 -20 °C에서 보관하였다.
- [0187] Bright®OTF5000 Cryostat (Bright Instrument Co Ltd, Cambridgeshire, UK)를 사용하여 10-18 마이크로미터 섹션을 제조하여, 망막의 상부 및 하부 측면의 시각화를 가능하게 하였다. 폴리신-코팅된 현미경 슬라이드 상에서 절단 직후 슬라이스를 수집하고, 실온에서 공기 건조시켰다. 슬라이드는 -20 °C에서 보관되거나 직접 분석되었다.
- [0188] 면역 조직 화학을 위해, PBS 중 5 % 염소 혈청 및 1 % 소 혈청 알부민에서 절편을 블로킹 (blocking)하였다. 항-원추세포 흡인 1 차 항체 (Millipore)를 4 °C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 절편을 실온에서 2 시간 동안 2 차 항체와 함께 인큐베이션하고 세척하였다. Alexa-fluor 2 차 항체 (Invitrogen-Molecular Probes)는 1:500 희석으로 사용되었다. 형광 고정 매질 (DAKO)에 고정하기 전에, 고정 배지 (배지 중 0.1 % DAPI)에 첨가물로서 DAPI로 또는 TBS 중 0.2 % DAPI에 침지하고 PBS-세척함으로써 DAPI로 슬라이드를 염색하였다. 고정된 슬라이드를 4 °C에서 보관하였다.
- [0189] 고정된 슬라이드는 Leica DM5500Q 공 초점 현미경 (Leica Biosystems, Germany) 또는 Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany)을 사용하여 이미지화되었다.
- [0190] **망막하 주사**
- [0191] 망막하 주사는 출생 후 약 2 주 후에 *Cpf15* (CNGA3-결손) (Hawes et al., 2006) 및 C57BL/6 마우스에서 수행되었다. 안과 수술 내내 수술 현미경을 사용하였다. 1.5 cm, 34-게이지 피하 주사 바늘 (Hamilton, Switzerland)

d)을 공막을 통해 접선 방향으로 삽입하여 자가-밀봉 공막 터널 상처를 생성했다 (Tan et al. 2009). 1.0-1.5 μ l의 바이러스懸液을 망막하 공간의 상부 및 하부 반구 내에 주사하여, 각각 안과용으로 볼 수 있는 수포성 망막 박리를 만들었다. C57BL/6을 프로모터 연구에 이용하고, 1×10^{12} 바이러스 역가를 주사하였다. *Cpf15* 마우스는 *CNGA3* 회복 연구에서 사용되었다. 마우스에 지정된 눈에 *CNGA3* 바이러스 구조체를 주사하고, 대조군 바이러스 구조체를 반대측 눈에 주사하였다. 모든 마우스는 양측으로 주사되었다.

[0192] **인 비보 치료 효능**

[0193] 망막 기능의 회복은 광순응 망막 전위도에 의해 평가되었다. ERG 기록은 양쪽 눈에서 동시에 얻어졌다. 밤새 암순응 (~12 시간) 후, 한 방울의 2.5 % 페닐에프린 및 1 % 트로픽아미드 (tropicamide) (Minims, Bausch & Lomb)를 각 눈에 적용하여 동공을 확장시켰고 윤활제는 눈을 촉촉하게 유지시켰다. ERG는 시판되는 이용 가능한 장비 (Espion ERG Diagnosys System)를 사용하여 수행되었다. 30 cd/m^2 의 백그라운드 상에서 0.1, 1, 3.16, 10, 31.6 및 75.28 cd.s/m^2 의 증가하는 광도에서 광순응 단일-플래시 기록을 얻었다. 달리 표시하지 않는 한, 도면은 백터가 피크 발현에 도달했을 때, 처리 후 4 주에 평균 광순응 b-파 진폭 (평균 \pm SD)을 나타낸다.

[0194] **실시예 1: 원추세포-특이적 전사 제어 단위 (TCU) 최적화**

[0195] 적색 옵신 유전자의 업스트림에 위치한 인간 유전자와 제어 영역 (LCR)은 나란히 위치한 적색 옵신 (L-opsin) 및 녹색 옵신 (M-opsin) 유전자의 발현을 향상시켰다 (도 1 좌측 상단 참조). LCR 및 적색 옵신 프로모터가 물리적으로 인접한 요소이기 때문에, 강력한 원추세포-특이적 프로모터는 LCR 및 적색 옵신 프로모터를 이전에 사용하였다. Smallwood et al에 의한 유전자 변형 마우스에서의 인 비보 리포터 유전자 발현 연구에서, LCR에의 물리적 근접성에 기초한 적색 또는 녹색 옵신 프로모터로부터 상이한 수준의 발현을 조사하였다. Smallwood et al는 LCR에의 물리적 근접성에 기초하여 적색 또는 녹색 옵신 프로모터로부터 상이한 수준의 발현을 입증하기 위해 인간 적색 및 녹색 어레이의 몇몇 유도체를 구축하였다 (도 1, 좌측 하단 참조). 각각의 유도체는 적색 옵신 프로모터의 제어하에 알칼리 포스파타아제 (AP) 리포터 유전자 및 녹색 옵신 프로모터의 제어하에 β -갈락토시다아제 (LacZ)로 구성되었다. 각각의 배아 줄기 세포주에 대해, 다중 키메라 파운더(multiple chimeric founder) 또는 전이 유전자를 안정적으로 물려받은 다수의 자손으로부터 망막을 분석하였다. 후자의 경우, 상기 분석은, 생식선 cre 마우스로 교배하여 loxP-측면 PGK-neo 카세트 제거하기 전후에 수행하였다.

[0196] 천연 염색체 배열 (pPMS107)을 사용하는 야생형 구조체에서, 원추세포의 65-95 %는 AP (적색 옵신 프로모터의 제어하에 있음) 또는 lacZ (녹색 옵신 프로모터의 제어하에 있음)를 발현하나 둘 모두를 발현하지는 않았다. 2 개의 전사 단위 사이에 9-kb 스페이스의 삽입 (즉, LCR과 녹색 옵신 프로모터 사이의 거리를 증가시킴, 구조체 pPMS108) lacZ (녹색 프로모터) 발현 세포로부터 AP (적색 프로모터) 발현 세포로의 큰 변화(shift)을 초래하였다. 2 개의 전사 단위 (pPMS101)의 위치를 교환하고 LCR (pPMS101) 바로 뒤에 녹색 옵신 코어 프로모터를 위치시키는 것은, 이 유전자 변형 마우스의 발현 프로파일을 거의 배타적으로 녹색 옵신 코어 프로모터 전사 (>99 %) 쪽으로 편향시켰다.

[0197] 본 발명은 인간 LCR 및 최적화된 인간 녹색 옵신 프로모터를 이용하는 대안적인 원추세포-특이적 전사 제어 유닛 (TCU)을 제공한다. 인간 녹색 옵신 프로모터 (0.2kb)의 보존된 핵심 요소가 확인되었고, 조작된 녹색 옵신 프로모터를 이용하는 일련의 TCU를 LCR 영역 및 2.0Kb (hG2.0), 1.7Kb (hG1.7) 및 1.4Kb (hG1.4)의 다양한 크기의 녹색 옵신 프로모터를 사용하여 생성시켰다 (도 2 참조). 1.7Kb의 적색 옵신 프로모터 단편 (PR1.7, AGTC에 의해 사용된 프로모터와 유사, Ye et al, 2016)을 또한 대조군으로서 생성시켰다.

[0198] 추가적으로, 상기 기재된 프로모터에 의해 구동되는 GFP 리포터를 포함하는 일련의 AAVshh10 벡터를 생성시키고 인간 ES-유래 망막 배양에서의 발현을 평가하였다.

[0199] 시험된 모든 구조체는 GFP 발현 수준 및 원추세포 특이성 측면에서 유사한 형질 도입 프로파일을 제공하였다. 더 작은 프로모터 단편을 갖는 구조체는 AAV 벡터 내에 더 큰 유전자를 패키징하기 위해 더 많은 공간을 제공한다.

[0200] **실시예 2- 최적화된 TCU는 모든 원추세포 아형에서 리포터 유전자의 강력한 발현을 제공한다**

[0201] 원추세포에서 리포터 단백질 발현을 촉진하는 본원에 개시된 최적화된 TCU의 능력을 시험하기 위해, 인간 ES-유래 망막을 AAVshh10-hG1.4.GFP를 사용하여 형질 도입시켰다. 모든 원추세포 아형 (도 3B', C')에서 강력한 리포터 유전자 발현 (도 3A) 이 관찰되었다.

- [0202] 이전에 특성화된 인간 원추세포 아레스틴 (CAR) 프로모터와 비교하여, hG1.4에 의해 제공된 발현 수준은 인간 원추세포에서 더 높았으며, 간상세포 또는 망막 색소 상피 (RPE) 세포에서 이소성 발현은 없었다. 마우스에서, 인간 적색 옵신 프로모터에 기초한 원추세포 프로모터는 간상세포에서 원추세포-특이적이고 매개된 발현이 아니었다 (Ye et al., 2016).
- [0203] **실시예 3: TCU 추가적인 최적화 및 인간 CNGA3 유전자의 코돈 최적화**
- [0204] 녹색 옵신 유전자의 전사 시작 부위에 대한 위치 +5 내지 +10에서 GGGCCG 서열을 TCTAGA로 변경시키면, 결과적인 발현 수준이 2 배가 되었다. 이 서열 변경 (M8)(서열번호 16 참조)은 hG1.4 및 hG1.7 구조체에 통합되었다
- [0205] 또한, CNGA3의 암호화 서열을 코돈-최적화하여 코돈 사용 편향 및 CG 함량을 개선시키고, mRNA에서 임의의 암호 처리 부위 및 잠재적 줄기-루프 구조를 제거하였다.
- [0206] hG1.4 (M8) (서열번호 6) 및 hG1.7 (M8) (서열번호 15) 구조체는 인간 코돈 최적화 CNGA3 cDNA (coCNGA3)를 보유하는 AAV2/8 벡터에서 사용되었고, 원추세포 기능의 망막 전위도 (ERG) 평가를 사용하여 CNGA3 녹아웃 마우스 모델에서 벡터의 효능을 결정하였다. 벡터 투여 1 개월 후, M8 서열이 없는 벡터에 비해 뚜렷한 이점은 없었지만, hG1.7(M8) 벡터는 M8 서열이 없는 상응하는 벡터에 비해 약간 개선된 것으로 나타났다 (도 4, 컬럼의 좌측 막대). 이들 동물에서의 ERG 평가가 투여 후 2 개월에 반복될 때, 'M8' 벡터를 주사한 동물의 진폭은 추가로 증가한 반면 (도 4, 컬럼의 우측 막대), 표준 벡터를 주사한 동물의 진폭은 일정하게 유지되었거나 (hG1.4) 또는 소폭 증가하였다 (hG1.7). CNGA3로 인해 색맹에서 우수한 기능적 회복을 달성하기 위해 최대 발현 수준이 중요하다는 것이 입증되었으며, 이러한 결과는 구조체에 M8 서열의 포함이 치료에 유리하다는 것을 나타낸다.
- [0207] 코돈-최적화된 CNGA3 유전자는 야생형 인간 CNGA3 유전자보다 Cnga3 녹아웃 마우스에서 광순응 반응을 보다 효과적으로 회복하였다 (도 5). 야생형 인간 CNGA3 유전자 또는 코돈 최적화된 인간 CNGA3 유전자를 구동하는 적색 옵신 프로모터 (1.7L)를 보유하는 구조체를 AAV2/8 혈청형으로 패키징하고 Cnga3-결손 마우스에 망막하 주사하였다. 주사 후 1 개월 및 2 개월에 광순응 ERG 반응을 평가하였다. 코돈-최적화된 벡터를 투여 받는 동물에서의 ERG 반응은 야생형 유전자를 받는 동물보다 일관되게 더 높았다 (도 5).
- [0208] **실시예 4: CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터는 CNGA3 녹아웃 마우스에서 광순응 반응을 회복할 수 있는 반면, 상응하는 AA2/5 구조체는 최소 회복을 제공한다**
- [0209] CNGA3을 발현하는 AAV2/5 및 AAV2/8 벡터의 광순응 반응을 회복하는 능력을 평가하기 위해, AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 및 AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3 바이러스 벡터를 1 개월령의 cnga3 녹아웃 마우스에 망막하 주사하였다. 투여 후 4 주에 광순응 ERG 반응을 평가하였다. 본 발명자들은 최대 70 μ V의 ERG b-파 진폭으로 AAV2/8 처리된 눈에서 강력한 광순응 반응을 관찰하였다 (도 6A 및 B). 두 반구 (상부/하부) 모두에서 망막하 주사를 받은 눈은 ERG b-파 진폭에서 가장 큰 개선을 보여주었다. 대조적으로, 야생형 마우스는 동일한 실험 설정에서 약 100-120 μ V의 진폭을 가졌다. 처리되지 않은 눈에서의 반응은 없었으며 AAV2/5 처리된 눈은 최소한의 반응을 제공했다 (도 6A 및 B). 이 데이터는 원추세포 ERG b-파 진폭으로 측정된 바와 같이, AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 벡터가 높은 수준의 CNGA3 발현을 제공할 수 있고 CNGA3 녹아웃 마우스에서 원추세포 기능을 야생형의 약 60 %의 수준으로 회복할 수 있음을 나타낸다.
- [0210] CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터에 의한 망막 민감도의 회복이 오래 지속됨을 추가로 입증하기 위해, Cnga3 결손 마우스에 2 주령에서 AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n=14) 또는 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n=13) (둘 다에 대한 역가 1×10^{12} vg/ml)를 망막하 주사하고, 또는 미처리된 상태로 두었다 (n=3). 두 벡터 중 어느 하나에 의한 형질 감염은 치료 후 최대 6 개월까지 망막 민감도의 지속적인 회복을 유도했다 (도 7).
- [0211] **실시예 5: CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터는 장기 원추세포 생존을 촉진한다**
- [0212] 원추세포의 생존을 촉진하기 위해 CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터의 능력을 2 주령의 Cnga3-결손 마우스를 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3로 주사함으로써 평가하였다. 주사를 받지 않은 3-4 개월령의 C57BL/6J 마우스는 건강한 원추세포에 대한 대조군으로 사용되었다. 망막을 분리하여 원추세포 아레스틴으로 염색하고 세척하였다.
- [0213] AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (도 8C 참조)로 형질 도입된 Cnga3-결손 망막은 처리 후 3-4 개월에 인 비보 원추세포의 생존을 나타냈다. 생존의 정도는 건강한 대조군의 원추세포 생존과 유사하였고 (도 8A 참조) 주사되지 않은 Cnga3-결손 망막과 비교하여 유의하게 증가하였다 (도 8B 참조).
- [0214] 원추세포 생존을 촉진하는 CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터의 능력은 오래 지속되었으며 벡터 처리 후 13 개월에

도 여전히 관찰될 수 있었다 (도 9 참조).

[0215] **실시예 6: CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터는 인 비보에서 시냅스 연결성의 보존한다**

[0216] 원추세포와 지지 뉴런 (양극성 세포) 사이의 시냅스 완전성을 향상시키는, CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터의 능력을 평가하기 위해, 2 주령의 *Cnga3*-결손 마우스에 AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3을 주사하였다. 처리 후 3-4 개월에, 망막을 단리하고 Gpr179 및 PNA로 염색한 다음 세척하였다. 시냅스 연결성은 평면 고정 망막의 단일 평면 공 초점 이미지에서 시냅스 마커 Gpr179의 신호 강도를 측정하여 결정되었다. 이미지 처리에는 Leica Las X 소프트웨어가 사용되었다. Gpr179 염색은 여러 원추세포 뿌리 관련 Gpr179 염색 (원추세포 뿌리를 확인하기 위해 PNA 염색을 사용) 및 10 개 이상의 간상세포 소구체 관련 Gpr179 염색 (A) 상에 손으로 선을 그려서 추적했다. 신호 강도를 출력하였다 (B; 흰색 선:Gpr179, 적색 선:PNA). 각각의 기점으로부터의 신호 강도의 피크를 평균내고, 원추세포 뿌리 대 간상세포 소구체 관련 Gpr179의 비 (CP/RS)를 계산하였다. 4 개의 다른 위치로부터의 CP/RS를 통계 분석에 사용하였다 (본페로니 다중 비교 검정 (ns: $p > 0.05$, **: $p \leq 0.01$, *: $p \leq 0.05$)). 주사되지 않은 *Cnga3*-결손 마우스 및 동일한 연령 (3-4 개월)의 주사되지 않은 C57BL/6J 마우스의 망막은 각각 음성 및 양성 대조군으로서 제공되었다.

[0217] 도 10에 나타난 바와 같이, CNGA3을 발현하는 AAV2/8 벡터를 이용한 *Cnga3*-결손 망막의 형질 도입은 건강한 대조군 마우스의 것과 유사한 시냅스 연결성을 유도하고, 주사되지 않은 *Cnga3*-결손 망막에 비해 현저히 개선되었다.

[0218] **실시예 7: AAV2/8을 사용한 coCNGA3 전달은 신규한 강력한 AAV 혈청형 AAV-Anc80, AAV-44.9 및 AAV5를 사용한 전달보다 더 큰 이점을 제공한다**

[0219] 유전자의 발현을 위해 다수의 상이한 AAV 혈청형 및 캡시드가 이용 가능하다. 예를 들어, 새롭게 개발된 Anc80-L65 캡시드는 광수용체에 대해 효율적인 트로피즘을 가지며 AAV8에 필적하거나 심지어 우수한 것으로 나타났다. 또한, 상기 신규한 혈청형 AAV44.9는 형광 마커와 조합하여 시험될 때 광수용체 세포에서 효율적인 형질 도입 및 높은 발현을 나타내는 것으로 나타났다. 따라서, coCNGA3를 발현하고 지속적인 ERG 반응을 제공하는 4 개의 상이한 AAV 벡터 (Anc80-L65, AAV44.9, AAV5 및 AAV8)의 능력을 비교하였다.

[0220] hG1.4(M8)-coCNGA3 발현 카세트 (1.0×10^{12} vg/mL)를 보유하는 각각의 벡터를 2 주령의 *Cnga3*-결손 마우스의 망막하 공간으로 전달하고, 단일 플래시 광순응 ERG를, 주입 후 상이한 시점에 기록하였다 (도 11 참조). 10cd.s/m^2 의 광 자극을 분석에 사용하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, AAV8-매개 유전자 전달은 Anc80-L65 (도 11A 참조), AAV44.9 (도 11B 참조) 또는 AAV5 (도 11C 및 도 6 참조)와 비교하여 더 높은 ERG 반응을 초래하였다.

[0221] **실시예 8: 이전에 공지된 원추세포 특이적 프로모터와 최적화된 TCU의 비교**

[0222] 본원에 개시된 TCU의 발현 수준을, 입수가 가능한 가장 강한 원추세포-특이적 프로모터 중 하나(1.7L)와 비교하기 위해, 17-19 주령의 인간 배아체 (hEB)를 hG1.4(M8), hG1.7(M8) 또는 P1.7L의 제어하에, eGFP를 발현하는 AAV 벡터 AAVShH10으로 각각 형질 도입하고, 2 주 후에 수집하였다 (각 프로모터에 대해 $n=6-8$). 분리 후, GFP 양성 세포에서 상대적인 중앙 형광 강도 (MFI)에 대해 세포를 분석하였다. 상이한 벡터로 형질 도입된 hEB에서의 상대적 MFI를 유세포 분석에 의해 평가하고, AAV ShH10-1.7L-eGFP로 형질 도입된 EB에서 MFI에 대한 비율로서 계산하였다. 도 12A에 나타난 바와 같이, 상기 구조체 hG1.7은 이전에 공지된 프로모터 1.7L과 비교하여 GFP 발현의 약 50 % 증가를 제공하였다.

[0223] 또한, *CNGA3* 녹아웃 마우스에서 hCAR (인간 원추세포 아레스틴) 프로모터로부터 hCNGA3을 구동하는 AAV2/8 벡터를 시험하였다. 광순응 반응 회복은 야생형 수준의 30 %를 초과하지 않았다 (도 12B).

[0224] *CNAT3* 녹아웃 마우스를 회복하기 위해 AAV2/5(Y719F) 벡터 및 마우스 청색 원추세포 옵신 프로모터를 사용할 수 있는 것으로 보고되었다. 그 연구에서는, 광순응 ERG 진폭은 P12에 주사될 때 야생형의 30 %에 도달하였고 처리 후 10 주에 평가되었다 (Michalakakis et al., 2010). 최근 AGA5 벡터 및 2.1kb 적색 옵신 프로모터가 *CNGA3*결손 양을 구제하는데 사용되어왔다. 이 연구에서, 처리되지 않은 것과 비교할 때 원추세포 플리커 (flicker) ERG의 배가(doubling)가 있었다 (Banin et al., 2015). 그러나, 이들 프로모터는 인간 원추세포의 일 서브세트에서만 기능하는 것으로 알려져 있다 (청색 원추세포 옵신 프로모터는 청색 원추세포에서만 활성화되고 2.1 적색 옵신 프로모터는 적색 원추세포에서만 활성화 된다).

- [0225] Hauswirth 실험실에 의해 *CNGA3* 녹아웃 마우스에서 무린 *CNGA3*을 발현시키기 위해 CBA 프로모터와 함께 AAV2/5 벡터를 사용한 연구는, 마우스를 매우 초기에 치료하였을 때 야생형 ERG 원추세포 b-파 진폭의 최대 70 %의 회복을 나타냈다 (처리 3 주 후 - 바이러스 역가 1E13로 P14 평가) (Pang et al., 2012). 본 발명자들은 생애 후기에 동일한 동물 모델을 치료하여 광순응 시력을 회복하는 데 유사한 효능을 달성하였다 (1 개월 - 바이러스 역가 7E12). 인간의 색맹은 변하지 않는 장애이지만, *CNGA3* 마우스 모델은 첫 1개월 내에 원추세포 사멸을 겪어 조기 치료가 유리하다는 것을 나타냈다. 비-특이적 CBA 프로모터는 *CNGA3* 시험에서 사용되지 않을 것이지만, 최적의 회복을 위해 높은 수준의 *CNGA3* 발현이 중요하다는 본 발명자들의 주장을 지지한다.
- [0226] **참조**
- [0227] Altschul S. F. **A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances.** 1993 J Mol Evol 36:290-300.
- [0228] Altschul S. F. et al **Basic local alignment search tool.** 1990 J Mol Biol 215:403-10.
- [0229] Banin E., Gootwine E., Obolensky A., Ezra-Elia R., Ejzenberg A., Zelinger L., Honig H., Rosov A., Yamin E., Sharon D., Averbukh E., Hauswirth W. W., Ofri R. **Gene Augmentation Therapy Restores Retinal Function and Visual Behavior in a Sheep Model of CNGA3 Achromatopsia.** 2015 Mol Ther. Sep;23(9):1423-33.
- [0230] Davidoff et al. **Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock.** 2004 J. Virol. Methods 121; 209-215.
- [0231] Devereux J. et al. **A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX.** 1984 Nucleic Acids Research 12, 387-395.
- [0232] Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J. M. **Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (18) (2002), pp. 11854-11859
- [0233] Hawes N., Wang X., Hurd R. E., Wang J., Davisson M. T., Nusinowitz S., Heckenlively J. R., Chang B. **A Point Mutation in the *Cnga3* Gene Causes Cone Photoreceptor Function Loss (*cpf15*) in Mice.** 2006 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: E-Abstr 4579
- [0234] Henikoff S. and Henikoff J. G. **Amino acid substitution matrices from protein blocks.** 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.
- [0235] Karlin S. and Altschul S. F. **Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.** 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787.
- [0236] Michalakakis S., Mühlfriedel R., Tanimoto N., Krishnamoorthy V., Koch S., Fischer M. D., Becirovic E., Bai L., Huber G., Beck S. C., Fahl E., Büning H., Paquet-Durand F., Zong X., Gollisch T., Biel M., Seeliger M. W. **Restoration of cone vision in the CNGA3-/- mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function.** 2010 Mol Ther. Dec;18(12):2057-63.
- [0237] Pang J. J., Deng W. T., Dai X., Lei B., Everhart D., Umino Y., Li J., Zhang K., Mao S., Boye S. L., Liu L., Chiodo V. A., Liu X., Shi W., Tao Y., Chang B., Hauswirth W. W. **AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-Achromatopsia.** 2012 PLoS One. 7(4):e35250.
- [0238] Shabaan S. A. and Deeb S. S. **Functional Analysis of the Promoters of the Human Red and Green Visual Pigment Genes.** 1998 IOVS 39: 885-896.
- [0239] Smallwood P. M., Wang Y., Nathans J. **Role of a Locus Control Region in the mutually exclusive expression of human red and green cone pigment genes.** 2002 Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 22;99(2):1008-11.
- [0240] Ye G. J., Budzynski E., Sonnentag P., Nork T. M., Sheibani N., Gurel Z., Boye S. L., Peterson J. J., Boye S. E., Hauswirth W. W., Chulay J. D. **Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia**

and Other Retinal Diseases. 2016 Hum Gene Ther. Jan;27(1):72-82.

서열 정보

서열번호 1 - M/L 흡신 유전자좌 제어 영역 (LCR)의 1.2kb 단편

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGTGGGGAAGGGCATGGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGAG
ACGGATGGTGGTACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGCAAAGGCAAAT
GGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGGCTC
TCCCGCTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGATTAGAGACAAGTCCAACATCTAATCTTCCACCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTC
CGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGCTGGCTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCTTTCTTCTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCAC
TGCTCCCGCTCTCTCCCCCATCCACCCCCTACCCCCTCGTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTG
GGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACAGTGCCCCACAGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTT
GATCTTCTGTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGACAACTACCGCCTTTCCAGGCCTCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTT
CCTGGGATGTGGGGCTGGCACAGTGTGGCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCAATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGCAGC
GGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCCCAGACCCCACTCTCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA
AGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCTTGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTC
GCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGTGGCCAGCATCCACCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAG
GAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTG

서열번호 2 - 2.0 kb M 흡신 프로모터 단편, 밑줄 그어진 서열번호 3의 500 bp 단편, M8 서열이 없는 이텔릭체로 된 UTR

TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTACTCAGGATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCAGCAAGTAGAGGCTGCA
GTGACCTGTGACTGTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGACCTTGTCTCAAAAAAAAAAGAGCGGGGGGGGGGGCCGGGCCGGGCGTGGTGG
CTCACAGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAAGCCAAGGCGGTGGATCACTTGAGGTGAGGAGTTTGAACCATCATGGTCAACACTGCGAAACACTGTCCCT
ACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACCTGTAATCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGAGACGGAGG
TTGCAGTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACTGACAAGAGTGAGATTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAGTAATCACTAGAAAAGAAGCTACAT
ATGTACATAACATCCAAATAACCAAGAGGAGAAAAAATGGGACTTGATTAATCAAAAACAAAAAGAAAGAAAGAAAGGGGGAGAAAAATAAACAA
GGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCACTTTGGAAGCCAAGGTGGGTGGATCTCTTGAGCTCAGGAGGTCAAGACCAGCCTGGGCAACATGG
CGAAACCCGCTCTCTATTAATAAAAAAAAAAATAACAACAATTATCTGGAGTGGTGGTGCACACCTGTAGTCCCAGCTACCCAGGACGCTGAGACGGGAGGA
TCGCTTGATCCCGGGATGTGAGGCTGCCGTGATCGCACCCTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCATCTCAAAAAATAAATAAATAAAGC
AAACAAGAAAAAAGGCTTGAACATATCTGATAGATAAAGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAATCAGTAACTAAGAGCAAATAACCCA
ATATAAGACATTAAGGGTAGCCACGACATCTCAGACGACGAAAAACAAAGACAGTAAACGTATAATAAACATGTAATTGCAAGGTGATCCGGGAATA
GTAAGCGAAAGCAACAATTAATACTATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTAAGGCCTAACAAATGTCCAGGGCTGGCAGAGATGTGGCAGAAGG
TGATGTCACATACCTGCAAGTGGGAATCTAAACAGATTGAGGTTTGGTTTTTTTTAAATCGCAATTAGGTGGCCTGTTAAATTTTTTTCTTGAGACAG
AGTTTTGCTCTGTGTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCTCGATCTTGGCTCACCGCAACCTCGACCTCCAGGTACAAGCGATTCTCTGTCTCAGCTCCCA
AGTAGCTGGGAGTACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTTGTTTTTATTTAGTAGAAAAGGGGTTTCAACATGTTAGTCAGGCTGGTGGGAACTCCT
GACCTCAGGAGATCTACCCGCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTT
GCCCAGGCTAGAGTTCACTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCTCCAGATTCAAGCGATTCTCTGCCTCGACCTCCAGTAGCTGGGATTACA
GGTTTCCAGCAATCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGTGGGAGGAGGAGTCTAAGTCCAGGCCCAATTAAGAG
ATCAGATGGTGTAGGATTGGGAGCTTTAAGGTGAAGAGGCCGGGTGATCCCACTGGCCGTATAAAGCACCGTGACCTCAGGTGACGCACCAAGGCC
GGCTGCCGTGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

서열번호 3 - 500 bp M 흡신 단편, 이텔릭체로 된 UTR, 밑줄 그어진 M8 돌연변이

ACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAAAGGGGTTTACCATGTTAGTCAGGCTGGTGGGAACTCCTGACCTCAGGAGAT
CTACCCGCTTGGCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCAGGCTAGAG
TTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCTCCAGATTCAAGCGATTCTCTGCCTCGACCTCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAA
TCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGTGGGAGGAGGAGTCTAAGTCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGT
GAGTTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCGGGTGATCCCACTGGCCGTATAAAGCACCGTGACCTCAGGTGACGCACCACTAGAGCTGCGGTGGG
GACAGGGCTTTCCATAGCC

서열번호 4 - hG1.7(M8) 구조체의 변이체, 1.2 kb M/L 흡신 LCR 단편, 500 bp M 흡신 단편, 이텔릭체로 된 UTR, 밑줄 그어진 M8 돌연변이

- [0249] TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGCAAAGGCAAATGGCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGGCTCTCCCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGATTAGAGACAAGTCCAACATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCTCTTCTTGGGGCTTCTTGGGCCGCCACTGTCTCCGCTCTCTCCCCATCCACCCCTCACCCCTCGTCTTCATATCCTTCTCTAGTGTCTCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTGTGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACAGTGGCCCCACAGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCTGTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCTTTCCAGGCCTCCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGCTGGCACAGTGTGGCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCAATAGCGTAATCTGGACAAGGGCAGACAGGGCGAGCGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGCTTCCCCAGACACCCCACTCCTCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCTTGGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTCCCTTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGAGGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGACAGGTATTGCCACTAAGCCAGCTAATTGTTTTTTATTAGTAGAAACGGGGTTTACCATTGTTAGTCAGGCTGGTCGGAACTCTGACCTCAGGAGATCTACCGCTTGGCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCAGGCTAGAGTTCAGTGGGCCATCTCAGTCACTGCAACCTCCGCTCCAGATTCAAGCGATTCTCTGCCTCGACCTCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTGGGAGCTTTAAGGTGAAGAGGCCGGGTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC
- [0250] 서열번호 5 - 200 bp M 읍신 단편, 이텔릭체로 된 UTR, 밀줄 그어진 M8 돌연변이
- [0251] GATCGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCAGGCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTGGGAGCTTTAAGGTGAAGAGGCCGGGTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC
- [0252] 서열번호 6 - hG1.4(M8) 구조체: 1.2 kb M/L 읍신 LCR 단편, 200bp M 읍신 단편, 이텔릭체로 된 UTR, 밀줄 그어진 M8 돌연변이
- [0253] TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGCAAAGGCAAATGGCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGGCTCTCCCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGATTAGAGACAAGTCCAACATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCTCTTCTTGGGGCTTCTTGGGCCGCCACTGTCTCCGCTCTCTCCCCATCCACCCCTCACCCCTCGTCTTCATATCCTTCTCTAGTGTCTCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTGTGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACAGTGGCCCCACAGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCTGTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCTTTCCAGGCCTCCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGCTGGCACAGTGTGGCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCAATAGCGTAATCTGGACAAGGGCAGACAGGGCGAGCGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGCTTCCCCAGACACCCCACTCCTCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCTTGGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTCCCTTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGAGGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGATCGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTGGGAGCTTTAAGGTGAAGAGGCCGGGTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC
- [0254] 서열번호 7 - 비-코돈 최적화된 CNGA3 cDNA
- [0255] ATGGCCAAGATCAACACCAATACTCCACCCCTCCAGGACCCACCTCAAGGTAAAGACCTCAGACCGAGATCTCAATCGCGTGAAAATGGCCTCAGCAGAGCCCACTCGTCAAGTGAGGAGACATCGTCAAGTGTGCAGCCGGGGATCGCCATGGAGACCAGAGGACTGGCTGACTCCGGGCAGGGCTCCTTACCGGCCAGGGATCGCCAGGCTGTGCGCCTCATCTTCTGTGCGCAGGTGGGTGCCAGGCATGTGCACCACCAGGACCAGGGACCGGACTCTTTTCTGATCGTTTCGTGGAGCCGAGCTTAAGGAGGTGTCCAGCCAAGAAAGCAATGCCAGGCAATGTGGGAGCCAGGAGCCAGCAGACAGAGGGAGAAGCGCTGGCCCTGGCCAAATGCAACACTAACACCAGCAACAACAGGAGGAGAGAAGAAGACGAAAAAGAGGTGCGATCGTGGTGACCCGTCCAGCAACCTGTACTACCGCTGGGTGACCGCCATCGCCTGCTCTATAAAGTGGTATCTGCTTATTTGACAGGCTGTTTCGATGAGCTGCAGTCCGAGTACCTGATGCTGTGGCTGTCTGGACTACTCGGCAGATGTCTGTATGTCTTGGATGTGCTGTACGAGCTCGGACAGGTTTCTCGAGCAAGGCTTAATGGTCAGTGATACCAACAGGCTGTGGCAGCATTACAAGACGACCACGAGTTCAAGCTGGATGTGTTGCTCCCTGGTCCCCACCGACCTGGCTTACTTAAAGGTGGGCACAACTACCCAGAA

GTGAGGTTC AACCGCCTACTGAAGTTT TCCGGCTCTTTGAATCTTTGACCGCACAGAGACAAGGACCAACTACCCCAATATGTTTCAGGATTGGGAAGTTG
GTCTTGATACATTCTCATCATCATCCACTGGAATGCCTGCATCTACTTTGCCATTTC AAGTTCATTGGTTTTGGGACAGACTCCTGGGTCTACCCAAACATC
TCAATCCCAGAGCATGGGCGCCTCTCCAGGAAGTACATTTACAGTCTCTACTGGTCCACCTTGACCCCTTACCACCATTTGGTGAGACCCACCCCCGTGAAA
GATGAGGAGTATCTCTTTGTGGTCGTAGACTTCTTGGTGGGTGTTCTGATTTTTGCCACCATTTGGGCAATGTGGGTCCATGATCTCGAATATGAATGCC
TCACGGGCAGAGTTCCAGGCCAAGATTGATTCCATCAAGCAGTACATGCAGTTCCGAAGGTCACCAAGGACTTGGAGACGCGGGTTATCCGGTGGTTTTGAC
TACCTGTGGGCCAACAGAAGACGGTGGATGAGAAGGAGGTGCTCAAGAGCCTCCCAGACAAGCTGAAGGCTGAGATCGCCATCAACGTGCACCTGGACACG
CTGAAGAAGGTTTCGCATCTTCCAGGACTGTGAGGCAGGGCTGCTGGTGGAGCTGGTCTGAAGCTGCGACCCACTGTGTTACGCCCTGGGGATTATATCTGC
AAGAAGGGAGATATTGGGAAGGAGATGTACATCATCAACGAGGGCAAGCTGGCCGTGGTGGCTGATGATGGGGTCACCCAGTTCGTGGTCTCAGCGATGGC
AGCTACTTCCGGGAGATCAGCATTTCTGAACATCAAGGGGAGCAAGTCGGGGAACCGCAGGACGGCCAACATCCGCAGCATTTGGCTACTCAGACCTGTTCTGC
CTCTCAAAGGACGATCTCATGGAGGCCCTCACCGAGTACCCCGAAGCCAAGAAGGCCCTGGAGGAGAAAGGACGGCAGATCCTGATGAAAGACAACCTGATC
GATGAGGAGCTGGCCAGGGCGGGCGCGGACCCCAAGGACCTTGAGGAGAAAGTGGAGCAGCTGGGGTCTCCCTGGACACCCCTGCAGACCAGGTTTGCACGC
CTCCTGGCTGAGTACAACGCCACCCAGATGAAGATGAAGCAGCGTCTCAGCCAACTGGAAAGCCAGGTGAAGGGTGGTGGGGACAAGCCCTGGCTGATGGG
GAAGTTCCCGGGGATGCTACAAAACAGAGGACAAACAACAGTGA

[0256] 서열번호 8 - 코돈-최적화된 *CNGA3* cDNA

[0257] ATGGCAAAAATCAATACCCAGTACAGCCACCCCTCACGAACTCACCTGAAAGTCAAAAACAAGCGATAGAGACCTGAACAGAGCCGAGAACGGCCTGTCCAGG
GCCCCAGACTCCTCTGAGGAACTAGTTCACTGTGTCAGCCTGGAATCGCTATGGAGACCAGAGGGCTGGCTGACTCTGGCCAAGGAAGTTTCACAGGGCAG
GGCATCGCCAGGCTGTCTAGACTGATTTTTCTGCTGAGGAGATGGGCCCTAGGCATGTGCACCATCAGGACCAGGGACCCGATAGTTTCCCTGAC

[0258] AGGTTTCAGGGGGCCGAAGTGAAGGAGTCACTCCCAGGAATCTAACGCACAGGCCAATGTGGGCAGTCAGGAGCCCGCTGATAGAGGACGGTCCGCATGG
CCTCTGGCCAAGTGAACACTAATACCTCTAACAATACAGAGGAAGAGAAGAAAAGTGAAGAAAGGATGCCATCGTGGTTCGACCCCTTCTAGTAACCTGTAC
TATAGGTGGCTGACAGCTATCGCACTGCCAGTGTCTACAATTGGTATCTGCTGATTGTCAGAGCTGTTTTGACGAAGTGCAGAGTGAGTATCTG

[0259] ATGCTGTGGCTGGTGTGCTGATTACTCAGCAGACGTGCTGTATGTGCTGGATGTCCTGGTGCAGCACGAACTGGGTTCTGGAGCAGGGCCTGATGGTGAAGC
GACACCAACAGACTGTGGCAGCACTACAAAACCAACTCAGTTAAGCTGGATGTCCTGTCCCTGGTGCCAACCGACCTGGCCTACCTGAAAGTCGGCACA
AACTATCCCAGAGTGCGGTTCAATCGCTGTGAAGTTCTCTCGGCTGTTTGTAGTTCTTCGATAGGACAGAGACTAGAACCAACTACCCAAATATG

[0260] TTCCGCATCGGCAACCTGGTGTGTATATTCTGATCATTATCCACTGGAATGCTTGTATCTACTTTGCAATCAGCAAGTTTATTGGATTTGGGACCGACAGC
TGGGTGTATCCAAACATTTCATCCCCGAACATGGACGACTGAGCAGGAAGTACATCTATTCACTGTACTGGAGCACACTGACTCTGACCACAATTGGGGAG
ACCCCCCTCCAGTGAAGGATGAAGAGTACCTGTTCTGTTGCTGGACTTTCTGGTGGCGTGCTGATCTTCGAACAATTGTCGGCAATGTGGGA

[0261] AGTATGATCTCAAACATGAATGCCTCACGAGCTGAGTTCCAGGCTAAAATTGACAGCATCAAGCAGTATATGCAGTTTAGAAAAGTCACTAAGGATCTGGAG
ACCAGAGTGATCCGTTGGTTTACTACCTGTGGGCAACAAAAAGACAGTCGATGAAAAAGAGGTGCTGAAGAGCCTGCCGACAAACTGAAGGCAGAGATT
GCCATCAATGTCCATCTGGATACTCTGAAAAAGGTGCGGATCTTCCAGGACTGCGAAGCAGGACTGCTGGTCGAGCTGGTGTGAAGCTGCGCCCT

[0262] ACCGTGTTTAGCCAGGCGATTATATCTGTAAAAAGGGGACATTGGCAAAGAAATGTACATTATCAACGAGGGGAAGCTGGCTGTCTGTCGAGACGATGGC
GTGACCCAGTTCTGCTGCTGAGCGATGGCAGCTATTTTGGGGAATTTCCATCCTGAATATCAAAGGCTCCAAGTCTGGAAACCGCGCACAGCTAATATT
CGGTCCATCGGATATTCTGACCTGTTCTGCTGTCTAAGGACGATCTGATGGAGGCACTGACTGAATACCCCGAGGGCAAAAAGGCTCTGGAAGAG

[0263] AAAGGCCGCGCAGATCCTGATGAAGGATAACCTGATTGACGAAGAGCTGGCACGAGCTGGAGCAGACCCCTAAAGATCTGGAAGAGAAGGTGGAGCAGCTGGGA
TCAAGCCTGGATACCTGCAGACACGCTTCGCTCGACTGCTGGCAGAATACAATGCCACCCAGATGAAATGAAGCAGCGCTGAGTCAGCTGGAGTCACAG
GTGAAGGCGGAGGGGACAAGCCCTGGCAGATGGCGAAGTCCCTGGCGACGCTACAAAACAGAAGATAAACAGCAGTAA

[0264] 서열번호 9 - *PDE6C* cDNA, NM_006204.3

[0265] ATGGGTGAGATCAACCAAGTTGCCGTGGAGAAATACCTGGAGGAGAACCCTCAGTTTGCCAAGGAGTACTTTGACAGGAAGTTGCGGGTGGAGGTGCTGGGA
GAAATCTTCAAGAACAGCCAGGTGCCAGTCCAGTCCAGCATGTCTTCTGAGCTGACCCAGGTGGAGGAGTCAGCCCTGTGCTTGGAGCTGTGTGGACC
GTGCAGGAGGAGGGGGGACCCAGAGCAGGGGGTTACAGGGCCCTGCAGAGGCTGGCCACCTGCTCCAGGCTGACCGTCGAGCATGTTCTGTGCCGG
TCCCGGAACGGCATACTGAGGTGGCCTCTAGGTTGCTGGATGTACCCCCACCTCCAAGTTTGAAGACAACCTGGTGGGCCCTGACAAAAGATTGTGTTT
CCATTGGACATTGGGATAGTGGGTTGGGCTGCTACACGAAGAAAACCTATAATGTCCAGATGTGAAAAAGAACAGCCATTTTCTGACTTCATGGACAAG
CAAATGGGTATGTCACTAAGAACCTGCTGGCAACCCCGATCGTGGTGGGCAAGGAGGTTCTTGCTGTGATCATGGCAGTTAACAAGTAAATGCATCTGAA
TTTTCCAAACAGGATGAAGAGGCTTTTCCAAATACCTCAACTTTGTGTCTATCATCCTAAGGCTTCATCACACCAGCTACATGTACAATATTGAATCCCGA
AGAAGCCAGATCCTTATGTGGTCAGCCAATAAAGTATTTGAAGAATCAGAGATGTTGAGCGACAGTTTCACAAAGCGCTCTACACGGTTAGATCATATCTG
AACTGTGAACGATACTCCATTGGACTGCTGGACATGACCAAGGAGAAGGAATTTACGATGAATGGCCAATCAAGCTTGGAGAAGTAGAGCCTTATAAAGGT
CCAAAGACACCTGATGGCAGGGAAGTCAACTTTTATAAAATCATTGATTACATTTTACATGGAAGAAGAGATCAAAGTGATTCCGACGCTCCTGCAGAC
CACTGGACACTCATTAGTGGGTTGCCAACATATGTTGCTGAAAAATGGATTTATCTGTAACATGATGAATGCCCTGCGGATGAATACTTCACATTTTCAGAAA

GGACCTGTAGACGAAACTGGTTGGGTCATTAAGAATGTTTTGTCCCTGCCTATTGTCAACAAGAAAGAGATATTGTGGGAGTGGCTACATTTTACAACAGG
AAGGATGGAAAACCTTTTCGATGAGCATGATGAATACATTACCGAGACTCTCACACAATTTCTTGGATGGTCTCTTTTAAATACTGACACCTACGATAAGATG
AATAAGCTAGAAAACAGAAAGGACATTGCTCAGGAAATGCTCATGAACCAACCAAGCCACTCCTGAAGAAATTAAGTCCATTTTGAAATTTCAAGAGAAG
TTAAATGTTGATGTAATTGACGACTGTGAAGAAAAACAATTGTTGCAATTTTGAAAGAGGACTTGCCAGACCCACGCTCAGCAGAACTGTACGAATCCGC
TTCAGTGACTTCCCCCTTACAGAGCAGCGATTGATTAAATGTGGAATACGACTGTTTTTTGAAATAAATGTGGTGGAGAAATTCAAAGTACCTGTAGAGGTT
CTTACCAGATGGATGTACTGTGAGGAAAGGGTACCGAGCTGTCACTTACCACAATTGGCGGCATGGGTTCAACGTGGGGCAGACCATGTTACTTTGCTG
ATGACAGGAAGATTAAAGAAGTACTACACAGATCTCGAAGCCTTTGCCATGCTTGTCTGCTTTCTGCCATGATATTGACCAGAGGCACCAATAATTTG
TACCAGATGAAATCCACGTCTCCATTAGCAAGACTTCATGGTCTTCTATTTTGGAGAGGCCACCCTGGAGTACAGTAAGACTCTGTTGCAGGATGAGAGT
TTAAACATCTTCCAGAACCTAAATAAGCGGCAGTTTGAACAGTTATTCAATTTGTTGAGGTGCAATAATAGCAACTGACCTGGCTTTATATTTCAAGAAG
AGGACCATGTTTCAAAAAATTTGTTGATGCCTGTGAACAAATGCAACCGGAAGAAGAGCCATCAATATGTAAGTGTGATCCAACCAAGAAAGAGATTATC
ATGGCAATGATGATGACGGCATGTGACTTGTCTGCTATTACCAAGCCCTGGGAGGTGCAAGTCAAGTAGCACTTATGGTTGCAATGAATTTTGGGAACAA
GGAGATCTGGAGAGAACAGTGTGTCAGCAACAACCCATTCTATGATGGACAGAAACAAAGAGATGAATTACCTAAACTTCAAGTTGGATTATTGATTTT
GTTTGTAATTTTGTATATAAGGAGTTCTCACGGTTTCACAAAGAAATCACACCTATGCTGAGTGGTCTTCAGAATAACAGAGTAGAATGGAATCACTAGCT
GATGAGTATGATGCAAGATGAAGGTCATTGAAGAGGAGCAAAAAAGCAAGAAGGAGGAGCCAAAAAGCTGCTGAAGATTCAAGAGGTGGTATGACAAA
AAGTCCAAAACATGTTAATGTTGTAA

[0266] 서열번호 10 - *PDE6H* cDNA, NM_006205.2

[0267] ATGAGTGACAACACTACTCTGCCTGCTCCAGCTTCAAACAGGGTCTACCACCCACGCAAGGCCCTCCCAAGTTCAAGCAGAGGCAGACTCGCCAATTC
AAGAGTAAACCTCCAAAGAAAGGTGTGAAGGATTTGGAGATGACATTCCAGGAATGGAGGGCTAGGAACAGATATCACAGTGATTGTCCATGGGAGGCA
TTCAGCCACCTGGAATTGCATGAGCTCGCTCAGTTTGGGATTATCTGA

[0268] 서열번호 11 - *GNAT2* cDNA, NM_005272.3

[0269] ATGGGAAGTGGAGCCAGTGTGAGGACAAAGAACTGGCCAAGAGGTCCAAGGAGCTAGAAAAGAAGCTGCAGGAGGATGTGATAAGGAAGCCAAGACTGTC
AAGCTGCTACTGTGGGTGCTGGGGAGTCAGGAAAGAGCACCATCGTCAAACAGATGAAGATCATTCACCAGGATGGCTATTACCAGAAGAATGCCTGGAG
TTCAAGGCTATCATCTATGGAATGTGCTGCAGTCCATCTGGCTATCATCCGGGCCATGACCACACTGGGCATCGATTATGTGAACCAAGCTGTGCGGAT
GACGGGCGACAGCTCAACAACCTGGCTGACTCCATTGAGGAGGGAACCATGCCTCCTGAGCTCGTGGAGGTCATTAGGAGGTTGTGGAAGGATGGTGGGTG
CAAGCCTGCTTCGAGAGAGCTGCAGAATACCAGCTTAATGACTCCGATCTTACTACCTGAACCAATTAGAACGAATTACAGACCTGAGTACCTCCCTAGT
GAGCAAGATGTGCTCCGATCCAGAGTCAAAACACGGGCATCATTGAAACCAAGTTTCCGTCAAAGACTTGAATTTCAAGGATGTTGATGTGGGAGGGCAG
AGATCCGAGAGAAAGAAGTGGATCCACTGCTTCGAGGGAGTCACCTGCATCATTTTCTGTGCAGCCCTCAGTGCCTATGATATGGTGTGGTGAAGATGAC
GAAGTGAATCGTATGCATGAGTCTTTGCATCTGTTCAACAGCATATGTAACCAAAATCTTTGCGGCTACTTCCATTGTCTCTTTCTCAACAAGAAGGAC
CTCTTTGAGGAAAAAATCAAGAAAGTCCATCTCAGCATTGTTTTCAGAGTATGATGGTAACAACCTCCTATGATGATGCGGGGAATTACATAAAGAGCCAG
TTCCTTGACCTCAATATGCGAAAAGATGTCAAAGAAATCTACAGTCACATGACCTGTGCTACAGATACAGAAATGTCAAATTTGTGTTTGTATGCAGTTACA
GATATTATCATCAAGAAAAACCTCAAGGACTGCGGCCTCTTCTAA

[0270] 서열번호 12 - *KCNV2* cDNA, NM_133497.3

[0271] ATGCTCAAACAGAGTGAGAGGAGACGGTCTGGAGCTACAGGCCCTGGAACACGACGAGAATGAGGGCAGCCAACACCGCAGGAGCATTGCTCCCTGGGT
GCCCCGTCCGGCTCCCAGGCCAGCATCCACGGCTGGACAGAGGGCAACTATACTACTACATCGAGGAAGACGAAGACGGCGAGGAGGAGGACCAGTGAAG
GACGACCTGGCAGAAGAGGACCAGCAGGCGAGGGAGGTACACCACGCCAAGCCGAGGGCCCCAGCGACCCTCCGGCCCTGCTGTCCACGCTGAATGTGAAC
GTGGGTGGCCACAGCTACCAGCTGGACTACTGCGAGCTGGCCGGCTTCCCCAAGACGCGCTAGGTGCGCTGGCCACCTCCACCAGCCGACGCCGACGCTA
AGCCTGTGCGACGACTACGAGGAGCAGACAGACGAATACTTCTTCGACCGGACCCGGCCGTCTTCCAGCTGGTCTACAATTTCTACCTGTCCGGGGTGTG
CTGGTGTCTGACGGGCTGTGTCCGCGCCGCTTCTGGAGGAGCTGGGCTACTGGGGCGTGGGCTCAAGTACACGCCACGCTGCTGCCCATCTGCTTCGAG
GAGCGGCGCAGCAGCTGAGCGAACGGCTCAAGATCCAGCAGAGCTGCGCGCAGGCGCAGGTCGAGGAGGCGGAGGAATCTTCCGCGACATGCGCTTC
TACGCCCCGACGCGCGCCGCTCTGGAACCTCATGGAGAAGCCATTCTCCTCGGTGGCCGCCAAGGCCATCGGGGTGGCCTCCAGCACCTTCGTGCTCGTC
TCCGTGGTGGCGCTGGCGCTCAACACCGTGGAGGAGATGCAGCAGCACTCGGGCAGGGCGAGGGCGGCCAGACCTGCGGCCCATCTGGAGCACGTGGAG
ATGCTGTGCATGGGCTTCTTACGCTCGAGTACCTGCTGCGCTAGCCTCCACGCCCGACCTGAGGCGCTTCGCGCGCAGCGCCCTCAACCTGGTGGACCTG
GTGGCCATCTGCGCTCTACCTTCAGCTGTGCTCGAGTGCTTACGGGCGAGGGCCACCAACGCGCCAGACGGTGGGCAGCGTGGGTAAAGTGGGTGAG
GTGTTGCGGCTCATGCGCTCATGCGCATCTTCCGATCCTCAAGCTGGCGCGCCACTCCACCGACTGCGTGCTTCGGCTTACGCTGCGCCAGTGCTAC
CAGCAGGTGGGTGCTGCTGCTCTTATCGCCATGGGCATCTTCACTTTCTCTGCGGCTGTCTACTCTGTGGAGCAGATGTGCCAGCACCAACTTCACT
ACCATCCCCACTCTGGTGGTGGGCGCGGTGAGCATCTCCACCGTGGGTACGGAGACATGTACCCAGAGACCCACCTGGGCAGGTTTTTGTCTTCTCTC
TGCATTGCTTTTGGGATCATTCTCAACGGGATGCCATTTCATCTCTACAACAAGTTTTCTGATTACTACAGCAAGCTGAAGGCTTATGAGTATACCACC
ATACGAGGGAGAGGGGAGAGGTGAATTCATGCAGAGAGCCAGAAAGAAGATAGCTGAGTGTGCTTGAAGCAACCCACAGCTACCCCAAGACAAGAG

AATTAG

[0272] 서열번호 13 - *CACNA2D4* cDNA, NM_172364.4

[0273] ATGGTCTGTGGCTGCTCTGCCCTCCTTCCCCTCCCCAACCCAGGCCACCATGCCTGCAACTCCCAACTTCCTCGAAACCCAGCTCCAGCAGCCGCTGG
ATTCCCCTCCAGCCAATGCCCGTGGCCTTGTGTGCAAGAAGACCTCGGCCCTCTGTGGCTGCTGTTCTAGGCACCTCCCTGTCCCTGCGTGGGGA
CAGGCCAAGATTCTCTGTGAAACAGTGAAGCTATGGGCTGACACCTTCGGCGGGGACCTGTATAACACTGTGACCAAATACTCAGGCTCTCTTGTGTCAG
AAGAAGTACAAGGATGTGGAGTCCAGTCTGAAGATCGAGGAGGTGGATGGCTTGGAGCTGGTGAGGAAGTTCTCAGAGGACATGGAGAACATGCTCGGAGG
AAAGTCGAGGCGGTCCAGAATCTGGTGAAGCTGCCGAGGAGGCCACCTGAACCACGAATTCAATGAATCCCTGGTGTTCGACTATTACAACTCGGTCTCTG
ATCAACGAGAGGGACGAGAAGGGCAACTTCGTGGAGCTGGGCGCGGAGTTCTCTCTGGAGTCCAATGCTCACTTCAGCAACCTGCGCGTGAACACCTCCATC
AGCAGCGTGCAGCTGCCACCAACGTGTACAACAAAGACCCAGATATTTTAAATGGAGTCTACATGTCTGAAGCCTTGAATGCTGTCTTCGTGGAGAACTTC
CAGAGAGACCAACGTTGACCTGGCAATATTTTGGCAGTGCAACTGGATTCTTCAGGATCTATCCAGGTATAAAATGGACACCTGATGAGAATGGAGTCATT
ACTTTTGACTGCCGAAACCGCGGTGTGATCTCAAGCTGCTACTTCTCCCAAGGACATAGTGATTTTGGTGGACGTGAGCGGCAGTATGAAGGGGCTGAGG
ATGACTATTGCCAAGCACACCATCACCACCATCTTGACACCCCTGGGGGAGAATGACTTCATTAATATCATAGCGTACAATGACTACGTCCATTACATCGAG
CCTTGTTTTAAAGGATCCTCGTCCAGGCGGACCGAGACAATCGAGAGCATTCAAACCTGCTGGTGGAGGAGTTGATGGTCAAAGGTGTGGGGGTCTGGGAC
CAAGCCTGAGAGAAGCCTTCCAGATCTGAAGCAGTTCCAAGAGGCCAAGCAAGGAAGCCTCTGCAACCAGGCCATCATGCTCATCAGCGACGGCGCGGTG
GAGGACTACGAGCCGTGTTTGAAGTATAACTGGCCAGACTGTAAGGTCCGAGTTTCTACTTACCTCATTGGGAGAGAAGTGTCTTTTGTGACCGCATG
AAGTGGATTGCATGAACAACAAAGGCTACTACACGAGATCTCAACGCTGGCGGACACCCAGGAGAACGTGATGGAATACCTGCACGTGCTCAGCCGCCCC
ATGGTCATCAACCACGACCACGACATCATCTGGACAGAGGCCTACATGGACAGCAAGCTCCTCAGCTCGCAGGCTCAGAGCCTGCACTGCTCACCCTGTG
GCCATGCCAGTCTTCAGCAAGAAGAACGAAACGCGATCCCATGGCATTCTCTGGGTGTGGTGGGCTCAGATGTGGCCCTGAGAGAGCTGATGAAGCTGGCG
CCCCGTACAAGCTTGGAGTGCACGGATACGCCTTCTGTAACACCAACAATGGCTACATCTCTCCCATCCGACCTCCGGCCCCGTACAGAGAGGGGGAAG
AAACTAAAACCCAAACCTAACTACAACAGTGTGGATCTCTCCGAAGTGGAGTGGGAAGACCAGGCTGAATCTCTGAGAACAGCCATGATCAATAGGGAACA
GGTACTCTCTCGATGGATGTGAAGGTTCGATGGATAAAGGGAAGCGAGTTCTTTCTGACCAATGACTACTTCTTCACGGACATCAGCGACACCCCTTTC
AGTTTGGGGTGGTGTCTGCCGGGGCCACGGAGAATACATCTTCTGGGGAACACGTCTGTGGAAGAAGGCCTGCATGACTTGCTTACCAGACCTGGCC
CTGGCCGGTACTGGATCTACTGCATCAGATATTGACCCAGACCACCGGAAGCTCAGCCAGCTAGAGGCCATGATCCGCTTCTCACCAGGAAGGACCCA
GACCTGGAGTGTGACGAGGAGCTGGTCCGGAGGTGCTGTTTACGCGGTGGTGACAGCCCCATGGAAGCCTACTGGACAGCGCTGGCCCTCAACATGTCC
GAGGAGTCTGAACACGTGGTGGACATGGCCTTCTGGGCACCCGGGTGGCCTCCTGAGAAGCAGCTTGTTCGTGGGTCCGAGAAGGTCTCCGACAGGAAG
TTCCTGACACCTGAGGACGAGGCCAGCGTGTACCCCTGGACCGCTTCCCGCTGTGGTACCGCCAGGCCCTCAGAGCATCTGCTGGCAGCTTCGTCTTCAAC
CTCCGTGGGCAGAAAGACAGAAAGTGCGGTGAACCCATGGTGGTGACGGAAGCACAGCTGTGGCGGTGACCGTGGACAAGAGGACAGCCATTGCTGCA
GCCGCGGGCTCCAAATGAAGCTGGAATTCCTCCAGCGCAAAATCTGGGCGGCAACGCGGACGTGCAGCAGTGTGGATGGGCCGTGCACACAGAGCTGCGAG
GACAGTGATCTGGACTGCTTCGTATCGACAACAACGGGTTCATTCTGATCTCCAAGAGGTCCCGAGAGACGGGAAGATTTCTGGGGGAGGTGGATGGTGT
GTCCTGACCCAGCTGCTCAGCATGGGGGTGTTTCCAGCAAGTGACTATGTATGACTATCAGGCCATGTGCAAAACCTCGAGTACCACCACAGTGCAGCCAG
CCCCTGGTACGCCAATTTCTGCCTTCTTGACGGCGACAGGTGGCTGCTGCAGGAGCTGGTGTCTTCTGCTGGAGTGGAGTGTCTGGGGCTCCTGGTAC
GACAGAGGGGCGGAGGCCAAAAGTGTCTTCCATCACTCCACAAAACAAGAAGCAGGACCCGCTGCAGCCCTGCGACACGGAGTACCCCGTGTCTGTATC
CAGCCGGCCATCCGGGAGGCCAACGGGATCGTGGAGTGGCGGCCCTGCCAGAAGGTATTTGTGGTGCAGCAGATTCCCAACAGTAACCTCTCTCTCTGGTG
ACAGACCCACCTGTGACTGCAGCATCTTCCACCAGTGTGCAGGAGGCGACAGAAGTCAAATATAATGCCTCTGTCAAATGTGACCGGATGCGCTCCAG
AAGTCCGCGCGGACAGACTCTGCCACGCTTCCATCCAGAGGAGAATGCCAGGACTGCGGCGGCGCTCGGACACCTCAGCTCGCGGCCCTACTC
CTGCTGCCTGTGTGTGCTGGGGCTACTGCCCCAACTCTCGCGGTGA

[0274] 서열번호 14 - *CNGB3* cDNA, NM_019098.4

[0275] ATGTTTAAATCGCTGACAAAAGTCAACAAGGTGAAGCCTATAGGAGAGAACAATGAGAATGAACAAAGTTCTCGTCGGAATGAAGAAGGCTCTCACCCAAGT
AATCAGTCTCAGCAAACACAGCACAGGAAGAAAACAAAGGTGAAGAGAAATCTCTCAAAACCAAGTCAACTCCAGTCACGCTGAAGAGCCACACACCAAC
ATACAAGACAACTCTCCAAGAAAAATTCCTCTGGAGATCTGACCACAAACCTGACCTCAAAATGCAGCAGAACCAACTGGAACAGTGCAGAGCAGAAAG
GAAATGGACCCCGGGAAGAAGTCCAAACAGCCCAAAAACAACCGCTGCAGCTCCTGTTATAAATGAGTATGCCGATGCCAGCTACACAACCTGGTG
AAAAGAATGCGTCAAAGAACAGCCCTTACAAGAAAAAGTTGGTAGAGGGAGATCTCTCCTACCCGAAGCCAGCCCAAACTGCAAGCCACGGCTGTA
CCACCAGTAAAAGAAAGCGATGATAAGCCAACAGAACATTACTACAGGCTGTTGTGGTTCAAAGTCAAAAAGATGCCTTTAACAGAGTACTTAAAGCGAATT
AAACTTCAAACAGCATAGATTACATACAGATCGACTCTATCTCTGTGGCTCTTGTGCTACTCTTGCCTATAACTGGAAGTGTGGTTTATACCACTG
CGCCTCGTCTTCCATATCAAACCGCAGACAACATACACTACTGGCTTATTGCGGACATCATATGTGATATCATCTACCTTTATGATATGCTATTATCCAG
CCCAGACTCCAGTTTGAAGAGGAGGAGACATAATAGTGGATTCAAATGAGCTAAGGAAACACTACAGGACTTCTCAAAATTTCAAGTGGATGTGCGATCA
ATAATACCATTGTATTTGCTACCTCTTCTTGGGTTTAAATCCAATGTTTAGAGCAAAATAGGATGTTAAAGTACACTTCATTTTTGAATTTAATCATCAC
CTAGAGTCTATAATGGACAAAGCATATATCTACAGAGTTATTGGAACAACCTGGATACTTGTGTTTATTCTGCACATTAATGCCTGTGTTTATTACTGGGCT
TCAAACATGAAGGAATTGGCACTACTAGATGGGTGTATGATGGGAAGGAAACGAGTATCTGAGATGTTATTATGGGCAGTTCGAACTTTAATTACCATT

GGTGGCCTACCAGAACCACAACTTTATTTGAAATTGTTTTTCAACTCTTGAATTTTTTTCTGGAGTTTTTGTTCTCCAGTTTAATTGGTCAGATGAGA
GATGTGATTGGAGCAGCTACAGCCAATCAGAACTACTTCCGCGCTGCATGGATGACACCATTGCCTACATGAACAATTACTCCATTCTAACTTGTGCAA
AAGCGAGTTCGGACTTGGTATGAATATACATGGGACTCTCAAAGAATGCTAGATGAGTCTGATTTGCTTAAGACCCTACCAACTACGGTCCAGTTAGCCCTC
GCCATTGATGTGAACTTCAGCATCATCAGCAAAGTCGACTTGTTCAGGGTTGTGATACACAGATGATTTATGACATGTTGCTAAGATTGAAATCCGTTCTC
TATTTGCCTGGTGACTTTGTCTGCAAAAAGGAGAAATTTGGCAAGGAAATGTATATCATCAAGCATGGAGAAGTCCAAGTTCTTGGAGGCCCTGATGGTACT
AAAGTCTCGTTACTCTGAAAGCTGGGTGCGTGTGTTGGAGAAATCAGCCTTCTAGCAGCAGGAGGAGGAAACCGTCGAACTGCCAATGTGGTGGCCACCGG
TTTGCAATCTTTAACTCTAGACAAAAGACCTCCAAGAAATCTAGTGCATTATCCAGATTCTGAAAGGATCCTCATGAAGAAAGCCAGAGTGCTTTTA
AAGCAGAAGGCTAAGACCGCAGAAGCAACCCCTCCAAGAAAAGATCTTGCCCTCCTCTCCACCAGAAAGAGACACCCAACTGTTTAACTCTCCTA
GGAGGCACAGGAAAAGCAAGTCTTGCAAGACTACTCAAATTGAAGCGAGAGCAAGCAGCTCAGAAGAAAAGAAATTTCTGAAGGAGGAGAGGAAGAAGGAAAA
GAAAAAGAAGATAAAACAAAAGAAAATGAAGATAAAACAAAAGAAAATGAAGATAAAGGAAAAGAAAATGAAGATAAAGATAAAGGAAAGAGAGCCAGAAGAG
AAGCCACTGGACAGACCTGAATGTACAGCAAGTCCATTGCAGTGGAGGAAGAACCCCACTCAGTTAGAAGGACAGTTTACCAGAGGGACTTCTCGTCAA
TCACTCATTATCAGCATGGCTCCTTCTGCTGAGGGCGGAGAAGAGGTTCTTACTATTGAAGTCAAAGAAAAGGCTAAGCAATAA

[0276] 서열번호 15 - hG1.7(M8) 구조체, 1.2 kb M/L 읍신 LCR 단편, 500 bp M 읍신 단편, 이탤릭체로 된 UTR, 밑줄
그어진 M8 돌연변이

[0277] TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTGGAG
ACGGATGGTGGTACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGTCAAAGGCAAAAT
GGCCAAATGGTTCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGGCTC
TCCCGCTGGAGTCAATTTAGGAGTAGTCGATTAGAGACAAGTCCAACATCTAATCTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTC
CGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCTGGCTTGGGTCCTCTGGCCTTTCCCAAGGGGCCCTTTCTTCTGGGGCTTTCTTGGGCGCCAC
TGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCACCCCTCACCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTGTG
GGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACAGTGCCCCACAGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAAATGGGACTT
GATCTTCTGTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGTGAAGGTGCAAGCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCACCTTGGCCACCTCCACTCTCCTT
CCTGGGATGTGGGGCTGGCACAGTGTGGCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCAATAGCGTAATCTGGACAAGGGCAGACAGGGCAGC
GGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGTGGGGCTTCCCCAGACACCCACTCCTCCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA
AGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCTTGGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTC
GCCCTGTTCAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGTGGCCAGCCATCCACCCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAG
GAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTGGATCACAGGTATTTGCCACTAAGCCAGCTAATGTGTTTTTATTAGTAGAAACGGGGTTTACCATGTTAGT
CAGGCTGGTGGGAACTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCTTGGCCTCCCAAGTGTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTT
AGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCTCCAGATTCAAGCGATTCTCTGCCTCGACC
TCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAATCCCTCTGAGCCGCCCCGGGGCTCGCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAA
GTCCCAGGCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTGGGAGCTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCC
TCAGGTGACGCCACCACTAGAGCTGCGGTGCGGGACAGGGCTTTCATAGCC

[0278] 서열번호 16 - M8 mutation

[0279] TCTAGA

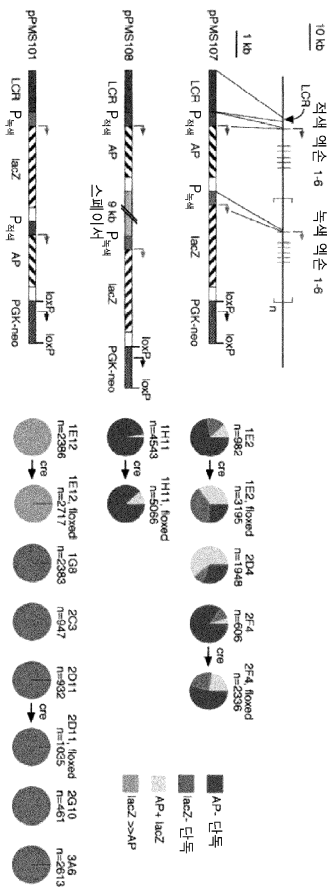
[0280] 서열번호 17 - 서열번호 2 - 2.0 kb M 읍신 프로모터 단편, 밑줄 그어진 서열번호 3의 500 bp 단편, 이탤릭체로
된 UTR, 밑줄 그어진 M8 돌연변이

[0281] TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTACTCAGGATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCAGCAAGTAGAGGCTGCA
GTGACCTGTGACTGTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGACCTTGTCTCAAAAAAAGAGCGGGGGGGGGGGCCGGGCCGGCGTGGTGG
CTCACAGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAAGCCAAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTGAGGAGTTTGGAGCCATCATGGTCAACACTGCGAAACACTGTCCCT
ACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACCTGTAATCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGAGACGGAGG
TTGCAGTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACTGACAAGAGTGAGATTGTCTCAAAAAAAGTAATCACTAGAAAAAGAGCTACAT
ATGTACATAACATCCAAATAACCAAGAGGAGAAAAAATGGGACTTGATTAATCAAAAAAAGAAAAAGAAAGAAAGGGGGAGAAAAATAAACAA
GGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCACTTTGGAAGCCAAGGTGGGTGGATCTTGGAGTCAAGAGGTAAGACCAGCCTGGGCAACATGG
CGAAACCCGCTCTATTAATAAAAAAATTAATACAACAATTATCCTGGAGTGGTGGTGACACCTGTAGTCCAGCTACCCAGGACGCTGAGACGGGAGGA
TCGCTTGATCCCGGGGATGTGAGGCTGCCGTGATCGCACCCTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCATCTCAAAAAATAAATAAATAAAGC
AAACAAGAAAAAAGGCTTGAACATATCTGATAGATAAAGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAATCAGTAACTAAGAGCAATAACCCA
ATATAAGACATTAAGGGTAGCCACGACATCTCAGCAGCAGAAAAACAAAGACAGTAAACGTATAATAAACATGTAATTGCAAGGTGATCCGGGAATA
GTAAGCGAAAGCAACAATTAATACTATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTAAGAGCCTAACAATGTCCAGGGCTGGCGAGAATGTGGCAGAAGG

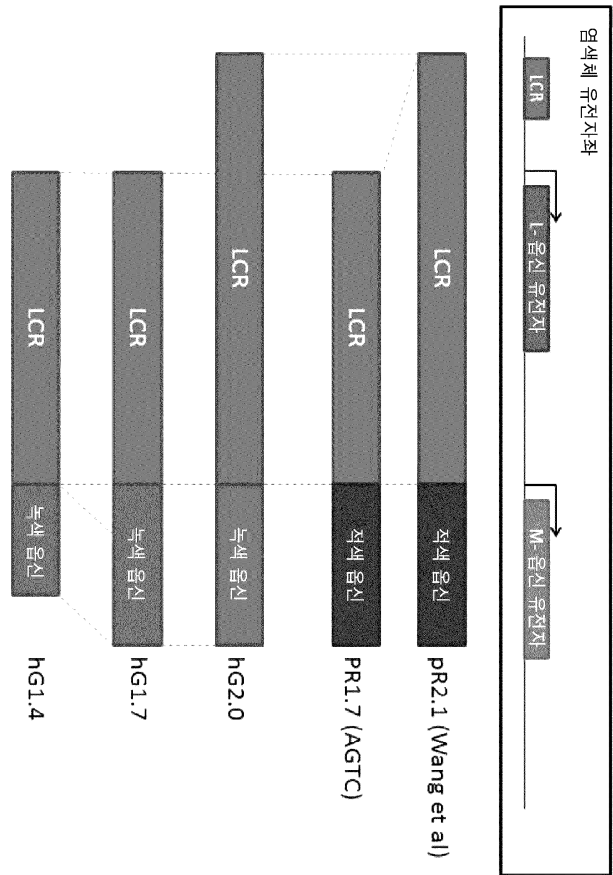
TGATGTCACATACCTGCAAGTGGGAATCTAAACAGATTACAGGGTTTTGGTTTTTTTTTAATCGCAATTAGGTGGCCTGTTAAATTTTTTTCTTGAGACAG
AGTTTTGCTCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCTCGATCTTGGCTCACCGCAACCTCGACCTCCCAGGTACAAGCGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCA
AGTAGCTGGGAGTACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTTAGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCT
GACCTCAGGAGATCTACCCGCCCTTGGCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTT
GCCCAGGCTAGAGTTTCTAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACA
GGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCAATTAAGAG
ATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGACCCGTGACCCTCAGGTGACGCACCACTCTAG
AGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

도면

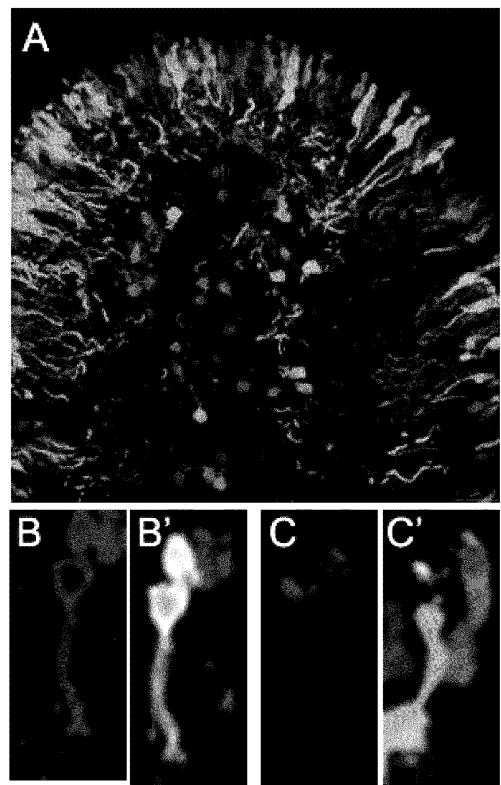
도면1



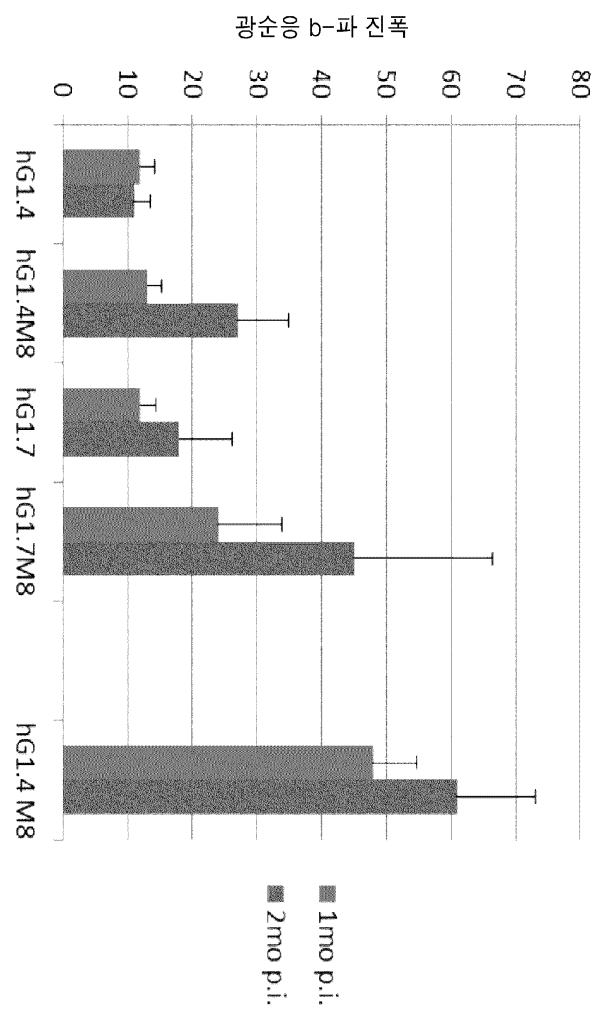
도면2



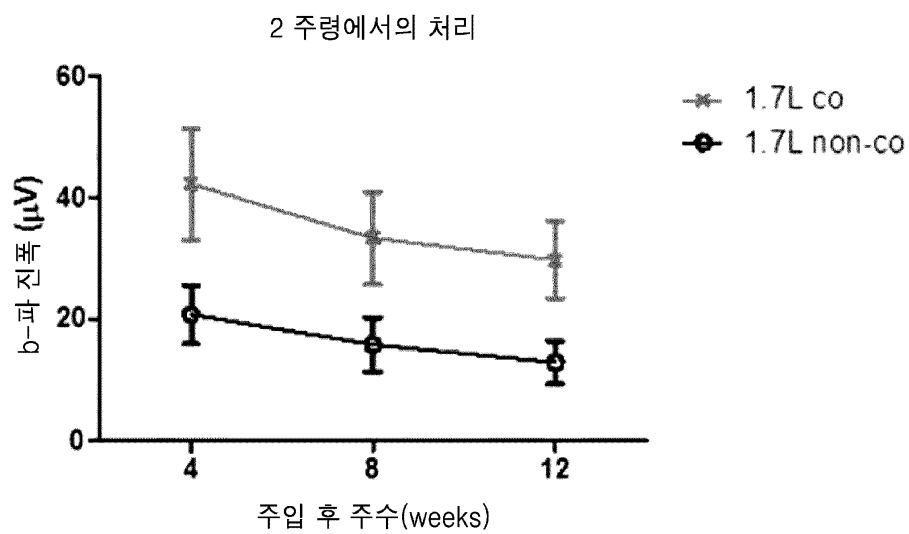
도면3



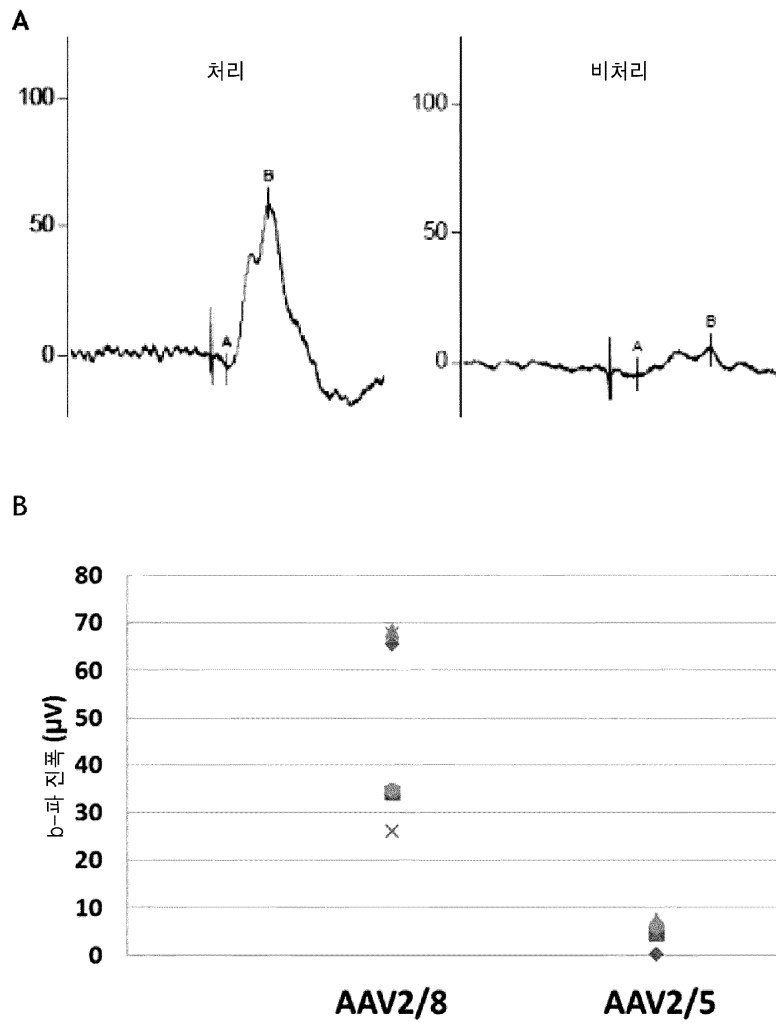
도면4



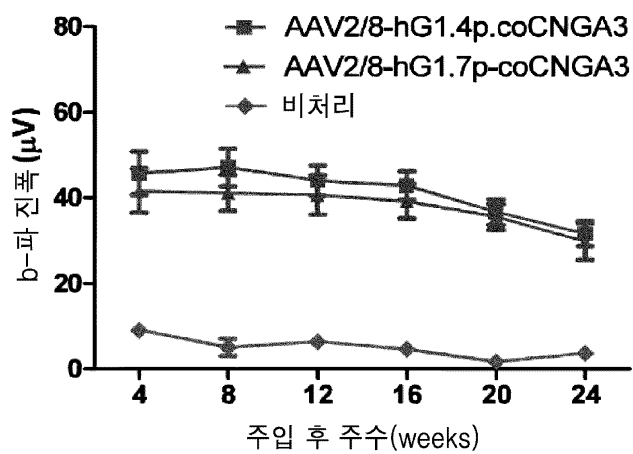
도면5



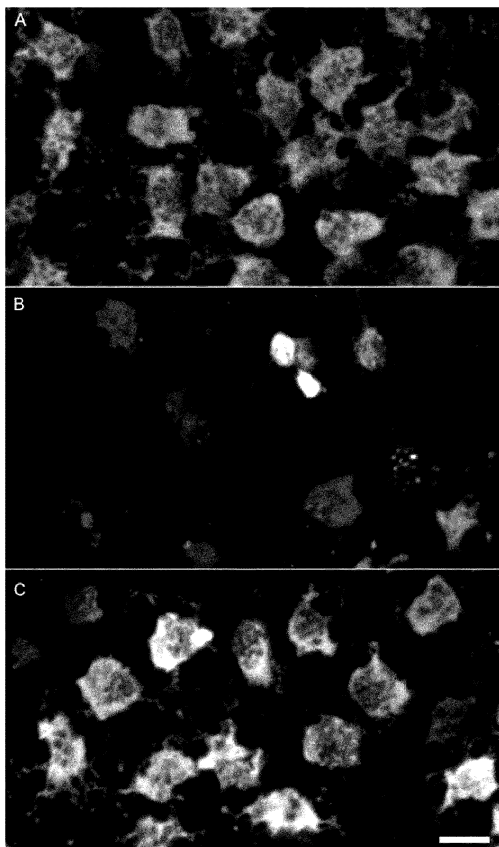
도면6



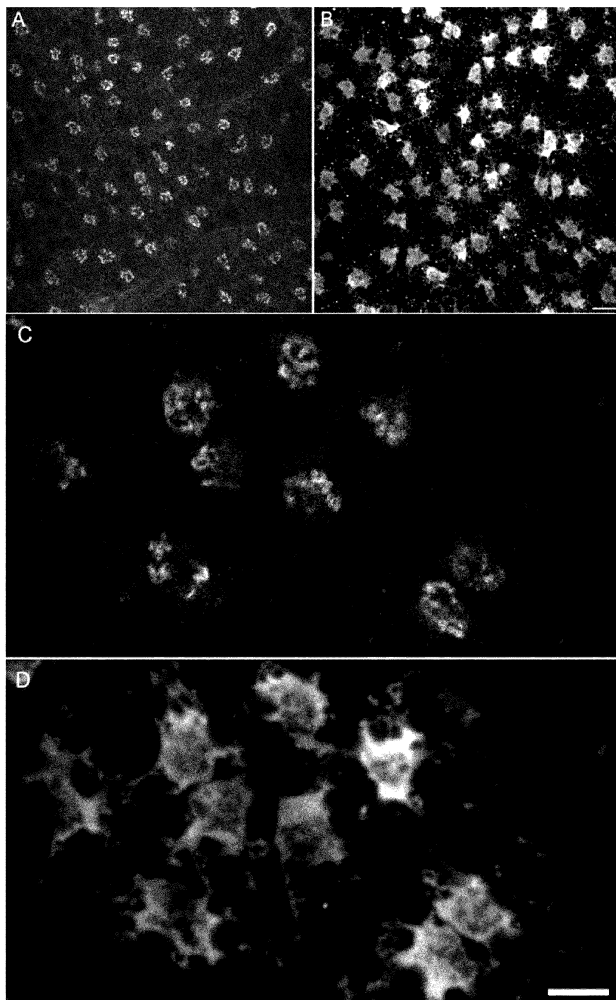
도면7



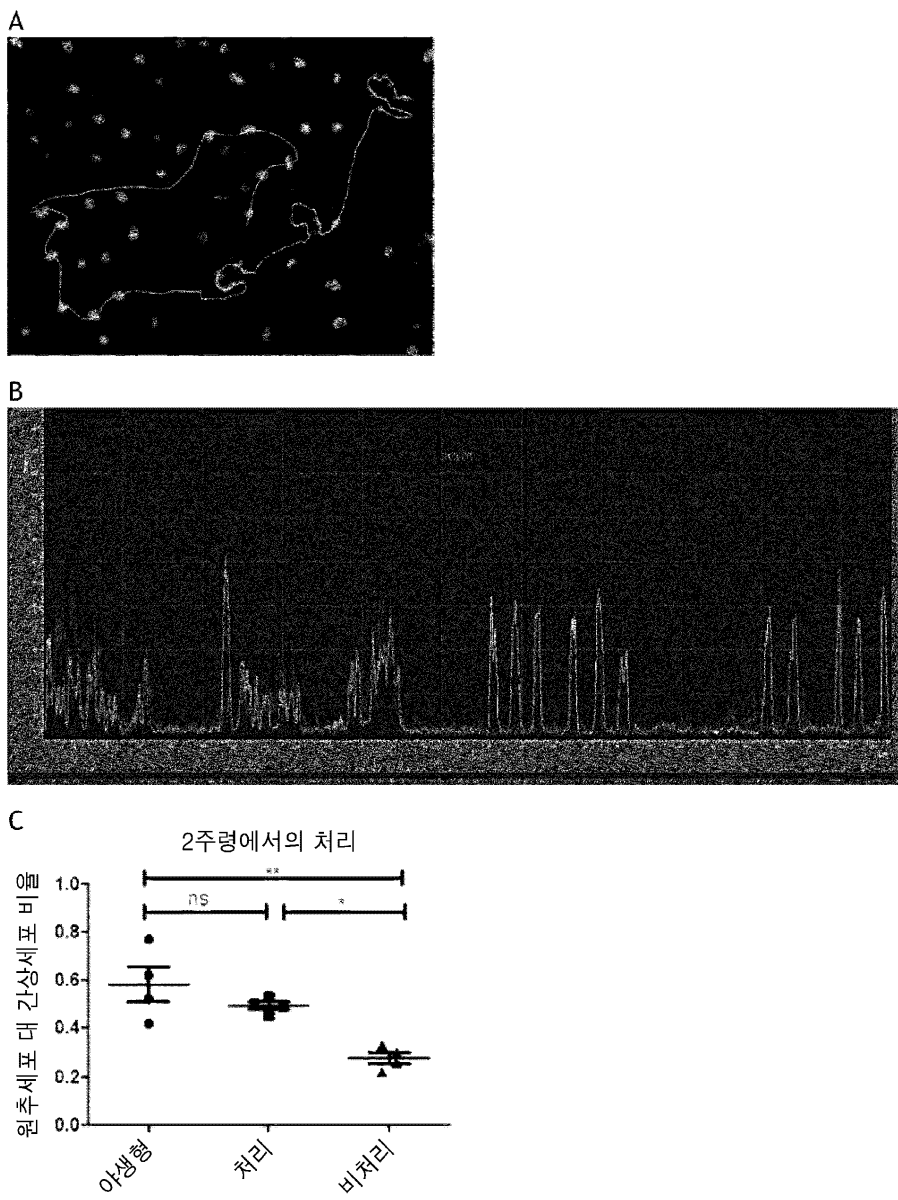
도면8



도면9

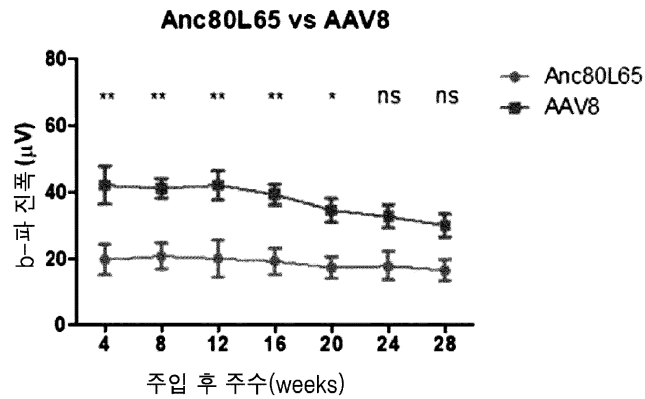


도면10

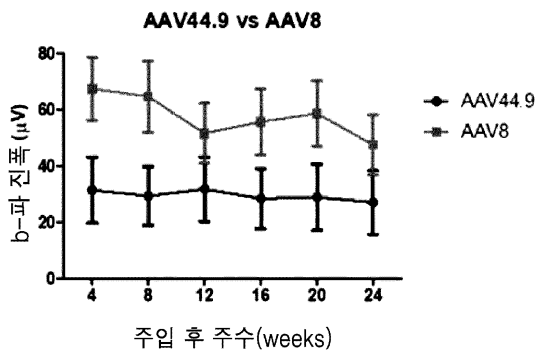


도면11

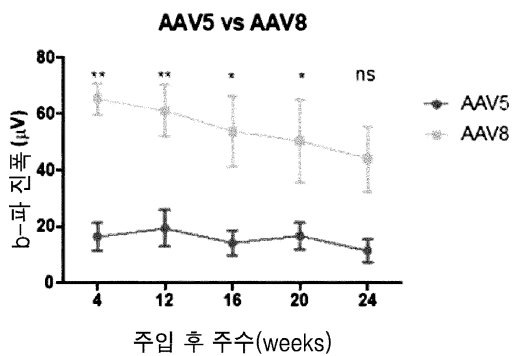
A



B



C



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> UCL BUSINESS PLC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING RETINAL DISORDERS

<130> N409521W0

<150> GB 1800546.2

<151> 2018-01-12

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1253

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.2 kb fragment of the M/L opsin Locus Control Region (LCR)

<400> 1

```

taggaataga agggtaggtg caggaggctg aggggtgggg aaagggcatg ggtgtttcat      60
gaggacagag ctccgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tggtgactgg      120

actatacact tacacacggt agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat      180
ctttttaaag tgtcaaaggc aaatggccaa atggttcctt gtcctatagc ttagcagcc      240
atcggtctgtt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagcccccat aactcctaata      300
cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa      360
tcttccaccc tggccagggc ccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag      420
agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccaggggccc      480
tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgctccgct cctctcccc catccaccc      540

cctcaccccc tegtcttca tatectctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc      600
tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac      660
aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt      720
ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cgtgaaggt gcagaacct cgcctttcc      780
aggcctctc ccacctctgc cactccact ctcttctctg ggatgtgggg gctggcacac      840
gtgtggccca gggcatttgt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca      900
agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc      960

ccagacaccc cactctctct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa      1020
agggcttcca aatagcatgg tggccttgga tgcccaggga agcctcagag ttgcttatct      1080
ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc      1140
cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atccaccct cagaagggac      1200
ccggtggggc aggtgatctc agaggaggt cacttctggg tctcacattc ttg      1253

```

<210> 2

<211> 1970

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2.0 kb M opsin promoter fragment, with no M8 sequence

<400> 2

taaaaagcaa gtcttgccag ggcagtgggtg tgcacctgtg gteccagcta ctcaggatgc	60
tgaggcagga ggattacttg tgcccagcaa gtagaggctg cagtgcactg tgactgtgct	120
actgccctcc aacctgggtg acagagttag accttgcttc aaaaaaaaaa gagcggggggg	180
ggggggccgg gccgggcgtg gtggctcaca gctgtaatcc cagcactttg ggaagccaag	240
gcgggtggat cacttgaggt caggagtttg agaccatcat ggtcaacact gcgaaacact	300
gtccctacta aaaatacaaa aattagccgg gcatggtggc acacacctgt aatcccagct	360
actggggagg ctgaggcagg agaattgctt gagccgggga gacggaggtt gcagtgagcc	420
gagactgcgc cactgcactc cagcctgact gacaagagtg agattgtctc aaaaaaaaaa	480
aaaaagtaat cactagaaaa gaagctacat atgtacataa catccaaata accaagagga	540
gaaaaaatg ggacttgatt aatcaaaaca aaaacaaaaa agaaagaaag aaagggggag	600
aaaataaaac aagggtggg tgtgtctggct catgcctgta atcccagcac ttggaagcc	660
aaggtgggtg gatctcttga gctcaggagg tcaagaccag cctgggcaac atggcgaaac	720
cccgctctcta ttaaaaaaaaa aattaataca acaattatcc tggagtgggtg gtgcacacct	780
gtagtcccag ctaccagga cgctgagacg ggaggatcgc ttgatcccgg ggatgtcgag	840
gctgccgtga tcgcaccact gccctccagc cagggtggca gactgagacc ccatctcaaa	900
aaataataaa ataaaagcaa acaagaaaaa aaaaggcttg aaacatatct gatagataaa	960
gggctaatac acacaatata taaagaactg caaatcagta aactaagagc aaataaccca	1020
atataaagac attaaagggt agccacggac atctcagacg acgaaaaaca aaagacagta	1080
aacgtataat aaaacatgta attgcaaggt gatccgggaa tagtaagcga aaagcaacaa	1140
ttaaatacta ttttctcatc caccagaacg ccaaaaatta aaaagcctaa caatgtccag	1200
ggctggcgag aatgtggcag aaggatggtt cacataccct gcaagtggga atctaacag	1260
attcagggtt ttggtttttt tttaatcgca attaggtggc ctgttaaatt tttttcttg	1320
agacagagtt ttgctcttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggctcgatct tggctcaccg	1380
caacctgac ctcccagga caagcgattc tctgtctca gcctcccaag tagctgggag	1440
tacaggtatt tgccactaag cccagctaatt tgttttttat ttagtagaaa cgggggtttca	1500
ccatgttagt caggctggtc gggaactcct gacctcagga gatctaccg ccttggcctc	1560
ccaaagtgtc gggattacag gcgtgtgcca ctgtgcccag ccactttttt ttagacagag	1620

tcttggctctg ttgccagcgc tagagttcag tggcgccatc tcagctcact gcaacctccg 1680

cctcccagat tcaagcgatt ctctgcctc gacctcccag tagctgggat tacaggtttc 1740

cagcaaatcc ctctgagccg cccccggggg ctgcctcag gagcaaggaa gcaaggggtg 1800

ggaggaggag gtctaagtc caggcccaat taagagatca gatggtgtag gatttgggag 1860

cttttaaggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac cgtgaccctc 1920

aggtgacgca ccaggggcgg ctgccgtcgg ggacagggtt tccatagcc 1970

<210> 3

<211> 529

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 500 bp M opsin fragment, with M8 mutation

<400> 3

acaggtatctt gccactaagc ccagctaatt gttttttatt tagtagaaac ggggtttcac 60

catgttagtc aggttggtcg ggaactcctg acctcaggag atctaccgc cttggcctec 120

caaagtgtcg ggattacagg cgtgtgccac tgtgccagc cacttttttt tagacagagt 180

cttggctctg tggccaggt agagttcagt ggcgccatct cagctcactg caacctccgc 240

ctcccagatt caagcgattc tctgcctcg acctcccagt agctgggatt acaggtttcc 300

agcaaatccc tctgagccg cccccggggc tgcctcagg agcaaggaag caaggggtgg 360

gaggaggagg tctaagtcac aggcccaatt aagagatcag atggtgtagg atttgggagc 420

ttttaaggtg aagaggcccc ggctgatccc actggccggt ataaagcacc gtgacctca 480

ggtgacgcac catctagagc tgccgtcggg gacagggtt tccatagcc 529

<210> 4

<211> 1782

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant of hG1.7 construct, 1.2 kb M/L opsin LCR fragment, 500 bp

M opsin fragment, with M8 mutation

<400> 4

taggaataga aggttgggtg caggaggctg aggggtgggg aaaggcatg ggtgtttcat 60

gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tgggtactgg 120

actatacact tacacacggt agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat 180

ctttttaaag tgicaaaggc aaatggccaa atggttcctt gtcctatagc ttagcagacc 240
 atcggctgtt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagcccccat aactcctaata 300
 cggctctccc gcgtggagtc atttaggagtc agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa 360
 tcttccaccc tggccagggc cccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag 420
 agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccagggggccc 480
 tctttccttg gggctttctt gggcgccac tgcctccgct cctctccccc catccacccc 540
 cctcaccccc tegtcttca tatecttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc 600

 tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac 660
 aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt 720
 ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cggatgaagtc gcagaacctc ccgcctttcc 780
 aggcctcttc ccacctctgc cacctccact ctcttctctg ggatgtgggg gctggcacac 840
 gtgtggccca gggcatttgt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca 900
 agggcagaca gggcgagcgg agggccagct cgggggctca ggcaaggctg ggggcttccc 960
 ccagacaccc cactctctct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa 1020

 agggcttcca aatagcatgg tggccttggg tggccaggga agcctcagag ttgcttatct 1080
 ccctctagac agaaggggaa tctcggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc 1140
 cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atccaccct cagaagggac 1200
 ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttgacaggta 1260
 ttgtccacta agcccagcta attgtttttt atttagtaga aacgggggtt caccatgtta 1320
 gtcaggctgg tcgggaactc ctgacctcag gagatctacc cgccttggcc tcccaaagtg 1380
 ctgggattac aggcgtgtgc cactgtgccc agccactttt ttttagacag agtcttggtc 1440

 tgttggccag gctagagttc agtggcgcca tctcagctca ctgcaacctc cgcctcccag 1500
 attcaagcga ttctctgcc tcgacctccc agtagctggg attacaggtt tccagcaaat 1560
 ccctctgagc cggcccccgg ggctcgctc aggagcaagg aagcaagggg tgggaggagg 1620
 aggtctaagt cccaggccca attaaagat cagatggtgt aggatitggg agcttttaag 1680
 gtgaagaggc cgggctgat cccactggcc ggtataaagc accgtgacct tcaggtagacg 1740
 caccatctag agctgccgtc ggggacaggg ctttccatag cc 1782

 <210> 5
 <211> 247
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 200 bp M opsin fragment, with M8 mutation

<400> 5

gatcgattac aggtttccag caaatccctc tgagccgcc cgggggctc gcctcaggag	60
caaggaagca aggggtggga ggaggaggtc taagtcccag gcccaattaa gagatcagat	120
ggtgtaggat ttgggagctt ttaagtgaa gagggccggg ctgatccac tggccggtat	180
aaagcacctg gaccctcagg tgacgcacca tctagagctg ccgtcgggga cagggtttc	240
catagcc	247

<210> 6

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hG1.4 construct: 1.2 kb M/L opsin LCR fragment, 200bp M opsin fragment, with M8 mutation

<400> 6

taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaaggcatg ggtgtttcat	60
gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtttg agacggatgg tggtgactgg	120
actatacact tacacacgtt agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat	180
cttttaaaag tgicaaaggc aaatggccaa atggttcctt gtcctatagc ttagcagcc	240
atcggtgtt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagccccat aactcctaat	300
cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa	360

tcttccacc tggccagggc cccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag	420
agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccaggggccc	480
tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgcctccgct cctctcccc catccaccc	540
cctcaccccc tcgtttctta tatecttctc tagtgcctcc tccactttca tccaccctc	600
tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac	660
aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt	720
ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cggatgaagg gcagaacctt ccgcctttcc	780

aggcctcctc ccacctctgc cactccact ctccttctg ggatgtgggg gctggcacac	840
gtgtggccca gggcattggt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca	900
agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc	960
ccagacaccc cactcctcct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgtttctaa	1020
agggcttcca aatagcatgg tggccttggg tgcccaggga agcctcagag ttgcttatct	1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc 1140
cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atcccaccct cagaagggac 1200

ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttggatcgat 1260
tacaggtttc cagcaaatcc ctctgagccg cccccggggg ctgcctcag gagcaaggaa 1320
gcaaggggtg ggaggaggag gtctaagtcc caggcccaat taagagatca gatggtgtag 1380
gatttgggag cttttaaggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac 1440
cgtgaccctc aggtgacgca ccatctagag ctgccgtcgg ggacagggct ttccatagcc 1500

<210> 7
<211> 2085
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> non-codon optimised CNGA3 cDNA
<400> 7

atggccaaga tcaacaccca atactccac ccctccagga cccacctcaa ggtaaagacc 60

tcagaccgag atctcaatcg cgctgaaaat ggccctcagca gagcccactc gtcaagttag 120
gagacatcgt cagtgtctga gccggggatc gccatggaga ccagaggact ggctgactcc 180
gggcagggct ctttcaccgg ccaggggatc gccaggctgt cgcgcctcat cttcttctgt 240
cgcaggtggg ctgccaggca tgtgcaccac caggaccagg gaccggactc ttttctgat 300
cgtttccgtg gagccgagct taaggagggtg tccagccaag aaagcaatgc ccaggcaaat 360
gtgggcagcc aggagccagc agacagaggg agaagcgctt ggcccctggc caaatgcaac 420
actaacacca gcaacaacac ggaggaggag aagaagacga aaaagaagga tgcgatcgtg 480

gtggaccgt ccagcaacct gtactaccgc tggctgaccg ccatcgccct gcctgtcttc 540
tataactggt atctgcttat ttgcagggcc tgtttcgatg agctgcagtc cgagtacctg 600
atgtgtggc tggctcctga ctactcggca gatgtcctgt atgtcttgga tgtgcttgta 660
cgagctcgga caggttttct cgagcaaggc ttaatggtca gtgatacaca caggctgtgg 720
cagcattaca agacgaccac gcagttcaag ctggatgtgt tgtccctggt cccaccgac 780
ctggcttact taaaggtggg cacaactac ccagaagtga ggttcaaccg cctactgaag 840
ttttccggc tctttgaatt ctttgaccgc acagagacaa ggaccaacta cccaatatg 900

ttcaggattg ggaacttggc cttgtacatt ctcatcatca tccactggaa tgctgcac 960
tactttgcca ttccaagtt cattggtttt gggacagact cctgggtcta cccaaacac 1020
tcaatcccag agcatgggag cctctccagg aagtacattt acagtctcta ctggtccacc 1080

ttgaccctta ccaccattgg tgagacccca ccccccgtga aagatgagga gtatctcttt 1140
gtggtcgtag acttcttggg ggggtgttctg atttttgccca ccattgtggg caatgtgggc 1200
tccatgatct cgaatatgaa tgcctcacgg gcagagtcc aggccaagat tgattccatc 1260
aagcagtaca tgcagttccg caaggtcacc aaggacttgg agacgcgggt tatccggtgg 1320

tttgactacc tgtgggccaa caagaagacg gtggatgaga aggaggtgct caagagcctc 1380
ccagacaagc tgaaggtga gatcgccatc aacgtgcacc tggacacgct gaagaaggtt 1440
cgcatcttcc aggactgtga ggcagggtcg ctggtggagc tgggtctgaa gctgcgaccc 1500
actgtgttca gccctgggga ttatatctgc aagaaggag atattgggaa ggagatgtac 1560
atcatcaacg agggcaagct ggccgtggtg gctgatgatg gggtcaccca gttcgtggtc 1620
ctcagcgatg gcagctactt cggggagatc agcattctga acatcaaggg gagcaagtcg 1680
gggaaccgca ggacggccaa catccgcagc attggctact cagacctgtt ctgcctctca 1740

aaggacgatc tcatggaggc cctcaccgag taccgccgaag ccaagaaggc cctggaggag 1800
aaaggacggc agatcctgat gaaagacaac ctgatcgatg aggagctggc cagggcgggc 1860
gcggacccca aggacctga ggagaaagtg gacagctgg ggtcctccct ggacaccctg 1920
cagaccaggt ttgcacgct cctggctgag tacaacgcca ccagatgaa gatgaagcag 1980
cgtctcagcc aactggaaag ccaggtgaag ggtggtgggg acaagcccct ggctgatggg 2040
gaagtccccg gggatgctac aaaaacagag gacaaacaac agtga 2085

<210> 8

<211> 2085

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon-optimised CNGA3 cDNA

<400> 8

atggcaaaaa tcaataccca gtacagccac ccttcacgaa ctcacctgaa agtcaaaaca 60
agcgatagag acctgaacag agccgagaac ggcctgtcca gggccacag ctctctgag 120
gaaactagtt cagtgtctga gcctggaatc gctatggaga ccagagggtt ggctgactct 180
ggccaaggaa gtttcacagg gcagggcac gccaggtgtg ctagactgat ttttctgctg 240
aggagatggg ccgctaggca tgtgcacat caggaccagg gaccgatag tttccctgac 300
aggttcaggg gggccgaact gaaggaggtc agtcccagg aatctaagc acaggccaat 360

gtgggcagtc aggagccgc tgatagagga cggctccgat ggctctggc caagtgaac 420
actaatacct ctaacaatc agaggaagag aagaaaacta agaaaagga tgccatcgtg 480

gtcgaccctt ctagtaacct gtactatagg tggctgacag ctatcgact gccagtgttc 540
tacaattggt atctgctgat ttgcagagct tgttttgacg aactgcagag tgagtatctg 600
atgctgtggc tgggtgctgga ttactcagca gacgtgctgt atgtgctgga tgtcctggtg 660
cgcgacgaa ctgggttcct ggagcagggc ctgatggtga gcgacaccaa cagactgtgg 720
cagcactaca aaaccacaac tcagtttaag ctggatgtcc tgtccctggt gccaacccac 780

ctggcctacc tgaaagtcgg cacaactat cccgaggtgc ggttcaatcg cctgctgaag 840
ttctctcggc tgtttgagtt ctctgatagg acagagacta gaaccaacta cccaatatg 900
ttccgcatcg gcaacctggt gctgtatatt ctgatcatta tccactggaa tgcctgtatc 960
tactttgcaa tcagcaagtt cattggattt gggaccgaca gctgggtgta tccaaacatt 1020
tccatccccg aacatggacg actgagcagg aagtacatct attcactgta ctggagcaca 1080
ctgactctga ccacaattgg ggagaccccc cctccagtga aggatgaaga gtacctgttc 1140
gtggtcgtgg actttctggt cggcgtgctg atcttcgcaa caattgtcgg caatgtggga 1200

agtatgatct caaacatgaa tgcctcacga gctgagttcc aggctaaaat tgacagcatc 1260
aagcagtata tgcagtttag aaaagtcact aaggatctgg agaccagagt gatccggtgg 1320
tttgactacc tgtgggccaa caaaaagaca gtcgatgaaa aagaggtgct gaagagcctg 1380
cccgacaaac tgaaggcaga gattgccatc aatgtccatc tggatactct gaaaaaggtg 1440
cggatcttcc aggactgcga agcaggactg ctggtcgagc tgggtgctgaa gctgcgcct 1500
accgtgttta gcccaggcga ttatatctgt aaaaaggggg acattggcaa agaaatgtac 1560
attatcaacg aggggaagct ggctgtcgtg gcagacgatg gcgtgacca gtctgtcgtg 1620

ctgagcgatg gcagctatct tggggaaatt tccatcctga atatcaaagg ctccaagtct 1680
ggaaaccggc gcacagctaa tattcgggtcc atcgatatt ctgacctgtt ctgcctgtct 1740
aaggacgatc tgatggaggc actgactgaa taccgagagg ccaaaaaggc tctggaagag 1800
aaaggccggc agatcctgat gaaggataac ctgattgacg aagagctggc acgagctgga 1860
gcagacccta aagatctgga agagaagggt gagcagctgg gatcaagcct ggataccctg 1920
cagacacgct tcgtctgact gctggcagaa tacaatgcca ccagatgaa aatgaagcag 1980
cgctgagtc agctggagtc acaggtgaaa ggcggagggg acaagcccct ggcagatggc 2040

gaagtcctg gcgacgtac aaaaacagaa gataaacagc agtaa 2085

<210> 9

<211> 2577

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6C cDNA, NM_006204.3

<400> 9

atgggtgaga tcaaccaagt tgccgtggag aaatacctgg aggagaaccc tcagtttgcc	60
aaggagtact ttgacaggaa gttgcgggtg gaggtgctgg gagaaatctt caagaacagc	120
caggtgccag tccagtcag catgtccttc tctgagctga cccaggtgga ggagtcagcc	180
ctgtgcttgg agctgctgtg gaccgtgcag gaggaggggg gcaccccaga gcagggggtt	240
cacagggccc tgcagaggct ggcccacctg ctccaggctg accgctgcag catgttcctg	300
tgccgtccc ggaacggcat acctgaggtg gcctctaggt tgctggatgt cccccacc	360
tccaagtttg aggacaacct ggtgggccct gacaaagaag ttgtgtttcc attggacatt	420
gggatagtgg gttgggctgc tcacacgaag aaaactcata atgtcccaga tgtgaaaag	480
aacagccatt tttctgactt catggacaag caaactgggt atgtcactaa gaacctgctg	540
gcaacccga tctgtgtggg caaggagggt cttgctgtga tcatggcagt taacaaagta	600
aatgcatctg aattttccaa acaggatgaa gaggtctttt ccaaatacct caactttgtg	660
tctatcatcc taaggcttca tcacaccagc tacatgtaca atattgaatc ccgaagaagc	720
cagatcctta tgtggtcagc caataaagta tttgaagaac tcacagatgt tgagcgacag	780
tttcacaaag cgctctacac ggtagatca tatctgaact gtgaacgata ctccattgga	840
ctgtggaca tgaccaagga gaaggaattc tacgatgaat ggccaatcaa gcttgagaa	900
gtaggcctt ataaaggctc aaagacacct gatggcaggg aagtcaactt ttataaaatc	960
attgattaca ttttcatgg aaaagaagag atcaaagtga ttccgacgcc tctgcagac	1020
cactggacac tcattagtgg gttgccaaca tatgttctg aaaatggatt tatctgtaac	1080
atgatgaatg cccctgcgga tgaatacttc acatttcaga aaggacctgt agacgaaact	1140
ggttgggtca ttaagaatgt tttgtccctg cctattgtca acaagaaaga agatattgtg	1200
ggagtggcta cattttaca caggaaggat ggaaaacctt tcgatgagca tgatgaatac	1260
attaccgaga ctctcacaca atttcttgga tggctctctt taaatactga cacctacgat	1320
aagatgaata agctagaaaa cagaaaggac attgctcagg aaatgctcat gaaccaaacc	1380
aaagccactc ctgaagaaat taagtccatt ttgaaatttc aagagaagtt aaatgttgat	1440
gtaattgacg actgtgaaga aaaacaactt gttgcaattt tgaaagagga cttgccagac	1500
ccacgtcag cagaactgta cgaattccgc ttcagtgact tcccccttac agagcacgga	1560
ttgattaaat gtggaatagc actgtttttt gaaataaatg tggtggagaa attcaaagta	1620
cctgtagagg ttcttaccag atggatgtac actgtgagga aagggtaccg agctgtcact	1680
taccacaatt ggcgcatgg gttcaactg ggcagacca tgtttacttt gctgatgaca	1740

ggaagattaa agaagtacta cacagatctc gaagcctttg ccatgcttgc tgctgctttc 1800
tgccatgata ttgaccacag aggaccaat aatttgtacc agatgaaatc cacgtctcca 1860
ttagcaagac ttcatggttc ttctattttg gagaggcacc acctggagta cagtaagact 1920
ctgttgagg atgagagttt aaacatcttc cagaacctaa ataagcggca gtttgaaaca 1980

gttattcatt tgttcgaggt cgcaataata gcaactgacc tggctttata tttcaagaag 2040
aggaccatgt ttcaaaaaat tgttgatgcc tgtgaacaaa tgcaaacgga agaagaagcc 2100
atcaaatatg taactgttga tccaaccaag aaagagatta tcatggcaat gatgatgacg 2160
gcatgtgact tgtctgctat taccaagccc tgggaggtgc aaagtcaggt agcacttatg 2220
gttgcaaatg aattttggga acaaggagat ctggagagaa cagtgttgca gcaacaaccc 2280
attcctatga tggacagaaa caaaagagat gaattaccta aacttcaagt tggatttatt 2340
gattttgttt gtacttttgt atataaggag ttctcacggt ttcacaaaga aatcacacct 2400

atgctgagtg gtcttcagaa taacagagta gaatggaaat cactagctga tgagtatgat 2460
gcaaagatga aggtcattga agaggaggca aaaaagcaag aaggaggagc cgaaaaagct 2520
gctgaagatt caggagggtg tgatgacaaa aagtccaaaa catgtttaat gttgtaa 2577

<210> 10
<211> 252
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PDE6H cDNA, NM_006205.2
<400> 10

atgagtgaca aactactct gcctgtcca gttcaaacc agggctctac caccacacgc 60
aaaggccctc ccaagttcaa gcagaggcag actcgccaat tcaagagtaa acctccaaag 120
aaagggtgta aaggatttgg agatgacatt ccaggaatgg aggggctagg aacagatatc 180

acagtgattt gtccatggga ggcatctcagc cacctggaat tgcatgagct cgctcagttt 240
gggattatct ga 252

<210> 11
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GNAT2 cDNA, NM_005272.3
<400> 11

atgggaagtg gagccagtgc tgaggacaaa gaactggcca agaggtccaa ggagctagaa 60

aagaagctgc aggaggatgc tgataaggaa gccaagactg tcaagctgct actgctgggt 120
gctggggagt caggaaagag caccatcgtc aacagatga agatcattca ccaggatggc 180
tattcaccag aagaatgcct ggagttcaag gctatcatct atggaaatgt gctgcagtcc 240

atcctggcta tcatccgggc catgaccaca ctgggcatcg attatgctga accaagctgt 300
gcggatgacg ggcgacagct caacaacctg gctgactcca ttgaggaggg aaccatgcct 360
cctgagctcg tggaggatcat taggaggttg tggaaggatg gtggggtgca agcctgcttc 420
gagagagctg cagaatacca gcttaatgac tccgcatctt actacctgaa ccaattagaa 480
cgaattacag accctgagta cctccctagt gagcaaatg tgctccgac cagagtcaaa 540
accacgggca tcatigaaac caagttttcc gtcaaagact tgaatttcag gatgtttgat 600
gtgggagggc agagatccga gagaagaag tggatccact gcttcgaggg agtcacctgc 660

atcattttct gtgcagccct cagtgcctat gatatggtgc tgggtgaaga tgacgaagtg 720
aatcgtatgc atgagtcttt gcatctgttc aacagcatat gtaaccacaa attctttgcg 780
gctacttcca ttgtcctctt tctcaacaag aaggacctct ttgaggaaaa aatcaagaaa 840
gtccatctca gcatittgtt tccagagtat gatggtaaca actcctatga tgatgcgggg 900
aattacataa agagccagtt ccttgacctc aatatgcgaa aagatgtcaa agaaatctac 960
agtcacatga cctgtgctac agatacacag aatgtcaaat ttgtgtttga tgcagttaca 1020
gatattatca tcaaagaaaa cctcaaggac tgcggcctct tctaa 1065

<210> 12

<211> 1638

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KCNV2 cDNA, NM_133497.3

<400> 12

atgtcaaac agagtgagag gagacggtcc tggagctaca ggccctggaa cacgacggag 60
aatgagggca gccaacaccg caggagcatt tgcctcctgg gtgcccggtc cggctcccag 120
gccagcatcc acggctggac agagggaac tataactact acatcgagga agacgaagac 180
ggcgaggagg aggaccagtg gaaggacgac ctggcagaag aggaccagca ggcaggggag 240
gtcaccaccg ccaagccga gggccccagc gacctccgg cctgctgtc cacgtgaat 300
gtgaacgtgg gtggccacag ctaccagctg gactactgcg agctggccgg cttcccaag 360

acgcgcctag gtcgcctggc cacctccacc agccgcagcc gccagctaag cctgtgcgac 420
gactacgagg agcagacaga cgaatacttc ttcgaccgag acccgccgt cttccagctg 480

gtctacaatt tctacctgtc cggggtgctg ctgggtgctg acgggctgtg tccgcgccgc 540
 ttcttgagg agctgggcta ctggggcgtg cggtcaagt acacgccacg ctgctgccgc 600
 atctgttcg aggagcggcg cgacgagctg agcgaacggc tcaagatcca gcacgagctg 660
 cgcgcgagg cgaggtcga ggaggcggag gaactcttcc gcgacatgcg ctctacggc 720
 ccgcagcggc gccgcctctg gaacctcatg gagaagccat tctcctcggg gcccgccaag 780

gccatcgggg tggcctccag caccttcgtg ctgctctccg tgggtggcgt ggcgtcaac 840
 accgtggagg agatgcagca gcactcgggg cagggcgagg gcggcccaga cctgcggccc 900
 atcttgagg acgtggagat gctgtgcatg ggcttcttca cgctcgagta cctgctgcgc 960
 ctagctcca cgccgacct gaggcgcttc gcgcgcagcg cctcaacct ggtggacctg 1020
 gtggccatcc tgccgtctta ccttcagctg ctgctcagat gcttcacggg cgagggccac 1080
 caacgcggcc agacggtggg cagcgtgggt aaggtgggtc aggtgttcgc cgtcatgcgc 1140
 ctcatgcga tcttccgcat cctcaagctg gcgcgccact ccaccggact gcgtgccttc 1200

ggcttcacgc tgcgccagtg ctaccagcag gtgggctgcc tgctgctctt catcgccatg 1260
 ggcatcttca ctttctctgc ggctgtctac tctgtggagc acgatgtgcc cagcaccaac 1320
 ttactacca tccccactc ctgggtgggt gccgcggtga gcatctccac cgtgggctac 1380
 ggagacatgt acccagagac ccacctgggc aggttttttg ccttcctctg cattgctttt 1440
 gggatcattc tcaacgggat gccatttcc atcctctaca acaagtttcc tgattactac 1500
 agcaagctga aggcctatga gtataccacc atacgcaggg agaggggaga ggtgaacttc 1560
 atgcagagag ccagaaagaa gatagctgag tgtttgcttg gaagcaaccc acagctcacc 1620

ccaagacaag agaattag 1638

<210> 13
 <211> 3414
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CACNA2D4 cDNA, NM_172364.4
 <400> 13

atggtctgtg gctgctctgc cctcttccc ctcccaacc ccaggccac catgcctgca 60
 actcccaact tctcgcaaa cccagctcc agcagcgcgt ggattccct ccagccaatg 120
 cccgtggcct gggcctttgt gcagaagacc tcggccctcc tgtggctgct gcttctaggc 180
 acctccctgt cccctgcgtg gggacaggcc aagattcttc tggaacacgt gaagctatgg 240
 gctgacacct tcggcgggga cctgtataac actgtgacca aatactcagg ctctctcttg 300

ctgcagaaga agtiacaagga tgtggagtcc agtctgaaga tcgaggaggt ggatggcttg 360
gagctggtga ggaagttctc agaggacatg gagaacatgc tgcggaggaa agtcgaggcg 420
gtccagaatc tgggtggaagc tgccgaggag gccgacctga accacgaatt caatgaatcc 480
ctggtgttcg aciattacaa ctccgtctcg atcaacgaga gggacgagaa gggcaacttc 540
gtggagctgg gcgccgagtt cctcctggag tccaatgctc acttcagcaa cctgccggtg 600
aacacctcca tcagcagcgt gcagctgccc accaacgtgt acaacaaaga cccagatatt 660
ttaaatggag tctacatgtc tgaagccttg aatgctgtct tcgtggagaa cttccagaga 720

gaccaacgt tgacctggca atattttggc agtgcaactg gattcttcag gatctatcca 780
ggtataaaat ggacacctga tgagaatgga gtcattactt ttgactgccg aaaccgcggc 840
tggtacattc aagctgctac ttctcccaag gacatagtga ttttgggtgga cgtgagcggc 900
agtatgaagg ggctgaggat gactattgcc aagcacacca tcaccacat cttggacacc 960
ctgggggaga atgacttcat taatatcata gcgtacaatg actacgtcca ttacatcgag 1020
ccttgtttta aagggatcct cgtccaggcg gaccgagaca atcgagagca tttcaaactg 1080
ctggtggagg agttgatggt caaagggtg ggggtcgtgg accaagccct gagagaagcc 1140

ttccagatcc tgaagcagtt ccaagaggcc aagcaaggaa gcctctgcaa ccaggccatc 1200
atgctcatca gcgacggcg cgtggaggac tacgagccgg tgtttgagaa gtataactgg 1260
ccagactgta aggtccgagt ttctacttac ctctattgga gagaagtgtc ttttctgac 1320
cgcatgaagt ggattgcatg caacaacaaa ggctactaca cgcagatctc aacgtggcg 1380
gacacccagg agaacgtgat ggaatactg cacgtgtca gccgccccat ggtcatcaac 1440
cacgaccagc acatcatctg gacagaggcc tacatggaca gcaagctcct cagctcgag 1500
gctcagagcc tgacactgct caccactgtg gccatgccag tcttcagcaa gaagaacgaa 1560

acgcgatccc atggcattct cctgggtgtg gtgggctcag atgtggccct gagagagctg 1620
atgaagctgg cgccccgta caagcttgga gtgcacggat acgcctttct gaacaccaac 1680
aatggctaca tctctccca tcccgacctc cgccccctgt acagagaggg gaagaaacta 1740
aaacccaaac ctaactacaa cagtgtggat ctctccgaag tggagtggga agaccaggt 1800
gaatctctga gaacagccat gatcaatagg gaaacaggta ctctctcgat ggatgtgaag 1860
gttccgatgg ataaaggga gcgagttctt ttctgacca atgactactt cttcacggac 1920
atcagcgaca cccctttcag tttgggggtg gtgctgtccc ggggccacgg agaatacatc 1980

cttctgggga acacgtctgt ggaagaaggc ctgcatgact tgcttcaccc agacctggcc 2040
ctggccggtg actggatcta ctgcatcaca gatattgacc cagaccaccg gaagctcagc 2100
cagctagagg ccatgatccg ctctctcacc aggaaggacc cagacctgga gtgtgacgag 2160

gagctggtcc gggagggtgct gtttgacgcg gtggtgacag ccccatgga agcctactgg 2220
acagcgctgg ccctcaacat gtccgaggag tctgaacacg tggaggacat ggccttcctg 2280
ggcaccggg ctggcctcct gagaagcagc ttgttcgtgg gctccgagaa ggtctccgac 2340
aggaagtcc tgacacctga ggacgaggcc agcgtgttca ccctggaccg cttcccgtg 2400

tggtaccgcc aggcctcaga gcacctgct ggcagcttcg tcttcaacct ccgtgggca 2460
gaaggaccag aaagtgcggg tgaacccatg gtggtgacgg caagcacagc tgtggcggtg 2520
accgtggaca agaggacagc cattgtctga gccgcgggcg tccaaatgaa gctggaattc 2580
ctccagcgca aattctgggc ggcaacgcgg cagtgcagca ctgtggatgg gccgtgcaca 2640
cagagctgcg aggacagtga tctggactgc ttcgtcatcg acaacaacgg gttcattctg 2700
atctccaaga ggtcccgaga gacgggaaga ttctggggg aggtggatgg tgctgtcctg 2760
accagctgc tcagcatggg ggtgttcagc caagtgacta tgtatgacta tcaggccatg 2820

tgcaaacct cgagtcacca ccacagtga gccagcccc tggtcagccc aatttctgcc 2880
ttcttgacgg cgaccaggtg gctgtctcag gagctggtgc tgttcctgct ggagtggagt 2940
gtctggggct cctggtacga cagaggggccc gagggcaaaa gtgtcttcca tcaactccac 3000
aaacacaaga agcaggaccc gctgcagccc tgcgacacgg agtaccctgt gtctgtgtac 3060
cagccggcca tccgggaggc caacgggatc gtggagtgcg ggccctgcca gaaggtattt 3120
tggtgtcagc agattcccaa cagtaacctc ctctctctgg tgacagacc cacctgtgac 3180
tgcagcatct tcccaccagt gctgcaggag gcgacagaag tcaaatataa tgcctctgtc 3240

aaatgtgacc ggatgcgtc ccagaagctc cgccggcgac cagactcctg ccacgccttc 3300
catccagagg agaatgccca ggactgcggc ggcgctcgg acacctcagc ctgcgcgcc 3360
ctactcctgc tgcctgtgtg tgcctggggg ctactgcccc aactcctgcg gtga 3414

<210> 14
<211> 2430
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CNGB3 cDNA, NM_019098.4
<400> 14

atgtttaaat cgtgacaaa agtcaacaag gtgaagccta taggagagaa caatgagaat 60
gaacaaagtt ctgctcgaa tgaagaaggc tctcaccaa gtaatcagtc tcagcaaacc 120
acagcacagg aagaaaacaa aggtgaagag aaatctctca aaaccaagtc aactccagtc 180

acgtctgaag agccacacac caacataca gacaaactct ccaagaaaaa ttcctctgga 240

gatctgacca caaacctga ccctcaaaat gcagcagaac caactggaac agtgccagag 300
cagaaggaaa tggaccccg gaaagaaggt ccaaacagcc cacaaaacaa accgcctgca 360
gctcctgtta taaatgagta tgccgatgcc cagctacaca acctggtgaa aagaatgcgt 420
caaagaacag ccctctacaa gaaaaagtig gttagaggag atctctctc acccgaagcc 480
agcccacaaa ctgcaaagcc cacggctgta ccaccagtaa aagaaagcga tgataagcca 540
acagaacatt actacaggt gttgtggttc aaagtcaaaa agatgccttt aacagagtac 600

ttaaagcgaa ttaaacttcc aaacagcata gattcataca cagatcgact ctatctctg 660
tggtctttgc ttgtcactct tgcctataac tggaactgct gggtttatacc actgcgcctc 720
gtcttcccat atcaaaccgc agacaacata cactactggc ttattgcgga catcatatgt 780
gatatcatct acctttatga tatgtatit atccagccca gactccagtt tgtaagagga 840
ggagacataa tagtggattc aaatgagcta aggaaacact acaggacttc tccaaaattt 900
cagttggatg tcgcatcaat aataccattt gatatttgct acctcttctt tgggtttaat 960
ccaatgttta gagcaaatag gatgttaaag tacacttcat ttttgaatt taatcatcac 1020

ctagagtcta taatggacaa agcatatatac tacagagtta ttcgaacaac tggatacttg 1080
ctgtttattc tgcacattaa tgccgtgtgt tattactggg cttcaaacta tgaaggaatt 1140
ggcactacta gatgggtgta tgatggggaa ggaaacagat atctgagatg ttattattgg 1200
gcagttcgaa ctttaattac cattggtggc ctaccagaac cacaacttt atttgaaatt 1260
gtttttcaac tcttgaattt ttttctgga gtttttgtgt tctccagttt aattggtcag 1320
atgagagatg tgattggagc agctacagcc aatcagaact acttccgcgc ctgcatggat 1380
gacaccattg cctacatgaa caattactcc attcctaaac ttgtgcaaaa gcgagttcgg 1440

acttggtatg aatatacatg ggactctcaa agaatgctag atgagtctga tttgcttaag 1500
acctaccaa ctacggtcca gttagccctc gccattgatg tgaacttcag catcatcagc 1560
aaagtcgact tgttcaaggg ttgtgataca cagatgattt atgacatggt gctaagattg 1620
aaatccgttc tctatttgcc tggtagcttt gtctgcaaaa agggagaaat tggcaaggaa 1680
atgtatatca tcaagcatgg agaagtccaa gttcttggag gcctgatgg tactaaagtt 1740
ctggttactc tgaagctgg gtcggtgttt ggagaaatca gccttctagc agcaggagga 1800
ggaaaccgtc gaactgccaa tgtggtggcc cacgggtttg ccaatctttt aactctagac 1860

aaaaagacc tccaagaaat tctagtgcatt tatccagatt ctgaaaggat cctcatgaag 1920
aaagccagag tgctttttaa gcagaaggct aagaccgcag aagcaacccc tccaagaaaa 1980
gatcttgccc tctcttccc accgaaagaa gagacacca aactgtttta aactctccta 2040
ggaggcacag gaaaagcaag tcttgcaaga ctactcaaat tgaagcgaga gcaagcagct 2100

cagaagaaag aaaattctga aggaggagag gaagaaggaa aagaaaatga agataaaca 2160
aaagaaaatg aagataaaca aaaagaaaat gaagataaag gaaaagaaaa tgaagataaa 2220
gataaaggaa gagagccaga agagaagcca ctggacagac ctgaatgtac agcaagtctt 2280

attgcagtgg aggaagaacc ccactcagtt agaaggacag ttttaccag agggacttct 2340
cgtcaatcac tcattatcag catggctcct tctgctgagg gcggagaaga ggttcttact 2400
attgaagtca aagaaaaggc taagcaataa 2430

<210> 15
<211> 1786
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hG1.7 construct , 1.2 kb M/L opsin LCR fragment, 500 bp M opsin
fragment, with M8 mutation
<400> 15

taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaaggcatg ggtgtttcat 60
gaggacagag cticcgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tggtgactgg 120

actatacact tacacacggt agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat 180
ctttttaag tgtaaaaggc aaatggccaa atggttcctt gtctatagc ttagcagcc 240
atcggctgtt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagccccat aactcctaata 300
cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa 360
tcttccacce tggccagggc ccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag 420
agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccaggggccc 480
tctttccttg gggttttctt gggccgccac tgcctccgct cctctccccc cateccacce 540

cctcaccccc tcgttcttca tacccttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc 600
tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac 660
aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt 720
ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cggatgaagg gcagaacctt ccgcctttcc 780
aggcctctc ccacctctgc cactccact ctcttctctg ggatgtgggg gctggcacac 840
gtgtggccca gggcatttgt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca 900
agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc 960

ccagacaccc cactctctct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa 1020
agggcttcca aatagcatgg tggccttggg tggccaggga agcctcagag ttgcttatct 1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc 1140
cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atcccaccct cagaaggagc 1200
ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttggatcaca 1260
ggtatttgcc actaagccca gctaattgtt ttttatttag tagaaacggg gtttcaccat 1320
gttagtcagg ctggtcggga actcctgacc tcaggagatc taccgcctt ggcctccaa 1380

agtgcctggga ttacaggcgt gtgccactgt gccagccac ttttttttag acagagtctt 1440
ggtctgttgc ccaggctaga gttcagtggc gccatctcag ctactgcaa cctccgcctc 1500
ccagattcaa gcgattctcc tgcctcgacc tcccagtagc tgggattaca ggtttccagc 1560
aaatccctct gagccgcccc cgggggctcg cctcaggagc aaggaagcaa ggggtgggag 1620
gaggaggtct aagtcacagg cccaattaag agatcagatg gtgtaggatt tgggagcttt 1680
taagtggaag aggccccggc tgatccact ggccggtata aagcaccgtg accctcaggt 1740
gacgcaccat ctagagctgc cgtcggggac agggctttcc atagcc 1786

<210> 16

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M8 mutation

<400> 16

tctaga 6

<210> 17

<211> 1970

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2.0 kb M opsin promoter fragment with M8 mutation

<400> 17

taaaaagcaa gtcttgccag ggcagtgggtg tgcacctgtg gtcccagcta ctcaggatgc 60
tgaggcagga ggattacttg tgcccagcaa gtagaggctg cagtacactg tgactgtgct 120
actgccctcc aacctgggtg acagagttag acctgtctc aaaaaaaaaa gagcgggggg 180

ggggggccgg gccgggcgtg gtggctcaca gctgtaatcc cagcactttg ggaagccaag 240
gcgggtggat cacttgaggt caggagtttg agaccatcat ggtcaacact gcgaaacact 300
gtccctacta aaaatacaaa aattagccgg gcatgtggc acacacctgt aatcccagct 360
actggggagg ctgaggcagg agaattgctt gagccgggga gacggaggtt gcagtgagcc 420

gagactgcgc cactgcactc cagcctgact gacaagagtg agattgtctc aaaaaaaaaa	480
aaaaagtaat cactagaaaa gaagctacat atgtacataa catccaaata accaagagga	540
gaaaaaaaaatg ggacttgatt aatcaaaaaca aaaacaaaaa agaaagaaaag aaagggggag	600
aaaataaaac aagggtctggg tgtgtctggct catgcctgta atcccagcac tttggaagcc	660
aaggtgggtg gatctcttga gctcaggagg tcaagaccag cctgggcaac atggcgaaac	720
cccgctctcta ttaaaaaaaaa aattaataca acaattatcc tggagtgggtg gtgcacacct	780
glagtcccag ctaccagga cgctgagacg ggaggatcgc ttgatcccg ggatgtcgag	840
gctgccgtga tgcaccact gccctccagc cagggtggca gactgagacc ccatctcaa	900
aaataataa ataaaagcaa acaagaaaaa aaaaggcttg aaacatatct gatagataa	960
gggctaataca acacaatata taaagaactg caaatcagta aactaagagc aaataacca	1020
atataaagac attaaagggt agccacggac atctcagacg acgaaaaaca aaagacagta	1080
aacgtataat aaaacatgta attgcaaggt gatccggga tagtaagcga aaagcaaca	1140
ttaaatacta ttttctcacc caccagaacg ccaaaaatta aaaagcctaa caatgtccag	1200
ggctggcgag aatgtggcag aaggtgatgt cacataacct gcaagtggga atctaaacag	1260
attcagggtt ttggtttttt tttaatcgca attaggtggc ctgttaaatt tttttcttg	1320
agacagagtt ttgctcttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggctcgatct tggtcaccg	1380
caacctcgac ctcccaggta caagcgattc tctgtctca gcctcccaag tagctgggag	1440
tacaggtatt tgccactaag ccagctaat tgttttttat ttagtagaaa cggggtttca	1500
ccatgttagt caggctggtc gggaactcct gacctcagga gatctaccg ccttggcctc	1560
ccaaagtgtt gggattacag gcgtgtgcca ctgtgccag ccactttttt ttagacagag	1620
tcttggtctg ttgccaggc tagagttcag tggcgccatc tcagctcact gcaacctccg	1680
cctcccagat tcaagcgatt ctctgcctc gacctcccag tagctgggat tacaggtttc	1740
cagcaaatcc ctctgagccg ccccgggggg ctgcctcag gagcaaggaa gcaaggggtg	1800
ggaggaggag gtctaagtc caggcccaat taagagatca gatggtgtag gatttgggag	1860
cttttaaggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac cgtgaccctc	1920
aggtgacgca ccatctagag ctgccgtcgg ggacagggtt ttccatagcc	1970