



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0036912
(43) 공개일자 2020년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) C07K 14/80 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7005930
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/055755
- (87) 국제공개번호 WO 2019/025984
국제공개일자 2019년02월07일
- (30) 우선권주장
62/539,473 2017년07월31일 미국(US)

- (71) 출원인
리플렉션 바이오테크놀로지스 리미티드
중국, 홍콩 에스에이알, 뉴 테러토리스, 팍 쉼
콕, 사이언스 파크 이스트 애비뉴 1, 코어 빌딩
1, 6층, 유닛 601
- (72) 발명자
양, 리차드 알.
중국, 홍콩 에스에이알, 뉴 테러토리스, 팍 쉼
콕, 사이언스 파크 이스트 애비뉴 1, 코어 빌딩
1, 6층, 유닛 601, 리플렉션 바이오테크놀로지스
리미티드
창, 스티븐 에이치.
미국, 10032 뉴욕, 뉴욕 샵6이, 헤븐 애비뉴 70
- (74) 대리인
안소영

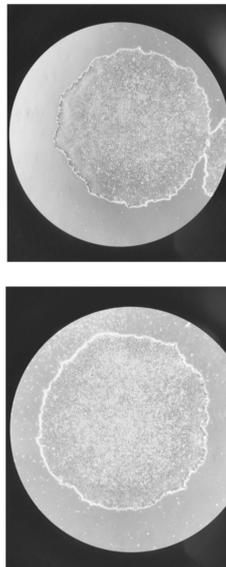
전체 청구항 수 : 총 334 항

(54) 발명의 명칭 안과 질환을 위한 세포 모델 및 치료요법

(57) 요약

본 발명은 안질환에 대한 세포 모델을 기술한다. 또한, 본 발명은 안질환을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 기술한다.

대표도 - 도1aa



(52) CPC특허분류

A61K 48/0075 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
C07K 14/80 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
G01N 33/5073 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

백터를 포함하는, 인간 대상체에서 안질환(ocular disease)을 치료 또는 예방하기 위한 조성물로서,

백터는 발현 카세트(expression cassette)를 포함하고, 발현 카세트는 하나 이상의 조절 서열(regulatory sequence)에 작동 가능하게 연결되는 기능적(functional) 또는 비-돌연변이체(non-mutant) CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함하고, 여기에서 질환은 안구 세포의 기능장애(dysfunction), 이영양증(dystrophy), 장애(disorder), 변성(degeneration), 위축(atrophy) 및/또는 사멸(death)과 관련되는 것인 조성물.

청구항 2

백터를 포함하는, 안구 세포의 기능장애, 이영양증, 장애, 변성, 위축 및/또는 사멸을 예방하거나(preventing), 저지하거나(arresting), 이의 진행을 지연시키거나(slowing), 치료하거나(treating) 또는 개선(ameliorating) 시키기 위한 조성물로서,

백터는 발현 카세트를 포함하고, 발현 카세트는 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 기능적 또는 비-돌연변이체 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 안질환 또는 안구 세포 변성은 CYP4V2 유전자에 이중-대립형질(bi-allelic) 돌연변이를 갖는 유전성 망막 변성(inherited retinal degeneration, IRD) 또는 망막색소 변성증(retinitis pigmentosa, RP)인 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 안구 세포 변성은 비에티 결정 이영양증(Bietti Crystalline Dystrophy)(비에티 결정 각막망막 이영양증(Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy(BCD)로도 알려져 있음)과 관련되는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 백터는 바이러스 백터, 플라스미드 또는 비-바이러스성 백터인 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 바이러스 백터는 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus, AAV) 백터, 아데노바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 헤르페스 단순포진 바이러스 백터, 바쿨로 바이러스 백터, 센다이 바이러스 백터 및 레트로바이러스 백터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 7

제 5항 또는 제6항에 있어서, 백터는 재조합 AAV 백터(rAAV)인 것인 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 내의 AAV 게놈 또는 AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 또는 AAV의 다른 혈청형(serotype) 또는 분리체(isolate) 또는 클레이드(Glade), 또는 이의 임의의 유도체, 변이체 또는 하이브리드 중 어느 하나로부터인 것인 조성물.

청구항 9

제5항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 슈도형(pseudotyped) AAV(예를 들어, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/9, AAV2/6, AAV2/4, AAV2/6, AAV5/2, AAV8/1, AAV8/2, AAV2/7, AAV2/12 및 AAV2/10) 또는 하이브리드 AAV(예를 들어, AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9)인 것인 조성물.

청구항 10

제5항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 하나 이상의 캡시드 돌연변이(예를 들어, Y-F, K-R, T-A, S-A 및/또는 T-V 돌연변이(예를 들어, Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F 및 T491V 중의 하나 이상의 캡시드 돌연변이, 또는 상이한 AAV 혈청형에 상응하는 돌연변이(예를 들어, AAV2(Y444F +Y500F+Y730F), AAV2(quadY-F+T-V) 또는 AAV2/8(Y733F))를 갖는 AAV2))를 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Anc80, rh10 및/또는 ShH10으로 이루어지는 군으로부터 선택되거나 유래되는 것인 조성물.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 AAV2/5, AAV2/8, AAV2/2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/9, AAV2/8(Y733F), AAV2/6, AAV2/4, AAV2/7, AAV5, AAV2, AAV8, AAV1, AAV9, AAV6, AAV10, AAV4, AAV7, AAV12, Anc80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B, 또는 이의 하이브리드, 유도체 또는 변이체로부터 선택되거나 유래되는 것인 조성물.

청구항 13

제5항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터는 단일-가닥(single-stranded) AAV 벡터 또는 자가-상보적 AAV(self-complementary AAV, scAAV) 벡터인 것인 조성물.

청구항 14

제5항에 있어서, 벡터는 플라스미드(plasmid), 네이키드 핵산(naked nucleic acid), 리포솜(liposome)(예를 들어, 양이온성 또는 음이온성 리포솜), 덴드리머(dendrimer), 나노입자(nano particle), 중합체(polymer)(예를 들어, 폴리플렉스(polyplex)), 지질-중합체 시스템(lipid-polymer system), 고체 지질 나노입자(solid lipid nanoparticle) 또는 리포솜 프로타민/DNA 리포플렉스(liposome protamine/DNA lipoplex, LPD)인 것인 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 기능적 또는 비-돌연변이체 CYP4V2 단백질은 서열번호 4 내지 6으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 가진 폴리펩타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3에 나타난 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 4, 5 또는 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 코돈-최적화된(codon-optimized) 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 프로모터를 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 프로모터는 RPE 세포-특이적 프로모터, 망막 세포-특이적 프로모터, 각막 세포-특이적 프로모터, 안구 세포-특이적 프로모터 또는 구성적(constitutive) 프로모터인 것인 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 프로모터는 베타 액틴 프로모터 또는 바이러스 프로모터 또는 이의 하이브리드인 것인 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서(early enhancer)/닭 베타 액틴 프로모터, CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로도 알려져 있음), 닭 베타 액틴 프로모터, 작은 CBA(small CBA, smCBA) 프로모터, CB^{SB} 프로모터, 또는 CBh 프로모터, 인간 베타 액틴 프로모터와 같은 또 다른 베타-액틴 프로모터, 연장인자 1 알파 짧은(elongation factor 1 short, EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파(EF-1 알파) 프로모터, CMV 프로모터, PGK 프로모터, UBC 프로모터, GUSB 프로모터, UCOE 프로모터, VMD2(난황형 황반 이영양증2(vitelliform macular dystrophy 2); BEST1로도 알려져 있음) 프로모터, RPE65 프로모터, 또는 이의 하이브리드, 변이체 또는 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bovine growth hormone polyadenylation signal, bGH poly A), 작은 폴리A 신호(small poly A signal, SPA), 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(human growth hormone polyadenylation signal, hGH poly A), SV40 폴리A 신호, SV40 레이트(late) 폴리A 신호, 또는 이의 유도체, 하이브리드 및 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리A 신호인 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 코작(Kozak) 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 인핸서를 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 인핸서는 WPRE 인핸서, HPRE 인핸서, CTE 인핸서, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드 또는 변이체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 바이러스 인핸서인 것인 조성물.

청구항 28

BCD를 치료하거나 예방하기 위한 조성물 또는 BCD를 치료하거나 예방하기 위한 조성물을 생산하기 위한 조성물로서,

서열번호 60 내지 64의 임의의 CYP4V2 발현 카세트 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 공유하는 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 특정 투여 경로에 적합한 추가의 성분과 함께 제형화되는 것인 조성물.

청구항 30

인간 대상체에서 안질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

백터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 백터는 발현 카세트를 포함하고, 발현 카세트는 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 기능적 또는 비-돌연변이체 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함하고, 질환은 안구 세포의 기능장애, 이영양증, 장애, 변성, 위축 및/또는 사멸과 관련되는 것인 방법.

청구항 31

안구 세포의 기능이상, 이영양증, 장애, 변성, 위축 및/또는 사멸을 예방하거나, 저지하거나, 이의 진행을 지연시키거나, 치료하거나 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은

백터를 안구 세포에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 백터는 발현 카세트를 포함하고, 발현 카세트는 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 또는 비-돌연변이체 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 안구 세포는 망막 세포(retinal cell), 각막 세포(corneal cell), 맥락막 세포(choroidal cell), 망막 색소 상피 (retinal pigment epithelial, RPE) 세포, 광수용체 세포(photoreceptor cell) 및/또는 맥락막 상피 세포(choroidal epithelial cell)인 것인 방법.

청구항 33

제30항 또는 제31항에 있어서, 안질환 또는 안구 세포 변성은 CYP4V2 유전자에 이중 대립형질 돌연변이를 갖는 유전성 망막 변성(IRD) 또는 망막색소 변성증(RP)인 것인 방법.

청구항 34

제30항 또는 제31항에 있어서, 질환은 비에티 결정 이영양증(비에티 결정 각막망막 이영양증(BCD)으로도 알려져 있음)와 관련되는 것인 방법.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 백터는 바이러스 백터, 플라스미드 또는 비-바이러스성 백터인 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 바이러스 백터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 백터, 아데노바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 헤르페스 단순포진 바이러스 백터, 바쿨로 바이러스 백터, 쉐다이 바이러스 백터 및 레트로바이러스 백터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 37

제 36항에 있어서, 백터는 재조합 AAV 백터(rAAV)인 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, rAAV는 AAV 게놈 또는 이의 유도체, 및/또는 AAV 캡시드 단백질 또는 이의 유도체 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, rAAV는 키메라(chimeric) AAV, 셔플된(shuffled) AAV 또는 캡시드-변형된

(capsid-modified) AAV인 것인 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 내의 AAV 계통 또는 AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 또는 AAV의 또 다른 혈청형 또는 분리체 또는 글레이드(Glade), 또는 이의 임의의 유도체, 변이체 또는 하이브리드 중 어느 하나로부터인 것인 방법.

청구항 41

제37항 내지 제 40항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 슈도형 AAV(예를 들어, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/9, AAV2/6, AAV2/4, AAV2/6, AAV5/2, AAV8/1, AAV8/2, AAV2/7, AAV2/12 및 AAV2/10) 또는 하이브리드 AAV(예를 들어, AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9)인 것인 방법.

청구항 42

제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 하나 이상의 캡시드 돌연변이(예를 들어, Y-F, K-R, T-A, S-A 및/또는 T-V 돌연변이(예를 들어, Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F 및 T491V 중의 하나 이상의 캡시드 돌연변이, 또는 상이한 AAV 혈청형에 상응하는 돌연변이(예를 들어, AAV2 (Y444F +Y500F+Y730F), AAV2 (quadY-F+T-V) 또는 AAV2/8 (Y733F))를 갖는 AAV2))를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Anc80, rh10 및/또는 ShH10으로 이루어지는 군으로부터 선택되거나 유래되는 것인 방법.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 AAV2/5, AAV2/8, AAV2/2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/9, AAV2/8(Y733F), AAV2/6, AAV2/4, AAV2/7, AAV5, AAV2, AAV8, AAV1, AAV9, AAV6, AAV10, AAV4, AAV7, AAV12, Anc80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B, 또는 이의 하이브리드, 유도체 또는 변이체로부터 선택되거나 유래되는 것인 방법.

청구항 45

제37항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터는 단일-가닥 AAV 벡터 또는 자가-상보적 AAV(scAAV) 벡터인 것인 방법.

청구항 46

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 플라스미드, 네이키드 핵산, 리포좀(예를 들어, 양이온성 또는 음이온성 리포좀), 덴드리머, 나노입자, 중합체(예를 들어, 폴리플렉스), 지질-중합체 시스템, 고체 지지 나노입자 또는 리포좀 프로타민/DNA 리포플렉스(LPD)인 것인 조성물.

청구항 47

제30항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 기능적 또는 비-돌연변이체 CYP4V2 단백질은 서열번호 4 내지 6으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 가진 폴리펩타이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제30항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 것인 방법.

청구항 49

제30항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도

80% 서열 동일성을 갖는 것인 방법.

청구항 50

제30항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3에 나타난 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제30항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 4, 5 또는 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 코돈-최적화된 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 프로모터는 RPE 세포-특이적 프로모터, 망막 세포-특이적 프로모터, 각막 세포-특이적 프로모터, 안구 세포-특이적 프로모터 또는 구성적 프로모터인 것인 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 프로모터는 베타 액틴 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 또는 이의 하이브리드인 것인 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴 프로모터, CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로도 알려져 있음), 닭 베타 액틴 프로모터, 작은 CBA(smCBA) 프로모터, CB^{SB} 프로모터, 또는 CBh 프로모터, 인간 베타 액틴 프로모터와 같은 또 다른 베타-액틴 프로모터, 연장인자 1 알파 짧은(EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파 (EF-1 알파) 프로모터, CMV 프로모터, PGK 프로모터, UBC 프로모터, GUSB 프로모터, UCOE 프로모터, VMD2(난황형 황반 이영양증 2; BEST1로도 알려져 있음) 프로모터, RPE65 프로모터, 또는 하이브리드 또는 이의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 56

제30항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 폴리아데닐화(폴리A) 신호를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 폴리A 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGH 폴리A), 작은 폴리A 신호(SPA), 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(hGH 폴리A), SV40 폴리A 신호, SV40 레이트(late) 폴리A 신호, 또는 이의 유도체, 하이브리드 또는 변이체인 것인 방법.

청구항 58

제30항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 코작 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제30항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열은 인핸서를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 인핸서는 WPRE 인핸서, HPRE 인핸서, CTE 인핸서 또는 이의 유도체 또는 하이브리드 또는 변이체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 바이러스 인핸서인 것인 방법.

청구항 61

BCD를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

서열번호 60 내지 64에서의 임의의 CYP4V2 발현 카세트 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 공유하는 핵산 분자를

포함하는 벡터를 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제30항 내지 제61 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 특정 투여 경로에 적합한 추가의 성분으로 제형화되는 것인 방법.

청구항 63

BCD를 치료하거나 예방하기 위한 벡터를 생산하는데 사용하기 위한 조성물로서,

조성물은 서열번호 60 내지 64에서의 임의의 CYP4V2 발현 카세트 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 공유하는 핵산 분자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 64

제30항 내지 제63 중 어느 한 항에 있어서, 시험관 내(*in vitro*) 처리의 경우, 표적 세포는 세포당 약 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC(GC: AAV 입자를 함유하는 계놈을 측정하는 계놈 카피)의 용량(MOI)으로 감염되는 것인 방법.

청구항 65

제30항 내지 제64 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 눈에 생체 내(*in vivo*) 투여의 경우, 단일 투여는 약 1×10^6 내지 2×10^{13} GC(예를 들어, 약 1×10^{11} GC 내지 약 1×10^{12} GC의 고 용량 범위, 약 1×10^{10} GC 내지 약 1×10^{11} GC의 중간 용량 범위, 약 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{10} GC의 저 용량 범위, 약 1×10^6 GC 내지 약 1×10^9 GC의 매우 저 용량 범위 및 약 1×10^{12} GC 내지 약 2×10^{13} GC의 매우 고 용량 범위) 정도이거나, 또는 원하는 효과를 제공하기에 충분한 이들 범위 내의 임의의 용량일 수 있는 것인 방법.

청구항 66

제30항 내지 제65 중 어느 한 항에 있어서, 투여 단계는 질환 증상의 발병 전 또는 질환 증상의 발병 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 67

제30항 내지 제66 중 어느 한 항에 있어서, 투여 및/또는 표적화된 전달은 눈 및/또는 안구 세포에 대한 것인 방법.

청구항 68

제30항 내지 제67 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 망막하(sub-retinal) 주사, 유리체내(intravitreal) 주사, 또는 벡터를 캡슐화하는 장치를 유리체내로 이식하는 것에 의한 것인 방법.

청구항 69

제30항 내지 제68 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 대상체의 망막 하 공간(sub-retinal place), 눈의 후안부(posterior segment), 각막, 망막, 맥락막, RPE 세포, 광수용체 또는 각막 상피 세포, CE 세포에 벡터를 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것인 방법.

청구항 70

제67항에 있어서, 눈으로의 투여는 혈류를 통한 전달에 의해 달성되는 것인 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70중 어느 한 항에 있어서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포, 망막 세포, 각막 세포, 수정체 세포, 신경절 세포, 시신경 세포, 및/또는 맥락막 세포뿐만 아니라, 줄기 세포(iPSC, ES 세포, MSC, 성체 줄기 세포 및/또는 조직-특이적 줄기 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않음)로부터 유래되는 상기 유형의 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 72

제30항 내지 제71중 어느 한 항에 있어서, 박터는 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 특정 투여 경로에 적합한 추가의 성분과 함께 제형화되는 것인 방법.

청구항 73

제30항 내지 제72중 어느 한 항에 있어서, BCD를 가지고 있거나 BCD가 발생할 위험이 있거나, 이중-대립형질 CYP4V2 돌연변이를 가지는 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 74

인간 대상체에서 비에티 결정 이영양증(BCD)을 치료하거나 예방하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 안구 세포로 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 인간 CYP4V2 단백질을 암호화하는 서열 번호 2의 핵산 서열, 또는 서열번호 2의 핵산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함하는 박터를 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 박터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 박터인 것인 방법.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 조절 서열은 프로모터인 것인 방법.

청구항 77

인간 CYP4V2 단백질을 암호화하는 서열번호 2의 핵산 서열 또는 서열번호 2의 핵산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 78

제77항에 따른 핵산 분자 및 이러한 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되는 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 발현 카세트.

청구항 79

제77항에 따른 핵산 분자 또는 제78항에 따른 발현 카세트를 포함하는 박터.

청구항 80

제79항에 있어서, 박터는 바이러스 박터이거나, 또는 재조합 아데노-관련 바이러스 (rAAV) 박터, 재조합 아데노 바이러스 박터, 재조합 렌티바이러스 박터, 재조합 헤르페스 단순포진 바이러스 박터, 재조합 바콜로 바이러스 박터, 재조합 센다이 바이러스 박터 및 재조합 레트로바이러스 박터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 박터.

청구항 81

제79항에 있어서, 박터는 플라스미드 또는 비-바이러스성 박터인 것인 박터.

청구항 82

제81항에 있어서, 비-바이러스성 박터는 네이키드 핵산, 리포솜(예를 들어, 양이온성 또는 음이온성 리포솜), 덴드리머, 나노입자, 중합체(예를 들어, 폴리플렉스), 지질-중합체 시스템, 고체 지질 나노입자 또는 리포솜 프로타민/DNA 리포플렉스(LPD)로부터 선택되는 것인 박터.

청구항 83

제77항에 따른 핵산 분자 및/또는 제79항 내지 제82항 중 어느 한 항에 따른 박터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 84

바이러스 벡터 매개성 유전자 치료요법에서, 바이러스 벡터에 대한 면역반응을 감소시키고, 형질도입 효율을 유지하며, 바이러스 벡터 및/또는 면역억제제의 용량을 낮추고/낮추거나 동일한 유전자 질환의 상이한 환자에 대한 치료 효과를 최대화시키는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 돌연변이 또는 변이체가 질환과 관련된 표적 세포(예를 들어, BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법의 경우 iPS-RPE 또는 RPE 세포주)에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 것으로 확인된 후, 상기 바이러스 벡터의 캡시드 상에 항원성 영역 돌연변이 또는 다른 돌연변이 또는 변이체를 갖는 변이체를 생성시킴으로써, 유전자 치료요법을 위한 표적 세포 유형에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 하나 이상의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)의 풀(pool)을 확립하는 단계,

(b) 유전자 치료요법을 필요로 하는 대상체에서 상이한 바이러스 벡터 혈청형 및/또는 캡시드 돌연변이 또는 변이체에 대한 기존의 중화 항-바이러스 벡터 항체(neutralizing anti-viral vector antibody, Nab)를 검출하고/하거나, 이러한 대상체로부터 유래되는 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포)에서 상이한 바이러스 벡터를 비교하고 시험하는 단계,

(c) (i) 질환 표적 세포에서 충분한 형질도입 효율, 및 (ii) 대상체에서 기존의 Nab와의 낮은 교차-반응성, 및/또는 (iii) 대상체의 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 환자-특이적 iPS-RPE 또는 RPE 세포주)에서의 양호한 표현형 구조(rescue) 결과를 갖는 바이러스 벡터의 상기 풀로부터 바이러스 벡터를 선택하는 단계, 여기에서 이러한 바이러스 벡터 풀은 상이한 혈청형 및/또는 캡시드-변형된 바이러스 벡터(예를 들어, 캡시드-돌연변이체 AAV 및/또는 캡시드 단백질 변이체 AAV 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 포함함,

(d) 대상체에게 투여하기 위해 (c)로부터 선택되는 바이러스 벡터를 사용하는 단계;

(e) 단계 (b) 내지 (d)(기존의 Nab와 관련된 부분만)를 반복하는 단계, 위 각각의 시기에 대상체는 동일한 기관(예를 들어, 눈 또는 반대쪽 눈) 또는 다른 기관으로의 후속 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자 치료요법 투여를 필요로 함

를 포함하는 방법.

청구항 85

인간 망막 질환을 치료하거나 예방하는데 있어서 AAV 벡터-매개성 유전자 치료요법을 사용하는 방법으로서,

AAV 벡터는 치료적 이식유전자(therapeutic transgene)에 작동 가능하게 연결되는 EFS 프로모터(서열번호 35) 및/또는 작은 폴리A(서열번호 36)를 포함하는 핵산분자, 또는 서열번호 35와 적어도 90% 서열 동일성 또는 서열번호 36과 적어도 85% 서열 동일성을 공유하는 핵산 분자를 포함하는 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, AAV 벡터는 단일-가닥 AAV인 방법.

청구항 87

제85항에 있어서, AAV 벡터는 자가-상보적 AAV(scAAV)인 방법.

청구항 88

세포 질환 모델로서,

(1) 대상체로부터 제공되거나 대상체로부터 제공되는 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포, 또는

(2) 표적 유전자에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 대상체로부터 제공되거나 대상체로부터 제공되는 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포로부터 유래되는 세포

를 포함하는 세포주 조성물을 포함하는 세포 질환 모델.

청구항 89

제88항에 있어서, 줄기 세포는 유도 만능성 줄기(induced pluripotent stem, iPS) 세포인 것인 조성물.

청구항 90

제88항에 있어서, 줄기 세포는 배아 줄기(embryonic stem, ES) 세포, 체세포(또는 성체) 줄기 세포, 조직 특이적 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC)인 것인 조성물.

청구항 91

제88항에 있어서, 대상체로부터 제공되는 세포는 체세포인 것인 조성물.

청구항 92

제88항에 있어서, 대상체로부터 제공되는 세포는 피부 세포, 섬유아세포 또는 혈액 세포인 것인 조성물.

청구항 93

제88항 또는 제92항에 있어서, 대상체로부터 제공되는 세포는 피부 섬유아세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)인 것인 조성물.

청구항 94

제88항에 있어서, 대상체로부터 제공되는 세포는 요(urinary) 세포, 신장 상피 세포, 모낭, 또는 모유두 세포(dermal papilla cell)인 것인 조성물.

청구항 95

제88항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래되는 세포는 안구 세포인 것인 조성물.

청구항 96

제95항에 있어서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 세포(간상 세포, 원추 세포 및 광수용체 선조 세포를 포함하는 PRC), 망막 세포, 각막 세포, 각막 상피 세포(CEC), 시신경 세포, 수정체 세포, 맥락막 내피(CE) 세포, 시신경 세포 또는 맥락막 세포인 것인 조성물.

청구항 97

제88항에 있어서, 줄기 세포로부터 유래되는 세포는 뉴런 세포인 조성물.

청구항 98

제88항에 있어서, 돌연변이는 대상체에 대해 내인성(endogenous)인 것인 조성물.

청구항 99

제88항 또는 제98항에 있어서, 돌연변이는 유전자 편집(genetic editing) 또는 유전자 조작(genetic manipulation)을 통해 인위적으로 도입되는 것인 조성물.

청구항 100

제88항에 있어서, 세포주는 대상체에 대해 내인성 및/또는 외인성(exogenous)인 다수의 돌연변이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 101

제88항에 있어서, 대상체는 포유동물인 것인 조성물.

청구항 102

제88항에 있어서, 대상체는 인간인 것인 조성물.

청구항 103

제88항에 있어서, 표적 유전자는 표 4에 제시된 유전자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 104

제88항에 있어서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, 또는 CYP46A 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 105

제88항에 있어서, 표적 유전자는 CYP4V2인 것인 조성물.

청구항 106

제105항에 있어서, 세포주는 iPS 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 107

제105항에 있어서, 세포주는 iPS-RPE 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 108

제105항에 있어서, 세포주는 iPS-광수용체(iPS-PRC) 세포, iPS-각막 상피 세포(iPS-CEC), iPS-맥락막 내피(CE) 세포, iPS-각막 세포, iPS-맥락막 세포, iPS-시신경 세포, iPS-안구 세포 또는 iPS-뉴런 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 109

제88항 또는 제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주 내의 CYP4V2 돌연변이는 대상체에 대해 내인성인 것인 조성물.

청구항 110

제88항 또는 제109항에 있어서, 대상체는 CYP4V2 유전자 또는 CYP4V2 유전자의 오솔로그(ortholog)에 병리학적 돌연변이를 갖는 것인 조성물.

청구항 111

제88항 또는 제109항에 있어서, 대상체는 표 1에 제시된 적어도 하나의 동형접합성(homozygous) 돌연변이 또는 2개 화합물 이종접합성(heterozygous) 돌연변이를 갖는 것인 조성물.

청구항 112

제88항에 있어서, 대상체는 유전성 망막 변성(IRD) 또는 망막색소 변성증(RP)을 갖는 것인 조성물.

청구항 113

제88항에 있어서, 대상체는 비에티 결정 이영양증(BCD, 비에티 결정 각막망막 이영양증, 비에티 결정 망막병증, 비에티 망막 이영양증으로도 알려짐)을 갖거나 BCD가 발생할 위험이 있는 것인 조성물.

청구항 114

제88항 또는 제105항에 있어서, 세포주는 대상체에 대해 외인성이며, 유전자 편집 또는 유전자 조작을 통해 인위적으로 도입되는 적어도 하나의 CYP4V2 돌연변이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 115

제88항 또는 제114항에 있어서, 세포주는 iPS 세포, ES 세포, MSC, 조직-특이적 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포, 또는 RPE 세포, 광수용체 세포, 각막 상피 세포, 맥락막 내피(CE) 세포, 또는 iPS 세포, ES 세포, MSC, 조직 특이적 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포로부터 유래되는 맥락막 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 116

BCD 인간 세포 모델 조성물 또는 CYP4V2 기능장애 세포 모델 조성물로서, iPS 세포 또는 iPS 세포주, 또는 BCD 환자의 세포 또는 세포주로부터 유래되거나, 또는 인위적으로 생성된 이중-대립형질(bi-allelic) CYP4V2 돌연변이를 갖는 세포 또는 세포주로부터 유래되는 iPS-RPE 세포 또는 iPS-RPE 세포주를 포함하는 조성물.

청구항 117

제88항 또는 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주는 건강한 대조군의 상응하는 세포주와 비교하여, 다음의 화합물 그룹 중 하나 이상의 화합물: (i) 지방산, (ii) 세라마이드, (iii) 스펅고마이엘린, (iv) 스펅고신, (v) 스펅가닌, (vi) 하이드록시-지방산, (vii) 코르티코스테로이드, 또는 (viii) 단백질(CYP4V2 이외에)에서 비정상적인 생화학적 프로파일, 또는 비정상적 RPE 기능, 또는 높은 세포 위축, 변성 또는 사멸 수준을 갖는 것인 조성물

청구항 118

제88항 또는 제105항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주는 건강한 대조군의 상응하는 세포주와 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물에서 비정상적인 생화학적 프로파일을 갖는 것인 조성물.

청구항 119

질환 세포 모델에서 이상(abnormality) 또는 표현형(phenotype)을 발견하는 방법으로서, 상기 방법은 환자의 세포주(또는 이러한 질환을 유발하는 유전자에 외인성 돌연변이를 포함하는 유전자 편집 또는 조작된 세포주) 및 건강한 대조군의 세포주의 세포 생존능(cell viability) 수준을 평가하고 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 120

질환 세포 모델에서 이상 또는 표현형을 발견하는 방법으로서, 상기 방법은 환자의 세포주(또는 이러한 질환을 유발하는 유전자에 외인성 돌연변이를 포함하는 유전자 편집 또는 조작된 세포주) 및 건강한 대조군의 세포주의 RPE 기능 수준(예를 들어, 대식세포 활성화(phagocytic activity), 상피투과 저항성(transsepithelial resistance))을 평가하고 비교하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포주는 RPE 세포주(줄기 세포로부터 유래되는 RPE 세포주를 포함)인 것인 방법.

청구항 121

제119항 또는 제120항에 있어서, 세포주 사이의 비교는 빛에 대한 노출없이 이루어지는 것인 방법.

청구항 122

제119항 또는 제120항에 있어서, 세포주 사이의 비교는 빛에 대한 노출 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 123

제119항, 제120항 또는 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주 사이의 비교는 청색 광에 대한 노출 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 124

제119항, 제121항, 제122항 또는 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 생존능은 죽은 세포/살아있는 세포 비율, 병든 세포/건강한 세포 비율 또는 유사한 비율, 또는 죽은 세포/전체 세포 또는 살아있는 세포/전체 세포의 퍼센트로 측정되는 것인 방법.

청구항 125

질환 세포 모델에서 이상 또는 표현형을 발견하는 방법으로서, 상기 방법은

환자의 세포주(또는 이러한 질환을 유발하는 유전자에 외인성 돌연변이를 포함하는 유전자 편집 또는 조작된 세포주)와 건강한 대조군의 세포주 사이의 하나 이상의 화합물의 수준을 평가하고 비교하는 단계를 포함하며, 여기에서 하나 이상의 화합물은 다음의 그룹으로부터 선택되는 것인 방법: (i) 지방산, (ii) 세라마이드, (iii) 스펅고마이엘린, (iv) 스펅고신, (v) 스펅가닌, (vi) 하이드록시-지방산, (vii) 코르티코스테로이드 및/또는 (viii) 단백질.

청구항 126

제125항에 있어서, 평가되는 화합물 중 하나 이상이 표 2에 제시되는 것인 방법.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서, 화합물 수준의 확인 및/또는 평가는 LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, 및/또는 FIA-MS/MS를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 128

제119항, 제120항 또는 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 세포 모델은 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 129

제119항, 제120항 또는 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 세포 모델은 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자 중에서 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 130

BCD 에 대한 치료학적 효능에 대해 시험 제제를 스크리닝하는 방법으로서, 상기 방법은

BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 세포를 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및

이러한 시험 제제와 접촉시키기 전과 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화(normalization); 세포에서 비-결함성 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드 양의 증가; 및/또는 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능, 또는 개선된 세포 생존능에 대해 세포를 평가하는 단계

를 포함하며,

여기에서 이러한 시험 제제와 접촉시키기 전과 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 세포에서 비-결함성 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드 양의 증가; 및/또는 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능 또는 세포 생존능은 BCD에 대한 치료학적 효능을 나타내는 시험 제제를 나타내고;

여기에서 세포주 사이의 비교는 빛에 대한 노출 후 및/또는 빛에 대한 노출없이 이루어질 수 있는 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 시험 제제는 핵산 또는 이의 유사체, 핵산 서열을 함유하거나 폴리펩타이드를 암호화하는 핵

터, 폴리펩타이드 또는 이의 유사체, 항체, 화학물질, 소분자 및/또는 이의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 132

제130항에 있어서, 세포는 PCR 기술, 면역검정법, 서열분석법, 생화학적 검정법, 기능 검정법, 세포 생존능 검정법, 현미경관찰 또는 이의 조합을 사용하여 평가되는 것인 방법.

청구항 133

BCD에 대한 시험 체제를 포함하는 제형, 벡터 또는 구조체(construct)의 효능 또는 효율을 스크리닝하는 방법으로서, 상기 방법은

BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결합이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 다수의 세포 샘플을 다양한 제형, 벡터 또는 구조체로 제형화되거나 패키징된 시험 체제와 접촉시키는 단계; 및

이러한 시험 체제에 의한 처리 전 및/또는 동일한 시험 체제에 의해 처리되지만 상이한 제형, 벡터 또는 구조체로 제형화되거나 패키징된 세포 샘플과 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 세포에서 비-결합성 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2폴리펩타이드 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태, 기능 또는 생존능; 및/또는 세포 저항성 또는 사멸에 대해 세포 샘플을 평가하여, 이러한 제형, 벡터 또는 구조체의 효율 또는 효능을 결정하고 비교하는 단계

를 포함하며,

여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정법, 서열분석법, 생화학적 검정법, 세포 생존능 검정법, 현미경관찰 또는 이의 조합을 사용하여 평가되고;

여기에서 세포주 간의 비교는 빛에 대한 노출 후 및/또는 빛에 대한 노출없이 이루어질 수 있는 것인 방법.

청구항 134

BCD에 대한 시험 체제의 유효하고 안전한 투여량 범위를 스크리닝하는 방법으로서,

BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결합이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 다수의 세포 샘플을 각각의 세포 샘플에 대해 상이한 용량의 시험 체제와 접촉시키는 단계;

이러한 시험 체제에 의한 처리 전 및/또는 동일한 시험 체제이지만 상이한 용량으로 처리된 세포 샘플과 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 세포에서 비-결합성 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2폴리펩타이드 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태, 생존능 또는 기능; 및/또는 세포 저항성 또는 사멸에 대해 세포 샘플을 평가하여, 상이한 용량의 유효성 및 안전성을 결정하고 비교하여 적절한 용량 범위를 결정하는 단계

를 포함하며,

여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정법, 서열분석법, 생화학적 검정법, 기능 검정법, 세포 생존능 검정법, 현미경관찰 또는 이의 조합을 사용하여 평가되고;

여기에서 세포주 간의 비교는 빛에 대한 노출 후 및/또는 빛에 대한 노출없이 이루어질 수 있는 것인 방법.

청구항 135

치료제를 망막 또는 망막 세포에 전달하기 위한 전달 장치 또는 방법의 효능 또는 효율을 스크리닝하거나 평가하는 방법으로서, 상기 방법은

(i) BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결합이 있는 CYP42 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 세포 샘플을 전달 장치 또는 방법을 사용하지 않고 시험 체제와 접촉시키는 단계;

(ii) BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나

나 결합이 있는 CYP42 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 또 다른 세포 샘플을 전달 장치 또는 방법을 사용하여 (i)에서와 동일한 투여량의 시험 제제와 접촉시키는 단계;

(iii) 이러한 시험 제제에 의한 처리 전 및/또는 동일한 용량이지만 전달 장치 또는 방법을 사용하지 않고 동일한 시험 제제에 의한 처리와 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에 있어서의 정규화; 세포에서 비-결합성 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능; 세포 저항성 또는 사멸; 및/또는 세포내 시험 제제의 수준에 대해 (i) 및 (ii)로부터의 세포 샘플을 평가하고 비교하여, 이러한 전달 장치 또는 기술의 효능 또는 효율을 결정하는 단계

를 포함하고,

여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정법, 서열분석법, 생화학적 검정법, 기능 검정법, 세포 생존능, 현미경관찰 또는 이의 조합을 사용하여 평가되고;

여기에서 세포주 간의 비교는 빛에 대한 노출 후 및/또는 빛에 대한 노출없이 이루어지는 것인 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 망막 세포는 RPE 세포인 것인 방법.

청구항 137

동질유전자(isogenic) 대조군을 생성하는 방법으로서, 상기 방법은

본원의 유전자 편집 치료요법에 관한 청구항 또는 RNP 청구항 중 어느 한 항에 의해 환자 세포주에서 돌연변이를 유전적으로 교정하는(genetically correcting) 단계를 포함하는 방법.

청구항 138

생체 내(*in vivo*) 치료를 위한 치료학적 유효 투여량을 평가하고 제안하기 위하여 환자-특이적 iPS-안구 세포를 사용하는 방법으로서, 상기 방법은

생체 내(예를 들어, GC 또는 gp)에서 사용하기 위한 유전자 치료요법 벡터의 용량 수준에 이르도록, 시험관 내(*in vitro*) 환자-특이적 iPS-안구 세포 모델에서 결정된 최적 용량 수준(예를 들어, 시험관 내 유전자 치료요법에 대해 MOI로 나타냄)에 생체내 치료에 대해 표적화된 안구 세포(예를 들어, RPE 세포, 광수용체 세포, 또는 RPE 세포 및 광수용체 세포)의 추정된 수를 곱하는 단계를 포함하며, 이러한 벡터 용량 수준은 승수(예를 들어, 1 내지 10(예를 들어, 망막하 주사의 경우 1 내지 5 또는 유리체내 주사의 경우 5 내지 10; 적용될 승수에 영향을 미치는 다른 인자는 표적화된 영역의 크기, 및 치료될 대상체(예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 체중, 질환의 발달 단계 및 상태, 및 잠재적인 면역 반응(즉, 기존의 NAb); 치료를 위해 표적화된 세포의 위치 및 밀도)에 의해 조정되어 생체내 치료를 위한 치료학적 유효 용량 범위를 제안하며, 이는 임상 시험에 의해 확인되거나 추가로 개선될 수 있는 것인 방법.

청구항 139

제138항에 있어서, 방법은 개별 환자에 대한 생체 내 치료에 사용되는 개별화된(personalized) 최적 용량을 평가하거나 제안하는데 사용되는 것인 방법.

청구항 140

제138항 또는 제139항에 있어서, 질환은 유전성 망막 장애(IRD) 또는 망막색소 변성증(RP)인 것인 방법.

청구항 141

제138항 또는 제139항에 있어서, 질환은 BCD이고, iPS-안구 세포는 iPS-RPE 세포이며, 생체 내 치료를 위한 안구 세포 표적은 RPE 세포인 것인 방법.

청구항 142

(a) CYP4V2 유전자에 대해 100bp 또는 그 이내의 핵산 서열("표적 서열")을 표적화하는 CRISPR 가이드 RNA, 및
(b) 기능적 CRISPR-관련 단백질(Cas)을 포함하는 조성물.

청구항 143

제142항에 있어서, (c) CYP4V2 유전자 또는 이의 일부의 교정(correction), 파괴(disruption) 또는 대체(replacement)를 위한 CYP4V2 유전자의 야생형 서열 또는 기능적 서열 전부 또는 이의 일부를 포함하는 공여체(donor) 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 144

제142항 또는 제143항에 있어서, 이의 하나 이상의 성분은 이러한 성분을 암호화하는 DNA 분자, 이러한 성분을 암호화하는 mRNA 분자, RNA 분자, 폴리펩타이드, 및/또는 리보핵단백질(RNP) 또는 단백질-RNA 복합체의 형태로 제공되는 것인 조성물.

청구항 145

제142항 또는 제143항에 있어서, 이의 2개 이상의 성분은 별개의 분자에 있거나 하나의 분자 또는 하나의 복합체로 조합되고, 별개의 벡터에 있거나 하나의 벡터로 조합되고, 하나 이상의 핵산 복합체에 있거나, 하나 이상의 RNP 복합체에 있는 것인 조성물.

청구항 146

제143항에 있어서, 공여체 핵산 서열은 단일-가닥 공여체 올리고뉴클레오타이드(ssODN) 또는 벡터로 제공되는 것인 조성물.

청구항 147

제142항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 플라스미드, 재조합 AAV 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 및/또는 이의 조합인 것인 조성물.

청구항 148

제142항 내지 제147항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 병리학적 CYP4V2 돌연변이를 갖는 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 149

제142항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 (i) 표적 유전자("표적 유전자")에 대하여 100bp 또는 그 이내의 표적 서열에 대해 상보적인 프로토스페이스 요소 서열(protospacer element sequence) 및 트랜스-활성화 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)의 상보적 영역에 상응하는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA), 및 (ii) crRNA의 상응하는 영역에 대해 상보적인 영역 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)과 상호작용하는 서열을 포함하는 tracrRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질이 Cas9를 포함하는 것인 조성물.

청구항 150

제149항에 있어서, 프로토스페이스 요소는 약 20개 염기, 약 19개 염기, 약 21개 염기, 약 19 내지 21개 염기, 약 18 내지 22개 염기 또는 약 16 내지 24개 염기인 것인 조성물.

청구항 151

제149항 또는 제150항에 있어서, crRNA 및 tracrRNA가 별개의 분자인 것인 조성물.

청구항 152

제149항 또는 제150항에 있어서, crRNA 및 tracrRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)로 결합되는 것인 조성물.

청구항 153

제152항에 있어서, sgRNA는 약 88 내지 150 bp인 것인 조성물.

청구항 154

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9는 다음으로부터 선택되는 Cas9 오솔로그 또는 돌연변이체 Cas9를 포함하는 것인 조성물: 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(SpCas9), SpCas9 닉카아제 (Cas9n D10A), SpCas9(D1135E), eSpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9 VRER, SpCas9 VQR, SpCas9EQR, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(SaCas9), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria Meningitidis*), 스트렙토코쿠스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 파스퇴렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 바실러스 스미티이(*Bacillus smithii*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 마이코플라스마 카니스(*Mycoplasma canis*) 및 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*).

청구항 155

제142항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적 서열에 대해 상보적인 프로토스페이서 요소 서열을 포함하는 crRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cpf1을 포함하는 것인 조성물.

청구항 156

제142항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR-관련 단백질, Cas9 또는 Cpf1은 N-말단 및/또는 C-말단에서 1, 2, 또는 3개 이상의 핵 국재화 서열(nuclear localization sequence, NLS), 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 157

제142항에 있어서, 프로토스페이서 요소 서열은 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 표적화하기 위한 프로토스페이서 인접 모티프(proto-spacer adjacent motif, PAM)로서 NGG를 갖는 Cas 단백질과 함께 사용하기 위한, 서열번호 48 내지 52로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 서열번호 48 내지 52 중 임의의 하나와 적어도 85% 서열 동일성을 공유하는 것인 조성물.

청구항 158

제142항, 제143항 및 제157항 중 어느 한 항에 있어서, CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정하거나, 파괴하거나 대체하는데 사용하기 위한, 공여체 핵산 서열은 서열번호 56 및 57로부터 선택되거나, 서열번호 56, 57 중 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 공유하거나, 또는 이의 상보적인 서열인 것인 조성물.

청구항 159

- 돌연변이된 CYP4V2 유전자를 갖는 대상체 또는 세포에서 BCD를 치료하거나 예방하는 방법으로서,
- (i) 서열분석을 통해 대상체 또는 세포에서 병리학적 돌연변이를 확인하는 단계;
 - (ii) 돌연변이에 관여하는 첫번째 뉴클레오타이드로부터 약 100 bp 상류에서 돌연변이에 관여하는 마지막 뉴클레오타이드로부터 약 100 bp 하류에 이르는 영역 내의 Cas 관련된 PAM 부위를 발견하는 단계;
 - (iii) (ii)에서 확인된 각각의 PAM 부위와 관련된 CYP4V2 서열을 표적화하는 다양한 프로토스페이서 요소를 확인하는 단계;
 - (iv) (iii)에서 확인된 프로토스페이서 요소 서열 및 프로토스페이서 요소 서열과 PAM을 기반으로 한 오프-타겟 편집 프로파일(off-target editing profile)을 포함하는 각각의 CRISPR 가이드 RNA의 활성 수준을 평가하는 단계;
 - (v) (iv)를 기반으로 하나 이상의 CRISPR 가이드 RNA 설계를 선택하는 단계;
 - (vi) 표적화된 CYP4V2 돌연변이를 교정하거나, 파괴하거나, 대체하기 위한 상동성-기반 복구(homology-directed repair: HDR)를 기반으로 하나 이상의 공여체 핵산 서열을 설계하는 단계;
 - (vii) 조성물 청구항 제1항 내지 제18항에서 제공된 바와 같은 CRISPR 가이드 RNA, Cas 및 공여체 핵산 서열을

제작하는 단계;

(viii) 대상체로부터 분리되는 세포; 또는 대상체로부터 유래되는 iPS 세포 또는 대상체로부터 유래되는 줄기 세포로부터 분화되는 세포, 또는 대상체로부터 분리되는 게놈 DNA에서 (vii)의 성분을 선택적으로 확인하고 추가로 선택하여 활성 수준 및/또는 오프-타겟 편집 프로파일을 평가하는 단계; 및

(ix) (viii)의 성분을 리보핵단백질 또는 단백질-RNA 복합체, 벡터, 단백질, 핵산 분자, 나노입자, 리포솜, 미셀, 비로솜, 핵산 복합체 및/또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 전달 시스템을 통해 대상체 또는 세포에 투여하는 단계, 여기에서 전달은 전기 천공법(electroporation)에 의해, 또는 지질-매개 형질감염(lipid-mediated transfection), 또는 핵감염(nucleofection), 또는 바이러스 형질도입(viral transduction) 또는 주입, 또는 이들의 조합을 통하여 수행됨

를 포함하는 방법.

청구항 160

대상체의 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)의 세포에서 CYP4V2 유전자 내 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정하거나 대체하기 위한 유전자 편집 조성물로서,

(i) 서열번호 48 내지 52 중 하나로부터 선택되는 프로토스페이서 요소 서열을 포함하거나, 서열번호 48 내지 52의 서열 중 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 공유하는 CRISPR 가이드 RNA;

(ii) 서열번호 56 및 57 중 하나로부터 선택되거나, 서열번호 56 및 57 중 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 공여체 핵산 서열, 또는 이의 상보적인 서열; 및

(iii) 1, 2, 3개 이상의 NLS를 선택적으로 함유하는 Cas9 단백질(서열번호 58에 나타난 예시적인 서열), 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커

를 포함하는 조성물.

청구항 161

제160항에 있어서, 선택적 뉴클레오타이드 G(서열번호 59)가 프로토스페이서 요소 서열 앞에 첨가되는 것인 조성물.

청구항 162

제160항 또는 제161항에 있어서, CRISPR 가이드 RNA는 crRNA(서열번호 53에 나타난 예시적인 서열 (5' 프로토스페이서 요소 서열 제외)) 및 tracrRNA(서열번호 54에 나타난 예시적인 서열)를 포함하고; 프로토스페이서 요소 서열은 crRNA에 함유되는 것인 조성물.

청구항 163

제160항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR 가이드 RNA는 프로토스페이서 요소 서열(서열번호 55에 나타난 예시적인 sgRNA 서열(5' 프로토스페이서 요소 서열 제외))을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 164

제160항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, (i), (ii) 및 (iii) 중 하나 이상의 성분이 이러한 성분을 암호화하는 DNA 분자, 이러한 성분을 암호화하는 mRNA 분자, 핵산 분자, 벡터, RNA 분자, 폴리펩타이드, 리보핵단백질(RNP) 또는 단백질-RNA 복합체, 및/또는 이의 조합의 형태로 제공되는 것인 조성물.

청구항 165

대상체에서 눈 질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서,

질환은 CYP4V2 유전자의 병리학적 유전자 변이 또는 후성(epigenetic) 유전자 변이와 관련되고, 방법은 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포 및/또는 줄기 세포로부터 유래되는 다

른 세포 또는 다른 안구 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 166

제165항에 있어서, 줄기 세포는 배아 줄기(ES) 세포, iPC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 167

제165항에 있어서, 줄기 세포는 BCD를 가지지 않거나 병리학적 CYP4V2 유전자를 가지지 않은 하나 이상의 대상체로부터의 것이거나 또는 이로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 168

제165항에 있어서, 줄기 세포는 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 하나 이상의 대상체로부터의 것이거나 또는 이로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 169

제165항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간 대상체인 것인 방법.

청구항 170

(a) BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 대상체로부터 분리되는 세포 또는 줄기 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포, 또는 (2) 대상체로부터 분리된 줄기 세포로부터 분화되거나, BCD에 의해 영향받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 가진 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍된 세포를 포함하는 세포 조성물.

청구항 171

제170항에 있어서, 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포는 iPC 세포인 것인 조성물.

청구항 172

제170항에 있어서, iPS 세포는 대상체로부터의 체세포로부터 재프로그래밍된 것인 조성물.

청구항 173

제170항에 있어서, iPS 세포는 피부 세포, 혈액 세포, 요세포, 모발 세포, 섬유아세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 신장 상피 세포, 모낭, 또는 모유두 세포로부터 재프로그래밍된 것인 조성물.

청구항 174

제170항에 있어서, 대상체로부터 분리된 줄기 세포는 MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포인 것인 조성물.

청구항 175

제170항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 안구 세포인 것인 조성물.

청구항 176

제170항 또는 제175항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 RPE 세포, PRC, 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, CEC 또는 CE 세포인 것인 조성물.

청구항 177

제170항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC 또는 iPS-CE 세포인 것인 조성물.

청구항 178

제170항에 있어서, (i) BCD에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되거나 iPSC로 재프로그래밍하는데 사용하기 위한 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 가진 세포, (ii) 대상체로부터 분리된 줄기 세포 또는 BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 가진 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 iPS 세포, 또는 (iii) 대상체로부터 분리된 줄기 세포로부터 분화된 세포 또는 BCD에 의해 영향받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 가진 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 iPS 세포가 유전자 복구되어 돌연변이된 CYP4V2 유전자의 효과를 개선시키는 것인 조성물.

청구항 179

제178항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 180

제178항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 치료요법 청구항 중 어느 한 항에 따른 임의의 조성물 또는 방법을 사용하는 것에 의한 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 181

제1항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 182

제181항에 있어서, 유전자 복구는 CRISPR 유전자 치료요법 청구항 중 어느 한 항에 따른 임의의 조성물 또는 방법을 사용하는 것에 의한 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 183

BCD에 의해 영향받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 가진 대상체에서 눈 질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

CYP4V2 자가 세포 조성물과 관련된 청구항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포, 및/또는 다른 안구 세포 또는 대상체의 줄기 세포로부터 유래되는 다른 안구 세포를 포함하는 유전자 복구된 세포를 포함하는 방법.

청구항 184

제183항에 있어서, 줄기 세포는 iPC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 185

제184항에 있어서, iPS 세포는 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC 전사 인자 중 하나 이상을 사용하여 재프로그래밍된 것인 방법.

청구항 186

제1항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구된 세포는 유전자 복구가 수행되기 전과 비교하여, 다음 중 하나 이상을 입증하는 것인 방법: 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 세포에서 결합이 없는 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 기능적 CYP4V2 폴리펩타이드 양의 증가; 및/또는 개선된 세포 구조, 형태, 생존능 또는 기능.

청구항 187

제1항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 투여되는 세포의 양은 단일 투여시 약 1,000 내지 약 1,000만개 세포인 것인 방법.

청구항 188

제1항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사를 통해 이루어지는

것인 방법.

청구항 189

제1항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 세포를 대상체의 눈의 망막하 공간, 후안부(posterior segment), 또는 각막으로 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것인 방법.

청구항 190

제1항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 세포 현탁액의 주사를 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 191

제1항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 시트(sheet), 매트릭스(matrix), 스캐폴드(scaffold), 조직(tissue) 또는 3D 망막 구조(3D retinal structure)의 일부로서 투여되는 것인 방법.

청구항 192

제1항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, RPE 세포는 천연 및/또는 합성 스캐폴드를 사용하여 투여되어 기능적RPE 단층을 생성하는 것인 방법.

청구항 193

제1항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간 대상체인 것인 방법.

청구항 194

(a) 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리된 세포 또는 이로부터 분리된 줄기 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포, 또는 (2) 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은, 대상체로부터 분리된 줄기 세포로부터 분화되거나 또는 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 세포를 포함하는 세포 조성물.

청구항 195

제194항에 있어서, 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍되는 줄기 세포는 iPS 세포인 것인 조성물.

청구항 196

제195항에 있어서, iPS 세포는 대상체로부터의 체세포로부터 재프로그래밍되는 것인 조성물.

청구항 197

제195항 또는 제196항에 있어서, iPS 세포는 피부 세포, 혈액 세포, 요세포, 모발 세포, 섬유아세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 신장 상피 세포, 모근, 또는 모유두 세포로부터 재프로그래밍되는 것인 조성물.

청구항 198

제194항에 있어서, 대상체로부터 분리된 줄기 세포는 MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포인 것인 조성물.

청구항 199

제194항에 있어서, 유전자는 안구 발달 또는 기능에 관련되어 있고/있거나 이의 돌연변이는 안질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자인 것인 조성물.

청구항 200

제194항에 있어서, 유전자는 신경 발달 또는 기능에 관련되어 있고/있거나 이의 돌연변이는 신경퇴행성 질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자인 것인 조성물.

청구항 201

제194항에 있어서, 유전자는 사이토크롬 P450 유전자인 것인 조성물.

청구항 202

제194항에 있어서, 유전자는 표 4에 제시된 것인 조성물.

청구항 203

제194항에 있어서, 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, 또는 CYP46A 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 204

제1항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 임의의 유형의 세포인 것인 조성물.

청구항 205

제1항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 안구 세포인 것인 조성물.

청구항 206

제1항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 RPE 세포, PRC, 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, CEC, CE 세포 또는 시신경 세포인 것인 조성물.

청구항 207

제1항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC 또는 iPS-CE 세포인 것인 조성물.

청구항 208

제1항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포로부터 분화된 세포는 뉴런인 것인 조성물.

청구항 209

제1항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 iPSC로 재프로그래밍 하는데 사용하기 위한, 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리된 세포, (ii) 대상체로부터 분리된 줄기 세포 또는 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 iPS 세포, 또는 (iii) 대상체로부터 분리된 줄기 세포로부터 분화된 세포 또는 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리된 세포로부터 재프로그래밍된 iPS세포는 유전자 복구되어 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자의 효과를 개선시키는 것인 조성물.

청구항 210

제1항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 211

제1항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 치료요법과 관련된 청구항 중 어느 한 항에 따른 임의의 조성물 또는 방법을 사용하는 것에 의한 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 212

제1항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 213

제1항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 복구는 CRISPR 유전자 편집 치료요법과 관련된 청구항 중 어느 한 항에 따른 임의의 조성물 또는 방법을 사용하는 것에 의한 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어지는 것인 조성물.

청구항 214

표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 영향을 받은 대상체에서 질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 자가 세포 조성물에 관한 청구항 중 어느 한 항에 따른 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 뉴런, 맥락막 내피(CE) 세포 및/또는 다른 안구 세포 또는 대상체의 줄기 세포로부터 유래되는 다른 세포를 포함하고, 여기에서 세포 조성물에서 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자는 유전자 복구되는 것인 방법.

청구항 215

대상체를 자가 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

- (i) 눈 질환을 가진 대상체로부터의 세포를 제공하는 단계;
- (ii) 대상체로부터의 세포에 만능성(pluripotency)을 유도하여 iPSC를 생산하는 단계;
- (iii) 대상체로부터 유래되는 iPSC에서 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 내의 하나 이상의 돌연변이를 유전자 편집 치료요법을 통해 유전자 복구하는 단계;
- (iv) iPSC를 대체 이식에 필요한 안구 세포 또는 다른 세포로 분화시키는 단계;
- (v) 단계 (iii)에 대한 대안으로, 유전자 이식 치료요법을 통해 iPS-유래 세포를 유전자 복구하는 단계; 및
- (vi) iPS-유래 세포를 대상체로 도입하여 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자("표적 유전자")와 관련된 질환을 가진 대상체를 자가 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 216

제214항 또는 제215항에 있어서, 줄기 세포는 iPC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 217

제216항에 있어서, iPS 세포는 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC 전사 인자 중 하나 이상을 사용하여 재프로그래밍된 것인 방법.

청구항 218

제214항 또는 제215항에 있어서, 유전자 복구된 세포는 다음 중 하나 이상을 입증하는 것인 방법: 유전자 복구가 수행되기 전과 비교하여, 세포에서 결함이 없는 표적 유전자 핵산 서열의 증가; 세포에서 표적 유전자에 의해 암호화되는 기능적 폴리펩타이드 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태, 생존능 또는 기능, 및/또는 세포에서

개선되거나 정규화된 생화학적 기능.

청구항 219

제1항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 투여되는 세포의 양은 단일 투여시 약 1,000 내지 약 1,000만개 세포인 것인 방법.

청구항 220

제1항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 주사, 망막하 주사, 또는 유리체내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 221

제1항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 세포를 대상체의 눈의 망막하 공간, 후안부, 또는 각막, 또는 대체 세포가 요구되는 조직 또는 기관에 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것인 방법.

청구항 222

제1항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 세포 현탁액의 주사를 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 223

제1항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 시트, 매트릭스, 스캐폴드, 조직 또는 3D 망막 구조의 일부로서 투여되는 것인 방법.

청구항 224

제1항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, RPE 세포는 천연 및/또는 합성 스캐폴드를 사용하여 투여되어 기능적 RPE 단층을 생성하는 것인 방법.

청구항 225

제1항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간 대상체인 것인 방법.

청구항 226

제1항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 표 4에 제시된 유전자에서의 대상체의 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이 또는 위험 인자와 관련되어 있는 것인 방법.

청구항 227

제1항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 광수용체 변성, 망막 색소 상피 세포 변성, 망막 변성, 각막 변성, 및/또는 맥락막 장애인 것인 방법.

청구항 228

제1항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 유전성 망막 변성(IRD)인 것인 방법.

청구항 229

제1항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 망막색소 변성증(RP)인 것인 방법.

청구항 230

제1항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 비에티 결정 이영양증(비에티 결정 각막망막 이영양증(BCD)으로도 알려져 있음)인 것인 방법.

청구항 231

제1항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 신경 변성과 관련된 것인 방법.

청구항 232

제1항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 각막 이영양증인 것인 방법.

청구항 233

제1항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 BCD를 가지거나 BCD가 발생할 위험이 있는 것인 방법.

청구항 234

제1항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 섬유아세포, 혈액 세포 또는 안구 세포인 것인 조성물.

청구항 235

제1항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 소변으로부터 또는 모발 또는 모낭으로부터 획득되는 것인 조성물.

청구항 236

제1항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포 또는 광수용체 세포(PRC)인 것인 조성물.

청구항 237

제1항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 다형성(polymorphism), 부적절한 메틸화, 부적절한 탈메틸화, 및 이의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 238

제1항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이인 것인 조성물.

청구항 239

제1항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터의 iPSC-안구 세포의 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 유전자 편집 치료요법을 사용하여 유전자 복구되어 있는 것인 조성물.

청구항 240

제1항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집 치료요법은 아연-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), TALEN 기술 또는 CRISPR 기술을 이용하는 것인 조성물.

청구항 241

제1항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터의 iPSC-안구 세포의 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 유전자 이식 치료요법을 사용하여 유전자 복구되는 것인 조성물.

청구항 242

제1항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 이식 방법은 재조합 AAV 벡터 또는 또 다른 바이러스 벡터 또는 비-바이러스성 벡터를 이용하여 표적 유전자(예를 들어, cDNA)의 건강한 카피를 이식될 세포로 전달하는 것인 조성물.

청구항 243

제1항 내지 제242항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 단계는 질환 증상의 발생 전 또는 질환 증상의 발생 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 244

제1항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 눈에 대해 또는 뉴런을 포함하는 또 다른 기관 또는 조직

에 대해 이루어지는 방법.

청구항 245

제1항 내지 제244항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 주사, 망막하 또는 유리체내 주사, 직접 망막 주사에 의한 것인 방법.

청구항 246

제1항 내지 제245항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 세포를 대상체의 눈의 망막하 공간, 후안부, 또는 각막으로, 또는 대체 세포가 필요한 조직 또는 기관에 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것인 방법.

청구항 247

제1항 내지 제246항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 또는 이식 전에, 세포에 대한 유전자형 분석을 수행하여 표 4에 제시된 하나 이상의 유전자에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이의 존재 또는 부재를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 248

제1항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이인 것인 방법.

청구항 249

제1항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이는 CYP4V2 핵산 분자에 있는 것인 방법.

청구항 250

제1항 내지 제249항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 전에 대상체의 눈을 평가하여 손상되거나 보유하고 있는 광수용체, 망막 세포 또는 각막 세포의 영역(들) 및 정도를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 251

제1항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후, 대상체를 모니터링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 252

제1항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 모니터링은 비-침습성 망막 이미징, 각막 시험, 압 적응, 대비 감도, 시야 측정법, ERG, OCT, 시력 검사 및/또는 기능 연구를 수행하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 253

제1항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 모니터링은 면역 반응에 대해 대상체를 평가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 254

제1항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 후, 대상체의 눈을 평가하여 손상되거나 보유하고 있는 광수용체, 망막 세포, 또는 각막 세포의 영역(들) 및 정도를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 255

(a) 표적 유전자("표적 유전자")에 대해 100bp 또는 그 이내의 핵산 서열("표적 서열")을 표적화하는 CRISPR 가이드 RNA, 및 (b) 리보핵단백질(RNP) 또는 단백질-RNA 복합체에, 기능적 CRISPR-관련 단백질(Cas)을 포함하는 조성물.

청구항 256

제255항에 있어서, (c) 이러한 표적 유전자 또는 이의 일부의 교정 또는 대체를 위한 표적 유전자의 야생형 서열 또는 기능적 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 공여체 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 257

제255항 또는 제256항에 있어서, 표적 유전자는 안질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자인 안구 발달 또는 기능 및/또는 돌연변이에 관여하는 것인 조성물.

청구항 258

제255항 또는 제256항에 있어서, 표적 유전자는 신경퇴행성 질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자인 신경 발달 또는 기능 및/또는 돌연변이에 관여하는 것인 조성물.

청구항 259

제255항 또는 제256항에 있어서, 표적 유전자는 사이토크롬 P450인 것인 조성물.

청구항 260

제255항 또는 제256항에 있어서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 표 4에 제시된 유전자를 포함하거나, 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 것인 조성물.

청구항 261

제256항에 있어서, 공여체 핵산 서열은 단일-가닥 공여체 올리고뉴클레오타이드(ssODN) 또는 벡터로 제공되는 것인 조성물.

청구항 262

제255항 내지 제261항 중 어느 한 항에 있어서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 (i) 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적 서열에 대해 상보적인 프로토스페이서 요소 서열 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)의 상보적 영역에 상응하는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA), 및 (ii) crRNA의 상응하는 영역에 대해 상보적인 영역 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)와 상호작용하는 서열을 포함하는 tracrRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cas9를 포함하는 것인 조성물.

청구항 263

제261항 또는 제262항에 있어서, crRNA 및 tracrRNA는 상이한 핵산 분자에 있는 것인 조성물.

청구항 264

제261항 또는 제262항에 있어서, crRNA 및 tracrRNA는 단일의 가이드 RNA(sgRNA)에 결합되는 것인 조성물.

청구항 265

제261항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9는 다음으로부터 선택되는 Cas9 오솔로그(ortholog) 또는 돌연변이체 Cas9를 포함하는 것인 조성물: 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(SpCas9), SpCas9 닉카아제(Cas9n D10A), SpCas9(D1135E), eSpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9 VRER, SpCas9 VQR, SpCas9EQR, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(SaCas9), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria Meningitidis*), 스트렙토코쿠스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 파스퇴렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 바실러스 스미티이(*Bacillus smithii*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 마이코플라스마 카니스(*Mycoplasma canis*) 및 엔테로코쿠스 파에칼리스(*enterococcus faecalis*)..

청구항 266

제255항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적서열에 대해 상보적인 프로토스페이서 요소를 포함하는 crRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cpf1을 포함하는 것인 조성물.

청구항 267

제255항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR-관련 단백질, Cas9, 또는 Cpf1이 N-말단 및/또는 C-말단에서 1, 2 또는 3개 이상의 핵 국제화 서열(NLS) 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 268

제255항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토스페이서 요소는 표적 서열에 대해 100% 상보성이거나, 표적 서열에 상응하는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오타이드 미스매치(mismatch)를 함유하는 것인 조성물.

청구항 269

제255항 또는 제256항에 있어서, crRNA 서열은 프로토스페이서 요소 바로 앞의 cdRNA 서열에 선택적으로 첨가된 G 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 270

제255항 내지 제269항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR 가이드 RNA, crRNA 및/또는 tracrRNA, 또는 sgRNA는 화학적으로 변형된 것인 조성물.

청구항 271

제255항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 유전자의 야생형 버전은 효소를 암호화하는 것인 조성물.

청구항 272

제255항 또는 제256항에 있어서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, 또는 CYP46A 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 273

제255항 내지 제272항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질, 및/또는 공여체 핵산 서열을 포함하는 이의 임의의 하나 이상의 성분은 벡터, DNA 및/또는 이러한 성분으로 전사 및/또는 번역할 수 있는 mRNA에 별도로 및/또는 추가로 제공되는 것인 조성물.

청구항 274

제255항 또는 제273항에 따른 조성물을 포함하는 약제학적으로 허용 가능한 제형.

청구항 275

제255항 내지 제274항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 질환을 치료하는 방법.

청구항 276

제157항 내지 제255항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해

유발된 대상체의 안질환을 치료하거나, 이와 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법.

청구항 277

제255항, 제256항, 또는 제258항 내지 제276항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 신경퇴행성 질환을 치료하거나, 이와 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법.

청구항 278

제255항 내지 제277항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 사이토크롬 P450 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 사이토크롬 P450 유전자에 의해 유발된 대상체의 질환을 치료하거나 이와 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법.

청구항 279

제278항에 있어서, 파괴되거나, 교정되거나 대체된, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 표 4에 제시된 유전자의 돌연변이되거나 결함이 있는 버전, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 표 4에 제시된 유전자의 버전인 것인 방법.

청구항 280

제278항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포에 존재하는 것인 방법.

청구항 281

제278항 또는 제279항에 있어서, 조성물은 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포로 전달되는 것인 방법.

청구항 282

제281항에 있어서, 전달은 전기천공에 의해 또는 지질-매개성 형질감염, 또는 핵감염, 또는 바이러스 형질도입, 또는 주사 또는 이의 조합을 통해 수행되는 것인 방법.

청구항 283

제278항 내지 제282항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질, 및/또는 공여체 핵산 서열을 포함하는 이의 임의의 하나 이상의 성분은 대상체 또는 세포에 리보핵단백질 또는 단백질-RNA 복합체, 나노입자, 리포솜, 미셀, 비로솜, 핵산 복합체, 및/또는 이의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 전달 시스템을 통해 투여되는 것인 방법.

청구항 284

제278항 내지 제283항 중 어느 한 항에 있어서, 치료는 대상체의 생체 내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 285

제278항 내지 제283항 중 어느 한 항에 있어서, 치료는 시험관 내 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포에서 수행되는 것인 방법.

청구항 286

제285항에 있어서, 처리된 세포는 대상체의 생체 내로 이식되거나, 처리되는 세포가 줄기 세포인 경우, 이러한 줄기 세포는 이식을 위해 원하는 유형의 세포로 분화된 후 분화된 세포가 대상체의 생체 내로 이식되는 것인 방

법.

청구항 287

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 대체되는 것인 방법.

청구항 288

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 교정되거나 대체된 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인 방법.

청구항 289

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 파괴되는 것인 방법.

청구항 290

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 1 내지 20개, 21 내지 40개, 41 내지 60개, 61 내지 80개, 81 내지 100개, 101 내지 1000개, 1001 내지 10000개의 염기 쌍의 뉴클레오타이드 또는 돌연변이가 파괴되거나, 교정되거나 대체되는 것인 방법.

청구항 291

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자의 영역이 파괴되거나, 교정되거나 대체되는 것인 방법.

청구항 292

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자의 약 10, 8, 6, 4, 2 또는 1 kb 미만의 영역이 파괴되거나, 교정되거나 대체되는 것인 방법.

청구항 293

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 뉴클레오타이드의 삽입 및/또는 결실을 통해 파괴되거나, 교정되거나 대체되는 것인 방법.

청구항 294

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 하나의 대립형질 또는 대립형질 둘 다에서 파괴되거나, 교정되거나 대체되는 것인 방법.

청구항 295

제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 상이한 CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질 및/또는 공여체 핵산 서열을 사용하여 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분 기능을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에서 하나 이상의 돌연변이 또는 결함을 파괴하거나, 교정하거나, 대체하는 것인 방법.

청구항 296

제278항에 있어서, 대상체는 포유동물인 것인 방법.

청구항 297

제278항에 있어서, 대상체는 인간인 것인 방법.

청구항 298

제278항에 있어서, 방법은 안구 발달 또는 기능을 개선시키거나, 안구, 망막 또는 각막 변성을 예방하는 것인 방법.

청구항 299

제278항에 있어서, 방법은 신경학적 발달 또는 기능을 개선시키거나, 신경 변성을 예방하는 것인 방법.

청구항 300

제278항에 있어서, 방법은 P450 효소의 발현 또는 기능을 개선시키는 것인 방법.

청구항 301

제255항, 제257항, 제258항 또는 제259항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 돌연변이되거나 변경된 표적 유전자 또는 이의 일부의 생성을 위해 돌연변이 또는 변경을 갖는 표 4에 제시된 표적 유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 공여체 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 302

표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자를 갖는 세포를 포함하는 조성물.

청구항 303

본원의 청구항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, 또는 CYP46A 유전자를 갖는 세포를 포함하는 조성물.

청구항 304

제303항에 있어서, 벡터는 AAV 벡터인 것인 조성물.

청구항 305

제1항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토스페이서 요소 서열은 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 표적화하기 위한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)로서 NGG를 갖는 Cas 단백질과 함께 사용하기 위한, 서열번호 48 내지 52로 이루어지는 균으로부터 선택되거나, 서열번호 48 내지 52 중 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 공유하는 것인 조성물.

청구항 306

제1항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 핵산 서열은 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정하거나, 파괴하거나 대체하는데 사용하기 위한, 서열번호 56 및 57로부터 선택되거나, 서열번호 56 및 57 중 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 것인 조성물.

청구항 307

(i) 유전자 편집 치료요법 조성물 또는 유전자 이식 치료요법 조성물을 포함하는 대상체에 존재하는 병든 세포를 표적화하는 조성물, 및 (ii) 대체 세포를 포함하는 세포 조성물의 조합을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 질환을 치료하는 방법.

청구항 308

제307항에 있어서, 대상체는 인간인 것인 방법.

청구항 309

제307항에 있어서, 질환은 대상체의 세포에서 변성을 유발하는 것인 방법.

청구항 310

제307항 또는 제308항에 있어서, 변성은 RPE 세포, RPC, CEC, CE 세포, 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, 시신경 세포, 안구 세포, 뉴런, 뉴런 세포, 뇌 세포, 간 세포, 폐 세포 및 심장 세포에서 발생하는 것인 방법.

청구항 311

제307항에 있어서, 질환은 표 4에 제시된 유전자에 의해 유발되는 것인 방법.

청구항 312

제307항에 있어서, 유전자 편집 치료요법 조성물은 본원의 유전자 편집 치료요법 청구항 중 어느 한 항에 따른 조성물인 것인 방법.

청구항 313

제307항에 있어서, 유전자 이식 치료요법 조성물은 본원의 유전자 이식 치료요법 청구항 중 어느 한 항에 따른 조성물인 것인 방법.

청구항 314

제307항에 있어서, 세포 조성물은 임의의 본원의 세포 치료요법 청구항 또는 자가 세포 치료요법 청구항의 조성물을 포함하는 것인 방법.

청구항 315

제307항에 있어서, 세포 조성물은 치료될 대상체에 대해 동종이계(allogenic)인 것인 방법.

청구항 316

제307항에 있어서, 세포 조성물은 치료될 대상체에 대해 자기 유래(autologous)인 것인 방법.

청구항 317

제307항 또는 제314항에 있어서, 세포 조성물은 대상체에게 투여 전에 유전자 복구되는 것인 방법.

청구항 318

제307항 또는 제317항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 319

제307항 또는 제318항에 있어서, 유전자 편집 치료요법은 본원의 유전자 편집 치료요법 청구항의 임의의 청구항을 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 320

제307항, 제318항 또는 제319항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집 치료요법은 임의의 본원의 CRISPR RNP 청구항을 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 321

제307항 또는 제317항에 있어서, 유전자 복구는 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 322

제307항 또는 제321에 있어서, 유전자 이식 치료요법은 임의의 본원의 유전자 이식 치료요법 또는 유전자 치료요법을 통해 이루어지는 것인 방법.

청구항 323

제307항에 있어서, (i) 및 (ii)의 조성물은 단일 투여로 투여되는 것인 방법.

청구항 324

제307항에 있어서, (i) 및 (ii)의 조성물은 개별적으로 또는 별개의 투여로 투여되는 것인 방법.

청구항 325

제307항에 있어서, 대체 세포는 줄기 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 326

제307항 및 제325항에 있어서, 대체 세포는 iPS 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 327

제307항 또는 제326항에 있어서, iPS 세포는 치료될 동일한 대상체로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 328

제307항 또는 제326항에 있어서, 대체 세포는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC 또는 iPS-CE 세포인 것인 방법.

청구항 329

제307항 또는 제326항에 있어서, 대체 세포는 iPS-안구 세포인 것인 방법.

청구항 330

제307항 또는 제326항에 있어서, 대체 세포는 iPS-뉴런 세포인 것인 방법.

청구항 331

제307항에 있어서, 방법은 대상체에서 안구 발달 또는 기능을 개선시키거나, 안구, 망막 또는 각막 변성을 예방하는 것인 방법.

청구항 332

제307항에 있어서, 방법은 대상체에서 신경학적 발달 또는 기능을 개선시키거나, 신경 변성을 예방하는 것인 방법.

청구항 333

제307항에 있어서, 방법은 대상체에서 P450 효소의 발현 또는 기능을 개선시키는 것인 방법.

청구항 334

제307항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 안구, 망막, 각막, 맥락막 또는 신경 변성으로 고통받았던 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2017년 7월 31일자로 출원된 "안과 질환을 위한 세포 모델 및 치료요법"이라는 명칭의 미국 특허 출원

[0001]

[0002]

제62/539,473호에 대한 35 U.S.C. § 119(e) 하에서의 우선권을 주장한다. 상기 내용의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] **비에티 결정 이영양증(비에티 결정색소망막 이영양증, *Bietti's Crystalline Dystrophy, BCD*)**

[0004] 비에티 결정 이영양증(BCD, 비에티 결정 각막망막 이영양증(Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy), 비에티 결정 망막병증(Bietti Crystalline Retinopathy), 비에티 망막 이영양증(Bietti's Retinal Dystrophy)(OMIM 210370)으로도 알려져 있음)은 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium, RPE)의 위축증(atrophy), 색소 클럼프(pigment clump) 및 맥락막 경화증(choroidal sclerosis)과 관련된, 망막의 후극부(posterior pole)에서의 다수의 작은 반짝이는 황-백색의 결정-유사 침착물(tiny glistening yellow-white crystal-like deposit)을 특징으로 하는 희귀하고, 상염색체 열성(autosomal recessive)이며 실명 가능한(blinding) 망막 이영양증이다. 이는 1937년 지. 비. 비에티(G.B. Bietti) 박사에 의해 처음 확인되었다. BCD 환자의 안저(fundus) 사진 및 SD-OCT 이미지는 결정성 침착물이 주로 망막 색소 상피(RPE)의 망막 측면에 위치함을 보여준다(H. Kojima, A. Otani, K. Ogino et al., "Outer retinal circular structures in patients with Bietti crystalline retinopathy," British Journal of Ophthalmology, vol. 96, pp. 390-393, 2012.). 각막 윤부(corneal limbus)의 결정성 침착물은 BCD를 앓고 있는 인간의 1/4내지 1/3에서 발생하는 것으로 추정되어 왔다(Kaiser-Kupfer et al. Clinical biochemical and pathologic correlations in Bietti's crystalline dystrophy, Am J Ophthalmol., 1994, 118:569-82). 일부 경우에, 수정체(lens)에서도 결정성 침착물이 또한 관찰된다(Chung et al., J Ophthalmol. 57:447-450, 2013). 진행 단계에서, BCD 환자는 진행성 맥락막 경화증, 결정성 침착물의 감소 또는 부재 및 망막 혈관의 약화를 나타내었다(Wada et al. Am J Ophthalmol 2005; 139:894-9). 비정상적인 ERG 및 망막 박화(retinal thinning) 또한 BCD에 존재한다.

[0005] 임상적으로, BCD는 진행성(progressive)이며, RPE의 이영양증 및 변성(degeneration)과 관련이 있다. 동일 환자의 눈 사이의 현저한 비대칭이 일반적이다. 질병 발병 연령과 및 진행은 심지어 같은 가족 내에서도 BCD 환자마다 다르다. 대부분의 환자는 야맹증(night blindness), 제한된 시야(constricted visual field), 불량한 색깔(poor color vision), 황반 변성(macular degeneration) 및 20세 내지 40세 사이에 시력 저하를 겪고 30세 내지 60세 사이에 법적 시각 상실(legal blindness)로 진행된다.

[0006] 맥락막 모세혈관층(choriocapillaris)의 혈관과 광수용체(photoreceptor)의 광-민감성 바깥 세그먼트(light-sensitive outer segment) 사이에 위치하는 RPE는 시각 기능의 유지에 있어서 광수용체(원추 세포(cone) 및 간상 세포(rod))와 밀접하게 상호작용하는 색소 세포(pigmented cell)의 단층이다. RPE의 주요 기능은 감각신경 망막인 광수용체로부터의 폐기물을 양성하고 제거하는 것이다. RPE의 다른 기능은 제한없이 다음을 포함한다: 광 흡수(light absorption), 상피 수송(epithelial transport), 공간 이온 버퍼링(spatial ion buffering), 시각 회로(visual cycle), 식세포 작용(phagocytosis), 분비(secretion) 및 면역 조절(immune modulation)(Strauss, 2005, The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev 85:845-81). 따라서, RPE의 기능장애 및 변성은 시력의 소실을 초래하는 광수용체 기능장애 및 변성을 유발한다. BCD가 RPE의 진행성 이영양증 및 변성과 관련되어 있다는 것을 고려해 볼 때, RPE는 BCD를 연구하고 치료하는데 모두 중요하다.

[0007] BCD는 희귀 질환이다. 하나의 출처는 BCD 발병률(incidence rate)이 1:67,000으로 추정하였다(ghr.nlm.nih.gov/condition/bietti-crystalline-dystrophy#statistics on the World Wide Web). 다른 출처는 BCD 유병률(prevalence)이 모든 RP 환자의 2.5%로 추정하였다(121명의 RP 인덱스 환자 중 3명의 BCD 인덱스 환자, Mataftsi et al., Retina. 24:416-426, 2004를 참조). 이러한 추정에 기초하여, 주어진 RP 발병률은 1:4000으로 추정되고(Hartong et al., Lancet. 368:1795-1809, 2006), BCD 발병률은 1:160,000으로 추정된다. BCD 증상은 망막을 점진적으로 손상시키는 다른 눈 장애의 증상과 유사하므로, 이는 때때로 망막색소 변성증(retinitis pigmentosa, RP)으로 진단되기도 한다(Mataftsi A et al. Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy: a cross-sectional study. Retina. 2004; 24: 416-426). BCD 환자는 아시아, 아프리카, 유럽, 중동, 북아메리카 및 남 아메리카를 비롯한 전세계의 상이한 지역 전반에 걸쳐서 보고되었지만, BCD는 동아시아 출신, 특히 중국 및 일본 인구에서 더욱 흔하게 보고되어 왔다(Hu 1983, Ophthalmic genetics in China. Ophthal Paed Genet 2:39-45; Li et al., Am J Hum Genet. 2004 May; 74(5): 817-826).

[0008] 현재 BCD에 대한 승인된 치료제는 없으며, 환자는 결국 실명한다. 이러한 희귀 질환으로 고생하는 환자를 위해

삶을 변화시키는 치료 옵션을 개발하는 데 대한 강력한 충족되지 않은 의학적 요구가 있다.

- [0009] **CYP4V2**
- [0010] CYP4V2(사이토크롬 P450, 패밀리 4, 서브패밀리 V, 폴리펩타이드 2, (OMIM 608614), 동의어: CYP4A11)는 사이토크롬 P450 슈퍼패밀리의 단백질 중 하나이며, 헴(heme) 티올레이트 사이토크롬 P450 서브패밀리 4(CYP4)의 구성원이다. 사이토크롬 P450(CYP)은 모노옥시게나제 반응으로 알려진, 중요한 헴-함유 단백질이다. 이들은 제노바이오틱스(xenobiotics) 및 내인성 화합물, 예를 들어 스테로이드 및 지방산의 물질대사에 관여한다. 인간 CYP는 주로 세포의 미토콘드리아의 내부 막 또는 소포체에 위치하는 막-관련 단백질이다. P450 단백질은 이들의 특징적인 서열 요소(signature sequence element) FxxGxxxCxG(서열번호 30)에 의해 확인될 수 있으며, 여기에서 밀줄친 시스테인은 헴 철에 대한 축방향 리간드(axial ligand)의 역할을 한다. P450 단백질에 대한 다른 특징적인 서열 요소는 ExxR(서열번호 31)이다. 인간 게놈 프로젝트(Human Genome Project)는 인간 P450 유전자의 수를 57개로 설정하였다. 참조로, 103개의 마우스 P450 유전자와 89개의 랫트 P450 유전자가 있다(Guengerich & Cheng, Pharmacological Reviews, September 2011, 63 (3) 684-699).
- [0011] 인간 CYP4 패밀리는 12개의 유전자 및 10개의 유사(pseudo) 유전자로 이루어진다. 인간 CYP4V2 유전자(HGNC: 23198)는 4q35에 위치하며, 11개의 엑손을 갖는다. CYP4V2 유전자내 돌연변이는 BCD를 유발한다(Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004). CYP4V2는 거의 모든 조직에서 발견되지만, 망막과 RPE에서는 높은 수준으로 발견되며, BCD의 주요 임상 소견을 보여주는 조직인 각막에서는 다소 낮은 수준으로 발견된다(Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004; Nakano M, Kelly EJ, Rettie AE: Expression and Characterization of CYP4V2 as a Fatty Acid omega-Hydroxylase. *Drug Metab Dispos* 2009; Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. *Mol Pharmacol* 2012; 82: 679-686).
- [0012] CYP4V2는 P450 패밀리의 비교적 새로운 구성원이며 BCD는 드문 질환이기 때문에, CYP4V2의 기능은 광범위하게 연구되지 않았다. 이전 연구에 따르면 CYP4V2 단백질은 지방산 물질대사에서 주로 활성을 나타낸다. BCD 환자의 혈청, 림프구 및 피부 섬유아세포에서 지방산과 이들 물질대사의 이상(abnormality)이 입증되었다 (Lee J, Jiao X, Hejtmancik JF et al: The metabolism of fatty acids in human Bietti crystalline dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1707-1714; Lai T, Chu KO, Chan KP et al: Alterations in serum fatty acid concentrations and desaturase activities in Bietti crystalline dystrophy unaffected by CYP4V2 genotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 1092-1097). 다른 연구는 CYP4V2가 오메가-3-다중불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA) 하이드록실라제이며, 형질전환된 인간 RPE 세포주 ARPE-19에서 고도로 발견되는 P450임을 보여주었다(Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. *Molecular pharmacology* 2012; 82: 679-686).
- [0013] 다수의 돌연변이가 CYP4V2 유전자에서 확인되었으며 이는 BCD를 유발하고, 유전자의 11개의 엑손 각각에서 적어도 하나의 돌연변이가 발생하였다. BCD 환자 중에서 가장 흔한 CYP4V2 돌연변이는 c.802-8_810del17insGC(IVS6-8 del/insGC)로도 지칭되는, CYP4V2 유전자의 인트론 6의 말단으로부터 8개의 염기가 시작하는 위치에 삽입된 2개의 염기(GC)를 갖는 17개의 염기 결실을 지칭함, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 포함하는 인간 CYP4V2 유전체(genomic) DNA 영역의 서열을 나타내는 서열번호 46 및 상응하는 야생형 서열을 나타내는 서열번호 47을 참조). c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 인간 CYP4V2 인트론 6-엑손 7 연결부(junction)를 나타내는 하기 서열에 나타나 있다. 인트론 6 서열은 소문자로 표시되며, 엑손 7 서열은 CAP 문자로 표시된다. 괄호로 나타낸 17 bp의 결실 및 GC의 삽입(caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT)(GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA(서열번호 46))은 엑손 7의 스킵핑(skipping)을 야기한다(Xiao et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 409:181-6, 2011; Meng et al., 2014, *Mol. Vis.*, 20:1806-14; Wada et al., *Am J Ophthalmol.* 139:894-9, 2005; Jiao et al., *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471). 최근의 연구에 따르면 c.802-8_810del17insGC 돌연변이의 나이는 중국인의 경우 1,040내지 8,200 세대, 일본인의 경우 300 내지 1100 세대인 것으로 추정된다. Jiao et al., *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471을 참조.
- [0014] 다양한 유형의 CYP4V2 돌연변이가 BCD와 관련된 것으로 밝혀졌으며, 이는 미스센스(missense), 중복(duplicate), 스플라이싱 부위(splice site), 프레임쉬프트(frameshift), 결실(deletion), 삽입(insertion),

삽입결실(indel), 넌센스(nonsense), 다형성(polymorphism)(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성) 및 조기 종결(premature termination)뿐만 아니라 CYP4V2 유전자의 전체 결실 또한 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 인간 BCD 환자 중에서 선택적 CYP4V2 돌연변이의 요약은 본원의 표 1에 제공되며, 다양한 공보 및 온라인 데이터베이스, 예를 들어 LOVD(월드 와이드 웹(World Wide Web) 상의 databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2), OMIM(월드 와이드 웹 상의 omim.org/allelicVariant/608614) 및 ClinVar(월드 와이드 웹 상의 [ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614\[MIM\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM]))에서 찾을 수 있다.

[0015] **[표 1]**

[0016] BCD 환자 중에서 선택적 CYP4V2 돌연변이

엑손	뉴클레오타이드 변화	예측된 단백질 변화
1	c.31C >T	p.Q11X
1	c.64C >G	p.L22V
1	c.71T >C	p.L24P
1	c.77G >A	p.G26D
1	c.130T>A	p.W44R
1	c.134A>C	p.Q45P
1	c.181G>A	p.G61S
1	c.197T>G	p.M66R
IVS1	c.214+1G>A	엑손 1del
IVS1	c.214+25de1T	N/A
IVS1	c.215-2A>G	엑손 2del
IVS1	c.215-1G>A	엑손 2del
2	c.219T>A	p.F73L
2	c.237G>T	p.E79D
2	c.253C>T	p.R85C
2	c.277T>C	p.W93R
2	c.283G>A	p.G95R
2	c.327G>A	N/A
IVS2	c.327+1G>A	p.E72Gfs*5
IVS2	c.327+11G > C	N/A
3	c.332T>C	p.I111T
3	c.335T>G	p.L112*

[0017]

3	c.367A>G	p.M123V
3	c.400G>T	p.G134*
3	c.413+2T>G	스플라이싱 수용체
4	c.518T>G	p.L173W
5	c.637_641delAGTAA	p.S213*
5	c.655T>C	p.Y219H
6	c.677T>A	p.M226K
6	c.694C>T	p.R232*
6	c.724delG	p.D242I fs*35
6	c.732G>A	p.W244*
6	c.761A>G	p.H254R
6	c.772C>T	p.L258F
6	c.791delT	결실
7	c.802-8_806del13	엑손 7del
7	c.802- 8_810del17insGC	엑손 7del
7	c.810delT	p.(Glu271Argfs*34)
7	c.838G>T	p.E280*
7	c.958C>T	p.R320*
7	c.971A>T	p.D324V
7	c.974C>T	p.T325I
IVS7	c.985+3A>G	N/A
8	c.992A>C	p.H331P
8	c.998C >A	p.T333K
8	c.1020G>A	p.W340*
8	c.1021T>C	p.S341P
8	c.1027 T>G	p.Y343D
8	c.1062dupA	p.V355Sfs*4

[0018]

IVS8	c.1091-2A>G	엑손 9del
9	c.1157A>C	p.K386T
9	c.1168C>T	p.R390C
9	c.1169G>A	p.R390H
9	c.1178C>T	p.P393L
9	c.1187C>T	p.P396L
9	c.1198C>T	p.R400C
9	c.1199G>A	p.R400H
9	c.1219G>T	p.E407*
9	c.1225+1 G>A	p.(G364_V408del)
10	c.1226-6_1235del16	엑손 10del
10	c.1328G>A	p.R443Q
10	c.1348C>T	p.Q450*
10	c.1355G>A	p.R452H
10	c.1372G>A	p.V458M
10	c.1393A>G	p.R465G
10	c.1396 A >G	p.N466D
10	c.1399T>C	p.C467R
10	c.1441delT	p.(Ser481Argfs*4)
10	c.1445C>T	p.S482*
11	c.1523G>A	p.R508H
11	c.1526C>T	p.P509L
	c.604G>A	p.(Glu202Lys)
	c.242C>G	p.(Thr81Arg)
	c.604+4A>G	p.(?)
	c.1249dup	p.(Thr417Asnfs*2)
	전체 CYP4V2 결실	*

[0019]

[0020]

이는 선택 목록일 뿐이며, 현재까지 확인되어 보고된 BCD 환자 중에서 모든 병리학적 CYP4V2 돌연변이/변이체를 함유하지 않을 수 있다. 돌연변이는 참조 서열(NM_207352.3) 및 (NP_997235.3)에 대해 비교된다. BCD 환자 중에서 새로운 CYP4V2 병리학적 돌연변이가 계속 확인되고 있다. BCD와 관련된 모든 확인되고 추후 확인되는 병리학적 CYP4V2 돌연변이/변이체는 본원에 참조로 포함된다.

[0021]

유전성 망막 변성(IRD)

[0022]

유전성 망막 변성(IRD)은 실명의 주요 원인이다. 현재 200개 이상의 유전자가 IRD 및 관련 장애에 연루되는 것으로 알려져 있다. 망막색소 변성증(RP)은 인간에서 IRD의 주요 원인(leading form)이다. RP에 대해 3개의 일반적인 유전(상염색체 우성(autosomal dominant), 상염색체 열성(autosomal recessive) 및 X-관련(X-linked))이 존재한다. RP의 세계적인 발병률은 4000명 중 1명으로 추정되며, 상염색체 열성 RP는 RP의 50% 내지 60%를 차지한다(Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. Lancet. 2006;368:1795-809). 유럽에서의 연구에 따르면 BCD 유병률은 모든 RP 환자의 2.5%이며, 비증후군성(nonsyndromic) 상염색체 열성 RP를 앓고 있는 사람의 대략 10%로 추정된다(Mataftsi A, Zografos L, Milla E, Secrian M, Munier FL. Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy: a cross-sectional study. Retina. 2004;24:416-26). 동일 연구에 따르면 또한 BCD는 종종 일반적으로 RP로 진단되는 경우가 있다. 따라서, BCD가 진단되지 않았을 수 있다. BCD는

세계적인 질환이지만, 동아시아, 특히 중국과 일본 인구에서 가장 흔하다(Li et al., Am J Hum Genet. 2004 May; 74(5): 817-826).

- [0023] 표 1 돌연변이에 대한 참조 문헌:
- [0024] Li A, Jiao X, Munier FL, Schorderet DF, Yao W, et al. (2004) Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. Am J Hum Genet 74: 817-826.
- [0025] Xiao X, Mai G, Li S, Guo X, Zhang Q (2011) Identification of CYP4V2 mutation in 21 families and overview of mutation spectrum in Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. Biochem Biophys Res Commun 409: 181-186.
- [0026] Shan M, Dong B, Zhao X, Wang J, Li G, et al. (2005) Novel mutations in the CYP4V2 gene associated with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. Mol Vis 11: 738-743.
- [0027] Rossi S, Testa F, Li A, Yaylacioglu F, Gesualdo C, et al. (2013) Clinical and genetic features in Italian Bietti crystalline dystrophy patients. Br J Ophthalmol 97: 174-179.
- [0028] Lin J, Nishiguchi KM, Nakamura M, Dryja TP, Berson EL, et al. (2005) Recessive mutations in the CYP4V2 gene in East Asian and Middle Eastern patients with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. J Med Genet 42: e38.
- [0029] Manzouri B, Sergouniotis PI, Robson AG, Webster AR, Moore A (2012) Bietti crystalline retinopathy: report of retinal crystal deposition in male adolescent siblings. ARCH OPHTHALMOL 130: 1470-1473.
- [0030] Lai TY, Ng TK, Tam PO, Yam GH, Ngai JW, et al. (2007) Genotype phenotype analysis of Bietti's crystalline dystrophy in patients with CYP4V2 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 5212-5220.
- [0031] Parravano M, Sciamanna M, Giorno P, Boninfante A, Varano M (2012) Bietti crystalline dystrophy: a morpho-functional evaluation. Doc Ophthalmol 124: 73-77.
- [0032] Wada Y, Itabashi T, Sato H, Kawamura M, Tada A, et al. (2005) Screening for mutations in CYP4V2 gene in Japanese patients with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy. Am J Ophthalmol 139: 894-899.
- [0033] Zenteno JC, Ayala-Ramirez R, Graue-Wiechers F (2008) Novel CYP4V2 gene mutation in a Mexican patient with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy. Curr Eye Res 33: 313-318.
- [0034] Lee KY, Koh AH, Aung T, Yong VH, Yeung K, et al. (2005) Characterization of Bietti crystalline dystrophy patients with CYP4V2 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 3812-3816.
- [0035] Yokoi Y, Sato K, Aoyagi H, Takahashi Y, Yamagami M, et al. (2011) A Novel Compound Heterozygous mutation in the CYP4V2 Gene in a Japanese Patient with Bietti's Crystalline Corneoretinal Dystrophy. Case Rep Ophthalmol 2: 296-301.
- [0036] Haddad NM, Waked N, Bejjani R, Khoueir Z, Chouery E, et al. (2012) Clinical and molecular findings in three Lebanese families with Bietti crystalline dystrophy: report on a novel mutation. Mol Vis 18: 1182-1188.
- [0037] Fu Q, Wang F, Wang H, Xu F, Zaneveld JE, et al. (2013) Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 54: 4158-4166.
- [0038] Song Y, Mo G, Yin G (2013) A novel mutation in the CYP4V2 gene in a Chinese patient with Bietti's crystalline dystrophy. Int Ophthalmol 33: 269-276.
- [0039] Jin ZB, Ito S, Saito Y, Inoue Y, Yanagi Y, et al. (2006) Clinical and molecular findings in three Japanese patients with crystalline retinopathy. Jpn J Ophthalmol 50: 426-431.
- [0040] Halford S, Liew G, Mackay DS, Sergouniotis PI, Holt R, Broadgate S, Volpi EV, Ocaka L, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR. Detailed phenotypic and genotypic characterization of bietti crystalline dystrophy. Ophthalmology. 2014; 121:1174-84.

- [0041] Houfa Yin, Chongfei Jin, Xiaoyun Fang, Qi Miao, Yingying Zhao, Zhiqing Chen, Zhaoan Su, Panpan Ye, Yao Wang and Jinfu Yin, Molecular Analysis and Phenotypic Study in 14 Chinese Families With Bietti Crystalline Dystrophy. PLoS One 9 (4), e94960. 2014 Apr 16.
- [0042] Xiao Hong Meng, Hong Guo, Hai Wei Xu, Qi You Li, Xin Jin, Yun Bai, Shi Ying Li, Zheng Qin Yin, Identification of novel CYP4V2 gene 돌연변이s in 92 Chinese families with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy, Molecular Vision (2014); 20:1806-1814.
- [0043] Galuh D N Astuti, Vincent Sun, Miriam Bauwens, Ditta Zobor, Bart P Leroy, Amer Omar, Bernhard Jurklies, Irma Lopez, Huanan Ren, Volkan Yazar, Christian Hamel, Ulrich Kellner, Bernd Wissinger, Susanne Kohl, Elfride De Baere, Rob W J Collin, and Robert K Koenekoop, Novel insights into the molecular pathogenesis of CYP4V2-associated Bietti's retinal dystrophy, Mol Genet Genomic Med. 2015 January; 3(1): 14-29.
- [0044] Xiaodong Jiao, Anren Li, Zi-Bing Jin, Xinjing Wang, Alessandro Iannaccone, Elias I Traboulsi, Michael B Gorin, Francesca Simonelli and J Fielding Hejtmanck, Identification and Population History of CYP4V2 mutations in Patients with Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy, European Journal of 인간 Genetics (2017) 25, 461-471.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0045] **요약**
- [0046] 세포주 청구항
- [0047] 세포주 및 질병 모델 청구항
- [0048] 세포주 조성물
- [0049] 일 양태에서, 세포주를 포함하는 세포 질환 모델이 제공된다. 이러한 질환 모델은 (a) 대상체로부터 제공되거나 대상체로부터 제공되는 세포로부터 재프로그래밍(reprogrammed) 줄기 세포(stem cell), 또는 (2) 표적 유전자에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 대상체로부터 제공되거나 대상체로부터 제공되는 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포로부터 유래되는 세포를 포함한다.
- [0050] 일부 구현예에서, 줄기 세포는 유도 만능 줄기(induced pluripotent stem, iPS) 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 배아 줄기(embryonic stem, ES) 세포, 체세포(somatic)(또는 성체(adult)) 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC)이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 제공되는 세포는 대상체의 임의의 세포 유형 및/또는 임의의 조직으로부터의 세포이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 제공되는 세포는 피부 세포, 섬유아세포(fibroblast) 또는 혈액 세포이다. 일부 구현예에서, 여기에서 대상체로부터 제공되는 세포는 피부 섬유아세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 제공되는 세포는 요세포(urinary cell), 신장 상피 세포(renal epithelial cell), 모낭(hair follicle) 또는 모유두 세포(dermal papilla cell)이다.
- [0051] 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 유래되는 세포는 안구 세포(ocular cell)이다. 일부 구현예에서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 세포(photoreceptor cell, PRC; 간상 세포(rod cell), 원추 세포(cone cell) 및 광수용체 선조 세포(photoreceptor progenitor cell) 포함), 망막 세포(retinal cell), 각막 세포(corneal cell), 각막 상피 세포(corneal epithelial cell, CEC), 시신경 세포(optic nerve cell), 수정체 세포(lens cell), 맥락막 내피(choroidal endothelial, CE) 세포, 시신경 세포(optic nerve cell) 또는 맥락막 세포(choroidal cell)이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 유래되는 세포는 뉴런 세포이다.
- [0052] 일부 구현예에서, 돌연변이는 대상체에 대해 내인성이다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 대상체에 대해 외인성이다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 유전자 편집(genetic editing) 또는 유전자 조작(genetic manipulation)을

통해 인위적으로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포주는 대상체에 대해 내인성 및/또는 외인성인 다수의 돌연변이를 포함한다.

- [0053] 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0054] 일부 구현예에서, 표적 유전자는 표 4에 제시된 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는(defective) CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자, 또는 결함 또는 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 CYP4V2이다.
- [0055] 일부 구현예에서, 세포주는 iPS 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포주는 iPS-RPE 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포주는 iPS-광수용체(iPS-PRC) 세포, iPS-각막 상피 세포(iPS-CEC), iPS-맥락막 내피(CE) 세포, iPS-각막 세포, iPS-맥락막 세포, iPS-시신경 세포, iPS-안구 세포 또는 iPS-뉴런 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포주 내 CYP4V2 돌연변이는 대상체에 대해 내인성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CYP4V2 유전자 또는 CYP4V2 유전자의 오솔로그(ortholog)에 병원성 돌연변이를 갖는다.
- [0056] 일부 구현예에서, 대상체는 표 1에 제시된 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 유전성 망막 변성(IRD) 또는 망막색소 변성증(RP)을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 비에티 결정 이영양증(BCD, 비에티 결정 각막막막 이영양증, 비에티 결정 망막병증, 비에티 망막 이영양증으로도 알려져 있음)을 앓고 있거나, 또는 BCD가 발생할 위험이 있다.
- [0057] 일부 구현예에서, 세포주는 대상체에 대해 외인성인 CYP4V2 돌연변이를 포함하며, 유전자 편집 또는 유전자 조작을 통해 인위적으로 도입된다.
- [0058] 일부 구현예에서, 세포주는 iPS 세포, ES 세포, MSC, 또는 성체 줄기 세포, 또는 RPE 세포, 광수용체 세포, 각막 상피 세포를 포함한다. 맥락막 내피(CE) 세포 또는 맥락막 세포는 iPS 세포, ES 세포, MSC 또는 성체 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, iPS 세포 또는 다른 유형의 줄기 세포는 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다: a. iPS, ES 또는 MSC의 독특한 형태; b. 하나 이상의 만능성 마커(pluripotency marker), 예를 들어Oct-4, Sox-2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG 및 AP; c. 원하는 세포 유형(예를 들어, RPE)으로 분화하는 능력; 및/또는 d. 기형종(teratoma) 검정.
- [0059] 일부 구현예에서, 다른 유형의 줄기 세포로부터 유래되는 iPS-RPE 세포 또는 RPE 세포는 다음을 특징으로 한다: a. 형태: 색소 및 육각형 형태 및/또는 b. 다음의 바이오마커, 레틴알데하이드-결합 단백질 1(retinaldehyde-binding protein 1(RLBP1), 일명: CRALBP), RPE65, BESTROPHIN-1, MITF, LRAT, RDH5, PAX6, MERTK, TYR, ZO-1 및/또는 VINCULIN 중 하나 이상.
- [0060] 다른 양태에서, BCD 인간 세포 모델 또는 CYP4V2 기능 세포 모델이 제공된다. 이러한 모델은 iPS 세포 또는 iPS 세포주, 또는 BCD 환자의 세포 또는 세포주로부터 유래되거나 또는 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 세포 또는 세포주로부터 유래되는 iPS-RPE 세포 또는 iPS-RPE 세포주를 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 세포주는 건강한 대조군의 상응하는 세포주와 비교하여, 하기 화합물 그룹 중 하나 이상의 화합물에서 비정상적인 생화학적 프로파일을 나타낸다: (i) 지방산(fatty acid), (ii) 세라마이드(ceramide), (iii) 스펅고마이엘린(sphingomyelin), (iv) 스펅고신(sphingosine), (v) 스펅가닌(sphinganine) 또는 (vi) 하이드록시-지방산(hydroxy-fatty acid). 일부 구현예에서, 세포주는 건강한 대조군의 상응하는 세포주와 비교하여, 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물에서 비정상적인 생화학적 프로파일을 갖는다.
- [0062] **세포 질환 모델의 제조 방법:**
- [0063] 다른 양태에서, iPS-유래 BCD 질환 모델의 제조 방법이 제공된다. 이러한 방법은 CYP4V2 유전자에 내인성 돌연

변이를 갖는 대상체로부터의 세포 또는 CYP4V2 유전자에 내인성 돌연변이는 없지만 외인성 CYP4V2 돌연변이가 이 단계에서 또는 다음 단계 중 임의의 단계에서 유전자 편집 또는 유전자 조작을 통해 인위적으로 도입된 세포를 획득하는 단계; 세포에서 만능성을 유도하거나 세포를 재프로그래밍하여 iPSC를 생산하는 단계; iPSC를 원하는 안구 세포로 분화시키는 조건하에서 iPSC를 배양하여 iPSC-유래 안구 세포주를 생산하는 단계를 포함한다.

[0064] 일부 구현예에서, 대상체로부터 획득되는 세포는 체세포이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 획득되는 세포는 피부 세포, 섬유아세포, 혈액 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 안구 세포이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 획득되는 세포는 요 세포, 신장 상피 세포, 모낭 또는 모유두 세포이다. 일부 구현예에서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 각막 상피 세포(CEC), 광수용체 세포(PRC), 맥락막 내피(CE) 세포, 시신경 세포, 망막 세포, 각막 세포 또는 맥락막 세포이다. 일부 구현예에서, 만능성이 도입되거나, 세포는 OCT4, SOX2, KLF4, 및 c-MYC 전사 인자 중 하나 이상을 사용하여 재프로그래밍된다.

[0065] 일부 구현예에서, 돌연변이는 병원성(pathologic)이다. 일부 구현예에서, 세포주는 표 1에 제시된 돌연변이 중에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포주는 돌연변이에 대해 이형 접합성(heterozygous)이다. 일부 구현예에서, 세포주는 돌연변이에 대해 동형 접합성(homozygous)이다.

[0066] 일부 구현예에서, 세포 질환 모델은 건강한 대조군의 관련 세포주에서의 수준과 비교하여 하기 화합물 그룹으로부터의 하나 이상의 화합물에서 비정상적인 수준을 나타낸다: (i) 지방산, (ii) 세라마이드, (iii) 스펅고마이엘린, (iv) 스펅고신, (v) 스펅가닌 또는 (vi) 하이드록시-지방산. 일부 구현예에서, 세포 질환 모델은 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물에서 건강한 대조군의 관련 세포주에서의 수준과 비교하여 비정상적인 수준을 나타낸다.

[0067] **생화학적 검정 방법:**

[0068] 일 양태에서, 질환 세포 모델에서 이상(abnormality) 또는 표현형(phenotype)을 발견하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 환자의 세포주(또는 이러한 질환을 유발하는 유전자 내 외인성 돌연변이를 포함하는 유전적으로 편집되거나 조작된 세포주)와 건강한 대조군의 세포주 사이에 하나 이상의 화합물의 수준을 평가하고 비교하는 단계를 포함하며, 여기에서 하나 이상의 화합물은 하기 그룹으로부터 선택된다: (i) 지방산, (ii) 세라마이드, (iii) 스펅고마이엘린, (iv) 스펅고신, (v) 스펅가닌 및/또는 (vi) 하이드록시-지방산.

[0069] 일부 구현예에서, 평가된 하나 이상의 화합물이 표 2에 제시되어 있다. 일부 구현예에서, 화합물 수준의 확인 및/또는 평가는 LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, 및/또는 FIA-MS/MS를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 질환 세포 모델은 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 질환 세포 모델은 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자 중에서 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자를 포함한다.

[0070] **BCD 세포 모델의 사용 방법(약물, 투여량 및 장치 스크리닝)**

[0071] 다른 양태에서, BCD에 대한 치료학적 효능에 대한 시험 제제(test agent)를 스크리닝하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 BCD 환자로부터 유래되는 iPSC-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPSC-RPE 세포주를 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화(normalization); 이러한 시험 제제와 접촉시키기 전과 비교하여, 세포에서 비-결함 CYP4V2 핵산 서열의 증가, 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가 및/또는 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능에 대해 세포를 평가하는 단계를 포함하며; 여기에서 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 이러한 시험 제제로 처리하기 전과 비교하여, 세포에서 비-결함 CYP4V2 핵산 서열의 증가, 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가 및/또는 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능은 BCD에 대한 치료학적 효능을 나타내는 시험 제제를 나타낸다.

[0072] 일부 구현예에서, 시험 제제는 핵산 또는 이의 유사체, 핵산 서열을 함유하거나 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터, 폴리펩타이드 또는 이의 유사체, 항체, 화학물질, 소분자 및/또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, 세포는 PCR 기술, 면역검정, 서열분석, 생화학적 검정, 기능 검정, 현미경 관찰 또는 이들의 조합을 사용하여 평가된다.

[0073] 다른 양태에서, BCD에 대한 시험 제제를 포함하는 제형, 벡터 또는 구조체(construct)의 효능(efficacy) 또는 효율(efficiency)을 스크리닝하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 다수의 세포 샘플을 다양한 제형, 벡터 또는 구조체로 제형화되거나 패키징된 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 이러한 시험 제제로 처리하기 전 및/또는 동일하지만 상이한 제형, 벡터 또는 구조체로 제형화되거나 패키징된 시험 제제로 처리된 세포 샘플과 비교하여, 세포에서 비-결함 CYP4V2 핵산 서열의 증가, 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가, 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능, 및/또는 세포 저항성(tolerance) 또는 사멸에 대해 세포 샘플을 평가하여 제형, 벡터 또는 구조체의 효율 또는 효능을 결정하고 비교하는 단계를 포함하며; 여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정, 서열분석, 생화학적 검정, 세포 생존능 검정, 현미경관찰 또는 이들의 조합을 사용하여 평가된다.

[0074] 일 양태에서, BCD에 대한 시험 제제의 효과적이고 안전한 투여량 범위를 스크리닝하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 다수의 세포 샘플을 각각의 세포 샘플에 대해 상이한 용량으로 시험 제제와 접촉시키는 단계; 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 이러한 시험 제제로 처리하기 전 및/또는 동일한 시험 제제이지만 상이한 용량으로 처리된 세포 샘플과 비교하여, 세포에서 비-결함 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능, 및/또는 세포 저항성 또는 사멸에 대해 세포 샘플을 평가하여 상이한 용량의 효과 및 안전성을 결정하고 비교함으로써 적절한 투여량 범위를 결정하는 단계를 포함하며; 여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정, 서열분석, 생화학적 검정, 세포 생존능 검정, 기능 검정, 현미경 관찰 또는 이들의 조합을 사용하여 평가된다.

[0075] 다른 양태에서, 망막 또는 망막 세포에 치료제를 전달하기 위한 전달 장치 또는 방법의 효능 또는 효율을 스크리닝하거나 평가하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 (i) BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 세포 샘플을 전달 장치 또는 방법을 사용하지 않고 시험 제제와 접촉시키는 단계; (ii) BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주 또는 인위적인 유전자 편집 또는 조작의 결과로서 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2 유전자를 포함하는 iPS-RPE 세포주로부터의 다른 세포 샘플을 전달 장치 또는 방법을 사용하여 (i)에서와 동일한 투여량의 시험 제제와 접촉시키는 단계; (iii) 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 이러한 시험 제제로 처리하기 전 및/또는 동일한 용량이지만 전달 장치 또는 방법을 사용하지 않고 동일한 시험 제제로 처리하기 전과 비교하여, 세포에서 비-결함 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능; 세포 저항성 또는 사멸; 및/또는 세포에서 시험 제제의 수준에 대해 (i) 및 (ii)로부터의 세포 샘플을 평가하고 비교하여 이러한 전달 장치 또는 기술의 효능 또는 효율을 결정하는 단계를 포함하며; 여기에서 세포는 PCR 기술, 면역검정, 서열분석, 생화학적 검정, 기능 검정, 현미경관찰 또는 이들의 조합을 사용하여 평가한다.

[0076] 일부 구현예에서, 망막 세포는 RPE 세포이다.

[0077] **CRISPR 유전자 편집 치료요법**

[0078] 일 양태에서, (a) CYP4V2 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 핵산 서열("표적 서열")을 표적화하는 CRISPR 가이드 RNA 및 (b) 기능적(functional) CRISPR-관련 단백질(Cas)을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은 (c) CYP4V2 유전자 또는 이의 일부(portion)의 교정(correction), 파괴(disruption) 또는 대체(replacement)를 위한 CYP4V2 유전자의 야생형 서열 또는 기능 서열(functional sequence)의 전부 또는 일부를 포함하는 공여체(donor) 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 이의 하나 이상의 성분은 이러한 성분을 암호화하는 DNA 분자, 이러한 성분을 암호화하는 mRNA 분자, RNA 분자, 폴리펩타이드 및/또는 리보핵단백질(ribonucleoprotein, RNP) 또는 단백질-RNA 복합체의 형태로 제공된다. 일부 구현예에서, 이의 두 개 이상의 성분은 별도의 분자에 있거나 하나의 분자 또는 하나의 복합체로 결합되거나, 별도의 벡터에 있거나 하나의 벡터로 결합되거나, 하나 이상의 핵산 복합체에 있거나, 하나 이상의 RNP 복합체에 있다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 단일-가닥 공여체 올리고뉴클레오타이드(single-stranded donor oligonucleotide, ssODN) 또는 벡터로 제공된다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드, 재조합 AAV 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 및/또는 이들의 조합이다.

- [0080] 일부 양태에서, 본원에 기술된 임의의 조성물을 함유하는 병리학적 CYP4V2 돌연변이를 갖는 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 (i) 표적 유전자("표적 유전자")에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적 서열에 대해 상보적인 프로토스페이스 요소 서열(photospacer element sequence) 및 트랜스-활성화 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)의 상보성 영역(complementary region)에 상응하는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 및 (ii) crRNA의 상응하는 영역에 대해 상보적인 영역 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)와 상호작용하는 서열을 포함하는 tracrRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cas9를 포함한다.
- [0081] 일부 구현예에서, 프로토스페이스 요소는 약 20개 염기, 약 19 개 염기, 약 21 개 염기, 약 19 내지 21 개 염기, 약 18 내지 22 개 염기 또는 약 16 내지 24 개 염기이다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 별도의 분자에 있다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 단일 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA)로 결합된다. 일부 구현예에서, sgRNA는 약 88 내지 150 bp이다.
- [0082] 일부 구현예에서, Cas9는 다음으로부터 선택되는 Cas9 오솔로그(ortholog) 또는 돌연변이체 Cas9를 포함한다: 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(SpCas9), SpCas9 닉카아제(Cas9n D10A), SpCas9(D1135E), eSpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9 VRER, SpCas9 VQR, SpCas9EQR, 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(SaCas9), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria Meningitidis*), 스트렙토코쿠스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 파스퇴렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 바실러스 스미티이(*Bacillus smithii*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 마이코플라스마 카니스(*Mycoplasma canis*) 및 엔테로코쿠스 파에칼리스(*enterococcus faecalis*). 일부 구현예에서, CRISPR-관련 단백질, Cas9 또는 Cpf1은 N-말단 및/또는 C-말단에서 1, 2 또는 3개 이상의 핵 위치결정 서열(nuclear localization sequence, NLS) 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커를 추가로 포함한다.
- [0083] 일부 구현예에서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적서열에 대해 상보적인 프로토스페이스 요소 서열을 포함하는 crRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cpf1을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로토스페이스 요소는 약 20개 염기, 약 21개 염기, 약 22개 염기, 약 23개 염기, 약 24개 염기, 약 19 내지 25개 염기, 약 18 내지 26개 염기 또는 약 16 내지 28개 염기이다.
- [0084] 일부 구현예에서, 프로토스페이스 요소는 서열번호 48 내지 52로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 또는 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 표적화하기 위한 프로토스페이스 인접 모티프(protospacer adjacent motif, PAM)로서 NGG를 갖는 Cas 단백질과 함께 사용하기 위해 서열번호 48 내지 52 중 하나와 적어도 85% 서열 동일성(identity)을 공유한다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 서열번호 56 및 57(이는 2개의 공여체 주형 서열임)로부터 선택되거나, 또는 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정, 파괴 또는 대체하는데 사용하기 위해 서열번호 56 및 57 중 하나 또는 이와 상보적인 서열과 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0085] **CRISPR 유전자 치료요법 방법 청구항**
- [0086] 다른 양태에서, 대상체에서BCD를 치료하거나 예방하는 방법 또는 돌연변이된 CYP4V2 유전자를 갖는 세포가 제공된다. 이러한 방법은 (i) 서열분석을 통해 대상체 또는 세포에서 병리학적 돌연변이를 확인하는 단계; (ii) 돌연변이에 관여하는 첫번째 뉴클레오타이드로부터 약 100 bp 상류에서 돌연변이에 관여하는 마지막 뉴클레오타이드로부터 약 100 bp 하류에 이르는 영역 내의 Cas 관련된 PAM 부위를 발견하는 단계; (iii) (ii)에서 확인된 각각의 PAM 부위와 관련된 CYP4V2 서열을 표적화하는 다양한 프로토스페이스 요소를 확인하는 단계; (iv) (iii)에서 확인된 프로토스페이스 요소 서열 및 프로토스페이스 요소 서열과 PAM을 기반으로 한 오프-타겟 편집 프로파일(off-target editing profile)을 포함하는 각각의 CRISPR 가이드 RNA의 활성 수준을 평가하는 단계; (v) (iv)를 기반으로 하나 이상의 CRISPR 가이드 RNA 설계를 선택하는 단계; (vi) 표적화된 CYP4V2 돌연변이를 교정(correction), 파괴(disrupting) 또는 대체(replacing)하기 위한 상동성-기반 복구(homology-based repair: HDR)에 기초하여 하나 이상의 공여체 핵산 서열을 설계하는 단계; (vii) 조성물 청구항 제1항 내지 제18항에 제공되는 바와 같은 CRISPR 가이드 RNA, Cas 및 공여체 핵산 서열을 제작하는 단계; (viii) 대상체로부터 분리되는 세포; 또는 대상체로부터 유래되는 iPS 세포 또는 대상체로부터 유래되는 줄기 세포로부터 분화되는 세포, 또는 대상체 또는 이의 분리되거나 유래되는 세포로부터 분리되는 유전체 DNA에서 (vii)의 성분을 선택적으로

확인하고 추가로 선택하여 활성 수준 및/또는 오프-타겟 편집 프로파일을 평가하는 단계; 및 (ix) (viii)의 성분을 리보핵단백질 또는 단백질-RNA 복합체, 벡터, 단백질, 핵산 분자, 나노입자, 리포솜, 미셀, 비로솜, 핵산 복합체 및/또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 전달 시스템을 통해 대상체 또는 세포에 투여하는 단계, 여기에서 전달은 전기 천공법(electroporation)에 의해, 또는 지질-매개 형질감염(lipid-mediated transfection), 또는 핵감염(nucleofection), 또는 바이러스 형질도입(viral transduction) 또는 주입, 또는 이들의 조합을 통하여 수행됨; (x) 여기에서 시험관 내(*in vitro*)에서의 세포의 처리의 경우, GFP, EGFP 또는 퓨로마이신 내성을 포함하나 이에 한정되지 않는 선택 마커가 (viii)의 성분에 선택적으로 첨가되거나 포함된다.

[0087] 일부 양태에서, 생체 내(*in vivo*)에서 대상체 또는 시험관 내(*in vitro*)에서 세포의 CYP4V2 유전자에서 c.802-8_810del117insGC 돌연변이를 교정 또는 대체하기 위한 유전자 편집 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 전형적으로: (i) 서열번호 48 내지 52 중 하나로부터 선택되는 프로토스페이서 요소 서열을 포함하거나, 서열번호 48 내지 52의 서열 중 하나와 적어도 80% 서열 동일성(identity)을 공유하는 CRISPR 가이드 RNA; (ii) 서열번호 56 및 57 중 하나로부터 선택되거나, 서열번호 56 및 57 중 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 공여체 핵산 서열 또는 이의 상보적인 서열; 및 (iii) 1, 2, 3개 이상의 NLS를 선택적으로 함유하는 Cas9 단백질(서열번호 58에 나타낸 예시적 서열), 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하나 이에 한정되지 않는 선택 마커를 포함한다.

[0088] 일부 구현예에서, 선택적 뉴클레오타이드 G는 프로토스페이서 요소 서열 앞에 첨가된다. 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA는 crRNA(서열번호 53에 나타낸 예시적 서열(5' 프로토스페이서 요소 서열 제외)) 및 tracrRNA(서열번호 54에 나타낸 예시적 서열)를 포함하고; 프로토스페이서 요소 서열은 crRNA에 포함된다. 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA는 프로토스페이서 요소 서열(서열번호 55에 나타낸 예시적 sgRNA 서열(5' 프로토스페이서 요소 서열 제외))을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함한다.

[0089] 일부 구현예에서, (i), (ii) 및 (iii) 중 하나 이상의 성분은 이러한 성분을 암호화하는 DNA 분자, 이러한 성분을 암호화하는 mRNA 분자, 핵산 분자, 벡터, RNA 분자, 폴리펩타이드, 리보핵단백질(RNP) 또는 단백질-RNA 복합체 및/또는 이들의 조합의 형태로 제공된다.

[0090] **BCD 세포 치료요법, 안질환 자가 세포 치료요법 및 병용 치료요법 청구항**

[0091] **BCD 세포 치료요법**

[0092] BCD에 대한 유전자 복구(genetic repair)가 없는 동종이계(allogenic) 세포 치료요법 또는 자가 세포 치료요법

[0093] 일부 양태에서, 대상체에서 눈 질환을 치료하거나 예방하는 방법이 제공되며, 여기에서 질환은 CYP4V2 유전자의 병리학적 유전자 변이(genetic alteration) 또는 후성 유전자 변이(epigenetic alteration)와 관련이 있다. 이러한 방법은 전형적으로 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은 다음을 포함한다: 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 전조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포 및/또는 줄기 세포로부터 유래되는 다른 안구 세포.

[0094] 일부 구현예에서, 줄기 세포는 배아 줄기(ES) 세포, iPC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 BCD를 갖지 않거나 병리학적 CYP4V2 유전자를 갖지 않은 하나 이상의 대상체로부터의 줄기 세포이거나 또는 이로부터 유래되는 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 하나 이상의 대상체로부터의 줄기 세포이거나 이로부터 유래되는 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0095] **BCD에 대한 유전자-복구 자가 세포 치료요법**

[0096] 다른 양태에서, (a) BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 대상체로부터 분리되는 세포 또는 줄기 세포로부터 재프로그래밍되는 줄기 세포, 또는 (b) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포로부터 분화되거나, BCD의 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍되는 세포를 포함하는 세포 조성물이 제공된다.

[0097] 일부 구현예에서, 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍되는 줄기 세포는 iPC 세포이다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 대상체로부터의 임의의 조직의 임의의 세포로부터 재프로그래밍된다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 피부 세포, 혈액 세포, 요 세포, 모발 세포, 섬유아세포, 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 신장 상피 세포, 모낭 또는 모유두 세포로부터 재프로그래밍된다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 분리되는 줄기 세포는 MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄

기 세포로부터 분화되는 세포는 안구 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 RPE 세포, PRC, 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, CEC 또는 CE 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC 또는 iPS-CE 세포이다.

[0098] 일부 구현예에서, (i) BCD에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되거나 iPSC로의 재프로그래밍에 사용하기 위한 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 세포, (ii) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포 또는 BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍되는 iPS 세포, 또는 (iii) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포로부터 분화되는 세포 또는 BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 돌연변이를 갖는 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍되는 iPS 세포는 유전적으로 복구되어 돌연변이된 CYP4V2 유전자의 효과를 개선한다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 iPS 세포로의 재프로그래밍 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 iPS 세포로의 재프로그래밍 후 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 줄기 세포 또는 iPS 세포의 분화 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 줄기 세포 또는 iPS 세포의 분화 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 이식 치료요법(gene transfer therap)을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 치료요법 청구항 중 어느 하나의 임의의 조성물 또는 방법을 사용함으로써 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 편집을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 CRiSPR 유전자 치료요법 청구항 중 어느 하나의 임의의 조성물 또는 방법을 사용함으로써 유전자 편집을 통해 이루어진다.

[0099] 다른 양태에서, BCD에 의해 영향을 받거나 CYP4V2 유전자에 병리학적 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 갖는 대상체에서 눈 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 본원에 기술된 임의의 CYP4V2 자가 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은 다음을 포함한다: 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포, 및/또는 대상체의 줄기 세포로부터 유래되는 다른 안구 세포.

[0100] 일부 구현예에서, 줄기 세포는 iPC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC 전사 인자 중 하나 이상을 사용하여 재프로그래밍된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 복구된 세포는 다음 중 하나 이상을 나타낸다: 표 2에 제시된 하나 이상의 화합물의 수준에서의 정규화; 세포에서 비-결합 CYP4V2 핵산 서열의 증가; 세포에서 기능적 CYP4V2 폴리펩타이드의 양의 증가; 및/또는 유전자 복구를 수행하기 전과 비교하여 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능.

[0101] 일부 구현예에서, 투여되는 세포의 양은 단일 투여시 약 1,000 내지 약 1,000만개 세포이다. 일부 구현예에서, 투여는 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 망막하(sub-retinal) 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 유리체내(intravitreal) 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 직접 망막 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 각막 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 눈의 망막하 위치, 후안부 (posterior segment) 또는 각막으로 세포를 효율적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 세포 현탁액의 주사를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 시트(sheet), 매트릭스(matrix), 스캐폴드(scaffold), 또는 조직(tissue)의 일부로서 투여된다.

[0102] 일부 구현예에서, RPE 세포는 기능적 RPE 단층을 생성하기 위해 천연 및/또는 합성 스캐폴드를 사용하여 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0103] **안질환에 대한 유전자-복구 자가 세포 치료요법**

[0104] 다른 양태에서, (a) 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되는 세포 또는 이로부터 분리되는 줄기 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포, 또는 (b) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포로부터 분화되거나, 또는 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍된 세포를 포함하는 세포 조성물이 제공된다.

[0105] 일부 구현예에서, 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍된 줄기 세포는 iPS 세포이다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 대상체로부터의 임의의 조직의 임의의 세포로부터 재프로그래밍된다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 피부 세포, 혈액 세포, 요 세포, 모발 세포, 섬유아세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 신장 상피 세포, 모근 또는 모유두 세포로부터 재프로그래밍된다. 일부 구현예에서, 대상체로부터 분리되는 줄기 세포는 MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포이다.

- [0106] 일부 구현예에서, 유전자는 안구 발달 또는 기능에 관여하고/관여하거나 이의 돌연변이는 안질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자이다. 일부 구현예에서, 유전자는 신경 발달 또는 기능에 관여하고/관여하거나, 이의 돌연변이는 신경퇴행성 질환을 유발하거나 유발하는 위험 인자이다. 일부 구현예에서, 유전자는 사이토크롬 P450 유전자이다. 일부 구현예에서, 유전자는 표 4에 제시된 것이다.
- [0107] 일부 구현예에서, 유전자는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, 또는 CYP46A 유전자 또는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함한다.
- [0108] 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 임의의 유형의 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 안구 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 RPE 세포, PRC, 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, CEC, CE 세포 또는 시신경 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC 또는 iPS-CE 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포로부터 분화되는 세포는 뉴런이다.
- [0109] 일부 구현예에서, (i) 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 iPSC로의 재프로그래밍에 사용하기 위한 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되는 세포, (ii) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포, 또는 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍된 iPSC 세포, 또는 (iii) 대상체로부터 분리되는 줄기 세포로부터 분화되는 세포, 또는 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환에 의해 영향을 받은 대상체로부터 분리되는 세포로부터 재프로그래밍된 iPSC세포는 유전적으로 복구되어 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자의 효과를 개선한다.
- [0110] 일부 구현예에서, 유전자 복구는 iPSC 세포로의 재프로그래밍 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 iPSC 세포로의 재프로그래밍 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 줄기 세포 또는 iPSC 세포의 분화 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 줄기 세포 또는 iPSC 세포의 분화 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 치료요법과 관련된 청구항 중 어느 하나의 임의의 조성물 또는 방법을 사용함으로써 유전자 이식 치료요법을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자 복구는 CRISPR 유전자 치료요법과 관련된 청구항 중 어느 하나의 임의의 조성물 또는 방법을 사용함으로써 유전자 편집 치료요법을 통해 이루어진다.
- [0111] 다른 양태에서, 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 영향을 받은 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 본원에 기술된 자가 세포 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포 조성물은: 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 뉴런, 맥락막 내피(CE) 세포 및/또는 대상체의 줄기 세포로부터 유래되는 다른 안구 세포를 포함하고, 여기에서 세포 조성물 내의 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자는 유전적으로 복구되었다.
- [0112] 여전히 다른 양태에서, 대상체를 자가 치료하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로 (i) 눈 질환을 갖는 대상체로부터의 세포를 제공하는 단계; (ii) 대상체로부터의 세포에서 만능성(pluripotency)을 유도하여 iPSC를 생산하는 단계; (iii) 대상체로부터 유래되는 iPSC에서 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자의 하나 이상의 돌연변이를 유전적으로 복구하는 단계; (iv) iPSC를 안구 세포로 분화시키는 단계; (v) 단계 (iii)에 대한 대안으로, 유전자 이식 치료요법을 통해 iPSC-안구 세포를 유전적으로 복구하는 단계; 및 (vi) iPSC-안구 세포를 대상체로 도입하여 눈 질환을 가진 대상체를 자가 치료하는 단계를 포함한다.

- [0113] 일부 구현예에서, 줄기 세포는 iPSC 세포, MSC, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, iPSC 세포는 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC 전사 인자 중 하나 이상을 사용하여 재프로그램된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 복구된 세포는 다음 중 하나 이상을 나타낸다: 유전자 복구가 수행되기 전과 비교하여, 세포에서 비-결합 표적 유전자 핵산 서열의 증가; 세포에서 표적 유전자에 의해 암호화되는 기능적 폴리펩타이드의 양의 증가; 개선된 세포 구조, 형태 또는 기능, 및/또는 세포에서 개선되거나 정규화된 생화학적 기능. 일부 구현예에서, 투여되는 세포의 양은 단일 투여시 약 10억 내지 약 1억개의 세포이다.
- [0114] 일부 구현예에서, 투여는 주사를 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 망막하 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 유리체내 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 직접 망막 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 각막 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 눈의 망막하 위치, 후안부 또는 각막으로 세포를 효과적으로 전달하는 임의의 다른 방법에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 세포 현탁액의 주사를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 시트, 매트릭스, 스캐폴드 또는 조직의 일부로서 투여된다. 일부 구현예에서, RPE 세포는 기능적 RPE 단층을 생성하기 위해 천연 및/또는 합성 스캐폴드를 사용하여 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0115] 일부 구현예에서, 질환은 대상체에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이 또는 위험 인자와 관련되어 있다. 일부 구현예에서, 질환은 광수용체 변성, 망막 색소 상피 세포 변성, 망막 변성, 각막 변성 및/또는 맥락막 장애이다. 일부 구현예에서, 질환은 유전성 망막 변성(IRD)이다. 일부 구현예에서, 질환은 망막 색소 변성증(RP)이다. 일부 구현예에서, 질환은 비에티 결정 이영양증(비에티 결정 각막망막 이영양증(BCD)으로도 알려져 있음)이다. 일부 구현예에서, 질환은 신경 변성과 관련이 있다. 일부 구현예에서, 질환은 각막 이영양증이다. 일부 구현예에서, 대상체는 BCD를 앓고 있거나, BCD가 발생할 위험이 있다.
- [0116] 일부 구현예에서, 세포는 섬유아세포, 혈액 세포 또는 안구 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 소변으로부터, 또는 모발 또는 모낭으로부터 획득된다. 일부 구현예에서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포 또는 광수용체 세포(PRC)이다.
- [0117] 일부 구현예에서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 다형성(polymorphism), 부적절한 메틸화(methylation), 부적절한 탈메틸화(demethylation) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 대상체로부터의 iPSC-안구 세포에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 유전자 편집을 사용하여 유전적으로 복구되었다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 방법은 아연-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), TALEN 기술 또는 CRISPR 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, 대상체로부터의 iPSC-안구 세포에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 유전자 이식(gene transfer)을 사용하여 유전적으로 복구되었다. 일부 구현예에서, 유전자 이식 방법은 재조합 AAV 벡터 또는 다른 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터를 이용하여 표적 유전자(예를 들어, cDNA)의 건강한 카피를 이식될 세포로 전달한다.
- [0118] 일부 구현예에서, 투여 단계는 질환 증상의 발생 전 또는 질환 증상의 발생 후에 일어난다. 일부 구현예에서, 투여는 눈에 대해 또는 뉴런을 포함하는 다른 기관 또는 조직에 대해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 망막하 또는 유리체내 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 직접 망막 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 각막 주사에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 눈의 망막하 위치, 후안부 또는 각막으로 세포를 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의한 것이다.
- [0119] 일부 구현예에서, 방법은 투여 또는 이식하기 전에, 세포에 대해 유전자형 분석을 수행하여 표 4에 제시된 하나 이상의 유전자 내 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이의 존재 또는 부재를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이는 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 CYP4V2 핵산 분자에 있다. 일부 구현예에서, 방법은 투여하기 전에 대상체의 눈을 평가하여 손상되거나 잔류하는(retained) 광수용체, 망막 세포 또는 각막 세포의 면적(들) 및 정도를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0120] 일부 구현예에서, 방법은 투여한 후에 대상체를 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 모니터링은 비-침습적 망막 이미징(non-invasive retinal imaging), 각막 시험(corneal test), 시야 측정법(perimetry), ERG, OCT, 시력 검사(visual acuity test) 및/또는 기능 연구를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 모니터링은 면역 반응에 대해 대상체를 평가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 투여한 후에 대상체의 눈을 평가하여 손상되거나 잔류하는 광수용체, 망막 세포 또는 각막 세포의 면적(들) 및 정도

를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0121] 세포 치료요법 - RNP 청구항

[0122] RNP 청구항

[0123] 다른 양태에서, (a) 표적 유전자("표적 유전자")에 대해 100 bp 또는 그 이내의 핵산 서열("표적 서열")을 표적화하는 CRISPR 가이드 RNA, 및 (b) 리보핵단백질(RNP) 또는 단백질-RNA 복합체 내 기능적 CRISPR-관련 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0124] 일부 구현예에서, 조성물은 (c) 표적 유전자 또는 이의 일부의 교정 또는 대체를 위한 이러한 표적 유전자의 야생형 서열 또는 기능적 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 공여체 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 안구 발달 또는 기능에 관여하고/관여하거나 이의 돌연변이는 안질환을 유발하거나 이를 유발하는 위험 인자이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 뉴런 발달 또는 기능에 관여하고/관여하거나 이의 돌연변이는 신경퇴행성 질환을 유발하거나 이를 유발하는 위험 인자이다.

[0125] 일부 구현예에서, 표적 유전자는 사이토크롬 P450 유전자이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 표 4에 제시된 유전자를 포함하거나, 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 단일-가닥 공여체 올리고뉴클레오타이드(single-stranded donor oligonucleotide, ssODN) 또는 벡터로 제공된다.

[0126] 일부 구현예에서, (a) (i) 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적 서열에 상보적인 프로토스페이서 요소 서열 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)의 상보적 영역에 상응하는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 및 (ii) crRNA의 상응하는 영역에 대해 상보적인 영역 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)와 상호작용하는 서열을 포함하는 tracrRNA를 포함하는 CRISPR 가이드 RNA, 및 (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cas9를 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, 프로토스페이서 요소는 약 20개 염기, 약 19개 염기, 약 21개 염기, 약 19-21개 염기, 약 18-22개 염기 또는 약 16 내지 24개 염기이다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 상이한 핵산 분자 내에 있다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)로 결합된다. 일부 구현예에서, sgRNA는 약 88 내지 150 bp이다.

[0128] 일부 구현예에서, Cas9는 Cas9 오솔로그 또는 다음으로부터 선택되는 돌연변이체 Cas9를 포함한다: 스트렙토코쿠스 피오게네스(SpCas9), SpCas9 닉카아제(Cas9n D10A), SpCas9(D1135E), eSpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9 VRER, SpCas9 VQR, SpCas9EQR, 스타필로코쿠스 아우레우스(SaCas9), 나이세리아 메닝기티디스, 스트렙토코쿠스 썬모필러스, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에, 캄필로박터 콜라이, 캄필로박터 체주니, 스트렙토코쿠스 무탄스, 파스퇴렐라 멀토시다, 비피도박테리움 룡검, 바실러스 스미티이, 트레포네마 텐티콜라, 마이코플라스마 카니스 및 엔테로코쿠스 파에칼리스.

[0129] 일부 구현예에서, (a) CRISPR 가이드 RNA는 표적 유전자에 대해 100 bp 또는 그 이내의 표적 서열에 대해 상보적인 프로토스페이서 요소 서열을 포함하는 crRNA를 포함하고, (b) 기능적 CRISPR-관련 단백질은 Cpf1을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로토스페이서 요소는 약 20개 염기, 약 21개 염기, 약 22개 염기, 약 23개 염기, 약 24개 염기, 약 19-25개 염기, 약 18-26개 염기, 또는 약 16-28 염기이다. 일부 구현예에서, CRISPR-관련 단백질인 Cas9 또는 Cpf1은 N-말단 및/또는 C-말단에서 1, 2 또는 3개 이상의 핵 국제화 서열(NLS) 및/또는 GFP 또는 EGFP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커를 추가로 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, 프로토스페이서 요소는 표적 서열에 대해 100% 상보적이거나, 표적 서열에 상응하는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오타이드 미스매치(mismatch)를 포함한다. 일부 구현예에서, crRNA 서열은 프로토스페이서 요소 바로 앞의 crRNA 서열에 선택적으로 첨가된 G 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA crRNA 및/또는 tracrRNA, 또는 sgRNA는 화학적으로 변형된다.

[0131] 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 ssODN 으로 제공되는 공여체 핵산 서열에 대해 약 1kb, 800bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 280bp, 260bp, 240bp, 220bp 또는 200bp 이하이고, 벡터로 제공되는 공여체 핵산 서열에 대해 약 30kb, 25kb, 20kb, 15kb, 10kb, 9kb, 8kb, 7kb, 6kb, 5kb, 4.5kb, 4kb, 3.5kb, 3kb, 2.5kb, 2kb, 1.5kb, 1kb, 0.5kb, 0.2kb 또는 0.1kb 이하이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자의 야생형 버전은 효소를 암호화한다.

[0132] 일부 구현예에서, 표적 유전자는 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC,

NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자, 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 포함한다.

- [0133] 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질 및/또는 공여체 핵산 서열을 포함하는 이의 임의의 하나 이상의 성분은 이러한 성분으로 전사 및/또는 번역될 수 있는 벡터, DNA 및/또는 mRNA에 개별적으로 및/또는 추가로 제공된다. 일 양태에서, 본원에 기술된 임의의 조성물을 포함하는 약학 제형이 제공된다.
- [0134] 다른 양태에서, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자, 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 대상체에게 본원에 기술된 임의의 조성물을 투여함으로써 이러한 유전자를 파괴, 교정 또는 대체하는 단계를 포함한다.
- [0135] 다른 양태에서, 안질환을 치료하거나, 또는 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 인구 질환 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 대상체에게 본원에 기술된 임의의 조성물을 투여함으로써 이러한 유전자를 파괴, 교정 또는 대체하는 단계를 포함한다.
- [0136] 다른 양태에서, 신경퇴행성 질환을 치료하거나, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 대상체의 신경퇴행성 질환과 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 대상체에게 본원에 기술된 임의의 조성물을 투여함으로써 이러한 유전자를 파괴, 교정 또는 대체하는 단계를 포함한다.
- [0137] 다른 양태에서, 돌연변이되거나 결합이 있는 사이토크롬 P450 유전자, 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 사이토크롬 P450 유전자에 의해 유발된 대상체의 질환을 치료하거나 이와 관련된 위험 인자를 개선시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 대상체에게 본원에 기술된 임의의 조성물을 투여함으로써 이러한 유전자를 파괴, 교정 또는 대체하는 단계를 포함한다.
- [0138] 일부 구현예에서, 파괴되거나, 교정되거나 대체된, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 표 4에 제시된 유전자의 돌연변이되거나 결합이 있는 버전이거나, 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 표 4에 제시된 유전자의 버전이다. 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자, 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포에 존재한다.
- [0139] 일부 구현예에서, 본원의 조성물은 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 전달은 전기천공법에 의해 또는 지질-매개 형질감염, 또는 핵감염, 또는 바이러스 형질도입, 또는 주사 또는 이들의 조합을 통해 수행된다. 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질 및/또는 공여체 핵산 서열을 포함하는 임의의 하나 이상의 이의 성분은 대상체 또는 세포에 리보핵단백질 또는 단백질-RNA 복합체, 나노입자, 리포솜, 미셀, 비로솜, 핵산 복합체 및/또는 이들의 조합으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 전달 시스템을 통해 투여된다.
- [0140] 일부 구현예에서, 치료는 대상체에 대해 생체 내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 치료는 시험관 내 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포에서 수행된다. 일부 구현예에서, 치료되는 세포는 생체 내에서 대상체에게 이식되거나, 치료되는 세포가 줄기 세포인 경우, 이러한 줄기 세포는 이식을 위해 원하는 세포의 유형으로 분화되고, 그 후 분화된 세포는 생체 내에서 대상체로 이식된다.
- [0141] 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자, 또는 결합이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 대체된다. 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결합이 있는 유전자, 또는 결합이 있

거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 교정되거나 대체된 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 파괴된다.

- [0142] 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 1 내지 20개, 21 내지 40개, 41 내지 60개, 61 내지 80개, 81 내지 100개, 101 내지 1000개, 1001 내지 10000개의 염기 쌍의 뉴클레오타이드 또는 돌연변이가 파괴되거나, 교정되거나 대체되었다. 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자의 영역은 파괴되거나, 교정되거나 대체된다. 일부 구현예에서, 약 10, 8, 6, 4, 2 또는 1 kb 미만의 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자가 파괴되거나, 교정되거나 대체된다.
- [0143] 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 뉴클레오타이드의 삽입 및/또는 결실을 통해 파괴되거나, 교정되거나 대체된다. 일부 구현예에서, 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자는 하나의 대립유전자(allele) 또는 대립유전자 둘 다에서 파괴되거나, 교정되거나 대체된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 CRISPR 가이드 RNA, CRISPR-관련 단백질 및/또는 공여체 핵산 서열은 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분 기능을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에서 하나 이상의 돌연변이 또는 결함을 파괴하거나, 교정하거나 대체하기 위해 사용된다.
- [0144] 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다. 일부 구현예에서, 방법은 안구 발달 또는 기능을 개선하거나, 안구, 망막 또는 각막 변성을 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 신경학적 발달 또는 기능을 개선하거나 신경 변성을 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 P450 효소의 발현 또는 기능을 개선한다.
- [0145] 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열을 기반으로 한 상동성 지정 복구(homology directed repair)는 표적 유전자의 인트론 및/또는 엑손을 초래하였다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열을 기반으로 한 상동성 지정 복구는 표적 유전자의 스플라이싱 억셉터(splice acceptor)를 초래하였다. 이러한 방법은 (c) 돌연변이되거나 변형된 표적 유전자 또는 이의 일부(portion)의 생성을 위한 돌연변이 또는 변형과 함께 표 4에 제시된 표적 유전자 전부 또는 일부를 포함하는 공여체 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0146] 일부 양태에서, 이러한 유전자에 돌연변이를 생성시킴으로써 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자, 또는 결함이 있거나 부분적인 기능 또는 활성을 가진 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 유발된 질환의 세포 질환 모델을 생성하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 본원에 기술된 임의의 조성물을 통해 이러한 유전자의 건강한 버전의 세포로의 전달을 포함한다. 일부 구현예에서, 전달은 전기천공법에 의해 또는 지질-매개 형질감염, 또는 핵감염, 또는 바이러스 형질도입, 또는 미세 주사, 또는 이들의 조합을 통해 수행된다. 일부 구현예에서, 세포는 섬유아세포, 혈액, RPE, 광수용체, 망막, 각막, 맥락막, 안구, 시신경, 뉴런, 또는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 유형의 세포이다.
- [0147] 여전히 다른 양태에서, 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자를 가진 세포를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0148] 다른 양태에서, 본원의 청구항 중 어느 하나의 조성물을 포함하는, 돌연변이되거나 결함이 있는 CYP4V2, CYP1B1, MYO7A, DFNB31, USH1C, USH1G, CDH23, PCDH15, CLRN1, ACO2, AFG3L2, ATXN2, AUH, C12orf65, CISD2, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPA1, OPA3, OPTN, PAX6, PDGF, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, WFS1, ABCA4, REP-1, RPE65, CEP290, PDE6B, RPGR, MERTK, MT-ND4, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 또는 CYP46A 유전자를 갖는 세포를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0149] 일부 구현예에서, 벡터는 AAV 벡터이다. 일부 구현예에서, 프로토스페이스서 요소 서열은 서열번호 48 내지 52로 이루어지는 균으로부터 선택되거나, CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 표적화하는 프로토스페이스서 인접 모티프(protospacer adjacent motif, PAM)로서 NGG를 갖는 Cas 단백질과 함께 사용하기 위한 서열번호 48 내지 52 중 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 공유한다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정, 파괴 또는 대체하는데 사용하기 위해, 서열번호 56 및 57로부터 선택되거나, 서열번호 56 및 57 중 하나, 또는 이의 상보적인 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 공유한다.

- [0150] **유전자 치료요법 청구항**
- [0151] **코돈-최적화된 서열 관련 청구항:**
- [0152] 일 양태에서, 인간 CYP4V2 단백질을 암호화하는 서열번호 2의 핵산 서열 또는 서열번호 2의 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0153] 다른 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자, 및 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 여전히 다른 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 벡터 또는 본원에 기술된 바와 같은 발현 카세트가 제공된다.
- [0154] 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 재조합 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 재조합 렌티바이러스(lentivirus) 벡터, 재조합 헤르페스 단순포진 바이러스(herpes simplex virus) 벡터, 재조합 센다이 바이러스(sendai virus) 벡터 및 재조합 레트로바이러스(retrovirus) 벡터로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(recombinant adeno-associated virus, rAAV) 벡터 또는 플라스미드이다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 구현예에서, 비-바이러스성 벡터는 네이키드 핵산(naked nucleic acid), 리포솜, 덴드리머(dendrimer) 및 나노입자로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.
- [0155] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 임의의 핵산 분자 및/또는 본원에 기술된 임의의 조성물을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 세균 세포, 이. 콜라이(E. Coli) 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 HEK293, HeLa, Vero, V27, A549, K562, B50, WI38, Hep G2 또는 BHK 세포이다.
- [0156] 다른 양태에서, 이러한 핵산 분자에 의해 암호화되는 생성물을 세균 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 세포, RPE 세포, 광수용체 또는 광수용체 선조세포(PRC), 망막 세포, 각막 세포, 안구 세포, 뉴런, 뉴런 세포, 혈액 세포, 상피 세포, 체 세포, iPS 세포, ES 세포, MSC, 성체 줄기 세포, 줄기 세포 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 세포에서 발현시키기 위한, 본원에 기술된 임의의 핵산 분자, 본원에 기술된 임의의 발현 카세트 또는 본원에 기술된 임의의 벡터의 용도가 제공된다.
- [0157] **EFS 및/또는 SPA 관련 청구항**
- [0158] 다른 양태에서, 연장 인자 1a 짧은(elongation factor 1a short, EFS) 프로모터 및/또는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 작은 폴리아데닐화(폴리A) 신호(small polyadenylation(poly A) signal, SPA), 간섭 RNA(interfering RNA) 분자 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 자가-상보적 아데노-관련 바이러스(self-complementary adeno-associated virus, scAAV) 벡터가 제공된다. 일부 구현예에서, EFS 프로모터는 서열번호 35의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어지고, SPA는 서열번호 36의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진다.
- [0159] 일부 구현예에서, scAAV 벡터는 핵산 분자에 의해 암호화되는 생성물이 세포에서 발현되도록 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, 안구 세포, 뇌 세포, 뉴런, 뉴런 세포, iPS 세포, ES 세포, MSC, 줄기 세포 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 세포이다.
- [0160] 일 양태에서, 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시키고, 유전자 치료요법에서 형질도입 효율을 보존하고/하거나 동일한 유전적 질환의 상이한 환자에 대한 치료 효과를 최대화하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 다음의 (a) 내지 (e)의 단계를 포함한다: (a) 유전자 치료요법을 위한 표적 세포 유형에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 하나 이상의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)의 풀(pool)을 확립하는 단계, 바이러스 벡터 풀은 상기 바이러스 벡터의 캡시드 상에 항원성 영역 돌연변이 또는 다른 돌연변이를 갖는 변이체 또는 변이체를 생성시킴으로써 증식될 수 있으며, 이러한 돌연변이 또는 변이체는 질환과 관련된 표적 세포(예를 들어, BCD의 경우 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 iPS-RPE 세포주)에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 것으로 확인됨; (b) 유전자 치료요법을 필요로 하는 대상체에서 상이한 바이러스 벡터 혈청형(serotype) 및/또는 캡시드 돌연변이 또는 변이체에 대한 기존의(pre-existing) 중화 항-바이러스 벡터 항체(NAb)를 검출하고/하거나, 이러한 대상체로부터 유래되는 환자-특이적 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포)에서 상이한 바이러스 벡터를 시험하고 비교하는 단계; (c) 대상체에서 기존의 Nab와 교차-반응성이 가장 낮은, 충분한 형질도입 효율을 갖는 바이러스 벡터 및/또는 대상체의 환자-특이적 세포에서 표현형 구출(rescue) 결과가 가장 우수한 하나의 바이러스 벡터의 풀로부터 바

이러스 벡터를 선택하는 단계, 이러한 바이러스 벡터의 풀은 상이한 혈청형 및 캡시드-변형된 바이러스 벡터(예를 들어, 캡시드-돌연변이체 AAV 및/또는 캡시드 단백질 변이체 AAV를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함함; (d) 대상체에게 투여하기 위해 단계 (c)로부터 선택되는 바이러스 벡터를 사용하는 단계; 및 (e) 상기 대상체가 유전자 치료제 투여를 요구할 때마다 단계 (b) 내지 (d)(기존의 Nab와 관련된 부분만)를 반복하는 단계, 이는 동일한 눈에 대한 후속 투여 또는 반대쪽 눈 또는 다른 기관에 대한 투여를 포함하나 이에 한정되지 않음.

- [0161] 다른 양태에서, 유효량의 벡터 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물이 제공된다. 전형적으로, 벡터는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함한다.
- [0162] 일부 구현예에서, 질환은 비에티 결정 이영양증(비에티 결정 각막막막 이영양증(BCD)으로도 알려져 있음)이다. 일부 구현예에서, 질환은 대상체에서의 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이와 연관되어 있다. 일부 구현예에서, 질환은 광수용체 변성, 망막 색소 상피 세포 변성, 망막 변성, 각막 변성 또는 맥락막 변성이다. 일부 구현예에서, 망막 변성은 망막 색소 변성증(RP)이다. 일부 구현예에서, 망막 변성은 유전성 망막 변성(IRD)이다. 일부 구현예에서, 질환은 BCD이다. 일부 구현예에서, 질환은 각막 이영양증이다. 일부 구현예에서, 대상체는 BCD를 앓고 있거나, BCD가 발생할 위험이 있다.
- [0163] 일 양태에서, 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함하는 벡터가 제공된다.
- [0164] 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 단순포진 바이러스 벡터, 쉐나디 바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, AAV는 재조합 AAV(rAAV)이다. 일부 구현예에서, rAAV는 AAV 계놈 또는 이의 유도체, 및/또는 AAV 캡시드 단백질 또는 이의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV는 키메라(chimeric) AAV, 셔플된(shuffled) AAV 또는 캡시드-변형(capsid-modified) AAV이다.
- [0165] 일부 구현예에서, AAV 계놈 또는 AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 또는 AAV의 다른 천연 유래의(naturally derived) 혈청형 또는 분리체(isolate) 또는 글라이드(Glade), 또는 이의 임의의 유도체 또는 하이브리드이다. 일부 구현예에서, rAAV는 슈도형(pseudotyped) AAV (예를 들어, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/4, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/12, AAV2/10 및 AAV2/9)이다. 일부 구현예에서, rAAV는 하이브리드 AAV(예를 들어, AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9)이다. 일부 구현예에서, rAAV는 유도 진화(directed evolution) 및/또는 합리적인 설계(rational design)(예를 들어, AAV 7m8 또는 AAV-PHP.B)를 통해 개발된다.
- [0166] 일부 구현예에서, rAAV는 하나 이상의 캡시드 돌연변이(예를 들어, Y-F, K-R, T-A, S-A 및/또는 T-V 돌연변이(예를 들어, Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F 및 T491V 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV, 또는 상이한 AAV 혈청형에 대해 상응하는 돌연변이(예를 들어, AAV2/8 (Y733F), AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F) 및 AAV2 (quadY-F+T-V)))를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, c80, rh10 및 ShH10으로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV2/5, AAV2/8, AAV2/8(Y733F), AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/4, AAV2/9, AAV2/6, AAV2/7, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV12, c80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B, 또는 이의 하이브리드, 유도체 또는 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.
- [0167] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 단일-가닥 AAV 벡터 또는 자가-상보적 AAV(scAAV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드 또는 비-바이러스성 벡터(예를 들어, 네이키드 핵산, 리포솜, 덴드리머 및 나노입자)이다.
- [0168] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은: (i) 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4); (ii) 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 5)의 변이체(예를 들어, 아미노산 및/또는 스플라이싱 변이체의 변화); (iii) 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 6)의 하나 이상의 단편; (iv) 다른 종의 하나 이상의 CYP4V2 오솔로그로부터의 서열의 전부 또는 일부, (v) 다른 CYP4 단백질 및 CYP46A1을 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 다른 P450 단백질로부터의 서열의 전부 또는 일부, (vi) 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)의 표 4에 열거된 하나 이상의 유전자에서 하나 이상의 생화학적 이상(abnormality)을 개선, 치료, 저지(arrest)시킬 수 있는 폴리펩타이드, 및/또는 (vii) 상

기의 조합을 포함한다.

- [0169] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4, 5 또는 6에 나타난 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 CYP4V2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 및 CYP46A1(서열번호 4 내지 18), 및 이의 유도체, 하이브리드, 변이체 및/또는 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 침팬지, 레서스 원숭이, 개, 소, 마우스, 랫트, 닭, 개구리, 말, 토끼 및 초파리의 CYP4V2(또는 CYP4V2의 오솔로그)(서열번호 19 내지 29) 및 이의 유도체, 하이브리드, 변이체 및/또는 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다.
- [0170] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4 내지 29로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 서열에 대해 적어도 80%의 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 FxxGxxxCxG 및 ExxR(서열번호 30 및 31)의 서열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)의 표 4에 열거된 하나 이상의 유전자에서 하나 이상의 생화학적 이상을 개선, 치료 또는 저지시킬 수 있는 화합물 또는 제제(agent)이다.
- [0171] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 청구항 43 내지 50항 중 어느 하나의 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 4, 5 또는 6에 나타내거나 또는 서열번호 4, 5 또는 6 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3내 임의의 서열에 대해 적어도 60% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 75% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3의 임의의 서열에 대해 적어도 76% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 2, 또는 3에 나타난 서열을 포함한다.
- [0172] 일부 구현예에서, 조절 서열은 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RPE 세포-특이적 프로모터, 망막 세포-특이적 프로모터, 각막 세포-특이적 프로모터, 안구-세포 특이적인 프로모터 또는 구성적(constitutive) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유동물 베타 액틴 프로모터 또는 바이러스 프로모터이다.
- [0173] 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서(early enhancer)/닭 베타 액틴 프로모터, CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로서 또한 공지됨), 닭 베타 액틴 프로모터, 소CBA(small CBA, smCBA) 프로모터, CB^{SB} 프로모터, 또는 CBh 프로모터, 인간 베타 액틴 프로모터와 같은 다른 베타-액틴 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(short)(EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(EF-1 알파) 프로모터, CMV 프로모터, PGK 프로모터, UBC 프로모터, GUSB 프로모터, UCOE 프로모터, VMD2(난황형 황반 이영양증(vitelliform macular dystrophy) 2; BEST1로도 알려져 있음) 프로모터, RPE65 프로모터, 또는 이의 하이브리드 또는 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.
- [0174] 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴 프로모터, 또한 CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로도 알려져 있음), 연장 인자 1 알파 짧은(EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(EF-1 알파) 프로모터 또는 CMV 프로모터, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드이다. 일부 구현예에서, 조절 서열은 인핸서를 포함한다.
- [0175] 일부 구현예에서, 인핸서는 WPRE 인핸서, HPRE 인핸서, CTE 인핸서, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드를 포함하나 이에 한정되지 않는 바이러스 인핸서이다. 일부 구현예에서, 조절 서열은 폴리아데닐화(폴리A) 신호를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리A 신호는 소(bovine) 성장 호르몬 폴리아데닐화(bovine growth hormone polyadenylation, bGH 폴리A) 신호, 작은 폴리A(small polyA, SPA) 신호, 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화(human growth hormone polyadenylation, hGH 폴리A) 신호, SV40 폴리A 신호, SV40 후기(late) 폴리A 신호, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드이다. 일부 구현예에서, 조절 서열은 코작(Kozak) 서열(서열번호 37 또는 38)을

포함한다.

- [0176] 일부 구현예에서, 조성물은 담체 및 특정 투여 경로에 적합한 추가 성분으로 제형화된다.
- [0177] 다른 양태에서, 본원에 기술된 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0178] 다른 양태에서, 대상체에서 눈 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공되며, 방법은 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 벡터는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함한다.
- [0179] 일 양태에서, 안구 세포의 기능이상, 이영양증, 장애, 변성 및/또는 사멸(death)을 예방, 이의 진행을 저지 또는 지연, 또는 개선시키는 방법이 제공되며, 방법은 벡터를 안구 세포로 전달하는 단계를 포함하고, 여기에서 벡터는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 이의 비-병원성 변이체를 포함한다.
- [0180] 일부 구현예에서, 질환은 비에티 결정 이영양증(비에티 결정 각막망막 이영양증; 비에티 결정 망막병증; 비에티 망막 이영양증; BCD)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 CYP4V2 유전자의 돌연변이에 의해 유발되는 다른 안과적인 임상적으로 정의된 상태(예를 들어, 유전성 망막 변성(IRD), 망막색소 변성증(RP) 또는 각막 이영양증)에 의해 영향을 받는다. 일부 구현예에서, 눈 질환은 광수용체 변성, 망막 색소 상피 세포 변성, 망막 변성, 각막 이영양증 또는 BCD이다.
- [0181] 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터, 재조합 헤르페스 단순포진 바이러스 벡터, 재조합 센다이 바이러스 벡터 및 재조합 레트로바이러스 벡터로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 rAAV 벡터이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12의 임의의 혈청형, 또는 AAV의 다른 천연 유래의 혈청형 또는 분리체 또는 클라이드, 또는 이의 하이브리드, 변이체 또는 유도체로부터 선택되는 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0182] 일부 구현예에서, rAAV 벡터 5' AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 또는 AAV의 다른 천연 유래의 혈청형 또는 분리체 또는 클라이드, 또는 이의 돌연변이, 키메라, 변이체 또는 융합체로부터 선택된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터 3' AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 또는 AAV의 다른 천연 유래의 혈청형 또는 분리체 또는 클라이드, 또는 이의 돌연변이, 키메라, 변이체 또는 융합체 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 구현예에서, rAAV는 키메라 AAV, 셔플된(shuffled) AAV, 또는 캡시드-변형된 AAV이다. 일부 구현예에서, rAAV는 슈도형 AAV(예를 들어, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/4, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/12, AAV2/10 및 AAV2/9)이다. 일부 구현예에서, rAAV는 하이브리드 AAV(예를 들어, AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9)이다. 일부 구현예에서, rAAV는 직접 유도 진화 및/또는 합리적 설계를 통해 개발된다(예를 들어, AAV 7m8 또는 AAV-PHP.B).
- [0183] 일부 구현예에서, rAAV는 하나 이상의 캡시드 돌연변이(예를 들어, Y-F, K-R, T-A, S-A 및/또는 T-V 돌연변이(예를 들어, Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F 및 T491V 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이, 또는 상이한 AAV 혈청형에 대해 상응하는 돌연변이(예를 들어, AAV2/8(Y733F), AAV2(Y444F+Y500F+Y730F) 및 AAV2(quadY-F+T-V))를 갖는 AAV2)를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV의 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Anc80, rh10 및 ShH10으로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV2/5, AAV2/8, AAV2/8(Y733F), AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/4, AAV2/9, AAV2/6, AAV2/7, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV12,c80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B 또는 이의 하이브리드, 유도체 또는 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.
- [0184] 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 단일-가닥 AAV 벡터 또는 자가-상보적 AAV(self-complementary AAV, scAAV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드 또는 비-바이러스성 벡터이다. 일부 구현예에서, 비-바이러스성 벡터는 네이키드 핵산, 리포솜, 덴드리머 및 나노입자로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.
- [0185] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은: (i) 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4); (ii) 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질의 변이체(예를 들어, 아미노산의 변화 및/또는 스플라이싱 변이체)(예를 들어, 서열번호 5); (iii) 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 6)의 하나 이상의 단편; (iv) 다른 종의 하나 이상의 CYP4V2 오솔로그로부터의 서열의 전부 또는 일부; (v) 다른

CYP4 단백질 및 CYP46A1을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 다른 P450 단백질의 전부 또는 일부; (vi) 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)의 표 4에 열거된 하나 이상의 유전자에서 하나 이상의 생화학적 이상을 개선, 치료, 저지시킬 수 있는 폴리펩타이드, 및/또는 (vii) 상기의 조합을 포함한다.

[0186] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화된 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4, 5 또는 6에 나타낸 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 CYP4V2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 및 CYP46A1(서열번호 4 내지 18), 및 이의 유도체, 하이브리드, 변이체 및/또는 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0187] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 침팬지, 레서스 원숭이, 개, 소, 마우스, 랫트, 닭, 개구리, 말, 토끼 및 초파리의 CYP4V2(또는 CYP4V2의 오솔로그)(서열번호 19 내지 29), 및 이의 유도체, 하이브리드, 변이체 및/또는 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4 내지 29로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 핵산 서열에 의해 암호화되는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 FxxGxxxCxG 및 ExxR(서열번호 30 및 31)의 서열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질은 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)의 표 4에 열거된 하나 이상의 유전자에서 하나 이상의 생화학적 이상을 개선, 치료, 저지시킬 수 있는 화합물 또는 제제이다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 청구항 제91항 내지 제97항 중 어느 한 항의 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 4, 5 또는 6에 나타낸 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 4, 5 또는 6 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 비-돌연변이적 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3에 나타낸 핵산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 1, 2 또는 3 중 어느 하나에 대해 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는다.

[0189] 일부 구현예에서, 조절 서열은 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RPE 세포-특이적 프로모터, 망막 세포-특이적 프로모터, 각막 세포-특이적 프로모터 또는 안구-세포 특이적인 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유동물 베타 액틴 프로모터 또는 바이러스 프로모터이다.

[0190] 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴 프로모터, 또한 CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로도 알려져 있음), 닭 베타 액틴 프로모터, 짧은 CBA(smCBA) 프로모터, CB^{SB} 프로모터, 또는 CBh 프로모터, 인간 베타 액틴 프로모터와 같은 다른 베타-액틴 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(EF-1 알파) 프로모터, CMV 프로모터, PGK 프로모터, UBC 프로모터, GUSB 프로모터, UCOE 프로모터, VMD2(난황형 황반 이영양증 2; 또한 BEST1로도 알려져 있음) 프로모터, RPE65 프로모터, 또는 하이브리드 또는 이의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터(하이브리드 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴 프로모터, 또한 CAGGS 프로모터, CB 프로모터 또는 CBA 프로모터로도 알려져 있음), 연장 인자 1 알파 짧은(EFS) 프로모터, 연장 인자 1 알파 짧은(EF-1 알파) 프로모터 또는 CMV 프로모터, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드를 포함한다.

[0191] 일부 구현예에서, 조절 서열은 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, 인핸서는 WPRE 인핸서, HPRE 인핸서, CTE 인핸서, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드를 포함하지만 이에 한정되지 않는 바이러스 인핸서이다. 일부 구현예에서, 조절 서열은 폴리아데닐화(폴리아) 신호를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGH 폴리아), 작은 폴리아 신호(SPA), SV40 폴리아 신호, 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(hGH 폴리아), SV40 레이트 폴리아 신호, 또는 이의 유도체 또는 하이브리드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조절 서열은 코작 서열(서열번호 37 또는 38)을 포함한다.

[0192] 일부 구현예에서, 시험관 내 처리의 경우, 표적 세포는 세포당 약 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC(GC: AAV 입자(백터 게놈(vg) 또는 게놈 입자(gp)로도 알려져 있음)를 함유하는 게놈을 측정하는 게놈 카피)의 용량(MOI)으로 감염된다. 일부 구현예에서, 대상체의 눈에 대한 생체 내 투여의 경우, 단일 투여는 약 1×10^6 내지 2×10^{13} GC(예를 들어, 약 1×10^{11} GC 내지 약 1×10^{12} GC의 고 용량 범위, 약 1×10^{10} GC 내지 약 1

1×10^{11} GC의 중간 용량 범위, 약 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{10} GC의 저 용량 범위, 약 1×10^6 GC 내지 약 1×10^9 GC의 매우 저 용량 범위 및 약 1×10^{12} GC 내지 약 2×10^{13} GC의 매우 고 용량 범위)의 순서일 수 있거나, 또는 원하는 효과를 제공하기에 충분한 이들 범위 내의 임의의 용량일 수 있다.

[0193] 일부 구현예에서, 투여 단계는 질환 증상의 발생 전 또는 질환 증상의 발생 후 일어난다. 일부 구현예에서, 투여는 눈에 대한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 망막하 주사에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 유리체 내 주사에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 벡터를 직접 망막 주사에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 망막 하 위치, 눈의 후안부, 각막 또는 RPE 세포, 광수용체 세포 또는 각막 상피 세포에 효과적으로 전달하는 임의의 다른 투여 방법에 의해 이루어진다.

[0194] 일부 구현예에서, 투여는 각막 전달에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 눈에 대한 투여는 혈류를 통한 전달에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 투여는 눈 점적을 통해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 수정체로의 전달에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 투여는 망막하 공간, 각막, 수정체 또는 유리체 내로 이루어진다. 일부 구현예에서, 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 세포(PRC), 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 내피(CE) 세포, 망막 세포, 각막 세포, 수정체 세포, 신경절 세포, 시신경 세포 및/또는 맥락막 세포뿐만 아니라 줄기 세포(iPSC, ES 세포, MSC, 성체 줄기 세포 및/또는 조직-특이적 줄기 세포를 포함하나 이에 한정되지 않음)로부터 유래되는 상기 유형의 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는이다.

[0195] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 또한 BCD를 앓고 있거나 BCD가 발생할 위험이 있는 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0196] **Cas 를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터에서 EFS 및/또는 SPA의 용도 관련 청구항**

[0197] 일 양태에서, CRISPR 관련 단백질(CRISPR associated protein, Cas)을 암호화하는 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 연장 인자 1 α 짧은(EFS) 프로모터 및/또는 작은 폴리아데닐화(폴리A) 신호(SPA)를 포함하는 재조합 아테노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0198] 일부 구현예에서, EFS 프로모터는 서열번호 35의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어지고, SPA는 서열번호 36의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, EFS 프로모터에 의해 작동 가능하게 연결된 핵산 서열에 의해 암호화되는Cas, 및/또는 SPA는 Cas9 또는 Cpf1이다.

[0199] 본원에 기술된 바와 같은 rAAV를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 세균 세포, 이. 콜라이 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 체세포 또는 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 망막 세포, 각막 세포, 맥락막 세포, 안구 세포, 뇌 세포, 뉴런, 뉴런 세포, iPS 세포, ES 세포, MSC, 성체 줄기 세포, 조직-특이적 세포, 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 임의의 세포이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 핵산 분자에 의해 암호화되는 Cas가 세포에서 발현되도록 숙주 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 청구항 제131항 내지 제134항 중 어느 한 항의 임의의 세포를 포함한다.

[0200] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 상세한 설명, 도면의 설명 및 실시예, 및 청구 범위로부터 명백해질 것이다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 기타 참조문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0201] **정의**

[0202] 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수("a" 또는 "an")는 이것이 사용되는 문맥에 따라 하나 이상을 의미할 수 있음을 이해하여야 한다. 따라서, 예를 들어 "세포"에 대한 언급은 "적어도 하나의 세포" 또는 "하나 이상의 세포"를 의미할 수 있다.

[0203] 용어 "약" 또는 "대략" 또는 기호 "~"는 주어진 값 또는 상태의 플러스 또는 마이너스 10%(포함) 범위를 지칭한다. 문맥으로부터 달리 명확해지지 않는 한, 본원에 제공되는 모든 수치는 약이라는 용어에 의해 변경될 수 있다.

[0204] 용어 "AAV.CYP4V2"는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아테노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 지칭한다.

[0205] 용어 "CYP4V2 유전자 치료요법"은 기능적 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 세포 및/또는 대상체로의 도입을 지칭한다. 개시내용의 상세한 논의를 참조.

- [0206] 용어 "유효량(effective amount)" 또는 "유효 투여량(effective dosage)" 또는 "치료학적으로 유효한 투여량(therapeutically effective dosage)"은 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 때 치료에 충분하고/하거나 치료에 적합한 화합물(예를 들어, 벡터) 및/또는 세포의 양을 지칭한다. 유효량은 사용되는 치료제의 특정 활성, 환자의 질병 상태의 중증도, 및 대상체의 연령, 신체 상태, 다른 질병 상태의 존재와 영양 상태에 따라 달라질 것이다. 또한, 환자가 제공받을 수 있는 다른 의학 및/또는 치료는 투여할 치료제의 유효량의 결정에 영향을 미칠 것이다. 보다 상세한 논의에 대해서는 본원의 설명을 참조한다.
- [0207] 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 1) 질환 또는 상태에 대한 예방 또는 보호, 즉 임상 증상이 발생하지 않도록 하는 것; 2) 질환 또는 상태를 억제, 즉 임상 증상의 발생을 저지, 지연, 개선 또는 억제하는 것; 3) 질환 또는 상태를 완화, 즉 임상 증상의 회귀(regression)를 유발하는 것; 및/또는 4) 병든(diseased) 세포, 조직 및/또는 기관의 기능 상실을 대체하고/하거나 복구하는 것을 포함하는 목적을 위해 대상체에게 본원에 개시된 바와 같은 조성물(예를 들어, 이식유전자 및/또는 세포를 포함하는 AAV)의 투여를 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 상태를 완화; 즉 임상 증상의 회귀를 유발하는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 대안적으로 또는 추가로 이를 필요로 하는 대상체의 예방적 치료를 지칭한다. 예방적 치료는 질환을 앓을 위험이 있는 대상체에게 적절한 용량의 치료제를 제공함으로써, 실질적으로 질병의 발병을 방지함으로써 달성될 수 있다. 궁극적인 유도성 사건(inductive event) 또는 사건들은 알려져 있지 않거나 잠재성일 수 있거나, 환자가 사건 또는 사건들의 발생 후 좋아질 때까지를 확인할 수 없으므로, "예방하는 것(preventing)"과 "억제하는 것(suppressing)" 사이를 구별하는 것이 항상 가능한 것은 아님을 당업계의 기술자는 이해할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어"예방(prophylaxis)"은 "치료(treatment)"의 요소로서 본원에 정의된 바와 같은 "예방하는 것" 및 "억제하는 것" 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0208] 용어 "대상체"는 포유동물과 같은 동물, 예를 들어 인간을 지칭한다. 본원에 기술된 방법은 인간 치료제, 전-임상 및 수의학 적용시 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이고, 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0209] "변이체"는 생물학적으로 활성인 단백질의 치료학적 및/또는 생물학적 활성의 적어도 일부를 보유하는 참조(reference) 생물학적 활성 단백질에 대해 서열 상동성을 갖는 단백질이다. 예를 들어, 변이체 단백질은 참조 생물학적 활성 단백질과 비교하여, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 용어 "생물학적으로 활성인 단백질"은 예를 들어, 부위 지정 돌연변이, 삽입 또는 우연히 돌연변이를 통해 의도적으로 (deliberately) 변형된 단백질을 포함한다. "변이체"는 치료학적 및/또는 생물학적 활성의 적어도 일부를 보유하는 천연 또는 비-천연의 생물학적으로 활성인 단백질의 절단된(truncated) 형태인 "단편(fragment)"을 포함한다.
- [0210] 용어 "핵산(nucleic acid)"은 모든 형태의 핵산, 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 올리고뉴클레오타이드를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 핵산은 게놈성 DNA, cDNA 및 RNA를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생적, 합성 및 의도적으로 변형되거나 변경된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 단일, 이중, 또는 삼중, 선형 또는 고리형일 수 있으며, 임의의 길이일 수 있다. 특정 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 구조는 서열을 5' 내지 3' 방향으로 제공하는 관례에 따라 본원에 기술될 수 있다.
- [0211] 용어 "서열 변이체(sequence variant)"는 이들의 천연 또는 원래의 서열과 비교하여 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 삽입, 결실 및/또는 치환에 의해 변형된 유전자 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 삽입은 유전자 또는 단백질의 말단 또는 양쪽에 위치할 수 있고/있거나, 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열의 내부 영역 내에 위치될 수 있다. 결실 변이체에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 또는 폴리펩타이드에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 제거된다. 치환 변이체에서, 유전자 또는 폴리펩타이드의 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 제거되고, 대안적인 잔기로 대체된다. 일 양태에서, 치환은 사실상 보존적(conservative)이며, 이러한 유형의 보존적 치환은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0212] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료요법(therapy)" 또는 "치료(treatment)"는 대상체에 대해 생체 내에서 또는 세포에서 시험관 내에서 적용될 수 있다.
- [0213] 본원에 사용된 바와 같이, 플라스미드는 벡터의 유형이다.
- [0214] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 복구된(genetically repaired)" 또는 "유전자 복구(genetic

repair)"는 원래 유전자에 유전적 결함(예를 들어, 돌연변이 또는 병리학적 변경)을 갖는 세포를 지칭하며, 이의 유전적 결함은 유전자 교정 또는 세포의 게놈 DNA 또는 mRNA의 파괴를 통해 (본원에서 "유전자 편집(gene editing)", "유전자 편집 치료요법(gene editing therapy)" 또는 "유전자 교정(gene correction)"으로 정의됨), 또는 결함이 있는 유전자에 상응하는 기능적 단백질을 발현하는 세포로의 외인성 핵산 분자의 유전자 이식 또는 보충(본원에서 "유전자 이식 치료요법(gene transfer therapy)" 또는 "유전자 치료요법(gene therapy)"으로 정의됨)을 통해 복구된다.

[0215] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "퍼센트 서열 동일성(percent sequence identity)" 또는 "서열 동일성"은 다음과 같이 결정되고 계산되어야 한다. (퍼센트) 서열 동일성을 계산함에 있어서, 2개의 서열이 정렬되고, 2개의 서열 사이의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 동일한 매치의 수가 결정된다. 동일한 매치의 수는 정렬된 영역의 길이(즉, 정렬된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 수)로 나뉘고, 100을 곱하여 퍼센트 서열 동일성 값에 이른다(그리고 다음의 더 높은 정수로 올려진다(예를 들어, 65.01%는 여기에서 66%로 올림되어 66%로 간주됨)). 정렬된 영역의 길이는 더 짧은 서열의 전체 넷 길이(갭(gap)을 적용하지 않고) 크기까지 하나 또는 둘 모두의 서열의 일부일 수 있음을 이해할 것이다. 뉴클레오타이드 서열을 암호화하는 2개의 단백질 사이의 동일한 매치를 결정하고 서열 동일성을 계산하기 위해, 임의의 비-암호화 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 제한없이 인트론, UTR, Kozak 서열, 프로모터, 인핸서 또는 다른 조절 서열)은 정렬 및 서열 동일성을 계산하기 위하여 2개의 서열을 재출하기 전에 제거되어야 한다. 2개의 서열 사이의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 동일한 매치의 수를 결정하기 위한 2개의 서열의 정렬은 니들만-운슈 알고리즘(Needleman-Wunsch algorithm)(유럽 생물정보학 협회(The European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI) 및 월드 와이드 웹(World Wide Web: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html for nucleotide alignment and ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/for_protein_alignment)에서 이용 가능함)을 사용하고 디플트 매개변수(뉴클레오타이드 서열 사용의 경우: 매트릭스: EDNAFULL. 갭 오픈 페널티(Gap Open Penalty): 10. 갭 연장 페널티(Gap Extend Penalty): 0.5. 출력 양식(Output format): 쌍(pair). 말단 갭 페널티(End Gap Penalty): 거짓(false). 말단 갭 오픈 페널티(End Gap Open Penalty): 10. 말단 갭 연장 페널티(End Gap Extend Penalty): 0.5. 단백질 서열 사용의 경우: 매트릭스: EBLOSUM62. 갭 오픈 페널티: 10. 갭 연장 페널티: 0.5. 출력 양식: 쌍. 말단 갭 페널티: 거짓. 말단 갭 오픈 페널티: 10. 말단 갭 연장 페널티: 0.5)를 사용하여 2개 서열의 최적의 전반적인 정렬을 생성하는 쌍서열 정렬 엠보스 니들(Pairwise Sequence Alignment EMBOS Needle)을 사용함으로써 수행할 수 있다.

[0216] 용어 "아데노-관련 바이러스 벡터(aden-associated virus vector)"는 임의의 AAV 혈청형, 예를 들어 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 혈청형, 또는 AAV 혈청형의 캡시드 단백질에 대해 이의 캡시드 단백질 서열에서 상동성을 공유하는 임의의 다른 바이러스 또는 혈청형으로부터 유래되는 핵산을 지칭한다. 용어 "재조합 아데노-관련 바이러스(recombinant adeno-associated virus)" 또는 "rAAV"는 AAV ITR에 의해 한쪽 측면 또는 양쪽 측면 둘 다가 플랭킹된, 관심 있는 핵산 분자를 캡슐화하는 AAV 단백질 외피(shell)로 구성되는 감염성의, 복제-결함 바이러스를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 특정 AAV 혈청형에 대한 참조는 AAV 혈청형의 적어도 하나의 캡시드 단백질을 갖는 AAV를 의미한다. 예를 들어, 용어 "AAV2"는 적어도 하나의 AAV 혈청형 2 캡시드 단백질을 갖는 AAV를 지칭한다.

[0217] 용어 "CYP4V2"는 사이토크롬 P450 4V2 또는 사이토크롬 P450, 패밀리 4, 서브패밀리 V, 폴리펩타이드 2(때때로 CYP4AH1로 지칭됨) 및 다른 종에서의 그것의 오솔로그를 지칭한다. CYP4V2에서의 돌연변이는 BCD(예를 들어, Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004를 참조) 및 망막색소 변성증(예를 들어, Wang *et al.*, *PLOS ONE* 7:e33673, 2012)과 관련이 있다. 전장 게놈 인간 CYP4V2 유전자는 약 22,053 bp 길이이며, 예를 들어 월드 와이드 웹상의 genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP4V2&keywords=CYP4V2에서 찾을 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "hCYP4V2"는 인간 CYP4V2 유전자 또는 단백질을 지칭한다. hCYP4V2 및 CYP4V2는 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 함유하는 유전자 또는 단백질, 또는 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 함유하지 않는 유전자 또는 단백질을 지칭할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0218] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기능적(functional) CYP4V2"는 발현될 때, 개체(예를 들어, CYP4V2 분자에 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 갖는 개체)에게 치료적 이점(예를 들어, 표적 세포에서 비정상적인 지방산 수준(예를 들어, DHA 수준)을 개선시키거나 구조하는 것)을 제공하는데 효과적인 단백질 또는 이를 생산하는 뉴클레오타이드 분자를 지칭한다. 기능적 CYP4V2 분자는 야생형 hCYP4V2 서열 또는 이의 자연 발생적 변이체(예를 들어, 다형성 변이체; 예를 들어, 병적인 변화(pathologic alteration)를 함유하지 않는 변이체), 또는 최적화된 서열에 상응할 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 분자는 인간 CYP4V2와 유사한 오솔로지

(orthology)를 공유하는 다른 종(예를 들어, 설치류, 토끼, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류와 같은 다른 포유동물)으로부터의 CYP4V2 분자이다. 예를 들어, 인간 CYP4V2 서열의 오솔로그는 쥐과의 mCyp4v3 서열이다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 분자는 다른 P450 분자(예를 들어, CYP4 단백질)이다.

- [0219] 용어 "안구 세포(ocular cell)"는 망막 세포, 망막 양극성 세포, 광수용체 세포 또는 광수용체 선조 세포("PR C"와 함께 간상 세포(rod) 및/또는 원추 세포(cone) 포함), 강글리온 세포, 망막 색소 상피(RPE) 세포, 맥락막 상피(CE) 세포, 각막 상피 세포(CEC), 맥락막 세포, 또는 각막 세포, 또는 시신경 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는, 눈의 기능 또는 이와 관련된 임의의 세포를 지칭한다.
- [0220] 용어 "기능 상실(function loss)" 또는 "기능장애(dysfunction)"는 정상의 병들지 않은 세포와 비교하거나 보다 이른 시점에서 다른 눈 또는 동일한 눈과 비교하여, 세포 기능 (예를 들어, 광수용체 기능, 광수용체 세포 기능, 망막 색소 상피 세포 기능, 수정체 기능, 맥락막 기능 또는 각막 기능)의 감소 또는 이의 상실을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "변성(degeneration)", "위축증(atrophy)", "장애(disorder)", "질환(disease)" 및/또는 "이영양증(dystrophy)"은 기능의 상실과 동의어로 사용될 수 있다. 용어 "증가된 기능(increased function)"은 병든 눈(동일한 안질환을 가짐), 보다 이른 시점에서 동일한 눈, 동일한 눈의 치료되지 않은 부분, 또는 동일한 환자의 반대쪽 눈과 비교하여, 기능(예를 들어, 광수용체, 광수용체 세포, 망막 색소 상피 세포, 맥락막 세포 또는 각막 세포의 기능)의 개선, 또는 기능적 광수용체 또는 세포(예를 들어, 광수용체 세포, 망막 색소 상피 세포, 맥락막 세포 또는 각막 세포)의 수 또는 퍼센트의 증가를 의미한다.
- [0221] 용어 "이식유전자(transgene)"는 세포 또는 유기체로 의도되거나 또는 도입되는 공여체 핵산을 지칭한다. 이식 유전자는 표 4에 제시된 유전자 또는 cDNA와 같은 임의의 유전자를 포함한다.
- [0222] 용어 "약제학적으로 허용 가능한 제형(pharmaceutically acceptable formulation)" 및 "생리학적으로 허용 가능한 제형(physiologically acceptable formulation)" 및 "약제학적으로 허용 가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 생물학적으로 허용 가능한 제형, 가스, 액체 또는 고체, 또는 이들의 혼합물을 의미하며, 이는 하나 이상의 투여 경로, 생체 내 전달, 시험관 내 전달 또는 접촉에 적합하며, 다른 질환을 위한 치료 요법(예를 들어, 다른 안질환을 위한 유전자 치료요법 또는 세포 치료요법)에 사용되는 제형 또는 담체를 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한" 또는 "생리학적으로 허용 가능한" 조성물은 생물학적이거나 또는 그렇지 않으면 바람직하지 않은 물질이며, 예를 들어 물질은 실질적으로 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않으면서 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 약학 조성물은 예를 들어, 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 나노-입자를 세포 또는 대상체로 투여하는데 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 약제학적 투여 또는 생체 내 또는 시험관 내 접촉 또는 전달에 적합한, 용매(수성 또는 비-수성), 용액(수성 또는 비-수성), 에멀전(예를 들어, 수중 오일(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil)), 현탁액, 시럽, 엘릭서, 분산 및 현탁 매질, 코팅제, 등장화제 및 흡수 촉진 또는 지연제를 포함한다. 수성 및 비-수성 용매, 용액 및 현탁액은 현탁화제, 유희제 및 증점제를 포함할 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 정제(코팅되거나 코팅되지 않음), 캡슐(경질 또는 연질), 마이크로비드, 분말, 과립 및 결정을 포함한다. 보충 활성 화합물(예를 들어, 방부제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제 및 면역억제제)를 또한 조성물내로 혼입시킬 수 있다. 약학 조성물은 본원에 제시되거나 담당자에게 공지된 바와 같이, 특정 투여 또는 전달 경로와 양립할 수 있도록 제형화될 수 있다. 따라서, 약학 조성물은 다양한 경로에 의한 투여에 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0223] 용어 "crRNA"는 CRISPR RNA를 지칭하며, 이는 프로토스페이스 요소 및 tracrRNA에 대해 상보적인 추가의 뉴클레오타이드를 둘 다 포함한다.
- [0224] 용어 "tracrRNA"는 교차활성화(transactivating) crRNA를 지칭하며, 이는 crRNA에 혼성화되어 Cas9 단백질에 결합하여 복합체를 활성화시켜 게놈 서열 내의 특정 부위에 이중-가닥 절단(break)을 일으킨다.
- [0225] 용어 "sgRNA"는 단일-가이드 RNA를 지칭하며, 이는 에스. 피오케네스(*S. pyogenes*)의 천연(native) CRISPR/Cas9 시스템에서 분리된 분자인 crRNA 및 tracrRNA를 단일 RNA 구조체로 결합시킨다.
- [0226] 용어 "PAM"은 절단 부위로서 CRISPR 뉴클레아제에 의해 인식되는 게놈의 어느 가닥에서의 짧은 서열인 "프로토스페이스 인접 모티프(proto-spacer adjacent motif)"를 지칭한다. PAM은 뉴클레아제(예를 들어, Cas9, Cpf1 등)에 따라 다르다. 프로토스페이스 요소 서열은 일반적으로 PAM 부위의 바로 상류(upstream)이다.
- [0227] 용어 "프로토스페이스 요소"("가이드 RNA" 또는 "CRISPR gRNA" 또는 "gRNA" 또는 g1, g2, g3, g4, g5 등으로도 지칭됨)는 게놈성 DNA 표적 서열에 대해 상보적인 crRNA(또는 sgRNA)의 일부를 지칭한다.

- [0228] DHA: 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic Acid), 다중불포화된 오메가-3 지방산, 22:6(ω -3) 또는 C22:6 n3으로도 알려져 있음.
- [0229] AA: 아라키돈산(Arachidonic Acid), 다중불포화된 오메가-6 지방산, 20:4(ω -6) 또는 C20:4 n6 또는 ARA로도 알려져 있음.
- [0230] PBS(+): 칼슘 및 마그네슘을 포함하는 포스페이트 완충 염수(phosphate buffered saline, PBS).
- [0231] PBS(-): 칼슘 또는 마그네슘을 포함하지 않는 포스페이트 완충 염수(PBS).
- [0232] **상세한 설명**
- [0233] **BCD 세포 질환 모델을 위한 방법 및 조성물**
- [0234] 적절한 BCD 질환 모델을 개발하고 BCD에 대한 분자 수준의 표현형을 확인하는 것은 BCD에 대한 약물 및 치료 옵션의 중요한 BCD 관련 연구, 개발 및 시험이다. CYP4V2 기능의 연구 또한 중요하다. 본원의 배경 섹션에 요약되어 있는 바와 같이, BCD의 임상적 표현형은 80년 전부터 특성화, 확립 및 연구되어 왔으며, BCD를 유발하는 유전자 돌연변이는 10년에 걸쳐 확인되어 왔다. 그러나, 임상적 표현형(예를 들어, BCD 환자의 망막 내 결정형 침착물)과 기저(underlying) CYP4V2 돌연변이 사이에는 갭이 여전히 존재한다.
- [0235] BCD에 대한 이전의 연구는 섬유아세포, 림프구 및 혈청을 포함하는, BCD 환자에서의 비정상적인 지방산 수준을 발견하였다. 예를 들어, Lee et al., The Metabolism of Fatty Acids in Human Bietti Crystalline Dystrophy, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Jul;42(8):1707-14에서, 연구자들은 BCD 환자의 섬유아세포 및 림프구의 이상을 연구하기 위해 파동-추적(pulse-chase) 방법을 사용하였다. BCD 환자 및 정상 대조군의 섬유아세포 및 림프구를 [(14)C]18:3n-3 또는 [(14)C]18:2n-6과 함께 배양하였다. BCD 환자로부터의 섬유아세포는 18:2n-6이 아닌 18:3n-3으로, 정상인 대상체의 섬유아세포보다 다중불포화된 지방산(PUFA)으로의 전환이 더 낮음을 보여주었다. 다른 연구(Lai et al., Alterations in Serum Fatty Acid Concentrations and Desaturase Activities in Bietti Crystalline Dystrophy Unaffected by CYP4V2 Genotypes, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:1092-7) 에서, 연구자들은 BCD 환자 및 대조군의 혈청 샘플에서의 혈청 지방산 농도를 분석하기 위하여 GC-MS를 사용하였다. 연구는 대조군 대상체와 비교하여 BCD 환자의 혈청에서 옥타데칸산(18:0)의 농도가 더 높을 뿐만 아니라, 대조군 대상체와 비교하여 옥타데카디에노산(18:1n-9)의 농도가 더 낮음을 발견하였다. 또한, 총 단일불포화 지방산 농도는 대조군에서보다 BCD에서 현저하게 더 낮았다. 연구 대상체로서 BCD 환자 샘플을 사용하지 않았던 또 다른 연구(Nakano et al., CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: Ocular Localization, Metabolism of omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids, d Functional Deficit of the p.H331P Variant, Mol Pharmacol 82:679-686, 2012)에서, 결과는 CYP4V2 효소가 오메가-3-PUFA에 대해 오메가-하이드록실라제 활성을 가짐을 시사하였다.
- [0236] BCD 환자의 섬유아세포 및 혈청에서 발견되는 비정상적인 지방산 수준이 BCD 환자의 RPE 세포에 실제로 존재하는지 여부를 확인하는 것이 중요하며, 이 세포는 BCD에 대한 질병 유발 세포이다. 따라서, BCD 환자의 RPE 세포에서 직접 조사를 가능하게 하는 BCD 질환 모델은 잠재적인 치료 옵션의 효능을 평가할뿐만 아니라, BCD 질환 병리 및 CYP4V2 기능에 대한 이해를 얻는데 바람직하다. 그러나, RPE의 위치 및 BCD의 희귀성을 고려할 때, BCD 환자로부터 천연의 RPE 세포를 얻는 것은 실패하지 않다.
- [0237] 본 개시내용은 BCD 세포 모델 및 BCD 세포 모델을 생성하는 방법을 제공한다. BCD 세포 모델은 BCD 환자의 임의의 줄기 세포로부터 유래되는 BCD 환자-특이적 줄기 세포(유도 만능 줄기 세포(iPSC), 배아 줄기(ES) 세포, 체(또는 성체) 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포(MSC)) 및 안구 세포(예를 들어, RPE 세포, 광수용체(간상 세포 또는 원추 세포) 세포, 광수용체 선조 세포, 각막 상피 세포, 수정체 세포 및/또는 맥락막 세포를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함하나 이에 한정되지 않음)로 이루어진다. 환자-특이적 줄기 세포 외에, BCD 세포 모델은 또한 BCD를 앓고 있지 않은 개체의 세포에 인위적인 CYP4V2 돌연변이를 만듦으로써 생성될 수 있으며, 이러한 세포는 ES 세포, iPS 세포 또는 다른 줄기 세포, 또는 줄기 세포로 재프로그래밍될 수 있는 임의의 세포, 또는 임의의 안구 세포(줄기 세포로부터 유래되거나 유래되지 않음)일 수 있다.
- [0238] 유도 만능 줄기 세포 기술은 동물 모델에 대한 질병 모델링을 위한 대안을 제공한다. 그러나, 모든 질환이 iPSC를 사용하여 성공적으로 모델링된 것은 아니다(Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. & Benvenisty, N. Differential Modeling of Fragile X Syndrome by Human Embryonic Pluripotent Stem and Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 6, 407-411 (2010)). 또한, BCD와 관련하여 보고된 지방산 동화작용

을 고려할 때, BCD 환자-특이적 iPSC 또는 환자-특이적 iPSC-RPE 세포가 iPSC 기술에 의해 생성될 수 있는지는 명확하지 않았다.

[0239] **A. 만능성 유도**

[0240] 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 사실상 모든 유형의 체세포는 iPSC 재프로그래밍을 위한 공급원 세포로서 사용될 수 있다. 요약하면, iPSC는 특정 세트의 단백질(예를 들어, 특정 세트의 단백질을 암호화하거나 단백질의 직접 전달에 의한 핵산)을 세포내로 도입함으로써 제조될 수 있다. 당업자는 하나의 예시적이며 비-제한적인 방법이 하나 이상의 OCT4, SOX2, KLF4 및/또는 c-MYC(예를 들어, "야마나카 인자(Yamanaka factor)")를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 도입함으로써 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 재프로그래밍은 4개의 모든 전사 인자를 사용한다. 일부 구현예에서, 1, 2 또는 3개의 전사 인자가 사용될 수 있다. Li et al., Stem Cells, 2009;27:2992-3000. Zhu et al., Cell Stem Cell 2010;7: 651-655. 일부 구현예에서, iPSC는 재프로그래밍 단백질의 직접 전달에 의해 생성될 수 있다. Kim et al., Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. 실시예 섹션은 비-통합(non-integrating) 방법을 사용하여, 예를 들어 쉐다이 바이러스(실시예 1)에 의해 또는 에피솜 방법(실시예 2)에 의해 iPSC를 생산하는 방법을 제공한다. 그러나, iPSC를 생산하는 임의의 방법도 본 개시내용의 범위 내에서 고려된다.

[0241] 다양한 방법(예를 들어, 쉐다이 바이러스, 에피솜 방법, 소분자가 있거나 없음)을 사용하여 iPSC를 생성할 수 있으며, 실시예 섹션을 참조한다. 또한, 예를 들어, Hubbard et al., J. Vis. Exp., 2014, 92:52009를 참조한다. 또한, 다수의 상이한 세포 유형으로부터 iPSC를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9): e45435; Poon et al. 2015, PLoS One, 10(7): e0131288; Lamba et al. 2010, PLoS One, 5(1): e8763를 참조한다. 전형적으로, iPSC는 Oct-4, Sox-2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, AP 및/또는 NANOG를 포함하나 이에 한정되지 않는, 검출가능한 수준의 적어도 하나의 마커를 발현한다.

[0242] 임의의 유형의 줄기 세포가 유도 만능 줄기 세포(iPSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 배아 줄기(ES) 세포, 중간엽 줄기 세포, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 본원에 기술된 BCD 세포 모델을 만드는 데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 줄기 세포는 만능성(pluripotent), 다능성(multipotent) 또는 전능성(topipotent) 줄기 세포일 수 있다.

[0243] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "만능성(pluripotent)"은 적어도 외배엽, 내배엽 및 중배엽 세포 중 하나로 발달할 수 있는 세포를 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 "만능성"은 전능성 및 다능성인 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전능성" 세포는 세포의 모든 계통으로 발달할 수 있는 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다능성"은 말단 분화되지 않는 세포를 지칭한다. 본 개시내용의 만능성 세포는 임의의 줄기 세포일 수 있거나, 또는 섬유아세포와 같은 비-만능 세포로부터 당업계에 공지된 유도, 탈-분화 및 핵 이식 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 본원에 기술된 만능성 세포는 줄기 세포 또는 비-만능 세포로부터 생산되는 줄기 세포인 것과 상관없이, BCD를 앓고 있거나 CYP4V2 돌연변이를 갖는 대상체 또는 대조군으로서 사용하거나 인위적인 CYP4V2 돌연변이를 만드는 데 사용하기 위한 BCD를 앓고 있지 않은 건강한 개체로부터 유래될 수 있다.

[0244] 사실상 임의의 유형의 세포는 iPSC 세포로 재프로그래밍될 수 있다. 본원의 "세포의 기원"이란 표제의 서브-섹션에서의 논의를 참조한다.

[0245] **B. iPSC의 분화**

[0246] BCD 환자의 iPSC 세포는 iPSC-RPE 세포(또는 다른 유형의 안구 세포(예를 들어, iPSC-CEC, iPSC-CE 세포 또는 iPSC-PRC))로 분화되었다. iPSC를 RPE 세포 또는 다른 유형의 안구 세포(예를 들어, CEC 및 PRC)로 분화시키는 방법은 알려져 있다. 예를 들어, 실시예 섹션; Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435; Songstad, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science December 2015, Vol.56, 8258-8267; 및 Lamba et al., PLoS One. 2010 Jan 20;5(1):e8763을 참조한다. 예를 들어, 세포로부터 재프로그래밍된 유도 만능 줄기 세포(iPSC)가 생산될 수 있으며, 예를 들어 RPE 세포(본원에서 "iPS-RPE"로 지칭됨), 각막 상피 세포(본원에서 "iPS-CEC"로 지칭됨), 광수용체 세포(또는 광수용체 선조 세포; 본원에서 "iPS-PRC"로 지칭됨) 또는 iPSC-맥락막 내피(CE) 세포("iPS-CE"로 지칭됨)로 추가로 분화될 수 있다.

[0247] 건강한 대조군의 iPSC-RPE 세포와 비교하여 생화학적 결함/이상을 평가하기 위하여, 분화된 세포, 예를 들어 iPSC-RPE 세포를 생화학적 기능(본원 및 실시예 섹션에 기술된 바와 같음)에 대해 시험하였다.

[0248] 본원에 기술된 바와 같이 생성된 iPSC-RPE 세포주는 형태(예를 들어, 색소 침착 및 육각형 모양)를 나타내고/내

거나 RPE 세포의 지표인 하나 이상의 바이오 마커(biomarker)를 발현한다. RPE 세포(및 iPS-RPE 세포)에 대한 바이오 마커는 공지되어 있으며, 제한없이 RLBP1(CRALBP로도 알려져 있음), RPE65, BESTROPHIN-1, MITF, VINCULIN, LRAT, RDH5, PAX6, MERTK, TYR 및/또는 ZO-1을 포함하며, RPE 분화가 일어나는지를 결정하거나 확인 하는데 사용될 수 있다. 유사하게는, CEC(및 iPS-CEC) 및 PRC(및 iPS-PRC)에 대한 바이오 마커는 공지되어 있으며, 예를 들어 각각 상피 세포에 대한 사이토케라틴 12 및 사이토케라틴 3; 및 광수용체에 대한 Crx, 간상 세포 및 원추 세포에 대한 레코베린(recoverin) 및 간상 세포에 대한 Nr1을 포함한다.

[0249] 실시예 섹션에 기술된 바와 같은 iPS 재프로그램 및 RPE 분화 방법을 통해, BCD 환자-특이적 iPS 및 iPS-RPE 세포가 성공적으로 생성되었다.

[0250] **C. 생화학적 결함/이상을 확인하기 위한 생화학적 검정 및 BCD 환자의 iPS-RPE 세포에서 RPE 위축을 평가하기 위한 세포 생존능 검정**

[0251] 생화학적 검정의 세트를 개발하여, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포에서 표현형을 평가하고 결정하는데 사용하였다.

[0252] 먼저, 보다 완전한 지방산 목록을 생화학적 검정에 포함시켰다. 선행 연구에 따르면 BCD 환자에서 비정상적인 혈청 지방산 수준이 확인되었으며, 샘플은 다음의 지방산 16:0, 16:1, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3, 24:0 및 24:1에 대해 시험되었다. 연구는 대조군 대상체와 비교하여 BCD 환자의 혈청에서 옥타데칸산(18:0)의 농도가 더 높을 뿐만 아니라, 대조군 대상체와 비교하여 옥타데카디엔산(18:1n-9)의 농도는 더 낮음을 발견하였다. BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포에 동일한 지방산 이상이 존재하는지의 여부 및 다른 지방산에 이상이 더 존재하는지의 여부를 결정하기 위하여, 더 많은 지방산을 포괄하는 생화학적 검정을 LC-MS를 사용하여 개발하였다(표 2를 참조).

[0253] 또한, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포가 지방산 외에 다른 이상을 갖는지를 결정하기 위하여, 세라마이드(ceramide, Cer), 스펅고마이엘린(sphingomyelin, SM), 스펅고신(sphingosine) 및 스펅가닌(sphinganine, SOSA)을 포함하는 검정에 다른 지질 종을 포함시켜 BCD 질환 모델에서 표현형을 분석하고 CYP4V2 단백질의 생화학적 기능을 결정하였다. BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포를 시험하는데 사용된 생화학적 검정에 포함된 상이한 종 및 화합물의 목록에 대해 표 2를 참조한다.

[0254] 놀랍게도, 시험 결과(실시예 섹션을 참조)는 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포가 BCD 환자의 혈청에서 발견된 것으로부터 상이한 지방산 비정상적 프로파일을 가짐을 나타내었다.

[0255] 눈은 인간 신체의 광 감각 기관이다. BCD는 RPE 위축으로 시작하여 광수용체 사멸 및 시력 상실을 유발한다. RPE의 주요 기능은 광 흡수이다(Strauss, 2005, The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845-81). 환경적 광 노출은 연령-관련 황반 변성(age-related macular degeneration, AMD) 및 망막색소 변성증(RP)과 같은 인간의 망막 변성의 발생 및 진행에 영향을 미칠 수 있다. 안질환 모델에서 광 노출의 사용은 망막 변성을 연구하기에 적합한 모델 시스템이다. 청색 광 노출을 포함하는 광 노출은 망막 연구에 광범위하게 사용되어 왔다(Dual roles of polyunsaturated fatty acids in retinal physiology and pathophysiology associated with retinal degeneration, Masaki Tanito & Robert Anderson (2009) *Clinical Lipidology*, 4:6, 821-827. Seko, et al., *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Jan; 239 (1): 47-52. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cell of the rat. Narimatsu, et al., *Exp Eye Res*. 2015 Mar;132:48-51. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo). 청색 광은 햇빛과 같은 환경 광 및 인위적인 조명(예를 들어, 사무실 조명)에서 뿐만 아니라, TV, 모니터, 스마트폰, 노트북 및 태블릿과 같은 전자 디스플레이 장치로부터도 존재한다(Moon, et al., Blue light effect on retinal pigment pigmentepithelial cells by display devices, *Integr Biol (Camb)*. 2017, 22:9(5):436-443. doi: 10.1039/c7ib00032d).

[0256] 본 연구에서, 세포 생존능 검정은 BCD 세포 모델에서 RPE 위축증을 발견하였다. (청색) 광에 대한 노출은 대조군 샘플에서보다 BCD 환자의 iPS-RPE 샘플에서 현저하게 더 높은 세포 사멸을 유발하였다. BCD의 임상적 표현형(즉, RPE 위축)은 BCD 세포 모델에서 명백하다. AAV.CYP4V2는 BCD 세포 모델에서 RPE 위축을 구조(rescuing)하는 효능을 입증하였다.

[0257] **D. BCD 세포 모델의 적용**

[0258] BCD와 관련된 세포 수준 표현형을 평가하는 것 외에도, BCD 세포 모델은 약물 스크리닝, 치료제 또는 장치의 개

발, 투여량 범위의 결정, 안전성 및 독성 시험, BCD 또는 CYP4V2와 관련된 다른 상태에 대한 상이한 제형의 시험, 또는 CYP4V2 기능, 및 CYP4V2 단백질을 포함하거나 이를 발현하는 약물의 개발 및 스크리닝을 포함하지만 이에 한정되지 않는 용도, 예를 들어 CYP4V2 유전자 치료요법의 연구를 포함하지만 이에 한정되지 않는 질환 모델의 다른 적용을 위해 사용될 수 있다. 또한, BCD 환자-특이적 iPSC-RPE(및 iPSC-광수용체 세포, iPSC-각막 세포를 제한없이 포함하는, 다른 BCD 환자-특이적 줄기 세포 유래 안구 세포)는 비변형된 형태로 또는 유전자 복구(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 이식 또는 유전자 편집에 의해) 후 세포 치료요법으로서 사용될 수 있다. 실시예 섹션은 BCD 세포 모델의 적용의 비-제한적인 예의 실시예를 제공한다.

[0259] E. 화합물의 스크리닝 방법

[0260] 중요하게는, 본원에 기술된 iPSC-RPE 세포주는 인간 세포 질환 모델(예를 들어, BCD, 망막색소 변성증, IRD)을 제공할 수 있다. 총괄적으로 "iPSC-안구 세포"로 지칭될 수 있는 이러한 iPSC-RPE 세포, iPSC-CEC 세포 또는 iPSC-PRC 세포는 BCD 환자 또는 망막색소 변성증 환자 또는 유전성 망막 질환의 다른 유형을 갖는 환자의 질환 발병, 중증도 및 진행 속도를 진단, 예후, 예측하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 iPSC-안구 세포주는 또한 CYP4V2 핵산(예를 들어, BCD)에서의 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이와 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 치료학적 효능을 가질 수 있는 것에 대해 시험 화합물을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0261] 본원에 기술된 만능성 세포, 특히 CYP4V2에 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 갖는 대상체 또는 눈 질환(예를 들어, BCD)을 갖는 대상체로부터 생산된 만능성 세포는 눈 질환(예를 들어, BCD)의 치료, 진단, 예후 또는 예방을 위한 치료 후보물질인 화합물을 확인하기 위한 방법에서 조사 도구로서 사용될 수 있다. 시험 화합물은 임의의 유형의 화합물일 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 이들은 천연 기원일 수 있거나, 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 이들은 구조적으로 정의된 화학적 화합물, 특성화되지 않은 화합물 또는 물질, 또는 화합물의 혼합물의 라이브러리일 수 있다. 시험 화합물은 제한없이, 핵산 또는 이의 유사체, 폴리펩타이드 또는 이의 유사체, 항체, 화학물질 및 소분자일 수 있음을 당업자는 알 수 있을 것이다.

[0262] 시험 화합물의 존재 또는 부재하에 본원에 기술된 세포는 동물 모델(예를 들어, 동물 모델의 눈)에서 성장하고 기능하는 이들의 능력 및 종양을 형성하는 것에 대한 성향(propensity) 또는 이러한 성향의 결여에 대해 평가될 수 있다. PCR 기술, 면역검정 및/또는 지질/지방산 물질대사 분석을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 방법이 세포를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0263] 세포 치료요법을 위한 방법 및 조성물

[0264] 본원에 논의된 바와 같이, CYP4V2 유전자 치료요법은 BCD 환자-특이적 iPSC-RPE 세포에서 생화학적 이상을 교정하는데 있어서 효능을 입증하였다. 그러나, 유전자 요법이 생체 내에서 작용하기 위한 전제조건은 대상체가 여전히 치료될 눈에 일부 RPE 및 광수용체 세포를 가져야 한다는 것이다. 눈에 남아 있는 RPE 세포 또는 광수용체 세포가 거의 없거나 없는 말기(late-stage) BCD 환자의 경우, 세포 치료요법은 대안으로서 또는 치료 옵션으로서 유전자 치료요법과 함께 사용될 수 있다.

[0265] 세포 치료요법은 새로운 세포를 이식하여 죽거나 변성된 세포를 대체하는 것을 포함한다. BCD의 경우, 새로운 세포는 대상체에서 변성을 나타내고 대체가 필요한 세포의 유형에 따라 RPE 세포, 광수용체 세포(원추 세포 및/또는 간상 세포), 광수용체 선조 세포, 맥락막 세포, 각막 상피 세포, 수정체 세포 또는 다른 유형의 안구 세포일 수 있다. 본원의 하기 설명 및 실시예는 방법 및 공정을 설명하기 위해 iPSC-RPE 세포를 사용하였다. 이들은 다른 유형의 안구 세포에 적용될 수 있다.

[0266] BCD, 및 유전성 망막 질환(IRD), 망막색소 변성증(RP), 황반 변성(연령-관련 황반 변성(AMD) 포함)을 포함하거나 이에 한정되지 않는 다른 유형의 안질환에 대한 세포 치료요법은 다음과 같이 분류될 수 있다.

[0267] (1) 동종이계 이식(allogenic transplantation):

[0268] 일 구현예에서, 배아 줄기 세포(ESC)로부터 유래되는 RPE 세포, PRC, CEC, CE 세포 및 다른 안구 세포 또는 건강한 공여체로부터의 iPSC는BCD에 대한 세포 치료요법으로서 동종이계 이식에 사용될 수 있다. 이는 건강한 개체(즉, CYP4V2 돌연변이를 가지지 않은 개체)로부터의 건강한 ESC 또는 iPSC를 RPE 세포로 분화시키고, 이러한 ESC-RPE 세포를 BCD 환자의 눈으로 이식하는 단계를 포함한다. iPSC를 재프로그래밍하고 ESC 또는 iPSC를 RPE로 분화시키는 방법이 본원의 실시예 섹션에 제공된다. 선행 연구에서는, 배아 줄기 세포(ESC) 유래 RPE 세포가 연령-관련 황반 변성(AMD)을 치료하는데 사용되어 왔다(Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol. 57, ORSFc1-ORSFc9 참조). 동종이식(allo-graft) 또는 동종이계 이식의 장점은 하나의 공통 공급원이 다수의 환자를 치료하는데 사용될 수 있기 때문에, 자가 이식보다 비용이 적게 든다는

것이다. 그러나, 이는 그 효능 및 지속 기간(duration)에 유의미한 영향을 미칠 수 있는 숙주 대상체에 의한 면역 거부와 같은 심각한 단점을 갖는다. 또한, 이는 심각한 전신 부작용을 유발할 수 있는 장기 면역억제제를 필요로 한다. 마지막으로, ESC의 사용은 윤리적 문제를 야기할 수 있다.

[0269] (2) 유전자 복구가 없는 자가 이식:

[0270] 일 구현예에서, 자가 세포가 BCD에 대한 세포 치료요법에 사용될 수 있다. 하나의 이러한 자가 공급원은 BCD 환자로부터 유래되는 iPS 세포 및 iPS-RPE 세포이며, 이는 이러한 BCD 환자의 눈에 이식될 수 있다. BCD는 비교적 늦게 발병하는 질환이다. BCD 환자에서의 증상은 일반적으로 생애의 20대, 30대 또는 심지어 40대에 발생한다. 또한, iPS 재프로그램 프로세스는 iPS 세포 및 iPS 세포로부터 유래되는 세포에 어느 정도의 "시계 재설정(reset the clock)" 효과를 갖는다. 따라서, BCD 환자로부터 유래된 iPS-RPE 세포 및 다른 iPS-안구 세포는 iPS-RPE 세포에서 CYP4V2 돌연변이의 어떤 유전자 복구 없이도 BCD 환자에게 이식하기 위한 세포 치료요법으로서 사용될 수 있다. iPS 재프로그램 및 RPE 분화 방법은 본원의 실시예 섹션에서 제공된다. 예방책으로, iPS 재프로그램 및 RPE 분화 프로세스 동안 돌연변이를 유발하는 임의의 질환이 있는지 여부에 대해 iPS 또는 iPS-RPE 세포의 게놈성 DNA 및 공급원 세포의 게놈성 DNA(예를 들어, 섬유아세포 또는 혈액 세포)를 비교하기 위하여, 전체 게놈 서열분석이 수행될 수 있다.

[0271] (3) BCD 및 다른 유형의 IRD 및 RD에 대한 세포 치료요법을 위한 유전자 복구된 환자 자가세포

[0272] 본원의 개시내용은 세포 치료요법을 위해 유전자 복구된 자가 세포를 생성하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, "유전자 복구된(genetically repaired)" 또는 "유전자 복구(genetic repair)"는 환자의 게놈의 유전자 편집(예를 들어, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, 아연 핑거(Zinc Finger), TALEN을 사용하여 염색체 상에서 직접)을 통하거나, 또는 전형적으로 게놈내로 통합되지 않는 CYP4V2 유전자(cDNA, RNA 또는 다른 형태)의 건강한 카피의 환자 세포로의 유전자 이식(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 CYP4V2 유전자 치료요법) 또는 환자의 세포에서 결함이 있는 mRNA에 대한 교정 또는 보충을 통한 CYP4V2 돌연변이의 교정을 지칭한다.

[0273] 유전자 돌연변이에 의해 유발된 질환과 같이, BCD 또는 다른 IRD 또는 RP에 대한 세포 치료요법에서 사용하기 위한 자가 세포는 이상적으로 이식 전에 복구된 유전자 결함(즉, CYP4V2 돌연변이) 및/또는 기능장애 CYP4V2 단백질질을 가져야 한다. 일 구현예에서, 이러한 유전자 복구는 기능적 CYP4V2 단백질질을 암호화하고 발현하는 핵산 서열분석의 AAV-매개성 유전자 치료요법 전달을 포함하지만 이에 한정되지 않는 본원에 논의된 바와 같은 유전자 이식 치료요법에 의해 달성될 수 있다. CYP4V2 유전자 이식 치료요법의 조성물 및 방법이 본원에 제공되며, 본원의 상세한 설명 및 실시예 섹션을 참조한다. BCD 환자-특이적 공급원 세포, iPS 또는 iPS-RPE 세포는 AAV.CYP4V2(본원에 제공된 바와 같음)에 의해 처리될 수 있고, 이어서 iPS 재프로그램 및/또는 RPE 분화(적용가능한 경우)되고, 개선된 생화학적 기능의 확인(본원에 제공된 바와 같음) 후 동일한 환자의 눈에 이식된다. 다른 구현예에서, 이러한 유전자 복구는 유전자 편집, 예를 들어 BCD 환자의 세포에서 게놈 또는 RNA내 CYP4V2 돌연변이(들)를 교정함으로써 달성될 수 있다. 세포 치료요법의 일부로서 시험관 내에서 적용되는 것 외에, 이러한 유전자 편집은 또한 유전자 치료요법으로서 생체 내에서 직접 적용될 수도 있다. 이러한 유전자 편집은 환자의 공급원 세포(예를 들어, 섬유아세포 또는 혈액 세포), iPS, iPS-RPE 또는 다른 유형의 iPS-안구 세포에서 수행될 수 있다. 환자-특이적 iPS 및 iPS-RPE를 생성하기 위한 iPS 재프로그램 및 RPE 분화는 유전자 복구(예를 들어, 유전자 이식 치료요법 또는 유전자 편집) 전 또는 후에 수행될 수 있다.

[0274] 본원의 개시내용은 유전자 편집을 통해 CYP4V2 돌연변이를 교정하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원의 실시예 섹션에서의 설명은 CRISPR/Cas9 구조체를 사용하여 BCD 환자 사이에서 가장 흔한 돌연변이인 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정하는 조성물 및 방법을 나타낸다. 이는 또한 다른 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cpf1, TALEN, 아연 핑거) 및 당업계에서 공지된 방법과 함께 다른 IRD 돌연변이(예를 들어, 표 1에서의 다른 CYP4V2 돌연변이, 이에 한정되지 않음)에도 적용될 수 있다.

[0275] BCD 환자 사이에서 가장 흔한 CYP4V2 돌연변이는 엑손 7의 예측된 스킵핑(skipping)을 야기하는 c.802-8_810del17insGC이다(CYP4V2 유전자의 인트론 6의 말단으로부터 8개의 염기가 시작하는 곳에 삽입된 2개의 염기(GC)를 갖는 17개의 염기 결실을 지칭하며, 또한 IVS6-8 del/insGC로도 지칭됨, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 포함하는 인간 CYP4V2 게놈성 DNA 영역의 서열을 나타내는 서열번호 46 및 상응하는 야생형 서열을 나타내는 서열번호 47을 참조. c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 인간 CYP4V2 인트론 6-엑손 7 연결부를 나타내는 다음의 서열로 예시됨. 인트론 6 서열은 소문자로 나타내고, 엑손 7 서열은 CAP 문자로 나타냄. 17 bp 결실 및 GC의 삽입은 괄호안에 있음): caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA

CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA)(서열번호 46). (Xiao et al., Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011; Meng et al., 2014, Mol. Vis., 20:1806-14; Wada et al., Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005; Jiao et al., European Journal of Human Genetics (2017) 25, 461-471). 최근 연구에 따르면 c.802-8_810del17insGC 돌연변이의 나이는 중국인의 경우 1,040 내지 8,200 세대(generation), 일본인의 경우 300 내지 1100 세대인 것으로 추정된다. Jiao et al., European Journal of Human Genetics (2017) 25, 461-471을 참조.

[0276] 세포 치료요법(또한 세포 치료요법(cellular therapy) 또는 세포요법(cytotherapy)으로도 알려져 있음)은 대상체에서 눈 질환을 치료 또는 예방하기 위하여 본원에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, BCD, 특정 RP, IRD 및 본원에 언급된 다른 눈 질환은 CYP4V2 핵산 서열에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이와 관련이 있다.

[0277] 세포 치료요법은 일반적으로 세포를 포함하는 조성물을 대상체(예를 들어, 환자의 조직 또는 기관(예를 들어, 눈))에 주사하거나, 임플란트하거나, 이식하거나, 또는 그렇지 않으면 전달하는 것을 포함한다. 본원에 기술된 방법은 눈 질환을 가진 대상체의 유전자 복구된 자가 세포 치료요법을 허용하기 때문에 유일하다.

[0278] 눈 질환(예를 들어, CYP4V2 핵산 서열에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이와 관련됨)을 가진 대상체로부터 세포를 획득하는 단계, 및 CYP4V2 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA) 내에서 돌연변이(들)를 예를 들어, 유전자 편집을 사용하여 복구하거나, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 전달(예를 들어, 유전자 이식)을 통해 복구하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기술되어 있다. 세포는 만능성(예를 들어, iPSC를 제조하기 위해, 예를 들어 만능성을 유도함으로써)으로 제조되고, 대상체(예를 들어, 대상체의 눈)로 다시 투여되기 전에 하나 이상의 안구 세포(예를 들어, iPS-RPE, iPS-CEC, iPS-PRC)로 분화될 수 있다. 세포는 만능성이 되기 전 또는 후에, 또는 안구 세포로 분화된 후에 유전자 복구될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0279] A. 세포의 기원

[0280] 일부 예에서, 자가 세포(예를 들어, 대상체(예를 들어, 환자)-특이적 세포)는 본원에 기술된 세포 치료 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 같은 세포는 대상체로부터 획득되어 실시예 섹션에 기술된 바와 같이 iPSC를 생산하는데 사용될 수 있다. 사실상 모든 유형의 세포가 iPSC를 생성하는데 사용될 수 있으므로, 공급원 세포로서 사용될 수 있다. 일부 예에서, 소변으로부터 획득된 세포(예를 들어, Zhou et al., 2012, Nat. Protoc., 7:2080-9 참조), 또는 모낭 또는 모유두 세포(예를 들어, Muchkaeva et al., 2014, Acta Naturae, 6:45-53 참조)가 iPSC를 생산하는데 사용될 수 있다.

[0281] B. 만능성 유도

[0282] 유도 만능 줄기 세포(iPSC)의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 요약하면, iPSC는 특정 세트의 단백질(예를 들어, 특정 세트의 단백질을 암호화하는 핵산)을 세포로 도입함으로써 제조될 수 있다. 하나의 예시적이며, 비-제한적인 방법은 OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC(예를 들어, "야마나카 인자")를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 도입하는 것에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 재프로그래밍은 4개의 전사 인자를 모두 사용한다. 일부 구현예에서, 1, 2, 또는 3개의 전사 인자가 사용될 수 있다. Li et al., Stem Cells, 2009;27:2992-3000. Zhu et al., Cell Stem Cell 2010;7: 651-655. 일부 구현예에서, iPSC는 재프로그래밍 단백질의 직접 전달에 의해 생성될 수 있다. Kim et al., Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. 실시예 섹션은 비-통합 방법을 사용하여, 예를 들어 쉐다이 바이러스(실시예 1)에 의해 또는 에피솜 방법(실시예 2)에 의해 iPSC를 생산하는 방법을 제공한다. 그러나, iPSC를 생산하는 임의의 방법도 본 발명의 범위 내에서 고려된다.

[0283] iPSC를 생성하기 위해 다양한 방법(예를 들어, 쉐다이 바이러스, 에피솜 방법, 소분자가 있거나 없음)이 사용될 수 있다. 실시예 섹션을 참조한다. 또한, 예를 들어, Hubbard et al., J. Vis. Exp., 2014, 92:52009를 참조한다. 또한, 다수의 상이한 세포 유형으로부터 iPSC를 제조하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9): e45435; Poon et al. 2015, PLoS One, 10(7): e0131288; Lamba et al. 2010, PLoS One, 5(1): e8763를 참조한다. 전형적으로, iPSC는Oct-4, Sox-2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 AP 및/또는 NANOG를 포함하지만 이에 한정되지 않는 검출 가능한 수준의 적어도 하나의 마커를 발현한다.

[0284] 만능 줄기 세포(iPSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 배아 줄기(ES) 세포, 중간엽 줄기 세포, 성체 줄기 세포 또는 조직-특이적 줄기 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 유형의 줄기 세포가 본원에 기술된 세포 치료 방법에서 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 줄기 세포는 만능성, 다능성 또는 전능성 줄기 세포일 수 있다.

- [0285] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "만능성"은 적어도 외배엽, 내배엽 및 중배엽 세포 중 하나로 발달할 수 있는 세포를 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 "만능성"은 전능성 및 다능성인 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전능성" 세포는 모든 계통의 세포로 발달할 수 있는 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다능성"은 말단 분화되지 않는 세포를 지칭한다. 본 발명의 만능성 세포는 임의의 줄기 세포일 수 있거나, 당업계에서 공지된 유도, 탈-분화 및 핵 전달 방법을 사용하여 섬유아세포와 같은 비-만능성 세포로부터 생성될 수 있다. 본원에 기술된 만능성 세포는 줄기 세포 또는 비-만능성 세포로부터 생산되는 줄기 세포인 것에 상관없이, BCD를 갖거나 CYP4V2 돌연변이를 갖는 대상체 또는 건강한 개체로부터 유래될 수 있다.
- [0286] iPSC는 다음 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: a. iPSC의 독특한 형태; b. Oct-4, Sox-2, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog 및 AP와 같은, 하나 이상의 만능성 마커; c. 원하는 세포 유형(예를 들어, RPE 세포)로 분화하는 능력, 및/또는 d. 기형종 검정. iPSC를 특성화하고 만능성을 확인하는데 위의 모든 것이 필요하지는 않다(예를 들어, 기형종; 예를 들어, Buta et al., 2013, Stem Cell Res., 11(1):552-562를 참조).
- [0287] C. 유전자 편집
- [0288] 대상체의 CYP4V2 핵산에 존재하는 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 복구하기 위해 다수의 유전자 편집 기술이 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있다. 유전자 편집은 클러스터된 규칙적으로 간격을 두고 분포하는 짧은 회귀성 반복부(clustered regularly interspaced short palindromic repeats: CRISPR) 기술(예를 들어, 미국 특허 8,697,359; 8,889,418; 8,999,641; 및 US 2014/0068797 참조), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(transcription activator-like effector nucleases: TALEN) 기술(예를 들어, Li et al., 2011, Nucleic Acids Res., 39(14):6315-25 참조) 또는 아연-핑거 뉴클레아제 기술(예를 들어, Wright et al., 2005, The Plant J., 44:693-705 참조)을 포함하는 임의의 수의 기술을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0289] CRISPR 기술을 사용하여 유전자 편집을 달성하기 위해, 뉴클레아제(예를 들어, 종종 Cas9 뉴클레아제이지만 다른 뉴클레아제(예를 들어, 다른 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cpf1, 또는 비-Cas 뉴클레아제)도 사용될 수 있음)를 암호화하는 핵산이 하나 이상의 벡터로 혼입되고, 본원에 기술된 바와 같이 대상체에게 투여될 수 있다. 단순히 예로서, 본원에 기술된 세포(예를 들어, iPSC로 재프로그램되기 전 대상체 세포, RPE, 각막 상피 세포 또는 광수용체 세포로 분화하기 전, 또는 RPE, 각막 상피 세포 또는 광수용체 세포로 분화된 후 대상체 iPSC(본원에서 "iPSCs-RPE", "iPSC-CEC" 또는 "iPSC-PRC"로 지칭됨))는 적어도 하나의 가이드 RNA(gRNA), 적어도 하나의 CRISPR-관련 단백질(예를 들어, Cas9 또는 Cpf1) 및 적어도 하나의 공여체 주형 핵산을 함유하고/하거나 암호화하는 하나 이상의 구조체(예를 들어, 벡터, RNP, mRNA)로 형질도입되거나 형질감염될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 유전자 복구가 녹아웃(knock out)을 통해 달성되는 경우, 공여체 주형 핵산은 필요하지 않다.
- [0290] 유사하게는, TALEN 기술을 사용하여 유전자 편집을 달성하기 위해, TALEN(예를 들어, 이량체성 전사 인자/뉴클레아제)을 암호화하는 핵산은 벡터로 혼입되고, 본원에 기술된 바와 같이 대상체에게 투여될 수 있다. 마찬가지로, 아연-핑거 뉴클레아제 기술을 사용하여 유전자 편집을 달성하기 위해, 통상의 DNA 엔도뉴클레아제(예를 들어, 각각의 소단위가 아연 핑거 도메인 및 FokI 엔도뉴클레아제 도메인을 함유하는 이중이량체)는 하나 이상의 벡터로 혼입되고, 본원에 기술된 바와 같이 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0291] 이러한 각각의 기술을 수행하는데 필요한 구성 요소는 상업적으로 이용가능하며, 특정 표적 서열(들)에 따라 맞춤형(customizable)될 수 있다. 예를 들어, Caribou Biosciences; GenScript, CRISPR Therapeutics; Editas Medicine; Collectis Bioresearch; Life Technologies; Sangamo BioSciences; 또는 Sigma Aldrich Chemical Co.를 참조한다.
- [0292] 적절한 상황에서, 대상체의 CYP4V2 핵산에서 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이를 복구하고, 그 결과 기능적 CYP4V2 단백질이 발현되도록 유전자 편집이 일어날 수 있다. CYP4V2 핵산(예를 들어, CYP4V2 mRNA)의 존재가 회복되거나, CYP4V2 단백질의 존재가 회복되거나, 또는 CYP4V2 단백질의 기능이 회복된 경우, CYP4V2 핵산 서열이 복구되었다. 유사하게는, "복구된(repaired)", 또는 "교정된(corrected)"은 영향을 받은 서열(예를 들어, 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이)의 야생형 서열 또는 본원에 기술된 바와 같은 다른 비-돌연변이 서열로의 복원(restoration)을 지칭할 수 있다.
- [0293] 유전자 편집을 사용하여 하나 이상의 돌연변이를 세포로(예를 들어, CYP4V2 핵산으로) 도입하는 것이 바람직한 경우가 있을 수 있다. 이는 질환의 세포 모델(예를 들어, BCD)을 만들 수 있는 방법이다. 예를 들어, 인위적인 CYP4V2 돌연변이를 갖는 세포주를 생성하기 위해 배아 줄기 세포(ES 세포)에서 유전자 편집이 수행될 수 있으며, 이는 이후 RPE 세포로 분화될 수 있다. 대안적으로, CYP4V2 돌연변이 iPS 또는 RPE 세포주를 생성하기

위해 건강한 대상체(예를 들어, 비-BCD 대상체)로부터의 iPS 세포주 또는 RPE 세포주(예를 들어, ARPE-19 세포주)에서 유전자 편집이 수행될 수 있다.

- [0294] 일부 예에서, 유전자 편집 단계가 완료된 후 세포를 (예를 들어, 전체 게놈 서열분석을 사용하여) 스크리닝하여 표적화된 돌연변이가 복구되고 유의한 오프-타겟(off-target) 편집이 발생하지 않았음을 확인하는 것이 바람직하다.
- [0295] RNA-가이드된 뉴클레아제(Cas9) 및 가이드 RNA로 이루어지는 CRISPR-Cas9로 알려진 CRISPR 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)는 부위-특이적 DNA 절단(break)을 생성하며, 이는 내인성 세포 메커니즘에 의해 복구된다. 이러한 접근법의 가능한 결과는 돌연변이 유발성 비-상동성 말단-결합(mutagenic non-homologous end-joining: NHEJ)을 통해 특정 부위를 돌연변이시키는 것, 절단 부위에 삽입 또는 결실(indel)을 생성하는 것 및 외인성 도입 공여체 주형을 사용한 상동 재조합(HR)을 통한 게놈 서열의 정확한 변화를 포함한다. CRISPR 가이드 RNA는 CRISPR 표적화 RNA(crRNA, 본원에서 CRISPR RNA로도 지칭됨) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)로 명명된 2개의 RNA로 구성된다. crRNA는 전형적으로 약 20개 뉴클레오타이드(nt) 길이이다. 이는 왓슨-크릭 염기 짝짓기(Watson-Crick base pairing)에 의해 표적 DNA 서열에 혼성화하고, Cas 엔도뉴클레아제를 가이드하여 표적 게놈 DNA를 절단한다.
- [0296] 유전자 편집을 통해 가장 일반적인 CYP4V2 돌연변이를 유전적으로 복구하기 위해, 다양한 CYP4V2 돌연변이 CRISPR 교정 구조체를 개발하였다(실시에 섹션을 참조). CRISPR은 TALEN 및 아연 핑거 뉴클레아제와 같은 다른 형태의 유전자 편집보다 더 효율적으로 구현하고 편집하는 것이 더 간단하기 때문에 사용되었다. CRISPR 구조체는 최적화되고 시험관 내에서 확인된 gRNA 서열 및 BCD의 경우, BCD 환자 세포주에서 c.802-8_810del117insGC 돌연변이를 교정하는데 쉽게 사용하여 자가 세포 치료요법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 세포 치료요법에 사용될 수 있는 유전자 복구된 세포를 생성할 수 있는 상이한 구조체 옵션을 함유한다.
- [0297] CRISPR 유전자 편집 치료요법은 뉴클레아제 및 CRISPR 가이드 RNA 인 CRISPR 관련 단백질(Cas)의 사용을 포함한다. CRISPR 가이드 RNA의 역할은 Cas를 표적 서열에 대해 상보적인(또는 이에 특이적인) CRISPR 가이드 RNA에 함유된 프로토스페이서 요소를 통해 CRISPR 가이드 RNA에 의해 표적화된 서열로 가이드하는 것이다. Cas(예를 들어, Cas9 또는 Cpf1)가 표적 서열에 결합하여 이를 절단하거나 표적 서열에 근접하도록 절단하기 위해, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열도 존재할 필요가 있다. PAM 서열은 Cas에 대한 결합 신호로서 작용하는 DNA의 짧은 스트레치(short stretch)(전형적으로, 2 내지 6개의 뉴클레오타이드)이다. 상이한 Cas는 상이한 PAM 및 절단 패턴을 가질 수 있다. 예를 들어, 스트렙토코쿠스 피오케네스 Cas9(SpCas9)의 경우, 기본형(canonical) PAM 서열은 NGG이다. 스트렙토코쿠스 아우레우스(SaCas9)의 경우, PAM 서열은 NGRRT 또는 NGRRN이다. 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)(NM) 및 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*)(Td)의 경우, PAM 서열은 각각 NNNNGATT 및 NAAAAC이다. 조작되거나 돌연변이된 Cas는 또한 변경된 PAM 서열을 생성할 수 있다. 예를 들어, SpCas9 VQR 변이체(D1135V, R1335Q 및 T1337R)의 PAM 서열은 NGAN 또는 NGNG이다. SpCas9 EQR 변이체(D1135E, R1335Q 및 T1337R)의 PAM 서열은 NGAG이다. SpCas9 VRER 변이체(D1135V, G1218R, R1335E 및 T1337R)의 PAM 서열은 NGCG이다. Cpf1의 경우, PAM 서열은 TTTN이다. 전형적으로, Cas는 이중-가닥 절단(break)(double-stranded break, DSB)를 생성하지만, 변경된 Cas는 단일-가닥 절단(예를 들어, SpCas9 닉카아제(Cas9n D10A))를 생성하거나 절단(dCas9)을 생성하지 않는다. Cas9는 PAM 부위의 3 nt 상류에 평활 말단(blunt end)을 생성하는 반면, Cpf1은 엇갈린 방식(staggered fashion)으로 절단되어 PAM으로부터 18 내지 23개 염기 떨어진 5개 뉴클레오타이드 5'오버행(overhang)을 생성한다.
- [0298] Cas9에 대한 CRISPR 가이드 RNA는 전형적으로 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)를 포함한다. CrRNA는 교정, 파괴 또는 대체를 위해 표적화된 유전자에 근접하도록 표적화된 서열에 대해 상보적(또는 특이적)으로 설계된 프로토스페이서 요소 서열, 및 tracrRNA의 상보적 영역에 상응하는 서열을 포함한다. tracrRNA는 crRNA의 상응하는 영역에 상보적인 영역, 및 CRISPR-관련 단백질 9(Cas9)과 상호작용하는 서열을 포함한다. Cpf1에는 TracrRNA가 필요하지 않다.
- [0299] 프로토스페이서 요소의 길이는 전형적으로 약 20개 뉴클레오타이드이다. 더 길거나 더 짧은 프로토스페이서 요소 서열(약 16 내지 24 nt) 또한 사용될 수 있다. 프로토스페이서 요소는 표적 서열에 대해 100% 상보적일 수 있거나, 표적 서열에 대해 미스매치(mismatch)를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, "G" 뉴클레오타이드는 프로토스페이서 요소 서열의 시작(start)에 선택적으로 가해질 수 있다.
- [0300] DNA 분자가 Cas에 의해 절단된 후, 이는 2개의 방법 중 하나에 의해 복구될 수 있다. 오류가 발생하기 쉬운 비-상동성 말단 결합(error-prone non-homologous end joining: NHEJ) 복구는 유전자에 의해 암호화되는 단백질

기능을 파괴할 수 있는 삽입결실(indel) 돌연변이를 초래할 수 있다. NHEJ는 세포주에서 인위적인 돌연변이를 생성하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이는 내인성 CYP4V2 돌연변이가 없는 세포주(예를 들어, ES 세포, iPS 세포 또는 및 ARPE-19 세포주)의 CYP4V2 유전자(예를 들어, 엑손내 삽입결실 또는 스플라이스 수용체 영역)에서 돌연변이를 생성하여 질병 세포 모델(예를 들어, BCD 세포 모델)을 생성하는데 사용될 수 있다. 또한, 2개 이상의 CRISPR 가이드 RNA를 함께 사용하여 표적 유전자의 표적 영역 또는 전체 표적 유전자를 녹아웃(knock out)시켜 녹아웃 모델을 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR 기반 유전자 침묵(silencing)은 예를 들어, 우성 유전 질환을 치료하는데 있어서 결함이 있는 유전자를 파괴(또는 침묵)시키는데 사용된다. 유전자 침묵 동안, 세포는 절단된 DNA를 복구하려는 시도를 하지만, NHEJ는 종종 유전자를 파괴하는 오류와 함께 그렇게 함으로써 유전자를 효과적으로 침묵시킨다. 일부 구현예에서, NHEJ는 또한 예를 들어, 특히 돌연변이가 단일 뉴클레오타이드 변이이거나 또는 약 10개 이하의 뉴클레오타이드의 변이인 경우, 돌연변이의 교정을 초래할 수 있다. 돌연변이의 교정을 야기할 수 있다. 대안적으로, 공여체 핵산 서열이 이용가능한 경우, DNA 절단은 표적 유전자의 교정 또는 대체를 위해 상동성 지정 복구(homology-directed repair: HDR)에 의해 복구될 수 있다. 공여체 핵산 서열은 단일-가닥 DNA(ssDNA, 또는 단일-가닥 올리고 DNA 뉴클레오타이드(ssODN)) 또는 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 ssODN으로 제공되는 공여체 핵산 서열에 대해 약 1kb, 800bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 280bp, 260bp, 240bp, 220bp 또는 200bp 이하이다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 벡터로 제공되는 공여체 핵산 서열에 대해 약 25kb, 20kb, 15kb, 10kb, 9kb, 8kb, 7kb, 6kb, 5kb, 4.5kb, 4kb, 3.5kb 또는 3kb 이하이다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 대칭(symmetrical)이다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열은 비대칭(asymmetrical)이다. 일부 구현예에서, 공여체 핵산 서열의 길이는 더 높은 HDR 비율로 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR 유전자 편집에서 사용되는 Cas에 의해 표적화된 PAM이 공여체 핵산 서열에도 존재하는 경우, 이는 공여체 주형 또는 Cas에 의해 절단되고 파괴되는 공여체 주형에 의해 복구된 DNA 서열을 피하기 위해 PAM이 더 이상 공여체 핵산 서열에 존재하지 않도록 돌연변이(다른 뉴클레오타이드로 변경)될 수 있다. 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자 또는 이의 일부를 교정하거나 대체하는 것 이외에, HDR은 또한 내인성 CYP4V2 돌연변이가 없는 세포주(예를 들어, ES 세포, iPS 세포 또는 ARPE-19 세포주)의 CYP4V2 유전자에 인위적인 돌연변이(예를 들어, 엑손 또는 스플라이스 수용체 영역에 돌연변이 삽입)를 생성하는데 사용되어 질환 세포 모델(예를 들어, BCD 세포 모델)을 생성할 수 있다.

- [0301] CRISPR 유전자 편집 치료요법에 사용되는 CRISPR 가이드 RNA 및 Cas 는 벡터(예를 들어, 플라스미드(예를 들어, pX330, pX458, pX459), 재조합 AAV 벡터 또는 재조합 렌티바이러스 벡터) 또는 이러한 성분(들) 및/또는 RNA 및 단백질 형태를 암호화하는 mRNA 로 제공될 수 있다.
- [0302] 공여체 주형은 ssDNA(예를 들어, ssODN)로 제공되거나, HDR에서 사용하기 위한 플라스미드 또는 다른 유형의 벡터(예를 들어, AAV 벡터(예를 들어, AAV2 또는 AAV6))로 클로닝될 수 있다.
- [0303] 다양한 조성물 및 방법이 타겟팅(on-target) 편집 또는 복구 효율을 향상시키고/시키거나 잠재적인 오프-타겟을 낮추는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상이한 Cas(예를 들어, Cas9 또는 Cpf1) 또는 상이한 종의 Cas(예를 들어, SpCas9, SaCas9, NMCas9) 또는 변이체(SpCas9, SpCas9 VQR)가 표적 서열에 대해 이용가능한 PAM 선택을 증식시켜 특이성을 향상시키는데 사용될 수 있다. 표적 서열 영역이 SpCas9에 대한 NGG PAM 부위가 결여되어 있으나 AT가 강력한 경우, Cpf1이 대신 고려될 수 있다. Cas9 니카아제(예를 들어, Cas9 D10A)는 표적 DNA에서 단일 가닥 절단(single-strand break)만을 생성하므로, 이중 가닥 절단을 생성하기 위해 2 쌍의 CRISPR 가이드 RNA가 필요하다. DSB를 유발할 수 있을 정도로 근접한 거리 내에 2개의 오프-타겟 닉(nick)이 생성될 가능성이 없으므로, 이러한 요구사항은 표적 특이성을 현저하게 증가시킨다. 또한, 비대칭 공여체 주형은 HDR 비율을 증가시킬 수 있다. 촉매적으로 불활성인 dCas9는 표적 DNA를 절단하지 않지만, Cas9 절단에 일반적으로 수반되는 임의의 오류가 발생하기 쉬운 복구 없이도 여전히 서열 대체 달성할 수 있다. Richardson et al., Nature Biotechnology 34, 339-344 (2016)를 참조한다.
- [0304] 표적 유전자 교정을 달성하는 한편, 오프-타겟 편집을 피하거나 최소화시키는 것이 유전자 편집의 두 가지 목적이다. 이전의 연구는 CRISPR 및 TALEN을 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자 편집 기술에 의해 유발되는 오프-타겟 돌연변이를 밝혀내었다. 예를 들어, Tsai et al, Nature Biotechnology 33, 187-197 (2015); Wang et al., Nature Biotechnology 33, 175-178 (2015); Wu, W.H. et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. Mol. Ther. 24, 1388-1394 (2016)를 참조한다. 생체 내에서 또는 세포 치료요법(예를 들어, 먼저 시험관 내의 세포에서 및 이후 생체 내에서 세포를 이식)에 사용되는 유전자 편집의 경우, 오프-타겟 편집을 피하거나 최소화하는 두 번째 목적은 오프-타겟 편집이 질환을 유발하거나 종양 형성을 유도할 수 있으므로 표적 유전자 교정을 달성하는 것만큼 중요하다. 모든 오프-타겟 편

집이 컴퓨터 소프트웨어 또는 알고리즘에 의해 예측될 수 있는 것은 아니라는 점에 유의하여야 한다.

- [0305] 따라서, CYP4V2 돌연변이 CRISPR 유전자 교정 구조체를 개발하고 확인하는데 신중한 설계, 확인 및 개선이 사용되었다:
- [0306] (1) 다수의 gRNA 후보물질을 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 함유하는 돌연변이체 CYP4V2 핵산 서열에 기초하여 생성하였다
- [0307] (2) 다음 기준을 이용하여 상위 5개의 gRNA를 선택하였다(서열번호 48 내지 52, 표 5 및 도 12 참조):
- [0308] a. 변형 부위에 대한 gRNA 절단 부위의 근접성(proximity), 및
- [0309] b. gRNA의 오프-타겟 프로파일;
- [0310] (3) 상위 5개의 gRNA의 활성을 동형의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이의 게놈 DNA에서 확인하였다(도 13 참조);
- [0311] (4) (2) 및 (3)에 기초하여, 3개의 gRNA를 선택하였다. Cas9를 암호화하는 핵산 서열 및 퓨로마이신을 사용하는 형질감염된 세포 선별을 위한 퓨로마이신 내성 유전자(Puro)와 함께 3개의 gRNA 각각을 pX459 플라스미드에 클로닝하였다(도 15 및 18 참조).
- [0312] (5) HDR 공여체 핵산 서열을 제공하는 2개의 공여체 주형(정방향(forward) 및 역방향(reverse)에 상보적)을 생성하였다. 공여체 주형 서열을 함유하는 ssODN을 IDT에 의해 합성하였다(서열번호 56 및 57 참조).
- [0313] (6) 플라스미드 구조체 외에, CRISPR RNP 구조체를 개발하였다. RNP 구조체는 다른 구조체보다 특정 장점을 부여한다. 상세한 논의는 하기 및 실시예 섹션에서 제공된다.
- [0314] (7) CYP4V2 CRISPR 교정 구조체는 동형 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는 BCD 환자로부터 유래되는 iPS 세포에서 확인된다.
- [0315] (8) 전체 게놈 서열분석을 비변형 세포, 및 CYP4V2 돌연변이 CRISPR 교정 구조체에 의해 유전자 복구된 iPS 세포에서 수행하여 c.802-8_810del17insGC 돌연변이의 교정을 확인하고 오프-타겟 편집을 평가하였다.
- [0316] iPSC의 형질감염을 위한 최적 조건을 결정하고, 형질감염된 세포를 선택하기 위한 방법이 제공된다. 상세한 설명에 대해서는 실시예 섹션을 참조한다. 이들 구조체는 시험관 내에서 BCD 환자-특이적 iPS 세포, 시험관 내에서 BCD 환자-특이적 iPS 세포로부터 유래되는 공급된 세포(예를 들어, 섬유아세포 또는 PBMCs) 또는 iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CE 세포 또는 iPS-CEC 세포 또는 다른 안구 세포뿐만 아니라, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는 환자의 생체 내에서 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 일 구현예에서, 구조체의 성분은 직접 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 구조체의 성분은 생체 내에서 더 높은 형질도입 효율 또는 표적 세포 유형에 대한 더 높은 특이성을 달성하거나 다른 목적을 달성하기 위해 변형되거나 다른 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 Cas9 닉카아제(Cas9n D10A)로 변형될 수 있으며, 이는 이중-가닥 절단과는 대조적으로 단일-가닥 닉을 생성할 수 있게 하는 돌연변이를 함유한다. 2개의 대면하고 있는 gRNA 서열과 SpCas9 닉카아제가 쌍을 이루는 것(pairing)은 원치 않는 삽입결실이 형성되는 것을 방지하는 효율적인 유전자 편집 방법이다. 플라스미드 이외에, CRISPR 성분을 패키징하는데 사용되는 다른 일반적인 벡터는 렌티바이러스 벡터 및 아테노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다. AAV 벡터를 사용하는 경우, SaCas9는 SpCas9보다 대략 1 kb 더 짧고 AAV 패키징 제약(constraint)에 추가적인 융통성(flexibility)을 제공하기 때문에, 스타필로코쿠스 아우레우스 Cas9 오솔로그(SaCas9)가 엔도뉴클레아제로서 사용될 수 있다.
- [0317] 다양한 개선이 CRISPR RNP 구조체에 대해 이루어졌다. IVT sgRNA 또는 crRNA:tracrRNA 듀플렉스(duplex) 대신에 합성 sgRNA가 사용되었다. 합성 gRNA는 IVT sgRNA보다 더 높은 순도를 가지므로, sgRNA의 불순물에 의해 야기되는 오프-타겟 편집의 위험이 낮다. 또한, 화학적 변형이 sgRNA에 적용되어 세포내 분해로부터 sgRNA를 보호하여 편집 효율을 증가시킬 수 있다. 자세한 내용은 실시예 섹션을 참조한다.
- [0318] 본원에 기술된 플라스미드 구조체 및 CRISPR RNP 구조체 외에, Cas9-암호화 mRNA 및 가이드 RNA 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA 구조체 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0319] BCD 환자-특이적 iPS 세포를 CYP4V2 돌연변이 CRISPR 교정 구조체로 형질감염시킨 후, 형질감염된 세포는 퓨로마이신을 사용하여 선택된다. GFP와 같은 다른 마커가 구조체로 도입되어 퓨로마이신 대신 또는 퓨로마이신 이외의 마커로서 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 선택 이후, 단일 세포 클로닝이 수행된 후, 단일 세포 클론

으로부터의 일부 세포가 서열분석을 위해 수거된다. 서열분석 후 결과가 성공적인 타겟팅(on-target) 유전자 편집을 확인하고, 질병을 유발하는 유전자 편집이 발견되지 않으면, 동일한 클론의 나머지 세포는 원하는 안구 세포 유형, 예를 들어 iPS-RPE 세포로의 분화를 위해 사용된다.

[0320] D. iPSC의 분화

[0321] 유전적자 복구된 BCD 환자 iPSC 세포는 iPSC-RPE 세포(또는 다른 유형의 안구 세포(예를 들어, iPSC-CEC, iPSC-CE 세포 또는 iPSC-PRC))로 분화된다. iPSC를 RPE 세포 또는 다른 유형의 안구 세포(예를 들어, CEC 및 PRC)로 분화시키는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, Hayashi et al., 2012, PLoS One, 7(9):e45435; Songstad, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science December 2015, Vol.56, 8258-8267; 및 Lamba et al., PLoS One. 2010 Jan 20;5(1):e8763를 참조한다. 예를 들어, 세포로부터 재프로그래밍된 유도 만능 줄기 세포(iPSC)가 생산되고, 예를 들어 RPE 세포(본원에서 "iPS-RPE"로 지칭됨), 각막 상피 세포(본원에서 "iPS-CEC"로 지칭됨), 광수용체 세포(또는 광수용체 선조세포; 본원에서 "iPS-PRC"로 지칭됨) 또는 iPSC-맥락막 내피(CE) 세포(본원에서 "iPS-CE"로 지칭됨)로 추가 분화될 수 있다.

[0322] 분화된 세포, 예를 들어 iPSC-RPE 세포는 유전자 복구되지 않은 환자의 iPSC-RPE 세포와 비교하여 생화학적 기능이 개선되었음을 확인하기 위하여 생화학적 기능(실시에 섹션에 기술된 바와 같음)에 대해 시험된다.

[0323] 본원에 기술된 바와 같이 생산된 iPSC-RPE 세포주는 형태(예를 들어, 색소 및 육각형 형태)를 나타내고/내거나 RPE 세포의 지표인 하나 이상의 바이오 마커를 발현한다. RPE 세포(및 iPSC-RPE 세포)에 대한 바이오 마커는 공지되어 있으며, RBP1(CRALBP로도 알려져 있음), RPE65, BESTROPHIN-1, MITF, VINCULIN, LRAT, RDH5, PAX6, MERTK, TYR, 및/또는 ZO-1 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, RPE 분화가 발생했는지 결정하거나 확인하는데 사용될 수 있다. 유사하게는, CEC(및 iPSC-CEC) 및 PRC(및 iPSC-PRC)에 대한 바이오 마커는 공지되어 있으며, 예를 들어 각막 상피 세포의 경우 사이토케라틴 12 및 사이토케라틴 3; 및 광수용체의 경우 Crx, 간상 세포와 원추 세포의 경우 레코베린, 및 간상 세포의 경우 Nr1을 포함한다.

[0324] E. 투여/전달

[0325] 유전자 복구된 iPSC-RPE 세포는 iPSC-RPE 세포가 유래하는 환자에게 자가 이식하는데 사용될 수 있다. CYP4V2 돌연변이로 인하여 BCD 또는 다른 안과적 상태를 갖는 환자는 본원에 제공되는 세포 치료 방법으로 치료될 수 있다. 유사하게는, 방법은 하나 이상의 유전자 돌연변이에 의해 유발되는 다른 안질환에 대해 유전자로 복구된 자가 세포 치료요법을 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0326] 세포를 투여하거나 전달하는 방법은 공지되어 있으며, 세포를 눈에 투여하거나 전달하는 방법도 공지되어 있다. 예를 들어, Wert et al., J Vis Exp. 2012; (69): 4286; WO 2016/179496; Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol.57, ORSFC1-ORSFC9를 참조한다. 일 구현예에서, 안구 세포는 세포 현탁액, 예를 들어 RPE 세포의 현탁액의 주사를 통해 이식될 수 있다. 다른 구현예에서, 세포는 시트(sheet) 또는 스캐폴드의 일부로서, 예를 들어 천연 및/또는 합성 스캐폴드를 사용하여 시험관 내 조직으로 이식되어 분극화된(polarized) 기능적 RPE 단층을 생성할 수 있다.

[0327] 눈에 투여되는 세포의 치료학적 유효량은 당업자에게 공지되어 있으며, 이식될 세포의 유형, 이식될 세포의 성숙도(maturity) 및 이식 후 분열(divide)될 지 여부, 대체를 위해 표적화된 세포의 면적 크기 또는 수, 및 치료될 대상체(예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 성별, 체중, 질병의 발생 단계 및 상태); 투여 경로; 및 필요 요법(regimen)에 따라 달라질 것이다. 안구 세포 치료요법에 사용되는 세포의 치료학적 유효량은 단일 투여시 약 1×10^3 내지 약 1×10^8 세포의 범위일 수 있다.

[0328] 개별 대상체에 대해 iPSC 세포주가 생성될 수 있지만, 일반적인 HLA 1배체형(haplotype)을 가진 iPSC의 세포 बैं크(또는 여기서 HLA 1배체형은 유전적으로 조작된다)가 생성될 수 있으며, 이는 환자 집단의 많은 부분과 면역학적으로 일치하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, Turner et al., Cell Stem Cell, 13:382-384, 2013을 참조한다. 또한, 대상체의 유전자형과 관계없이 면역학적 침묵 iPSC 세포주가 생성될 수 있다(예를 들어, Rioloobos et al., Mol. Ther., 21:1232-41, 2013 참조). 이들 방법과 조합되는 경우, 환자-특이적 iPSC 세포 및 iPSC-안구 세포는 엄격한 자가의 의미에서 사용될 수 있을 뿐 아니라, 다른 환자에게 이식하는데 사용될 수 있다.

[0329] 전형적으로, 세포 치료요법 투여 단계는 질환 증상의 발병 후, 또는 적용가능한 경우, 대상체가 망막 변성 또는 각막 이영양증의 징후를 나타낸 후에 일어난다. 일 구현예에서, 본원에 제공되는 안구 세포 치료요법은 안질환(예를 들어, BCD) 치료와는 독립적으로 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 안구 세포 치료요법은 본원에 제공되는 CYP4V2 유전자 이식 치료요법 및/또는 CYP4V2 CRISPR 유전자 편집 치료요법을 포함하지만

이에 한정되지 않는 하나 이상의 다른 치료 옵션과 조합하여 사용될 수 있다.

- [0330] 유사하게는, 투여는 한 번 또는 여러 번(예를 들어, 몇 주, 몇 달 또는 몇 년에 걸쳐) 일어날 수 있으며, 동일한 눈 또는 반대편 눈에 적용될 수 있다. 또한, 하나 이상의 세포 유형이 단일 또는 개별 투여로 투여될 수 있다.
- [0331] 치료 후 평가는 시력(visual acuity), 시계(visual field), 암 순응(dark adaptation), 시각기능(visual function) 및/또는 광간섭 단층촬영장치(Optical Coherence Tomography(OCT), 예를 들어 스펙트럼 도메인(Spectral Domain)-OCT(SD-OCT)) 및 ERG와 같은 시력 검사를 통한 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본원의 CYP4V2 유전자 치료요법 섹션에 기술된 방법을 사용할 수 있다.
- [0332] **안구 세포 치료요법 및 유전자 치료요법에서 CRISPR RNP를 사용하는 방법**
- [0333] CRISPR RNP는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)과 복합체화된 가이드 RNA를 포함하는 유전자-편집 리보핵 단백질(gene-editing ribonucleoprotein, RNP) 복합체이다. 가이드 RNA는 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)로 명명된 2개의 RNA로 구성된다. 일 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 2개의 별도의 핵산 분자로서 제공된다. 다른 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 키메라 단일 가이드 RNA(sgRNA)에 결합될 수 있다. sgRNA는 약 100 뉴클레오타이드(nt) 길이 또는 필요에 따라 더 짧거나 길 수 있다. 5' 말단에서 20 nt(crRNA)는 왓슨-크릭 염기 짝짓기에 의해 표적 DNA 서열에 혼성화되고, Cas9 인식을 위해 3' 측에 남아있는 이중 가닥 구조와 함께 Cas 엔도뉴클레아제가 표적 게놈 DNA를 절단하도록 안내한다.
- [0334] CRISPR RNP는 전통적인 Cas9/gRNA 구조체(예를 들어, 핵산 서열, CRISPR 가이드 RNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 플라스미드 구조체)와 비교하여 프로(pro) 및 원추 세포(con)를 갖는다. 예를 들어, 가이드 RNA(crRNA 및 tracrRNA) 및 Cas9 단백질은 온전한(intact) 복합체로서 표적 세포로 전달될 수 있으며, CRISPR 성분을 발현하기 위해 세포 자신의 전사 기구의 필요성을 극복한다. 그 결과, CRISPR RNP는 형질감염 후 신속하게 편집될 수 있다. 또한, CRISPR 성분은 세포로부터 더 빠르게 고갈되며, 이는 오프-타겟 편집의 가능성(chance)을 감소시킬 수 있다. 또한, 이는 플라스미드에 의해 야기되는 통합 돌연변이 유발(integrational mutagenesis)의 가능성을 감소시킬 수 있다. 이러한 장점을 고려할 때, RNP는 또한 생체내 유전자 편집에 유리할 수 있다. 한편, 그러나, RNP는 단백질 분해를 통해 세포로부터 빠르게 제거됨에 따라, 세포에서 발현이 보다 오래 지속되는 플라스미드 구조체보다 타겟팅(on-target) 편집 효율이 더 낮을 수 있다.
- [0335] 상기 가설을 평가하고 CRISPR RNP 구조체가 안구 세포 치료요법 및 유전자 치료요법에서 원하는 유전자 편집의 목적 둘 다를 달성할 수 있는지 여부를 입증하기 위하여, 2 세트의 구조체를 설계하였다. 하나의 구조체는 플라스미드 구조체며, 나머지 하나는 RNP 구조체다. 구조체 둘 다는 형질감염을 위해 동일한 BCD 환자의 iPS 세포를 사용하며, 이는 추후 각각의 구조체의 타겟팅(on-target) 유전자 복구 및 오프-타겟 편집을 분석하기 위해 서열 분석된다. 오프-타겟 편집은 동일한 환자의 비변형 섬유아세포로부터의 게놈 DNA에 대해 비교함으로써 결정된다. 플라스미드 구조체 및 RNP 구조체 둘 다로부터의 결과를 비교할 수 있다.
- [0336] RNP, RNP를 형성하고 RNP 구조체를 사용하여 BCD 환자에 대한 유전자 복구된 세포(iPS 및 iPS-RPE 세포)를 생성하기 위한 방법의 상세한 설명이 실시예 섹션에 제공된다.
- [0337] 유사한 CRISPR RNP 구조체가 BCD의 다른 돌연변이 및 다른 RP 및 IRD의 돌연변이를 교정하거나 불활성화하는데 사용될 수 있음에 유의하여야 한다. 일 양태에서, 본원에 사용되는 crRNA 서열은 상이한 표적 돌연변이 서열을 특이적으로 표적화하는 다른 crRNA 서열로 변경된다. 다른 양태에서, RNP 구조체에서 가이드 RNA 또는 sgRNA는 유전자 편집 효율을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. Hendel et al, Nat Biotechnol. 2015 Sep; 33(9): 985-989를 참조. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 전기천공을 사용하여 형질감염될 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 지질감염 또는 핵감염을 사용하여 형질감염될 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 미세주사를 통해 전달될 수 있다.
- [0338] 시험관 내에서 환자의 세포를 유전자 복구하고 치료하는 것 외에도, CRISPR RNP 구조체는 생체 내 유전 돌연변이에 의해 유발되는 안질환을 치료하는데 사용될 수 있으며, 생체 내 적용을 위한 다른 유형의 CRISPR 구조체(예를 들어, 플라스미드 및/또는 CRISPR 구성요소를 암호화하는 mRNA)에 비해 이점을 갖는다. 예를 들어, CRISPR RNP 구조체는 시험관 내 전사된 Cas9 mRNA 및 sgRNA와 비교하여 더 높은 효능, 더 낮은 오프-타겟 위험 및/또는 더 낮은 독성 또는 선천적(innate) 면역 반응 활성화를 갖는다. 일 구현예에서, 돌연변이 DNA 서열의 영역을 표적으로 하는 가이드 RNA와 복합체화된 Cas9 단백질로 구성되는 CRISPR RNP 구조체는 대상체의 눈으로(예를 들어, 망막하 주사, 유리체내 주사 또는 각막에) 직접 주사될 수 있다. 다른 구현예에서, 생체 내 뇌 세

포에서 편집 효율이 증가된 다중 SV40 핵 국제화 서열(NLS)을 갖는 Cas9의 조작된 변이체(Stahl et al., Nat Biotechnol. 2017 May;35(5):431-434)는 안구 세포에서 더 높은 편집 효율을 달성하는데 사용될 수 있다. 하나 또는 다수의 NLS(N-말단 및/또는 C-말단에서)를 갖는 Cas9 단백질은 IDT 및 Feldan과 같은 다양한 CRO에서 상업적으로 이용 가능하다. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 "있는 그대로(as is)" 전달된다. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 전달될 때 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화된다. 일부 구현예에서, CRISPR RNP 구조체는 패키징된 형태, 예를 들어 나노입자로 전달된다.

[0339] CRISPR RNP 구성요소들, 예를 들어 가이드 RNA와 Cas9 단백질 사이의 비는 시험관 내 또는 생체 내 처리 전에 시험관 내 환자 세포주(예를 들어, BCD 환자-특이적 iPS 세포 또는 iPS-RPE 세포)에서 상이한 비를 시험함으로써 조정되고 최적화될 수 있음이 이해될 것이다. CRISPR RNP 구조체는 독립적으로, 또는 CRISPR 가이드 RNA 또는 crRNA를 암호화하는 플라스미드 또는 벡터, 또는 Cas 단백질 또는 이의 조합; Cas9-암호화 mRNA; 가이드 RNA 올리고뉴클레오타이드; 다른 CRISPR RNP 구조체; 또는 이들의 조합 또는 하이브리드를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 CRISPR 구조체와 조합하여 사용될 수 있다. 또한, CRISPR RNP 구조체는 하나 이상의 안질환과 관련된 하나 이상의 돌연변이를 교정하거나 불활성화하는데 사용될 수 있다.

[0340] **유전자 치료요법 및 세포 치료요법 조합 치료**

[0341] 본원의 개시내용은 CYP4V2 유전자 이식 치료요법 및 CYP4V2 CRISPR 유전자 편집 치료요법을 포함하지만 이에 한정되지 않는, BCD 및 CYP4V2 돌연변이에 의해 유발된 다른 안질환에 대한 다수의 치료 옵션을 제공한다. CYP4V2 유전자 이식 치료요법 및 CYP4V2 유전자 편집 치료요법은 둘 다 생체 내 또는 시험관 내, 또는 생체 내 및 시험관 내에서 사용될 수 있다. 생체 내 적용되는 경우, CYP4V2 유전자 이식 치료요법 및/또는 CYP4V2 CRISPR 유전자 편집 치료요법은 유전자 치료요법으로서 BCD에 의해 영향을 받는 나머지 안구 세포를 치료할 수 있다. 환자 세포 또는 환자 유래 세포의 시험관 내 적용의 경우, CYP4V2 유전자 이식 치료요법 및/또는 CYP4V2 CRISPR 유전자 편집 치료요법에 의해 처리된 세포는 세포 치료요법으로서 죽거나 변성된 안구 세포를 대체하기 위해 환자에게 이식될 수 있다. 중요하게는, 본원에 제공되는 유전자 치료요법 및 세포 치료요법 조성물 및 방법은 유전자 치료요법 또는 세포 치료요법을만 사용하여 달성될 수 없는 환자에게 추가적인 이점을 제공하기 위해 조합될 수 있다. "조합 치료(combination treatment)"는 또한 적격 환자 기반을 넓힐 수 있다. 예를 들어, 광수용체 또는 RPE 세포가 없거나 거의 없는 말기 단계 환자의 경우, 유전자 치료요법은 초기-단계 환자만큼 효과적이지는 않다. 이 경우에, 세포 치료요법은 새로운 세포(예를 들어, RPE 또는 광수용체 세포)를 제공함으로써 유리할 수 있지만, 유전자 치료요법은 남아있는 RPE 또는 광수용체 세포를 구조하고/하거나 건강이 안구 세포의 상태에 영향을 미치는 맥락막 세포의 상태를 개선시킴으로써 세포 치료요법의 효과를 향상시킬 수 있다. 유전자 치료요법 및 세포 치료요법 각각의 "구조(rescue)" 및 "대체(replacement)" 효과의 조합은 조합 치료를 유전자 치료요법 또는 세포 치료요법으로부터 개선시킨다. 이러한 조합 치료 방법은 하나 이상의 유전 돌연변이에 의해 유발되는 다른 안질환에 적용될 수 있다.

[0342] **CYP4V2 유전자 치료요법에 대한 방법 및 조성물**

[0343] 본 개시내용은 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 다양한 조성물 및 이를 활용하여 안구 세포 및/또는 안질환을 치료하는 다양한 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 치료 목적을 위해 직접 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자가 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 이러한 핵산 분자를 포함하는 발현 카세트는 핵산 분자의 생성물의 발현을 유도하고 제어하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 벡터는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및 표적 세포에 대한 전달을 향상시키기 위한 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 이러한 CYP4V2 발현 카세트를 패키징하고, 이러한 CYP4V2 암호화 핵산 분자 및 발현 카세트의 생성물의 원하는 발현을 달성하기 위해 사용된다.

[0344] 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 구현예에서, 벡터는 다른 유형의 바이러스 또는 비-바이러스성 벡터이다. 치료 방법은 유효량(또는 유효 농도)의 상기 벡터를 대상체의 눈 및/또는 표적 세포에 투여하거나 전달하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 치료는 생체 내에 직접 적용된다. 다른 구현예에서, 치료는 표적 세포(예를 들어, 안구 세포)의 생체 외(ex vivo) 처리 및 처리된 표적 세포를 대상체(예를 들어, 대상체의 눈)로 이식하는 것을 포함한다. 치료 방법은 안질환 및 CYP4V2 돌연변이와 관련된 다른 상태에 관한 것이다. 일 구현예에서, 안질환은 비에티 결정 이영양증(BCD)이다.

[0345] A. 기능적 CYP4V2 단백질 및 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산

- [0346] CYP4V2(사이토크롬 P450, 패밀리 4, 서브패밀리 V, 폴리펩타이드 2, (MIM 608614), 동의어: CYP4AH1)는 사이토크롬 P450 슈퍼패밀리(P450)의 단백질 중 하나이며, 사이토크롬 P450 서브패밀리 4(CYP4)의 구성원이다. 사이토크롬 P450(CYP)은 옥시다아제 효소로서 이들의 역할이 알려진, 중요한 헴-함유 단백질이다. 용어 P450은 효소가 환원된 상태이며 일산화탄소와 복합체화될 때 효소의 최대 흡수 파장(450 nm)에서의 분광 광도 피크(spectrophotometric peak)로부터 유래된다. 이들은 제노바이오틱스 및 내인성 화합물, 예를 들어 스테로이드 및 지방산의 물질대사에 관여한다. CYP 효소는 동물, 식물, 진균, 원생생물, 세균, 고세균 및 심지어 바이러스 등 모든 생명체에서 확인되었다. 그러나, 이들은 어디에나 있는 것은 아니며; 예를 들어, 이들은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서는 발견되지 않는다.
- [0347] P450 단백질은 구조에 있어서 주요 요소를 공유한다. 예를 들어, P450 단백질은 이들의 특징 서열 요소 FXXGXXXCXG(서열번호 30)에 의해 확인될 수 있으며, 여기에서 시스테인은 헴 철에 대한 촉방향 리간드의 역할을 한다. 서열 동일성은 P450 단백질 중에서 비교적 낮지만, 이들의 일반적인 형태(topography) 및 구조적 폴드(structural fold)는 매우 보존적이다. 이러한 보존된 코어는 '미앤더(meander)'로 명명된 코일, 4개의 나선 다발, 나선 J 및 K, 및 2세트의 베타-시트로 구성된다. 이들은 헴-결합 루프(헴 철에 대해 5번째 리간드 역할을 하는 절대적으로 보존된 시스테인을 가짐), 양성자-이전달 그루브(proton-transfer groove) 및 나선(helix) K에 보존된 EXXR 모티프(서열번호 31)를 구성한다. P450 단백질은 주로 미토콘드리아의 내부 막 또는 세포의 소포체에 위치한 막-관련 단백질이다.
- [0348] P450 단백질은 구조적 유사성 외에도 기능적 유사성을 공유한다. P450 효소에 의해 촉매되는 가장 일반적인 반응은 모노옥시게나제 반응, 예를 들어 하나의 산소 원자를 유기 기질(RH)의 지방족 위치에 삽입하는 반면 다른 산소 원자는 물로 환원된다:
- [0349]
$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow H_2O + NADP^+$$
- [0350] 많은 하이드록실화 반응(하이드록실 그룹의 삽입)은 P450 효소를 사용한다. 많은 P450 효소는 기질로서 스테로이드 및/또는 지방산을 갖는다.
- [0351] 인간 CYP4V2 단백질(NCBI RefSeq: NP_997235.3)은 525개 아미노산(서열번호 4에 나타난 아미노산 서열)을 갖는다. 병원성 변이체(즉, 돌연변이)(BCD 환자 중에서 CYP4V2 돌연변이의 선택 목록에 대한 본원의 표 1 참조) 및 비-병원성(즉, 기능적) 변이체를 포함하는 인간 CYP4V2 단백질의 변이체가 존재한다.
- [0352] 일 양태에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)이다. 다른 양태에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 5에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는 인간 CYP4V2 단백질의 기능적 변이체 또는 단편이다.
- [0353] 기능적 CYP4V2 단백질은 또한 다른 기능적 CYP4V2 단백질의 변이체일 수 있다. 다음은 등가의, 또는 심지어 개선, 2세대 분자를 생성하기 위해 본원에 기술된 폴리펩타이드의 아미노산의 변화에 기초한 논의이다. 예를 들어, 어떤 아미노산은 예를 들어, 기질 분자 상의 결합 부위, 예를 들어 지방산에 대한 결합 부위와 같은 구조와의 상호작용성 결합 능력의 상당한 손실없이 단백질 구조 내에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 이는 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하는 단백질의 상호작용 능력 및 성질이므로, 특정 아미노산 치환은 단백질 서열 및 이의 기본(underlying) DNA 또는 RNA 암호화 서열에서 이루어질 수 있지만, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 생성할 수 있다. 따라서, 본원에 논의된 바와 같이, 기능적 CYP4V2 단백질의 아미노산 서열, 또는 유전자 또는 이의 암호화 영역의 DNA 또는 RNA 서열에서 이들의 생물학적 유용성 또는 활성의 상당한 손실없이 다양한 변화가 이루어질 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 서열번호 5는 서열번호 4에 나타난 인간 CYP4V2 단백질 서열로부터의 하나의 아미노산 변화를 갖는 CYP4V2 단백질 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0354] 다양한 기술, 알고리즘, 소프트웨어 및 도구가 기능적 CYP4V2 단백질, 예를 들어 인간 CYP4V2 단백질의 기능적 유도체, 변이체 및/또는 단편을 설계하고 조작하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 폴리펩타이드 또는 변화의 구조 및 기능은 NMR, x-선 결정학, 또는 컴퓨터 모델링, 예를 들어 ClustalW, SWISS-MODEL 서버, Swiss-Pdb 뷰어(Viewer), Polyphen-2, PROVEAN, SIFT, Condel, Mutation Assessor 및 FatHMM에 의해 모델링되고, 해결되거나 예측될 수 있다.
- [0355] 기능적 CYP4V2 단백질은 또한 기능적 CYP4V2 단백질의 단편이거나, 이의 단편으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4) 및 이의 변이체(서열번호 5) 둘 다는 N-말단으로부터 약 13번째 아미노산 잔기와 약 35번째 잔기 사이에 막관통 도메인(transmembrane domain)을 갖는다. 인간 CYP4V2 단백질(서열번호

4)의 골격은 약 36 내지 525aa 사이에 위치한다. 따라서, 기능적 CYP4V2는 인간 CYP4V2 단백질로부터 첫번째 약 35개의 아미노산의 결실(서열번호 6) 및 이를 대안적인 막관통 도메인 서열로 대체함으로써 유도될 수 있다. 기능적 CYP4V2 단백질의 다른 공급원은 기능적 CYP4V2 단백질의 스플라이싱 변이체(splice variant)이다.

- [0356] CYP4V2의 예측된 막관통 세그먼트(segment)는 N 말단 근처에 존재하며, CYP450 패밀리의 전형적인 구형(globular) 구조 도메인이 뒤따른다. CYP4V2의 구형 도메인은 18개의 나선 및 베타 구조 세그먼트를 포함한다. 헴 그룹은 단백질의 표면에 근접하게 위치하며, I 나선에 의해 단백질 내부를 향하고 L 나선은 표면적으로 배위된다. Li et al., *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004. CYP4V2 단백질은 지방산 대사에서 주로 활성이다. 다른 많은 P450 효소가 또한 지방산 대사에 관여한다. CYP4V2는 거의 모든 조직 및 기관에서 편재적으로 발현된다. CYP4V2의 발현은 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장, 췌장, 망막, 망막 색소 상피, 각막 및 림프구에서 발견되었다(Li et al., *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004). 그러나, 대부분의 다른 P450 효소는 안구 세포에 존재하지 않는다. 예를 들어, CYP4V2 및 CYP1B1은 ARPE-19 세포주에서 고 수준으로 발현된 유일한 P450 효소이며; CYP2E1, CYP2J2, 및 CYP3A4는 저 수준으로만 전사되었고(CYP4V2 mRNA 발현의 5%), CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 및 CYP4F12에 대한 전사체는 검출가능하지 않았다(Nakano, et al., *Mol Pharmacol* 2012; 82: 679-686). CYP4V2 돌연변이의 증상이 눈에 한정되고, CYP4V2는 CYP1B1 외에 발현되는 유일한 주요 P450 효소이며, 발현된 유일한 P450 서브패밀리 4(CYP4) 효소이지만, CYP4V2가 다른 P450 효소와 함께 존재하는 기관에서는 나타나지 않는다는 사실은 다른 P450 효소, 특히 CYP4 효소가 CYP4V2의 기능의 전부 또는 일부를 치환하는데 사용될 수 있음을 시사한다. 실제로, CYP4 서브패밀리는 PUFA의 경우 하이드록실라제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 지방산 물질대사에서 공통의 역할을 공유하는 것으로 밝혀졌다. 참조: Hardwick, *Biochem. Pharmacol.*, 75(12):2263-75; Fer et al., *J. Lipid Res.*, 49(11):2379-89 ; Nakano et al., *Mol. Pharmacol.*, 2012, 82:679-686). 인간 CYP4 단백질의 단백질 서열은 서열번호 8 내지 18에 나타나 있다.
- [0357] CYP4 서브패밀리의 다른 단백질과의 공유된 기질 및 기능에 더하여, 컴퓨터 분석은 CYP4V2가 CYP46A(서열번호 7)의 조상(ancestor)의 복제(duplication)로부터 형성되고, 이어서 전체 CYP4 패밀리를 생성하기 위해 복제된 것으로 밝혀졌다. Pan et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17(7) pii: E1020. doi: 10.3390/ijms17071020.
- [0358] 또한, CYP4V2 유전자(또는 CYP4V2 유전자의 오솔로그, 예를 들어 마우스의 경우 *Cyp4v3*)는 인간, 침팬지, 레서스 원숭이, 개, 소, 마우스, 랫트, 닭, 개구리, 말, 토끼 및 초파리(서열번호 19 내지 29)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 많은 종에 보존되어 있다. 인간 유전자 CYP4V2를 가진 오솔로그는 196개의 유기체에서 발견되었다.
- [0359] 기능적 CYP4V2 단백질은 하기를 포함하지만 이에 한정되지 않는 것을 포함하거나, 이로부터 설계되거나, 조작되거나, 유래될 수 있다:
- [0360] (i) 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4),
- [0361] (ii) 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 5)의 변이체 (예를 들어, 아미노산의 변화 및/또는 스플라이싱 변이체),
- [0362] (iii) 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 6)의 하나 이상의 단편,
- [0363] (iv) 다른 종의 CYP4V2(또는 오솔로그) 단백질,
- [0364] (v) 다른 CYP4 단백질 또는 CYP46A1,
- [0365] (vi) 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)에서 표 2에 열거된 하나 이상의 화합물에서 하나 이상의 생화학적 이상을 개선, 치료 또는 저지시킬 수 있는 폴리펩타이드, 및/또는
- [0366] (vii) 상기 (i) 내지 (vi) 중 임의의 하나 이상의 유도체, 하이브리드 또는 변이체.
- [0367] 본원에 개시된 조성물 및 방법은 상술한 바와 같은 임의의 기능적 CYP4V2 단백질을 발현시키는 데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 일 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4, 5 또는 6에 나타난 아미노산 서열 중 전부 또는 일부를 포함하는 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 침팬지, 레서스 원숭이, 개, 소, 마우스, 랫트, 닭, 개구리, 말, 토끼 및 초파리(서열번호 19 내지 29)의 CYP4V2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 CYP46A(서열번호 4 내지 18), 및 CYP4V2, 및 이의 유도체, 하이브리드, 변이체 및/또는 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 전부 또는 일부를 포함하는 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4 내지 29로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성(예를 들

어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 FxxGxxxCxG 및 ExxR(서열 번호 30 및 31)의 서열 요소를 포함하는 폴리펩타이드이다.

- [0368] 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 환자 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포)에서 하나 이상의 생화학적 이상을 개선, 치료 또는 저지할 수 있는 화합물 또는 제제이다.
- [0369] 일 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질은 다른 질환에 대한 단백질-기반 약물과 유사하게, BCD를 치료하기 위해 직접 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 표적화된 세포에서 기능적 CYP4V2 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 RNA이다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 장-기간 발현을 위한 상보적 DNA(cDNA)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA이다. cDNA는 양성- 또는 음성-센스, 단일- 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산은 CYP4V2 발현 카세트를 형성하기 위해 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이러한 발현 카세트는 향상된 전달 및/또는 발현 효율을 위해 벡터에 패키징된다.
- [0370] 코돈은 3개의 뉴클레오타이드의 세트로 이루어지며, 특정 아미노산을 암호화하거나 번역의 종료(즉, 저지 코돈)를 야기한다. 대다수의 아미노산(보통 메티오닌을 제외한 모든 아미노산)은 다수의 코돈에 의해 암호화된다. 따라서, 상이한 핵산 서열이 동일한 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 동일한 단백질 서열을 암호화하는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 동일성은 0% 내지 99% 초과 범위일 수 있다. 예를 들어, 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 두 핵산 서열(서열번호 1) 및 다른 핵산 서열(서열번호 2)은 단지 77%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0371] 핵산 서열의 코돈-최적화는 암호화된 아미노산 서열을 변화시키지 않고 단백질 발현을 개선 및/또는 안정화시킬 수 있다. 코돈 최적화는 핵산 서열에 존재하는 코돈을 동일한 아미노산을 암호화하는 바람직한 코돈, 예를 들어 포유동물 발현에 바람직한 코돈으로 대체한다. 코돈 사용 편향(codon usage bias), GC 함량, CpG 디뉴클레오타이드 함량, mRNA 2차 구조, 크립틱 스플라이싱 부위(cryptic splicing site), 미성숙 폴리A 부위, 내부 카이 부위(internal chi site) 및 리보솜 결합 부위, 음성 CpG 섬(island), RNA 불안정성 모티프(ARE), 반복 서열(직접 반복, 역 반복 및 다이아드 반복(Dyad repeat)) 및 클로닝을 방해할 수 있는 제한 부위를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 전략 및 파라미터가 코돈 최적화에 사용될 수 있다. 코돈 최적화 방법은 당업계, 예를 들어 미국 특허 6,114,148 및 US 20110081708에 공지되어 있다. 주어진 아미노산 서열의 코돈 최적화된 핵산 서열 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 본원에 기술된 방법에 의해 및/또는 온라인 소프트웨어를 통한 것을 포함하는 다양한 코돈 최적화 소프트웨어에 의해 생성될 수 있다.
- [0372] 사용되는 코돈-최적화 방법, 구성, 알고리즘 또는 소프트웨어에 따라, 동일한 단백질을 암호화하는 상이한 코돈-최적화된 핵산 서열이 생성될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 그러나, 코돈 최적화는 야생형의 비변형 핵산 서열과 비교하여 항상 개선된 발현을 유도하는 것은 아니다. Alexeyev MF, Winkler HH: Gene synthesis, bacterial expression and purification of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1419: 299-306. 10.1016/S0005-2736(99)00078-4; Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS: Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 2013, 15: 55-66; Agashe D, Martinez-Gomez NC, Drummond DA, Marx CJ: Good codons, Bad transcript: large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a Key enzyme. *Mol Biol Evol*. 2013, 30 (3): 549-560. 10.1093/molbev/mss273. doi:10.1093/molbev/mss273을 참조.
- [0373] 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 서열(서열번호 2)이 본원에 제공된다. 서열번호 1 및 서열번호 2 둘 다는 동일한 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화한다. 코돈-최적화된 핵산 서열(서열번호 2)은 서열번호 1에 나타난 핵산 서열에 대해 0.94의 코돈 적응 지수(codon adaptation index, CAI)를 초과하는 0.95의 개선된 CAI를 갖는다. 1.0의 CAI는 원하는 발현 유기체에서 완벽한 것으로 간주된다. 본 개시내용은 이러한 cDNA 서열에 상응하거나 이로부터 유래되는 임의의 RNA 서열 또는 DNA 서열 또는 다른 핵산 서열을 포함하는, 서열번호 2에 나타난 cDNA 서열에 의해 나타낸 바와 같은 모든 형태 및 유형의 코돈-최적화된 핵산 서열을 포함하며, 이는 본원에 제공되는 서열에 대해 단일-가닥 또는 이중 가닥 형태, 및/또는 양성-, 음성-, 항- 또는 상보적-센스일 수 있음이 이해될 것이다.
- [0374] 코돈-최적화에 이외에, 번역 성능을 개선하기 위해 다른 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 코작(Kozak) 서열 또는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열은 번역 개시의 효율을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 상이한 저지 코돈(예를 들어, TGA)이 번역 종료의 효율을 증가시키는데 사용될 수 있다. ORF 서열 이외에, 기능적 CYP4V2 단

백질을 암호화하는 핵산 서열은 또한 단백질 발현을 개선시키기 위해 UTR(들) 및/또는 하나 이상의 인트론과 같은 하나 이상의 비-암호화 서열을 포함할 수 있다. 코작(Kozak) 서열(서열번호 36 에 나타난 예시적인 서열)은 발현을 증가시키기 위해 cDNA를 암호화하는 CYP4V2 바로 앞에 삽입될 수 있다.

- [0375] 본원에 논의된 바와 같이, 인간 CYP4V2 단백질의 기능적 변이체 및/또는 단편이 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)의 기능적 변이체(서열번호 5)를 암호화하는 핵산 서열이 서열번호 3에 제공된다.
- [0376] 일부 구현예에서, CYP4V2 핵산 분자는 서열번호 4 내지 30을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하거나, 또는 서열번호 4 내지 30에 나타난 임의의 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리펩티드 분자이다. 일부 구현예에서, CYP4V2 핵산 분자는 임의의 서열번호 1, 2 또는 3에 대해 적어도 60% 서열 동일성을 공유하는 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0377] 벡터(예를 들어, 바이러스 또는 비-바이러스성 벡터) 및 본원에 기술된 바와 같은 CYP4V2 발현 카세트는 전형적으로 하나 이상의 CYP4V2 핵산 분자 또는 이의 단편을 포함한다. 핵산 분자는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 핵산(예를 들어, ssDNA, ssRNA), 이중-가닥 핵산(예를 들어, dsDNA, dsRNA), 플러스-가닥 또는 마이너스-가닥 핵산, 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA, 메신저 RNA(mRNA), 소간섭 RNA(siRNA) 및/또는 DNA 지정 RNA 간섭(DNA directed RNA interference, ddRNAi))을 포함하지만 이에 한정되지 않는 많은 형태를 취할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 핵산 분자는 또한 하나 이상의 뉴클레오타이드 유사체 또는 골격 변형을 포함할 수 있다. 또한, cDNA는 역전사 효소에 의해 촉매되는 반응에서 mRNA 주형으로부터 합성될 수 있거나, 또는 코돈-최적화된 cDNA를 포함하지만 이에 한정되지 않는 암호화하고자 하는 단백질에 기초하여 설계되고 합성될 수 있거나, 또는 돌연변이 유발을 통해 다른 핵산 분자로부터 합성될 수 있다. 또한 cDNA는 엑손만을 함유할 수 있거나, 또는 엑손 및 다른 서열, 예를 들어 비번역 영역(untranslated region, UTR) 및/또는 인트론을 함유할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 예에서, 본원에 기술된 벡터 및 CYP4V2 발현 카세트는 인간 CYP4V2 단백질 또는 이의 기능적 변이체 또는 단편을 암호화하는 서열을 갖는 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0378] 적합한 핵산 서열은 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 서열일 수 있다. 이러한 핵산 서열은 UTR, 인트론 또는 코작 서열과 같은 비-암호화 요소를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 이는 야생형 서열 또는 합성되거나 변형된 서열(예를 들어, 코돈-최적화된 서열)을 포함할 수 있다. 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 본원에 기술된 바와 같이 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0379] 인간 CYP4V2 단백질을 암호화하는 서열번호 1에 나타난 바와 같은 서열을 갖는 핵산 분자는 본원에서 "CYP4V2st"로 지칭된다. 인간 CYP4V2 단백질을 암호화하는 서열번호 2에 나타난 바와 같은 코돈-최적화된 서열을 갖는 핵산 분자는 본원에서 "CYP4V2op"로 지칭된다. 인간 CYP4V2 단백질의 기능적 변이체를 암호화하는 서열번호 3에 나타난 서열을 갖는 핵산 분자는 본원에서 "CYP4V2fv"로 지칭된다. 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 1, 2 또는 3 중 하나와 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0380] 기능적 CYP4V2 단백질 및 이러한 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 방법에 의해 합성되거나 분리되거나, 정제되고 검출될 수 있다. 또한, 단백질 합성 또는 분리, 정제 및 검출은 또한 Wuxi Aptec(중국 상하이 소재) 및 GenScript(뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 포함하는 CRO를 통해 상업적으로 이용 가능하다. 핵산 분자 합성 또는 분리, 정제 클로닝 및 검출은 GenScript(뉴저지주 피스카타웨이 소재) 및 Integrated DNA Technologies(아이오와 주 코랄빌 소재)를 포함하는 CRO를 통해 상업적으로 이용 가능하다.
- [0381] 폴리펩타이드는 합성되거나(예를 들어, 제조된 단백질 발현 또는 화학적 합성을 통해) 분리될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "정제된(purified)" 폴리펩타이드는 자연적으로 수반되는 세포 성분으로부터 분리되거나 정제된 폴리펩타이드이다. 전형적으로, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드가 자연적으로 결합된 자연 발생적 분자를 포함하지 않는 건조 중량 기준으로 적어도 70%(예를 들어, 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%)인 경우 "정제된" 것으로 고려된다. 화학적으로 합성되는 폴리펩타이드는 본질적으로 자연적으로 수반되는 성분으로부터 분리되기 때문에, 합성 폴리펩타이드는 "정제"되어 있다.
- [0382] 폴리펩타이드는 천연 공급원(예를 들어, 생물학적 샘플)으로부터 공지된 방법, 예컨대 DEAE 이온 교환, 겔 여과 및 하이드록시아파타이트 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 예를 들어, 발현 벡터 내에서 핵산을 발현시킴으로써 정제될 수 있다. 또한, 정제된 폴리펩타이드는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다. 폴리펩타이드의 순도의 정도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 HPLC 분석을 사용하여 측정될 수 있다.

- [0383] 폴리펩타이드는 전형적으로 항체를 사용하여 검출된다. 항체를 사용하여 폴리펩타이드를 검출하는 기술은 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 웨스턴 블롯(Western blot), 면역침전 (immunoprecipitation) 및 면역형광(immunofluorescence)을 포함한다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 일부에 대해 특이적인 결합 친화성을 갖는 항체는 당업계에 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 미세역가 플레이트와 같은 고체 지지체에 부착될 수 있다. 폴리펩타이드의 존재하에서, 항체-폴리펩타이드 복합체가 형성된다.
- [0384] "분리된(isolated)" 핵산 분자는 전형적으로 분리된 핵산 분자가 유래하는 유기체의 게놈에서 핵산의 한쪽 또는 양쪽 말단에 자연적으로 인접(flank)하는 서열이 없는 핵산 분자(예를 들어, PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 DNA 단편)를 지칭한다. 이러한 분리된 핵산 분자는 일반적으로 주로 조각의 편의성을 위해 또는 벡터(예를 들어, 바이러스 또는 비-바이러스성 벡터)로 패키징 하기 위한 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 목적을 위해, 단백질을 발현하고 융합 단백질을 생성하는 구조체(예를 들어, 클로닝 구조체, 또는 유전자 치료요법에서 사용하기 위한 발현 구조체)로 도입된다.
- [0385] 핵산은 당업계의 통상의 기술을 사용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 재조합 핵산 기술, 부위-특이적 돌연변이유발, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 및/또는 다른 유전 공학 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 방법을 사용하여 분리될 수 있다. 일반적인 PCR 기술은 예를 들어, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995에 기술되어 있다. 재조합 핵산 기술은 예를 들어, 제한 효소 분해 및 연결(ligation)을 포함하며, 이는 핵산을 분리하는데 사용될 수 있다. 돌연변이유발 프로토콜은 예를 들어, *In Vitro Mutagenesis Protocols*, Braman, ed., Humana Press, 2002에 기술되어 있다.
- [0386] 분리된 핵산은 또한 단일 핵산 분자 또는 일련의 올리고뉴클레오타이드로서 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0387] 핵산을 함유하는 구조체는 당업계에 공지되어 있다. 클로닝 구조체 및 발현 구조체를 포함하는 구조체는 상업적으로 주문 제작될 수 있거나, 당업계의 통상의 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 구조체는 발현될 핵산에 작동 가능하게 연결되는 조절 서열을 가질 수 있고, 선택 가능한 마커(예를 들어, 항생제 내성 유전자)를 암호화하는 것과 같은 서열을 추가로 포함할 수 있다. 조절 서열은 본원에 논의되어 있다. 핵산을 함유하는 구조체는 키메라 또는 융합 폴리펩타이드(즉, 이중 폴리펩타이드에 작동 가능하게 연결되는 폴리펩타이드, 이는 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 존재할 수 있음)를 암호화할 수 있다. 대표적인 이중 폴리펩타이드는 암호화된 폴리펩타이드의 정제 또는 검출에 사용될 수 있는 것(예를 들어, 6xHis tag, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), CFP, Fc, FLAG, HA, Myc, RFP, Strep, VSV, GFP 및 YFP)이다.
- [0388] 핵산 서열을 가지는 구조체가 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "숙주 세포(host cell)"는 핵산이 도입되는 특정 세포를 지칭하며 또한 구조체를 가지는 이러한 세포의 후대 세포(progeny)를 포함한다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 이. 콜라이와 같은 세균 세포, 또는 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포(예컨대, 차이니스 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cells, CHO), COS 세포, HEK293 세포, HeLa, Vero, V27, A549, K562, B50, WI38 및 BHK 세포)일 수 있다. 다른 숙주 세포는 iPS 세포, ES 세포, RPE 세포, iPS-RPE 세포, iPS-광수용체 세포, ES-RPE 세포, ARPE-19 세포, 각막 세포, 광수용체 세포, 맥락막 세포, 시신경 세포, 본원에 논의된 임의의 다른 유형의 안구 세포, 뉴런 세포, 상피 세포, 혈액 세포, 섬유아세포, 림프구 및 줄기 세포 유래 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 생체 내 및 시험관 내 둘 다에서 핵산 또는 핵산 이식유전자를 갖는 벡터 또는 발현 카세트를 숙주 세포 내로 도입시키는 많은 방법은 당업계의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 전기천공(electroporation), 소노포레이션(sonoporation), 인산칼슘 침전(calcium phosphate precipitation), 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG) 형질전환(transformation), 열 쇼크(heat shock), 지질감염(lipofection), 미세주사(microinjection) 및 바이러스-매개성 핵산 전달(viral-mediated nucleic transfer)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0389] 핵산은 적절한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 프라이머)를 사용하여 임의의 수의 증폭 기술을 사용하여 검출될 수 있다(예를 들어, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 1995, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 및 미국 특허 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 및 4,965,188 참조). 최초의 PCR에 대한 많은 변형이 개발되었으며 핵산을 검출하는데 사용할 수 있다. 핵산은 또한 혼성화를 사용하여 검출할 수 있다. 핵산간의 혼성화는 Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sections 7.37-7.57, 9.47-9.57, 11.7-11.8, d 11.45-11.57)에 상세히 논의되어 있다. Sambrook 등은 약 100개 뉴클레오

타이드 미만의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 적합한 서던 블롯(Southern blot) 조건(섹션 11.45-11.46) 및 약 100개 뉴클레오타이드 이상의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대한 서던 블롯 조건(섹션 9.47-9.54 참조)을 개시하고 있다.

[0390] B. 벡터

[0391] 일부 구현예에서, 기능적 CYP4V2 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 분자는 벡터에 의해 치료를 필요로 하는 안구 세포로 전달된다. 안구 세포로의 전달을 위해, 치료학적 벡터는 바람직하게는 비독성이며 핵산 분자(예를 들어, DNA, RNA)를 표적 세포로 전달하는데 효과적이다. 유전자 치료요법 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 바이러스 벡터 또는 비-바이러스성 벡터일 수 있다.

[0392] 핵산을 세포 내로 생체 내 도입하기 위한 한가지 접근법은 핵산 분자, 예를 들어 cDNA를 함유하는 바이러스 벡터를 이용하는 것이다. 바이러스 벡터를 이용한 세포의 감염은 표적 세포의 많은 부분이 핵산 분자를 수용할 수 있다는 이점이 있다. 또한, 예를 들어, 바이러스 벡터에 함유된 cDNA에 의한 바이러스 벡터 내에 암호화된 분자는 핵산 분자를 함유하는 바이러스 벡터를 취한 세포에서 효율적으로 발현된다.

[0393] 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터(aden-associated virus vector, AAV), 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 단순포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 벡터와 같은 헤르페스 바이러스(herpes virus, HV) 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 인간 포아미 바이러스(human foamy virus, HFV) 벡터, 엡슈타인 바 바이러스(Epstein Barr virus, EBV) 벡터, 박시니아 바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 플라스미드 또한 핵산 분자를 표적 세포로 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터와 같은 재조합 바이러스 벡터이다. 어떤 벡터는 숙주 세포(예를 들어, 대상체의 세포)의 게놈에 통합되거나 더 통합되는 경향이 있는 반면, 다른 벡터는 숙주 세포의 게놈에 통합되지 않거나 덜 통합되는 경향이 있음(예를 들어, 염색체 외 발현)은 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0394] 재조합 AAV(rAAV) 벡터는 유전자 치료요법 접근법에 일반적으로 사용된다. AAV는 파르보 바이러스 패밀리에 속하며, 각각 단일 가닥 DNA를 함유한다. rAAV 벡터는 현재 포유동물 세포에서 유전자 이식을 위한 가장 안전하고 가장 효율적인 플랫폼인 것으로 고려된다(Salganik et al, 2015, Microbiol. Spectr., 3(4): doi:10.1128 / microbiolspec.MDNA3-0052-2014). 지금까지, 12개의 AAV 혈청형(AAV1 내지 AAV12) 및 100개 이상의 변이체가 인간 및 비 인간 영장류의 조직 샘플(예를 들어, Gao et al., 2005, Curr. Gene Ther., 5:285-97 참조) 및 다른 종으로부터 분리되었다. 자연 발생적 및 변형된 AAV 형 둘 다 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있다.

[0395] 야생형 AAV는 3개의 단백질 VP1, VP2 및 VP3으로 구성되는 캡시드 내에 봉입된 선형의 단일-가닥 DNA 게놈을 함유한다. 재조합 AAV(rAAV)에서, 야생형 AAV 게놈으로부터의 rep 및 cap 유전자는 전형적으로 패키징에 요구되는 AAV 역위된 말단 반복부(ITR)에 의해 플랭킹된 이식유전자 발현 카세트에 의해 대체된다. 본원에 사용된 바와 같이, "rAAV 벡터"는 하나 이상의 AAV 바이러스의 하나 이상의 캡시드 요소를 함유하거나 이로부터 유래되는 재조합 AAV 벡터를 지칭한다.

[0396] AAV 및 다른 바이러스 벡터-매개성 유전자 치료요법의 장점에도 불구하고, 모든 바이러스 벡터 및 모든 AAV 유형이 특정 질환을 치료하는데 적합하지는 않다. 바이러스 벡터(예를 들어, AAV 벡터)를 사용하는 유전자 치료요법이 직면한 두 가지 주요 과제가 있다. 첫째, 치료를 위해 표적화되는 세포 유형에서 AAV 벡터에 의한 효율적인 형질도입 효율이 바람직하다. 둘째, 바이러스 벡터에 의해 촉발된(triggered) 잠재적 면역 반응이 고려될 필요가 있다. Madsen et al., Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. J Gen Virol 90, 2622-2633 (2009); Mingozzi et al., CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in human s. Nat Med 13, 419-422 (2007)을 참조한다. 대부분의 다른 기관 및 조직과 비교하여, 눈은 많은 다른 기관에 비해 면역-관용 기관(immune-privileged organ)으로 고려되며, 눈의 AAV-매개성 유전자 치료요법에서 면역 반응은 면역억제제의 사용에 의해 제어될 수 있지만, 눈의 AAV 형질도입에 있어서 중화 항체(neutralizing antibody, NAB)와 같은 면역 반응의 역할은 대형 동물에서 명확하지 않다. 또한, 유리체 내 AAV 투여는 망막하 투여보다 면역계와의 상호작용에 대해 더욱 민감하다. 따라서, 안구 유전자 치료요법에 사용되는 바이러스 벡터는 면역 반응을 최소화하거나 또는 전혀 촉발하지 않을 것이므로, 잠재적 부작용을 피하고 바이러스 벡터의 형질도입/발현 효율이 면역 반응, 예를 들어 대상체에서 기존의 NAB에 의해 실질적으로 감소되고/되거나 rAAV 벡터의 용량을 저하시키지 않도록 한다.

- [0397] AAV 벡터 설계 및 선택과 관련된 다양한 조성물 및 방법이 이러한 과제를 해결하기 위해 사용될 수 있다. BCD를 치료하기 위해 CYP4V2 유전자 치료요법을 사용하는 경우, 치료를 위해 표적화되는 세포가 주로 RPE 세포일 때 RPE 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 바람직하다. BCD 환자의 각막 세포를 치료하는 경우, 각막 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 바람직하다. 일부 구현예에서, RPE 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, 각막 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, RPE 및 광수용체에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, RPE, 광수용체 및 맥락막 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, 망막 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, 안구 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 일부 구현예에서, 안구 세포 및/또는 혈액 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 벡터가 사용된다. 잠재적 면역 반응(예를 들어, 유전자 치료요법 벡터에 대한 NABs 및 세포-기반 면역 반응)을 다루기 위해, 상이한 AAV 혈청형 및 변이체, 변형된 AAV 벡터 및/또는 면역-억제 프로토콜이 사용될 수 있다.
- [0398] 본원에 사용되는 rAAV 벡터는 야생형 AAV(예를 들어, AAV1 내지 AAV12 중 하나, 또는 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 AAV12를 포함하지만 이에 한정되지 않는 인간 또는 다른 종으로부터 분리되는 다른 야생형 AAV 변이체로부터의 야생형 AAV) 또는 변형된 AAV 에 기초하거나 이로부터 유래될 수 있다. 변형된 AAV는 슈도형(pseudotyped) AAV(예를 들어, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/4, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/9, AAV2/12, AAV8/2), 키메라 AAV(예를 들어, AAV-DJ), 캡시드 변형된 AAV(예를 들어, 캡시드 돌연변이체 AAV(예를 들어, Y-F, K-R, T-A, S-A 및/또는 T-V 돌연변이를 갖는 AAV 및 AAV-DJ로부터의 캡시드 돌연변이체 AAV인 AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9), 캡시드 변이체 AAV (예를 들어, AAV 7m8 및 유도체), 조상(ancestral) AAV(예를 들어, Anc80)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 많은 상이한 방법으로 생성될 수 있다. 자연 발생적 AAV 또는 변이체의 게놈 및/또는 캡시드에 대한 임의의 변화, 및 이의 임의의 조합을 포함하는 재조합 AAV. 인위적인, 변형된, 합성된, 재조합된, 조작된, 진화된, 설계된, 유래된 또는 향상된 AAV, 또는 합리적으로 설계되고/되거나 유도 진화 및/또는 DNA 서플링을 통해 생성된 AAV, 또는 AAV 변이체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 변형된 AAV 를 지칭하기 위한 상이한 방식이 존재하는 것으로 이해될 수 있다. 변형된 AAV의 사용은 비변형 AAV 에 비해 보다 높은 형질도입 효율, 보다 높은 조직- 또는 세포-특이성, 거의 없는 면역 반응 및/또는 특정 유형의 투여(예를 들어, 유리체 내 주사 또는 혈류를 통한 전달)에 보다 더 적합하다는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 장점을 가질 수 있다.
- [0399] 일부 구현예에서, 본원에 사용되는 변형된 AAV 벡터는 슈도형 AAV이다. AAV 슈도형은 상이한 바이러스 혈청형으로부터의 캡시드 및 게놈의 혼합을 지칭한다. 이들 혈청형은 슬래시(/)를 사용하여 표시되므로, AAV2/5는 혈청형 5로부터의 캡시드에 패키징된 혈청형 2의 게놈(예를 들어, ITR)을 함유하는 바이러스를 나타낸다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/6, AAV2/9, AAV2/4, AAV2/7, AAV2/10 또는 AAV2/12 벡터이다.
- [0400] 일부 구현예에서, 본원에 사용되는 변형된 AAV 벡터는 상이한 종으로부터 분리되는 상이한 AAV 혈청형을 포함하는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는 키메라(때때로 하이브리드 또는 셔플이라고도 함) AAV이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9이다. AAV-DJ는 DNA 서플링 방법에 의해 8개의 혈청형의 AAV 하이브리드의 라이브러리로부터 생성되는 AAV 변이체이다. Grimm, D. et al. (2008). *J. Virol.* 82: 5887-5911. 안구 세포를 포함하는 광범위한 세포 유형을 효율적으로 형질도입할 수 있다. 더욱이, 키메라 AAV는 자연 발생적 AAV보다 면역 중화를 회피하는 능력이 더 많으므로, 보다 많은 양의 치료학적 전이 유전자를 효율적으로 전달할 수 있다. 하이브리드 AAV는 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, AAV-DJ/8 및 AAV-DJ/9는 AAV-DJ의 헤파린 결합 도메인(heparin binding domain, HBD)에 점 돌연변이(point mutation)를 만듦으로써 생성되었다. Grimm, D. et al. (2008). *J. Virol.* 82: 5887-5911.
- [0401] 일부 구현예에서, 본원에 사용되는 변형된 AAV는 캡시드 돌연변이체 AAV이다. 이는 AAV 캡시드 단백질에 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 점 돌연변이)를 생성하는 것을 포함한다. 캡시드 돌연변이체 AAV는 비변형 AAV에 비해 장점을 가질 수 있다. 예를 들어, AAV 캡시드 단백질의 표면 노출된 타이로신(Y) 잔기의 점 돌연변이는 인산화(phosphorylation) 및 후속 유비퀴틴화(ubiquitination)를 회피하여 시험관 내 및 생체 내 둘 다에서 보다 높은 형질도입 효율을 유도하기 위한 단순하고 효과적인 방법으로서 보고되었다(Zhong et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(22): 7827-32; Markusic et al., *Mol Ther.* 2010;18(12):2048-56; Li et al., *Hum Gene Ther.* 2010 Nov; 21(11): 1527-1543). 예를 들어, 페닐알라닌 잔기 치환에 의한 7개의 AAV2 캡시드 타이로신 잔기(Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 및 Y730) 각각의 부위-지정 돌연변이유발은 시험관 내 인간 세포 및 생체 내 쥐와 간세포에서 EGFR-PTK 인산화 및 유비퀴틴-프로테오솜 경로를 우회함으로써 벡터 형질도입 및 이

식유전자 발현을 증가시킨다(Zhong et al., *Virology*. 2008 Nov 25; 381(2):194-202). 특정 타이로신(Y), 세린(S), 트레오닌(T) 및 라이신(K) 잔기에서 AAV 캡시드 상의 점 돌연변이는 시험관 내 및 생체 내 둘 다에서 유익적인 형질도입 개선을 야기할 수 있는 것으로 또한 보고되었다(Gabriel et al., *Hum Gene Ther Methods*. 2013;24(2):80-93; Sen et al., *Hum Gene Ther Methods*. 2013;24(2):104-16; Sen et al., *Sci Rep*. 2013;3:1832; Wu et al., *J Virol*. 2006;80(22):11393-7). 다른 변형된 AAV를 생성하기 위해 변형된 AAV에 캡시드 돌연변이를 만들 수도 있다. 예를 들어, AAV-DJ/8 및 AAV-DJ/9는 하이브리드 AAV인 AAV-DJ의 헤파린 결합도메인(HBD)에 점 돌연변이를 만듦으로써 생성되었다. Grimm, D. et al. (2008). *J. Virol*. 82: 5887-5911. 캡시드 돌연변이는 또한 AAV가 NAB를 회피하여 면역 반응을 거의 생성하지 않도록 한다. 또한, 특정의 캡시드 돌연변이는 AAV가 유리체 내 전달에 보다 적합하게 만들 수 있다. Kay et al., *PLoS One*, 8:e62097, 2013. 일부 구현예에서, 본원에 사용되는 AAV 벡터는 타이로신 대 페닐알라닌(Y-F), 트레오닌 대 발린(T-V), 라이신 대 아르기닌(K-R), 트레오닌 대 알라닌(T-A), 세린 대 알라닌(S-A)을 제한없이 포함하고/하거나, AAV의 헤파린 결합도메인(HBD), 및/또는 459, 493 및 551번 위치를 포함하지만 이에 한정되지 않는 이의 항원 영역에 영향을 미치는 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 변형된 AAV이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F 및 T491V 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV2이고, 여기에서 숫자(예를 들어, 444)는 AAV 캡시드의 점 돌연변이의 위치를 나타낸다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y263F 및 Y719F 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV5이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y447F, Y733F 및 T494V 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV8이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y731F의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV1이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y445F 및 Y731F 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV6이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 Y731F의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV9이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 K137R, T251A 및 S503A 중에서 하나 이상의 캡시드 돌연변이를 갖는 AAV-DJ, AAV-DJ/8 또는 AAV-DJ/9이다.

[0402] 일부 구현예에서, 변형된 AAV 벡터는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 갖는 AAV 이다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 비-자연 발생적 캡시드 단백질은 이중 서열(예를 들어, 상이한 AAV 혈청형, 동일한 AAV 혈청형의 비-연속적 부분, 비-AAV 바이러스성 공급원 또는 비-바이러스성 공급원으로부터 수득된 서열)과 함께 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 AAV 벡터는 캡시드 단백질 GH 루프에 하나 이상의 아미노산 삽입(예를 들어, 약 5개의 아미노산 내지 약 11개의 아미노산)을 포함한다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 비-변이체 AAV(예를 들어, 야생형 AAV)에 의한 망막 세포의 감염성(infectivity)과 비교하여 망막 세포의 감염성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 AAV는 혈류를 통한 전달에 적합하게 하는 혈액-안구 장벽(blood-ocular barrier, BOB)을 가로질러 이식유전자를 전달할 수 있으며, 이는 안구 유전자 치료요법에 사용되는 종래의 투여(예를 들어, 망막하 주사 또는 유리체 내 주사)로부터 대안적인 투여/전달 경로 제공할 수 있는 것이다. 일부 구현예에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질을 갖는 AAV는 AAV 7m8 또는 이의 유도체 또는 변이체이다(Dalkara et al., *Science Translation Medicine*, 5:189ra76, 2013; PCT 출원 번호 PCT/US2012/034413, PCT 출원 번호 PCT/US2014/039015, 미국 출원 번호 14/214,011 및 미국 출원 번호 13/899,481). 일부 구현예에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질을 갖는 AAV는 AAV-PHP.B이다.

[0403] 일부 구현예에서, AAV 벡터는 바이러스 변형 계통의 재제작을 통해 재구성되거나 합성될 수 있다. 이러한 재구성은 조상(ancestral), 고대(ancient) 또는 부모(parental)의 AAV를 산출할 수 있다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 Anc80(조상의 AAV1, 2, 8 및 9) 또는 이의 유도체이다. Zinn et al., *Cell Rep*. 2015 Aug 11;12(6):1056-68.

[0404] 일부 구현예에서, 하나 이상의 AAV 및/또는 다른 바이러스 벡터는 예를 들어 "유도 진화(directed evolution)" 및/또는 "합리적 설계(rational design)"를 포함하는 당업계에 공지된 기술에 의해 변형(예를 들어, 유리체 내 전달을 위해, 표적 세포 유형(예를 들어, RPE 세포)에서의 향상된 형질도입을 위해, 또는 혈류를 통한 전달을 위해 최적화)될 수 있다. 예를 들어, Asuri et al., *Mol Ther*. 20:329-338, 2012 and Yang et al., *Methods Mol Biol*. 709:127-139, 2011을 참조한다. 변형된 AAV 또는 다른 바이러스 벡터는 예를 들어, "조작된(engineered)", "하이브리드(hybrid)", "진화된(evolved)", "향상된(enhanced)" 또는 "설계된(designed)" 벡터로서 기술될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 벡터 표적화(예를 들어, 유리체 내 전달 또는 혈류를 통한 전달을 위한 적합성을 증진시킴), 형질도입 효율 및/또는 낮은 면역 반응을 개선하여 예를 들어, 필요한 용량을 낮출 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV 혈청형 rh10(EP 20100178940) 또는 ShH10이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV-PHP.B(US 20150079038)이다.

- [0405] 일부 구현예에서, AAV 벡터는 본원에 기술된 하나 이상의 전략의 조합으로부터 생성되고/되거나 선택될 수 있다. 예를 들어, AAV-DJ/8 및 AAV-DJ/9는 하이브리드 AAV인 AAV-DJ의 헤파린 결합 도메인(HBD)에 점 돌연변이를 만듦으로써 생성되었다.
- [0406] 어떤 AAV는 일부 다른 AAV보다 유리체 내 전달에 더 적합할 수 있다는 것이 당업계에 알려져 있다. 유리체 내 전달을 위한 많은 이러한 AAV는 돌연변이(예를 들어, AAV2(quadY-F+T-V)(Kay et al., PLoS One. 2013 Apr 26;8(4))를 통해 AAV 캡시드 단백질 또는 변이체 AAV 캡시드 단백질(예를 들어, AAV 7m8)을 변형시키는 것을 포함한다. 또한, 혈류를 통해 전달하기에 적합한 AAV, 예를 들어 AAV-PHP.B가 존재한다. 그러나, 이들의 용도는 유리체 내 전달 또는 혈류를 통한 전달에 한정되지 않으며, 예를 들어 이들은 망막하 및 다른 투여 경로를 위한 AAV 벡터로서도 사용될 수 있다.
- [0407] 일부 구현예에서, 자가-상보적 AAV 벡터(scAAV)가 사용된다. 야생형 AAV는 단일-가닥 DNA 게놈을 갖는다. AAV의 단점은 이의 단일-가닥 DNA 게놈이다. 단일-가닥 AAV 게놈은 상보적 가닥을 합성하기 위해 세포의 DNA 복제 기구(replication machinery)에 의존하기 때문에, 이식유전자 발현이 지연되며 이중-가닥 DNA만큼 강력하지 않다. CYP4V2 유전자 치료요법을 위해, 본 발명자들은 종래의 단일-가닥 AAV 벡터에서 속도 제한 이중-가닥 합성을 우회하며 강력한 이식유전자 발현을 가능하게 하기 위해 scAAV 설계를 개발하였다(도 7 참조). scAAV.CYP4V2는 숙주 세포 DNA 합성에 대한 요건을 제거하여 형질도입시 더 빠르고 보다 강력한 발현을 초래하는 분자내 자가-상보적 CYP4V2 DNA 구조를 포함한다. 그러나, scAAV의 자가-상보적 구조는 scAAV 벡터의 패키징 한계를 ssAAV의 경우 약 4.7-5.0 kb에서, scAAV의 경우 약 2.4-2.5 kb로 감소시킨다. 따라서, 더 짧은 길이의 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 및/또는 폴리A 신호)이 scAAV 설계에 필요하다. 발현 카세트가 벡터 패키징 한계를 초과하지 않도록 하고, 사용되는 cDNA 및 다른 조절 서열의 길이에 따라 특성의 선택적 조절 서열을 인핸서와 같은 scAAV 구조체로부터 배제시킬 필요가 있을 수 있다. scAAV 설계에서 2개의 ITR 중 하나는 절단된 ITR이고, 말단 분해 부위(terminal resolution site: TRS)에 돌연변이를 갖는다. scAAV 구조, 정제 및 생산의 상세한 논의에 대해서는, McCarthy, Molecular Therapy, Volume 16, Issue 10, p1648-1656, October 2008를 참조한다.
- [0408] 다수의 다른 벡터 설계가 사용될 수 있다. 예를 들어, 이중 벡터 시스템(예를 들어, AAV-기반 이중 벡터 시스템, 예를 들어 트랜스-스플라이싱 또는 하이브리드 이중 AAV 벡터)이 핵산 서열(예를 들어, CYP4V2 핵산 서열)을 발현시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, Colella, et al., Gene Ther. 21, 450-456, 2014를 참조한다. 예를 들어, 이중 벡터 시스템은 (i) 폴리뉴클레오타이드의 각각의 말단(5' 및 3' 말단)에 역위된 말단 반복부를 갖는 제1 AAV 벡터 폴리뉴클레오타이드, 및 역위된 말단 반복부 사이에 관심(interest) 핵산 서열에 의해 암호화되는 단백질의 N-말단 부분을 암호화하는 부분 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 적합한 프로모터; 및 ii) 폴리뉴클레오타이드의 각각의 말단(5' 및 3' 말단)에 역위된 말단 반복부를 갖는 제2 AAV 벡터 폴리뉴클레오타이드, 및 역위된 말단 반복부 사이에 관심 핵산 서열에 의해 암호화되는 단백질의 C-말단 부분을 암호화하는 부분 암호화 서열, 뒤이어 폴리아데닐화(pA) 신호 서열을 포함할 수 있다.
- [0409] scAAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, scAAV2/5, AAV2/8, scAAV2/9 및 AAV2/2 (Y444F+Y500F+Y730F)를 포함하는 다양한 rAAVs 벡터기 본 연구를 위해 설계되고 생성되었다(본원의 개략도 및 도 7에서의 주석을 참조). 이들은 다양한 벡터 설계의 rAAV 벡터가 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용될 수 있음을 입증한다. 또한, 옵션으로서 다수의 rAAV 벡터를 포함시키는 것은 기존의 중화 항체 및 환자 집단 중에서 특정 AAV 유형에 대한 다른 개개의 면역 반응을 고려할 때 CYP4V2 유전자 치료요법에서 잠재적인 면역 반응을 감소시키는 것을 도울 수 있다. 또한 동일한 눈으로의 후속 투여 또는 동일한 대상체의 반대쪽 눈으로의 투여가 바람직한 경우에 더 많은 옵션을 제공할 것이다.
- [0410] 헬퍼-무함유(helper-free) 시스템을 사용하는 생산을 포함하는 바이러스 전달 벡터를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, PCT/US2007/010055; 특허 6458587, 특허 번호: US 6428988 B1을 참조한다. 유전자 치료요법에 사용되는 다양한 벡터, 예를 들어, 제한없이, AAV, 아테노바이러스, 렌티바이러스 및 레트로바이러스 벡터의 생산은 또한 위탁연구 전문기관(contract research organizations: CRO) 및 위탁제조 전문기관(contract manufacturing organization(CMO), 예를 들어 Vector Biolabs(펜실바니아주 말버른 소재) 및 Cell Biolabs, Inc.,(캘리포니아주 샌 디에고 소재)를 통해 상업적으로 이용가능하다.
- [0411] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 유용한 재조합 AAV 벡터는 AAV 혈청형 캡시드 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 분자; rep 유전자; 최소한 AAV 역위된 말단 반복부(ITR) 및 관심 핵산 분자(예를 들어, CYP4V2 핵산 서열을 가짐)를 포함하는 미니유전자(minigene); 및 AAV 캡시드 단백질로 관심 핵산의 패키징을 가능하게 하기에 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포(예를 들어, HEK293 세포)를 배양함으로써 생성될 수 있다. 숙주

세포에서 배양하여 AAV 캡시드에 핵산을 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양되는데 요구되는 성분은 숙주 세포에 시스 또는 트랜스로 제공될 수 있다. 대안적으로, 임의의 하나 이상의 요구되는 성분(예를 들어, 관심 핵산 분자, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능)은 하나 이상의 요구되는 성분을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 임의의 이들 성분은 임의의 적합한 혈청형으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, rAAV 벡터는 생산자 세포(producer cell)(예를 들어, HEK 293 세포)를 (a) 관심 유전자(예를 들어, CYP4V2를 암호화하는 cDNA) 및 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹된 다른 바람직한 조절 서열로 구성되는 클로닝된 재조합 AAV 게놈을 함유하는 플라스미드(AAV 시스-플라스미드), (b) AAV 바이러스 Rep 및 Cap 유전자를 트랜스로(in trans) 발현시키는 별도의 구조체, (c) 아데노바이러스 감염에 의해, 또는 이들 아데노바이러스 헬퍼 인자를 제공하는 제3 플라스미드를 생산자 세포로 형질감염시킴으로써 제공되는 아데노바이러스 헬퍼 인자와 함께 공-형질감염시킴으로써 생성된다. HEK293 세포 이외에, HeLa, Vero, A549, B50, WI38 및 BHK 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 세포주가 rAAV 벡터의 생산에 사용될 수 있다.

[0412] 일부 구현예에서, 바이러스 전달 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9 및/또는 AAV12 바이러스의 하나 이상으로부터의 캡시드 요소를 갖는 rAAV2 바이러스, rAAV2/5 바이러스, rAAV2/8 바이러스, rAAV2/1 바이러스, rAAV2/4 바이러스, rAAV2/6 바이러스, rAAV2/9 바이러스, rAAV2/12 바이러스 또는 rAAV 바이러스이다. 일 구현예에서, 바이러스 전달 벡터는 AAV2(Y444F+Y500F+Y730F) 또는 AAV8(Y733F)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 Y-F 돌연변이를 갖는 rAAV 바이러스이다.

[0413] 일부 구현예에서, 바이러스 전달 벡터는 단일-가닥 rAAV(ssAAV) 바이러스이다. 일부 구현예에서, 바이러스 전달 벡터는 자가-상보적 rAAV(scAAV) 바이러스이다.

[0414] AAV 벡터 이외에, 다른 바이러스 벡터가 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스 벡터 또한 유전자 이식에 유용한 것으로 입증되었다. 예를 들어, Mori et al., 2002. IOVS, 43:1610-1615는 이식유전자(녹색 형광성 단백질)가 CMV 프로모터에 의해 유도(drive)되는, E-1이 결실되고, 부분적으로 E-3이 결실된 5형 Ad인 아데노바이러스 벡터의 용도를 개시하고 있다. 피크 발현 수준은 10^7 내지 10^8 개의 바이러스 입자의 주사시 입증되었으며, 망막하 주사는 유리체 내 주사보다 더 높은 발현 수준을 제공한다.

[0415] 일부 구현예에서, 전달 벡터는 인간 CYP4V2 단백질 또는 이의 기능적 변이체 또는 단편을 암호화하는 핵산 분자를 함유하는 플라스미드이다.

[0416] 비-바이러스성 벡터 또한 CYP4V2 유전자 치료요법에서 사용될 수 있다. 비-바이러스성 벡터의 예는 네이키드 핵산, 덴드리머, 리포좀(예를 들어, 양이온성 또는 음이온성 리포좀), 중합체(예를 들어, 폴리플렉스), 지질-중합체 시스템 및 나노입자(예를 들어, 무기 또는 합성된 나노입자)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 효율적인 비-바이러스성 안구 유전자 이식은 안구 조직으로의 비-바이러스성 유전자 이식을 위한 시스템으로서 압축된 DNA 나노입자를 사용한 Farjo et al., 2006, PLoS 1:e38에 의해 입증되었다. 개념의 증명으로서, CMV 즉시-초기 프로모터(immediate-early promoter) 및 인핸서에 의해 전사적으로 제어된 향상된 녹색 형광성 단백질(green fluorescent protein, GFP) cDNA를 암호화하는 pZEGFP5.1 (5,147 bp) 발현 구조체가 사용되었다. DNA 나노입자는 공지된 방법을 사용하여 말레이미드 연결을 통해 10 kDa 폴리에틸렌 글리콜에 접합된 N-말단 시스테인을 갖는 30-머 라이신 펩타이드인 CK30PEG10K와 플라스미드 DNA를 혼합함으로써 제형화되었다. 나노입자는 염수에서 4 mg/ml의 DNA까지 농축되었다. 압축된 DNA는 유리체 공동에는 0.6 µg 용량으로 전달되었다. GFP 발현이 PCR 및 현미경에 의해 수정체, 망막 및 색소 상피/맥락막/공막에서 관찰되었다.

[0417] 또한, 하이알루론산 매개성 아데노바이러스 형질도입 방법을 제공하는 미국 특허 번호 7,144,870; 렌티바이러스 벡터 및 안구 유전자 이식을 매개하기 위한 이들의 용도를 제공하는 미국 특허 번호 7,122,181 및 6,555,107; 헤르페스 단순포진 바이러스 벡터 및 안구 유전자 이식을 매개하는 이들의 용도를 제공하는 미국 특허 번호 6,106,826; 및 DNA 발현 벡터 및 안구 유전자 이식을 매개하는 이들의 용도를 제공하는 미국 특허 5,770,580을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 안구 유전자 이식 방법에 대한 다수의 특허가 공개되었다.

[0418] 상이한 벡터로부터 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용하기에 적합한 벡터를 스크리닝하고 선택하는 방법은 본원의 실시예 섹션에 제공된다. 실시예는 상이한 AAV 벡터를 사용하여 방법을 나타내었다. 이러한 방법은 또한 상이한 유형의 벡터, 예를 들어 바이러스 대 비-바이러스성 벡터, 아데노바이러스 대 AAV, 렌티바이러스 대 AAV, HSV 대 AAV 등을 비교하고 선택하기 위해 당업자에 의해 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0419] C. CYP4V2 발현 카세트 및 조절 서열

[0420] 본 개시내용은 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, 서열번호 1, 2 또는 3의 핵산 서열)

및 핵산 서열을 암호화하는 CYP4V2에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 분자 이외에, CYP4V2 유전자 치료요법에 사용되는 발현 카세트의 다른 주요 요소는 상기 핵산 분자의 발현을 제어하기 위한 하나 이상의 조절 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 향상된 전달, 형질도입 및/또는 발현 효율을 위해 전달 벡터(예를 들어, AAV ITR에 의해 플랭킹된 rAAV 벡터에)에 패키징된다. 임의의 AAV ITR이 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있다. 본원의 실시예에 기술된 ssAAV 벡터는 각각 약 141 bp의 2개의 AAV2 ITR(서열번호 40에 나타난 예시적인 서열)을 함유한다. 실시예에 기술된 scAAV 벡터는 2개의 AAV2 ITR을 함유하며, 이들 중 하나는 절단되어 있다(서열번호 41에 나타난 예시적인 서열). AAV2 ITR은 주로 사용될 모(parental) 벡터에 따라서 약 132 내지 약 167 bp의 길이를 갖는다.

[0421] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절 서열(regulatory sequence)"은 핵산 서열의 복제 또는 발현(전사 또는 번역)시 조절 효과를 발휘할 수 있거나, 그렇지 않으면 핵산 서열의 발현을 지시하고, 이에 영향을 미치고/미치거나 이를 조절할 수 있는 임의의 유전자 요소(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)를 지칭한다. 일반적인 발현 제어 서열은 프로모터, 폴리아데닐화(폴리아) 신호, 인핸서, 상류 조절 도메인, 인트론, UTR, 반응 요소, 또는 유도성 요소, 복제 오리진, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 전사 개시 서열, 종결 서열, 스플라이싱 및 폴리아데닐화(폴리아) 서열과 같은 RNA 프로세싱 서열, 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열, 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 컨센서스 서열), 단백질 안정성을 향상시키는 서열 또는 암호화된 단백질의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 조절 서열은 세균, 효모, 곤충, 포유동물 또는 바이러스 기원일 수 있거나, 이의 유도체, 하이브리드 또는 변이체일 수 있거나, 합성일 수 있고, 벡터는 상이한 기원으로부터의 조절 서열의 조합을 함유할 수 있다. 예를 들어, 조절 서열은 이들이 발현을 조절하는 암호화 서열(예를 들어, CYP4V2 유전자)에 대해 이중성(예를 들어, 상이한 기원의 또는 상이한 유전자로부터; 예를 들어, 비-CYP4V2 유전자로부터)이거나 상동성(예를 들어, 동일한 유전자로부터; 예를 들어, CYP4V2 유전자로부터)일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 프로모터 및/또는 다른 조절 서열(들)이 핵산 암호화 서열의 발현을 지시하거나, 이에 영향을 미치거나 또는 이를 조절하는 방식으로 핵산 암호화 서열에 대해 위치되는 것을 의미한다. 조절 서열은 동일한 벡터 또는 상이한 벡터에서 핵산 암호화 서열과 "작동 가능하게 연결"될 수 있다. 핵산 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 서열은 연속적일 수 있고/있거나, 트랜스로 또는 핵산 암호화서열의 발현을 지시하거나, 이에 영향을 미치거나 또는 이를 조절하기 위한 거리에서 작용할 수 있다. 조절 서열 중에서, 프로모터는 필수적이지만, 인핸서, 인트론 및 종결인자(terminator)와 같은 다른 조절 서열은 유리하지만 선택적일 수 있다.

[0422] 다양한 프로모터 서열이 핵산 암호화 서열의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 일부 프로모터는 구성적 프로모터이며, 이는 거의 모든 조직 및 대부분의 세포 유형에서 발현을 지시한다. 반면 다른 프로모터는 더 제어된다. 조절되는 프로모터는 단지 특정 조직 또는 세포(즉, 조직- 또는 세포-특이적 프로모터)에서만 또는 발달의 특정 시기(즉, 발달-단계 특이적 프로모터)에 작용할 수 있고/있거나 화학물질, 산소 수준, 열 또는 빛과 같은 환경 조건 또는 외부 자극(즉, 유도성 프로모터)에 대해 조절될(conditioned) 수 있다.

[0423] 일부 예에서, 구성적(또는 편재된) 프로모터를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 예시적인 구성적 프로모터는 사이토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터(Gray et al., Hum Gene Ther. 2011 Sep; 22(9): 1143-1153; Norman et al., PLoS ONE 5(8): e12413, Aug 2010), CMV/닭 베타 액틴/토끼 베타-글로빈으로부터 유래되는 닭 β-액틴 프로모터, 하이브리드 CAG(CAGGS, CBA 또는 CB로도 알려져 있음) 프로모터(Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K. 1989. Expression vector system based on the chicken β-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. Gene 79: 269-277; Acland, G. M. et al. Mol Ther, 2005, 12:1072-1082), 작은 CBA(smCBA) 프로모터(~953 bp, 참조: Mah, et al. 2003, Hum. Gene Ther. 14:143-152; Haire, et al. 2006 IOVS, 2006, 47:3745-3753), CBh 프로모터(~800 bp, Gray et al., Hum Gene Ther. 2011 Sep; 22(9): 1143-1153 참조), 인간 β-액틴 프로모터(ACTB) (Norman et al., PLoS ONE 5(8): e12413, Aug 2010), 연장 인자 1 알파(EF-1 알파) 프로모터(Gill et al., Gene Ther. 2001;8(20):1539-1546; Norman et al., PLoS ONE 5(8): e12413, Aug 2010 참조), 포스포글리세레이트 키나아제(PGK, 인간 또는 마우스) 프로모터(Norman et al., PLoS ONE 5(8): e12413, Aug 2010), 유비퀴틴 C(UBC) 프로모터(Norman et al., PLoS ONE 5(8): e12413, Aug 2010), GUSB (글루쿠로니다아제 베타) 프로모터, GUSB 최소 프로모터(hGBp)(Husain, Gene Therapy (2009) 16, 927-932), UCOE 프로모터, 연장 인자 1α 짧은(EFS) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, 로우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 다양한 프로모터의 유전적 비교 및 논의에 대해서 Powell, Discov Med. 2015 Jan; 19(102): 49-57을 참조한다. 일부 경우에, "구성적(constitutive)" 또는 "편재된(ubiquitous)" 프로모터는 선택된 세포

유형에서 침묵하는 경향이 있거나, 차등적인 발현 강도를 촉진시킬 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, McCown et al., Brain Res. 1996;713(1-2):99-107; Gray et al., Hum Gene Ther. 2011;22:1143-1153을 참조한다.

[0424] 일부 예에서, 세포-특이적 또는 조직-특이적 프로모터를 사용하는 것이 바람직하며, 이는 특정 유형의 세포 또는 조직에서 핵산 암호화 서열의 발현을 지시한다. 본원의 개시내용에 기초하여, 세포-특이적 또는 조직-특이적 프로모터는 안구 세포 또는 조직에 대해, 또는 림프구에 대해 특이적일 수 있음이 이해될 것이다. 안구 세포 유형은 망막 세포, 망막 양극성 세포(retina bipolar cell), 광수용체 세포, 간상 세포 및 원추 세포, 강글리온 세포, 망막 색소 상피(RPE) 세포, 맥락막 세포 또는 각막 상피 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같은 세포-특이적 프로모터는 망막-특이적 프로모터(예를 들어, RPE-특이적, 광수용체-특이적(예를 들어, 원추 세포-특이적 및/또는 간상 세포-특이적) 및/또는 맥락막-특이적) 또는 각막-특이적 프로모터일 수 있다. 예시적인 안구 세포-특이적 프로모터는 인간 G-단백질-결합 수용체 단백질 키나아제 1 (로돕신 키나아제 1(GRK1) 프로모터(진뱅크(Genbank) 등록 번호 AY327580)로도 알려져 있음, GRK1 프로모터의 292 nt 단편(1793 내지 2087번 위치)(Beltran et al., Gene Therapy 17:1162-74, 2010을 참조), 인간 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 근접(interphotoreceptor retinoid-binding protein proximal, IRBP) 프로모터, hIRBP 프로모터의 235 nt 단편, RPGR 근접 프로모터, 레드 옵신(red opsin) 프로모터, 적-녹색 옵신 프로모터, 청색 옵신 프로모터, 마우스 옵신 프로모터(긴 버전 및 짧은 버전 둘 다, Le et al., Molecular Vision 2006; 12:389-398; Beltran et al., Gene Therapy 17: 1 162-74, 2010), 로돕신(Rho) 프로모터(Mussolino et al., Gene Therapy, 18:637-45, 2011); 콘 트랜스듀신의 알파-서브유닛(Morrissey et al., BMC Dev Biol, 11:3, 2011); 베타 포스포디에스테라아제(phosphodiesterase, PDE) 프로모터; 망막색소 변성증(RP1) 프로모터(Nicord et al., J. Gene Vied. 9: 1015-23, 2007), NXNL2/NXNL1 프로모터(Lambard et al., PLoS One, 5:e13025, 2010), RPE65 프로모터(Li et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, December 2002, Vol.43, 3640); 망막 변성 슬로우(slow)/페리페린 2(Rds/perphZ) 프로모터(Cai et al., Exp Eye Res, 91: 186-94, 2010), VMD2 프로모터(난황형 황반 이영양증 2; BEST1로도 알려져 있음, Kachi et al., Human Gene Therapy, 20:31-9, 2009), IRBP/GNAT2 프로모터(콘 트랜스듀신 알파 프로모터에 융합된 hIRBP 인핸서), Rd(망막 변성 슬로우) 프로모터, hPDE6b 프로모터, 또는 VEcad 프로모터(VE-카드헤린/카드헤린 5(CDH5)/CD144 프로모터)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 당업계에 공지된 다른 프로모터가 본원에 제공되는 근거 및 논의에 기초하여 본원에 제공되는 임의의 예시적인 프로모터 대신에 또는 그에 더하여 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0425] 예시적인 유도성 프로모터는 칼슘-민감성 프로모터(예를 들어, NFAT 프로모터, Gene Ther. 2013 Mar;20(3):248-54를 참조), 아연-유도성 양(sheep) 메탈리오이히오닌(MX) 프로모터, 텍사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터 시스템; 엑다이손 곤충 프로모터, 테트라 사이클린-억제성 시스템, 테트라사이클린-유도성 시스템, RU486-유도성 시스템, 라파마이신-유도성 시스템, 다수의 상업적으로 이용 가능한 유도성 프로모터, 및 특정 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성기(acute phase), 특히 세포의 분화 상태에 의해, 또는 복제하는 세포에서만 조절되는 유도성 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 특정 안구 세포 유형에 대해 엄격하게 조절되고 이에 특이적인 프로모터이다.

[0426] 프로모터는 다른 프로모터 및/또는 다른 조절 서열의 하이브리드, 또는 이의 절단된/단축된 또는 변형된 버전이거나, 또는 그렇지 않으면 이로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어 CAG 프로모터는 CMV 즉시 초기 인핸서, 닭 베타 액틴 프로모터 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 하이브리드이고, smCBA 프로모터는 CBA 프로모터의 절단된 버전이다. 프로모터는 다른 요소, 예를 들어 인트론, 엑손 및/또는 인핸서, 예를 들어 CAG 프로모터를 함유할 수 있다. 하나 이상의 프로모터가 발현 카세트 내에서 함께 사용될 수 있다.

[0427] 일부 예에서, 프로모터로 인하여 발생하는 상기 발현을 증가시키고/시키거나 안정화하기 위해 인핸서 서열을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 대표적인 인핸서 서열은 전사 후 조절 요소(예를 들어, 우드척(woodchuck) 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE로도 알려져 있음), 또는 B형 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(HPRE 또는 HBVPRE로도 알려져 있음, Donello et al., J Virol. 1998 Jun;72(6):5085-92; Sun et al., DNA Cell Biol. 2009 May; 28(5): 233-240), 또는 다양한 단축, 돌연변이 또는 변형된 WPRE, 예를 들어 WPRE의 최소의 감마 및 알파 요소를 함유하는 ~247 bp의 단축된 WPRE(Choi et al., Mol Brain. 2014; 7: 17; Donello et al., J Virol. 1998 Jun; 72(6): 5085-5092; Zanta-Boussif et al., Gene Therapy (2009) 16, 605-619), 또는 IRBP 인핸서(Nicord et al., J. Gene Vied. 9: 1015-23, 2007), 구성적 수송 요소(CTE) 인핸서(예를 들어, 메이슨-화이저 원숭이 바이러스(Mason-Pfizer Monkey Virus) CTE 또는 아비안 백혈병 바이러스 CTE), 사이토메갈로 바

이러스(CMV) 즉시 초기 인핸서, 번역글로불린 유전자 또는 SV40 인핸서로부터 유래되는 것, 또는 마우스 근접 프로모터에서 확인된 시스-작용 요소, 인트론 조절 서열, 예를 들어 SV-40으로부터 유래되는SD-SA로서 지칭되는 미니-인트론 스플라이스 공여체/스플라이스 수용체, 단일 유전자 전사체로부터의 하나의 폴리펩타이드, 예를 들어 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 함유하는 단백질 또는 2개의 상이한 단백질을 생산하는데 사용될 수 있고, RPE, 광수용체 및 강글리온 세포에서 이식유전자 발현을 지원하는 폴리오바이러스 내부 리보솜 진입 서열일 수 있는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0428] 전사체의 폴리아데닐화는 핵 배출, 번역 및 mRNA 안전성에 중요하다. 따라서, 전사체 폴리아데닐화의 효율은 이식유전자 발현에 중요하다. 대표적인 폴리A 신호 서열은 SV40 폴리A 신호, SV40 레이트 폴리A 신호, SV40 초기 폴리A 신호, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGH 폴리A) 신호, 작은 폴리A, 또는 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(hGH 폴리A)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 예에서, 상류 인핸서(upstream enhancer, USE) 서열은 폴리A 신호, 예를 들어 SV40 레이트 2xUSE, HIV-1 USE(인간 면역결핍 바이러스 1), GHV USE(열록 다람쥐 간염 바이러스), 아데노바이러스(L3) USE(아데노바이러스), hTHGB USE(인간 프로트롬빈) 또는 hC2 USE(인간 C2 상보성 유전자)(Schambach A, Galla M, Maetzig T, Loew R, Baum C. Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. Mol Ther. 2007;15(6):1167-1173)의 효율을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0429] 프로모터 서열과 마찬가지로, 발현 카세트에 사용되는 다른 조절 서열은 조절 서열의 단축된/절단된, 변형된 또는 다르게 유래된 버전의 하이브리드일 수 있다. 예를 들어, 단축된 WPRE, SV40 레이트 2 x USE, SV40 레이트 폴리A가 있다. 본원에 기술된 요소 이외에, 발현 카세트는 또한 다른 조절 서열, 예를 들어 인트론, UTR, 및 링커 서열을 함유할 수 있다. 스플라이싱 부위의 포함(즉, 2개의 인트론에 의해 플랭킹된 엑손)은 발현 카세트로부터 단백질의 유전자 발현을 증가시키는데 유용한 것으로 입증되었다.

[0430] 조절 서열 또는 하이브리드 조절 서열이 다수의 버전을 가지고 하나 이상의 명칭을 가지는 것이 일반적이라는 것은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 다양한 프로모터, 인핸서 및 폴리A 신호는 CMV 프로모터, EF1 α 프로모터, WPRE 인핸서, 및 SV40 폴리A 신호를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 버전을 갖는다. CAG 프로모터는 CBA 프로모터, CB 프로모터 또는 CAGGS 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 대안적인 명칭을 갖는다. 또한, 유도체 또는 변이체를 생성하기 위해 조절 서열이 단축되거나, 변형되거나 다른 서열과 조합될 수 있다는 것은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 CAG(CBA, CB 또는 CAGGS로도 알려져 있음) 프로모터는 CMV 즉시 초기 인핸서, 닭 베타 액틴 프로모터 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 하이브리드이고, smCBA 프로모터는 절단된 CAG 프로모터이다. CB^{SB} 프로모터는 단축된 CAG 프로모터이며, CMV 즉시 초기 인핸서의 5' 말단에서 약 152 bp 차이가 난다. 또한, 조절 서열은 상이하게 명명될 수 있으며, 예를 들어 HPRE 또는 WPRE와 같은 전사 후 조절 요소는 인핸서로도 지칭될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 조절 서열은 이러한 조절 서열의 모든 변이, 유도체 및/또는 하이브리드를 고려한다. 조절 서열과 관련하여 본원에 제공되는 임의의 예시적인 서열은 사실상 예시적이며, 이러한 조절 서열의 정의 또는 범위를 예시적인 서열에 나타난 것으로 제한하지 않는다.

[0431] 일부 구현예에서, 마이크로(micro)RNA(miRNA) 기술이 예를 들어, 리프레스 오프-타겟 이식유전자 발현을 통해 표적 발현 특이성을 달성하기 위해 발현 카세트 설계에 사용될 수 있다. 단순히 예로서 그리고 제한없이, miR181(강글리온 세포 및 내부 망막에서 독점적으로(exclusively) 발현되는 것으로 나타난 miRNA)에 대한 표적 서열은 강글리온 세포 및 내부 망막 세포에서 발현 카세트-매개성 CYP4V2 단백질의 합성을 억제하기 위해 CYP4V2 cDNA의 바로 하류에 첨가될 수 있다. 유사하게는, 특정 세포 유형으로 독점적으로 발현되는 miRNA에 대한 표적 서열은 표적 조직- 또는 세포-특이적 발현을 달성하기 위해 이들 유형의 세포에서 발현 카세트-매개성 CYP4V2 단백질 발현을 억제하는데 사용될 수 있다.

[0432] D. CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 효율적인 발현 카세트 및 전달 벡터의 설계

[0433] CYP4V2 발현 카세트 및 전달 벡터 설계 방법 및 이들 연구를 위한 다양한 설계에 대한 상세한 논의는 본원의 실시예 섹션에 제공된다.

[0434] **안질환을 치료하는데 있어서 EFS 프로모터 및/또는 작은 폴리A 신호(SPA)의 용도**

[0435] 본원에 논의된 바와 같이, 유전자 이식 벡터는 패키징 크기 제한을 갖는다. 예를 들어, 단일-가닥 AAV 벡터는 약 4.7 내지 5.0 kb의 패키징 한계를 가지며, 이를 초과하면 형질도입 및 발현 효율이 현저하게 떨어질 수 있다. 자가-상보적 AAV(scAAV)의 경우, 패키징 제한은 약 2.4 내지 2.5 kb으로 반감(halved)된다. 따라서, 크기는 벡터-매개성 유전자 이식 및 유전자 치료요법에 문제가 된다. 이중 가닥 자가-상보적 벡터의 경우, 이식유전

자(예를 들어, cDNA)를 위한 충분한 공간(room)을 만들기 위해 작은 크기 조절 서열을 사용하는 것이 바람직하며 때때로 중요하다. 이러한 크기 제한으로 인하여, 큰 프로모터는 또한 scAAV와 함께 사용하기에 적합하지 않다. CYP4V2 유전자 치료요법의 경우, cDNA의 크기가 약 1578 bp이고 AAV ITR(돌연변이를 가짐)가 약 258 bp임을 고려할 때, 조절 서열에 대해 약 500 내지 600 bp만이 남는다. CYP4V2는 거의 편재적으로 발현되기 때문에, 일부 구현예에서, CYP4V2 이식유전자 발현을 유도하기 위해 구성적 프로모터를 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 약 1.7 kb인 단일-가닥 AAV 설계에 사용되는 구성적 CAG 프로모터, 또는 약 953 bp인 단축된 CBA 프로모터(smCBA), 또는 약 800 bp인 CBh 프로모터를 위한 공간이 없을뿐만 아니라, 약 600 bp인 CMV 프로모터와 같은 많은 다른 구성적 프로모터를 위한 공간도 없다. 대신에, 짧은 길이의 EFS 프로모터는 scAAV 설계를 위해 사용할 수 있다(서열번호 34 에 나타낸 예시적인 서열). 동일한 크기 제한이 다른 조절 서열, 예를 들어 폴리A 신호에 적용될 수 있다. bGH 폴리A는 약 225 bp이고, SV40 폴리A는 약 240 bp이며, SV40 라이트 폴리A는 약 120 bp이다. 이들 중 임의의 하나는 프로모터를 포함하는 조절 서열에 대해 ~500 bp 길이의 상당 부분을 차지할 것이다. 따라서, sdAAV 설계를 위해 단지 약 54 bp(서열번호 35 에 나타낸 예시적인 서열)인 작은 폴리A 신호(SPA)가 사용되었다.

[0436] EFS 프로모터 및 SPA만을 사용한 설계는 약 300 bp만을 차지하며 AAV ITR과 함께 총 약 600 bp를 차지하므로, scAAV를 위해 설계된 발현 카세트에서 원하는 단백질 및 임의의 다른 서열을 암호화하는 핵산 서열분석을 위한 약 1.8 내지 1.9 kb의 패키징 공간을 남기고, scAAV를 위해 설계된 발현 카세트에서 원하는 단백질 및 임의의 다른 서열을 암호화하는 핵산 서열분석을 위한 약 4.1 내지 4.4 kb의 패키징 공간을 남긴다. 그 결과, 더 큰 크기의 cDNA 및/또는 다른 서열은 CMV 프로모터, CAG 프로모터, smCBA 프로모터, CBh 프로모터, EF1 알파 프로모터, bGH 폴리A, SV40 폴리A 및 SV40 라이트 폴리A를 포함하지만 이에 한정되지 않는 더 큰 프로모터 및 폴리A 신호 서열의 사용과 비교하여 EFS 프로모터 및 SPA와 함께 rAAV 벡터에 패키징될 수 있다.

[0437] EFS 프로모터 및 SPA를 포함하는 발현 카세트의 개략도가 도 4b에 제공된다. 도 7b에 나타낸 구조체는 CYP4V2 cDNA를 포함한다. CYP4V2 cDNA는 다른 이식유전자 발현을 위해 사용될 발현 카세트에 대한 다른 관심 유전자로 대체될 수 있다.

[0438] 안질환을 치료하기 위해 핵산 암호화 서열을 유도하기 위한 발현 카세트에서의 EFS 프로모터 및 SPA 전달 벡터의 사용이 본 연구에서 시험되었다. scAAV1.EFS.CYP4V2op.SPA로 명명된, EFS 프로모터, CYP4V2 cDNA 및 SPA를 함유하는 scAAV2/1 벡터가 생성되었다. scAAV1-EFS-CYP4V2op-SPA는 BCD 환자의 iPS-RPE 세포에 적용되었다. scAAV1-EFS-CYP4V2op-SPA는 EFS 프로모터 및 SPA의 짧은 길이에도 불구하고, 단 4일만에 BCD 환자의 iPS-RPE 세포에서 빠르고 강력한 작용을 나타내었다(표 3 참조). 이는 EFS 프로모터 및/또는 SPA가 안구 유전자 치료요법에 대한 scAAV 시스템에 매우 유용한 작은 크기의 조절 서열임을 입증한다. 또한, scAAV 벡터의 강력한 발현은 scAAV 설계가 망막하 전달 이외에 다른 투여 경로(예를 들어, 유리체 내 전달)에도 적합하게 한다.

[0439] EFS 프로모터 및/또는 SPA의 사용은 CYP4V2 유전자 치료요법 또는 scAAV 구조체에 한정되지 않는다. 이들은 다른 유전자를 포함하는 유전자 치료요법에 사용될 수 있으며, 여기에서 이식유전자 크기 및/또는 scAAV 설계는 빠르고 충분한 단백질 발현을 유도시키기 위해 짧은 길이 프로모터 및 폴리A 신호를 사용해야 한다.

[0440] E. 치료 옵션, 대상체 선택 및 투여

[0441] CYP4V2 유전자 치료요법은 다수의 방식으로 적용될 수 있다. 일부 예에서, 치료는 치료를 위해 표적화된 세포, 조직 또는 기관, 예를 들어 대상체의 RPE, 광수용체, 맥락막, 각막, 림프구, 망막 또는 눈으로 CYP4V2 발현 카세트를 함유하는 전달 벡터의 효과적인 전달을 통해 대상체(예를 들어, BCD 환자)에게 생체 내 적용될 수 있다. 일부 예에서, 치료는 표적 세포(예를 들어, 환자 iPS-RPE 세포, 환자 iPS-광수용체 세포, iPS-광수용체 선조 세포, iPS-CEC, 림프구)에서 시험관 내 적용될 수 있다. 이후에, 처리된 세포는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, BCD 환자)에게 이식될 수 있다. 일부 예에서, 치료는 생체 내 또는 시험관 내 접근법 둘 다를 조합하는 것을 통해 적용될 수 있다. 일부 예에서, CYP4V2 유전자 치료요법은 독립적으로 사용될 수 있다. 일부 예에서, CYP4V2 유전자 치료요법은 다른 치료 옵션과 함께 사용될 수 있다.

[0442] 본 치료 방법을 위한 후보인 대상체는 BCD로 진단되는 대상체를 포함한다. CYP4V2 유전자내 돌연변이에 의해 야기되는 다른 안과적으로 임상-정의된 상태(예를 들어, 유전성 망막 변성(IRD), 망막색소 변성증(RP) 또는 각막 이영양증)을 앓고 있는 대상체 또한 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 수 있다. CYP4V2 유전자내 돌연변이에 의해 야기되는 BCD, IRD, RP, 각막 이영양증 또는 다른 안과적 상태의 진단은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 이루어질 수 있다. 본원에 기술된 방법은 CYP4V2 유전자내 돌연변이에 의해 야기되는 BCD 또는 다른 안과적 상태를 가지거나, CYP4V2 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 BCD 또는 다른 안과적 상태를 가지는 것으로 의심

되는(예를 들어, 상태의 증상의 존재 및 다른 명백한 원인의 부재에 기초함) 대상체, 예를 들어 어린이, 청소년 또는 성인 대상체를 확인하는 단계, 및 대상체로부터 게놈 DNA를 포함하는 샘플을 획득하는 단계, 공지된 분자 생물학적 방법을 사용하여 CYP4V2 유전자내 돌연변이의 존재를 검출하는 단계를 포함한다.

[0443] 다수의 돌연변이가 CYP4V2 유전자에서 확인되었으며, 이는 BCD를 야기하며, 유전자의 11의 엑손 각각에 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다는 것이 확인되었다. 유전형 분석은 BCD 환자 중에서 가장 흔한 CYP4V2 돌연변이가 c.802-8_810del17insGC(CYP4V2 유전자의 인트론 6의 끝에서 8개의 염기가 시작하는 위치에 2개의 염기(GC)기가 삽입된 17개의 염기 결실을 지칭함, IVS6-8 del/insGC로도 지칭함; 이 삽입-결실 돌연변이는 인트론 6-엑손 7 접합부에 있으며, 17 bp 결실은 엑손 7 스플라이스-수용체 부위를 포함하여 62개의 아미노산 암호화 엑손 7의 프레임 내(in-frame) 결실을 초래함)이며, 엑손 7의 스키핑을 야기한다는 것을 보여주었다. (Xiao et al., Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011; Meng et al., 2014, Mol. Vis., 20:1806-14; Wada et al., Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005; Jiao et al., European Journal of Human Genetics(2017) 25, 461-471). 다양한 유형의 돌연변이가 미스센스, 스플라이스 부위, 프레임쉬프트(frameshift), 결실, 삽입, 삽입-결실, 넌센스, 다형체(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형체) 및 미성숙 종결(early termination)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 BCD와 관련된 CYP4V2 돌연변이에서 발견되었다. 인간 BCD 환자 중에서 선택된 CYP4V2 돌연변이의 요약은 표 1에 제공되며, 다수의 간행물 및 온라인 데이터베이스, 예를 들어 LOVD (월드 와이드 웹 상의 databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2), OMIM(월드 와이드 웹 상의 omim.org/allelicVariant/608614) 및 ClinVar(월드 와이드 웹 상의 ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM])에서 찾을 수 있다.

[0444] 표 1의 인간 CYP4V2 돌연변이는 완전하지 않다는 것에 유의하여야 한다. 앞으로 더 많은 CYP4V2 돌연변이가 확인될 수 있다. 참조 서열에 대한 모든 변이가 돌연변이가 아니라는 것이 이해될 것이다. 일부 변이는 비-병원성이다. 유전자 변이가 병리학적인지, 즉 돌연변이인지를 확인하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 이전에 임상적으로 확인된 공지된 돌연변이와 변이를 비교하는 단계 및/또는 기능에 있어서 상응하는 변경이 존재하는지의 여부를 결정하는 단계를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 유전자 변이가 병리학적인 변이(즉, 돌연변이)인지 여부를 확인하는 한 가지 방법은 본원에 기술된 바와 같은 대상체로부터 유래되는 iPSC-RPE 세포주의 생화학적 기능을 시험하고, 건강한 대조군의 iPSC-RPE 세포주의 생화학적 기능과 비교하여 임의의 이상이 존재하는지의 여부를 평가하기 위한 것이다.

[0445] 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 CYP4V2 돌연변이로 인한 BCD 또는 다른 안과적 상태를 갖는 환자는 바람직하게는 예를 들어, 시력, 시야, 시각 기능 및/또는 광 간섭성 단층촬영기술(OCT, 예를 들어 스펙트럼 도메인(Spectral Domain)-OCT(SD-OCT))에 의해 측정된 바와 같은 일부 광수용체 및 시각 기능을 보유한다.

[0446] 투여 전에, 최종 생성물은 임상 등급(clinical grade) 기준을 충족시키기 위한 일련의 단계 (예를 들어, 초정제(ultrapurification)를 거칠 것이다. 임상 등급 생산은 NIH 유전자 치료요법 리소스 프로그램(Gene Therapy Resource Program, GTRP) 및 위탁생산 전문기관(CMO)의 시설을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 GMP 시설을 통해 상업적으로 이용가능하다.

[0447] 투여 전에, 대상체는 대상체가 투여받을 AAV 벡터의 유형에 대한 기존의 중화 항체(NAb)에 대해 시험될 수 있다. 일 구현예에서, 대상체가 이러한 AAV 유형에 대해 기존의 Nab를 갖는 경우, 면역 반응을 낮추고 AAV 벡터에 의한 효율적인 형질도입 효율을 유지하기 위하여 대상체의 기존의 Nab에 대해 교차-반응성이 낮은 대안적인 AAV 벡터 또는 변형된 캡시드 구조를 갖는 AAV 벡터가 이러한 대상체에게 투여하는데 사용될 수 있다. 면역 반응을 최소화하는 다른 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 치료 전, 동안 및/또는 후에 면역-억제제 및 프로토콜을 적용하는 단계를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0448] 바이러스 또는 비-바이러스성 벡터, 또는 이들의 조합(예를 들어, 하이브리드 벡터)은 하나 이상의 물리적 수단을 사용하여 대상체의 안구 세포로 전달될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 안구 세포는 망막 색소 상피(RPE) 세포, 광수용체 세포, 각막 상피 세포, 망막 세포, 망막 쌍극 세포, 간상 세포, 원추 세포, 강글리온 세포, 맥락막 세포 및/또는 수정체 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 추가로 또는 대안적으로, 벡터는 뇌의 세포 또는 시신경 또는 혈액 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 표적 세포와 접촉할 수 있는 세포, 또는 근처 또는 이웃 세포로 전달될 수 있다.

[0449] 시험관 내 처리는 임의의 방법, 또는 방법 및/또는 치료를 위해 표적화된 세포(예를 들어, BCD 환자로부터의 iPSC-RPE 세포)로 벡터를 효과적으로 전달하는 체계의 조합을 사용할 수 있다. 시험관 내 처리는 하나 이상의 라운드(round)의 감염을 통해 수행될 수 있다. 일부 예에서, 벡터는 세포를 형질감염시키거나 형질도입시키기 위해 배양된 세포에 직접 적용될 수 있다. 일부 예에서, 다중 형질감염/형질도입, 전기천공, 자성감염

(magnetofection) 또는 소노포레이션(sonoporation)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 세포에서의 다른 전달 방법, 및/또는 형질감염/형질도입 효율을 향상시키는 다른 방법이 사용될 수 있다. 벡터 또는 발현 카세트로 세포를 감염/형질감염시키는데 사용되는 방법 및 제제는 당업계에 공지되어 있으며, 본원의 실시예 섹션에 기술된 바와 같은 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0450] 시험관 내에서 처리된 세포는 그후 대상체의 눈에 이식될 수 있다. 예를 들어, BCD 환자로부터의 유전자 복구된 iPS-RPE 세포는 환자에게 망막하 주사를 통해 이식될 수 있다. 눈으로의 세포 이식에 사용되는 방법, 제제 및 장치는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Wert et al., J Vis Exp. 2012; (69): 4286; WO 2016/179496; Schwartz et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science April 2016, Vol.57, ORSfc1-ORSfc9를 참조한다.

[0451] 생체 내 치료의 경우, 벡터 및/또는 발현 카세트는 생체 내 치료를 위해 (예를 들어, 치료를 위해 표적화된 세포로 전달하기 위해 치료를 필요로 하는 대상체의 눈으로의 투여를 통해) 표적화된 세포로 전달될 수 있다. 생체 내에서 표적 안구 세포로의 핵산 분자, 발현 카세트, 벡터의 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 눈으로의 투여는 치료를 위해 표적화된 세포에 따라 벡터를 망막, 망막하 공간, 맥락막 또는 일반적으로 눈의 후안부, 각막, 수정체 또는 유리체에 효과적으로 전달하는 임의의 방법(또는 방법 및/또는 제제의 조합)을 사용할 수 있다. 투여는 주사(예를 들어, 망막하 주사, 유리체내 주사, 직접 망막 주사, 눈의 후방 맥락막위 공간), 눈 점적을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 수단을 통할 수 있으며, 다른 전달 기술(예를 들어, 각막 상피로의 전기적 보조 전달(electrically assisted delivery))과 조합하여 적용될 수 있다. CYP4V2 핵산, 발현 카세트 및/또는 전달 벡터는 또한 예를 들어, DNA 입자 충격(DNA particle bombardment)(예를 들어, 유전자 총에 의한), 유체역학적 유전자 이식(hydrodynamic gene transfer), 눈 점적(eye drop), 전기천공, 자성감염 또는 소노포레이션(sonoporation)을 사용하여 세포로 도입될 수 있다. 눈으로의 투여 및 전달 방법 및 기술은 당업계에 공지되어 있다. 단순히 예로서, 제한없이, Wert et al., J Vis Exp. 2012; (69): 4286; WO 2016/179496; Mohan et al., Prog Retin Eye Res. 2012 Jan; 31(1): 43-64를 참조한다.

[0452] 망막하 주사를 사용한 RPE 세포로의 통상적인 전달 이외에, 본원에 논의된 방법의 일 양태는 눈 질환의 치료 또는 예방을 위한 핵산 분자(예를 들어, 비-돌연변이체 CYP4V2 핵산 서열을 가짐)의 유리체내 전달이다. 일부 벡터(예를 들어, AAV2(quadY-F+T-V) 및 AAV 7m8)는 유리체내 투여를 통한 망막에서의 효율적인 형질도입에 대한 특별한 가능성을 보여준다. 또한, AAV 또는 다른 바이러스 벡터는 통상적인 망막하 주사를 통하는 것 이외에, 하나 이상의 유형의 세포 또는 조직에 유전자를 전달하기 위한 벡터로서의 적합성을 개선 또는 최적화 하기 위해, 예를 들어 "유도 진화" 및 "합리적 설계"를 포함하는 당업계에 공지된 기술(예를 들어, 유리체내 주사)에 의해 변형될 수 있다. scAAV 벡터는 또한 신속하고 강력한 발현 프로파일로 인하여 망막하 전달 이외에 유리체내 전달에도 사용될 수 있다. CYP4V2는 망막에서 특히 고 발현으로 거의 편재적으로 분포되어 있기 때문에, CYP4V2의 유전자 변이 및 후성 유전자 변이는 하나 이상의 벡터의 유리체내 투여를 통해 복구에 특히 적합하다. 현재의 유전자 치료 방법은 일반적으로 벡터의 망막하 투여를 필요로 한다. 따라서, 본원에 개시된 물질 및 방법에 의해 달성되는 기술적 진보 중 하나는 CYP4V2의 핵산 서열내 유전자 변이 또는 후성 유전자 변이와 관련된 눈의 질환을 치료 및 예방하기 위한 핵산 서열(예를 들어, 야생형 또는 비-돌연변이 핵산 서열, 또는 유전자 편집 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열) 및/또는 폴리펩타이드의 유리체내 전달이다.

[0453] 투여 또는 전달 과정을 용이하게 하기 위해 특정 기술 및 제제가 사용될 수 있다. 전달 비히클(예를 들어, 바늘)에 대한 벡터의 부착을 피하도록 하는 윤활제의 사용을 포함하는 비-제한 실시예. 또한, 투여 또는 전달 과정 전, 동안 및/또는 후에 면역억제 약물의 사용은 감염 또는 형질도입 효율을 증가시킬 수 있다.

[0454] 벡터는 다양한 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 허용 가능한 비히클 부형제, 희석제 및/또는 담체를 사용하여 대상체의 안구 세포로의 전달을 위해 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 지칭될 수 있는 눈으로의 투여에 적합한 비히클 부형제, 희석제 및/또는 담체의 예는 멸균된 발열성물질 제거수(sterile, pyrogen-free water) 및 멸균된 발열성물질 제거 완충 염수(예를 들어, 포스페이트를 사용하여 완충된 염수 또는 적절한 생리학적 수준으로 pH를 유지하기 위한 HEPES와 같은 다른 완충제), 등장성 염화나트륨 용액, 평형(balanced) 염 용액, 에멀전(예를 들어, 오일/물 에멀전) 및 다양한 유형의 습윤제를 포함한다. 일부 예에서, 제형은 다른 의약제, 약제학적 제제, 안정화제, 완충제, 담체, 보조제 및 희석제를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 제형은 장기 저장을 위한 DBPS, 글리세롤 또는 트윈20을 포함할 수 있다.

[0455] 가장 효과적인 투여 수단 및 치료학적 유효 용량(therapeutically effective dose)을 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 이는 벡터, 이의 캡시드 구조, 벡터 설계(예를 들어, ssAAV 대 scAAV), 발현 카세트의 조

성, 박터의 발현 수준, 프로모터, 다른 조절 서열 또는 핵산 분자, 박터 역가, 표적 세포 유형, 표적 발현 수준, 표적 세포의 면적 또는 이의 수 및 치료될 대상체(예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 성별, 체중, 질환 및 상태의 발달 단계, 및 잠재적인 면역 반응); 투여 경로; 치료를 위해 표적화된 세포의 위치(예를 들어, 망막 대(vs) 각막); 야생형 세포 및/또는 조직에서 관련 유전자의 성질(nature) 및 발현 수준; 및 필요한 요법에 따라 달라질 것이다. 치료학적 유효 용량은 질환 모델(예를 들어, BCD 세포 모델(예를 들어, BCD 환자로부터의 iPS-RPE 세포주) 또는 동물 모델에서 결정되고 평가될 수 있고, 임상 시험에 의해 확인되거나 구체화(refined) 될 수 있다. 시험관 내 세포의 처리의 경우, 용량은 일반적으로 MOI로 나타내며, 치료될 세포의 수에 의해 MOI를 배수로 나타낸다. MOI는 일반적으로 세포당 약 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC의 범위이거나, 또는 세포당 약 100 내지 약 10,000 GC의 감염성 MOI이다(GC: AAV 입자(박터 게놈 (vg) 또는 게놈 입자(gp)를 함유하는 게놈을 측정하는 게놈 카피(genome copy)로도 알려져 있음). 생체 내 치료의 경우, 상술한 인자 이외에, 투여되는 실제 용량은 또한 투여 동안 각각의 환자에 대해 특이적인 개별 상황, 예를 들어 하기 기술된 맥락막 결손(choroideremia) 사례의 환자 6명에 대한 망막하 투여 동안 감소된 용량에 의해 영향을 받을 수 있다. 따라서, 생체 내에서 단일 투여를 위한 치료학적 유효 용량은 대략 약 1×10^6 내지 2×10^{13} GC(예를 들어, 약 1×10^{11} GC 내지 약 1×10^{12} GC의 고 용량 범위, 약 1×10^{10} GC 내지 약 1×10^{11} GC의 중간 용량 범위, 약 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{10} GC의 저 용량 범위, 약 1×10^6 GC 내지 약 1×10^9 GC의 매우 낮은 용량 범위 및 약 1×10^{12} GC 내지 약 2×10^{13} GC의 매우 높은 용량 범위)일 수 있거나, 또는 원하는 효과를 제공하기에 충분한 이들 범위 내의 임의의 용량을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 약 1×10^6 내지 2×10^{13} GC의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, 생체 내로 투여되는 용량은 치료를 위해 표적화된 세포의 수에 표적 MOI(예를 들어, 세포당 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC)와 곱함으로써 결정된다. 눈에 대한 임의의 단일 투여 시 rAAV 박터를 함유하는 제제의 부피는 약 1 μ L(0.001 mL) 내지 약 1000 μ L(1 mL)의 범위일 수 있다.

[0456] 본원에 기술된 바와 같은 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 제형화될 수 있다. 유사하게는, 투여는 한 번 또는 여러 번(예를 들어, 몇 주, 몇 개월 또는 몇 년에 걸쳐) 일어날 수 있으며, 동일한 눈 또는 반대쪽 눈에 적용될 수 있다. 다수의 투여 상황 하에서, 동일하거나 상이한 AAV 혈청형 및/또는 투여 경로(들)가 고려될 수 있다. 투여는 또한 상이한 조직 및 세포에 적용될 수 있으며, 예를 들어 하나의 투여는 RPE를 표적화하고 다른 투여는 각막을 표적화한다.

[0457] 유전자 치료요법(안구 유전자 치료요법 포함)에 사용하기 위한 바이러스 박터 생성, GMP 생산, 정제, 제형 및 용량은 당업자에게 공지되어 있으며, 바이러스 박터의 제조 방법은 하기 LCA-2에 대한 다양한 그룹의 유전자 치료요법 연구에서 입증된 임의의 다수의 회사 및 방법에 의해 수행될 수 있다. 본원에 제공되는 발현 카세트는 하기 열거된 임의의 예시적인 바이러스 박터 내로 삽입될 수 있다. 대안적으로, 바이러스 박터는 하기 제공되는 실시예에 기초하여 생성될 수 있다. Bainbridge et al., 2008. N Engl J Med. 358:2231-9; Maguire et al., 2008. N Engl J Med. 358:2240-8;; Hauswirth et al., Hum 유전자 Ther. 2008 Oct; 19(10): 979-990를 참조한다.

[0458] 예를 들어, 바인브릿지(Bainbridge) 연구에서, 혈청형 2의 재조합 아데노-관련 바이러스 박터인 tgAAG76 박터가 유전자 전달을 위해 사용되었다. 박터는 본원 의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 인간 RPE65 프로모터에 의해 유도되고, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 부위에 의해 종결되는 인간 RPE65 암호화 서열을 함유한다. 박터는 B50 패키징 세포주, tgAAG76 박터 게놈을 함유하는 아데노바이러스-아데노-관련 바이러스 하이브리드 서플 박터 및 아데노바이러스 5 헬퍼 바이러스를 사용하여 제품 제조 실무 가이드라인(Good Manufacturing Practice guideline)에 따라 Targeted Genetics Corporation에 의해 제조되었다. 박터를 완충 식염수 용액에 밀리리터당 1×10^{11} 개의 박터 입자의 역가로 넣고, -70°C 에서 1-ml의 분취량으로 동결시켰다.

[0459] Maguire는 AAV2.RPE65의 단일의 망막하 주사 후 LCA2의 개 모델에서 시각 기능의 장기간 지속되는(> 7.5년, 지속적인 관찰) 복구를 제공하는 것으로 문서화된 RPE65 cDNA를 함유하는 복제-결핍성 AAV 박터인 재조합 AAV2.hrPE65v2 바이러스 박터를 사용하였다. AAV2.RPE65를 생성하는데 사용되는 시스 플라스미드는 가나마이신-내성 유전자를 함유한다. 바이러스는 HEK293 세포의 세 번의 형질감염 후 세포 및 분자 치료학 센터(The Center for Cellular and Molecular Therapeutics)에 의해 제조되었고, 미세유동화(microfluidization), 여과, 양이온 교환 크로마토그래피(POROS 50HS; GE Healthcare, 뉴저지주 피스카타웨이 소재), 밀도 구배 초원심분리 및 PBS에서의 한외여과에 의해 분리되고 정제되었다. 이 조합은 빈(empty) 캡시드 및 잔류 염화세슘의 효율적인 제거를 포함하는, AAV 박터 생성물의 최적 순도를 제공한다. 생성물의 일부는 생성물 접촉 표면에 대한 박터의 후속적인 손실을 방지하기 위하여 PF68 NF Pri11 Poloxamer 188(PF68; BASF, 독일 루트빅샤렌 소재)로 보충되었다. PF68의 유무에 관계없이 정제된 바이러스를 멸균 60-ml 주사기 및 주사기 필터를 사용하여 0.22- μ m 필터에 통

과시킴, 사용할 때까지 멸균 튜브에 냉동(-80°C) 보관하였다. Pluronic F-68 NF Prill Poloxamer 188이 보충된 150 µl의 포스페이트-완충 식염수의 부피로 AAV2.hRPE65v2의 1.5 X 10¹⁰ 벡터 게놈의 주사액을 망막하 공간으로 투여하였다.

- [0460] Hauswirth에 의해 사용된 바이러스 벡터는 인간 RPE65 유전자(rAAV2- CB^{SB}-hRPE65)를 운반하도록 변경된 재조합 아데노-관련 바이러스 혈청형 2 (rAAV2) 벡터였으며, 이는 이전에 RPE65가 결핍된 동물 모델에서 시력을 회복시키는 것으로 입증되었다. RPE65-LC바이러스 벡터는 망막하 주사에 의해 전달되었다(150 µl 중 5.96 X 10¹⁰ 벡터 게놈).
- [0461] 눈에 대한 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 치료제(예를 들어, 단백질, 핵산 분자, 발현 카세트, 유전자 치료요법 벡터, 세포)의 투여 방법 및 프로토콜, 및 다른 과정 및 프로토콜(면역학 시험, 눈 시험 및 면역억제제를 포함하나 이에 한정되지 않음)은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 다음은 맥락막 결손의 치료에서 MacLaren에 의해 사용된 AAV 벡터의 망막하 주사의 예이다. 먼저 균형 염 용액(Alcon Laboratories, 미국 텍사스주 포트 워스 소재)을 사용하여 41G 테플론 캐놀러(Teflon cannula)(DORC International BV, 네덜란드, 주이들란트 소재)를 통해 망막을 박리(detach)하기 위한 수술을 시작하였다. 일단 망막 표적 영역이 기저 망막 색소상피로부터 박리되면, AAV2.REP1의 1 X 10¹⁰개의 게놈 입자를 함유하는 고정 부피(0.1 mL)를 새로운 주사기를 통해 처음 5명의 환자에서 생성된 망막하 공간으로 주사하였다. 환자 6에서, 최대 6 X 10⁹개의 게놈 입자의 감소된 용량을 주사하였다. 동일한 망막절개술을 통해 벡터를 서서히 주사하여 박리가 더 연장되도록 하였다. 수술은 처음 5명의 환자에서 복잡하지 않았지만, 환자 6에서는 말초 황반으로부터 망막의 박리가 어려워 안와(fovea)에 근접한 지점으로부터 박리의 유도가 필요하였으며, 이는 유두황반 다발(papillomacular bundle)의 가시적인 신장(stretch)을 유발하였다. 6/7·5 시력을 갖는 환자에서 이러한 필수적인(vital) 구조의 신장(stretch)-관련 손상에 대한 우려 때문에, 더 작은 부피의 벡터(최대 0.06 mL)가 두 번째 단계에서 주사되었다. 모든 환자에서, 주사기에 남아있는 잉여 벡터는 캐놀러를 통해 폴리프로필렌 바이알 내로 배출시킨 후 동결시켰다. 이 잉여 벡터는 나중에 인간 유래 HT1080 세포주의 형질도입 후 웨스턴 블롯을 사용하여 효능(potency)에 대해 시험되었다. 환자는 수술 2일 전에 시작하여 10일의 과정으로, 7일 동안 1 mg/kg(70 내지 100 mg)에서 이후 1일 40 mg, 1일 20 mg 및 1일 10 mg의 프레드니솔론으로 처리되었다. 면역학적 시험을 위해 혈액 샘플을 수술 전, 및 수술 1주 후 및 5 내지 6주 후에 채취하였다. MacLaren et al., Lancet. 2014 March 29; 383(9923): 1129-1137을 참조한다.
- [0462] Hauswirth 연구에서, 투여는 다음과 같이 수행되었다. 온화한 정주 진정법(mild intravenous sedation) 후, 수술할 눈에 눈뒤 마취(retrobulbar anesthesia)를 한 후에 표준 멸균 방식으로 준비하고 가렸다. 표준 3-포트 23-게이지 코어 및 말초 유리체 절제술을 수행하였다. 우측 공막 절개(right-sided sclerotomy)를 거쳐 결막을 웨스트코트 시저(Westcott scissor) 및 0.3 겹자를 사용하여 절개하였다. 레이저-팁팅 카우터리(eraser-tipped cautery)로 지혈을 유지하였다. 망막하 캐놀러를 눈에 쉽게 삽입할 수 있도록 공막절개를 20-게이지 MVR 블레이드로 넓혔다. 벡터를 39-게이지 주사 캐놀러(Synergetics, 미주리주 오팔론 소재)로 빨아들여 망막하 공간으로 도입하였다. 시술이 끝나면, 공막절개 부위를 7.0 비크릴 봉합사(Vicryl suture)로 봉합하고, 결막을 단속 봉합(interrupted suture)으로 단았다. 결막 밑에 항생제 및 스테로이드를 투여하였다. 국소 항생제 및 스테로이드를 수술 후 20일 동안 사용하였다. Hauswirth et al., Hum Gene Ther. 2008 Oct; 19(10): 979-990를 참조한다.
- [0463] 시험관 내 CYP4V2 유전자 치료요법 치료의 경우, 치료 후 평가는 세포의 형태 및/또는 생화학적 기능이 치료 후 개선되었는지를 평가하기 위하여, 환자 세포의 형태 및/또는 생화학적 기능장애를 비교, 예를 들어 BCD 환자의 iPS-RPE 세포(또는 가능한 경우, iPS-PRC 또는 iPS-CEC 세포)에 있어서의 이상을 치료 전 및 치료 후에 나타내는 화합물의 수준을 비교할 수 있다.
- [0464] 생체 내 CYP4V2 유전자 치료요법 치료의 경우, 치료후 평가는 암순응, 대비 민감도, 시야 시험, 시력 검사, 색각 시험, ERG, OCT, 안저 이미지(fundus imaging), 각막 실험, 이동성(mobility) 등과 같은 기능 시험을 포함하지만 이에 한정되지 않는 망막 및 각막 질환에 대해 당업계에 공지된 안구 및 망막(및 적용가능한 경우, 각막 시험) 실험을 사용할 수 있다. 효능은 다음 중 하나에 의해 확인될 수 있다: 시력 개선, 질환 진행 중지, 또는 망막 변성 또는 시력 손실의 예상 속도보다 더 느린 속도.
- [0465] 바이러스 벡터-매개성 유전자 치료요법의 한가지 과제는 유전자 치료요법을 받는 대상체로부터의 면역 반응이다. 대상체에 대한 통상적으로 관련된 위험 이외에, 면역 반응은 바이러스 벡터의 형질도입 효율을 현저하게 감소시키고/시키거나, 장기간 이식유전자 발현을 확립하지 못하게 할 수 있다. Mingozzi F, Meulenberg

JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Hasbrouck NC, Edmonson SA, Hutnick NA, Betts MR, Kastelein JJ, Stroes ES, High KA, AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood*. 2009 Sep 3; 114(10):2077-86.

- [0466] 아마도, 눈의 독특한 면역학적 환경으로 인하여, 안구 유전자 치료요법에서 다양한 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, AAV, 렌티바이러스, 아데노바이러스)의 면역학적 효과는 상당히 가벼운(benign) 것으로 보인다. 그럼에도 불구하고, 아데노바이러스의 안구내 투여 후에 상당한 세포-매개성 면역 반응이 발생할 수 있다. 그러나, AAV 또는 렌티바이러스는 세포-매개성 반응을 유발하지 않으므로, 만성 안구(망막) 질환의 치료를 위한 유망한 벡터이다. J Bennett, Immune response following intraocular of recombinant viral vectors, *Gene Therapy* (2003) 10, 977-982. doi:10.1038/sj.gt.3302030. 그러나, 반면에, 이전의 연구는 AAV 벡터의 유리체내 투여가 유리 체액(vitreous fluid)뿐만 아니라 비-인간 영장류의 혈청 둘 다에서 항-AAV 항체 수준의 증가를 초래한다는 것을 보여주었다. 더욱이, 원숭이 혈청내 기존의 중화 항체 역가의 존재는 AAV의 유리체내 투여 후 약하거나, 지연된 이식유전자 발현 또는 이식 유전자 발현이 되지 않는 것과 강력하게 관련되었다. Kotterman et al., Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates, *Gene Ther.* 2015 February; 22(2): 116-126. 따라서, 원하는 형질도입 효율 및/또는 장기간 이식유전자 발현을 보존하기 위해, 안구 유전자 치료요법에서 면역 반응, 특히 중화 항체(NAb)의 면역 반응을 감소시키는 것이 바람직하다.
- [0467] 역사적으로 유전자 치료요법 분야에서 회사들에게 일반적인 관행은 하나의 혈청형의 AAV 벡터를 사용하는 것이다. 이들은 전형적으로 동물 연구 및/또는 다른 유전자 치료요법의 임상 시험에 양호한 형질도입 효율 및 다량의 안전성 데이터를 갖는 벡터 유형을 사용한다. 예를 들어, AAV2는 임상 시험에서 안구 유전자 치료요법을 위해 가장 일반적으로 사용되는 AAV 혈청형이다. 그러나, 한 명의 환자에게 가장 우수한 혈청형이 면역계의 개별적인 차이, 예를 들어 기존의 항-AAV 항체로 인해 다른 환자에 대해서도 항상 가장 좋은 것은 아니다. 예를 들어, 특정 AAV 혈청형에 대한 기존의 항-AAV 중화 항체의 유병률(prevalence)은 국가 및 인구마다 상이하다. 또한, 면역 반응은 적용되는 유전자 치료요법의 효율을 감소시킬 수 있는 형질도입 효율을 유의적으로 감소시킬 수 있고/있거나 더 많은 용량의 투여를 요구할 수 있다.
- [0468] 바이러스 벡터 매개성 유전자 치료요법에서, 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시키고, 형질도입 효율을 유지하며, 바이러스 벡터 및/또는 면역억제제 용량을 낮추고/낮추거나, 동일한 유전자 질환의 상이한 환자에 대한 치료 효과를 최대화시키는 방법이 본원에 제공되며, 다음을 포함한다:
- [0469] (a) 유전자 치료요법을 위한 표적 세포 유형에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 하나 이상의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)의 풀(pool)을 확립하는 단계. 바이러스 벡터 풀은 돌연변이 또는 변이체가 질환과 관련된 표적 세포(예를 들어, BCD를 위한 CYP4V2 유전자 치료요법의 경우 iPS-RPE 또는 RPE 세포주에서)에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 것으로 확인된 후, 상기 바이러스 벡터의 캡시드 상에 항원성 영역 돌연변이 또는 다른 돌연변이 또는 변이체를 갖는 변이체를 생성시킴으로써 증식될 수 있음.
- [0470] (b) 유전자 치료요법을 필요로 하는 대상체에서 상이한 바이러스 벡터 혈청형 및/또는 캡시드 돌연변이 또는 변이체에 대한 기존의 중화 항-바이러스 벡터 항체(Nab)를 검출하고/하거나, 이러한 대상체로부터 유래되는 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포)에서 상이한 바이러스 벡터를 비교하는 단계.
- [0471] (c) (i) 질환 표적 세포에서 충분한 형질도입 효율 및 (ii) 대상체에서 기존의 Nab와의 낮은 교차-반응성, 및/또는 (iii) 대상체의 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 환자-특이적 iPS-RPE 또는 RPE 세포주)에서의 양호한 표현형 구조(rescue) 결과를 갖는 바이러스 벡터의 상기 풀로부터 바이러스 벡터를 선택하는 단계, 여기에서 이러한 바이러스 벡터 풀은 상이한 혈청형 및/또는 캡시드-변형된 바이러스 벡터(예를 들어, 캡시드-돌연변이체 AAV 및/또는 캡시드 단백질 변이체 AAV 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 포함함.
- [0472] (d) 대상체에게 투여하기 위해 (c)로부터 선택되는 바이러스 벡터를 사용하는 단계,
- [0473] (e) 단계 (b) 내지 (d)(기존의 Nab와 관련된 부분만)를 반복하는 단계, 상기 각각의 시기에 대상체는 동일한 기관(예를 들어, 눈 또는 반대쪽 눈) 또는 다른 기관으로의 후속 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자 치료요법 투여를 필요로 함.
- [0474] 이 방법의 잠재적인 이점은 면역억제제의 사용 감소, 더 낮은 용량의 rAAV 벡터, 더 높은 형질도입 효율 및 장기간 이식유전자 발현 및/또는 더 높은 백분율의 유전자 치료요법에 적합한 환자를 포함한다.

[0475] 이러한 방법은 다른 바이러스 벡터와 관련하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 이러한 방법은 CYP4V2 유전자 또는 다른 유전자(들)에 관계없이, 모든 유형의 안구 유전자 치료요법 및 비-안구 유전자 치료요법에서 사용될 수 있다.

[0476] 기존의 항-AAV 항체를 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 항-AAV 항체는 중화 항체 및 비-중화 항체 둘 다를 포함한다는 점에서 주목할 가치가 있다. 기존의 항-AAV 중화 항체 및 AAV에 대한 다른 면역 반응을 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. Melvin Y Rincon et al., JMIR Res Protoc. 2016 Apr-Jun; 5(2): e102; Hauswirth et al., Hum Gene Ther. 2008 Oct; 19(10): 979-990. 중화 항체에서는 그 효과가 가장 중요하지만, 비-중화 항체조차도 면역계에 의한 벡터 제거를 유발할 수 있다. 비-중화 항체는 ELISA에 의해 검출될 수 있다. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C, Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, d 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vector s. Hum Gene Ther. 2010 Jun; 21(6):704-12.

[0477] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 방법 및 조성물이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 제공된 용어의 정의 이외에, 분자 생물학에서의 일반적인 용어의 정의는 또한 *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, Rieger et al., 1991, 5th Ed, Springer-Verlag; in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Eds., 1998 Supplement, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.; in *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino et al., Eds., 1999 Supplement, John Wiley & Sons, Inc.; and in *Current Protocols in Neuroscience*, Crawley et al., Eds., 1999 Supplement, John Wiley & Sons, Inc.에서 찾을 수 있다.

[0478] 대표적인 방법 및 물질이 본원에 기술되어 있으며; 당업계에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질 또한 사용될 수 있다. 방법 및 물질은 단지 예시를 위한 것이며 제한하려는 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0479] 본 발명은 하기 그림 및 도면에 추가로 예시되어 있으며, 이는 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

세포주 특허:

도 1: BCD 환자로부터 유래되는 iPS 세포주

(a) BCD 환자의 피부 생검 샘플의 섬유아세포로부터 생성된 iPS 세포:

- (i) 환자 1(P1) iPS 세포
- (ii) 환자 2(P2) iPS 세포
- (iii) Oct-4, Sox-2 및 SSEA-4 마커에 의한 P1 및 P2 iPS 세포주의 특성화
- (iv) 나노그(Nanog) 및 Tra-1-60 마커에 의한 P1 및 P2 iPS 세포주의 특성화

(b) BCD 환자로부터 생성된 iPS 세포 및 혈액 샘플의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터의 건강한 대조군:

- (i) iPS 세포주의 상(phase) 대조 이미지
- (ii) iPS 세포주의 AP 염색 결과

(c) 명백하게 정상적인 인간 핵형(karyotype)을 나타내는 BCD 환자-유래 iPS 세포 핵형 이미지.

도 2: BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주:

(a) RPE의 독특한 형태 - 육각형, 색소 및 단층을 나타내는 BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주의 명시야(light field) 사진:

- (i) P1 iPS-RPE 세포
- (ii) P2 iPS-RPE 세포

(b) RPE-특이적 마커, RPE65, CRALBP 및 MITF의 존재를 나타내는, BCD 환자의 iPS-RPE 세포의 RPE 마커 결과.

도 3: iPS-RPE 샘플에서 CYP4V2 발현의 qRT-PCR 결과. WT(대조군). WT AVE(대조군의 평균). P1(BCD 환자 1). P1-AAV8(AAV8.CYP4V2fv에 의해 처리된 P1 샘플, MOI=1.5x10e4 GC/세포).

도 4: iPS-RPE 샘플에서 CYP4V2op 발현의 qRT-PCR 결과. WT(대조군). WT AVE(대조군의 평균). P1 및 P2(BCD 환자 1 및 환자 2). P1-AAV2(2x10e4 GC/세포의 MOI로 AAV2.CYP4V2op에 의해 처리된 P1 샘플). P2-AAV2(2x10e4 GC/세포의 MOI로 AAV2.CYP4V2op에 의해 처리된 P2 샘플). P2-scAAV1(2x10e4 GC/세포의 MOI로 scAAV1.CYP4V2op에 의해 처리된 P2 샘플).

도 5: 청색 광에 노출되지 않은 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지. WT(대조군). P1 및 P2(BCD 환자 1 및 환자 2). 적색(죽은/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 5(a): 적색만. 도 5(b): 적색 및 녹색.

도 6: 청색 광에 1시간 노출 후 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지. WT(대조군). P1 및 P2(BCD 환자 1 및 환자 2). 적색(죽은/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 6(a): 적색만. 도 6(b): 적색 및 녹색.

유전자 치료요법:

도 7: 예시적인 CYP4V2 발현 카세트 및 재조합 AAV(rAAV) 벡터의 개략도 및 이에 대한 주석

- (a) 단일-가닥 AAV(ssAAV) 벡터에 패키징된 CYP4V2 발현 카세트(인헨서 존재)
- (b) 단일-가닥 AAV(ssAAV) 벡터에 패키징된 CYP4V2 발현 카세트(인헨서 부존재)
- (c) 자가-상보적 AAV(scAAV) 또는 ssAAV 벡터에 패키징된 CYP4V2 발현 카세트.

주석: CYP4V2 발현 카세트(나타낸 바와 같이 AAV ITR에 의해 플랭킹됨)는 임의의 AAV 혈청형 또는 이의 하이브리드 또는 변이체로부터의 캡시드와 함께 rAAV 벡터에 패키징할 수 있다. ITR: 역위된 말단 반복부(Inverted terminal repeat)(다른 AAV 혈청형으로부터의 AAV2 ITR 또는 ITR일 수 있음). 서열번호 42 및 43에 나타낸 예시적인 AAV2 ITR 서열. CYP4V2: 인간 CYP4V2 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 cDNA, 예를 들어 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 CYP4V2st(서열번호 1) 또는 CYP4V2op(서열번호 2), 또는 기능적 CYP4V2 단백질(서열번호 5)을 암호화하는 CYP4V2fv(서열번호 3). 코작 서열(서열번호 37 또는 38에 나타낸 서열)은 CYP4V2 cDNA 서열의 바로 앞에 삽입된다. CAG: 하이브리드 CAG 프로모터(서열번호 32에 나타낸 예시적인 서열). CMV 프로모터(서열번호 40에 나타낸 예시적인 서열) 또는 EF-1 α 프로모터(서열번호 41에 나타낸 예시적인 서열)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 본원에 논의된 다른 프로모터도 또한 사용될 수 있다. WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element): 우드척(woodchuck) 간염 바이러스 전사후 조절 요소(서열번호 33에 나타낸 예시적인 서열). bGH 폴리A: 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(서열번호 34에 나타낸 예시적인 서열). 대안적인 폴리A 신호, 예를 들어 SV40 후기 폴리A 신호(서열번호 39에 나타낸 예시적인 서열)가 사용될 수 있다. EFS: 연장 인자 1 α 짧은(EFS) 코어 프로모터. 서열번호 35에 나타낸 예시적인 서열. SPA: 작은 폴리A 신호. 서열번호 36에 나타낸 예시적인 서열. 돌연변이/절단된(truncated) ITR: scAAV 벡터에 사용된 2개의 ITR 중 하나는 돌연변이/절단된 ITR임(ITR*로서 나타냄). 서열번호 44에 나타낸 예시적인 서열. 인헨서는 CYP4V2 발현 카세트에서 선택적이다.

도 8: 청색 광에 1시간 노출 후 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지(AAV.CYP4V2 처리되지 않음 대 1x10e5 GC/세포의 MOI로 AAV2.CYP4V2op 또는 scAAV1.CYP4V2op에 의해 처리됨). P1 및 P2(BCD 환자 1 및 환자 2). 적색(사멸/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 8(a): 적색만. 도 8(b): 적색 및 녹색.

도 9: 청색 광에 1시간 노출 후 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지(AAV.CYP4V2 처리되지 않음 대 1x10e5 GC/세포의 MOI로 AAV5.CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st 또는 AAV8.CYP4V2fv에 의해 처리됨). P1(BCD 환자 1). 적색(사멸/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 9(a): 적색만. 도 9(b): 적색 및 녹색.

도 10: 청색 광에 1시간 노출 후 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지(AAV.CYP4V2 처리되지 않음 대 1x10e4 GC/세포의 MOI로 AAV5.CYP4V2op, scAAV1.CYP4V2op 또는 scAAV5.CYP4V2op에 의해 처리됨). P2(BCD 환자 2). 적색(사멸/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 10(a): 적색만. 도 10(b): 적색 및 녹색.

도 11: 청색 광에 1시간 노출 후 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플의 세포 생존능 이미지(AAV.CYP4V2 처리되지 않음 대 1x10e5 GC/세포의 MOI로 scAAV9.CYP4V2op에 의해 처리됨). P1(BCD 환자 1). 적색(사멸/병든 세포); 녹색(살아있는/건강한 세포). 도 11(a): 적색만. 도 11(b): 적색 및 녹색.

세포 치료요법:

도 12는 가이드 RNA(gRNA) 활성 검정을 위해 c.802-8_810del17insGC 돌연변이 및 프라이머(오렌지색 화살표)에 대해 설계된 CYP4V2 서열의 영역 및 gRNA의 위치를 나타낸다.

도 13은 시험관 내 서베이어 검정(surveyor assay)을 나타낸다. 레인 1: 앰플리콘 + Cas9; 2: 앰플리콘 + g1 + Cas9; 3: 앰플리콘 + g2 + Cas9; 4: 앰플리콘 + g3 + Cas9; 5: 앰플리콘 + g4 + Cas9; 6: 앰플리콘 + g5 + Cas9; 7: 앰플리콘 단독; M: 1kb DNA 마커.

도 14는 서베이어 검정에 사용된 DNA 오리진(origin)을 확인하는 서열 비교를 나타낸다. 상단: 비처리된 앰플리콘; 중간: g2 처리된 앰플리콘으로부터의 단편; 하단: 돌연변이 부위를 나타내는 CYP4V2 유전자자리(locus).

도 15는 gRNA 벡터 구성의 예시이다.

도 16은 gRNA(예로서 g1을 사용함), Cas9 및 PuroR 공-발현 플라스미드 pX459-hSpCas9-2A-Puro의 벡터 맵(vector map)이다.

도 17은 pX459-hSpCas9-2A-Puro. 플라스미드에서 U6 프로모터에 대한 gRNA(예로서 g1을 사용함)의 위치를 나타낸다. U6 프로모터와 gRNA 사이의 "G" 뉴클레오타이드는 U6 프로모터에 의해 유도되는 전사 효율을 향상시키기 위한 것이다. 이는 상이한 프로모터가 사용되거나 gRNA가 "G" 뉴클레오타이드로 시작하는 경우 선택적이며, 필 수적이지 않다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

[0480]

본 발명을 다음의 실시예에서 추가로 설명되며, 이는 본 발명의 범위 또는 청구범위를 제한하지 않는다.

[0481]

이 연구는 희귀 망막 질환을 앓고 있는 환자와 가족이 설립하고 주도하는 생명공학 회사인 Reflection Biotechnologies Limited("ReflectionBio")에 의해 시작, 설계, 조직 및 후원되었다. 희귀 질환 환자는 인류가 피할 수 없는 유전자 돌연변이를 가지지만, 종종 사회에서 무시되고 공공 재원에 의해 지원받지 못하고 있다. ReflectionBio는 환자-중심의 생명공학 회사로서, 환자들이 힘을 모아 희귀 질환 및 다른 까다로운 질환에 대한 과학 및 의료 R&D를 추진하는데 있어서 더욱 적극적인 역할을 하는 '환자에 의한, 환자를 위한' 접근 방식을 적용한다.

[0482]

BCD로 진단되고, 상이한 이중-대립형질 CYP4V2 돌연변이(예를 들어, 동형접합성(homozygous) CYP4V2 돌연변이 또는 화합물 이형접합성(heterozygous) CYP4V2 돌연변이를 포함)를 가지는 환자를 본 연구에 포함시켰다. 특히, 한명의 환자(본원에서 환자 1, P1 또는 RB001으로 지칭됨)는 동형접합성 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는다. c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 62개의 아미노산을 암호화 엑손 7의 프레임 내 결실을 초래한다. c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 BCD 환자 중에서 가장 흔한 돌연변이이다. 환자 2(P2 또는 RB002)는 화합물 이형접합성 CYP4V2 돌연변이를 가지며, 각각의 돌연변이는 525개-아미노산 길이의 CYP4V2 단백질에서 단 하나의 아미노산 변화를 야기하는 단일 뉴클레오타이드 변화이다.

[0483]

사전 동의를 얻었다. 절차는 헬싱키 선언 가이드라인(Declaration of Helsinki guideline)을 따르고, 기관 검토위원회(Institutional Review Board)에 의해 승인되었다.

[0484]

BCD 인간 세포 질환 모델 실시예

[0485]

임상적으로, BCD는 RPE 위축과 관련되어 있으며, 이는 궁극적으로 광수용체 사멸 및 시력 상실을 유발한다. 따라서, BCD를 연구하고 BCD에 대한 치료법을 개발하기 위해 인간 RPE 모델을 생성하고 사용하는 것이 중요하다.

[0486]

실시예 1-BCD 환자로부터 유래되는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)의 생성 및 특성화

[0487]

연구에서, 유전자 비통합 방법(integration-free)을 사용하여 BCD 환자로부터 iPSC를 생성하였다. iPSC 재프로그래밍에 사용된 전통적인 기술(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스)은 표적 세포의 게놈에 통합된다. 생성된 iPSC 및 이러한 iPSC로부터 분화된 세포는 외부 DNA를 함유할 것이며, 세포 치료요법 및 약물 개발 응용에 사용하기에는 안전하지 않고 문제가 있을 수 있다. 더욱이, 통합이 게놈의 중요 영역에서 발생하여 관련이 없는 발달 과정에 문제를 일으킬 수 있다. 전통적인 재프로그래밍 방법과 비교하여, 비통합 재프로그래밍 방법은 검출 가능한 벡터 및 이식유전자를 함유하지 않는 iPSC를 생성하므로, 이들을 세포 치료요법 및 약물 발견 응용에 더욱

[0488]

적합하다.

- [0489] 연구에서, 2개의 상이한 비통합 재프로그래밍 방법을 BCD 환자로부터 iPSC를 생성하는데 사용하였으며, 하나는 센다이 바이러스를 그리고 다른 하나는 에피솜 벡터를 사용하였다. 2개의 상이한 유형의 샘플을 사용하였으며, 하나는 피부 샘플(피부 섬유아세포)이고 그리고 다른 하나는 혈액 샘플(말초 혈액 단핵 세포(PBMC))이다. 피부, 혈액, 또는 소변 및 모발 샘플과 같은 다른 샘플로부터 BCD 환자-특이적 iPSC를 생성하는데 어느 하나의 방법을 사용할 수 있었다.
- [0490] A. 피부 샘플로부터 iPSC 재프로그래밍
- [0491] 피부 생검을 BCD 환자에서 수행하고, 인간 섬유아세포를 생검으로부터 획득하였다. 그 후 BCD 환자-특이적 섬유아세포 세포를 숙주 계능을 변경시킬 위험이 없는 비삽입형(footprint-free) RNA 바이러스인 센다이 바이러스를 사용하여 iPS 세포주로 재프로그래밍하였다. 렌티 바이러스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 벡터 또한 iPS 재프로그래밍에 사용할 수 있으나, 숙주 세포의 계능내로 통합될 위험이 있다. BCD 환자로부터 유래되는 iPS 세포의 사진에 대해서는 도 1을 참조한다. 야생형(또는 대조군) iPS 세포주를 생성하기 위해 건강한 개체로부터의 섬유아세포 또한 동일한 방법으로 재프로그래밍하였다.
- [0492] iPSC를 생성하기 위해, 5×10^4 개의 섬유아세포를 도말(plated)하고, 세포가 부착되어 약 70% 내지 80% 컨플루언트(confluent)할 때까지 12-웰 플레이트에서 배양(약 12 시간)하였다. 배양 배지를 제거하고, 세포를 500 μ l의 섬유아세포 배양 배지 중 5:5:3:5의 MOI로 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc(CytoTune™-iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트(Sendai Reprogramming Kit), A16517, Life Technologies)를 발현하는 센다이 바이러스를 사용하여 형질감염시켰다. 세포를 37°C 및 5% CO₂ 에서 밤새 항온처리한 후, 바이러스-함유 배지를 제거하고, KO-DMEM 배지(KnockOut DMEM, 15 % 녹아웃(KnockOut) 혈청 대체물, 1 L-글루타민, 1 비필수 아미노산, 1 페니실린-스트렙토마이신, 0.1 mM \hat{a} -머캅토에탄올, 기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF) 10 ng/ml)로 교체하였다. 형질감염된 세포를 약 7일 동안 매일 배지를 바꿔주면서 항온처리하였다.
- [0493] 형질감염된 세포를 PBS로 세척하고, 트립신(예를 들어, 4분 동안 37°C에서 TrypLE Express)에 노출시키고, 10 μ M ROCK 억제제를 함유하는 2 ml의 KO-DMEM 배지에 재현탁시켰다. 그후에 세포를 미토마이신-C-처리된 MEF 피더(feeder) 층에 도말하고, 37°C 및 5% CO₂로 되돌렸다. 24시간 후 및 그 후 매일, 배지를 제거하고 KO-DMEM 배지(ROCK 억제제를 포함하지 않음)로 교체하였다. 콜로니(colony)는 계대(passage) 후 7 내지 14일에 보였다. 각각의 iPS 콜로니를 약 100-150개 세포의 덩어리(chunk)로 미세박리시킨(microdissected) 후, 10 μ M ROCK 억제제가 들어있는 KO-DMEM 배지로 간단히 처리한 후, 다시 1주 동안 37°C 및 5% CO₂ KO-DMEM 배지에서 다시 배양하였다.
- [0494] 만능성 마커의 1 차 항체를 사용하여 iPSC 특성화를 수행하였다: OCT4 산타 크루즈(Santa Cruz) sc-9081 토끼 폴리, SOX2 R&D 시스템즈 245610 마우스 IgG, TRA-1-60 Millipore(Chemicon) MAB4381, 마우스, IgM, SSEA4 밀리포어(Millipore)(Chemicon) MAB4304 마우스 IgG, Nanog R&D 시스템즈 AF1997 염소 폴리. 전형적으로 마커를 사용한 특성화를 위해, 세포를 세척하고, 차단(예를 들어, 3% 혈청 및 0.1% 트립톤 X를 사용)하고, 1차 항체(1:200)에 노출시키고, 실온에서 2 내지 3 시간 동안 항온처리하였다. 세포를 다시 세척하고, 2차 항체에 노출시키고, 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 이후에, 세포를 핵 염색하였다(예를 들어, PBST 중 1:10000 Dapi를 사용).
- [0495] BCD 환자의 섬유아세포로부터 생성된 iPSCs, 및 Oct-4, Sox-2, SSEA-4, Nanog 및 Tra-1-60 마커에 의한 특성화는 도 1(a)를 참조한다.
- [0496] B. 혈액 샘플로부터 iPSC 재프로그래밍
- [0497] 피부 생검 샘플 이외에, iPSC를 BCD 환자 및 건강한 대조군으로부터의 혈액 샘플로부터 생성하였다. iPSC는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 에피솜 방법을 사용하여 생성하였다. 프로토콜을 하기와 같이 기술된다.
- [0498] T 세포 활성화:
- [0499] a) 동결된 PBMC를 해동시키고, 약 5천만개의 살아있는 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 다이내비드(Dynabead)(인간 T 활성화인자, CD3/CD28, Thermo Fisher, Cat#11132D)를 사용하여 T 세포 활성화시켰다.

- [0500] b) 활성화된 T 세포를 이후 혈액 세포 배양 배지에서 10 내지 14일 동안 증식시켰다.
- [0501] 재프로그램:
- [0502] a) iPSC 세포주를 생성하기 위해, 활성화된 T 세포를 다이내비드로부터 분리하고, 에피솜 iPSC 재프로그램 벡터 (제품 번호 A14703, Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 전기천공시켰다.
- [0503] b) 2 세트의 전기천공된 세포를 CF1 MEF 피더(제품 번호: ASF-1213, Applied StemCell, 미국 캘리포니아주 밀피타스 소재)로 예비-배양된 2 세트의 35mm 디쉬에 도달하였다. 세포에 인간 iPSC 성장 배지를 매일 공급하였다.
- [0504] c) 2-3주 후, 인간 ESC-유사 iPSC 콜로니를 고르고, 증식시키기 위해 매트릭스-젤(matri-gel) 코팅된 24-웰 플레이트로 옮겼다.
- [0505] d) 그 후, 환자-특이적 인간 iPSC 세포주를 동결보존 전에 충분한 세포수가 얻어질 때까지 2-3회 이상의 계대 동안 인간 iPSC 피더-프리 성장 배지(mTeSRTM1, 제품 번호 05850, Stem Cell Technologies Inc., 캐나다 밴쿠버 소재)의 매트릭스(Corning 제품 번호 354277) 상에서 성장시키고 계대시켰다.
- [0506] 알칼리 포스파타아제:
- [0507] a) 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 염색을 위해, iPSC를 고정시킨 후 알칼리 포스파타아제 염색 용액(Naphthol/fast red violet, Sigma)으로 염색하였다.
- [0508] b) 세포 이미지를 올림푸스 현미경(IX51, Olympus, 일본 도쿄도 소재)을 사용하여 캡처하였다.
- [0509] BCD 환자 및 건강한 대조군의 혈액 샘플의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 생성된 iPSCs의 위상차(phase contrast) 이미지 및 AP 염색 결과에 대해서는 도 1(b)을 참조한다.
- [0510] 명백하게 정상적인 인간 핵형을 나타내는 BCD 환자-유래 iPSC 핵형 이미지에 대해서는 도 1(c)를 참조한다.
- [0511] **실시예 2-BCD 환자의 iPSC의 망막 색소 상피(RPE) 세포로의 분화**
- [0512] iPSC 분화는 BCD 환자 및 건강한 대조군의 모든 iPSC 세포주에 대해 3 내지 6회 계대에서 시작되었다. 분화를 위해, iPSC 콜로니를 녹-아웃(KO) DMEM(Thermo Fisher Scientific, 10829018), 15% KO 혈청 대체물(Thermo Fisher Scientific, 10829028), 1% 비-필수 아미노산(Thermo Fisher Scientific, 11140050), 2 mmol/L 글루타민(Thermo Fisher Scientific, 35050061), 50 U/ml 페니실린-스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific, 10378016) 및 10 mmol/L 니코틴아미드(Sigma-Aldrich, N0636)로 이루어지는 분화 배지의 1:50 희석된 매트릭스(CORNING, 356230)로 전처리된 6-웰 배양 디쉬(Costar, Corning, 뉴욕주 코닝 소재)에서 처음 14일 동안 컨플루언스되도록 배양하였다. 분화 15 내지 28일 동안, 분화 배지에 100 ng/ml의 인간 액티빈-A(PeproTech, 120-14)를 보충하였다. 29일째로부터, 분화가 완료될 때까지 액티빈-A를 제거하였다. 8 내지 10주 후, 착색된 클러스터가 형성되었고, 수동으로 선별하여 매트릭스-코팅된 디쉬 상에 도달하였다. 이들 세포를 MEM(알파 변형, Sigma-Aldrich, M-4526)-기반 RPE 배지에 유지시켰으며, 이는 N1 보충물(500 ml의 배지당 5 ml), 타우린(500 ml의 배지당 125 mg), 하이드로코르티손(500 ml의 배지당 10 µg), 트리오오도-티로닌(500 ml의 배지당 0.0065 µg)(모두 Sigma-Aldrich로부터 입수), 2 mmol/L 글루타민, 50 U/ml 페니실린-스트렙토마이신, 1% 비-필수 아미노산 및 5% 태아 송아지 혈청(모두 GIBCO-BRL로부터 입수)를 함유하였다. 세포를 기능적 분석을 위한 기능적 단일층을 형성할 수 있도록 다시 6 내지 8주 동안 배양하였다.
- [0513] BCD 환자의 iPSC로부터 분화된 RPE 세포를 광학 현미경 하에서 관찰하였으며, 뚜렷한 RPE 색소 및 육각형 세포 형태가 관찰되었다(도 2를 참조). 형태학적 차이 이외에, BCD 환자로부터의 iPSC-유래 RPE 세포를 RPE-특이적 마커, RPE65, CRALBP 및 MITF의 존재에 의해서도 확인하였다. RPE-특이적 마커, RPE65, CRALBP 및 MITF의 존재를 나타내는 BCD 환자의 iPSC-RPE 세포의 RPE 마커 결과에 대해서는 도 2(b)를 참조한다.
- [0514] 다수의 프로토콜을 사용하여 iPSC를 RPE 세포로 분화시켰다. 본원에 기술된 RPE 분화 프로토콜은 일반적으로 3개월 이상 걸리는 연장된 프로토콜이다. 다른 프로토콜은 예를 들어, 2개월 미만으로 시간이 덜 걸린다. 더 짧고 연장된 프로토콜 둘 다 iPSC를 RPE 세포로 분화시킬 수 있지만, 다른 프로토콜에 의해 생성된 iPSC-RPE 세포 사이에 종양 형성 위험의 관점에서 차이가 있을 수 있다. iPSC 분화와 관련된 종양 형성의 위험은 프로토콜의 후반에서 미분화되거나 완전히 분화되지 않고 남아있는 iPSC 세포의 일부에 기인하며, 연장된 프로토콜은 iPSC가

성숙 RPE 세포로 완전히 분화되기 때문에 중앙 형성의 결여에 기여할 가능성이 있다. 생화학적 및 기타 분석과 기능적 연구를 위해 생성된 iPS-PRE 세포주의 순도를 보장하고, 자가 이식을 포함하지만 이에 한정되지 않는 세포 치료요법을 위한 iPSC-RPE 세포의 안전성을 지원하기 위해 장기 프로토콜을 사용하였다.

[0515] 실시예 3 -BCD 세포 모델 및 CYP4V2 기능 연구를 위한 생화학적 세포 생존능 및 기타 검정

[0516] 지질 검정:

[0517] BCD 및 CYP4V2 효소의 기능에 대한 이전의 연구는 지방산에 초점을 맞추었다. 이 연구에서는, 지방산뿐만 아니라 세라마이드(Cer), 스펡고마이엘린(SM) 및 스펡고신과 스펡가닌(SOSA)을 포함하는 더 많은 지질검정을 사용하여 BCD 질환 모델에서 생화학적 이상/표현형을 분석하고, CYP4V2 단백질의 생화학적 기능을 분석하였다.

[0518] 유리 지방산(FFA), 세라마이드(Cer), 스펡고마이엘린(SM), 및 스펡고신과 스펡가닌(SOSA)의 생화학적 검정을 관련 검정 및 프로토콜에 기초하여 콜롬비아 대학(미국 뉴욕주 뉴욕 소재)의 바이오 마커 코어 실험실(Biomarker Core Laboratory)에서 수행하였다.

[0519] 유리 지방산(FFA), 세라마이드, 스펡고신 및 스펡가닌을 클로로포름:메탄올을 사용하여 추출하였다. 요약하면, 약 1백만 개의 iPS-RPE 세포를 150 μ L의 물에 균질화시켰다. 100 μ L의 균질물을 내부 표준물질(팔미트산-D31, C12 세라마이드, C25 세라마이드, C17 스펡고신, C17 스펡가닌)을 함유하는 3 mL의 클로로포름:메탄올(v:v=2:1)과 혼합하였다. 샘플을 잘 볼텍싱하고, 0.5 mL의 물을 첨가하여 상 분리되도록 하였다. 혼합물을 다시 볼텍싱하고, 4°C에서 10분 동안 3,000 g에서 원심분리하였다. 하부 유기 상을 파스퇴르 피펫을 사용하여 제2의 깨끗한 유리 튜브로 옮겼다. 2 mL의 클로로포름을 잔류 수성 상에 첨가한 후, 볼텍싱 혼합하고 다시 원심분리하여 임의의 잔류 지질을 추출하였다. 하부 유기 상을 모으고(pooled), 37°C 질소 하에 증발시켰다. 추출된 지질을 50 μ L의 메탄올:아세트니트릴(v:v=1:1)에서 재구성하고, 주사용 LC 자가샘플러 바이알로 옮겼다. 스펡고마이엘린 또한 다른 지질과 마찬가지로 클로로포름:메탄올로 추출되었지만, 스펡고마이엘린의 샘플 준비를 위해 2 μ L의 세포 균질액만 두었다. 모든 검정을 Waters Xevo TQ MS ACQUITY UPLC 시스템(Waters, 미국 매사추세츠주 밀포드 소재)에서 수행하였다. FFA를 100 mm Waters ACQUITY UPLC HSS C18 컬럼으로 용리시켰다. 세라마이드, 스펡고신, 스펡가닌, 스펡고마이엘린을 100 mm Waters ACQUITY UPLC BEH 페닐 컬럼 상에서 분리하였다. FFA를 음성 SIR 방법을 사용함으로써 모니터링하고, 다른 것은 양성 MRM 획득을 사용하여 모니터링하였다.

[0520] 생화학적 검정에서 시험한 화합물의 목록은 하기 표 2에 제공된다. 본 연구에서 표준물질로서 사용하기 위해 특정 화학 화합물을 구입하였다(표 2에 주석을 단 바와 같이. Nu-Chek: Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, USA; Cayman: Cayman Chemical Company, Ann Arbor, 미국 미주리주 소재). 다른 화합물은 콜롬비아 대학(미국 뉴욕주 뉴욕 소재)의 바이오 마커 코어 실험실에서 이용 가능한 기존의 표준물질을 사용하였다. 모든 FFA는 단일 MS에 의해 검출되었지만, 다른 유형의 화합물은 MS/MS에 의해 검출되었다.

표 2: 시험 화합물 목록					
지명산 (PFA)	설명	판매회사	제품 번호	세라미드 (Cer)	설명
C12	C12:0 (라우르산)	Nur-Chek	N-12-A	C14	C14 세라미이드 (d18:1/14:0)
C13	C13:0 (트라이테칸산)	Nur-Chek	N-13-A	C16:1	C16:1 세라미이드 (d18:1/16:1)
C14:1 이성질체 1				C16	C16 세라미이드 (d18:1/16:0)
C14:1 이성질체 2				C18:1	C18:1 세라미이드 (d18:1/18:1)
C14:1 미리스탄	C14:0 (미리스탄)			C18	C18 세라미이드 (d18:1/18:0)
C15	C15:0 (펜타데칸산)	Nur-Chek	N-15-A	C20:5	C20:5 세라미이드 (d18:1/20:5)
C16:1 n7 시스	Δ 9 시스(팔미톨레산)	Nur-Chek	U-40-A	C20:4	C20:4 세라미이드 (d18:1/20:4)
C16:1 n9 시스	시스-7-헥사데칸산	Cayman	10007290	C20:1	C20:1 세라미이드 (d18:1/20:1)
C16:1 n7 트랜스	Δ 9 트랜스(팔미톨레산)	Nur-Chek	U-41-A	C20	C20 세라미이드 (d18:1/20:0)
C16 팔미탄산	C16:0 (팔미탄산)			C22:6	C22:6 세라미이드 (d18:1/22:6)
C17	C17:0 (마가르산)	Nur-Chek	N-17-A	C22:5	C22:5 세라미이드 (d18:1/22:5)
C18:3 n3 알파	C18:3n-3:(알파 리놀렌산)	Nur-Chek	U-62-A	C22:1	C22:1 세라미이드 (d18:1/22:1)
C18:3 n6 감마	C18:3n-6 (감마 리놀렌산)	Nur-Chek	U-63-A	C22	C22 세라미이드 (d18:1/22:0)
C18:2 n6 9,12 시스	Δ 9 시스,12 시스(리놀레산)	Nur-Chek	U-59-A	C24:1	C24:1 세라미이드 (d18:1/24:1)
C18:2 n6 9,12 트랜스	Δ 9 트랜스,12 트랜스(리놀레산)	Nur-Chek	U-60-A	C24	C24 세라미이드 (d18:1/24:0)
C18:1 올레산	C18:1n-9 (올레산)			C26:1	C26:1 세라미이드 (d18:1/26:1)
C18 스테아르산	C18:0 (스테아르산)			C26	C26 세라미이드 (d18:1/26:0)
C19	C19:0 (노나데칸산)	Nur-Chek	N-19-A	C28:1	C28:1 세라미이드 (d18:1/28:1)
C20:5 n3 BPA	에이코사헵타엔산(BPA)	Nur-Chek	U-99-A	C28	C28 세라미이드 (d18:1/28:0)
C20:4 n6 AA	아라키돈산(AA)	Nur-Chek	U-71-A		
C20:4 이성질체					
C20:3 n6	호모감마 리놀렌산	Nur-Chek	U-89-A	스펩고마이엘린 (SM)	
C20:3 이성질체 1				C14:1	C14:1 스펙고마이엘린 (d18:1/14:1)
C20:3 이성질체 2				C14	C14 스펙고마이엘린 (d18:1/14:0)
C20:2 n6	11-14 에이코사디엔산			C16:1	C16:1 스펙고마이엘린 (d18:1/16:1)
C20:2 이성질체		Nur-Chek	U-68-A	C16	C16 스펙고마이엘린 (d18:1/16:0)
C20:1 n9	11-에이코세산			C18:1	C18:1 스펙고마이엘린 (d18:1/18:1)
C20 아라키탄산	C20:0 (아라키탄산)	Nur-Chek	U-66-A	C18	C18 스펙고마이엘린 (d18:1/18:0)
C21	헤미코탄산			C20:5	C20:5 스펙고마이엘린 (d18:1/20:5)
C22:6 n3 DHA	도코사헵타엔산 (DHA)	Nur-Chek	N-21-A	C20:4	C20:4 스펙고마이엘린 (d18:1/20:4)
C22:5 n3 DPA	7-10-13-16-19 도코사헵타엔산	Nur-Chek	U-84-A	C20:1	C20:1 스펙고마이엘린 (d18:1/20:1)
		Nur-Chek	U-101-A	C20	C20 스펙고마이엘린 (d18:1/20:0)

[0521]

C22:5 n6	4-7-10-13-16 도코사헵타엔산	Ni-Chek	I-102-A	C22:6	C22:6 스핑고마이엘린 (d18:1/22:6)
C22:4 n6	7-10-13-16 도코사테트라엔산	Ni-Chek	I-83-A	C22:5	C22:5 스핑고마이엘린 (d18:1/22:5)
C22:1 n9	13-도코센산(ERC/C)	Ni-Chek	N-22-A	C22:1	C22:1 스핑고마이엘린 (d18:1/22:1)
C22	페렌산	Ni-Chek	N-22-A	C22	C22 스핑고마이엘린 (d18:1/22:0)
C23	트리코산산	Ni-Chek	N-23-A	C24:1	C24:1 스핑고마이엘린 (d18:1/24:1)
C24:1 n9	네르본산	Ni-Chek	I-88-A	C24	C24 스핑고마이엘린 (d18:1/24:0)
C24	리그노세르산	Ni-Chek	N-24-A	C26:1	C26:1 스핑고마이엘린 (d18:1/26:1)
C25	팜타코산산	Cayman	15197	C26	C26 스핑고마이엘린 (d18:1/26:0)
C26:1	C26:1 n9 (핵사코사엔산)	Cayman	13854	C28:1	C28:1 스핑고마이엘린 (d18:1/28:1)
C26	핵사코산산	Cayman	13854	C28	C28 스핑고마이엘린 (d18:1/28:0)
SOSA					
SO	스핑고신 (d18:1)				
SA	스핑가닌 (d18:0)				
SO-IP	스핑고신-1-포스페이트 (d18:1)				
SA-IP	스핑가닌-1-포스페이트 (d18:0)				

[0522]

[0523]

하이드록시-지방산 검정:

[0524]

또한, LC-MS/MS를 사용하여 iPS-RPE 세포에서 16-HEPE, 17-HEPE, 18-HEPE, 19-HEPE, 20-HEPE, 17-HDHA, 18-HDHA, 19-HDHA, 20-HDHA, 21-HDHA, 22-HDHA, 19(20)-EpDPA(공식 명칭: (±)19,20-에폭시-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-도코사헵타엔산, (±)19,20 EDP로도 알려져 있음, (±)19,20-에폭시 도코사헵타엔산, (±)19,20-에폭시 DPA, (±)19,20-EpDPE) 및 19(20)-DiHDPA(공식명칭: (±)19,20-하이드록시-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-도코사헵타엔산, (±)19,20-DiHDpE로도 알려져 있음)를 포함하는, 하이드록시 지방산을 검출하였다. HDHA 화합물은 DHA의 하이드록시-대사산물이고, HEPE 화합물은 각각 EPA의 하이드록시-대사산물이다. 19(20)-EpDPA는 DHA의 ω-3 이중 결합의 에폭시화를 통해 유도되는 DHA 에폭시계나야제 대사산물이다. 19(20)-DiHDPA는 또한 DHA의 대사산물이다. DHA는 중요한 지방산이며, 뇌와 망막에서 가장 풍부한 ω-3 지방산이다. 이전 연구에 따르면 CYP4V2가 ω-3 지방산, 특히 DHA에 대한 하이드록실라아제인 것으로 나타났다.

[0525]

물질: 하이드록시-지방산 표준물질 (±)18-HEPE(품목 번호 32840), (±)20-HDHA(품목 번호 33750), (±)19(20)-EpDPA(품목 번호 10175) 및 (±)19(20)-DiHDPA(품목 번호 10007001)는 Cayman Chemical Company(미

국 미주리주 안 아르버 소재)로부터 구입하였다. 내부 표준 중수소화 팔미트산(C16-D31 지방산)은 C/D/N Isotopes Inc.(캐나다 퀘벡 #D-2002 소재)로부터 구입하였다.

[0526] 상기 기술된 LC-MS 또는 LC-MS/MS 방법 이외에, 연구에서 시험된 화학종 및 화합물은 또한 다른 방법을 사용함으로써 검출 및/또는 정량화될 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, 메틸화 전-처리된 FFA에 대한 GC-MS 또는 GC-MS/MS 방법이 있다. Cer 및 SM의 경우, FIA-MS/MS 또는 GC-MS/MS를 사용할 수 있다.

[0527] 세포 생존능 검정:

[0528] 청색 광 노출: iPS-RPE 세포를 3.5cm 디쉬 및 4-웰 챔버(well chamber) 디쉬에 시딩(seeding)하였다. 2개월 후, 이들을 10 µg/ml 글루코즈를 함유하는 PBS(+)에서 1.5mW/cm²에서 1시간 동안 430±20 nm(청색) 광에 노출시켰다. 모든 세포주에 대해 동일한 시딩 밀도를 사용하였다. 청색 광 노출 후, 처리된 세포에 신선한 RPE 배지를 공급하고, 5% CO₂ 및 37°C의 인큐베이터에서 밤새 회수하였다.

[0529] 1 시간 이외에, 더 짧거나 더 긴 광 노출 기간, 예를 들어 노출 없음, 30분, 45분, 75분, 90분 또는 120분 등을 사용할 수 있다. 유사하게는, 다른 파장 또는 더 넓은 스펙트럼의 광에 대한 노출을 또한 사용할 수 있다. 더욱이, 상이한 배양일(예를 들어, RPE 배양에서 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 6개월)의 iPS-RPE 샘플을 사용하여, 예를 들어 노화의 영향을 연구할 수 있다.

[0530] 세포 생존능 검정: 살아있는/건강한 세포를 세포-투과성 염료 칼세인 AM(Thermo Fisher Scientific, 제품 번호: C3099, USA)에 의해 3 µmol/ml PBS(+)의 최종 농도(각각의 3.5cm 디쉬에 대해 1 ml 또는 각각의 챔버에 대해 200 µl)로 표지하고, 죽은/병든 세포를 프로피디움 요오다이드(PI)(Thermo Fisher Scientific, 제품 번호: P3566, USA)로 2 µg/ml PBS(+)의 최종 농도(각각의 3.5cm 디쉬에 대해 1 ml 또는 각각의 챔버에 대해 200 µl)로 실온에서 1시간 동안 표지하였다. PI는 DNA에 결합하고 살아있는 세포에 침투하지 않기 때문에, 이는 일반적으로 집단에서 죽은 세포를 검출하는데 사용된다. 이후에, PBS(-)로 세척한 후, 세포 형광 수준을 관찰하고, 20 배율로 형광 도립 현미경(Nikon Eclipse Ts2R)으로 사진을 찍었다. 사진을 ImageJ(Fiji)로 처리한 후, 죽은/생존 세포 비율을 계산하였다.

[0531] 생화학적 검정 및 세포 생존능 시험 이외에, 식세포 활성(phagocytic activity), 상피통과 저항성(transsepithelial resistance)과 같은 RPE 기능 시험을 BCD 환자 iPS-RPE 세포에서 수행하였다.

[0532] CYP4V2 발현:

[0533] 실험을 수행하여 대조군 및 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포에서 CYP4V2 발현 수준을 검출하고 비교하였다. 세포 주에서의 CYP4V2 발현은 항-CYP4V2 항체(웨스턴 블롯(Western Blot)) 또는 정량적 PCR에 의해 평가할 수 있다.

[0534] CYP4V2 웨스턴 블롯: 각각의 iPS-RPE 샘플로부터의 45 µg의 전 세포 단백질을 7.5% SDS 페이지 겔(page gel)에 러닝한 후, 막으로 습식 이동(wet transfer)시켰다. 막을 실온에서 1시간 동안 PBST 중 5% BSA로 차단한 후, 5% BSA 중 1:1000 농도의 1차 항체(토끼에서 생산된 항-CYP4V2, Sigma Aldrich 제품 번호: SAB 1410565, USA)와 함께 4°C에서 밤새 항온처리하였다. PBST로 3 x 10분 동안 세척하였다. 이후에 막을 4°C에서 4시간 동안 5% BSA 중 1:3000 농도의 2차 항체 염소 항-토끼 IgG HRP(Santa Cruz 제품 번호: sc-2004, USA)와 함께 항온처리하였다. PBST를 사용하여 3x10분 동안 최종 세척하였다. GAPDH를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0535] CYP4V2 웨스턴 블롯은 대조군의 iPS-RPE 샘플에서 CYP4V2 단백질 발현을 검출하였으나, BCD 환자 iPS-RPE 샘플에서는 검출하지 않았다. AAV.CYP4V2에 의한 처리 후, CYP4V2 단백질은 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 샘플에서 검출되었다.

[0536] 실시간 PCR 및 상대적 mRNA 정량화: 건강한 대조군(WT)의 iPS-RPE, BCD 환자의 iPS-RPE, BCD 환자의 AAV.CYP4V2 처리된 iPS-RPE 샘플을 수거하고, TRIZOL 시약(Invitrogen)으로 용해하였다. 총 RNA를 제조사의 설명서에 따라 분리하였다. 그 후 DNase I(Invitrogen) 처리를 수행하여 게놈 DNA 오염을 방지하였다. Superscript III 역 전사 키트로 역 전사 반응을 수행하고, 무작위 헥사머(Invitrogen)를 사용하여 cDNA를 생성하였다. StepOne 실시간 PCR 시스템(Invitrogen)이 장착된 Maxima SYBR Green/ROX qPCR 마스터 믹스(Master Mix)(Fisher Scientific)을 사용하여 실시간 PCR 방법을 수행하여, 유전자 발현 수준을 정량화하였다(38회 사이클). CYP4V2 엑손 7 영역 및 CYP4V2op 각각에 대해 특이적인 프라이머를 사용하였다. 액틴은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로서 사용하였다.

[0537] 결과: 정량적 PCR을 수행하여 iPS-RPE 세포 샘플에서 CYP4V2 및 CYP4V2op의 발현을 시험하였다. CYP4V2 및

CYP4V2op의 전사 수준을 각각 환자 샘플 및 대조군 샘플로 정규화하였다. CYP4V2의 경우, 모든 비-환자 대조군 샘플은 환자 샘플에서 CYP4V2 발현 수준보다 수백 배 높은, 유사한 수준의 CYP4V2를 발현하였다. AAV.CYP4V2 치료 후, 환자 샘플 CYP4V2 발현 수준은 비-환자 대조군 샘플에 필적하는 수준으로 백배 이상 증가하였다(도 3). CYP4V2op의 경우, 모든 AAV-처리된 샘플은 비-처리된 샘플과 비교하여 훨씬 높은 수준을 나타내었다(도 4). 이러한 결과는 AAV 벡터가 CYP4V2 cDNA를 BCD 환자의 iPS-RPE 세포로 전달할 수 있고, 발현 카세트가 유전자를 발현할 수 있음을 입증하였다.

[0538] 실시예 4-BCD 세포 모델에서의 표현형 및 CYP4V2 기능에 있어서의 발견

[0539] 지질 시험 결과:

[0540] BCD 세포 모델(예를 들어, BCD 환자 iPS-RPE 세포)에 존재하는 생화학적 결함/이상(즉, 표현형)을 결정하기 위하여, 실시예 3에 기술된 생화학적 검정을 사용하여 건강한 대조군으로부터 유래되는 iPS-RPE 세포와 비교하여, BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포에서의 지방산, 세라마이드, 스펅고마이엘린, 스펅고신, 스펅가닌 및 하이드록시-지방산을 검출하고 정량화하였다.

[0541] 시험하기 전에, 세포를 다음과 같이 수거하였다. BCD 환자로부터 유래된 대략 1백만개의 iPS-RPE 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 플라스틱 세포 리프터(lifter)로 디쉬로부터 박리하고, 1 ml의 피펫을 사용하여 1.5 ml의 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 시험 전에 에펜도르프 튜브를 -80°C 냉동고에 넣었다. 건강한 대조군 iPS-RPE 세포를 동일한 방법으로 수거하였다. 생화학적 검정 결과를 하기 표 3에 나타내었다:

총 지방산의 mol %	표 3 지방산 시험 결과							
	WT	P1	PI AAV2.op	P2	P2 AAV2tri.op	P2 AAV2.op	P2 AAV8.fv	P2 scAAV1.op
C12	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%
C13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C14:1 이성질체 1	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
C14:1 이성질체 2	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
C14 미리스트산	1.0%	0.6%	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	0.8%	1.1%
C15	1.3%	0.5%	0.7%	0.5%	0.5%	0.6%	0.6%	0.7%
C16:1 n7 시스	2.7%	2.4%	1.7%	2.3%	2.9%	2.9%	2.8%	3.8%
C16:1 n9 시스	0.9%	0.9%	0.8%	1.0%	1.0%	1.1%	1.2%	1.6%
C16:1 n7 트랜스	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.4%	0.5%	0.4%
C16 팔미트산	20.3%	14.2%	12.7%	14.8%	17.0%	17.2%	17.9%	17.4%
C17	1.1%	0.5%	0.8%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.4%
C18:3 n3 알파	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C18:3 n6 감마	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
C18:2 n6 9,12 시스	1.6%	1.1%	0.9%	0.9%	0.9%	1.0%	1.0%	1.3%
C18:2 n6 9,12 트랜스	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
C18:1 n9 올레산	22.2%	20.9%	19.0%	18.5%	19.4%	20.8%	19.7%	28.6%
C18 스테아르산	26.3%	17.9%	24.2%	19.4%	16.5%	16.6%	17.7%	14.4%
C19	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
C20:5 n3 EPA	0.8%	1.9%	1.3%	1.9%	1.6%	1.7%	1.4%	1.6%
C20:4 n6 AA	5.4%	15.2%	13.3%	14.7%	14.2%	13.2%	13.0%	7.9%
C20:4 이성질체	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C20:3 n6	0.6%	0.8%	0.8%	0.9%	0.8%	0.9%	0.8%	0.6%
C20:3 이성질체 1	0.1%	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.3%	0.1%
C20:3 이성질체 2	3.8%	6.0%	5.5%	5.1%	5.5%	4.1%	4.2%	3.0%
C20:2 n6	0.4%	0.4%	0.5%	0.3%	0.4%	0.3%	0.4%	0.6%
C20:2 이성질체	0.6%	0.6%	0.8%	0.7%	0.8%	0.7%	0.7%	0.9%
C20:1 n9	3.7%	2.9%	2.7%	2.7%	3.6%	3.4%	3.3%	6.1%
C20 아라키드산	0.8%	0.5%	0.5%	0.5%	0.6%	0.6%	0.5%	0.5%
C21	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

[0542]

C22:6 n3 DHA	2.2%	6.1%	5.6%	7.2%	6.2%	6.5%	6.5%	4.1%
C22:5 n3 DPA	1.0%	2.0%	2.4%	2.8%	2.1%	2.6%	2.1%	1.7%
C22:5 n6	0.1%	0.4%	0.5%	0.4%	0.3%	0.3%	0.4%	0.2%
C22:4 n6	0.7%	1.3%	1.7%	1.4%	1.4%	1.3%	1.3%	1.0%
C22:1 n9	0.5%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.9%
C22	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%
C23	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C24:1 n9	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.3%
C24	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%
C25	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C26:1	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%
C26	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
합계	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
총 n-3 지방산	4.0%	10.0%	9.4%	11.5%	9.9%	10.8%	10.1%	7.4%

표 3에 대한 주석:

WT: 야생형 대조군 iPS-RPE. P1: 환자 1 iPS-RPE. P2: 환자 2 iPS-RPE.

치료되지 않은 환자 및 AAV 처리된 샘플은 배양 날짜 및 클론 세포주와 일치하였다.

P1 AAV2.op 및 P2 AAV2.op 샘플은 AAV2.CYP4V2op(1 일째 MOI: 5×10^4 GC/세포)로 처리하고 처리 10 일 후 수거하였다. P2 AAV8.fv 샘플은 AAV8.CYP4V2fv(1 일째 MOI: 2×10^5 GC/세포)로 처리하고 처리 10 일 후 수거하였다. P2 scAAV1.op 샘플은 scAAV1.CYP4V2op(1 일째 MOI: 2×10^5 GC/세포)로 처리하고 처리 4 일 후 수거하였다.

[0543]

[0544]

결과는 BCD 환자 iPS-RPE 세포 샘플이 대조군과는 상이한 지방산 프로파일을 가짐을 보여주었다. 특히, BCD 환자 샘플은 대조군의 것보다 훨씬 더 높은 수준의 DHA(22:6 n3) 및 총 오메가-3(ω -3, 또는 n3) 지방산(C18:3 n3 알파, C20:5 n3 EPA, C22:6 n3 DHA 및 C22:5 n3 DPA의 합)을 갖는다. 이는 CYP4V2가 오메가-3 지방산 대사에 영향을 준다는 이전 연구로부터의 제안을 확인하였다.

[0545]

놀랍게도, n3 지방산 수준의 이상 이외에, BCD 환자 iPS-RPE 세포는 또한 더 높은 수준의 C20:4 n6(아라키돈산, 또는 AA)을 나타내었다. BCD와 관련된 선행 연구에서 비정상적인 AA 수준은 보고되지 않았다.

[0546]

흥미롭게도, BCD 환자의 혈청에서 지방산 수준을 시험한 선행 연구에서는 n3 지방산(DHA 포함) 및 n6 지방산(AA 포함)의 이상이 발견되지 않았다. BCD 환자 iPS-RPE 세포 및 혈청의 상이한 지방산 프로파일은 CYP4V2의 기능이 비-망막 또는 비-RPE 세포에서 다른 CYP4 효소로 대체되고, CYP4V2가 RPE 세포에서 비교적 발현 수준이 높은 유일한 CYP4 효소인 것을 제외하고는 이들 중 다수가 CYP4V2와 함께 다른 기관 및 조직에서 발현된다는 가설을 뒷받침한다.

- [0547] 지방산 이외에, BCD 환자 iPS-RPE 세포는 다른 화합물 또는 화합물 부류에서 표현형을 가질 수 있다. 스펅고마 이엘린, 세라마이드, 스펅고신과 스펅가닌, 및 지질 신호전달을 포함하는 코르티코스테로이드, 스펅고지질 및 인지질을 포함하지만 이에 한정되지 않은 다른 화합물 부류에서 표현형을 스크리닝 하기 위해 실험을 수행하였다. 또한, 동위 원소 추적 시험 및 단백질 분석(proteomic analysis)(예를 들어, 질량 분광법-기반 단백질 분석)을 BCD 환자의 iPS-RPE 세포에서 수행하였다.
- [0548] 또한, 선행 연구는 CYP4V2가 ω -3 지방산(DHA 및 EPA) 하이드록실라제라는 것을 발견하였다. 흥미롭게도, 실시예 3에 기술된 하이드록시-DHA 또는 하이드록시-EPA는 LC-MS/MS를 사용하여 건강한 대조군 또는 BCD 환자의 iPS-RPE 세포에서 검출되지 않았다. CYP4V2 효소 기능은 살아있는 세포 대(vs.) 선행 연구에서 수행된 살아있는 세포 외부의 화학 반응에서 상이하거나, 하이드록시-지방산은 살아 있는 세포에서 다른 화합물 또는 형태로 빠르게 전환되는 중간체이거나, 또는 하이드록시 지방산은 샘플이 매우 다량의 세포를 함유하는 경우에만 검출될 수 있는 극미량 수준일 수 있다.
- [0549] 세포 생존능 검정 결과:
- [0550] 임상적으로, BCD는 RPE 위축과 관련되어 있으며, 이로 인해 광수용체 사멸 및 시력 손실이 발생한다. 세포 생존능 검정(상기 실시예 3에 기술된 바와 같음)은 BCD 환자의 iPS-RPE 세포 샘플에서 RPE 위축을 나타내었다. 대조군 및 BCD 환자의 iPS-RPE 샘플간 세포 생존능 비교에 대해서는 도 5 및 6을 참조한다(도 5 - 청색 광에 노출되지 않음; 도 6 - 청색 광에 1시간 노출 후).
- [0551] 중요하게는, 이들 이미지는 다음과 같이 밝혀졌다:
- [0552] (1) 빛에 노출된 후, BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 샘플(P1 및 P2)에서 대조군의 것(WT1 및 WT2)보다 훨씬 높은 수준의 상당한 수준의 세포 사멸이 나타났다(도 6을 참조). 예를 들어, P1 iPS-RPE의 죽은/살아있는 세포 비율은 WT2 iPS-RPE의 경우 3.0%와 비교하여, 20.87%이었다. BCD의 임상 표현형인, RPE 위축은 BCD 세포 모델에서 명백하였다.
- [0553] (2) 상이한 수준의 RPE 위축이 BCD P1과 P2 iPS-RPE 샘플 사이에서 관찰되었다. P1 iPS-RPE는 P2 iPS-RPE보다 높은 세포 사멸 수준을 나타내었다.
- [0554] (3) 청색 광 노출 없이도, BCD 환자 iPS-RPE 샘플(P1)은 RPE 위축을 나타내었다(도 5).
- [0555] BCD 환자는 질환 발병 연령 및 진행이 크게 다르다. BCD 발병은 10대 초반에서 30대 또는 심지어 30대 이후까지 이고; 30대 내지 60대 동안에 법적 시각 상실을 초래한다. 또한, 동일한 CYP4V2 돌연변이를 갖는 BCD 형제자매 환자는 질환 발병 연령 및 진행에 있어서 물질적 차이를 가질 수 있다. 이전에는, 이러한 차이점에 대한 설명이 없었다. 상이한 BCD 환자의 iPS-RPE 샘플 사이의 RPE 위축 수준의 차이는 BCD 환자 사이의 질환 발병 및 진행에 있어서의 차이에 대한 세포 수준에서의 지침을 제공한다.
- [0556] BCD의 임상 표현형(즉, RPE 위축)을 포함하는 다수의 표현형(생화학적(예를 들어, 지질) 이상과 같은 분자-수준 표현형, 세포 생존능과 같은 세포-수준 표현형) 이 본 연구의 BCD 세포 모델에서 발견되었다.
- [0557] **실시예 5-약물 후보물질 및 투여량 범위를 스크리닝하고, BCD 및 CYP4V2 기능을 연구하고, 세포 치료요법에서 환자-특이적 반응을 평가하기 위한 BCD 대상체로부터의 iPS 및 iPS-RPE 세포의 용도**
- [0558] BCD 질환 인간 세포 모델로서, BCD 환자로부터의 iPS 및 iPS-RPE 세포는 BCD 및 CYP4V2 기능을 연구하고(예를 들어, 상기 실시예 3 및 4를 참조); 및 BCD 및 관련 질환에 대한 약물 후보물질 및 투여량 범위를 스크리닝(본원의 실시예를 참조)하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 광범위한 적용을 갖는다.
- [0559] BCD 세포 모델(예를 들어, 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주 또는 iPS-RPE 세포주)을 사용하기 위한 방법 및 실시예가 본원의 실시예에 상세히 기술되어 있으며, 이는 유전자 치료요법 및 세포 치료요법에서 BCD 세포 모델의 사용과 관련되어 있다. 유전자 치료요법을 시험하고 세포 치료요법을 위한 세포 기반으로, 이러한 BCD 세포 모델은 다른 치료제(예를 들어, 약물 후보물질) 및 이들의 투여량, 제형 및 벡터(바이러스 또는 비-바이러스성 벡터) 또는 BCD, IRD 또는 RP를 치료하기 위한 장치 또는 전달 메커니즘의 효율 및/또는 안전성을 본원의 실시예에 상세히 기술된 바와 유사한 방식으로 스크리닝하고 시험할 수 있다.
- [0560] BCD 세포 모델의 사용시, 치료제의 효능은 이러한 치료제에 의한 치료 전 및 치료 후 상기 실시예 3 및 4 및 본원의 다른 실시예에 기술된 다양한 중 및 RPE 위축에서 화합물의 수준을 비교함으로써 평가할 수 있으며, 이들

화합물의 수준의 이상 여부 및 BCD 세포 모델에서 RPE 위축이 치료 후 개선되는지의 여부를 평가할 수 있다. 유사하게는, 치료제의 상이한 용량, 제형(예를 들어, 화학 화합물을 위한 제형, 활성 약제학적 성분, 또는 유전자 치료요법을 위한 벡터 유형 및/또는 캡시드, 또는 유전자 편집을 위한 벡터 유형) 또는 주요 구조체(예를 들어, 유전자 치료 발현 카세트내 프로모터 또는 다른 조절 서열)를 BCD 세포 모델을 사용하여 비교할 수 있다. 또한, BCD 세포 모델을 사용하여 치료제를 안구 세포로 전달하거나 형질도입 또는 형질감염 효율을 개선시키는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 의학 장치 또는 방법의 효능을 시험할 수 있다. 처리된 세포를 처리되지 않은 세포 또는 화합물에 대해 노출하기 전 동일한 세포와 비교할 수 있다는 것은 이해될 것이다. 상이한 투여량을 사용하여 효과적인 투여량 범위(세포당, 1백만개 세포 또는 50만개 세포 등으로 측정 등)를 결정할 수 있다. 건강한 대조군의 RPE 또는 iPS-RPE 세포와 비교하여 BCD 환자의 iPS-RPE 세포(치료 후 대 치료 없이)에서, 상기 실시예 3 및 4에 언급된 지방산의 상이한 화합물과 다른 화합물 및 RPE 위축의 수준과 관련된 데이터를 비교하여, 치료 효과 및 유효 투여량 범위를 평가할 수 있다.

[0561] 또한, BCD 환자-특이적 iPS 세포주, iPS-RPE 세포주 및 다른 iPS-유래 세포주를 사용하여 치료제, 용량 또는 장치에 대한 이러한 환자의 개별 반응을 평가하였다. 환자-특이적 iPS 세포, iPS-RPE 세포 및 다른 iPS-유래 세포는 면역 반응(예를 들어, 세포 면역성, RPE 면역성), 유전형(예를 들어, 상이한 반응을 초래할 수 있는 환자간의 상이한 돌연변이)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 각각의 환자에 특이적인 특성(trait)을 갖는다. 이러한 적용을 사용하여 개별화된 치료제(예를 들어, 상이한 AAV 벡터 혈청형 또는 캡시드 돌연변이) 또는 동일한 질환의 상이한 환자에 대해 개인화된 최적의 투여량을 개발하고 스크리닝할 수 있다. 이러한 접근법은 안질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 질환을 위해 사용될 수 있다.

[0562] BCD 환자-특이적 iPS-RPE는 BCD 환자에서 개인차를 나타내었으므로, 이를 사용하여 개별화된 최적 투여량을 평가하고, 개별화된 의약품을 개발할 수 있다. 예를 들어, 하기 유전자 치료요법 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 동일한 용량의 1x10⁵ MOI에서, AAV2.CYP4V2op는 P1과 P2의 iPS-RPE 사이에서 RPE 위축의 상이한 구조 수준(즉, 상이한 효능 수준)을 달성하였다. 이는 BCD 세포 모델이 동물 모델보다 유리하다.

[0563] BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포(즉, BCD 세포 모델)는 생체 내(예를 들어, GC 또는 gp)에서 사용하기 위한 유전자 치료요법 벡터의 용량 수준에 이르도록, 시험관 내 BCD 세포 모델에서 결정된 최적의 용량 수준(예를 들어, 시험관 내 유전자 치료요법에 대한 MOI로 나타냄)에 생체 내 치료를 위해 표적화된 안구 세포(예를 들어, RPE 세포)의 추정된 수를 곱함으로써 생체 내 치료를 위한 치료학적 유효 투여량을 평가하거나 제안하는데 사용될 수 있다. 이러한 벡터 용량 수준은 승수(예를 들어, 1 내지 10(예를 들어, 망막하 주사의 경우 1 내지 5 또는 유리체내 주사의 경우 5 내지 10; 적용될 승수에 영향을 미치는 다른 인자는 표적화된 영역의 크기, 및 치료될 대상체(예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 체중, 질환의 발달 단계 및 상태, 및 잠재적인 면역 반응(즉, 기존의 NAb); 치료를 위해 표적화된 세포의 위치 및 밀도)에 의해 조정되어 생체내 치료를 위한 치료학적 유효 용량 범위를 제안하며, 이는 임상 시험에 의해 확인되거나 추가로 개선될 수 있다. 이러한 방법을 또한 사용하여 개별 환자에 대한 생체 내 치료를 위한 개별화된 최적 용량을 평가하거나 제안할 수 있다.

[0564] **실시예 6—인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 BCD 세포 모델**

[0565] BCD는 희귀 질환이므로, 환자 샘플을 수득하기 어려울 수 있다. 이러한 곤란성을 극복하기 위하여, BCD 세포 모델을 CRISPR과 같은 유전자 편집 기술을 사용하여 배아 줄기(ES) 세포주 또는 BCD를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 iPS 세포와 같은 비-BCD 환자 세포의 CYP4V2 유전자에 인위적인 돌연변이를 만듦으로써 생성시킬 수 있다.

[0566] 예를 들어, 본원의 실시예에 입증된 바와 같이, sgRNA 1, sgRNA 2, sgRNA 3, sgRNA 4 또는 sgRNA 5(각각의 sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3, sgRNA4 및 sgRNA5에서의 프로토스페이서 요소 서열에 대해서는 각각 서열번호 48 내지 52를 참조; IVT sgRNA에 대한 추가의 서열에 대해서는 서열번호 55 및 59를 참조)를 SpCas9 단백질과 함께 사용하여, BCD 환자 중에서 가장 흔한 CYP4V2 돌연변이인, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 함유하는 BCD 환자의 게놈 DNA에서 CYP4V2 유전자 영역의 절단을 생성하였다. 이들 중에서, sgRNA 3, sgRNA 4, d sgRNA 5는 c.802-8_810del17insGC 돌연변이 서열에 대해 특이적이지 않으므로, 건강한 세포(예를 들어, CYP4V2 돌연변이를 포함하지 않는 ES 또는 iPSC)의 CYP4V2 유전자에서 이중 가닥 DNA 절단(DSB)을 생성할 수 있다. 특히, 형질감염 후, sgRNA 4 및 Cas9는 CYP4V2 유전자의 엑손 7에서 DSB생성할 수 있으며, 이는 DNA가 세포에서 비-동종 말단 결합(non-homologous end joining: NHEJ)을 통해 복구되는 경우, 엑손 7에 돌연변이(하나 또는 두 개의 대립형질)를 일으킬 수 있으며, 예를 들어 NHEJ의해 생성된 삽입-결실 오류는 프레임쉬프트 돌연변이를 일으킬 수 있다. 그 결과, 일부 세포는 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 가질 수 있으며, BCD 세포 질환 모델로서 사용될 수 있거나 또는 BCD 세포 모델을 생성하는데 사용될 수 있다(예를 들어, ES 또는 iPS 세포를 RPE 세포로 분

화시켜 CYP4V2 돌연변이 함유 ES-RPE 또는 iPS-RPE 세포를 생성할 수 있음). 유사하게는, CYP4V2 유전자의 상이한 영역에서 DSB를 생성하도록 설계된 두 세트의 gRNA를 사용하여 CYP4V2 유전자에 거대한 결실 또는 녹아웃 돌연변이를 생성하거나 세포에서 전체 CYP4V2 유전자를 녹아웃시킴으로써 CYP4V2 돌연변이(들)를 함유하는 BCD 세포 모델을 생성할 수 있다. CRISPR 시스템을 사용하여 표적 서열을 절단하고/하거나 교정하는 방법, 및 결과를 확인하는 방법에 대한 보다 상세한 논의는 본원의 실시예 및 개시내용에 제공되어 있다.

[0567] 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 이러한 BCD 세포 모델은 BCD 및 CYP4V2 기능을 연구할뿐만 아니라, 약물 후보물질을 시험하고 비교하고, 투여량 범위를 결정하고, 의약 장치 또는 전달 방법을 시험하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 본원에 논의된 것과 같은 관련 적용에서 BCD 환자-특이적 세포 모델을 모방하는데 사용될 수 있다.

[0568] 동일한 방법을 사용하여 표 4에 제시된 하나 이상의 유전자(들)에서의 돌연변이 또는 유전자 결함과 관련된 것을 포함하는, 안구 또는 다른 질환에 대한 인위적으로 생성된 돌연변이를 갖는 세포 질환 모델을 생성할 수 있다.

[0569] **실시예 7-안질환에 대한 동질유전자(isogenic) 대조군의 생성 및 사용**

[0570] 돌연변이-교정된 동질유전자 환자-특이적 iPS 세포주 및/또는 이로부터 유래되는 다른 세포주(예를 들어, iPS-RPE 세포, iPS-RPC, iPS-CEC, iPS-CE 세포 또는 다른 iPS-안구 세포)가 질환 및/또는 특이적인 돌연변이 또는 결함이 있는 유전자의 영향을 연구하는데 있어서 동질유전자 대조군으로서 사용될 수 있다. ES 또는 다른 개체로부터 유래되는 통상의 대조군(예를 들어, 세포주, 예를 들어 ES-RPR 또는 iPS-RPE 세포주)은 질환 관련 유전자의 차이 외에 환자로부터의 유전적 차이를 포함하는 개별적인 차이를 갖는다. 본 실시예는 대조군과 이로부터 야기되는 "배경 노이즈(background noise)" 사이의 개별적인 차이를 제거하는 방법을 제공한다. 이는 돌연변이를 갖는 동일한 환자의 세포주와 비교하기 위해 환자로부터 돌연변이-교정된 동질유전자 대조군을 생성하고 사용하는 단계를 포함한다. 동일한 환자로부터 유래되는 환자-특이적 질환 모델 및 돌연변이-교정된 동질유전자 대조군은 어떠한 개별적인 차이도 가지지 않으므로, 이들을 분석하고 비교하여 환자의 돌연변이 또는 결함이 있는 유전자와 관련된 표현형, 생화학적 이상, 및 다른 구조적 및 기능적 결함을 확인할 수 있다. 돌연변이-교정된 동질유전자 대조군은 CRISPR, ZFN 및 TALEN을 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자-편집 기술을 사용하여 생성할 수 있다. CRISPR 유전자 편집을 사용하여 BCD 환자 중에서 가장 흔한 돌연변이인 c.802-8_810del117insGC 돌연변이를 교정하여, BCD 환자로부터 동질유전자 대조군을 생성하는 방법에 대한 구체적인 예가 본원의 실시예에 제공된다. 다른 안질환에 대한 동질유전자 대조군을 생성하기 위해 동일한 접근법을 사용할 수 있다. 동질유전자 대조군은 통상의 대조군보다 현저한 이점을 가지며, 미묘한 표현형(예를 들어, 연령-관련 황반 변성(AMD))을 갖는 안질환을 연구하는데 있어서 필수적이다. 또한, 동질유전자 대조군은 유전적 위험 인자, 교정된 돌연변이 또는 유전자 중 각각 하나를 갖는 동질유전자 대조군을 생성함으로써 안질환에서 다수의 유전적 위험 인자, 돌연변이 및/또는 다수의 유전자의 영향 차이를 비교하고 확인하며, 표 4에 제시된 하나 이상의 유전자(들)에서의 돌연변이 또는 유전적 결함과 관련된 것들을 포함하는 안구 및 다른 질환에서의 관련 위험 인자, 돌연변이 또는 유전자의 영향을 결정하기 위해 이러한 동질유전자형 대조군을 질환 모델과 비교하는데 사용될 수 있다.

[0571] 동질유전자 대조군은 유전적 돌연변이 및/또는 관련된 결함이 있는 단백질과 관련된 표현형, 생화학적 이상, 및 다른 구조적 및 기능적 결함을 확인하기 위해 환자-특이적 세포 질환 모델과 비교하는데 사용될 수 있다. 환자 세포주와 대조군 사이의 생화학적 이상/표현형을 확인하기 위해, 지질학(lipidomics), 단백질학 및 동위원소 추적 생물-검정을 포함하지만 이에 한정되지 않는 방법에 대한 특정의 비 제한적인 예 및 논의가 상기 실시예 3 및 4에서 본원에 제공된다.

[0572] **BCD 인간 세포 질환 모델에 대한 논의**

[0573] BCD가 희귀 질환임을 고려하여, 생검을 통해 BCD 환자로부터 인간 RPE 세포를 나타내는 질환을 얻는 것은 불가능하다. 생존 가능한 BCD 인간 질환 모델의 결여는 연구 대상체로서 비-BCD 질환 유발 세포(예를 들어, 눈의 일부가 아닌 섬유아세포 및 림프구) 및 BCD 환자로부터의 혈청을 사용하는 것으로 BCD에 대한 사전 연구를 제한하였다. 이들 연구로부터의 결과는 지방산 동화작용을 중심으로 이루어졌다.

[0574] 본원에 기술된 연구에서, BCD 환자로부터 유래되는 iPS 세포주를 성공적으로 생성하고 이용하여 환자-특이적 BCD 질환 RPE 세포를 생성하였으며, 이는 시험관 내에서 BCD 질환 표현형을 보유한다. BCD 표현형은 BCD에 영향을 받는 주요 세포인 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포에서 직접 확인되었다. 본 연구 이전에, 부분적으로 BCD와

관련된 지방산 동화작용으로 인해 iPS 세포주 및 iPS-RPE 세포주가 성공적으로 생성될 수는지 여부는 알려지지 않았다.

- [0575] 생화학적 시험은 BCD 환자로부터의 iPS-RPE 세포는 이전 BCD 환자에서 보고되지 않은 세포를 포함하는 건강한 대조군의 iPS-RPE 세포에 비해 비정상적인 지방산 수준을 나타내었다. BCD 질환-특이적 iPS-RPE 세포의 시험관 내 표현형은 CYP4V2에 의해 조절되는 경로 및 BCD의 발병에 대한 더 많은 통찰력을 제공하고, BCD의 발병 및 CYP4V2 단백질의 기능에 대한 매우 유용한 통찰력을 제공하고, 또한 실행 가능하고 강력한 BCD 인간 질환 모델로서 BCD 환자로부터의 iPS-RPE 세포주의 사용을 추가로 뒷받침한다.
- [0576] BCD 환자로부터의 iPS 세포주, iPS-RPE 세포주 및 다른 iPS-안구 세포주는 약물 스크리닝, 신규 치료제의 개발 또는 투여량 범위의 결정을 위한 용도뿐만 아니라, 세포 치료요법에서의 용도와 같은 추가의 적용을 갖는다.
- [0577] BCD 환자-특이적 iPS, iPS-RPE 및 다른 iPS-안구 세포주 이외에, BCD 인간 질환 세포 모델은 유전자 편집을 통해 개발되어 ES 세포주, iPS 세포주 및 RPE 세포주를 포함하지만 이에 한정되지 않는 비-BCD 개체의 ES 세포 또는 iPS 세포로부터 유래되는 다른 세포주에서 병리학적 CYP4V2 돌연변이를 생성할 수 있다.
- [0578] 또한, 안질환에 대한 동질유전자 대조군을 생성하는 방법이 제공된다. 동질유전자 대조군은 환자-특이적 질환 모델과는 개인차가 없다. 따라서, 동질유전자 대조군은 종래의 대조군에 비해 안질환을 연구하는데 유리하다.

[0579] **CYP4V2 유전자 치료요법**

[0580] **실시예 8 - 인간 CYP4V2 단백질 및 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 cDNA**

- [0581] 3개의 cDNA를 본 연구에 사용하였다. 서열번호 1에 나타낸 서열을 갖는 cDNA (본원에서 CYP4V2st로 지칭함) 및 서열번호 2에 나타낸 서열을 갖는 cDNA (본원에서 CYP4V2op로서 지칭함) 둘 다는 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4에 나타낸 아미노산 서열, NP_997235.3)을 암호화한다. 서열번호 3에 나타낸 서열을 갖는 cDNA(본원에서 CYP4V2fv로 지칭함)는 인간 CYP4V2 단백질의 기능적 변이체 (서열번호 5에 나타낸 아미노산 서열)를 암호화한다.
- [0582] 서열번호 5는 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)의 기능적 변이체의 아미노산 서열이다. 두 단백질 모두(서열번호 4 및 서열번호 5) 본원에 정의된 바와 같은 기능적 CYP4V2 단백질이다. 서열번호 5에 나타낸 기능적 CYP4V2 단백질은 서열번호 4에 나타낸 인간 CYP4V2 단백질로부터 하나의 아미노산 변화를 갖는다. 기능적 CYP4V2 단백질(서열번호 5)을 암호화하는 서열번호 3에 나타낸 cDNA는 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 서열번호 1에 나타낸 cDNA로부터 2개의 뉴클레오타이드 차이를 갖는다. 서열번호 2에 나타낸 코돈-최적화된 cDNA 및 서열번호 1에 나타낸 cDNA 둘 다는 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하며 77%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0583] CYP4V2 fv-op 서열은 서열번호 1과 3 사이에 1 또는 2개의 뉴클레오타이드 차이를 보유하는 것을 제외하고, CYP4V2op(서열번호 2)의 cDNA 서열을 포함하는 서열번호 5의 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 코돈-최적화된 cDNA(CYP4V2fv-op)가 본원에 제공된다.
- [0584] CYP4V2op 및 CYP4V2fv-op 이외에, 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질(예를 들어, 서열번호 4 내지 29 중 임의의 것)을 암호화하는 다른 코돈-최적화된 cDNA 또는 핵산 서열은 본원의 개시내용에 기술된 방법으로 생성될 수 있다. 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4) 또는 기능적 CYP4V2 단백질(서열번호 5, 또는 서열번호 6 내지 29 중 임의의 것)을 암호화하는 코돈-최적화된 핵산 분자는 BCD를 치료하기 위한 이의 발현 효율 및/또는 구조 기능을 결정하고/하거나 확인하기 위해, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주(또는 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 RPE 세포)에서 시험될 수 있다. 이러한 시험은 단백질 발현(예를 들어, 그것이 암호화하는 기능적 CYP4V2 단백질에 특이적인 웨스턴 블롯), 관련 유전자 발현, 및/또는 조성물(예를 들어, 발현 카세트 및/또는 벡터)에 의한 BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주에서 생화학적 이상 및 RPE 위축을 구조하는 효능을 검출하기 위한 PCR 및 본원에 제공된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0585] 서열번호 1(CYP4V2st cDNA, 1578 bp)

[0586] ATGGCGGGCTCTGGCTGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGAGTGCCTTCCCTGGCCGGCCAGTCTGGTCTGAGCCTGCTG CAGAGGGTGGCGAGCTACGCGGAAATGGCAGCAGATGCGGCCATCCCACGGTGGCCGCGCCTACCCACTGGTGGCCACGCGCTGCTGATGAAGCCG GACGGGCGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTTAGTACACAGAGGAATACGCCACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGGTCGGGCCAGTGCCTATGGTGGCCCTT TATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAATGACAAAATCTCTATGTACAAGTTTTTGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTT ACAAGTACTGAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACCCACTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCA

AATATATTGGTTAAGAACTTAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTTAACTGCTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCT
ATGGGGAAGAATATTGGTGTCTCAAAGTAATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAATAAAGATGCCCTGG
CTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAGCCTTCAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTATCGTGAACGG
GCCAATGAAATGAACCCAATGAAGACTGTAGAGGTGATGGCAGGGCTCTGCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTACTTGTCTTTAAGTGTG
ACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACAGTGCAGTGAATAAAGTGG
TCCTTATACCTGTTGGTCTAACCCAGAAGTCCAGAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAGAC
CTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCTTCGCCTTTTTCTTCTGTTCCTTTATTTGCCGTAGTGTAGTGAAGATTGTGAAGTG
GCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCATGAAGCCGTCATATTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCAGCCTGAG
CGGTTCTTCCCAGAAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGAACTGTATAGGTCAAAAGTTTGTGTGATGGAA
GAAAAGACCATCTTTCGTGCATCCTGAGGCACCTTTGGATAGAATCCAACCCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGT
AATGGCATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAAAATGCAGATGAACGCTAA

[0587] 서열번호 2(CYP4V2op cDNA, 1578 bp)

[0588] ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTCCTGGCTGGGGCTTCACTGGTGTGCTGAGCCTGCTG
CAGAGGGTGGCCTCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGATGAGGCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGTGATGAAGCCT
GACGGCAGAGAGTTCTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTG
TACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGTCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCCGAGCCTTGGCTGGGCCTGGGCTGCTG
ACCTCTACAGGCAACAAGTGGAGGAGCCGGAGAAGATGCTGACCCCAACATCCACTTTACAATCCTGGAGGACTTCTGGACATCATGAACAGCAGGCC
AATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGCCTTTAATTGCTCTTTTACATCACCTGTGCGCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCT
ATGGGCAAGAATCATCGCGCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCATCAAGATGCCCTGG
CTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAGAAGTCCCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATGCCGAGAGA
GCCAATGAGATGAACCCAATGAGGACTGTAGGGCGATGGAAGGGCAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGAGAGCCTTCTGGACCTGTGCTGAGCGTG
ACCGACGATGAGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGTGGATACATTCATGTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCCATCAACTGG
TCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTCCGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGGAT
CTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCGTGATCAAGGAGACACTGCGCTGTTCCTCTGTGCTCTGTTTGCCCGTCCGTGCTGAGGACTGTGAGGTG
GCCGGTATCGCGTGTGAAGGGCACCGAGGCCGTGATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCCAGAGGAGTTTACGCCAGAG
AGATTCTTCCCAGAAATGCCAGGGCAGGCACCTTACGCCTATGTGCCATTTCCGCCGACCAAGGAAGTGCATCGGACAGAAGTTTCCCGTGTGAGGAG
GAGAAAACCATCTGTCTGTATCCTGAGACACTTCTGGATCGAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCTGCGGCCAAGC
AACGGCATCTGGATCAAACCTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTTAA

[0589] 서열번호 3(CYP4V2fv cDNA, 1578 bp)

[0590] ATGGCGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGAGTGCCTTTCCCTGGCCGGCCAGTCTGGTCTGAGCCTGCTG
CAGAGGGTGGCAGCTACCGCGGAAATGGCAGCAGATGCGGCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGTGATGAAGCCG
GACGGCGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACGCCACATGCCGTGCTGAAGCTCTGGGTGGGCCAGTGGCCATGGTGGCCCTT
TATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAAATGACAAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTT
ACAAGTACTGAAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACCCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCA
AATATATTGGTTAAGAACTTAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTTAACTGCTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCT
ATGGGGAAGAATATTGGTGTCTCAAAGTAATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAATAAAGATGCCCTGG
CTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAGCCTTAAAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTATCGCGAACGG
GCCAATGAAATGAACCCAATGAAGACTGTAGAGGTGATGGCAGGGCTCTGCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTACTTGTCTTTAAGTGTG
ACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACAGTGCAGTGAATAAAGTGG
TCCTTATACCTGTTGGTCTAACCCAGAAGTCCAGAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAGAC
CTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCTTCGCCTTTTTCTTCTGTTCCTTTATTTGCCGTAGTGTAGTGAAGATTGTGAAGTG
GCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCATGAAGCCGTCATATTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCAGCCTGAG
CGGTTCTTCCCAGAAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGAACTGTATAGGTCAAAAGTTTGTGTGATGGAA
GAAAAGACCATCTTTCGTGCATCCTGAGGCACCTTTGGATAGAATCCAACCCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGT
AATGGCATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAAAATGCAGATGAACGCTAA

[0591] 서열번호 4(인간 CYP4V2 단백질, NP_997235.3, 525 aa)

[0592] MAGLWLGLVWQKLLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQMRP IPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQ I IEYTEEYRHMP LLLKLVGVPVPMVAL
YNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLPEWLG LLLTSTGNKWRSRKMLTPTFHFT ILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFNCFYITLCALDI ICETA

MGKNIGAQSNDSEYVRAVYRMSEMFRRIKMPWLWDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSV
 TDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARVSSEDCEV
 AGYRVLKGTAVIIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVVPFSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPS
 NGIWIWIKLRRNADER

[0593] 서열번호 5(인간 CYP4V2 단백질의 기능적 변이체; 525 aa)

[0594] MAGLWGLVWQKLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQIEYTEEYRHMPLKLVGVPVPMVAL
 YNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLPWLGLLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFFNYITLALDIICETA
 MGKNIGAQSNDSEYVRAVYRMSEMFRRIKMPWLWDLWYLMFKEGWEHKKSLKILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSV
 TDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARVSSEDCEV
 AGYRVLKGTAVIIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVVPFSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPS
 NGIWIWIKLRRNADER

[0595] 서열번호 6(막관통 도메인이 없는 CYP4V2의 단편; 490 aa)

[0596] RVASYARKWQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQIEYTEEYRHMPLKLVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLPWLGLLLT
 STGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFFNYITLALDIICETAMGKNIGAQSNDSEYVRAVYRMSEMFRRIKMPWL
 WDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREEVDTFMFEGHDTTAAAINWS
 LYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARVSSEDCEVAGYRVLKGTAVIIPYALHRDPRYFPNPEEFQPER
 FFPENAQGRHPYAYVVPFSAGPRNCIGQKFAVMEEKTILSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIWIKLRRNADER

[0597] **실시예 9 - CYP4V2 유전자 치료요법에 대한 효율적인 발현 카세트 및 전달 벡터의 설계**

[0598] 본원에 기술된 바와 같이, 발현 카세트 및 전달 벡터는 다양한 요소를 포함한다. 결과는 상이한 설계에 기초하
 여 현저하게 달라질 수 있다. 하기 열거된 것 및 이들의 수많은 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 각각의
 중요한 요소에서의 많은 양의 옵션을 고려할 때, CYP4V2 유전자 치료요법의 성공을 위해서는 효율적인 발현 카
 세트 및 전달 벡터의 신중한 설계가 필요하다. 또한, 설계 프로세스는 질환 표현형 및 특성(예를 들어, 치료를
 위해 표적화된 세포/조직의 유형) 및 안전성(예를 들어, 독성, 면역 반응)을 고려할 필요가 있다. 마지막으로,
 정상적인 질환 모델에서 설계를 시험하고 검증해야 한다.

[0599] (a) 전달 벡터의 유형;

[0600] (b) 벡터 혈청형 및 캡시드 설계/선별;

[0601] (c) 추가 벡터 설계, 예를 들어, ssAAV 대 scAAV;

[0602] (d) cDNA 설계;

[0603] (e) 프로모터 설계/선별;

[0604] (f) 폴리A 신호 설계/선별; 및

[0605] (g) 임의의 다른 조절 서열, 예를 들어 인핸서, 또는 연결부/링커 서열.

[0606] (a)의 경우, 표적 세포(예를 들어, 인간 RPE)에서 높은 형질도입 효율을 달성하기 위하여 바이러스 벡터를 선
 별하였다. 다양한 유형의 바이러스 벡터 중에서, AAV 벡터가 그것의 안전성 프로파일로 인해 선택되었고,
 CYP4V2 암호화 핵산(예를 들어, CYP4V2 cDNA)의 크기는 AAV 벡터의 패키징 한계에 적합하다. 패키징 한계가 더
 큰 벡터, 예를 들어 HSV 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바콜로바이러스 또는 아데노바이러스 벡터 또한 CYP4V2 유전
 자 치료요법에 사용될 수 있다. 바이러스 벡터 이외에, 비-바이러스성 벡터, 예를 들어 리포좀 나노입자, 고흥
 지질 나노입자, 리포좀 프로타민/DNA 리포플렉스(lipoplex)(LPD)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 나노입자 또
 한 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용될 수 있다.

[0607] (b)의 경우, RPE 세포는 BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법에서 치료를 위해 표적화되는 1차 세포 유형이기 때
 문에, RPE 세포에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 AAV 혈청형이 바람직하다. 또한, 다음의 인자가 고려된다.
 CYP4V2의 발현은 다양한 인간 조직 및 기관, 예를 들어 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장, 췌장, 망막,
 RPE, 각막 및 림프구에서 광범위하게 관찰되었고, RPE 이외에도 BCD는 또한 맥락막, 광수용체 및 일부 환자에서
 는 각막에 영향을 미치며, BCD 환자의 피부 섬유아세포, 림프구 및 혈청에서 그 이상(abnormality)이 이전에 보
 고된 바 있으므로, RPE 세포에서만 AAV 형질도입을 제한하지 않고 다른 세포/조직, 예를 들어 광수용체, 맥락막

및/또는 각막을 형질도입할 수 있는 AAV 혈청형 및 캡시드 구조는 RPE 세포에서 양호한 형질도입 효율을 갖는 AAV 혈청형 및 캡시드 구조에 더하여 설계되고/되거나 선택될 수 있다. 그 결과, 광범위한 AAV 혈청형 및 캡시드 구조가 적합하며, 사용될 수 있다. AAV2, AAV5, AAV8, AAV1, AAV9 및 캡시드 돌연변이체 AAV 벡터(AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F))를 연구를 위해 선택하였다. 형질도입 효율 이외에, 고려되었던 다른 인자는 일반 집단에서 상이한 AAV 혈청형에 대한 기존의 NAB 및 환자간의 다른 잠재적인 개인차(다른 유형의 면역 반응(예를 들어, 세포내 면역성 또는 RPE 면역성) 또는 유전자형의 차이(예를 들어, 상이한 돌연변이)로 인한 것을 포함하지만 이에 한정되지 않음)이다. 이 설계에서, 잠재적인 면역 반응을 낮추고 다른 환자에 대한 치료 효과를 최대화하기 위해 NAB에 대한 낮은 교차-반응성을 공유하는 것을 포함하는 다수의 AAV 유형을 사용하고 시험하였다.

[0608] (c)의 경우, 전장 CYP4V2 cDNA는 1578 bp(예를 들어, 출발 및 저지 코돈)이므로, ssAAV 및 scAAV 설계 둘 다는 CYP4V2 유전자 치료요법에서 사용될 수 있다. ssAAV 및 scAAV 설계는 각각 본원에 기술된 바와 같은 자체 장단점(pros and cons)을 갖는다. ssAAV와 비교하여, scAAV 설계는 신속한 발현 및 높은 DNA 안전성을 제공한다. 그러나, 이의 패키징 한계(약 2.4 내지 2.5 kb)는 더 큰 크기 및 잠재적으로 더 활성인 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 폴리A 신호)의 사용을 제한한다. 또한, 사용되는 프로모터의 크기에 따라서, scAAV 설계는 일부 선택적 조절 서열(예를 들어, 인핸서) 없이 짧아지거나 길어질 필요가 있을 수 있다. CYP4V2 유전자 치료요법에서 사용하기 위해 ssAAV 및 scAAV 벡터 둘 다를 설계하고 생성하였다. AAV2 계통(예를 들어, AAV2 ITR(서열번호 42 및 43), 및 상기 (b)에 기술된 각각의 AAV 유형으로부터의 캡시드를 함유하는 다양한 슈도형(pseudotyped) AAV가 생성되었다. scAAV의 경우, 2개의 AAV2 ITR 중 하나가 절단/돌연변이되었다(서열번호 44).

[0609] (d)의 경우, 본원에 논의된 바와 같이, 다수의 기능적 CYP4V2 단백질이 존재한다. 또한, 다수의 핵산 서열은 동일한 단백질을 암호화할 수 있다. 3개의 cDNA를 본 연구에서 생성하였다; 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 첫 번째 것(서열번호 1, CYP4V2st로 지칭됨), 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 4)을 암호화하는 코돈-최적화된 cDNA(서열번호 2, CYP4V2op로 지칭됨)인 두 번째 것, 및 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 5)의 기능적 변이체를 암호화하는 세 번째 것(서열번호 3, CYP4V2fv로 지칭됨). 코작 서열(서열번호 37 또는 38에 나타난 예시적인 서열)을 cDNA 출발 코돈 앞에 삽입하였다.

[0610] (e)의 경우, (b)의 이론적 근거와 유사하게, 프로모터는 표적 세포(예를 들어, 치료를 위한 표적 세포 유형이 RPE인 경우 RPE 세포, 표적 세포 유형이 각막 세포인 경우 각막 세포)에서 발현을 유도하기 위해 잘 작동하여야 한다. 프로모터는 유전자 치료요법 벡터의 발현 카세트내 주요 요소이다. 최적의 프로모터 선택은 표적 특이성 및 유전자 발현을 향상시킬 수 있다. 치료에 대해 표적화된 세포 또는 조직 유형(들)에 따라, CYP4V2 유전자 치료요법에 사용된 프로모터는 구성적 프로모터 또는 세포-특이적 프로모터(예를 들어, RPE 세포에 대해 특이적인 프로모터, RPE 및 광수용체 둘 다에 대해 특이적인 프로모터, RPE 세포 및 맥락막 세포에 대해 특이적인 프로모터, RPE, 광수용체 및 맥락막 세포에 대해 특이적인 프로모터, 각막 세포에 대해 특이적인 프로모터, RPE, 광수용체, 맥락막, 및 각막 세포에 대해 특이적인 프로모터, 또는 안구 세포에 대해 특이적인 프로모터)일 수 있다. CYP4V2는 거의 편재적으로 발현되고, 다수의 세포 유형이 BCD(주요 세포 유형은 RPE이고, 다른 세포 유형은 예를 들어, 각막, 망막, 림프구를 포함)에 영향을 미치기 때문에, 다수의 조직 및 세포 유형에서 발현 카세트 및 전달 벡터의 효과를 넓히기 위해, 이 설계에서 구성적 프로모터를 선택하였다. ssAAV 벡터에 사용된 발현 카세트의 경우, 강력한 구성적 프로모터, 즉 ~1.7 kb 길이인 CAG 프로모터(서열번호 32 에 나타난 예시적인 서열)가 사용되었다. CAG 프로모터(CBA, CAGGS 또는 CB 프로모터로도 알려져 있음)은 강력한 합성 프로모터이다. CAG 프로모터는 다음의 조절 요소로 구성된다: (C) 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소; (A) 닭 베타-액틴 유전자의 프로모터 영역 및 제1의 엑손, 및 닭 베타-액틴 유전자 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 키메라 인트론, 및 (G) 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체. CAG 프로모터는 포유동물 세포에서 발현을 유도하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 구성적 프로모터인, CMV 프로모터(서열번호 40 에 나타난 예시적인 서열)보다 더 강력하고 오래 지속되는 활성을 가지기 때문에 사용되었다. scAAV 벡터에 사용된 발현 카세트의 경우, scAAV의 패키징 크기 제한으로 인하여, 훨씬 더 짧은 구성적 프로모터인 연장 인자 1 알파 짧은(EFS) 프로모터(서열번호 35 에 나타난 예시적인 서열)를 사용하였다. EFS 프로모터는 EF-1 알파 프로모터의 소형화된 버전이다(~1.2 Kb, 서열번호 41 에 나타난 예시적인 서열). EF-1 알파 프로모터는 인간 연장 인자-1 알파(EF-1 α)로부터 유래되는 구성적 프로모터이다. EFS 프로모터는 또한 ssAAV용 발현 카세트 설계에 사용될 수 있다. CAG 프로모터, CMV 프로모터, EF1 알파 프로모터 및 EFS 프로모터 이외에 다른 구성적 프로모터가 사용될 수 있으며, CMV 프로모터와 같은 다른 바이러스 프로모터, smCBA 프로모터, CB^{SB} 프로모터 또는 CBh 프로모터와 같은 CAG의 유도체 또는 변이체(CBA, CAGGS 또는 CB 프로모터로도 알려져 있음), 인간 베타 액틴 프로모터와 같은 다른 베타-액틴 프로모터, EF-1 알파 프로모터의 유도체 또는 변이체, PGK 프로모터, UBC 프로모터, GUSB 프로모터, UCOE 프로모터 또

는 본원에 기술된 다른 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 또한, RPE에서 발현을 유도하기 위해 본원에 기술된 안구 세포-특이적 프로모터, 예를 들어 VMD2(BEST1로도 알려져 있음) 프로모터 또는 RPE65 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 세포-특이적 프로모터가 사용될 수 있다.

- [0611] (f)의 경우, ssAAV에 사용되는 발현 카세트 설계를 위해 bGH 폴리A가 사용되었으며(서열번호 34에 나타낸 예시적인 서열), scAAV에서 사용되는 발현 카세트 설계를 위해 짧은 Poly A 신호, 작은 poly A(SPA)(서열번호 36에 나타낸 예시적인 서열)가 사용되었다. SPA는 또한 ssAAV를 위한 발현 카세트에서도 사용될 수 있다. SV40 폴리A 신호, SV40 레이트 폴리A 신호(서열번호: 39에 나타낸 예시적인 서열)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 polyA 신호(유도체 또는 변이체 포함), 또는 상류 인핸서(upstream enhancer, USE)와 조합하여 사용되는 폴리A 신호를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 폴리A 신호가 대신 사용될 수 있다.
- [0612] (g)의 경우, WPRE 인핸서는 ssAAV에 사용되는 발현 카세트 설계를 위해 사용되었다(서열번호 33에 나타낸 예시적인 서열). scAAV에 사용되는 발현 카세트 설계의 경우, 크기 제한을 고려할 때, 인핸서는 포함되지 않았다. 인핸서는 ssAAV 및 scAAV CYP4V2 발현 카세트 둘 다에서 선택적임에 유의하여야 한다. 그러나, scAAV CYP4V2 발현 카세트에 짧은 길이의 인핸서 서열, 예를 들어 WPRE의 최소의 감마 및 알파 요소를 함유하는 짧아진 WPRE와, 작은 크기의 프로모터 및 폴리A 신호를 포함시키는 것이 가능하다는 점에 유의하여야 한다. WPRE이외에, 본원에 기술된 바와 같은 HPRE 인핸서 또는 CTE 인핸서와 같은 다른 인핸서가 사용될 수 있다.
- [0613] 일부 예에서, CYP4V2 발현 카세트는 프로모터(예를 들어, CAG (CBA, CAGGS, CB로도 알려져 있음) 프로모터, EF-1 알파 프로모터, smCBA 프로모터, CBh 프로모터, EFS 프로모터, 인간 베타-액틴 프로모터, CMV 프로모터, VMD2 프로모터 또는 RPE65 프로모터), 인핸서 서열(예를 들어, WPRE 인핸서, HPRE 인핸서 또는 단축된 WPRE 또는 HPRE 인핸서)에 작동 가능하게 연결된 기능적 CYP4V2 단백질 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, 인간 CYP4V2 단백질 또는 이의 기능적 변이체 또는 단편을 암호화하는 cDNA) 및 폴리A 신호(예를 들어, bGH 폴리A, SPA, 또는 SV40 폴리A, 또는 이의 단편 또는 유도체, 예를 들어 SV40 레이트 폴리A), 및 다른 조절 서열(예를 들어, 코작 서열)을 포함한다. 예시적인 서열에 대한 서열번호 1 내지 41을 참조.
- [0614] (i) 서열 섹션에 제공된 다양한 조절 서열의 예시적인 서열은 본질적으로 예시적이고, 동일하거나 유사한 기능을 달성할 수 있는 이들 조절 서열의 상이한 버전이 있으며, (ii) 또한 사용될 수 있는 이들 서열의 상이한 변이체, 단편 및/또는 유도체, 예를 들어, 절단된 CAG 프로모터, 단축된 WPRE 인핸서, SV40 레이트 폴리A가 존재한다는 것이 이해될 것이다.
- [0615] 상기 기술된 설계 접근법에 기초하여, 다음을 포함하는 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용하기 위한 다수의 CYP4V2 cDNA, CYP4V2 발현 카세트 및 rAAV 벡터를 생성하였다:
- [0616] (1) 서열번호 1, 2 및 3 각각에 나타낸 바와 같은 3개의 CYP4V2 cDNA, CYP4V2st(서열번호 1) 및 CYP4V2op(서열번호 2) 둘 다 인간 CYP4V2 단백질을(서열번호 4)을 암호화한다. CYP4V2fv(서열번호 3)는 인간 CYP4V2 단백질(서열번호 5)의 기능적 변이체를 암호화한다;
- [0617] (2) 2개의 CYP4V2 발현 카세트(CYP4V2는 인간 CYP4V2 단백질 또는 기능적 CYP4V2 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다. 개략적인 도면에 대해 도 7을 참조):
- [0618] (i) CAG-CYP4V2-WPRE-bGH 폴리A
- [0619] (ii) EFS-CYP4V2-SPA
- [0620] (3) 상기 언급된 CYP4V2 cDNA 및 CYP4V2 발현 카세트를 6개의 상이한 AAV 벡터(AAV2, AAV5, AAV8, AAV1, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F) 및 AAV9) 내로 패키징하여 CYP4V2 cDNA, 및 ssAAV와 scAAV 벡터 구조체 둘 다를 포함하는 발현 카세트 하기 rAAV 벡터를 생성하였다:
- [0621] (i) 재조합 AAV2/2-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGH 폴리A(본원에서 AAV2.CYP4V2op로 지칭됨),
- [0622] (ii) 재조합 AAV2/2 (Y444F+Y500F+Y730F)-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGH 폴리A(본원에서 AAV2tri(Y-F).CYP4V2op 또는 AAV2tri.CYP4V2op로 지칭됨),
- [0623] (iii) 재조합 AAV2/5-CAG-CYP4V2op-WPRE-bGH 폴리A(본원에서 AAV5.CYP4V2op로 지칭됨),
- [0624] (iv) 재조합 AAV2/5-CAG-CYP4V2st-WPRE-bGH 폴리A(본원에서 AAV5.CYP4V2st로 지칭됨),
- [0625] (v) 재조합 AAV2/8-CAG-CYP4V2fv-WPRE-bGH 폴리A(본원에서 AAV8.CYP4V2fv로 지칭됨),

- [0626] (vi) 재조합 자가-상보적 AAV2/1-EFS-CYP4V2op-SPA(본원에서 scAAV1.CYP4V2op로 지칭됨),
- [0627] (vii) 재조합 자가-상보적 AAV2/5-EFS-CYP4V2op-SPA(본원에서 scAAV5.CYP4V2op로 지칭됨), 및
- [0628] (viii) 재조합 자가-상보적 AAV2/9-EFS-CYP4V2op-SPA(본원에서 scAAV9.CYP4V2op로 지칭됨).
- [0629] rAAV 벡터 내로 패키징하는 경우, 발현 카세트는 2개의 AAV2 ITR(서열번호 42 및 43)에 의해 플랭킹되었다. scAAV의 경우, AAV2 ITR 중 하나가 절단/돌연변이되었다(서열번호 44). 비-AAV2 ITR을 포함하는 비-AAV2 계놈은 발현 카세트를 패키징하는데 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 코작 서열(서열번호 37 또는 38)는 CYP4V2 cDNA의 바로 앞에 삽입되었다. 이들 발현 카세트의 설계를 나타내는 도 7을 참조한다. CYP4V2 cDNA는 상이한 발현 카세트 내에 패키징될 수 있고, CYP4V2 발현 카세트는 상이한 AAV 벡터 내에 패키징될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, CYP4V2op cDNA는 CAG-CYP4V2-WPRE-bGH 폴리A 발현 카세트 및 EFS-CYP4V2-SPA 발현 카세트 둘다에서 사용될 수 있다. CAG-CYP4V2-WPRE-bGH 폴리A 발현 카세트 또는 EFS-CYP4V2-SPA 발현 카세트 중 어느 하나는 AAV1, AAV2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV5, AAV8, AAV8 (Y733F), AAV9, AAV6, AAV7, AAV4, AAV12, AAV-PHP.B를 포함하지만 이에 한정되지 않는 적합한 AAV 벡터 및 다른 벡터 내로 패키징될 수 있다. scAAV 설계는 재조합 scAAV 벡터, 예를 들어 scAAV1, scAAV2, scAAV2(Y444F+Y500F+Y730F), scAAV5, scAAV8, scAAV8 (Y733F), scAAV3, scAAV4, scAAV6, scAAV7, scAAV9, scAAV12 등을 생성하기 위하여 임의의 적합한 AAV 벡터에 사용될 수 있다.
- [0630] 유사한 설계 프로세스가 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 다른 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터 또는 플라스미드)를 설계하는데 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 벡터의 유형에 따라, 상기 기술된 어떤 요소는 필요하지 않을 수 있거나, 이에 따라 예를 들어 프로모터 서열은 조정될 필요가 있을 수 있다.
- [0631] 본원에 특정된 cDNA, 조절 서열 및 AAV 유형 및 설계 이외에, CYP4V2 발현 카세트 및 전달 벡터의 각 주요 요소에 대한 다른 설계 옵션 또한 사용될 수 있다. 다양한 AAV 유형의 형질도입 효율 및 표적화된 세포 유형에서의 상이한 프로모터의 강도를 비교하는 방법에 대한 예는 본원의 실시예 섹션에 제공된다. 발현 카세트 및 전달 벡터의 다른 주요 요소, 예를 들어 cDNA, 인핸서, 폴리A 신호, ssAAV 대 scAAV, AAV 대 HSV 등의 설계 옵션을 평가하고 비교하기 위해 유사한 방법이 사용될 수 있다. 또한, 본원에 제공된 바와 같이, CYP4V2 발현 카세트 및 전달 벡터의 효율은 본원에 기술된 방법 및/또는 생화학 이상, RPE 기능 또는 위축을 평가하기 위한 다른 방법을 사용하여, BCD 세포 모델, 예를 들어, BCD 환자의 iPS-RPE 세포 모델에서의 시험을 통해 평가되고 비교될 수 있다.
- [0632] 상기 기술된 CYP4V2 cDNA, 발현 카세트 및 전달 벡터를 BCD 환자-특이적 인간 iPS-RPE 세포주에서 시험하였고, 그 결과를 하기 실시예에 나타내고 논의한다.
- [0633] 또한, 다양한 조절인자 서열 사이(ITR과 프로모터 사이, 인핸서와 폴리A 신호 사이 또는 폴리A 신호와 ITR 사이를 포함하지만 이에 한정되지 않음), 또는 조절 서열과 cDNA 사이(프로모터와 cDNA 사이, cDNA와 인핸서 사이 또는 cDNA와 폴리A 신호 사이를 포함하지만 이에 한정되지 않음)의 연결부/링커 서열은 또한 표적 유전자(예를 들어, CYP4V2)의 발현을 조절하는 역할을 할 수 있다. 연구에 사용된 상이한 CYP4V2 발현 카세트(ITR 및 연결/링커 서열 포함)의 서열은 하기 실시예 11에 열거되어 있다.
- [0634] 본 실시예에서 논의된 특정 조절 서열 및 ITR 서열의 예시적인 서열은 다음과 같이 제공된다:
- [0635] 서열번호 32(CAG 프로모터, 1715 bp)
- [0636] GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGCGAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGAGGTGCGGGCGAGCCAATCAGAGCGGCGCGTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCTTCGCCCGTCCCCGCTCCGCGCGCCTCGCGCCGCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTCGTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCTGTGTGTGCTGCGGGAGCGCCGCGTGCGCCCGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGAGCGCGGGCGGGGGCGGTGCCCCGGTGCGGGGGGTGCAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCTGGGGGGTGTGAGCAGGGGTGTGGCGGGCGGGTGCGGCTGTAAC

CCCCCTGCACCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTGCCGTGCCGGGCGGGGG
TGGCGCAGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGGCCCCGAGCGCGGGGCTGTCGAGGG
CGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCG
CACCCCTCTAGCGGGCGCGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGAAATGGGCGGGGAGGGCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCTCCCTTCTCCAT
CTCCAGCCTCGGGGTGCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGTCTGGCGTGTGACCGGGGCTCTAGAGCCTCG
CTAACCATGTTATGCCTTCTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGCAAA

[0637] 서열번호 33(WPRE 인핸서, 589 bp)

[0638] AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGTATGTGGATACGTGCTTTAATGCCTTTGTAT
CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTCAGGCAACGTGGC
GTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGCATTGCCACCACCTGTGACGTCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCC
ACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGACTGACAATCCCGTGGTGTGTGCGGGAAATCATGTCCTTT
CCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACTTCTTCCCGCGGCTG
CTGCCGCTCTGCGGCTTTCGCGCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCCTCCCGC

[0639] 서열번호 34(bGH 폴리A, 225 bp)

[0640] CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG
GGGATGCGGTGGGCTCTATGG

[0641] 서열번호 35(EFS 프로모터, 235 bp)

[0642] g attggctccg gtccccgca gtggcgagag cgcacatcgc ccacagtcgc cgagaagtg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc
tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgctg tglactggct ccgcttttt cccgaggggt ggggagaacc gtatataagt
gcagtagtgc ccgtgaacct tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac acag

[0643] 서열번호 36(SPA, 54 bp)

[0644] GATCCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

[0645] 서열번호 37(코작 서열, 6 bp)

[0646] GCCACC

[0647] 서열번호 38(코작 서열, 5 bp)

[0648] CCACC

[0649] 서열번호 39(SV40 레이트 폴리A, 120 bp)

[0650] TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAATAAAGCATTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA
CTCATCAATGTATCTTAT

[0651] 서열번호 40(CMV 프로모터, 576 bp)

[0652] TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCC
CGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTG
GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG
GGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACG
CAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAG

[0653] 서열번호 41(EF-1 알파 프로모터, 1184 bp)

[0654] cgtgaggctccggtgccccgcagtgaggcagagcgcacatcgccccagtcgccgagaagttggggggaggggtcggcaatgaaaccggtgcctagagaaggt
ggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgctgactggctccgcttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgacgtgctgcctgaaacttc
tttttcgcaaccgggtttgccccagaacacaggttaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttgaat
cttccacctggctgcagtagctgatcttgatcccagcttccgggttggaaagtggtgggagagtccaggccttgcgcttaaggagccccctcgctcgtg
cttgagttgaggcctggcctggcgctggggcccgcgctgcgaatctggtggcaccttccgctgtctcgctgctttcgataagctctagccatttaa

at t t t t g a t g a c c t g c t g c g a c g c t t t t t t c t g g c a a g a t a g t c t t g t a a t g c g g g c c a a g a t c t g c a c a c t g g t a t t t c g g t t t t g g g g c c g g g g c g
 g c g a c g g g g c c c g t g c t c c c a g c g c a c a t g t t c g g c g a g g c g g g c c t g c g a g c g c g g c c a c c g a g a a t c g g a c g g g g t a g t c t c a a g t g g c c g c t g
 c t c t g g t g c c t g c g c c c c g t g t a t c g c c c g c c c t g g g c g g c a a g g c t g g c c c g g t c g g c a c c a g t t g c g t g a g c g g a a a g a t g g c c g t t c c c g
 g c c c t g c t g c a g g g a g c t c a a a a t g g a g g a c g c g g c g c t c g g g a g a c g g g c g g t g a g t c a c c c a c a c a a a g g a a a a g g g c t t t c c g t c c t c a g c c g t c g
 c t t a t g t g a c t c c a c g g a g t a c c g g g c c c g t c c a g g c a c c t c g a t t a g t t c t c g a g c t t t t g g a g t a c g t c g t c t t a g g t t g g g g g a g g g g t t t t a t g
 c g a t g g a g t t t c c c a c a c t g a g t g g t g g a g a c t g a a g t t a g c c a g c t t g g c a c t t g a t g t a a t t c t c c t t g g a a t t g c c t t t t g a g t t g g a t c t t
 g g t t c a t t c t c a a g c c t c a g a c a g t g g t t c a a a g t t t t t t c t t c a t t t c a g g t g t c g t g a

- [0655] 서열번호 42(AAV2 5' Left-ITR, 141 bp)
- [0656] cctgcaggca gctgcgct cgctcgtca ctgaggccgc cgggcaag cccggcgctc gggcgacctt tggtcgccc gctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc t
- [0657] 서열번호 43(AAV2 3' Right-ITR, 141 bp)
- [0658] ag gaaccctag tgatggagt ggccactccc tctctcgcg ctcgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgccc acgcccggg tttgcccgg cgccctcagt gagcgagcga gcgcgagct gcctgcagg
- [0659] 서열번호 44(scAAV 구조체내 돌연변이체 AAV2 5' ITR, 117 bp)
- [0660] cctgcaggca gctgcgct cgctcgtca ctgaggccgc cgggcaag cccggcgctc gggcgacctt tggtcgccc gctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtgg
- [0661] 서열번호 45(scAAV 구조체내 AAV2 3' ITR, 141 bp)
- [0662] aggaacc ctagtgatgg agttggccac tcctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccgggca ccaaaggctc cccgacccc gggctttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg agctgcctgc agg
- [0663] **실시예 10 - BCD 세포 모델을 사용하여 AAV 혈청형 및 캡시드 구조, 프로모터 및 다른 조절 서열 활성 및 cDNA 발현 수준뿐만 아니라 벡터의 전체 효율 및 CYP4V2 유전자 치료요법의 투여량 수준을 시험, 비교 스크리닝하고, 상이한 환자에 대해 개인화된 최적의 벡터 및 투여량을 평가하는 방법**
- [0664] BCD 세포 모델(예를 들어, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주, 또는 인위적으로 생성된 CYP4V2 돌연변이를 갖는 ES-RPE, iPS-RPE 또는 RPE 세포주)는 약물 및 투여량 스크리닝에 사용될 수 있다. BCD 환자-특이적 iPS-RPE 샘플을 사용하여 벡터 유형(예를 들어, AAV 혈청형 및 캡시드 구조), CYP4V2 발현 카세트내 프로모터, 인핸서, 폴리A 신호 및 다른 서열, 및 CYP4V2 cDNA뿐만 아니라 벡터의 전체적인 효율 및 투여량 수준을 포함하는 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 다양한 성분 및 투여량을 시험, 비교 스크리닝하였다. 표현형 구조(rescue)를 사용하여 효능을 시험하고 비교하였다.
- [0665] 상이한 혈청형의 벡터(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9) 또는 캡시드(예를 들어, 캡시드 돌연변이(들)를 갖는 AAV, 예를 들어 AAV2 대 AAV2tri(Y-F)) 또는 구조(예를 들어, scAAV 대 ssAAV)를 동일한 발현 카세트를 갖는 상이한 벡터를 사용하여 시험하고 비교할 수 있다. 예를 들어, AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op 및 AAV5.CYP4V2op 모두 동일한 발현 카세트를 가지지만, AAV 혈청형/캡시드에 있어서 차이가 있다. scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op 및 scAAV9.CYP4V2op 모두는 동일한 발현 카세트를 공유하지만, AAV 혈청형에서 상이하다. 표현형 구조(rescue)의 결과를 사용하여, CYP4V2 cDNA를 BCD 환자 RPE 세포로 형질도입하고 전달하는데 있어서 AAV 혈청형/캡시드(예를 들어, AAV2 대 AAV2tri(Y-F) 대 AAV5) 및 구조(예를 들어, scAAV5 대 ssAAV5) 효율 차이를 시험하고 비교할 수 있다.
- [0666] 동일한 방법을 사용하여 동일한 구조체(시험하고 비교될 요소는 제외)의 rAAV 벡터의 표현형 구조 효능을 시험함으로써 상이한 발현 카세트, cDNA, 또는 조절 서열 또는 다른 서열(예를 들어, 연결부/링커 서열)의 활성 수준을 시험하고 비교할 수 있다.
- [0667] 또한, 본원의 실시예에 기술된 바와 같이, 상이한 투여량(예를 들어, 1x10⁴ 내지 1x10⁵)의 동일한 벡터(예를 들어, rAAV 벡터, 예를 들어 scAAV1.CYP4V2op)를 동일한 환자의 iPS-RPE 샘플에 적용하여 치료학적 유효 투여량 범위를 평가하였다(세포당 MOI로 측정됨).
- [0668] 또한, BCD 세포 모델이 개인차를 나타낸다는 것을 고려해 볼 때, 이는 또한 각각의 환자에 대한 개별화된 최적 투여량 및 벡터 구조체를 개별적으로 평가하고 발견하는데 사용될 수 있다.

[0669] 보다 관련된 논의에 대해서는 본원의 관련 실시예 및 개시내용을 참조한다.

[0670] **실시예 11 - 기능적 CYP4V2암호화 핵산 서열 및 발현 카세트를 갖는 다양한 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터의 생성**

[0671] AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st, AAV5.CYP4V2op, AAV8.CYP4V2fv 및 scAAV1.CYP4V2op를 포함하는 본 연구를 위해 설계된 다양한 AAV.CYP4V2 벡터(본원의 실시예 참조)를 Vector BioLabs(미국 펜실베이니아주 말버른 소재)로부터 주문 제작하였다. Vector BioLabs으로부터의 재조합 AAV 벡터는 헬퍼를 포함하지 않는다(helper-free). 생산 공정은: (1) 관련 CYP4V2 cDNA(즉, CYP4V2st, CYP4V2op 또는 CYP4V2fv) 및 CYP4V2 발현 카세트의 조절 서열을 포함하는 AAV2 ITR-함유 플라스미드인 pAAV 시스-플라스미드를 클로닝하는 단계, (2) Qiagen Endo-free Mega Prep 키트를 사용하여 pAAV 시스-플라스미드 및 상보적 플라스미드(관련 AAV Rep-Cap 유전자를 운반하는 플라스미드 및 아데노바이러스로부터 분리된 헬퍼 유전자를 제공하는 플라스미드)를 대규모 제조하는 단계, (3) HEK293 세포의 플레이트로 상기 기술된 3개의 플라스미드를 대규모 동시-형질감염시키는 단계, (4) 형질감염 2일 후, 세포 펠렛을 수거하고, 바이러스를 3회의 동결/해동 사이클을 이용하여 방출시키고, AAV 바이러스를 CsCl-구배 초-원심분리로 정제한 후 탈염시키는 단계, 및 (5) 바이러스 역가(계놈 카피(GC)/ml)를 실시간 PCR을 사용하여 결정하고, 정제된 rAAV 벡터를 사용할 때까지 -80°C에서 저장하는 단계.

[0672] 연구를 위한 다양한 AAV.CYP4V2 벡터에 패키징된 상이한 CYP4V2 발현 카세트(ITR 및 연결부/링커 서열 포함)의 서열은 다음과 같이 열거된다.

[0673] 서열번호 60 -AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, 및 AAV5.CYP4V2op.내 CYP4V2 발현 카세트의 서열:

[0674] 좌측 -ITR: 1-141

[0675] CAG 프로모터: 237-1951

[0676] CYP4V2op cDNA: 2002-3579

[0677] WPRE 인핸서: 3736-4324

[0678] bGH 폴리A: 4350-4574

[0679] 우측 -ITR 4659-4799

[0680] 1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG

[0681] 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC

[0682] 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGGCCAAT

[0683] 151 TCAGTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGATTTAAA TACGCGCTCT

[0684] 201 CTTAAGGTAG CCCCAGGACG CGTCAATGA GATCTCGACA TTGATTATTG

[0685] 251 ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGG TCATTAGTTC ATAGCCATA

[0686] 301 TATGGAGTTC CGGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC

[0687] 351 CGCCCAACGA CCCCAGCCCA TTGACGCAA TAATGACGTA TGTCCATA

[0688] 401 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG

[0689] 451 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC

[0690] 501 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAATGGC CCGCTGGCA TTATGCCAG

[0691] 551 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT

[0692] 601 CATCGCTATT ACCATGGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTTCCTCTC

[0693] 651 CCCATCTCCC CCCCTCCCC ACCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA

[0694] 701 ATTATTTTGT GCAGCGATGG GGGCGGGGGG GGGGGGGCG CGCGCCAGGC

[0695] 751 GGGGCGGGG GGGGCGAGGG GCGGGGCGGG GCGAGGCGGA GAGGTGCGGC

[0696] 801 GGCAGCCAAT CAGAGCGGCG CGCTCCGAAA GTTTCCTTTT ATGGCGAGGC
 [0697] 851 GGCGGCGGCG GCGGCCCTAT AAAAAGCGAA GCGCGCGGCG GGCGGGAGTC
 [0698] 901 GCTGCGTTGC CTTCGCCCG TGCCCCGCTC CGCGCCGCTT CGCGCCGCC
 [0699] 951 GCCCCGGCTC TGACTIONGACCG CGTTACTCCC ACAGGTGAGC GGGCGGGACG
 [0700] 1001 GCCCTTCTCC TCCGGGCTGT AATTAGCGCT TGGTTAATG ACGGCTCGTT
 [0701] 1051 TCTTTTCTGT GGCTGCGTGA AAGCCTAAA GGGCTCCGGG AGGGCCCTTT
 [0702] 1101 GTGCGGGGGG GAGCGGCTCG GGGGGTGCCT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG
 [0703] 1151 AGCGCCGCGT GCGGCCCGCG CTGCCCGGCG GCTGTGAGCG CTGCGGGGCG
 [0704] 1201 GGCAGCGGGG TTTGTGCGCT CCGCGTGTGC GCGAGGGGAG CGCGCCGGG
 [0705] 1251 GGCAGTGCCC CGCGGTGCGG GGGGGCTGCG AGGGGAACAA AGGCTGCGTG
 [0706] 1301 CGGGGTGTGT GCGTGGGGG GTGAGCAGGG GGTGTGGGCG CGGCGTCCG
 [0707] 1351 GCTGTAACCC CCCCTGCAC CCCCTCCC GAGTTGCTGA GCACGGCCCG
 [0708] 1401 GCTTCGGGTG CGGGGCTCCG TCGGGGCGT GCGCGGGGCG TCGCCGTGCC
 [0709] 1451 GGCAGGGGGG TGGCGGCAGG TGGGGTGC GGGCGGGGCG GGGCCGCTC
 [0710] 1501 GGCAGGGGA GGGCTCGGG GAGGGGCGG GCGGCCCGG AGCGCCGGCG
 [0711] 1551 GCTGTGAGG CGCGGCGAGC CGCAGCCATT GCCTTTTATG GTAATCGTGC
 [0712] 1601 GAGAGGGGCG AGGGACTTCC TTTGTCCAA ATCTGGCGGA GCCGAAATCT
 [0713] 1651 GGGAGGGGCC GCCGACCCC CTCTAGCGGG CGCGGGCGAA GCGGTGCGGC
 [0714] 1701 GCCGCGAGGA AGGAAATGGG CGGGGAGGGC CTTCGTGCGT CGCCGCGCCG
 [0715] 1751 CCGTCCCCTT CTCCATCTCC AGCCTCGGG CTGCCGAGG GGGACGGCTG
 [0716] 1801 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG
 [0717] 1851 GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTCTTA
 [0718] 1901 CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA
 [0719] 1951 AGAATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA CCCAAGCTGG CTAGAGCCAC
 [0720] 2001 CATGGCTGGA CTGTGGCTGG GACTGGTGTG GCAGAACTG CTGCTGTGGG
 [0721] 2051 GGGCCGCTTC CGACTGTCA CTGGCTGGG CTTACTGGT GCTGAGCCTG
 [0722] 2101 CTGAGAGGG TGGCCTCCTA CGCCAGAAAG TGGCAGCAGA TGAGGCCCAT
 [0723] 2151 CCCTACCGTG GCCAGAGCCT ATCCACTGGT GGGACACGCA CTGCTGATGA
 [0724] 2201 AGCCTGACGG CAGAGAGTTC TTTCAGCAGA TCATCGAGTA CACAGAGGAG
 [0725] 2251 TATAGGCACA TGCCACTGCT GAAGCTGTGG GTGGGACCCG TGCCTATGGT
 [0726] 2301 GGCCTGTAC AACGCCGAGA ATGTGGAAGT GATCCTGACC AGCAGCAAGC
 [0727] 2351 AGATCGATAA GTCTAGCATG TATAAGTTCC TGGAGCCTTG GCTGGGCTG
 [0728] 2401 GGCCTGTGA CCTCTACAGG CAACAAGTGG AGGAGCCGGA GAAAGATGCT
 [0729] 2451 GACCCCAACA TTCCACTTTA CAATCCTGGA GGAATCCTG GACATCATGA
 [0730] 2501 ACGAGCAGGC CAATATCCTG GTGAAGAAGC TGGAGAAGCA CATCAACCAG
 [0731] 2551 GAGGCCTTTA ATTGCTTCTT TTACATCACC CTGTGCGCCC TGGACATCAT

[0732] 2601 CTGTGAGACA GCTATGGGCA AGAACATCGG CGCCAGTCT AATGACGATA
 [0733] 2651 GCGAGTACGT GCGGGCCGTG TATAGAATGA GCGAGATGAT CTTTAGGCGC
 [0734] 2701 ATCAAGATGC CCTGGCTGTG GCTGGATCTG TGGTATCTGA TGTTC AAGGA
 [0735] 2751 GGGCTGGGAG CACAAGAAGT CCCTGCAGAT CCTGCACACC TTTACAAACT
 [0736] 2801 CTGTGATCGC CGAGAGAGCC AATGAGATGA ACGCCAATGA GGACTGTAGG
 [0737] 2851 GGCATGGAA GGGGAGCGC CCCTTCCAAG AACAAGCGGA GAGCCTTCCT
 [0738] 2901 GGACCTGCTG CTGAGCGTGA CCGACGATGA GGGCAATCGC CTGTCCCACG
 [0739] 2951 AGGACATCCG GGAGGAGGTG GATACATTCA TGTTTGAGGG ACACGACACC
 [0740] 3001 ACAGCCGCCG CCATCAACTG GTCCCTGTAC CTGCTGGGCT CTAATCCAGA
 [0741] 3051 GGTGCAGAAG AAGGTGGATC ACGAGCTGGA CGACGTGTTC GGCAAGTCCG
 [0742] 3101 ACAGGCCAGC AACCGTGGAG GATCTGAAGA AGCTGAGATA CCTGGAGTGC
 [0743] 3151 GTGATCAAGG AGACACTGCG CCTGTTCCTC TCTGTGCCTC TGTTTGCCCG
 [0744] 3201 GTCCGTGTCT GAGGACTGTG AGGTGGCCGG CTATCGCGTG CTGAAGGGCA
 [0745] 3251 CCGAGGCCGT GATCATCCCT TACGCCCTGC ACCGGGACCC CAGGTATTTT
 [0746] 3301 CCTAACCCAG AGGAGTTTCA GCCAGAGAGA TTCTTTCCCG AGAATGCCCA
 [0747] 3351 GGCAGGCAC CCTTACGCCT ATGTGCCATT CTCCGCCGA CCAAGGAACT
 [0748] 3401 GCATCGGACA GAAGTTTGCC GTGATGGAGG AGAAAACCAT CCTGTCTTGT
 [0749] 3451 ATCCTGAGAC ACTTCTGGAT CGAGAGCAAT CAGAAGAGGG AGGAGCTGGG
 [0750] 3501 CCTGGAGGGA CAGCTGATCC TCGGCCAAG CAACGGCATC TGGATCAAAC
 [0751] 3551 TGAAGAAG GAACGCTGAC GAGAGGTAAA AGCTGGTAC CGATATCGCG
 [0752] 3601 GCCGCCCTAG GGAGCTCCTC GAGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCT
 [0753] 3651 TCGAAGGTAA GCCTATCCCT AACCTCTCC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT
 [0754] 3701 ACCGGTCATC ATCACCATCA CCATTGAGTT TCGATAATCA ACCTCTGGAT
 [0755] 3751 TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT CTAACTATG TTGCTCCTTT
 [0756] 3801 TACGCTATGT GGATACGCTG CTTAATGCC TTTGTATCAT GCTATTGCTT
 [0757] 3851 CCCGATGGC TTTCATTTTC TCCTCCTGT ATAAATCCTG GTTGCTGTCT
 [0758] 3901 CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTCAGG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC
 [0759] 3951 TGTGTTTGCT GACGCAACCC CCACTGGTTG GGCATTGCC ACCACCTGTC
 [0760] 4001 AGCTCCTTTC CGGGACTTTC GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA
 [0761] 4051 CTCATCGCCG CCTGCCTTGC CCGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCTGTGGG
 [0762] 4101 CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTGGGGAA ATCATCGTCC TTTCTTGGC
 [0763] 4151 TGTCTGCTG TGTGCCACC TGGATTCTGC GCGGGACGTC CTTCTGCTAC
 [0764] 4201 GTCCCTTCGG CCCTCAATCC AGCGGACCTT CCTTCCCGCG GCCTGCTGCC
 [0765] 4251 GGCTCTGCGG CCTCTCCGC GTCTTCGCCT TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA
 [0766] 4301 TCTCCCTTTC GGCCGCTCC CCGCATCGAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC
 [0767] 4351 TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT

[0768] 4401 CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTCCTA ATAAAATGAG
 [0769] 4451 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
 [0770] 4501 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG
 [0771] 4551 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGATCC
 [0772] 4601 TCTCTTAAGG TAGCATCGAG ATTTAAATTA GGGATAACAG GGTAATGGCG
 [0773] 4651 CGGGCCGAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG
 [0774] 4701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCG ACGCCCGGGC
 [0775] 4751 TTTGCCCGGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

[0776] 서열번호 61 -AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st내 CYP4V2 발현 카세트의 서열은 AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op 및 AAV5.CYP4V2op(서열번호 60)로서 동일한 프로모터(CAG), 인핸서(WPRE) 및 폴리A(bGH-폴리A)를, 그러나 상이한 CYP4V2 cDNA 및 연결부/링커 서열을 갖는다:

[0777] 좌측-ITR: 1-141

[0778] CAG 프로모터: 166-1880

[0779] CYP4V2st cDNA: 1938-3515

[0780] WPRE 인핸서: 3551-4139

[0781] bGH 폴리A: 4163-4387

[0782] 우측-ITR: 4399-4539

[0783] 1 CCTGCAGGCA GCTGCGGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCG CCGGGCAAAG
 [0784] 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGTCGCCCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
 [0785] 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGGCCTAA
 [0786] 151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
 [0787] 201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTC GCGTTACATA
 [0788] 251 ACTTACGTA AATGGCCCG CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCAT
 [0789] 301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
 [0790] 351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCC ACTTGGCAGT
 [0791] 401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
 [0792] 451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
 [0793] 501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
 [0794] 551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
 [0795] 601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGIG CAGCGATGGG
 [0796] 651 GGGGGGGGG GGGGGGGCG GCGCCAGGCG GGGCGGGCG GGGCGAGGGG
 [0797] 701 CGGGGCGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
 [0798] 751 GCTCCGAAAG TTTCTTTTA TGGCGAGGCG GCGCGGCGG CGGCCCTATA
 [0799] 801 AAAAGCGAAG CGCGGCGCG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCGT
 [0800] 851 GCCCGCTCC GCGCCGCTC GCGCCGCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
 [0801] 901 GTTACTCCA CAGGTGAGCG GCGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA

[0802] 951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA

[0803] 1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG

[0804] 1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC

[0805] 1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGGCGG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC

[0806] 1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG

[0807] 1201 GGGGTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG

[0808] 1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC

[0809] 1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT

[0810] 1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGT GCGGCGAGGT

[0811] 1401 GGGGTGCCG GCGGGGCGG GGCCGCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG

[0812] 1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGA GCGCCGCGG CTGTGAGGC GCGGCGAGCC

[0813] 1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGC AGAGGGCGCA GGGACTTCCT

[0814] 1551 TTGTCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC

[0815] 1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GAAATGGGG

[0816] 1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCCGCGCCG CGTCCCCTC TCCATCTCCA

[0817] 1701 GCCTCGGGG TGCCGCAGGG GGACGGTGC CTTCGGGGG GACGGGCGAG

[0818] 1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA

[0819] 1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTC TTTTCTAC AGCTCCTGG CAACGTGCTG

[0820] 1851 GTTATTGTG TGTCTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTCACT

[0821] 1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT

[0822] 1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGG GCGGAGTGCC

[0823] 2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC

[0824] 2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCATCCCC ACGGTGGCCC

[0825] 2101 GCGCTACCC ACTGGTGGG CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA

[0826] 2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC

[0827] 2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG

[0828] 2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGT CAAAGCAAAT TGACAAATCC

[0829] 2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG

[0830] 2351 TACTGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTCC

[0831] 2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT

[0832] 2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG

[0833] 2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA

[0834] 2551 TGGGAAGAA TATTGGTGTCAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT

[0835] 2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG

[0836] 2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA

[0837] 2701 AAAAGAGCCT TCAGATCCTA CATACTTTA CCAACAGTGT CATCGCTGAA

[0838] 2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG

[0839] 2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA

[0840] 2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA

[0841] 2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAAC TG CAGCTGCAAT

[0842] 2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG

[0843] 3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA

[0844] 3051 GTAGAAGACC TGAAGAAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC

[0845] 3101 CCTTCGCCTT TTTCCTTCTG TTCCTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG

[0846] 3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC

[0847] 3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCA ACCCCGAGGA

[0848] 3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCGGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT

[0849] 3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCA GAACTGTAT AGGTCAAAAG

[0850] 3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT

[0851] 3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT

[0852] 3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT

[0853] 3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT

[0854] 3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA

[0855] 3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTA ATGCCTTGT

[0856] 3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTCA TTTTCTCCTC CTGTATAAA

[0857] 3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG

[0858] 3751 TGGCGTGGTG TGCACTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA

[0859] 3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCTCCCT

[0860] 3851 ATTGCCACGG CGAACTCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG

[0861] 3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT

[0862] 3951 CGTCCTTTC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGGGG

[0863] 4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC

[0864] 4051 CCGCGGCTG CTGCCGGCTC TCGGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCCTTCGCC

[0865] 4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGA TCGAAACCCG

[0866] 4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC

[0867] 4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCA CTGTCTTTC

[0868] 4251 CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA

[0869] 4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC

[0870] 4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG

[0871] 4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGG CTCGCTCGCT

[0872] 4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG

[0873] 4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGAGCT GCCTGCAGG

- [0874] 서열번호 62 -AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv내 CYP4V2 발현 카세트의 서열은 동일한 프로모터(CAG), 인핸서 (WPRE) 및 폴리A(bGH-폴리A) 및 AAV5.CYP4V2st(서열번호 61)로서 연결부/링커 서열을 가지며, CYP4V2 cDNA 서열에서만 상이하다:
- [0875] Left-ITR: 1-141
- [0876] CAG 프로모터: 166-1880
- [0877] CYP4V2fv cDNA: 1938-3515
- [0878] WPRE 인핸서: 3551-4139
- [0879] bGH 폴리A: 4163-4387
- [0880] Right-ITR: 4399-4539
- [0881] 1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
- [0882] 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
- [0883] 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA
- [0884] 151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
- [0885] 201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTC GCGTTACATA
- [0886] 251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCAT
- [0887] 301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
- [0888] 351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCC ACTTGGCAGT
- [0889] 401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
- [0890] 451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
- [0891] 501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
- [0892] 551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCA
- [0893] 601 CCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTGTG CAGCGATGGG
- [0894] 651 GGCAGGGGGG GGGGGGGCG GCGCCAGGCG GGGCGGGCG GGGCGAGGG
- [0895] 701 CGGGGCGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
- [0896] 751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTA TGCGAGGCG GCGCGGCGG CGGCCCTATA
- [0897] 801 AAAAGCGAAG CGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCGT
- [0898] 851 GCCCCGCTCC GCGCCGCCTC GCGCCGCCG CCCCGGCTCT GACTGACCGC
- [0899] 901 GTTACTCCA CAGGTGAGCG GCGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
- [0900] 951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTCTGTG GCTGCGTGAA
- [0901] 1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTG TCGGGGGGG AGCGGCTCGG
- [0902] 1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGA GCGCCGCGT CGGCCGCGC
- [0903] 1101 TGCCCGGCG CTGTGAGCG TGCGGGCGG GCGCGGGCT TTGTGCGCTC
- [0904] 1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
- [0905] 1201 GGGGTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGG
- [0906] 1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCG GCGGTCGGG CTGTAACCC CCCCTGCACC
- [0907] 1301 CCCCTCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT

[0908] 1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GGCGGGGGT GGCGGCAGGT
 [0909] 1401 GGGGGTGCCG GGCGGGGCGG GGCCGCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
 [0910] 1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGA GCGCCGGCGG CTGTCGAGGC GCGGCGAGCC
 [0911] 1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCTT
 [0912] 1551 TTGTCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
 [0913] 1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
 [0914] 1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCCGCGCCGCG CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
 [0915] 1701 GCCTCGGGGC TGCCGAGGG GGACGGCTGC CTTCGGGGGG GACGGGGCAG
 [0916] 1751 GGCGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 [0917] 1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 [0918] 1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
 [0919] 1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
 [0920] 1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GCGGAGTGCC
 [0921] 2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGCC
 [0922] 2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
 [0923] 2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
 [0924] 2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
 [0925] 2201 GCTGTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
 [0926] 2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
 [0927] 2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
 [0928] 2351 TACTGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTCC
 [0929] 2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
 [0930] 2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
 [0931] 2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
 [0932] 2551 TGGGAAGAA TATTGGTCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
 [0933] 2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
 [0934] 2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
 [0935] 2701 AAAAGAGCCT TAAGATCCTA CATACTTTA CCAACAGTGT CATCGCGGAA
 [0936] 2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
 [0937] 2801 CTCTGCCCC TCCAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
 [0938] 2851 GTGTGACTGA TGACGAAGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTGAGAA
 [0939] 2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGAC GATACAACCTG CAGCTGCAAT
 [0940] 2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
 [0941] 3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
 [0942] 3051 GTAGAAGACC TGAAGAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
 [0943] 3101 CCTTCGCCTT TTTCTTCTG TTCCTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG

[0944] 3151 ATGTGTAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
 [0945] 3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCA ACCCCGAGGA
 [0946] 3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
 [0947] 3301 ATGCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAAG
 [0948] 3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT
 [0949] 3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
 [0950] 3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCACTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
 [0951] 3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
 [0952] 3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
 [0953] 3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
 [0954] 3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTCA TTTTCTCCTC CTGTATAAA
 [0955] 3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
 [0956] 3751 TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
 [0957] 3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTT CCCCCTCCT
 [0958] 3851 ATTGCCACGG CGGAACTCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
 [0959] 3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
 [0960] 3951 CGTCTTTCC TTGGTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGGGG
 [0961] 4001 ACGTCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
 [0962] 4051 CCGCGGCTG CTGCCGGCTC TCGGCCTCT TCCGCTCTT CGCCTTCGCC
 [0963] 4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCG CCTCCCCGA TCGAAACCCG
 [0964] 4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
 [0965] 4201 TCCCCGTC CTTCCTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCA CTGTCCTTC
 [0966] 4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
 [0967] 4301 TTCTGGGGG TGGGGTGGG CAGGACAGCA AGGGGAGGA TTGGGAAGAC
 [0968] 4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGA TCGGTGGG TCTATGGCCG CGGGCCGAG
 [0969] 4401 GAACCCCTAG TGATGGAGT GGCCACTCCC TCTCTGCGG CTCGCTCGCT
 [0970] 4451 CACTGAGGCC GGGCGACAA AGGTCGCCC ACGCCGGGC TTGCCCAGG
 [0971] 4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

[0972] 서열번호 63 -AAV5.CYP4V2op(신규). AAV5.CYP4V2op(신규)내 CYP4V2 발현 카세트의 서열은 동일한 프로모터 (CAG), 인핸서(WPRE) 및 폴리A(bGH-폴리A) 및 AAV5.CYP4V2st(서열번호 61) 및 AAV8.CYP4V2fv(서열번호 62)로서 동일한 연결부/링커 서열 그러나 상이한 CYP4V2 cDNA 서열을 갖는다:

[0973] 좌측-ITR: 1-141
 [0974] CAG 프로모터: 166-1880
 [0975] CYP4V2op cDNA: 1938-3515
 [0976] WPRE 인핸서: 3551-4139
 [0977] bGH 폴리A: 4163-4387

[0978] 우측 -ITR: 4399-4539

[0979] CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG

[0980] CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC

[0981] GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA

[0982] GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA

[0983] ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA

[0984] ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCC GCCCAT

[0985] TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC

[0986] CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT

[0987] ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG

[0988] GTAAATGGCC CGCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT

[0989] CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG

[0990] AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA

[0991] CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG

[0992] GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG

[0993] CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC

[0994] GCTCCGAAAG TTTCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA

[0995] AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT

[0996] GCCCCGCTCC GCGCCGCTC GCGCCGCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC

[0997] GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA

[0998] ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA

[0999] AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGG AGCGGCTCGG

[1000] GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC

[1001] TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC

[1002] CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG

[1003] GGGGTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG

[1004] TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTGCGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC

[1005] CCCCTCCCC AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT

[1006] GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCAGGT

[1007] GGGGTGCGG GCGGGGCGG GGCCGCTCG GCGCGGGGAG GGCTCGGGG

[1008] AGGGGCGCG CGGCCCGGA GCGCCGCGG CTGTCGAGG GCGGCGAGCC

[1009] GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGC AGAGGGCGCA GGGACTTCCT

[1010] TTGTCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCCTG CCGACCCCC

[1011] TCTAGCGGG GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGCAGGAA GGAATGGGC

[1012] GGGGAGGGC TTCGTGCGTC GCCGCGCCG CGTCCCCTTC TCCATCTCCA

[1013] GCCTCGGGG TGCCGAGGG GGACGGCTGC CTTCGGGGG GACGGGGCAG

- [1014] GGCGGGGTTT GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
- [1015] ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
- [1016] GTTATTGTGC TGTCATCA TTTTGGCAA GAATTCTAAT ACGACTACT
- [1017] ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACC
- [1018] ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTACTGGCTGGGGCTTCACTGGTGCTGAGCCTGCTG
 CAGAGGGTGGCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGATGAGGCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCCTGCTGATGAAGCCT
 GACGGCAGAGAGTTCTTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTG
 TACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTGGAGCCTTGGCTGGGCCTGGCCTGCTG
 ACCTCTACAGGCAACAAGTGGAGGAGCCGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCACCTTTACAATCCTGGAGGACTTCTGGACATCATGAACGAGCAGGCC
 AATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCTTTAATTGCTTCTTTACATCACCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCT
 ATGGGAAGAATCATCGGCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCATCAAGATGCCCTGG
 CTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTCCCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGA
 GCCAATGAGATGAACGCCAATGAGGACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGCAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCTGGACCTGTGCTGAGCGTG
 ACCGACGATGAGGCAATCGCCTGTCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTCATGTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCCATCAACTGG
 TCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGTGGATCAGGAGCTGGACGACGTGTTCCGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGGAT
 CTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCCTGATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCTCTGTGCCTGTGTTGCCCGTCCGTGCTGAGGACTGTGAGGTG
 GCCGGTATCGCTGCTGAAGGGACCCGAGGCCGTGATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGACCCAGGTATTTCCCTAACCCAGAGGAGTTTCAGCCAGAG
 AGATTCTTTCCGAGAATGCCAGGGACGCCCTTACGCCTATGTGCCATTTCCCGGACCAAGGAACTGCATCGGACAGAAGTTTCCCGTGTGAGGAG
 GAGAAAACCATCCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATCGAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGCCAAGC
 AACCGCATCTGGATCAAACCTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
- [1019] AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
- [1020] CTATGTTGCT CTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
- [1021] ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
- [1022] TCCTGGTTGC TGTCCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
- [1023] TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
- [1024] TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCTCCCT
- [1025] ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
- [1026] GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATCCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
- [1027] CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
- [1028] ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
- [1029] CCGCGGCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGCTT CGCCTTCGCC
- [1030] CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGCA TCGAAACCG
- [1031] CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
- [1032] TCCCCGTGC CTTCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCA CTGTCCTTTC
- [1033] CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
- [1034] TTCTGGGGG TGGGTGGG CAGGACAGCA AGGGGAGGA TTGGGAAGAC
- [1035] AATAGCAGGC ATGCTGGGA TGCGGTGGC TCTATGGCCG CGGGCCGACG
- [1036] GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
- [1037] CACTGAGGCC GGGCGACAA AGGTGCCCCG ACGCCCGGC TTTGCCCGG
- [1038] CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

- [1039] 서열번호 64 -scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op, 및 scAAV9.CYP4V2op내 CYP4V2 발현 카세트의 서열.
- [1040] 좌측 -ITR (절단됨): 1-117
- [1041] EFS 프로모터: 130-364
- [1042] CYP4V2op cDNA: 520-2097
- [1043] SPA: 2116-2169
- [1044] 우측 -ITR: 2263-2403

[1045] 1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc
 [1046] 61 gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggacg
 [1047] 121 cgtaggcctg attggetcgg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc
 [1048] 181 cgagaagttg gggggagggg tggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggt
 [1049] 241 aaactgggaa agtgatgctg tgtactgctt ccgcttttt cccgagggtg ggggagaacc
 [1050] 301 gtatataagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac
 [1051] 361 acaggtgtcg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaata taaaattttt
 [1052] 421 aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt
 [1053] 481 tggaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact gtggctggga
 [1054] 541 ctggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgcttccg cactgtcact ggctggggct
 [1055] 601 tcaactggtc tgagcctgct gcagagggtg gcctcctacg ccagaaagtg gcagcagatg
 [1056] 661 aggeccatcc ctaccgtggc cagagcctat ccaactggtg gacacgcact gctgatgaag
 [1057] 721 cctgacggca gagagtctt tcaagcagat atcgagtaca cagaggagta taggcacatg
 [1058] 781 ccaactgctga agctgtgggt gggaccctg cctatggtgg cctgtacaa cgccgagaat
 [1059] 841 gtggaagtga tctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctagcatgta taagtccctg
 [1060] 901 gagccttggc tgggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag gagccggaga
 [1061] 961 aagatgctga cccaacatt ccaactttaca atcctggagg acttcttga catcatgaac
 [1062] 1021 gagcaggcca atatcctggt gaagaagctg gagaagcaca tcaaccagga ggcctttaat
 [1063] 1081 tgcttctttt acatcacctt gtgcgcctg gacatcatct gtgagacagc tatgggcaag
 [1064] 1141 aacatcggcg cccagtctaa tgacgatagc gactacgtgc gggccgtgta tagaatgagc
 [1065] 1201 gagatgatct ttaggcgcat caagatgccc tggctgtggc tggatctgtg gtatctgatg
 [1066] 1261 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt taaaactct
 [1067] 1321 gtgatcgccc agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggg cgatggaagg
 [1068] 1381 ggcagcgcct cttcaagaa caagcggaga gccttctggt acctgctgct gagcgtgacc
 [1069] 1441 gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga tacattcatg
 [1070] 1501 tttgagggac acgacaccac agccgcgcc atcaactggt cctgtacct gctgggctct
 [1071] 1561 aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg caagtccgac
 [1072] 1621 aggeccagcaa ccgtggagga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt gatcaaggag
 [1073] 1681 aactgcgcc tgttccctc tgtgcctctg tttgcccgtt ccgtgtctga ggactgtgag
 [1074] 1741 gtggccggct atcgctgct gaagggcacc gaggccgtga tcatccctta cgcctgcac

- [1075] 1801 cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt ctttcccag
- [1076] 1861 aatgcccagg gcaggcacc ttacgcctat gtgccattct ccgccggacc aaggaactgc
- [1077] 1921 atcggacaga agtttgccgt gatggaggag aaaaccatcc tgccttgtat cctgagacac
- [1078] 1981 ttciggatcg agagcaatca gaagaggag gagctgggcc tggagggaca gctgacctg
- [1079] 2041 cggccaagca acggcatctg gatcaaactg aaaagaagga acgctgacga gaggtaaaag
- [1080] 2101 cttgaattcc tcgaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtt
- [1081] 2161 ttttgtgtgt ctagttgcca gccatctggt gtttgcccct cccccgtgcc ttccttgacc
- [1082] 2221 ctggaaggig ccaactccag tttaaactta attaagggcc gcaggaaccc ctagtgatgg
- [1083] 2281 agttggccac tcctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccgggcca ccaaaggctg
- [1084] 2341 cccgacgccc gggtttgccc cgggcgccct cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc
- [1085] 2401 agg

[1086] CYP4V2 유전자 치료요법에서 CYP4V2st와 CYP4V2op cDNA 사이에서 효율에 있어서의 차이를 평가하기 위해, 동일한 프로모터(CAG), 인핸서(WPRE) 및 폴리A(bGH-폴리A) 및 동일한 연결부/링커 서열을 가지는 2개의 AAV5 벡터 (하나는CYP4V2st cDNA(AAV5.CYP4V2st(서열번호 61))을 운반하고, 다른 하나는 CYP4V2op cDNA(AAV5.CYP4V2op(신규)(서열번호 63))를 운반함)를 본원에 기술된 세포 생존능 검정을 사용하여 BCD 환자 유래 iPS-PRE에서 RPE 위축을 구조하는데 있어서의 효능에 대해 비교하였다.

[1087] 서열번호 60 및 서열번호 63에서 사용된 상이한 연결부/링커 서열이 CYP4V2 cDNA 또는 발현 카세트의 발현에 영향을 미치는지의 여부를 평가하기 위해, 동일한 프로모터(CAG), 인핸서(WPRE) 및 폴리A(bGH-폴리A) 및 동일한 CYP4V2 cDNA (CYP4V2op(서열번호 2))를 가지지만 연결부/링커 서열이 다른 2개의 AAV5 벡터 (AAV5.CYP4V2op(서열번호 60) 및 AAV5.CYP4V2op(신규)(서열번호 63))를 본원에 기술된 세포 생존능 검정을 사용하여 BCD 환자-유래 iPS-RPE에서 RPE 위축을 구조하는데 있어서의 효능에 대해 비교하였다.

[1088] 상이한 CYP4V2 cDNA(서열번호 1, 2, 3 또는 기타)가 CYP4V2 유전자 치료요법에서 사용하기 위해 본원에 제공된 발현 카세트 서열에 함유되는 CYP4V2 cDNA 대신에 본원에 기술된 CYP4V2 발현 카세트에 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 본원에 기술된 각각의 CYP4V2 발현 카세트를 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용하기 위한 다양한 혈청형/캡시드의 rAAV 벡터(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV5, AAV8 및 AAV9)에 패키징할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 연구에 사용된 scAAV 벡터에 패키징된 CYP4V2 발현 카세트는 또한 scAAV 구조체에 사용된 돌연변이체 AAV ITR을 ssAAV 구조체에 사용된 비-돌연변이체 AAV ITR로 변경시킨 후, CYP4V2 유전자 치료요법에서 사용하기 위해 ssAAV 벡터에 패키징할 수 있다. 더욱이, 본원에 기술된 CYP4V2 cDNAs 또는 발현 카세트(AAV ITR을 포함하거나 포함하지 않음)를 CYP4V2 유전자 치료요법에 사용하기 위한 다른 바이러스 벡터(즉, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 및 헤르페스 단순포진 바이러스와 같은 비-AAV 벡터 또는 다른 바이러스 벡터) 또는 비-바이러스성 벡터(예를 들어, 플라스미드, 나노입자 또는 지질-기반 나노입자 (예를 들어, 리포솜-프로타민-DNA 복합체(LPD))에 패키징할 수 있다.

[1089] **실시예 12- AAV.CYP4V2에 의한 BCD 환자-유래 iPS-RPE 세포의 치료**

[1090] BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포를 혈청을 포함하지 않은 RPE 배지에서 상술한 다양한 AAV.CYP4V2 벡터로 감염시켰다. 1일 후에, 바이러스-함유 배지를 새로운 혈청-함유 RPE 배지로 교체하여 RPE 배양을 계속하였다. 상이한 투여량의 치료학적 효과를 평가하기 위하여, 상이한 감염 다중도(MOI, 계능 카피(GC)/세포)를 시험하였다.

[1091] **실시예 13- AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 효과를 평가하기 위한 검정**

[1092] AAV.CYP4V2 감염 후, BCD 환자의 iPS-RPE 세포를 RPE 배지에서 scAAV의 경우 적어도 4일 동안 또는 ssAAV의 경우 적어도 10일 동안 배양한 후, 세포를 시험하기 위해 수거하였다. 세포 수거 프로토콜 및 샘플 제조 프로토콜은 앞서 기술한 바와 같이 수행하였다.

[1093] 지방산, 세라마이드(Cer), 스펡고마이엘린(SM), 및 스펡고신과 스펡가닌(SOSA)을 검출하기 위해, 본원의 실시예에 기술된 생화학적 시험을 AAV.CYP4V2-처리된 BCD 환자 iPS-RPE 세포에서 수행하고, LC-MS를 사용하는 동일한

생화학적 시험 프로토콜을 수행하였다. 상기 표 3은 AAV.CYP4V2 처리를 하지 않은 AAV.CYP4V2 및 AAV.CYP4V2 처리 후 건강한 대조군 iPS-RPE 세포, BCD 환자 iPS-RPE 세포에서의 결과를 나타낸다.

- [1094] 결과는 BCD 환자 iPS-RPE 세포(예를 들어, 대조군과 비교하여 비정상인 지방산 수준(예를 들어, DHA, AA 및 총 n3 지방산))에서의 표현형이 AAV.CYP4V2 유전자 치료요법에 의해 개선되거나 교정되었음을 입증하였다. 이는 BCD 환자-유래 iPS-RPE 세포주에서 AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 효능을 확립하였다. BCD는 주로 RPE 변성에 의해 야기되므로, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주에서 AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 효능은 BCD 환자에 대한 AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 효능을 확립하였다.
- [1095] 유의적으로, scAAV1.CYP4V2op 처리는 매우 짧은 시간(치료 후 단 4일)에 가장 현저한 개선을 달성하였다. 이는 scAAV가 상보적 DNA 가닥을 합성하기 위해 세포 기관을 필요로 하지 않기 때문에 빠르게 작용한다는 것을 입증하였다. 같은 이유로, AAV.CYP4V2 처리와 시험을 위한 세포 수거 사이의 시간이 더 길면 결과에서, 특히 ssAAV 벡터에 패키징된 CYP4V2 유전자 치료요법에 대한 결과가 더 크게 개선될 수 있을 것으로 예상된다.
- [1096] 인간 RPE 세포내에서 scAAV 벡터에 의해 달성된 빠르고 강력한 결과는 scAAV 벡터가 RPE 또는 망막 변성의 초기 발병 질환 및/또는 말기 인간 환자를 구조하는데 특히 유용할 수 있다는 것을 확립하였다. 또한, scAAV 벡터의 강력한 발현 프로파일은 또한 이를 망막에 전달하기 위한 유리체내 투여에도 적합하다.
- [1097] *AAV.CYP4V2에 의한 RPE 위축의 구조*
- [1098] BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플을 청색 광에 1시간 동안 노출시킨 후, 다음날 세포 생존능 검정을 본원에 이미 기술된 바와 같이 샘플에서 수행하였다.
- [1099] AAV.CYP4V2 처리하지 않은 대 처리한 환자 iPS-RPE 샘플을 비교하는 세포 생존능 이미지를 본원의 도면에 나타내었다.
- [1100] 각각의 AAV2.CYP4V2op 및 scAAV1.CYP4V2op 처리는 처리되지 않은 환자 샘플과 비교하여 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플에서 RPE 위축의 구조를 나타내었다(도 8. MOI=1x10e5 GC/세포). 흥미롭게도, 1x10e5 MOI에서 AAV2.CYP4V2op 및 scAAV1.CYP4V2op에 의한 구조 효능은 P1 iPS-RPE에서 보다 P2 iPS-RPE에서 더 높다. 이는 BCD를 치료하기 위한 AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 사용을 위한 최적의 투여량은 환자들 간의 개인차에 기초하여 변할 수 있고, BCD 환자-특이적 iPS-RPE가 상이한 환자에 대한 개별화된 최적 용량을 평가하는데 유용한 도구임을 시사한다.
- [1101] 각각의 AAV5.CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st 및 AAV8.CYP4V2fv 처리는 처리되지 않은 환자 샘플과 비교하여 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플에서 RPE 위축을 구조하였다(도 9. MOI=1x10e5).
- [1102] 각각의 AAV5.CYP4V2op, scAAV1.CYP4V2op 및 scAAV5.CYP4V2op 처리는 처리되지 않은 환자 샘플과 비교하여 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플에서 RPE 위축을 구조하였다(도 10. MOI=1x10e4).
- [1103] scAAV9.CYP4V2op 처리는 처리하지 않은 환자 샘플과 비교하여 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플에서 RPE 위축을 구조하였다(도 11. MOI=1x10e5. 치료 2주 후).
- [1104] 유의적으로, P2 샘플에서 더 낮은 용량(MOI=1x10e4)으로의 AAV.CYP4V2 처리는 P1 샘플에서 동일한 벡터에 의한 더 높은 용량(MOI=1x10e5 GC/세포)의 치료와 유사하거나 더 우수한 결과를 달성하였다. 이는 세포 수준에서 RPE 위축을 구조하는데 있어서 동일하거나 유사한 효능을 달성하기 위해서는 상이한 환자는 상이한 투여량이 필요할 수 있음을 입증하였다. 다시 말해, 동일한 질환을 가진 모든 환자에 대해 하나의 벡터 및 하나의 유사한 용량 수준이 유전자 치료요법에 가장 의학적으로 및 경제적으로 접근하는 것은 아닐 수 있다. 다른 안질환에 대한 BCD 세포 모델 및 유사한 세포 모델은 개별화된 최적 용량에 대한 지침을 제공할 수 있다.
- [1105] 다른 AAV.CYP4V2 벡터를 또한 시험하였으며, 이는 상이한 MOI 수준(1x10e4 및 1x10e5 GC/세포)에서 AAV2tri(Y-F).CYP4V2op 처리(1x10e4의 MOI) 및 AAV5.CYP4V2op(신규)(서열번호 63)을 포함하는 BCD 환자 iPS-RPE 샘플에서 개선된 RPE 위축을 나타낸다. 또한, 세포 생존능 이미지를 ImageJ(Fiji)로 처리하여 iPS-RPE 샘플에서 죽은 및 살아있는 세포의 수를 계수하였다. 각각의 샘플로부터 4개의 상이한 영역/이미지를 사용하여 계수하였고, 동일한 샘플의 다수의 이미지로부터 죽은/살아있는 세포의 비를 평균내었다. 죽은/살아있는 세포비는 AAV.CYP4V2 처리가 BCD 환자-유래 iPS-RPE에서 RPE 세포 위축을 구조하였음을 입증하였다. 예를 들어, WT2의 죽은/살아있는 세포 비는 3.0%이고, P1(AAV.CYP4V2는 처리하지 않음)는 20.87%이며, AAV5.CYP4V2st에 의해 치료된 P1는 9.69%이다. 다른 AAV.CYP42 벡터에 의한 치료는 또한 BCD 환자 iPS-RPE 샘플에서 죽은/살아있는 세포 비를 감소시켰

다.

[1106] 이러한 결과는 다음을 입증하였다:

[1107] (1) 다양한 AAV.CYP4V2 벡터, 발현 카세트 및 CYP4V2 cDNA는 BCD에서 RPE 위축을 구조하고:

[1108] (2) 자가-상보적 AAV 벡터(scAAV)는 구조 효능을 달성하는데 빠르고;

[1109] (3) 효능은 상이한 투여량 수준에서 달성될 수 있다.

[1110] **실시예 14- AAV.CYP4V2 벡터의 안전성 및 임상 용도를 위한 GMP 제작**

[1111] 선행 연구는 CYP4V2가 인간 기관에서 거의 편재적으로 발현되며 눈 내에서 발현 수준은 망막에서 높다는 것을 입증하였다. 또한, AAV 벡터의 안전성이 다른 질환을 위한 유전자 치료요법 연구 및 임상 시험에서 확립되었다. 따라서, AAV.CYP4V2 벡터가 유전자 치료요법에서 사용하기에 안전하다고 기대하는 것이 합리적이다.

[1112] 이 연구에서, 다양한 AAV.CYP4V2 벡터를 사용하여 인간 iPS-RPE 샘플을 고 용량(예를 들어, 1x10e5 MOI)으로 처리하였다. AAV.CYP4V2가 상기 실시예에 기술된 바와 같이 BCD 환자-유래 iPS-RPE 샘플에서 RPE 위축을 구조한 것을 제외하고는, 처리되지 않은 샘플과 AAV.CYP4V2 처리된 샘플 사이의 세포 사멸에 있어 물질적 차이는 관찰되지 않았다. 이는 AAV.CYP4V2 벡터의 안전성을 확립하고, 형질도입된 CYP4V2-암호화 유전자의 높은 수준의 발현이 현저한 독성의 증거없이 달성될 수 있음을 입증한다.

[1113] 세포주에서 시험 이외에, AAV.CYP4V2 유전자 치료요법의 안전성은 또한 동물, 예를 들어 마우스, 랫트 또는 비-인간 영장류에서 및/또는 인간 임상 시험을 통해 시험될 수 있다. 인간 임상 용도를 위한 재조합 AAV 벡터를 생산하기 위해 다양한 제작 방법 및 플랫폼이 이용가능하다. 예를 들어, 제한없이, rAAV 벡터의 GMP 제조는 2-플라스미드 형질감염 방법 또는 3-플라스미드 형질감염 방법을 사용할 수 있고, HEK293, A459 또는 293T와 같은 포유동물 세포주, 또는 바콜로 바이러스/Sf9 세포 플랫폼과 같은 곤충 세포주를 사용할 수 있고, 부착 또는 현탁 세포 배양액을 사용할 수 있다. 또한, 헤르페스 단순포진 바이러스(HSV)-기반 생산 시스템, 단일-용도 생물 반응기(예를 들어, iCELLis), HYPERStacks, 롤러 병(roller bottle) 및 컬럼 크로마토그래피를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 방법, 공정 및/또는 플랫폼이 수율 또는 역가를 증가시키고/시키거나, 순도를 개선하고/하거나, 잠재적인 오염을 방지하는데 사용될 수 있다. 이들 rAAV 벡터의 임상 생산 방법, 공정, 기술 및 플랫폼은 당업계에 공지되어 있으며, 위탁생산 전문기관(CMO) 또는 대학 GMP 시설, 예를 들어 Lonza(USA), Cobra Biologics(UK), 전국 아동 병원(Nationwide Children's Hospital: NCH, 미국 오하이오주 소재), 필라델피아 어린이 병원(Children's Hospital of Philadelphia)(CHOP, USA), WuXi Biologics(중국 및 미국)을 통해 상업적으로 이용 가능하다. 인간 임상 용도를 위한 AAV.CYP4V2 벡터는 본원에 언급된 임의의 하나 이상의 방법, 공정, 기술, 플랫폼 및 GMP 시설 및/또는 당업계에 공지되어 있거나 미래에 개발될 다른 것을 사용하여 제조될 수 있다.

[1114] **실시예 15- BCD를 치료하기 위한 AAV.CYP4V2의 대상체 선택 및 투여**

[1115] AAV.CYP4V2 인간 임상 시험에 대한 예시적인 대상 자격 기준은 다음과 같이 열거된다:

[1116] 포함 기준

[1117] 대상자가 다음의 포함 기준 모두를 충족하는 경우 이들은 연구 참여에 자격이 있다.

[1118] 1. 연구 참여에 대한 의지를 가지고 사전 동의를 제공할 수 있다.

[1119] 2. ≥18세 이상의 연령

[1120] 3. 이종-대립형질(bi-allelic) CYP4V2 돌연변이의 유전적으로 확인된 진단을 받았다.

[1121] 4. 연구 눈의 황반 영역 내에서 임상적으로 볼 수 있는 활성 질환이 있다.

[1122] 5. 연구 눈에 보다 더 우수한 34-73 ETRS 문자의 최상의 교정 시력(best corrected visual acuity, BCVA)(20/40 스넬렌 시력(Snellen acuity)과 같거나 나쁘지만, 20/200 스넬렌 시력과 같거나 좋음)을 갖는다.

[1123] 배제 기준

[1124] 대상자가 임의의 다음의 배제 기준을 충족하는 경우 연구 참여에 자격이 없다.

[1125] 1. 적격한 눈에 약시(amblyopia)의 병력이 있다.

- [1126] 2. AAV로 치료받은 경우 3개월 동안 기구 피임(barrier contraception) 방법을 사용할 수 없다.
- [1127] 3. 안구내 수술이 첫 방문 3개월 이내에 연구 눈에서 수행되었다.
- [1128] 4. 시험자의 의견에 따라, 연구 참여로 인해 대상자를 위험에 처하게 하거나, 연구 결과 또는 대상자의 연구 참여 능력에 영향을 줄 수 있는 다른 중대한 안구 또는 비-안질환/장애를 가진다. 이는 다음을 갖는 대상자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:
- [1129] ● 경구 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론/프레드니손)에 대한 사용 금지 사유(contraindication)
 - [1130] ● 임상적으로 중요한 백내장
 - [1131] ● 연구 시험자의 임상적 견해로 수술 절차(예를 들어, 망막하 수술)의 적절한 후보자가 아닌 사람.
- [1132] 5. 지난 12주 동안 임상 시험용 제품과 관련된 다른 연구에 참여하였거나, 이전의 임의의 시점에서 유전자/세포-기반 치료요법을 받은 경우.
- [1133] BCD를 치료하기 위해 AAV.CYP4V2를 사용하려면, 환자는 BCD의 유전자 또는 분자 확인 진단, 즉 유전자 검사(의학적으로 필요한 경우 단일 유전자 시험 또는 다중 유전자 패널 시험)를 통한 이중-대립형질(bi-allelic) CYP4V2 돌연변이의 확인이 있어야 한다. BCD는 때때로 유전성 망막 장애(IRD), 망막 변성(RD) 또는 망막색소 변성증(RP)으로 진단되기 때문에, AAV.CYP4V2는 또한 유전적으로 확인된 이중-대립형질 CYP4V2 돌연변이를 갖는 IRD, RD 또는 RP의 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [1134] 생체 내 AAV.CYP4V2 치료의 경우, 환자는 광 간섭성 단층촬영기술(optical coherence tomography, OCT) 및/또는 안과 검사에 의해 결정되는 바와 같이 생존할 수 있는 망막 세포를 가져야 한다. 바람직하게는, 환자는 20/200 이상(치료될 눈에서 십진수(Decimal) 0.1)보다 약간의 시력(예를 들어, 이상의 가장 우수한 교정 시력(BCVA))이 남아있어야 한다.
- [1135] 망막에의 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 생체 내 표적 세포(예를 들어 망막 또는 각막 세포)에 AAV.CYP4V2 벡터를 전달하는데 다양한 투여 수단/경로가 사용될 수 있으며, 이는 망막하 주사, 유리체내 주사(유리체내 전달에 적합한 AAV 벡터, 예를 들어, AAV2(Y444F+Y500+Y730F), AAV 7m8 또는 이들의 유도체 사용) 또는 혈류를 통한 전달(혈액-망막 장벽을 통과할 수 있는 AAV 벡터, 예를 들어 AAV9 또는 AAV-PHP.B를 사용)을 통해 수행될 수 있다. 또한, AAV.CYP4V2 벡터는 또한 투여 방식으로서 유리체내 이식되도록 장치에 캡슐화할 수 있다.
- [1136] 유전자 치료요법과 관련된 외과적/투여 방법뿐만 아니라, 전달/형질도입 효율을 개선하기 위한 특정 기술(예를 들어, 내부 제한 막(internal limiting membrane: ILM) 박리 및 유리체 절제술(vitrectomy, VIT))이 당업계에 공지되어 있다. 면역억제제, 예를 들어 코르티코스테로이드는 면역 반응을 최소화하기 위해 AAV 투여 전, 동안 및/또는 후에 사용될 수 있다.
- [1137] 생체 내에서 환자를 치료하는 것 이외에, CYP4V2 유전자 치료요법(AAV.CYP4V2 유전자 치료요법 포함)을 사용하여 시험관 내 표적 세포(예를 들어, BCD 환자의 iPS 유래 RPE 세포, 망막 세포, 각막 상피 세포 또는 각막 세포) 처리 후, 세포 치료요법으로서 이러한 세포를 환자에게 이식할 수 있다. AAV.CYP4V2 벡터를 사용하여 BCD 환자 iPS-RPE 세포를 처리하는 방법은 본원의 실시예 및 개시내용에 제공된다. 예를 들어, 망막 및 각막으로의 세포 임플란트/이식 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, ES-RPE 세포를 망막에 이식하는 동일하거나 유사한 방법 및 외과적 기술을 사용하여 BCD 환자의 iPS-RPE 세포를 이식할 수 있다.
- [1138] 치료학적 유효 용량은 질환 모델(예를 들어, BCD 세포 모델(예를 들어, BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포주)) 또는 동물 모델에서 결정 및 평가하고, 임상 시험에 의해 확인되거나 개선될 수 있다. 시험관 내 세포의 처리를 위해, 용량은 일반적으로 MOI로 나타낸 후, 치료되는 세포의 수에 MOI를 곱한다. MOI는 일반적으로 세포당 약 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC 사이의 범위 또는 세포당 약 100 내지 약 10,000 GC(GC: 게놈 카피, AAV 입자(벡터 게놈 (vg) 또는 게놈 입자(gp)로도 알려져 있음)를 함유하는 게놈 측정)의 감염성 MOI 범위이다. 생체 내 처리의 경우, 투여 경로, 표적화된 세포의 영역의 크기 또는 세포 수, 및 치료되는 대상체(예를 들어, 대상체의 연령, 체중, 질환의 발달 단계 및 상태, 및 잠재적인 면역 반응); 치료를 위해 표적화된 세포의 위치(예를 들어, 망막 대 각막)와 같은 전형적인 임상 인자를 용량을 결정하는데 고려하여야 한다. 또한, 사용되는 AAV.CYP4V2 벡터의 형질도입 효율 및 구조 효능을 또한 고려해야 한다. 마지막으로, 가능한 경우, 환자 별 세포 수준에서 최적 용량의 개별적인 차이가 또한 고려되어야 하며, 이는 환자-특이적 iPS-RPE 세포에서 평가될 수

있다. 따라서, 생체 내에서 눈으로의 단일 국소 투여를 위한 치료학적 유효 용량은 약 1×10^6 내지 약 2×10^{13} GC 정도일 수 있으며, (예를 들어, 약 1×10^{11} GC 내지 약 1×10^{12} GC의 고 용량 범위, 약 1×10^{10} GC 내지 약 1×10^{11} GC의 중간 용량 범위, 약 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{10} GC의 저 용량 범위, 약 1×10^6 GC 내지 약 1×10^9 GC의 매우 낮은 용량 범위 및 약 1×10^{12} GC 내지 약 2×10^{13} GC의 매우 높은 용량 범위), 또는 원하는 효과를 제공하기에 충분한 이러한 범위 내의 임의의 용량일 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 약 1×10^6 내지 약 2×10^{13} GC의 용량으로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 생체 내 투여되는 용량은 치료를 위해 표적화된 세포의 수에 표적 MOI(예를 들어, 세포당 약 1×10^3 GC 내지 약 1×10^6 GC)를 곱하여 결정된다. 눈에 대한 임의의 국소 투여를 위한 rAAV 벡터를 함유하는 제제의 부피는 약 1 μ L(0.001 mL) 내지 약 1000 μ L(1 mL)의 범위일 수 있다. 혈류를 통한 전달에 의한 치료는 훨씬 더 높은 용량을 필요로 하며, 체중 1 kg당 약 1×10^6 내지 약 2×10^{14} GC의 범위일 수 있다.

[1139] "E. 치료 옵션, 대상체 선택 및 투여" 및 추가 설명을 위한 본원의 다른 개시내용을 참조한다.

[1140] **실시예 16- 치료 후 평가**

[1141] BCD의 임상 증상은 많은 다른 유형의 IRD, RD 및 RP의 증상, 예를 들어 시력 손실, 제한된 시야, 야맹증, 암 적응 감소 및 색각, 망막(및 일부 환자의 경우 각막에서)의 변화 및 망막전위도(ERG)에 대한 반응의 감소와 유사하기 때문에, 관련 측정을 사용하여 환자의 질환 상태 및 치료 전 및 후 진행을 평가하여 치료 결과를 평가할 수 있다. 이러한 측정 및 관련 실험 및 시험은 망막 및 각막 질환에 대해 당업계에서 공지되어 있다. 예를 들어, 제한없이, 최상의 시력 교정(시력 차트 사용)은 제2의 결과 척도로서 다음 중 하나 이상과 함께 BCD 유전자 치료요법에 대한 주요 결과 척도로서 사용될 수 있다: 마이크로페리메트리(microperimetry)(민감도 변화), 펀더스자가형광(fundus autofluorescence: AF)(AF의 변화), 광간섭 단층 촬영장치(OCT)(타원 구역 및 망막 두께), 대비 민감도(펠리-롭슨 차트(Pelli-Robson chart)), 색각(파른스위쓰-문셀(Farnsworth-Munsell) 100 휴 시험(hue test)) 및 ERG(ERG의 변화). 또한, 이동성 시험과 같은 기능적 시험을 또한 1차(primary) 또는 2차(secondary) 결과 척도로서 사용될 수 있다. 평가는 치료 후 상이한 시점, 예를 들어 2주, 1 개월, 2개월, 3개월, 6개월 및 12개월 쯤에 수행될 수 있다. 결과는 치료 결과를 평가하는데 사용될 수 있다. 효능은 다음 중 하나로 나타낼 수 있다: 1차 또는 2차 결과 측정 중 하나 이상 개선, 질병 진행의 중지, 또는 망막 변성 또는 시력 상실의 예상 속도보다 느림(필요한 경우 자연사(natural history) 연구 데이터를 사용함으로써).

[1142] **실시예 17: 유전자 치료요법에서 면역 반응을 감소시키고 개별 차이를 다루는 방법**

[1143] 바이러스 벡터-매개성 유전자 치료요법은 세포, 국소 또는 전신성 면역 반응을 유발할 수 있으며, 이는 안전 위험을 초래할 수 있다. 면역 반응은 또한 형질도입 효율을 감소시켜 바이러스 벡터-매개성 유전자 치료요법의 치료 효과를 감소시킬 수 있다. 면역 반응은 림프 또는 혈액에 있는 항원 또는 병원체를 인식하는 체액 반응(또는 항체-매개성 반응), 및/또는 세포-매개성 면역성의 형태로 발생할 수 있다. 면역 반응을 최소화하기 위해, 코르티코스테로이드와 같은 면역억제제를 종종 유전자 치료요법 투여와 함께 사용한다. 면역억제제 약물은 예를 들어, 안압 상승, 백내장 및 다른 부작용(예를 들어, 면역억제제의 장기간 사용은 암의 위험을 증가시킬 수 있음)을 유발할 수 있다. 면역 반응 이외에, 예를 들어 벡터의 상이한 유형(예를 들어, 상이한 혈청형 또는 상이한 캡시드 돌연변이/구조)에 대한 반응, 또는 동일한 용량에서 동일한 벡터에 대한 반응으로 환자간에 다른 개인차가 존재한다.

[1144] 바이러스 벡터 매개성 유전자 치료요법에서, 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시키고/시키거나, 형질도입 효율을 유지하고/하거나, 바이러스 벡터 및/또는 면역억제제 용량을 낮추고/거나 동일한 유전 질환의 상이한 환자에 대한 치료 효과를 극대화시키는 방법은 다음을 포함한다:

[1145] (a) 유전자 치료요법을 위한 표적 세포 유형에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 하나 이상의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)의 풀을 확립하는 단계. 바이러스 벡터 풀은 이러한 돌연변이 또는 변이체가 질환과 관련된 표적 세포(예를 들어, BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법의 경우 iPS-RPE 또는 RPE 세포주)에서 충분한 형질도입 효율을 갖는 것으로 확인된 후, 상기 바이러스 벡터의 캡시드 상에 항원성 영역 돌연변이 또는 다른 돌연변이 또는 변이체를 갖는 변이체를 생성함으로써 증식될 수 있음.

[1146] (b) 유전자 치료요법을 필요로 하는 대상체에서 상이한 바이러스 벡터 혈청형 및/또는 캡시드 돌연변이 또는 변이체에 대한 기존의 중화 항-바이러스 벡터(Nab)를 검출하고/하거나, 이러한 대상체로부터 유래되는 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포)에서 상이한 바이러스 벡터를 시험하고 비교하는 단계.

[1147] (c) (i) 질환 표적 세포에서의 충분한 형질도입 효율 및 (ii) 대상체에서 기존의 Nab와 낮은 교차-반응성, 및/

또는 (iii) 대상체의 환자-특이적 질환 표적 세포(예를 들어, BCD에 대한 CYP4V2 유전자 치료요법을 위한 환자-특이적 iPS-RPE 또는 RPE 세포주)에서의 우수한 표현형 구조 결과를 갖는 상기 바이러스 벡터의 풀로부터 바이러스 벡터를 선택하는 단계, 여기에서 이러한 바이러스 벡터의 풀은 상이한 혈청형 및 캡시드-변형된 바이러스 벡터(예를 들어, 캡시드-돌연변이체 AAV 및/또는 캡시드 단백질 변이체 AAV를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함함,

- [1148] (d) 대상체에게 투여하기 위해 단계 (c)로부터 선택되는 바이러스 벡터를 사용하는 단계,
- [1149] (e) 대상체가 유전자 치료요법 투여를 요구할 때마다 단계 (b) 내지 (d)(기존의 Nab와 관련된 부분만)를 반복하는 단계, 이는 동일한 눈에 대한 후속 투여 또는 반대쪽 눈 또는 다른 기관에 대한 투여를 포함하나 이에 한정되지 않음.

[1150] 구체적으로, 본 연구에서 5개의 상이한 AAV(AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 및 AAV9) 혈청형 및 캡시드 돌연변이체 AAV(AAV2.tri(Y-F))를 포함하는 다양한 rAAV 벡터를 생성시키고 시험하여, 상이한 환자 중에서의 차이를 평가하였다.

[1151] **실시예 18: 망막 질환의 신속한 구조에서의 scAAV의 사용 및 안질환을 치료하는데 있어서 scAAV 또는 AAV 벡터에서의 EFS 및/또는 SPA의 사용**

[1152] 상기 실시예 13에 입증된 바와 같이, scAAV.CYP4V2 처리는 BCD 환자 iPS-RPE 세포에서 매우 짧은 시간(단 4일)에 생화학적 표현형의 강력한 구조를 달성하였다. 또한, scAAV.CYP4V2는 AAV 처리 2주 후 BCD 환자 iPS-RPE 세포주에서 RPE 위축을 나타내었다(도 11 참조). scAAV 벡터에서 EFS 프로모터(서열번호 35에 나타낸 예시적인 서열) 및 SPA(서열번호 36에 나타낸 예시적인 서열)에 의해 유도되는 인간 iPS-RPE 세포에서의 빠르고 강력한 발현은 인간 안구 세포에서의 이식유전자 발현을 유도하고 인간 안질환을 치료하는데 있어서의 EFS 프로모터 및/또는 SPA의 적합성을 입증하였다. EFS 프로모터 및 SPA를 갖는 scAAV 벡터에 의해 달성되는 신속한 구조는 빠르게 진행되는 질환 또는 진행된 질환 단계의 환자를 치료하는데 특히 유용하다.

[1153] 또한, 본 연구는 인간 망막 세포에서 scAAV 설계의 신속하고 강력한 발현을 입증하였다. scAAV-매개성 유전자 치료요법은 조기 발병 망막 질환 환자를 치료하거나 신속한 구조를 필요로 하는 말기 환자를 치료하는데 특히 유용하다.

[1154] **CYP4V2 유전자 치료요법에 있어서의 논의**

[1155] BCD는 현재 승인된 이용가능한 치료법이 없는 희귀 실명 질환이다. BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포주의 사용을 포함하는 임상 연구에서, BCD 환자-특이적 iPS-RPE 세포에서 표현형을 구조하는 다양한 AAV.CYP4V2 벡터 및 발현 카세트 설계의 효능이 본 연구에서 지방산 및 지질 검정을 통해 평가된 바와 같이 입증되었다. 또한, 생체내 치료를 위한 용량 범위를 결정하기 위한 지침으로의 역할을 할 수 있는 상이한 용량(MOI)을 시험하였다. 마지막으로, AAV.CYP4V2 유전자 치료요법과 관련된 독성의 유의적인 증거는 없다.

[1156] **세포 치료요법 및 CRISPR 유전자-편집 치료요법 실시예**

[1157] **실시예 19 - 세포 치료요법에서 BCD 대상체로부터의 iPSC, iPS-RPE 또는 iPS-안구 세포의 사용**

[1158] BCD는 비교적 발병이 늦은 질환이다. BCD 환자의 증상은 대개 생애의 20대, 30대 또는 심지어 40세대 발생한다. 또한, iPS 재프로그램 프로세스는 때때로 "시계 재설정(reset the clock)" 효과를 가질 수 있다. 따라서, BCD 환자로부터 유래되는 iPS-RPE 세포 및 다른 iPS-안구 세포는 심지어 iPS-RPE 세포에서 CYP4V2 돌연변이의 임의의 유전자 복구 없이도 BCD 환자에게 이식하기 위한 세포 치료요법으로서 사용될 수 있다.

[1159] 대안적으로, BCD 환자로부터 유래되는 iPSC, iPS-RPE 세포, iPS-PRC, iPS-CE 세포, iPS-CEC 및/또는 다른 iPS-안구 세포는 세포 치료요법 이식 전에 유전자 복구될 수 있다. 유전자 복구는 상기 실시예에 기술된 바와 같은 CYP4V2 유전자 치료요법 또는 유전자 편집에 의해 달성될 수 있다. 유전자 편집 있어 보다 상세한 설명에 대해서는 본원의 실시예를 참조한다.

[1160] **실시예 20-안구 세포 치료요법을 위한 유전자 복구된 환자 자가 세포**

[1161] 환자-특이적 iPSC 유래되는 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포, iPS-CEC, iPS-CE 세포, iPS-PRC, 또는 iPS-안구 세포)는 망막 및 각막 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 안질환에 대한 세포 치료요법에서 이식을 위한 자가 세포 공급원으로서 사용될 수 있다. ES 세포(예를 들어, ES-RPE 세포, ES-CEC 또는 ES-PRC 및 이러한 ES-유래 세포로 제조된 조직)와 같은 동종이계 공급원으로부터 생성된 세포 또는 다른 개체의 iPS 세포와 비교하여, 이

러한 환자-특이적 iPSC-유래 자가 세포 및 이러한 세포로부터 제조된 조직은 일반적으로 환자의 면역 억제를 거의 또는 전혀 필요로 하지 않으며, ES 및 ES-유래 세포의 사용과 관련된 윤리적 문제를 갖지 않는다.

[1162] 그러나, 환자 공급원 세포(예를 들어, 섬유아세포 또는 혈액 세포)로부터 생성된 iPSC 및 이러한 환자-특이적 iPSC(예를 들어, 환자-특이적 iPSC-RPE 세포, iPSC-PRC, iPSC-CEC, iPSC-CE 세포 및 iPSC-안구 세포)로부터 유래된 세포 및 조직은 여전히 질환-유발 돌연변이 및 관련된 표현형을 갖는다. 건강한 환자-유래되는 세포 및/또는 조직을 생성하기 위하여, 병리학적 돌연변이는 규칙적으로 간격을 띄고 분포하는 짧은 회문 반복부(CRISPR)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자 편집 기술을 이용하여 유전자 복구되거나 교정될 수 있으며, 이는 환자 세포에서 표적 돌연변이를 교정하도록 설계될 수 있다. 이들 유전자 복구된 건강한 iPSC는 이후 더 이상 환자의 병리학적 돌연변이를 갖지 않는 다양한 세포 유형(예를 들어, iPSC-RPE 세포, iPSC-CEC, iPSC-CE 세포, iPSC-PRC 또는 다른 iPSC-안구 세포)를 생성하는데 사용될 수 있다.

[1163] 또한, 이러한 개념 증명 연구는 이러한 유전자-교정된 iPSC 및/또는 유전자-교정된 iPSC-유래 세포(예를 들어, iPSC-RPE 세포)가 환자로부터의 (교정되지 않은) iPSC-유래 세포에서 관찰되는 바와 같은 (생물검정, 예를 들어, 지질학 및/또는 단백질학에 의해 평가되는 바와 같은 비정상적인 생화학적 프로파일) 표현형을 더 이상 갖지 않음을 입증한다. 따라서, 이러한 유전자-교정된 세포는 세포 치료요법에서 대체 세포로서 사용될 수 있는 재생성의, 유전자 복구된 자가 세포의 공급원으로서의 역할을 한다. 유전자-교정된 환자 자가 세포와 관련된 조성물 및 방법은 본원 및 하기 실시예에 상세히 기술되어 있다.

[1164] 다른 유형의 유전자 복구된 환자 세포는 상기 본원에 기술된 바와 같이 유전자 보충 치료요법(예를 들어, CYP4V2 유전자 치료요법)에 의해 치료되는 환자 iPSC 또는 iPSC-유래 세포(예를 들어, iPSC-RPE 세포, iPSC-PRC, iPSC-CE 세포, iPSC-CEC 및 iPSC-안구 세포, iPSC-뉴런 세포)이다. 유전자 치료요법 치료 후, 환자-특이적 세포는 돌연변이된 유전자(예를 들어, cDNA)의 건강한 카피를 지니고/지니거나 건강한 이식유전자에 의해 암호화된 기능적 단백질을 발현한다. 또한, 유전자 치료요법 치료된 환자-특이적 세포는 치료되지 않은 환자 세포에서 관찰된 개선되거나 정상화된 생화학적 프로파일 또는 다른 표현형을 입증한다. 따라서, 이들은 또한 세포 치료요법, 예를 들어, BCD에 대한 세포 치료요법에서 사용하기 위한 유전자 복구된 환자 자가 세포로서 BCD 환자-특이적 iPSC-RPE 세포, iPSC-PRC, iPSC-CEC, iPSC-CE 세포 및 iPSC-안구 세포로 처리되는 CYP4V2 유전자 치료요법에서 대체 세포로서 사용하기 위한 유전자 복구된 자가 세포의 공급원으로서 사용될 수 있다. CYP4V2 유전자 치료요법으로 처리된 BCD 환자-특이적 세포와 관련된 조성물 및 방법은 상기 본원의 실시예에 상세히 기술되어 있다. 하기 본원의 논의는 게놈 DNA에서 돌연변이를 교정함으로써 유전자 복구의 유형에 초점을 맞추고 있다.

[1165] 유전자 돌연변이와 관련된 안구 및 망막 변성 질환을 위한 자가 세포 대체는 유전자 편집을 통해 돌연변이를 유전적으로 교정함으로써 환자의 병리학적 돌연변이를 복구하거나, 이식 전에 돌연변이의 결과를 복구하거나 개선시키는(예를 들어, 질환 유전자와 관련된 이식유전자의 건강한 카피의 전달, 예를 들어 CYP4V2 유전자 치료요법을 통해) 능력에 의존한다. 여기에서, 가장 일반적인 CYP4V2 돌연변이(c.802-8_810del117insGC)를 갖는 BCD 환자로부터 환자-특이적 iPSC를 생성하고, 이러한 돌연변이를 교정하기 위한 CRISPR 유전자-편집 성분(CRISPR 가이드 RNA 및 공여체 주형) 및 다양한 구조체(플라스미드 및 RNP)를 개발하였다. 비록 본원에서 유전자 편집을 위한 수단으로서 CRISPR/Cas9가 사용되지만, TALEN을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 CRISPR 시스템(예를 들어, Cpf1) 및 다른 유전자 편집 기술뿐만 아니라, CRISPR/Cpf1과 같은 도래하는 및 미래의 유전자 편집 기술을 사용하여 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 또한 유전자 편집은 iPSC 뿐만 아니라 iPSC를 생성하는데 사용될 원래의 공급원 세포뿐 및 iPSC로부터 생성된 세포에도 적용되어, 이러한 세포에서 병원성 돌연변이(들)를 교정할 수 있을 것으로 예상된다.

[1166] iPSC-유래 세포주는 환자-특이적 기반으로 생성되지만, 세포 치료요법에 적용할 필요는 없다. iPSC-기반 세포 치료요법의 광범위한 사용을 제한하는 주요 인자는 인간 개인의 면역학적 차이이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 접근법에는 여러 가지가 있다. 예를 들어, 하나의 접근법은 일반적인 HLA 일배체형을 갖는 제한된 수의 세포주를 함유하고 환자 집단의 대부분과 면역학적 매칭을 달성하도록 설계된 다수의 세포 은행을 개발하는 것이다. 이러한 세포 은행은 선택된 일배체형을 갖는 환자로부터 iPSC를 생성하거나 HLA 유전자형의 유전자 조작에 의해 생성할 수 있다. 다른 접근법은 환자의 유전자형과 관계없이 면역학적으로 침묵할 수 있는 세포 유형을 생성하는 것이다.

[1167] 다음은 유전자 복구된 환자-특이적 자가 세포를 생성하는 방법, 세포에서 유전자 복구의 영향을 평가하는 방법, 및 세포 치료요법에서 이들을 사용하는 방법을 기술한다. 본원에 제공된 실시예는 BCD 환자 중에서 가장 흔한 돌연변이인 CYP4V2 유전자에 c.802-8_810del117insGC 돌연변이를 갖는 BCD 환자로부터 유전자 복구된 환자 자가

세포를 생성하는것에 관한 것이다. 동일한 방법을 사용하여 CYP4V2에 상이한 돌연변이를 갖는 환자, 또는 안질 환과 관련된 다른 유전자에 돌연변이를 갖는 환자, 또는 안질환과 관련된 다른 유전자에서의 돌연변이, 또는 표 4에 포함된 임의의 유전자를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 유형의 질환과 관련된 돌연변이를 갖는 환자로부터 유전자 복구된 환자 자가 세포를 생성할 수 있다.

[표 4]

표적 유전자 목록

ABCA4, ABCC6, ABHD12, ADAM9, AHI1, AIPL1, ALMS1, ARL13B, ARL6, ARMS2, ATXN7, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BEST1, C1QTNF5, C2, C2orf71, C3, C5orf42, C8orf37, CA4, CABP4, CACNA1F, CACNA2D4, CAPN5, CC2D2A, CDH23, CDH3, CDHR1, CEP164, CEP290, CEP41, CERKL, CFB, CFH, CHM, CHR2, CIB2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLRN1, CNGA1, CNGA3, CNGB1, CNGB3, CNM4, COL11A1, COL2A1, COL9A1, CRB1, CRX, CYP4V2, DFNB31, DHDDS, EFEMP1, ELOVL4, ERCC6, EYS, FAM161A, FBLN5, FLVCR1, FSCN2, FZD4, GNAT1, GNAT2, GNPTG, GPR143, GPR179, GPR98, GRK1, GRM6, GRN, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, HARS, HMCN1, HTRA1, IDH3B, IFT140, IFT80, IMPDH1, IMPG2, INPP5E, INVS, IQCB1, ITM2B, JAG1, KCNJ13, KCNV2, KCTD7, KIF11, KLHL7, LCA5, LRAT, LRIT3, LRP5, LZTFL1, MAK, MERTK, MFN2, MFRP, MFSD8, MKKS, MKS1, MT-ND4, MTP, MYO7A, NDP, NEK4, NEK8, NMNAT1, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NR2E3, NRL, NUB1, NYX, OA1, OAT, OCA1, OCA2, OFD1, OPA1, OPA3, OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW, OTX2, PANK2, PAX2, PCDH15, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PDE6H, PDGF, PDZD7, PEX1, PEX10, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX5, PEX6, PEX7, PGK1, PHYH, PITPNM3, PLA2G5, PPT1, PRCD, PROM1, PRPF3, PRPF31, PRPF6, PRPF8, PRPH2, RAB28, RAX2, RBP3, RBP4, RD3, RDH12, RDH5, RDS, RGR, RGS9, RGS9BP, RHO, RIMS1, RLBP1, ROM1, RP1, RP1L1, RP2, RP9, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, RS1, SAG, SDCCAG8, SEMA4A, SLC24A1, SLC45A2, SNRNP200, SPATA7, TEAD1, TIMM8A, TIMP3, TLR3, TLR4, TMEM126A, TMEM231, TMEM237, TMEM67, TOPORS, TPP1, TREX1, TRIM32, TRPM1, TSPAN12, TTC21B, TTC8, TTPA, TULP1, TYR, TYRP1, UNC119, USH1C, USH1G, USH2A, VCAN, VPS13B, WDPCP, WDR19, WFS1, WHRN, ZNF423, ZNF513, ACO2, AFG3L2, AUH, C12orf65, CISD2, CYP1B1, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPTN, PAX6, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, ATXN2, ROBO3, PHOX2A, HOXA1, SALL4, CHN1, TUBB3, KIF21A, HOXB1, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, CYP46A1

예로서, CYP4V2 돌연변이를 갖는 질환인 BCD를 사용하여, BCD 환자의 특이적 돌연변이를 보유하는 환자-특이적 세포로부터 iPSC를 생성하였다. 환자-특이적 iPSC를 CRISPR 가이드 RNA (gRNA), Cas9 엔도뉴클레아제, 및 공여 체 상동(homology) 주형으로 형질감염시켰다. CYP4V2 유전자 카피는 돌연변이 교정 및 야생형 대립형질로의 전환을 나타낸다. 이어서 교정된 iPSC를 사용하여 유전자-교정된 iPS-RPE 세포를 생성한다. 그 후, 유전자-교정된 iPS-RPE 세포를 시험하여 이들이 더 이상 표현형(예를 들어, 비정상적인 생화학적 프로파일(예를 들어, 지방산 프로파일))을 가지지 않음을 확인한다. 이들 유전자 복구된 환자 자가 세포는 BCD에 대한 자가 세포 치료요법으로서 동일한 환자에게 이식(직접 (예를 들어, 세포 현탁액) 또는 다른 형태, 예를 들어, 레이저, 시트, 매트릭스, 스캐폴드 또는 조직의 일부)될 수 있다.

(i) BCD 환자-특이적 iPSC 세포주의 생성:

iPSC 를 본원에 기술된 바와 같이 CYP4V2 유전자에 동형 c.802-8_810del117insGC 돌연변이를 갖는 BCD 환자의 환자-특이적 세포로부터 생성하였다. 환자-특이적 iPSC를 생성하는 방법에 대해서는 실시예 1을 참조한다. BCD 환자의 돌연변이는 서열분석으로 확인하였다.

(ii) CRISPR 유전자 편집 성분 및 돌연변이를 표적화하는 구조체의 설계, 스크리닝 및 선택

CRISPR 유전자 편집 치료요법에 있어서 상세한 설명에 대해서는 본원의 실시예를 참조한다.

(CRISPR gRNA를 선택하여 오프-타겟 편집을 최소화하고, 돌연변이 부위에 바로 모여 있는(directly centered) 표적 서열과의 특이성을 최대화하였다. 환자-특이적 CYP4V2 돌연변이를 함유하는 영역에 대해 높은 특이성을 갖는 다수의 gRNA를 스크리닝하였다. 후보 gRNA를 표적 DNA 절단을 매개하는데 관여하는 Cas9 엔도뉴클레아제를 또한 함유하는 발현 벡터에 별도로 삽입하고, 293 세포주에 형질감염시켰다. 환자로부터의 게놈 DNA를 CYP4V2 영역에 대한 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시키고, PCR 생성물을 DNA 절단 활성에 대해 분석하였다. 조사 검정을 사용하여 어느 gRNA 후보가 돌연변이 부위에 대해 비교적 높은 활성을 가지는지를 확인하였다. 절단 효율이 가장 높은 gRNA 를 유전자 편집에 사용하였다.)

- [1177] (iii) iPSC에서 유전자 편집:
- [1178] CRISPR 유전자 편집 치료요법에 있어서 상세한 설명에 대해서는 하기 실시예를 참조한다.
- [1179] BCD와 같은 유전적 열성 질환의 경우, 하나의 대립 유전자(allele) 또는 돌연변이내 유전자 교정으로 충분하다. 상이한 돌연변이를 표적으로 하는 다수의 CRISPR 구조체를 사용하여 세포에 잠복된 다수의 돌연변이를 교정할 수 있다.
- [1180] (iv) 유전자 교정된 iPSC로부터의 iPS-RPE 세포 또는 다른 iPS-안구 세포의 생성:
- [1181] 서열분석을 통해 오프-타겟 편집이 없거나 최소인 병원성 돌연변이의 정밀한 교정을 확인한 후, 유전자 편집에 의해 교정된 iPSC를 사용하여 iPS-RPE 세포 또는 본원에 기술된 관련 질환에 의해 영향을 받는 다른 유형의 iPS-안구 세포(예를 들어, iPS-PRC, iPS-CEC, 또는 iPS-CE 세포)로 분화시키고 생성시켰다. BCD 환자로부터 유래된 교정된 iPS-RPE 세포를 이후 동일한 RPE 운명 확인(예를 들어, 별개의 RPE 형태(예를 들어, 색소 및/또는 6각형 형태) 및/또는 RPE-특이적 마커)을 거쳤다
- [1182] (v) 표현형이 없음을 확인하기 위한 생물검정
- [1183] 생물검정을 사용하여 이러한 유전자-교정된 iPSC 및/또는 유전자-교정된 iPS-유래 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포)가 환자로부터 (교정되지 않은) iPS-유래 세포에서 관찰된 바와 같은 표현형을 더 이상 가지지 않음을 확인하였다. 생물검정은 특정 질환과 관련되어 있는 환자 세포에서 세포 및/또는 분자 수준 표현형을 확인하고 평가할 수 있는 임의의 유형의 생물학적 검정일 수 있다. 예를 들어, 지질학, 단백질학, 단백질 발현 및/또는 다른 생화학적 시험을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. BCD의 경우, 생물검정은 본원의 실시예에 기술된 바와 같은 지방산 및 세라마이드 시험을 포함한다. 결과는 BCD 환자로부터 유래되는 이러한 유전자 교정된 iPS-RPE 세포가 더 이상 BCD 환자로부터 유래되는 교정되지 않은 iPS-RPE 세포에서 관찰되는 바와 같은 관련된 생화학적 결함/기능장애를 더 이상 가지지 않음을 나타낸다. 이는 유전자-교정된 iPS-RPE 세포에 표현형이 없으므로, 세포 치료요법에 적합한 대체 세포의 공급원임을 입증한다.
- [1184] (vi) 이식:
- [1185] 이들 유전적으로-복구된 환자 자가 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포, iPS-PRC, iPS-CE 세포, iPS-CEC 및 다른 iPS-안구 세포)는 BCD에 대한 세포 치료요법으로서 동일한 환자에 이식(직접 또는 층, 시트, 매트릭스, 스캐폴드 또는 조직의 일부로서)될 수 있다.
- [1186] **실시예 21- 안질환에 대한 CRISPR 유전자 편집 치료요법의 구체적인 예**
- [1187] CRISPR/Cas9는 gRNA가 올바르게 설계될 때는 매우 특이적이지만, 특히 CRISPR이 임상 용도로 개발되므로 특이성 및 오프-타겟 편집은 여전히 주요 관심사이다. 다음의 실시예는 안질환을 치료하는데 사용하기 위한 높은 타겟팅(on-target) 특이도 및 오프-타겟 편집 위험이 낮은 CRISPR 유전자 편집 치료요법 구조체를 개발하기 위한 방법을 상세히 설명한다. 또한, c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 모든 공지된 CYP4V2 돌연변이 및 다른 유전적 안질환 중에서 교정하기 위한 가장 어려운 돌연변이 중 하나를 나타낸다. 대부분의 CYP4V2 돌연변이는 단일 뉴클레오타이드 변경, 삽입 또는 결실(참조: 표 1: BCD 환자 중에서 CYP4V2 돌연변이 선택)인 반면, c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 17 bp 결실 및 2 bp 삽입, 및 인트론 및 엑손 둘 다를 포함한다.
- [1188] 가장 흔한 병리학적 CYP4V2 돌연변이(c.802-8_810del17insGC 돌연변이)를 교정하기 위한 여러 세트의 CRISPR 유전자 편집 치료요법 구조체를 설계하고 제작하였다. 다음은 돌연변이를 교정하고 BCD를 치료하기 위한 이러한 CRISPR CYP4V2 유전자 편집 구조체의 설계, 이를 사용하기 위한 조성물 및 방법에 대한 상세한 설명이다.
- [1189] (a) 돌연변이의 분석
- [1190] c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 인트론 및 엑손, 및 결실 및 삽입 둘 다를 포함하며, 이는 스플라이스 수용체 부위에 영향을 미친다.
- [1191] c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 CYP4V2 유전자의 인트론 6의 끝으로부터 8개의 염기에서 시작하는 위치에 2개의 염기(GC)가 삽입된 17개의 염기 결실을 지칭하며, 이는 또한 IVS6-8 del/insGC라고도 한다: c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 포함하는 인간 CYP4V2 게놈 DNA 영역의 서열을 나타내는 서열번호 46 및 상응하는 야생형 서열을 나타내는 서열번호 47을 참조한다. c.802-8_810del17insGC 돌연변이는 인간 CYP4V2 인트론 6-엑손 7 연결부를 나타내는 다음 서열에 나타나 있다. 인트론 6 서열은 소문자로 표시되고, 엑손 7 서열은 CAP 문자로 표시된다. 17 bp 결실 및 GC의 삽입은 괄호안에 있다: caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac

agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA)는 엑손 7의 스킵핑을 야기하는 것으로 예상된다. 야생형 CYP4V2는 다음 서열을 갖는 반면: CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA(T CAT ACA GGT CAT CGC T)GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (서열번호 47), c.802-8_810del17insGC 돌연변이체 CYP4V2는 다음 서열을 갖는다: CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA(G C)GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (서열번호 46). 야생형 서열에서 괄호안의 뉴클레오타이드는 결실된 17개 뉴클레오타이드이고, 돌연변이체 서열에서 괄호안의 뉴클레오타이드는 17개 염기쌍 결실 후 삽입된 2개의 뉴클레오타이드이다.

[1192] CRISPR을 사용하여 우수한 복구율을 달성하기 위하여, Cas는 돌연변이된 서열에 가능한 근접하게 절단을 생성하는 것이 바람직하다. c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 함유하는 CYP4V2 게놈 DNA의 영역은 다수의 SpCas9 PAM 부위(NGG)를 갖는다. 따라서, 규칙적인 SpCas9를 사용하여 이러한 돌연변이를 교정할 수 있다. 대안적으로, 다른 종의 Cas9, 돌연변이된 Cas9 또는 상이한 PAM를 갖는 다른 CRISPR 뉴클레아제(예를 들어, Cpf1)(예를 들어, 돌연변이된 서열 내에 존재하는 Cpf1에 대한 TTN)를 사용하여 c.802-8_810del17insGC 돌연변이 및/또는 다른 돌연변이를 교정할 수 있다.

[1193] (b) CRISPR gRNA 설계 및 선택

[1194] CYP4V2 유전자의 c.802-8_810del17insGC 돌연변이 영역에 존재하는 다양한 PAM 부위에 기초하여, 다수의 관련된 프로토스페이스서 요소 서열(본원에서 gRNA로 지칭됨, 전형적으로 20 nt 길이이고 상이한 길이로 존재할 수 있음, 예를 들어, Cas9로 사용하는 경우 17-22 nt)을 DeskGen 소프트웨어를 사용하여 스크리닝하였다. 5개의 gRNA 후보물질을 다음 기준을 사용하여 선택하였다: a) 표적 교정 부위에 대한 gRNA/Cas9 절단 부위의 근접성; 및 b) gRNA의 예측된 오프-타겟 프로파일(참조: 표 5 및 도 12: gRNA 서열의 경우 서열번호 48 내지 52 참조).

[1195] [표 5]

[1196] gRNA 후보물의 서열

gRNA	오프-타겟	서열
CYP4V2 g1	87	5' -TGA TTA TCA TTC AAA GCG AA CGG-3'
CYP4V2 g2	98	5' -GAT TAT CAT TCA AAG CGA AC GGG-3'
CYP4V2 g3	73	5' -GAT AAT CAC ATG CTT CTG TT TGG-3'
CYP4V2 g4	70	5' -TTC ATT GGC GTT CAT TTC AT TGG-3'
CYP4V2 g5	32	5' -CAC ATG CTT CTG TTT GGA CT TGG-3'

[1197] 각각의 gRNA 후보물질에 상응하는 PAM 부위는 굵은 활자체로 강조하였다. 혼란을 피하기 위하여, PAM 서열은 gRNA (프로토스페이스서 요소) 서열의 일부가 아니다.

[1199] (c) 환자 게놈 DNA를 사용한 gRNA 확인

[1200] 동형접합 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는 BCD 환자(P1)의 게놈 DNA를 사용하여 gRNA를 선택하고 확인하였다. 돌연변이 부위 및 다양한 표적 부위를 함유하는 CYP4V2의 영역을 플랭킹하는 DNA 앰플리콘을 프라이머로서 제조하였다(표 6 및 도 12를 제조). DNA 앰플리콘, 시험관내 전사(*in vitro* transcription, IVT)에 의해 제조된 단일 가이드 RNA(sgRNA)(각각 gRNA1, gRNA2, gRNA3, gRNA4, 또는 gRNA5 중 하나를 포함) 및 SpCas9 단백질을 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 활성 sgRNA는 Cas9 단백질을 매개하여 앰플리콘에서 이중 가닥 절단을 생성하고, 다양한 단편 양식을 나타내었다(표 7). 반응물을 로딩하고 DNA 단편을 1.5% 아가로스 겔 상에서 분해하였다(도 13).

[1201] [표 6]

[1202] gRNA 확인에 사용된 프라이머

	서열	앰플리콘 (bp)
CYP4V2 1F	5' -CAG AAA TCG CAA GCA TAG AGG GTG AAT TCA-3'	1062bp
CYP4V2 1R	5' -CTG TTG GAG GGC TCT TAA CTG TCC-3'	

[1203] [표 7]

[1204] [표 7]

[1205] 활성 gRNA에 의해 생성된 예측된 DNA 단편

gRNA	DNA 앰플리콘 크기	단편 크기 (bp)	
g1	1062bp	442	620
g2		443	619
g3		416	646
g4		455	607
g5		410	652

[1206]

[1207] 단편이 실제로 앰플리콘으로부터 유래되는지를 확인하기 위하여, 처리되지 않은 앰플리콘의 DNA 샘플(도 16, 상부 패널) 및 g2-처리된 가장 작은 단편(도 16, 중간 패널)을 생거 서열분석(Sanger sequencing) 하였다(도 14). 5개의 gRNA모두 예측된 절단 활성을 나타내었다.

[1208] 돌연변이를 갖는 환자 게놈 DNA에서의 확인에 추가하여 또는 그 대신에, gRNA 활성을 또한 체세포, 줄기 세포, iPSC, 또는 줄기 세포로부터 유래되는 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 환자 세포에서 확인할 수 있다.

[1209] (d) gRNA 발현 벡터의 제작

[1210] 각각의 활성 gRNA의 이중 가닥 올리고 카세트를 삽입함으로써 최대 활성 및 최대 오프-타겟 점수를 갖는 3개의 gRNA(g1, g2 및 g3) 를 pX-U6-CBh-Cas9-Puro gRNA 발현 벡터에 클로닝하였다. g1, g2 및 g3의 gRNA 서열 중 하나에 기초하여 각각의 카세트를 합성하였다. 발현 벡터의 제작 및 gRNA의 삽입 부위를 나타내는 개략도는 도 15 및 도 16에 나타낸다. 전체 IVT sgRNA 서열(서열번호 55(프로토스페이서 요소 서열 또는 선택적 "G"를 포함하지 않음))에 이어 U6 프로모터를 나타내는 보다 상세한 설명(예로서 g1 사용)에 대해서는 도 17을 참조한다. 각각의 프로토스페이서 요소(gRNA) 서열의 시작에 삽입된 "G" 뉴클레오타이드(서열번호 59)는 선택적이다. 이는 주로 U6 프로모터의 전자 효율을 향상시키기 위한 것이다. 프로토스페이서 요소 서열이 "G" 잔기로 시작하거나 비-UT 프로모터가 사용되는 경우(예를 들어, H1 프로모터), 이는 필요하지 않다. 모든 gRNA 구조체가 제한 효소 분해 및 서열 분석 둘 다에 의해 확인되었다.

[1211] 상부 gRNA(g1, g2 또는 g3)를 발현하고 hSpCas9 및 푸로마이신 내성 유전자, 즉 pX459-hSpCas9-2A-Puro를 공-발현하는 3개의 플라스미드를 각각 개발하고(도 15 및 16), c.802-8_810del17insGC 돌연변이의 유전자 교정을 위한 구조체 중 하나로서 포함시켰다(하기 표 8 참조).

[1212] 가이드 RNA, Cas 단백질 및/또는 선택 마커(예를 들어, 푸로마이신 내성 유전자 및/또는 GFP, EGFP 또는 RFP)는 하나의 플라스미드 또는 별도의 플라스미드에 패키징될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 또한, 하나 이상의 gRNA가 사용되는 경우(여러 돌연변이를 교정하거나 동일한 돌연변이를 교정하기 위해, 예를 들어 Cas9 니카아제와 함께 사용하기 위한 gRNA를 짝짓기하기 위해), 이들은 동일한 벡터 또는 별도의 벡터로 패키징할 수 있다.

[1213] 본원에 기술된 플라스미드 벡터 이외에, 다양한 다른 벡터(들)를 사용하여 CRISPR 유전자 편집 성분(가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질), 및/또는 pX458 플라스미드 벡터, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터, 및/또는 렌티바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 선택 마커를 패키징할 수 있다. CRISPR 성분을 암호화하는 DNA 구조체 이외에, 가이드 RNA, Cas 단백질 및/또는 선택 마커를 직접적으로 또는 mRNA 구조체 또는 RNP 구조체에서 사용할 수 있다.

[1214] (e) CRISPR RNP의 제작 및 확인

[1215] 벡터에서의 DNA 구조체(예를 들어, 상술한 바와 같은 pX459 플라스미드) 이외에, CRISPR 리보핵단백질(RNP) 구조체를 g1, g2, g3, g4 및 g5 각각에 대해 개발하였다(표 5 및 8을 참조). 각각의 RNP 구조체는 (i) 관련 프로토스페이서 요소를 함유하는 키메라 단일 가이드 RNA(sgRNA)(표 5 및 8 및 본원의 상세한 설명을 참조); 및 (ii) 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성하는 SpCas9 단백질. CYP4V2 유전자의 표적 부위에서 다양한 RNP 구조체 (sgRNA1:Cas9, sgRNA2:Cas9, sgRNA3:Cas9, sgRNA4:Cas9, sgRNA5:Cas9)의 절단 활성을 환자 게놈 DNA(도 12, 13 및 14를 참조)에서 상기 단락 (c)에서 기술한 바와 같이 확인하였다.

[1216] sgRNA는 전형적으로 약 100 nt 길이이지만, 17nt-22nt 프로토스페이서 요소 서열을 포함하는 길이가 다양할 수 있다. sgRNA는 IVT 유래되거나 합성일 수 있다. g1, g2, g3, g4 및 g5에 상응하는 IVT sgRNA를 상기 기술한 바와 같이 생성하고 확인하였다. g1 및 g2에 상응하는 합성 sgRNA를 후술된 바와 같이 Synthego(미국 캘리포니아주 실리콘 밸리 소재)로부터 주문 제작하였다.

- [1217] sgRNA 대신에, crRNA(서열번호 53에서 예시적인 서열) 및 tracrRNA(서열번호 54에서 예시적인 서열) 듀플렉스를 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)과 함께 사용하여 CRISPR RNP 복합체(crRNA:tracrRNA:Cas9)를 형성하였다. Cpf1 단백질을 사용하는 경우, tracrRNA는 필요하지 않다.
- [1218] sgRNA 또는 crRNA:tracrRNA를 세포내 RNA 분해로부터 보호하기 위하여 화학적으로 변형시켰다. 예를 들어, 화학적으로 변형된 합성 RNA는 gRNA의 5' 및 3' 말단 3개의 염기에서 2'-O-메틸 유사체 및 3' 포스포오로티오에이트 뉴클레오타이드간 결합(linkage)을 함유할 수 있다(Synthego (미국 캘리포니아주 실리콘 밸리 소재). 주어진 프로토스페이스서 요소 서열(예를 들어, CRISPR g1, g2, g3, g4 또는 g5(참조: 서열번호 48 내지 52)에 기초한 합성 sgRNA 또는 crRNA 및 tracrRNA는 예를 들어, Synthego Corporation(미국 캘리포니아주 실리콘 밸리 소재) 또는 IDT로부터 상업적으로 이용가능하며, 옵션으로서 화학적 변형이 가능하다.
- [1219] (f) 공여체 주형의 제작
- [1220] 상동성 지정 복구(HDR)에서, 공여체 주형을 사용하여 표적 유전자의 돌연변이된 서열을 교정하는데 요구되는 공여체 핵산 서열을 제공하였다. HDR에 대한 2개의 별도의 공여체 주형을 단일-가닥 올리고 데옥시 뉴클레오타이드(ssODN) 형태로 생성하였다. CYP4V2 공여체 주형 1 또는 CYP4V2 ssODN 1(서열번호 56)으로 지칭된 첫번째 것은 17 bp 교정을 함유하며 다음과 같은 서열을 갖는다: 5'-AGA AAA ATA AAT GAA AGA AAC TAG CAT ATT TTA TAA GAA AAT GTG TTA ACT AGG GTG CAT CCA AGT CCA AAC AGA AGC ATG TGA TTA TCA TTC AAA **TCA TAC AGG TCA TCG CTG** AAC GGG CCA ATG AAA TGA ACG CCA ATG AAG ACT GTA GAG GTG ATG GCA GGG GCT CTG CCC CCT CCA AAA ATA AAC GCA GGG CCT TT-3': 반면 CYP4V2 공여체 주형 2 또는 CYP4V2 ssODN 2(서열번호 57)는 CYP4V2 공여체 주형 1의 역 상보체이다.
- [1221] 공여체 주형중 하나를 상술한 임의의 gRNA 또는 sgRNA(g1, g2, g3, g4 또는 g5) 및 Cas9 단백질과 함께 사용하여 상동성 지정 복구(homology-directed repair: HDR)를 생성하여 표적 CYP4V2 (c.802-8_810del17insGC) 돌연변이를 교정하였다.
- [1222] 본원에 제공된 공여체 주형은 200 nt 길이이다. 다양한 길이의 공여체 주형을 사용할 수 있다. 공여체 주형은 표적 부위에 대해 대칭이거나 비대칭일 수 있다. 공여체 주형은 공여체 핵산 서열을 함유하거나 암호화하는 ssDNA, ssODN 또는 벡터(예를 들어, 플라스미드 또는 AAV 벡터)에 의해 제공될 수 있다. 공여체 주형이 CRISPR 가이드 RNA의 프로토스페이스서 요소에 상보적인 온전한 서열 및 Cas 단백질에 의해 표적화된 PAM 서열을 갖는 경우, 이러한 공여체 주형이 세포에서 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)에 의해 분해되는 것을 피하기 위하여, 예를 들어 공여체 주형에서 Cas9 PAM "NGG"를 돌연변이시키고 이를 "NGT" 또는 다른 비-PAM 서열로 변경시킴으로써 공여체 주형에 돌연변이가 만들어질 수 있다. 그러나, 공여체 주형에 의해 도입될 의도된 PAM 돌연변이가 암호화 영역 내에 있는 경우, 이것이 침묵 돌연변이가 되도록 하기 위해 주의를 기울여야 한다.
- [1223] 공여체 주형은 합성적으로 제조하거나 상업적으로 이용할 수 있다. 예를 들어, 제공된 서열의 DNA 올리고는 주문 제작할 수 있다(Ultramer® DNA 올리고뉴클레오타이드, Integrated DNA Technologies (IDT), 미국 아이오와주 코랄빌 소재).#
- [1224] (g) Cas 단백질 및 선택 마커
- [1225] 플라스미드에 의해 암호화되거나 RNP 구조체로서 사용하기 위한 재조합 단백질로 암호화되는 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는 CRISPR-관련 단백질/뉴클레아제(Cas)(예를 들어, Cas9 또는 Cpf1)가 상업적으로 이용가능하다. Cas 단백질은 또한 1개, 2개 이상의 핵 국제화 서열(NLS)(예를 들어, 제품 번호: 1074182, Integrated DNA Technologies(IDT), 미국 아이오와주 코랄빌 소재: 제품 번호: A034a-a-1000, Feldan(캐나다 퀘벡 소재): Cpf1: 제품 번호: 1076158 (IDT))을 포함하고, 또한 선택 마커(예를 들어, EGFP와 융합된 SpCas9 단백질, 제품 번호: PR-137211-E (Novatein Biosciences, 미국 매사추세츠주 우브론 소재)와 융합될 수 있다.
- [1226] CRISPR 유전자 편집 구조체를 시험관 내에서 세포로 형질감염시키는 경우, 선택 마커를 사용하여 형질감염율을 평가하고/하거나 다음 단계 처리를 위해 세포를 채집(picking)하는 것을 도울 수 있다. 형광(예를 들어, GFP, EGFP, RFP) 및/또는 퓨로마이신을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 선택 마커를 공정에 사용할 수 있다. 선택 마커는 CRISPR 구조체의 임의의 성분과 통합되거나 형질감염 공정에서 별도로 제공될 수 있다. 예를 들어, 형질감염된 세포의 편리한 이미징 및 수동 또는 FACS 분류를 위해 형광 표지가 tracrRNA (IDT) 또는 Cas9 단백질(Novatein Biosciences, 제품 번호: PR-137211-E)과 결합될 수 있다. 퓨로마이신 내성 유전자는 퓨로마이신을 사용한 선택을 위해 CRISPR 구조체로 공-형질감염된 벡터로 제공될 수 있다. 퓨로마이신을 사용한 선택은 실시예에 나타난다. 항생제 선택 마커(예를 들어, 퓨로마이신) 또는 형광성 표지와 같은 다양한 유형의 선택 마

커가 IDT, Sigma Aldrich, Novatein Biosciences, Clontech Laboratories, InvivoGen를 포함하지만 이에 한정되지 않는 곳으로부터 상업적으로 이용가능하며, CRISPR 성분(예를 들어, Cas9 단백질 또는 CRISPR 가이드 RNA)에 통합되거나 별도로(예를 들어, 푸로마이신 내성 유전자를 발현하는 발현 플라스미드) 제공될 수 있다.

[1227] (h) 구조체 및 권장 프로토콜

[1228] 다음의 표(표 8)는 3개의 gRNA(gRNA1, gRNA2 및 gRNA3) 중 각각 하나에 대해 생성된 CRISPR 유전자 편집 구조체(플라스미드 및 RNP)를 나타낸다. 이들은 3개의 gRNA 플라스미드 구조체 또는 각각의 sgRNA, 2개의 공여체 주형(전방향 및 역방향 상보성) 및 SpCas9 단백질을 함유한다.

[1229] **[표 8]**

[1230] CYP4V2 돌연변이(c.802-8_810del17insGC) CRISPR 유전자 교정 치료요법을 위한 플라스미드 및 RNP 구조체¹

항목	유형	명칭
1	DNA 구조체/플라스미드 ²	CYP4V2-g1 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 48 참조)
2	DNA 구조체/플라스미드 ²	CYP4V2-g2 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 49 참조)
3	DNA 구조체/플라스미드 ²	CYP4V2-g3 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 50 참조)
4	sgRNA ³	CYP4V2-g1 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 48 참조)
5	sgRNA ³	CYP4V2-g2 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 49 참조)
6	sgRNA ³	CYP4V2-g3 (표 5 및 서열에 대해 서열번호 50 참조)
7	공여체 주형 ⁴	CYP4V2 공여체 주형 1 (절 (f) 및 서열번호 56 참조)
8	공여체 주형 ⁴	CYP4V2 공여체 주형 2 (절 (f) 및 서열번호 57 참조)
9	단백질	SpCas9 (예시적인 서열에 대해 서열번호 58 참조)

[1232]

[1233] ¹ BCD 환자중에서 가장 흔한 CYP4V2 돌연변이인, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 교정하기 위한 구조체. CRISPR gRNA 및 다른 CYP4V2 돌연변이를 교정하기 위한 구조체를 설계하였으며, 본원에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 확인하였다. 플라스미드 및 RNP 구조체 이외에, mRNA 및 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 구조체를 또한 사용하여 하나 이상의 CRISPR 성분을 제공/발현시켰다.

[1234] ² CRISPR 성분(sgRNA 및 SpCas9 단백질), 및 선택 마커로서 푸로마이신(Puro) 내성 유전자를 암호화하는 pX459 플라스미드. DNA 구조체 및 sgRNA(예로서 g1 사용, 및 벡터 구조체 및 맵에 대해 도 15 및 16 참조)를 암호화하는 서열을 나타내는 도 17을 참조한다. 각각의 sgRNA 서열은 (a) 20 nt 프로토스페이서 요소(g1, g2 및 g3 각각에 대해 서열번호 48, 49 또는 50), 및 (b) 82 nt 서열(서열번호 55(플라스미드 DNA에 포함된 DNA 형식으로 나타낸 서열: RNA 서열의 경우 DNA 서열에서 "U"를 사용하여 "T"를 대체함)를 함유한다. pX459 벡터는 U6 프로모터에 의해 유도되는 전사 효율을 향상시키기 위해, 인간 U6 프로모터 서열 직후 및 프로토스페이서 요소 서열 바로 앞에 "G" 뉴클레오타이드(서열번호 59 및 도 17)를 함유하며, 이는 또한 IVT 유래 sgRNA에 포함된다. CRISPR 성분(gRNA 및 Cas 단백질)은 또한 렌티바이러스 벡터 또는 AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 벡터에 클로닝된다. CRISPR gRNA 및 Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)은 별도의 벡터 또는 하나의 벡터에 클로닝될 수 있다.

[1235] ³ 다양한 프로토스페이서 요소 (CYP4V2 g1, CYP4V2 g2 또는 CYP4V2 g3, 각각 표 5 및 서열번호 48, 49 또는 50을 참조)에 기초한 sgRNA. IVT sgRNA에 대해서는 상기 설명을 참조한다. IVT sgRNA 이외에, 화학적 변형을 갖는 합성 sgRNA는 Synthego Corporation(미국 캘리포니아주 실리콘 밸리 소재)으로부터 주문하였다. SgRNA 대신에, crRNA(CYP4V2 g1, g2 또는 g3의 20 nt 프로토스페이서 서열, 및 crRNA(서열번호 53에 나타낸 예시적인 서열)의 나머지 서열 포함) 및 tracrRNA(서열번호 54에 나타낸 예시적인 서열) 듀플렉스를 사용할 수 있다.

[1236] ⁴ 상동성 지정 복구(HDR)를 위한 공여체 주형. 상이한 길이의 공여체 주형을 또한 사용할 수 있으며, 이는 ssODN 또는 벡터(예를 들어, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터(예를 들어, AAV2 또는 AAV6))를 포함하지만 이에 한정되지 않는 상이한 형태로 제작할 수 있다. 각각의 시약의 농도는 약 1000(ng/μL)이다.

[1237] 다음의 프로토콜은 전기천공 및 핵감염을 통해 환자 iPSC로 CYP4V2 돌연변이 CRISPR 유전자 복구 구조체를 전달하기 위한 것이다. 지질감염, 바이러스벡터 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 또는 AAV 벡터 (예를 들어, AAV6)을 사용하여 공여체 주형을 전달) 또는 미세주사를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 방법을 또한 사용할 수 있다. 계대 11 내지 14의 P1 iPSC를 사용하였다.

[1238] 프로토콜 번호 1(플라스미드를 사용한 전기천공):

[1239] 1. Neon® 형질감염 시스템(Life Technologies) 설명서에 따라서, 약 1백만개의 세포에 대해 2.5 μg(2.5 μl의 스톡)의 pX459.gRNA(품목 번호 1, 또는 2 또는 3. gRNA를 결합하지 않음) 및 2.5 μg(2.5 μl의 스톡)의 ssODN(품목 번호 7 또는 8 중 하나)을 함유하는 혼합물을 사용한다.

[1240] 2. 전기천공(EP) 조건을 적용한다: a) 1100 V, 30 ms, 1 펄스: 또는 b) 1200 V, 30 ms, 1 펄스.

[1241] 3. EP후, 세포를 Rock 억제제(10 μM)가 들어있는 6-웰 플레이트 중 3개의 웰로 균일하게 분주(split)한다.

[1242] 4. 도말 2일 후, 표 9에 나타낸 바와 같은 퓨로마이신을 첨가한다.

[1243] 5. 퓨로마이신 첨가 2일 후, 소비된 배지를 새로운 퓨로마이신-미포함 배지로 교체한다.

[1244] 6. 콜로니를 피킹(picking)하기 전 2주 동안 배양을 유지한다.

[1245] **[표 9]**

[1246] 병든 iPSC에 대한 조건 및 퓨로마이신 농도 수준

	퓨로마이신 농도(μg/ml)		
1100V 30ms 1p	0.1	0.15	0.2
1200V 30ms 1p	0.1	0.15	0.2

[1247]

[1248] 프로토콜 번호 2(RNP를 사용한 전기천공):

[1249] 1. 얼음 양동이(ice bucket)를 사용한다. 하나의 sgRNA(품목 번호 4, 또는 5, 또는 6: gRNA 결합하지 않음), 하나의 ssODN 공여체 주형(품목 번호 7 또는 8) 및 SpCas9 단백질(품목 번호 9)뿐만 아니라 Cas9-Puro 발현 벡터를 얼음 위에서 해동한다. Cas9-Puro 발현 벡터를 선택 마커로서 사용한다. 이는 pX459-hSpCas9-2A-Puro 플라스미드이며, gRNA에서 클로닝되지 않은 것을 제외하고는 도 15에 나타낸 구조를 갖는다.

[1250] 2. 1.7 ml의 에펜도르프 튜브 및 6-웰 플레이트에 명확하게 표지한다. 각각의 샘플에 대해 하나의 에펜도르프 튜브 및 1개의 웰을 준비한다. 3 ml의 배양 배지(StemCell Technologies(제품 번호 05940)로부터 TeSR-E8)를 각각의 웰에 첨가한다.

[1251] 3. 25 ml의 PBS가 들어있는 하나의 10 cm크기 디쉬를 준비하여 Neon® 팁을 세척한다.

[1252] 4. 전기천공된 세포를 도말하기 위한 6-웰 플레이트를 준비한다. 3ml의 배양 배지를 각각의 웰에 첨가한다.

[1253] 5. 각각의 에펜도르프 튜브에 4 μg(4 μl의 스톡)의 sgRNA(항목 4, 5 또는 6. sgRNA를 결합하지 않음) 및 10 μg(10 μl의 스톡)의 SpCas9 단백질(품목 번호 9)을 첨가하고, 튜브를 실온에서 적어도 10분 동안 둔다.

[1254] 6. 각각의 튜브에 5 μg(5 μl의 스톡)의 ssODN(품목 번호 7 또는 8 중 하나) 및 2.5 μg(2.5 μl의 스톡)의 Cas9-Puro 발현 벡터를 첨가한다.

[1255] 7. 세포를 적절한 Neon® EP 완충액 R에 1 x 10⁷ 세포/ml의 최종 밀도로 재현탁한다.

- [1256] 8. 105 μ L의 세포 현탁액을 분취하고, CRISPR RNP 혼합물이 들어있는 각각의 에펜도르프 튜브에 첨가한다.
- [1257] 9. 3 ml의 완충액 E2를 Neon® 피펫에 넣고, Neon® 피펫 스테이션에 Neon® 피펫을 놓는다.
- [1258] 10. 100 μ L의 Neon® 팁을 사용한다. 각각의 에펜도르프 튜브로부터 100 μ L의 EP 혼합물을 흡입하고, Neon® 피펫에 넣는다.
- [1259] 11. 상기 표 9의 EP 조건 중 하나를 적용하고, 상기 프로토콜 번호 1의 단계 3 내지 6을 따른다.

[1260] 참고: iPSC가 잘 성장하지 않는 경우, 조건 배지를 추천한다. 소비된 배지(퓨로마이신 미포함)를 수집하고 이를 여과하여 세포 잔해물(debris)을 제거한다. 사용된 배지와 신선한 배지를 1:1 비율로 혼합한다. 유전자 편집 공정에 걸쳐 피더를 포함하지 않는 조건하에서 인간 iPSC를 배양하기 위해 매트릭셀(코닝 제품 번호 354277) 및 StemCell Technologies(제품 번호 05940)로부터의 배지 TeSR-E8의 사용을 추천한다. EP후 세포를 도말하는 경우, 48시간 동안 배지에 Rock 억제제(최종 농도 10 μ M)의 첨가하면 세포 생존능을 유지하는데 도움이 될 것이다.

[1261] 프로토콜 번호 3(RNP를 사용한 핵 감염):

- [1262] 1. Lonza 4D-뉴클레오펙터(nucleofector), 매개변수 설정: Lonza program, DS-150
- [1263] 2. RNP(cas9+gRNA) 및 ssODN을 별도로 준비하고(부피를 최대 10 μ L로 함), 사용 전에 혼합한다. 표 10을 참조한다.
 - [1264] (1) gRNA1 +CYP4V2 전방향 ssODN (2) gRNA2 +CYP4V2 전방향 ssODN
 - [1265] (3) gRNA1 +CYP4V2 역방향 ssODN (4) gRNA2 +CYP4V2 역방향 ssODN

[1266] **[표 10]**

각 그룹의 반응	gRNA 30 μ M (μ L)	Cas9 20 μ M (μ L)	ssODN 30 μ M (μ L)	PBS (μ L)
P1 iPS 세포	4	1	4	1

키트 완충액/각각의 그룹	부피 (μ L) / 샘플	4 개의 샘플 (μ L) 10
용액	16.4	65.6
보충	3.6	14.4

- [1267]
- [1268] 3. 수거 및 세포 계수: 5×10^5 iPS 세포
- [1269] 4. 부드럽게 상하로 3-5회 피펫팅하여 RNP+ssODN(10 μ L)로 세포를 현탁한다.
- [1270] 5. Lonza 키트 완충액 20 μ L를 세포 현탁액에 첨가하고, 핵감염 전 항온처리 시간을 최소화한다.
- [1271] 6. 혼합물(30 μ L)을 Lonza 키트 웰로 로딩한다. 임피던스를 점검한다.
- [1272] 7. 설정 매개변수(DS150)를 사용하여 세포를 전기천공한다.
- [1273] 8. 70 μ L의 mTeSR(w/Rock 억제제 존재)을 키트 웰에 직접 첨가하여 전기천공된 세포를 부드럽게 재현탁시킨다.
- [1274] 9. 6웰 플레이트 중 하나의 웰의 계대배양 배지에 세포를 넣는다.
- [1275] 10. 전기천공 24시간 후 세포 생존능을 관찰하고, 배지를 배양 배지로 교체한다.
- [1276] 참고: 본 프로토콜에는 선택 마커가 사용되지 않는다. 핵감염에서 살아남은 세포를 단일 세포 증식을 위해 피킹한다. Lonza DS-150 program이외에, CB-150과 같은 매개변수를 또한 사용할 수 있다.
- [1277] **실시예 22 - 유전자-복구된 환자 세포주의 생성 및 유전자-복구된 환자 세포주를 생성 및 안구 세포 치료요법에**

서의 RNP의 사용

- [1278] CRISPR g1 또는 g2(품목 번호 1 또는 2)를 함유하는 각각의 발현 플라스미드 구조체, 및 sgRNA1 또는 sgRNA2(품목 번호4 또는 5, Synthego, 미국 캘리포니아주 실리콘 밸리 소재) 및 SpCas9(품목 번호9, 제품 #: Feldan(캐나다 퀘벡 소재)로부터 또는 Synthego로부터의 A034a-a-1000(예를 들어, Cas9 뉴클레아제 2NLS, 에스. 피오게네스))를 함유하는 CRISPR RNP 구조체 각각을, CYP4V2 공여체 주형(품목 번호7 또는 #8, ssODN, Ultramer DNA 올리고뉴클레오타이드, Integrated DNA Technologies (IDT), 미국 아이오와주 코탈빌 소재)과 함께 사용하여 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는 환자 iPSC를 형질감염시켰다.
- [1279] *상동성 지정 복구(HDR)에 의한 유전자 교정의 평가:*
- [1280] 형질감염 후, 피킹된 세포를 PCR을 위해 수집한 후, 표적화된 앰플리콘 서열분석에 의해 c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 함유하는 CYP4V2 영역에서 유전자 교정을 평가하였다. 형질감염된 세포의 심도깊은 서열분석(Deep sequencing)은 관독값이 17 bp "TCATACAGGTCATCGCT"의 삽입 및 "GC"의 결실과 함께, 돌연변이의 정확한 교정을 포함하여, 돌연변이를 야생형 서열(서열번호 47)로 교정함을 보여준다. 임의의 형질감염되지 않은 대조군 iPSC에서는 돌연변이의 교정은 보이지 않는다. 결과는 또한 형질감염된 세포 중에서 HDR 빈도의 지표로서 제공된다.
- [1281] *오프-타겟 편집이 최소화되거나 없는 iPS 클론의 수득:*
- [1282] HDR을 평가한 후, c.802-8_810del17insGC 돌연변이를 갖는 환자 iPSC에서 형질감염은 다시 수행하였다. 형질감염된 세포는 단일-세포 클로닝 및 증식을 거쳤다. HDR 타겟팅(on-target)이 확인된 클론 세포주를 그 후 서열 분석을 통해 오프-타겟 편집에 대해 평가하였다. 임상 적용의 경우, 전체-게놈 서열분석(60x 포함)을 사용하여 동일한 환자의 편집 및 형질감염되지 않은 세포주를 비교한다. 게놈에서 공지된 물질 부작용이 없는 오프-타겟 편집이 없거나 오프-타겟 편집이 최소화된 편집된 클론 iPS 세포를 선택하였다.
- [1283] *유전자 교정된 iPS의 원하는 유형의 세포로의 분화*
- [1284] 선택된 iPS 클론 세포주를 이후 iPS-RPE 세포로 분화시켰다(본원의 실시예를 참조). 선택된 iPS 클론 세포주를 세포 치료요법에 사용하기를 원하는 다른 유형의 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포, iPS-PRC, iPS-CE 세포, iPS-CEC 또는 다른 iPS-안구 세포)로 분화시킬 수 있다.
- [1285] *유전자-복구된 iPS 또는 iPS-유래 세포가 더 이상 표현형을 가지지 않음을 확인하는 생물-검정*
- [1286] 유전자-교정된(또는 유전자-복구된) iPS-RPE 세포를 생화학적 기능에 대해 시험하고(본원의 실시예 참조), 이들이 치료되지 않은 환자 iPS-RPE 세포에서 볼 수 있는 바와 같이 표현형이 더 이상 존재하지 않음을 확인하였다. CYP4V2 발현은 유전자 복구된 환자 iPS-RPE 세포에서 검출된다.
- [1287] 그것(예를 들어, gRNA, Cas 뉴클레아제, 및/또는 공여체 주형)을 암호화하는 CRISPR 성분의 지속적인 발현을 초래하는 플라스미드 또는 다른 벡터 구조체(예를 들어, AAV, 렌티바이러스)와 달리, CRISPR RNP 구조체는 빠르게 온(on)되고 빠르게 오프(off)된다. RNP 구조체의 성분은 형질감염된 세포에서 비교적 빠르게 분해된다. 따라서, RNP 구조체의 사용은 플라스미드 및 다른 구조체와 비교하여 오프-타겟 편집의 위험을 낮춘다. 이는 RNP 구조체가 이식뿐만 아니라 생체 내 치료(예를 들어, RNP 구조체를 생체 내 유전자 교정을 위해 대상체의 눈으로 주사하는 것)에 적합한 유전자-복구된 환자 세포를 생성하는 것과 같은 임상적 적용에 특히 적합하게 한다.
- [1288] BCD를 치료하는 것 이외에, 본원에 제공된 CRISPR RNP 구조체 및 방법은 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자와 관련된 질환을 포함하는 다른 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [1289] **실시예 23: 안구 세포 치료요법에서 유전자 복구된 세포의 사용**
- [1290] 유전자-복구된 iPS-RPE 세포, iPS-PRC, iPS-CECs, iPS-CE 세포 또는 다른 iPS-안구 세포를 안구 세포 치료요법으로서 환자의 눈에 이식할 수 있다. 예를 들어, 이들은 BCD 환자에서 죽거나 변성된 RPE 세포, 광수용체 또는 다른 안구 세포에 대한 자가 대체 세포로서 사용될 수 있다. 유전자 복구된 세포는 직접적으로(예를 들어, 세포 현탁액), 또는 층, 시트, 매트릭스, 스캐폴드 또는 조직의 일부를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 형태로 이식될 수 있다. 이식에 사용된 유전자 복구된 세포의 양은 대체를 위해 표적화된 세포 유형, 대체 세포를 필요로 하는 영역의 크기 및 치료될 대상체(예를 들어, 치료될 대상체의 연령, 성별, 체중, 질환 및 상태의 발달 단계); 투여 경로; 이식 위치(예를 들어, 망막 대 각막); 이식 형태(예를 들어, 세포 현탁액 대 층, 시트, 매트릭스, 스캐폴드 또는 조직의 일부로서); 및 필요한 요법에 의존한다. 주어진 세포 유형(예를 들어, RPE 세포, 광수용체, CEC, 또는 CE 세포)의 한쪽 눈에 대한 단일 이식에 있어서 세포의 양은 약 1,000개 세포 내지

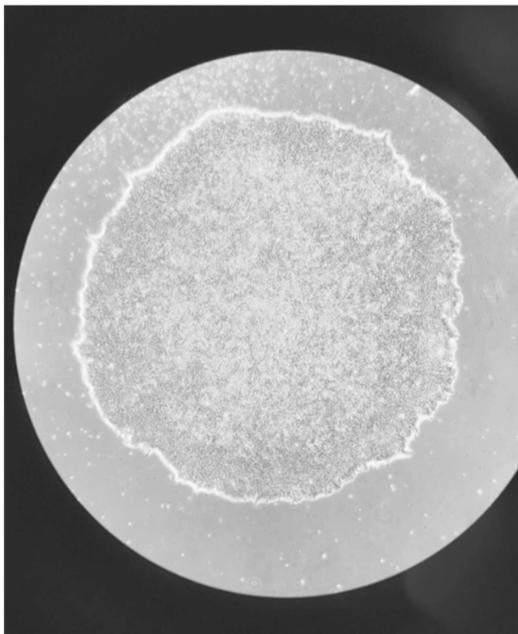
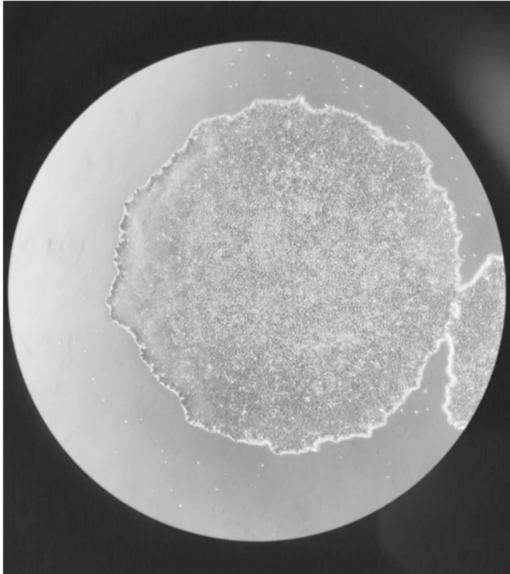
1,000만개 세포의 범위일 수 있다.

- [1291] 필요할 경우, 임상 용도로 GMP 시설에서 세포를 제조할 수 있다. 세포 치료요법 제품을 위한 GMP 시설은 연구 기관, 생산 대행기업(CMO) 및 임상시험 수탁기관(contract research organization: CRO), 예를 들어 케이스 웨스턴 리저브 대학(Case Western Reserve University)에서 Cellular Therapy Integrated Services, 베일러 의과 대학(Baylor College of Medicine)에서 세포 및 유전자 치료요법 센터(Center for Cell and Gene Therapy), CELLforCURE, New York Stem Cell Foundation 및 Lonza를 통해 상업적으로 이용가능하다.
- [1292] 환자-특이적 자가 투여는 연령-관련 황반 변성(AMD)과 같은 RPE 변성에 의해 영향받는 것을 포함하는 망막 변성 질환에 대한 동종이체 안구 세포 치료요법(예를 들어, 배아 줄기 세포 유래 RPE(ES-RPE) 이식체)에서 사용된 것과 동일한 투여/전달 방법을 사용할 수 있다.
- [1293] **실시예 24 - 안질환에 대한 유전자 치료요법 및 세포 치료요법 조합 치료**
- [1294] 본원의 개시내용은BCD에 대한 유전자 치료요법 및 세포 치료요법에서 사용하기 위한 조성물 및 방법을 기술하였다. 안질환의 경우, 유전자 치료요법 및 세포 치료요법에는 각각의 장단점이 있다. 한편, 유전자 치료요법은 환자가 유전자 치료요법 치료에 의해 수용되고 구조되도록 남아있는 망막 (또는 안구) 세포가 여전히 많을 경우, 질병의 초기 내지 중기에서 더 잘 작동한다. 그러나, 유전자 치료요법은 관련 안구 세포(예를 들어, RPE 또는 PRC)가 남아있지 않은 말기 환자의 경우 잘 작동하지 않거나 전혀 작동하지 않을 수 있다. 한편, 세포 치료요법은 환자의 눈에서 죽거나 변성된 세포를 대체하기 위한 대체 세포를 제공하며, 특히 말기 환자 및 우성 유전 질환의 경우 유전자 치료요법보다 장점을 갖는다. 그러나, 세포 치료요법은 환자의 눈에 남아있는 "원래(original)" 세포를 구조할 수 없으며, 이의 생존은 환자의 나머지 시력을 보존할 뿐아니라 대체 세포의 통합에 유리하다.
- [1295] 유전자 치료요법 및 세포 치료요법의 한계를 극복하고 환자에게 최대의 이익을 가져오기 위하여, 유전자 치료요법 및 세포 치료요법의 조합 치료 방법을 BCD에 대해 개발하였으며, 이는 또한 다른 안질환에도 사용될 수 있다. 이러한 방법은 다음을 포함한다:
- [1296] (a) 생체 내에서 환자 눈에 유전자 치료요법(예를 들어, AAV.CYP4V2 유전자 치료요법 또는 CRISPR 유전자 교정 치료요법)을 적용하는 단계; 및
- [1297] (b) 유전자-복구된 환자-특이적 자가 iPS-안구 세포(예를 들어, iPS-RPE 세포, iPS-PRC, iPS-CE 세포, iPS-CEC 또는 질환에 의해 영향을 받는 다른 유형의 안구 세포)를 시험관 내에서 생성하여 이들 세포를 환자의 눈에 이식하는 단계.
- [1298] 여기에서 (a) 및 (b)는 순차적으로(먼저 (a) 다음 (b), 또는 먼저 (b) 다음 (a)) 또는 동시에(예를 들어, 유전자 치료요법 벡터 및 세포를 1회 투여로 주사) 적용될 수 있다. 각각의 (a) 또는 (b)는 동일한 눈에 1회 이상 적용될 수 있다. 질환, 질환-단계 및 환자 개별 상황에 따라서, (a) 및 (b)는 동일한 유형 또는 상이한 유형의 안구 세포를 표적화할 수 있다. 예를 들어, BCD의 경우, 편재된 프로모터에 의해 유도된 유전자 치료요법 벡터는 RPE 세포, 광수용체 및 다른 망막 세포에서 CYP4V2 발현을 야기할 수 있는 반면, 세포 치료요법은 재생된RPE 세포 및/또는 광수용체를 제공하는데 초점을 맞출 수 있다.
- [1299] 이러한 경우에, 세포 치료요법은 새로운 세포(예를 들어, RPE 또는 광수용체 세포)를 제공함으로써 유리할 수 있지만, 유전자 치료요법은 남아있는 RPE 또는 광수용체 세포를 구조하고/하거나 그것의 건강이 안구 세포의 상태에 영향을 미치는 맥락막 세포의 상태를 개선함으로써 세포 치료요법의 효과를 향상시킬수 있다. 유전자 치료요법 및 세포 치료요법의 "구조(rescue)" 및 "대체(replacement)" 효과의 조합은 조합 치료를 유전자 치료요법 또는 세포 치료요법으로부터 개선시킨다. 이러한 조합 치료 방법은 표 4에 제시된 돌연변이되거나 결함이 있는 유전자와 관련된 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 유전자 돌연변이에 의해 야기되는 안구 질환 및 다른 질환에 적용될 수 있다.
- [1300] 물질의 방법 및 조성물이 본원에서 다수의 상이한 양태와 함께 설명되었지만, 다양한 양태의 상기 설명은 물질의 방법 및 조성물의 범위를 예시하기 위한 것으로, 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다. 다른 양태, 장점 및 변형은 다음의 청구범위의 범위 내에 있다.
- [1301] 목적을 위해 사용될 수 있거나, 함께 사용될 수 있거나, 목적물의 제조에 사용될 수 있거나, 개시된 방법 및 조성물의 생성물인, 방법 및 조성물이 개시되어 있다. 이러한 및 다른 물질은 본원에 개시되어 있으며, 이러한 방법 및 조성물의 조합, 부분집합, 상호작용, 그룹 등이 개시되어 있는 것으로 이해된다. 즉, 이들 조성물 및 방

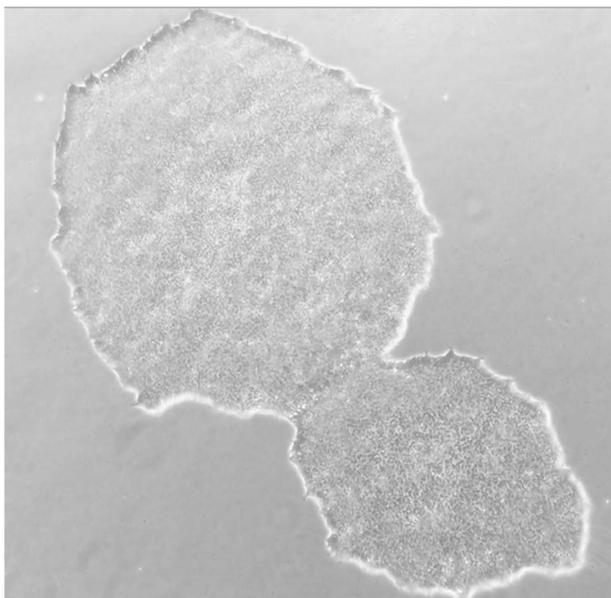
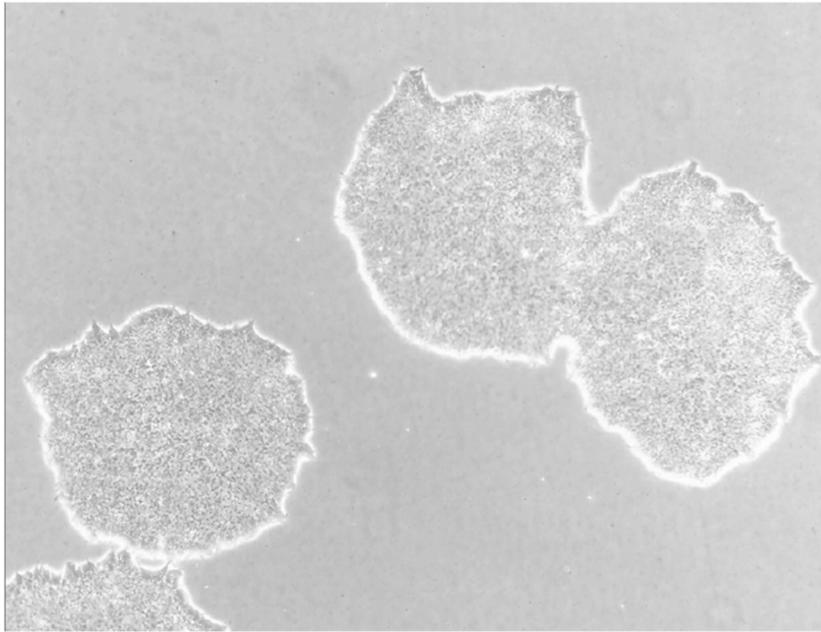
법의 각각의 다양한 개별 및 집단 조합 및 치환 대한 특정 언급은 명시적으로 개시되지 않을 수 있지만, 각각은 본원에서 구체적으로 고려되고 기술된다. 예를 들어, 물질의 특정 조성물 또는 특정 방법이 개시 및 논의되어 있고, 다수의 조성물 또는 방법이 논의되는 경우, 조성물 및 방법의 각각의 모든 조합 및 순서는 달리 명시적으로 지시되지 않는 한 구체적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 부분집합 또는 조합 또한 구체적으로 고려되고 개시되어 있다.

도면

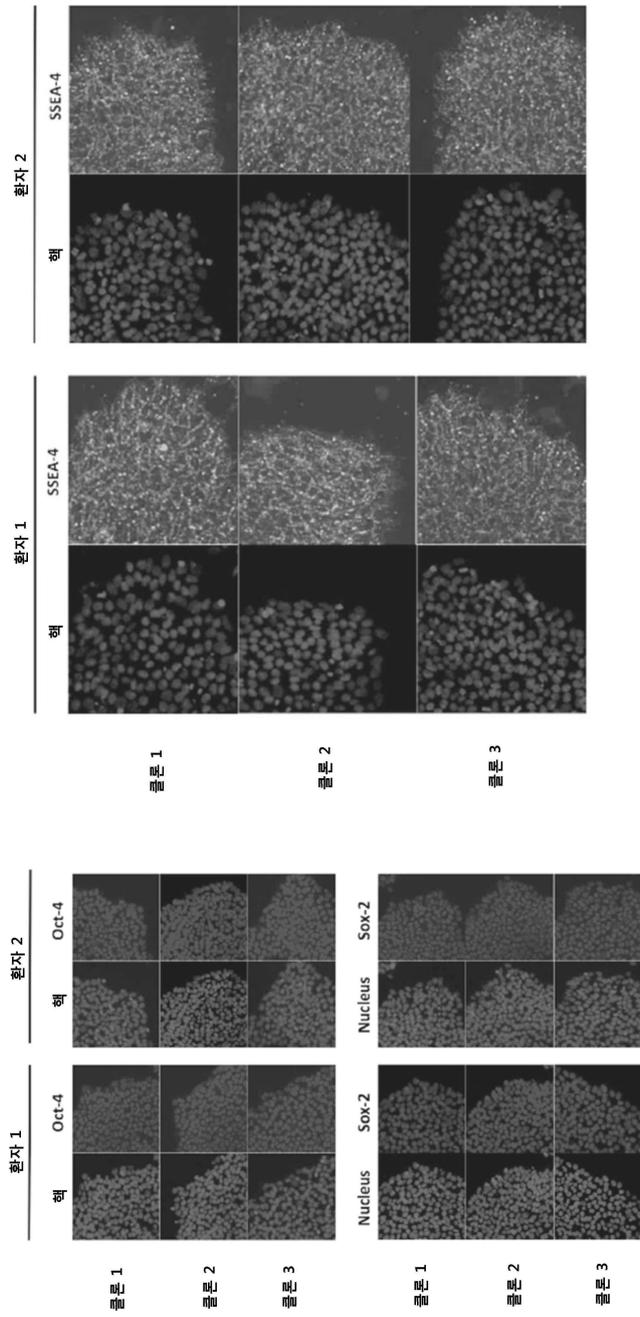
도면1aa



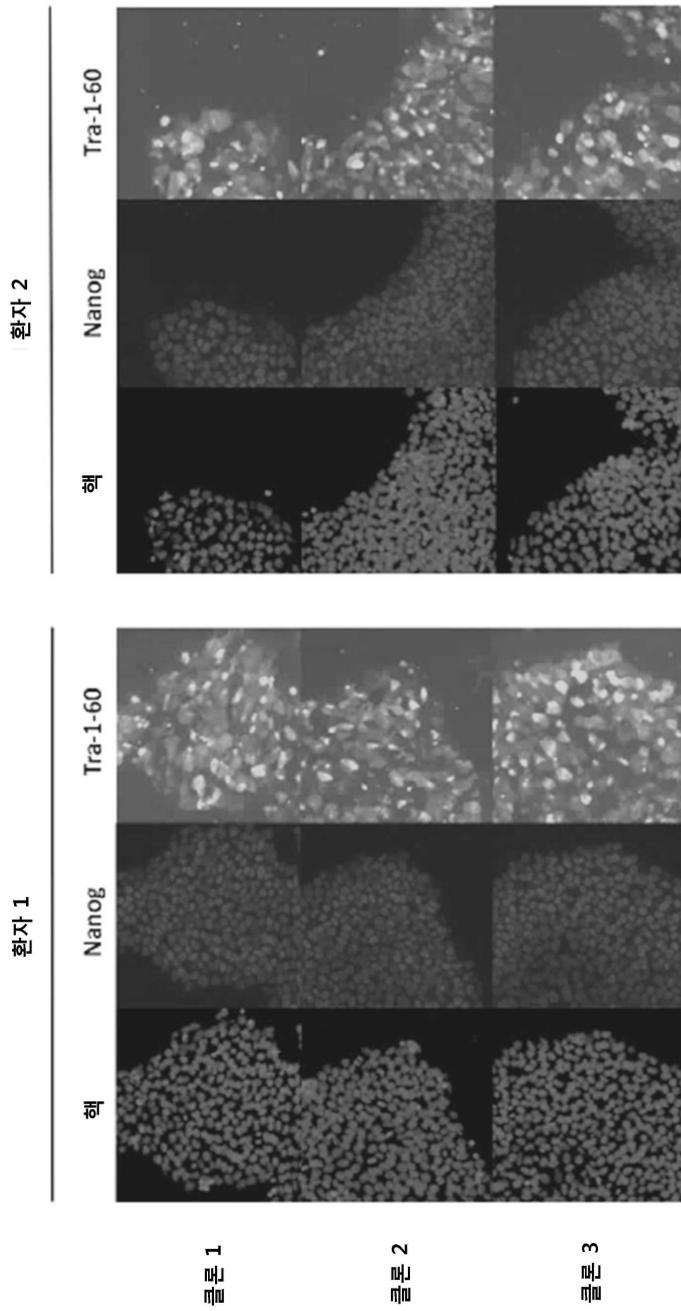
도면1ab



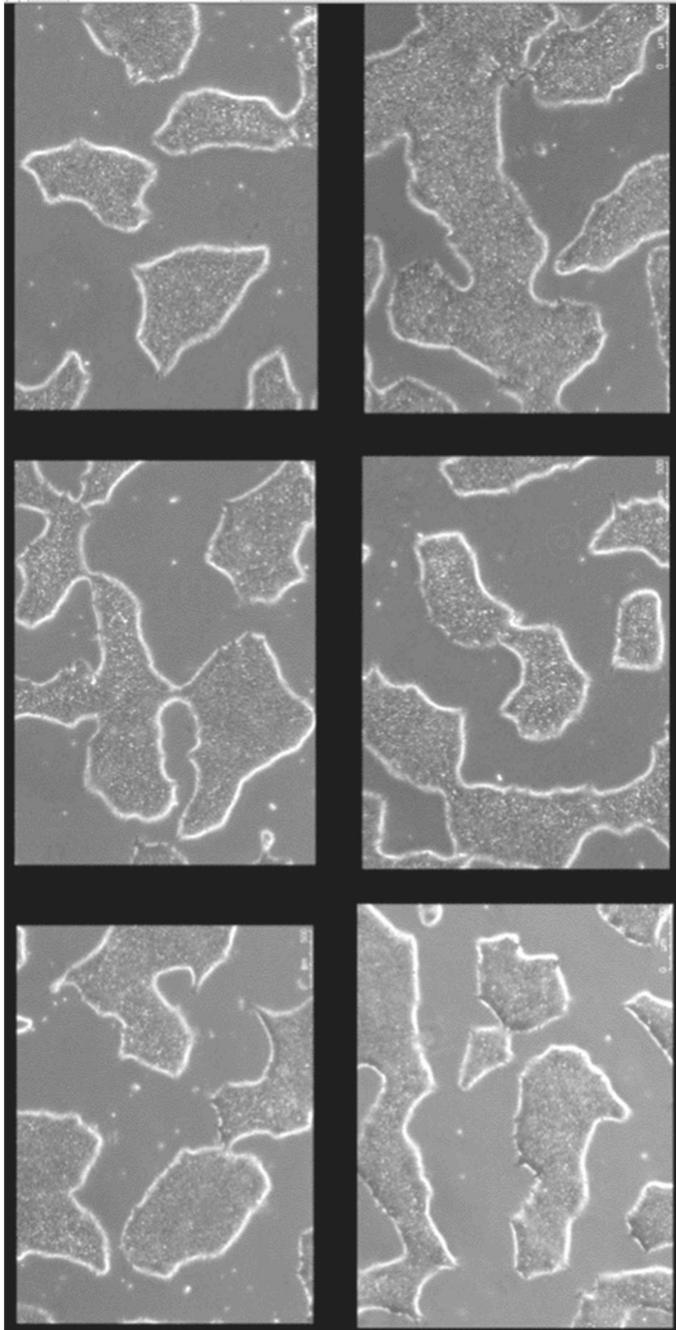
도면1ac



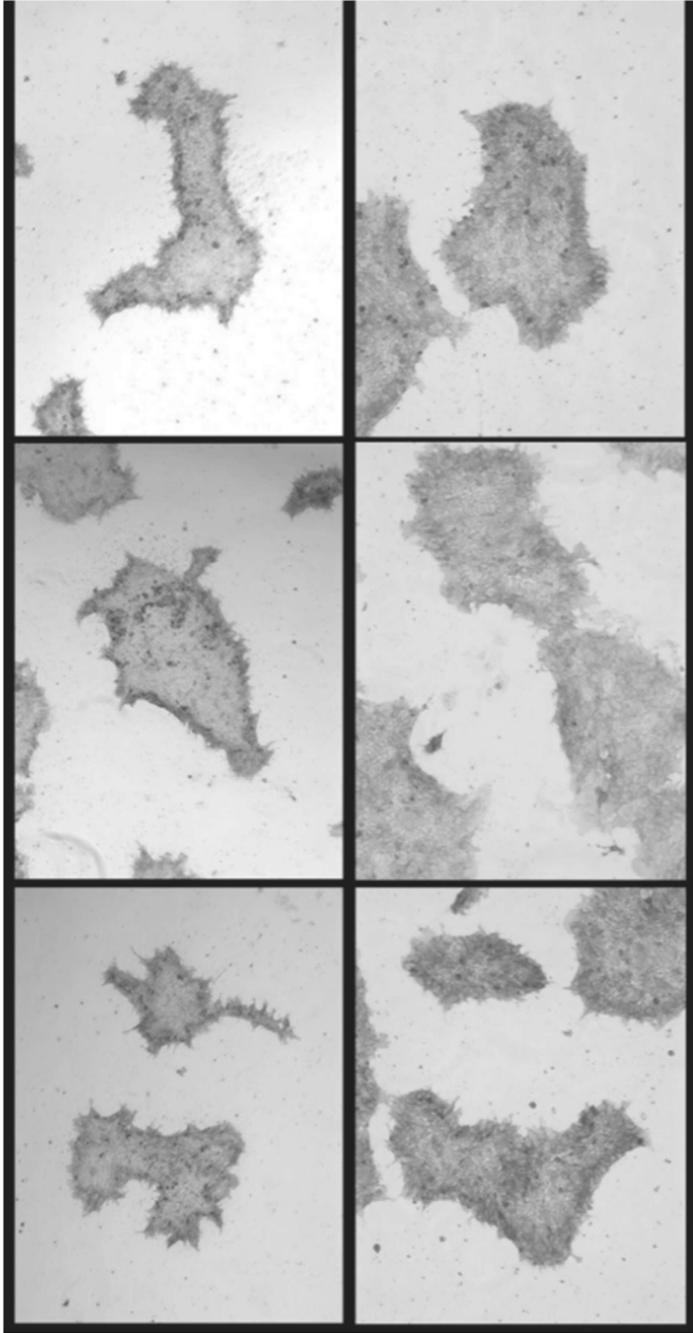
도면1ad



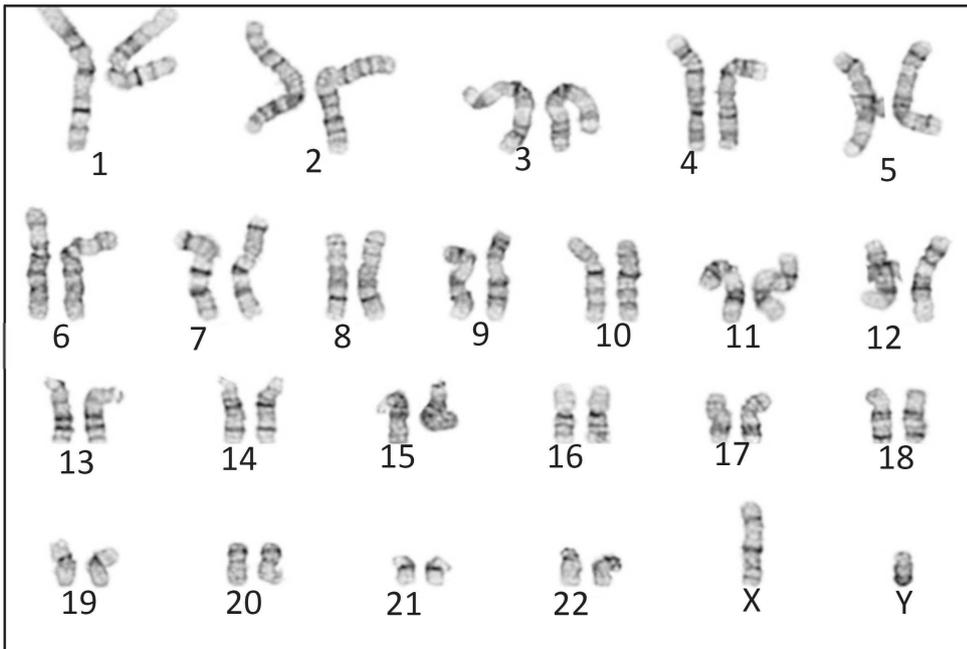
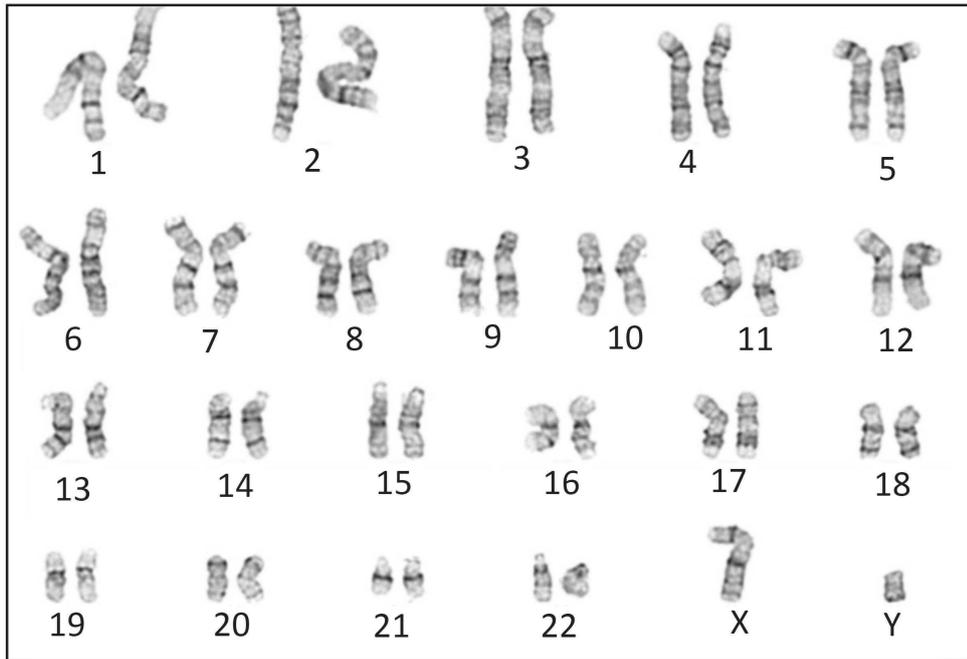
도면1ba



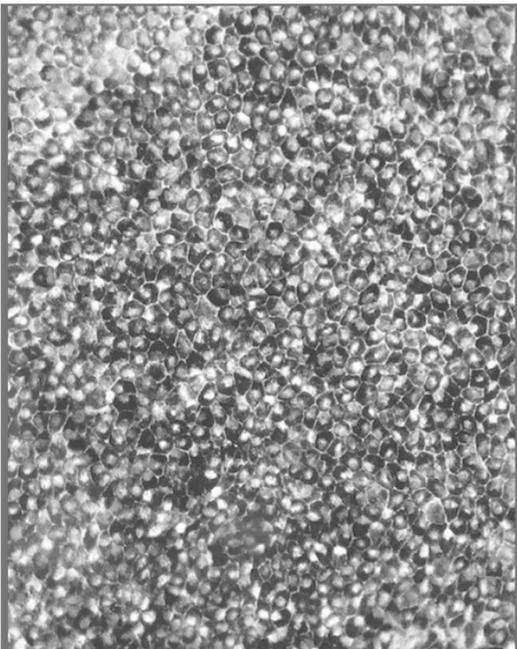
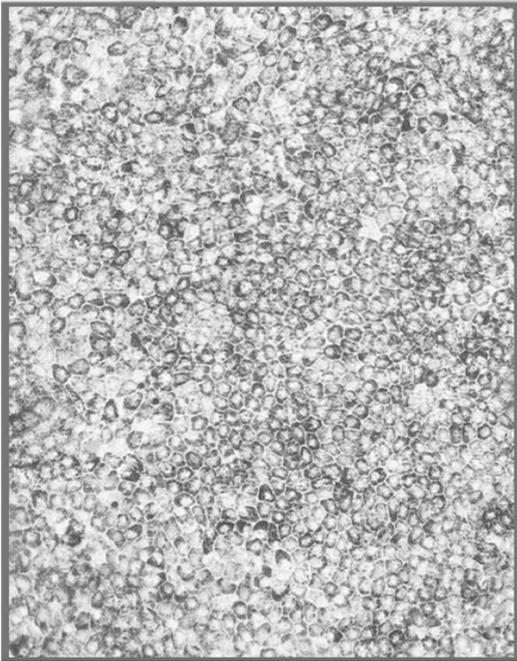
도면1bb



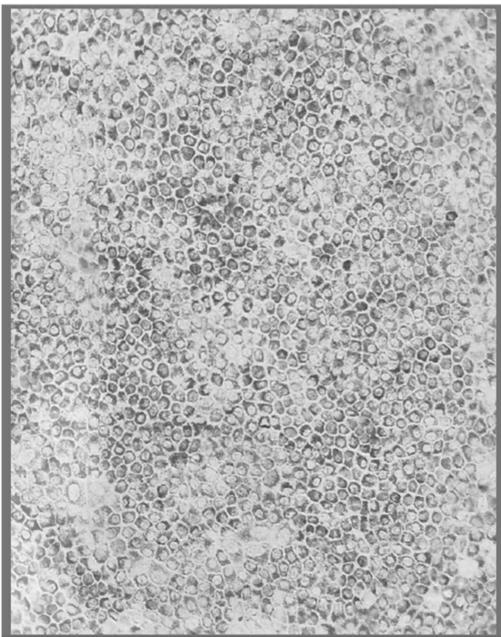
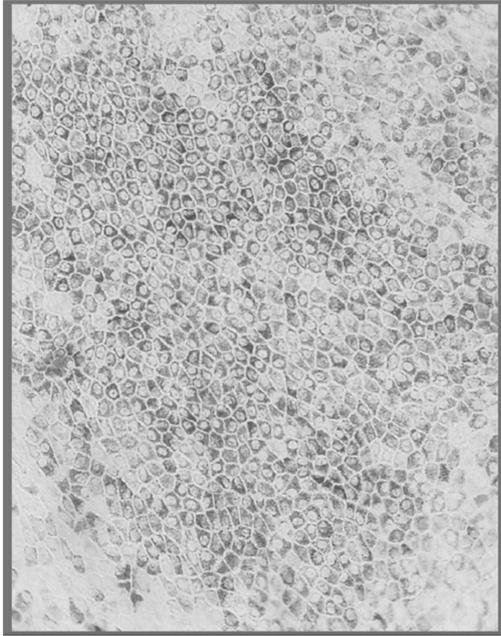
도면1c



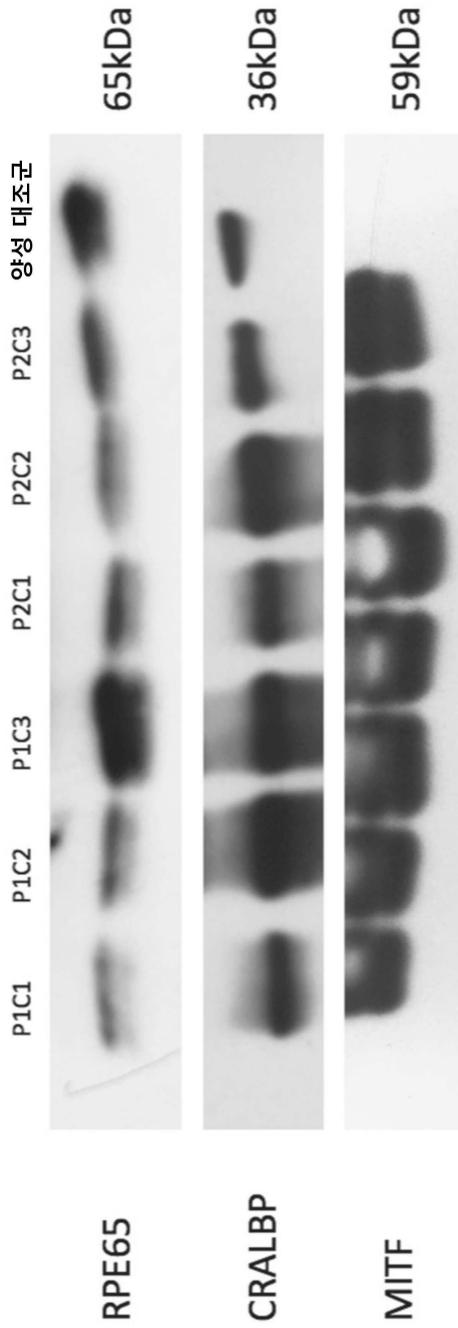
도면2aa



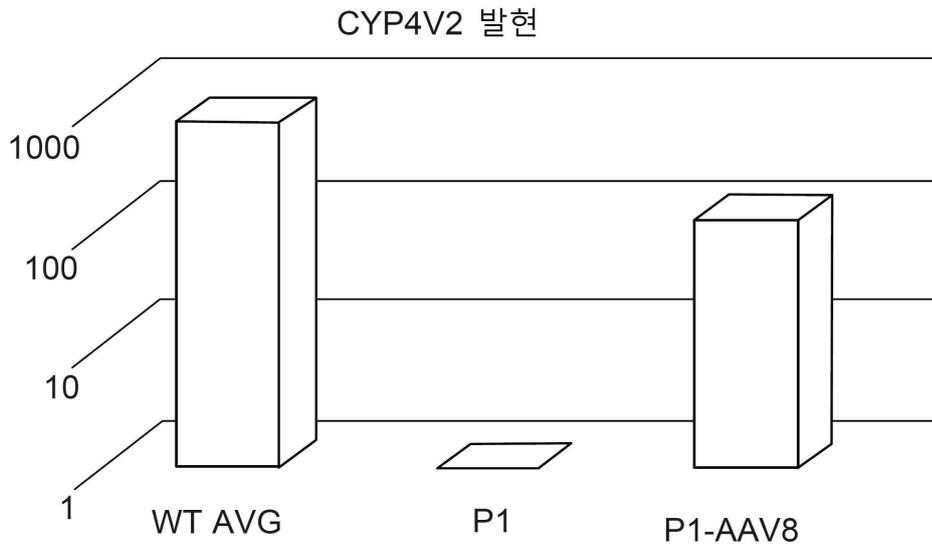
도면2ab



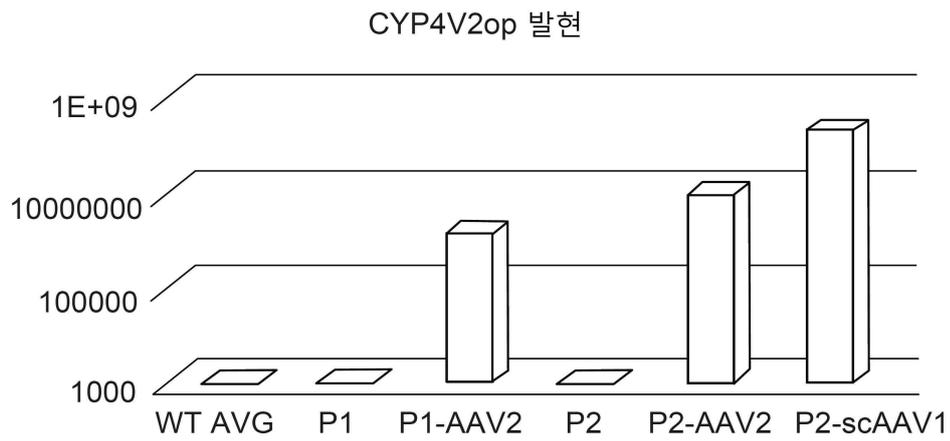
도면2b



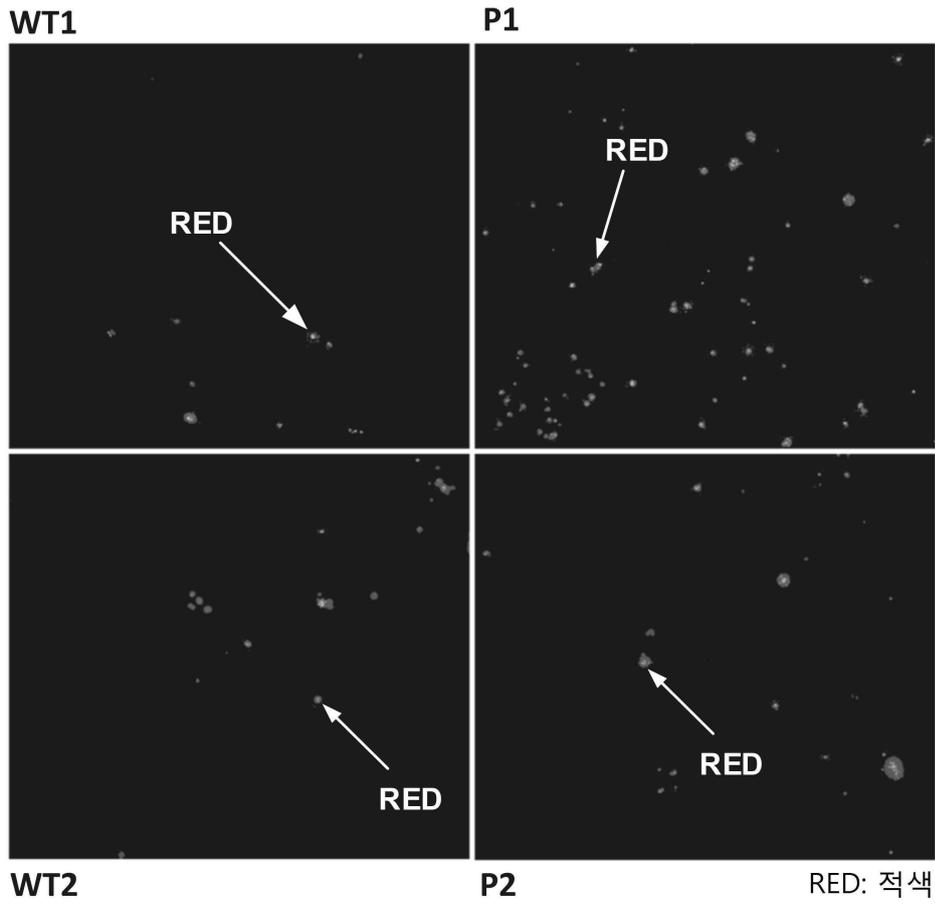
도면3



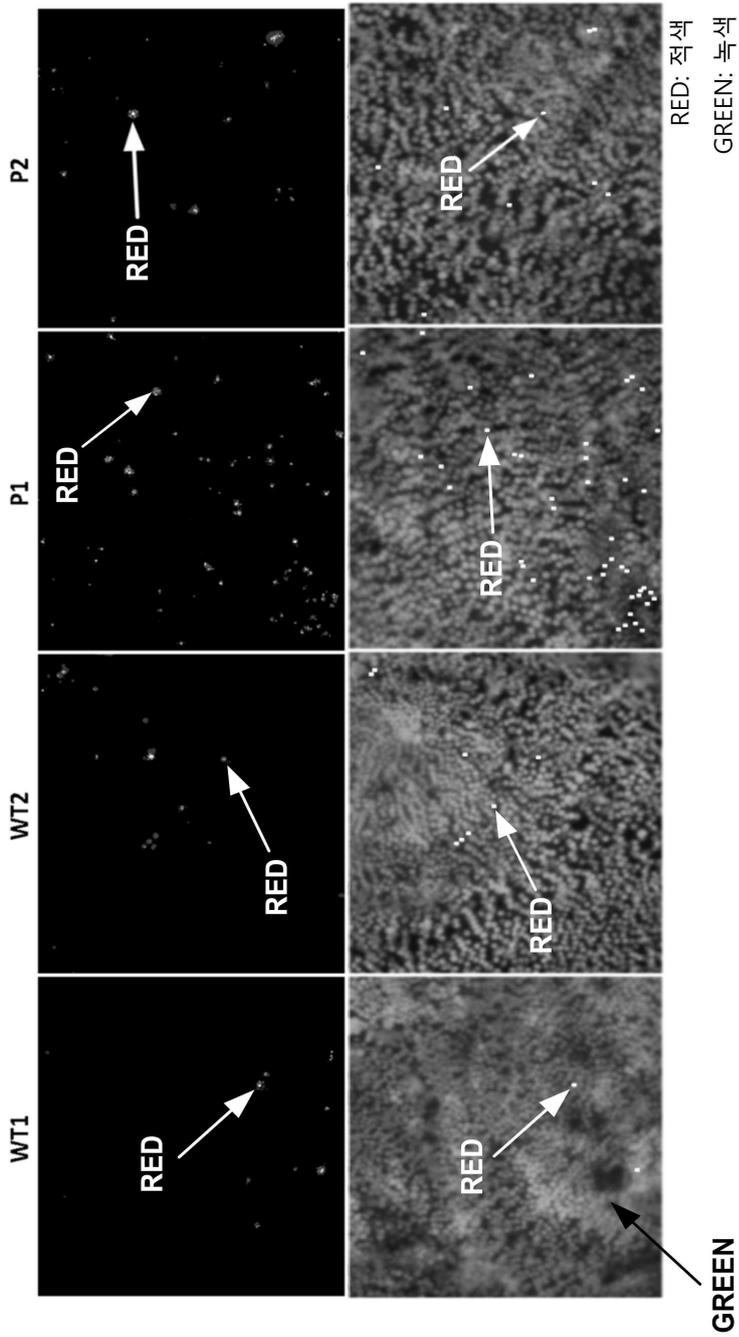
도면4



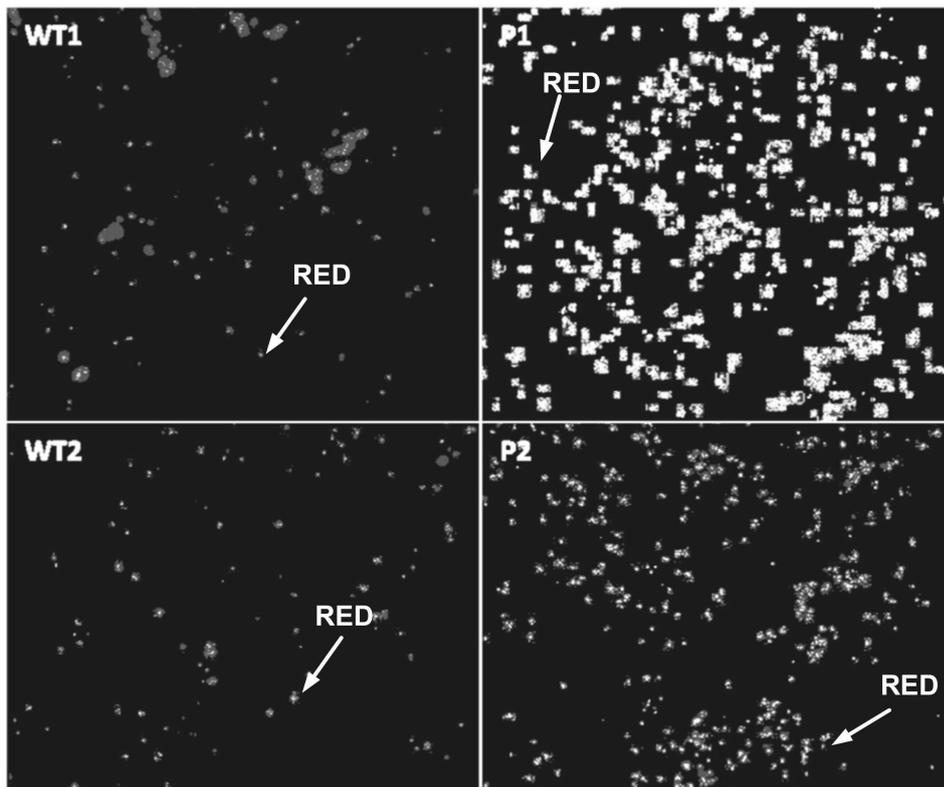
도면5a



도면5b

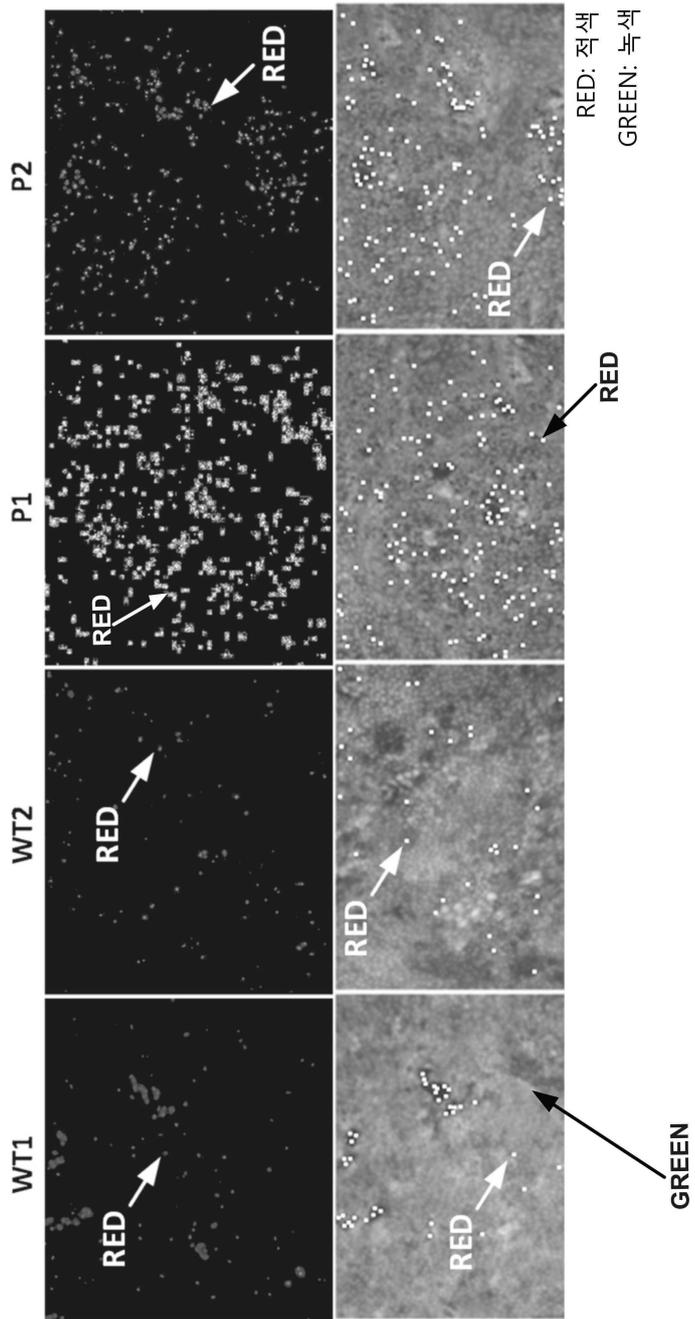


도면6a

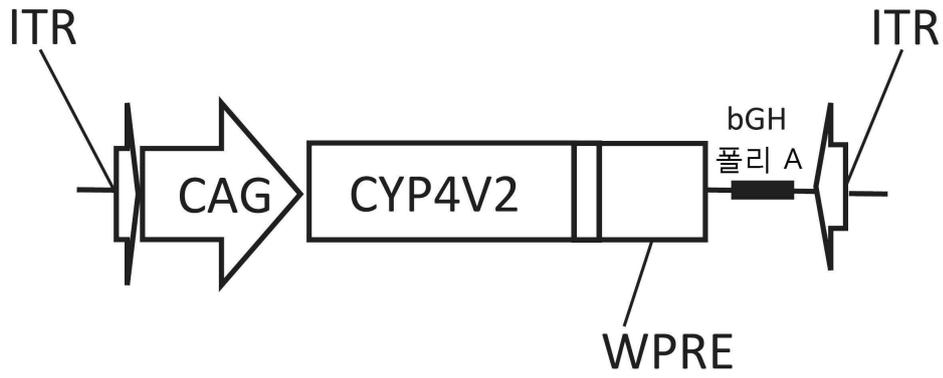


RED: 적색

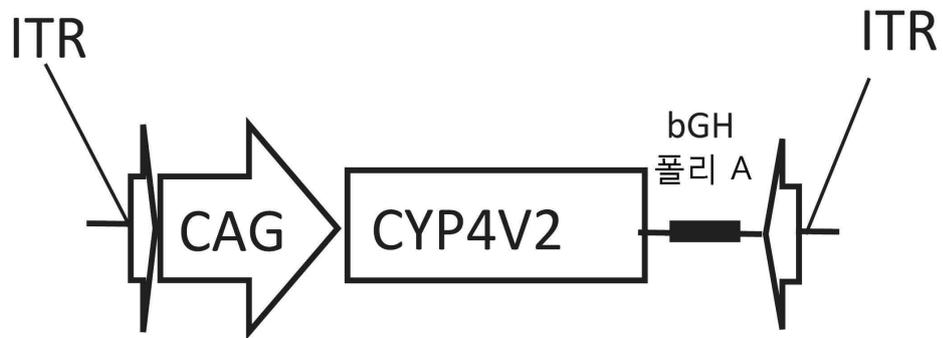
도면6b



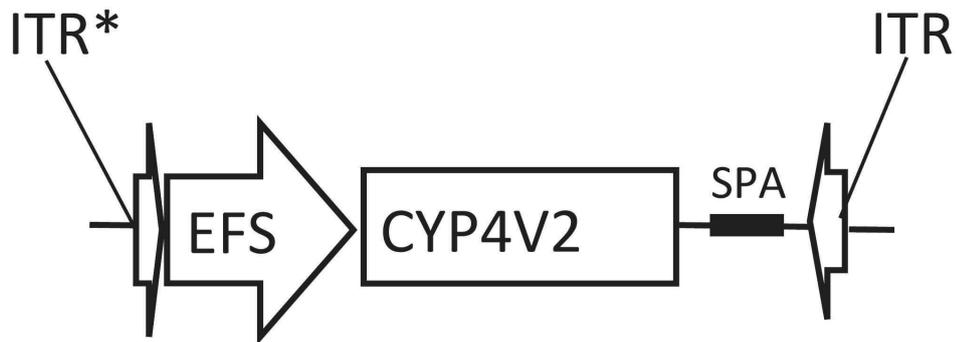
도면7a



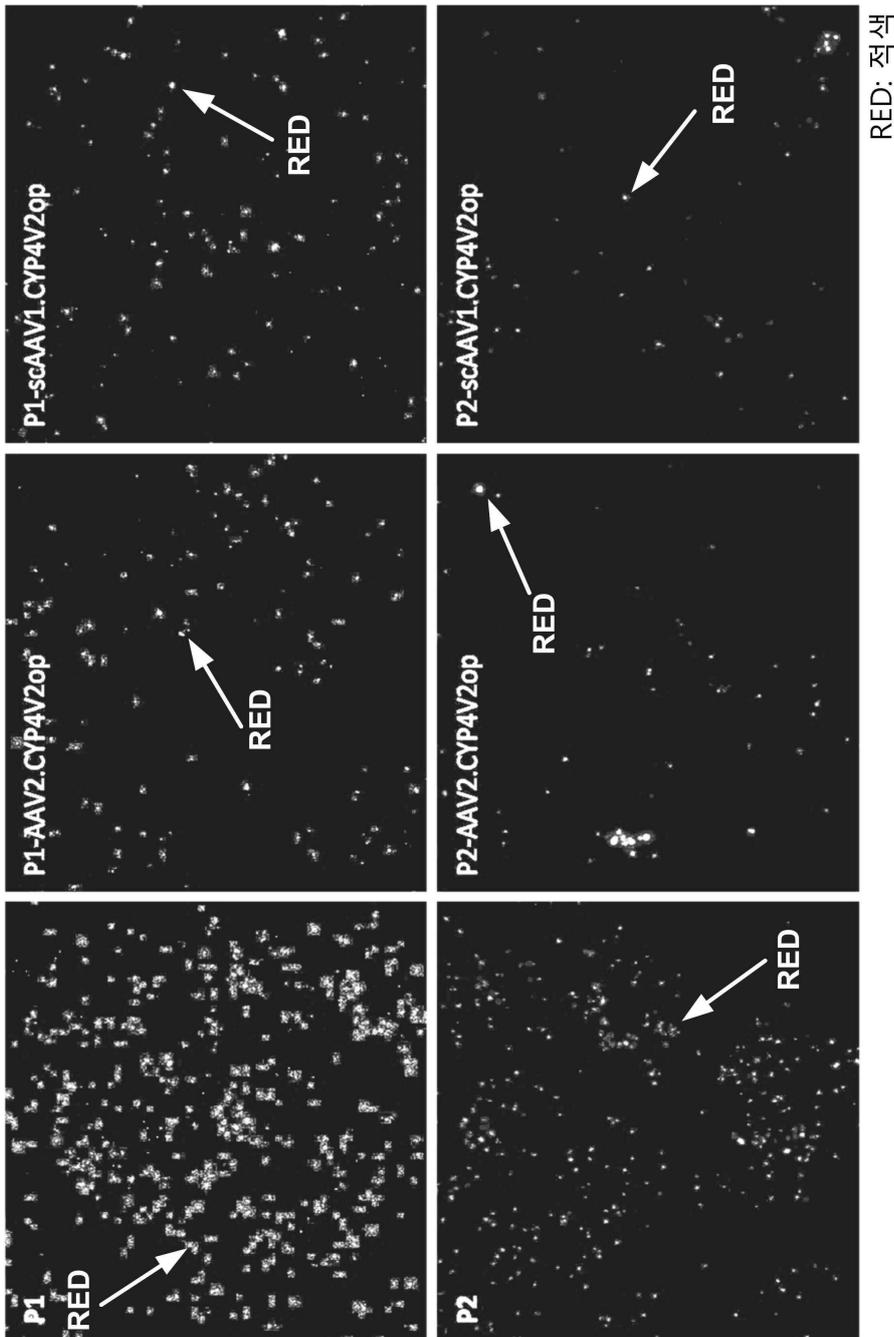
도면7b



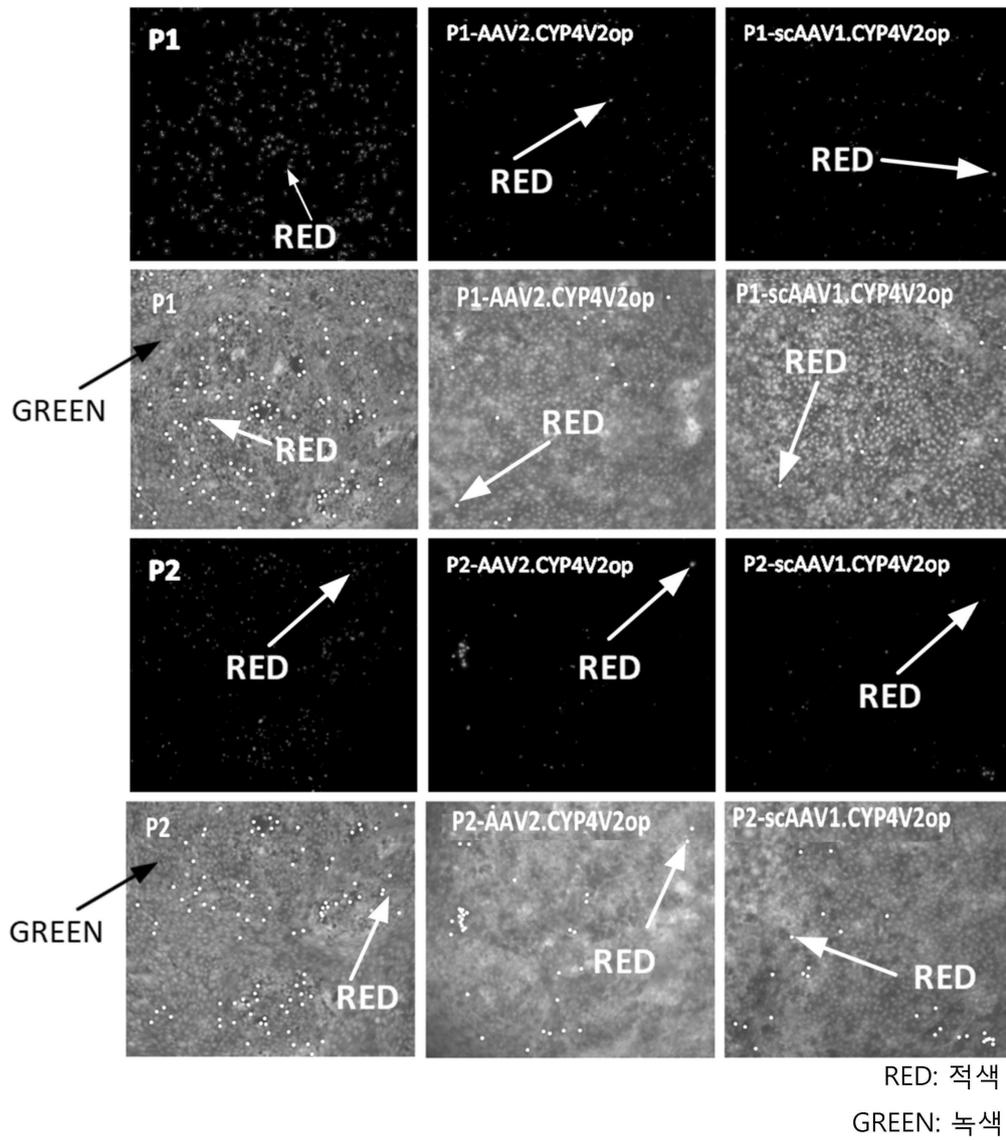
도면7c



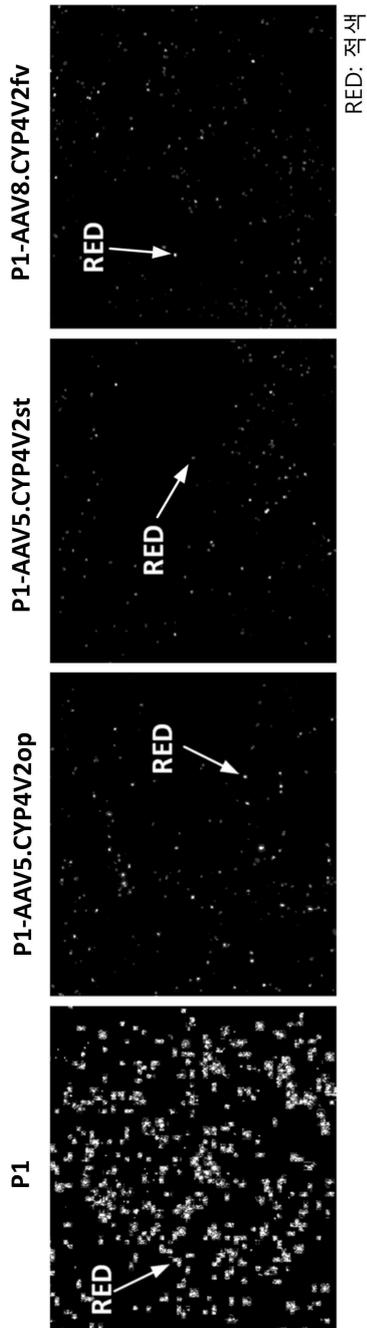
도면8a



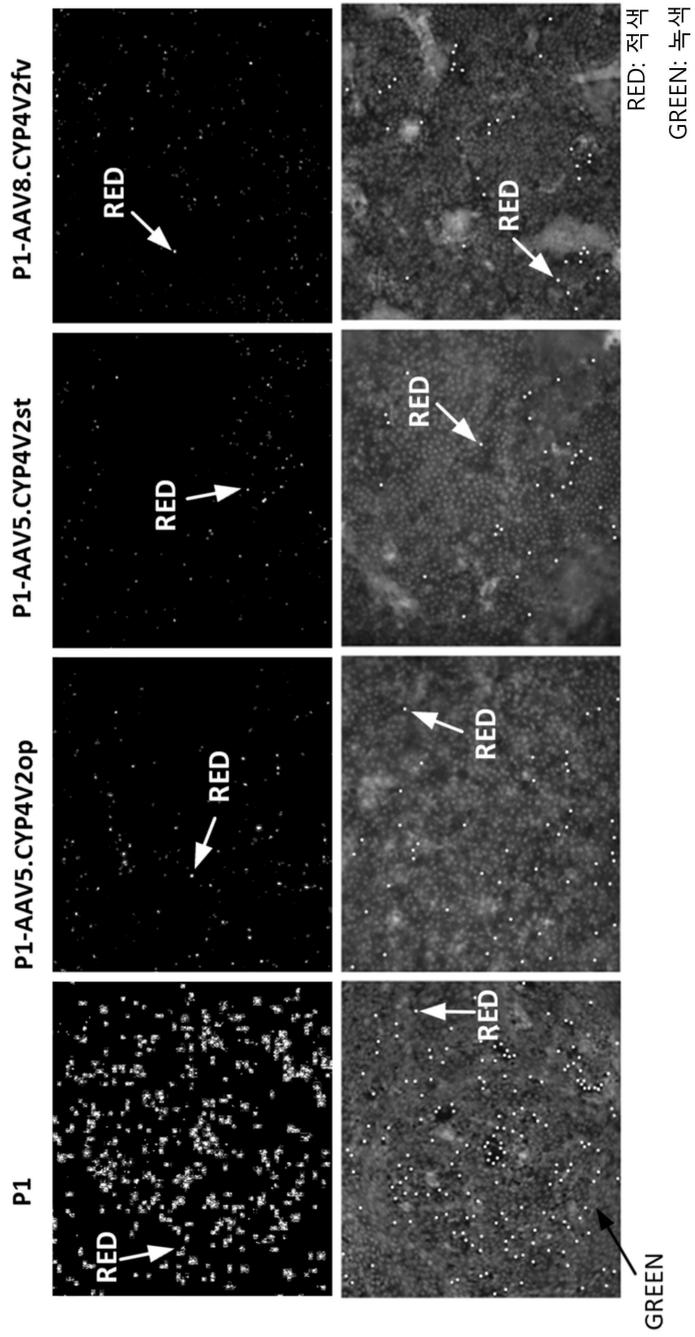
도면8b



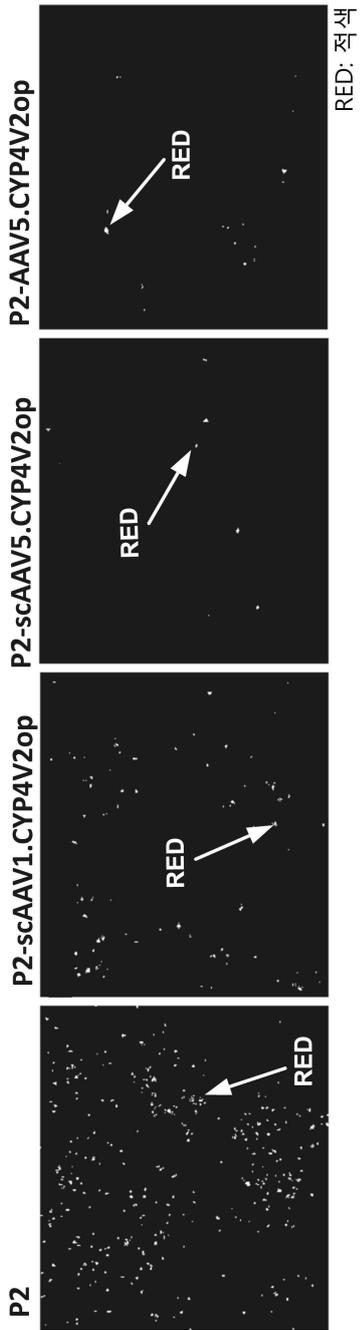
도면9a



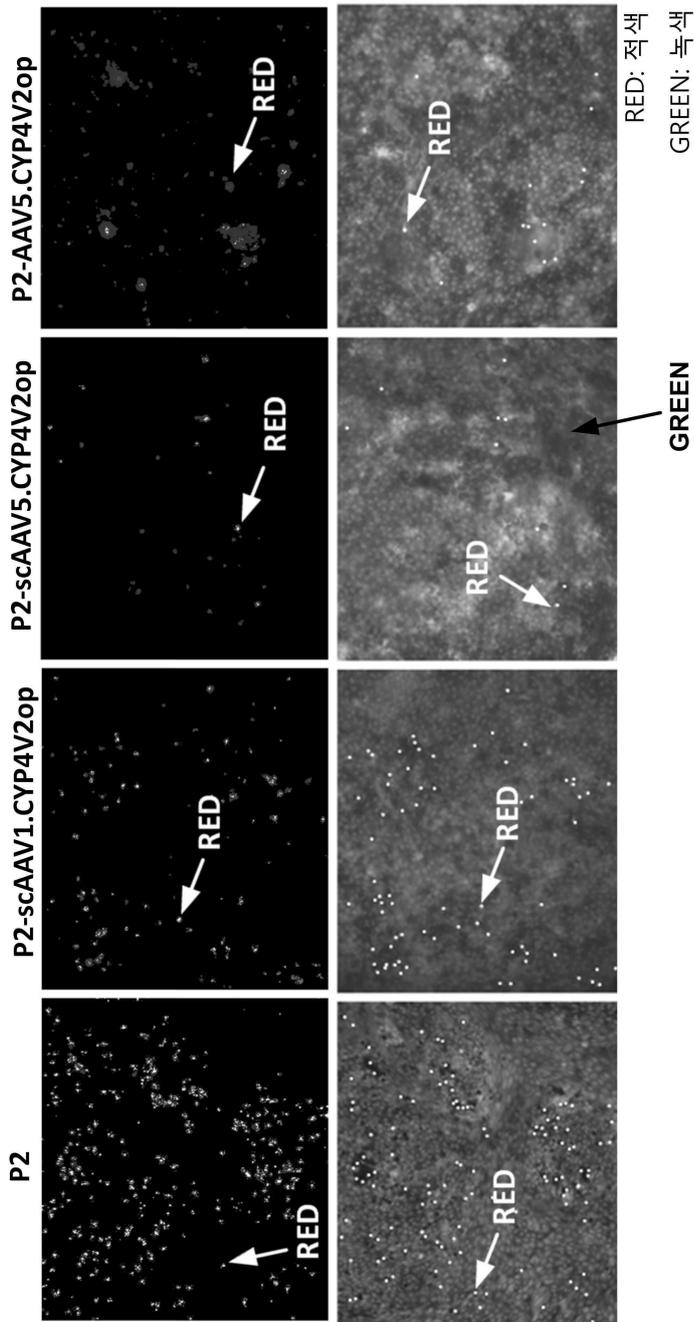
도면9b



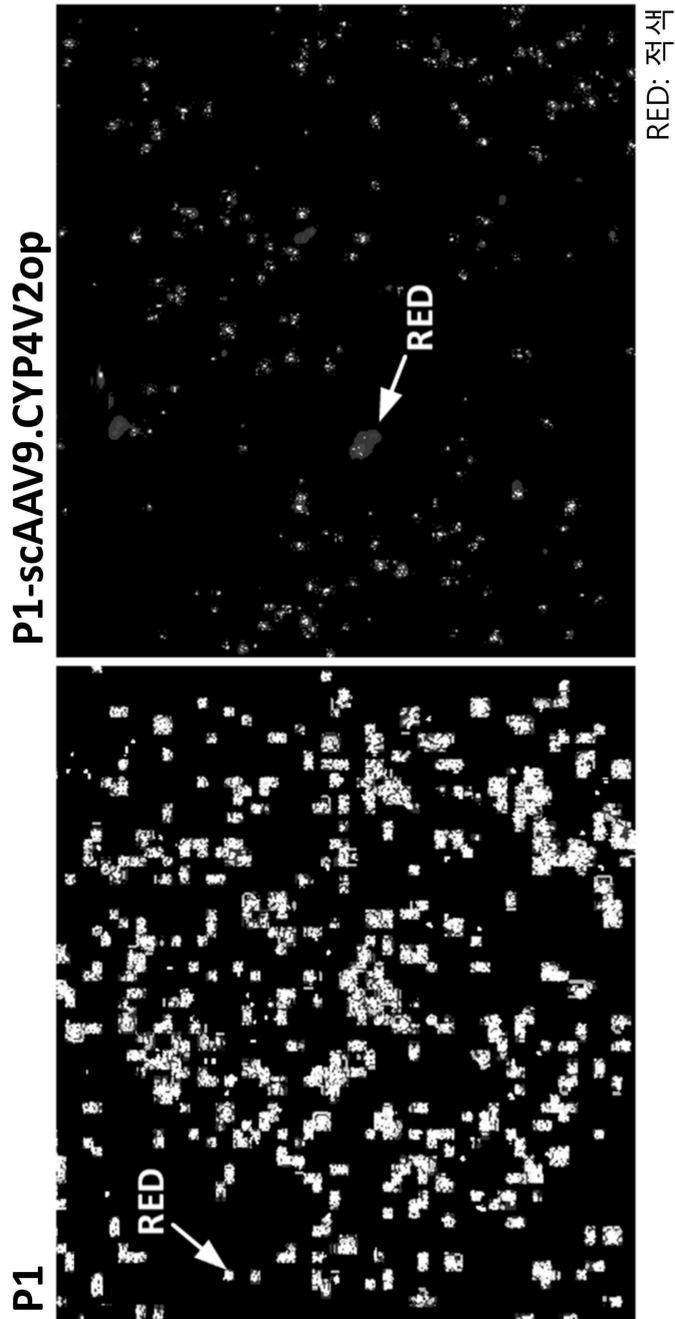
도면10a



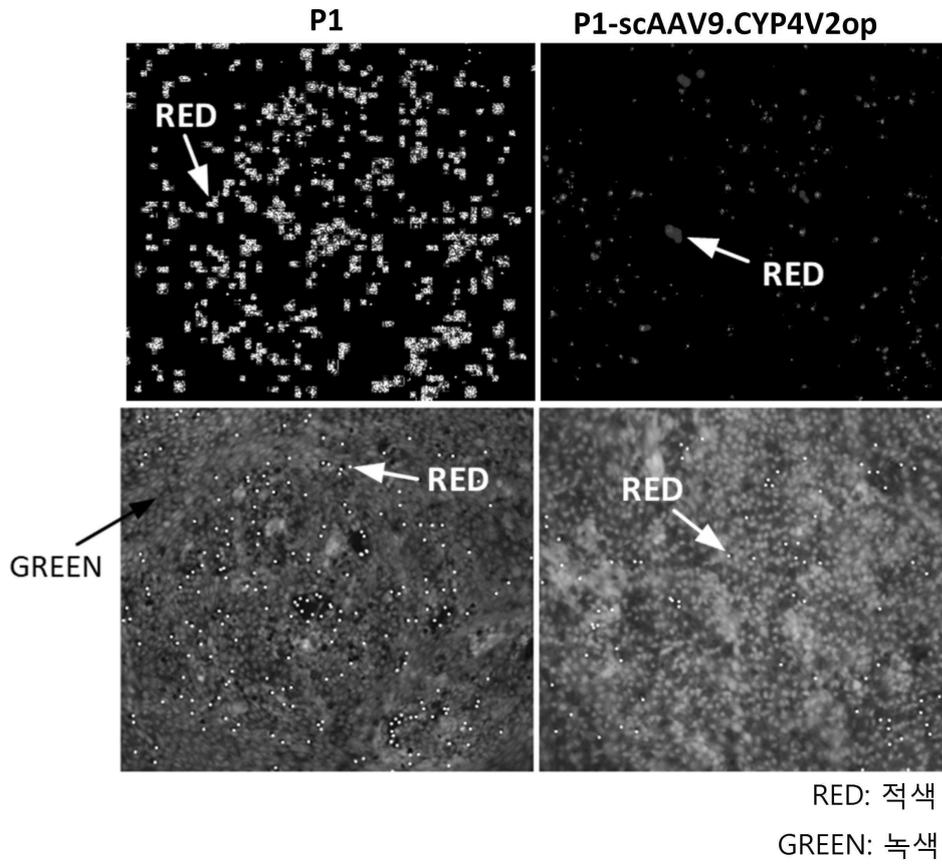
도면10b



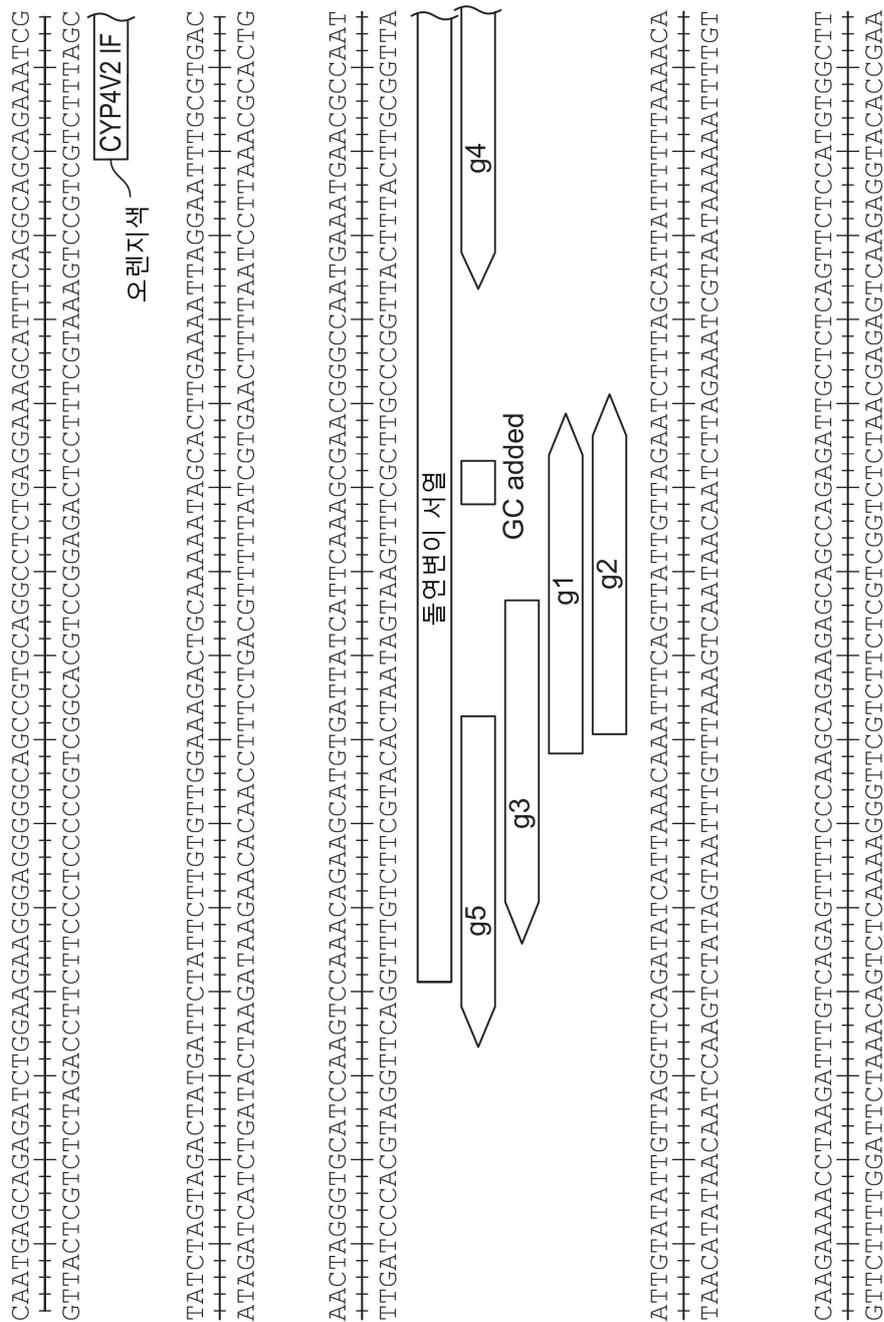
도면11a



도면11b



도면12a



도면12b

CAAAGCATAGAGGGTGAAATTCACATAAATCTGCTTGCCTTCTTTCTCCTCTACAACATGTAAATTAAGTCTATAAATTAG
 GTTCGTATCTCCCACTTAAGTGAATTAGACGAACGACAAAAGAGGAGATGTTGTACATTAATTCAGATATTAATC

CYP4V2 1F
 오렌지색

ATTAAATTTGTTTTTAAAAGTTTCAACCAGATAATCCCCAAAATAATTAATGAGGCTTTACTGTATTTTCAACAAGAGCCT
 TAAATTTAAACAAAAATTTCAAAGTGGTCTATTAGGGGTTTATAAATTAATCCGAAATGACATAAAAAGTGTCTCTCGGA

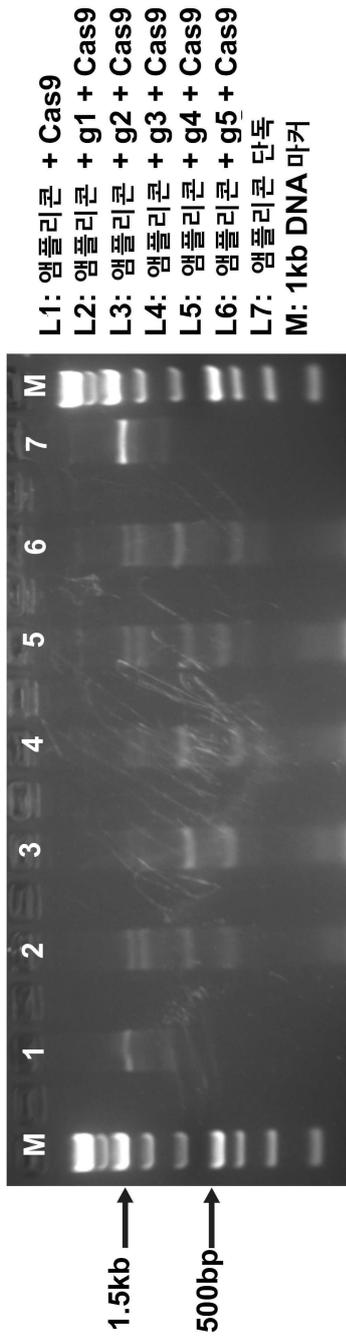
GAAAGCTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTTCTTGACTTGCCTTTAAAGT
 CTTCTGACATCTCCACTACCGTCCCCGAGACGGGGGAGGTTTATAATTTGCGTCCCCGAAAGAACTGAACGAAAAATTCA

94

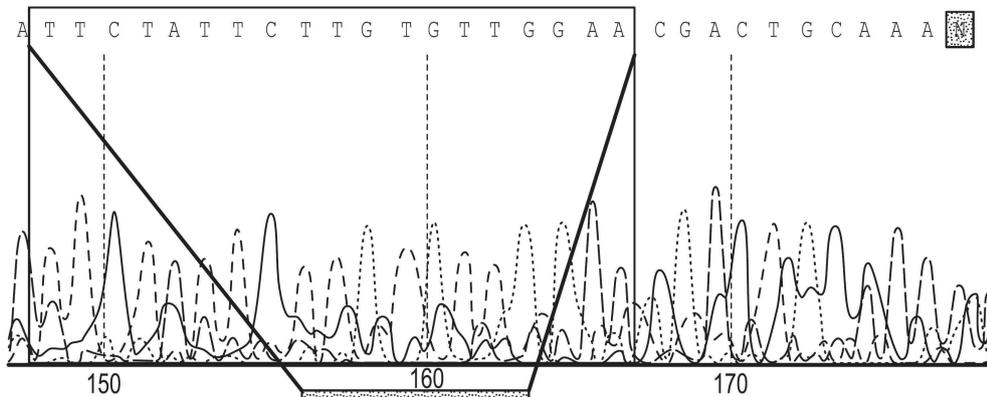
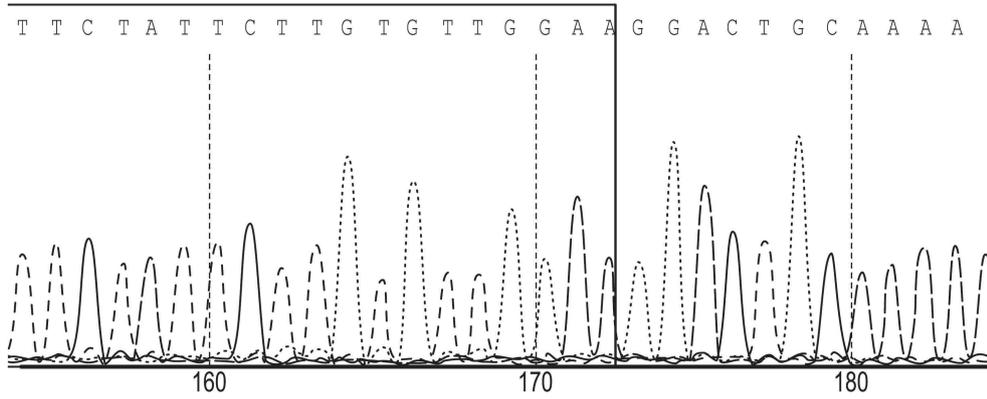
ATCAAATTTAAAAGTAGTTTAACTAAAGAAGATTCAATATAATTTAAATTAGAAAATACAAAAATTAAGAAAATGATTA
 TAGTTAAAAATTTCAATCAAAATTGATTTCTTCTAAGTAATAAAAAATTAATCTTTAAATGTTTAAATTTCTTTGACTAAT

CAGGCTTCCCTTCTAAACCTCCAGACATGCAAGTCCACTTCC'TCACCCACTGCTTTCTGAGGTTCCAGCAGATGAGCAC
 GTCCGAAGGAAGATTGGAGGGTCTGTACGTTCAGGTGAAGGAGTGGTGGACGAAAGACTCCAAGGTCGTCTACTCGTG

도면13



도면14b



TAGGGTACTATCTAGTAGACTATGA **T C A T T C T G T G G A A** AGACTGC AAAAATAGCACTTGAAAATTAGGAATTTGCCGT

ATCCCATGATAGATCATCTGATACTAAGATAAGAACACAACCTTTCTGACGTTTTTATCGTGAACCTTTAATCCTTAAACGCA

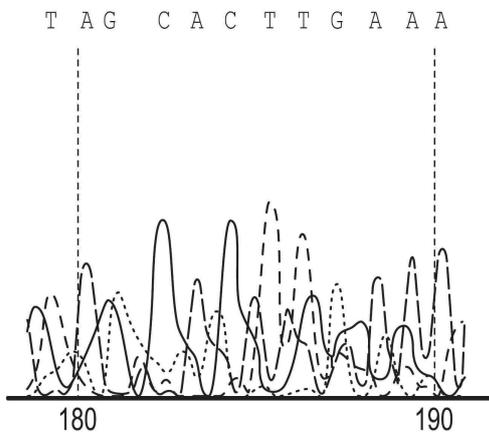
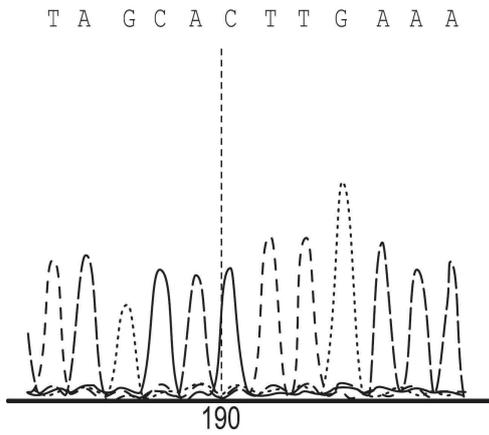
GAAATAGGCTTAGAAAAATAAATGAAAGAACTAGCATATTTTATAAGAAAATGTGTTAACTAGGGTGCATCCAAGTCCAAAC

CTTTATCCGAATGTTTTATTACTTTCTTTGATCGTATAAAAATTTCTTTTACACAATTGATCCACGTAGGTTTCAGGTTTG

TAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTTTAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAG

ATTTGCGTCCCGAAAGAACTGAACGAAAATTCACACTGACTACTGCTTCCTTGTCCGATTCAGTACTTCTATAAGCTCTTC

도면14c



GACATTAAATTTGTT

+++++ 10,440

CTGTAATTTAAACAA

AGAAGCATGTGATTA

+++++ 10,620

TCTTCGTACACTAAT

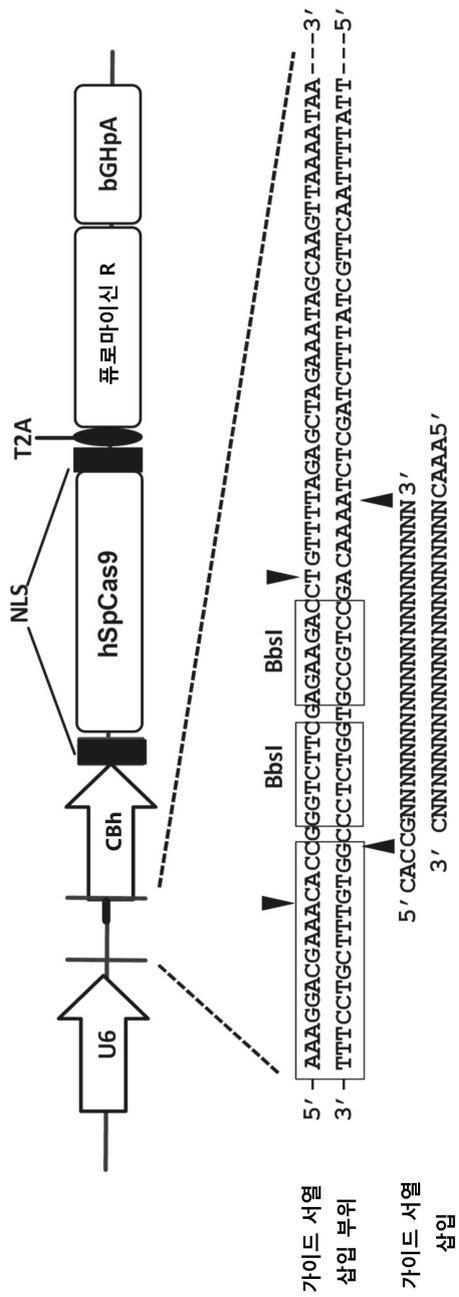
돌연변이

AAGTTGACACCTTCA

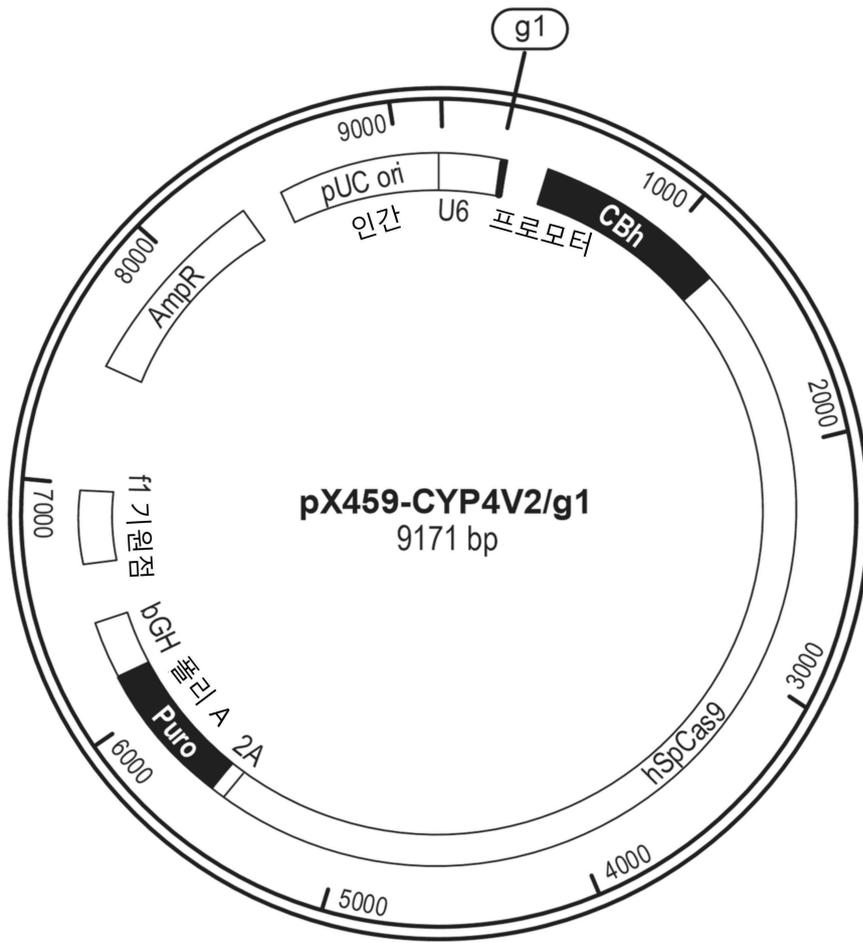
+++++ 10,800

TTCAACTGTGAAGT

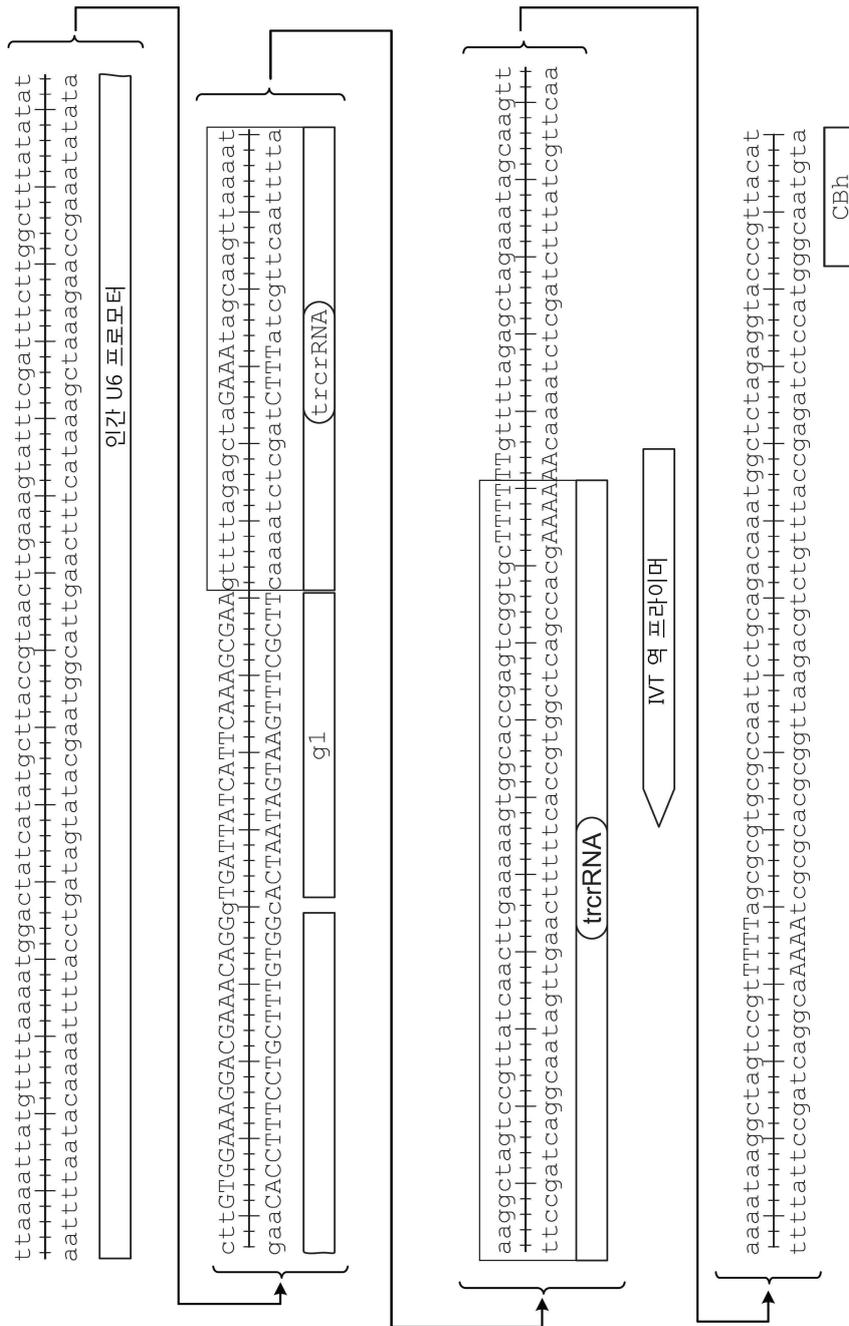
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Reflection Biotechnologies Limited
- <120> CELLULAR MODELS OF AND THERAPIES FOR OCULAR DISEASES
- <130> P20-006-INP-FRP
- <140> PCT/IB2018/055755
- <141> 2018-07-31

<150> US 62/539,473

<151> 2017-07-31

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1578

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated coding sequence

<400> 1

```

atggcggggc tctggctggg gctcgtgtgg cagaagctgc tgctgtgggg cgcggcgagt      60

gccctttccc tggccggcgc cagtctggtc ctgagcctgc tgcagagggt ggcgagctac      120
gcgcggaaat ggcagcagat gcggcccatc cccacggtgg cccgcgccta cccactggtg      180
ggccacgcgc tgctgatgaa gccggacggg cgagaatfff ttcagcagat cattgagtac      240
acagaggaat accgccacat gccgctgctg aagctctggg tcgggccagt gcccatggtg      300
gccctttata atgcagaaaa tgtggaggta attttaacta gttcaaagca aattgacaaa      360
tcctctatgt acaagttfff agaaccatgg cttggcctag gacttcttac aagtactgga      420
aacaatggc gctccaggag aaagatgffa acaccactt tccattttac cattctggaa      480

gatttcttag atatcatgaa tgaacaagca aatatattgg ttaagaaact tgaaaaacac      540
attaaccaag aagcatttaa ctgctttfff tacatcactc tttgtgcctt agatatcatc      600
tgtgaaacag ctatggggaa gaatattggt gctcaaagta atgatgattc cgagtatgtc      660
cgtgcagttt atagaatgag tgagatgata tttcgaagaa taaagatgcc ctggctttgg      720
cttgatctct ggiaccttat gtttaagaa ggatgggaac acaaaaagag ccttcagatc      780
ctacatactt ttaccaacag tgatcatgct gaacgggcca atgaaatgaa cgccaatgaa      840
gactgtagag gtgatggcag gggctctgcc cctccaaaa ataaacgcag ggcctttctt      900

gacttgcttt taagtgtgac tgatgacgaa gggaacaggc taagtcatga agatattcga      960
gaagaagttg acaccttcat gtttgagggg cacgatacaa ctgcagctgc aataaactgg     1020
tccttatacc tgttgggttc taaccagaa gtccagaaaa aagtggatca tgaattggat     1080
gacgtgtttg ggaagtctga ccgtcccgtc acagtagaag acctgaagaa acttcggtat     1140
ctggaatgtg ttattaagga gacccttctc ctttttctt ctgttctttt atttgcctgt     1200
agtgttagtg aagattgtga agtggcaggf tacagagttc taaaaggcac tgaagccgtc     1260

```

atcattccct atgcattgca cagagatccg agatacttcc ccaacccccga ggagttccag 1320

cctgagcggg tcttccccga gaatgcacaa gggcgccatc cataatgccta cgtgccttc 1380

tctgctggcc ccaggaactg tataggtcaa aagtttgctg tgatggaaga aaagaccatt 1440

ctttcgtgca tcctgaggca cttttggata gaatccaacc agaaaagaga agagcttgg 1500

ctagaaggac agttgattct tcgtccaagt aatggcatct ggatcaagtt gaagaggaga 1560

aatgcagatg aacgctaa 1578

<210> 2

<211> 1578

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated coding sequence

<400> 2

atggctggac tgtggctggg actggtgtgg cagaaactgc tgctgtgggg ggccgcttcc 60

gcactgtcac tggtctgggg ttaactggtg ctgagcctgc tgcagagggt ggcctcctac 120

gccagaaagt ggcagcagat gaggcccatc cctaccgtgg ccagagccta tccactggtg 180

ggacacgcac tgctgatgaa gcctgacggc agagagtctt ttcagcagat catcgagtac 240

acagaggagt ataggcacat gccactgctg aagctgtggg tgggacccgt gcctatggtg 300

gccctgtaca acgccgagaa tgtggaagtg atcctgacca gcagcaagca gatcgataag 360

tctagcatgt ataagttcct ggagccttgg ctgggcctgg gcctgctgac ctctacaggc 420

aacaagtgga ggagccggag aaagatgctg accccaacat tccactttac aatcctggag 480

gacttcttgg acatcatgaa cgagcaggcc aatatacctgg tgaagaagct ggagaagcac 540

atcaaccagg aggcctttaa ttgcttcttt tacatcaccc tgtgcgcctt ggacatcatc 600

tgtgagacag ctatgggcaa gaacatcggc gccagctcta atgacgatag cgagtacgtg 660

cgggccgtgt atagaatgag cgagatgac tttaggcgca tcaagatgcc ctggctgtgg 720

ctggatctgt ggtatctgat gttcaaggag ggctgggagc acaagaagtc cctgcagatc 780

ctgcacacct ttacaaactc tgtgatcgcc gagagagcca atgagatgaa cgccaatgag 840

gactgtaggg gcgatggaag gggcagcgcc ccttccaaga acaagcggag agccttctctg 900

gacctgctgc tgagcgtgac cgacgatgag ggcaatcgcc tgtcccacga ggacatccgg 960

gaggaggtgg atacattcat gtttgaggga cacgacacca cagccgccgc catcaactgg 1020

tcctgttacc tgcctggctc taatccagag gtgcagaaga aggtggatca cgagctggac 1080

gacgtgttcg gcaagtccga caggccagca accgtggagg atctgaagaa gctgagatac 1140

ctggagtgcg tgatcaagga gacactgcgc ctgttccct ctgtgcctct gtttgcggg 1200
 tccgtgtctg aggactgtga ggtggccggc tatcgctgc tgaagggcac cgaggccgtg 1260
 atcatccctt acgccctgca ccgggacccc aggtatttcc ctaaccaga ggagtttcag 1320

ccagagagat tctttccga gaatgccag ggcaggcacc cttacgcta tgtgccattc 1380
 tccgccggac caaggaactg catcggacag aagtttgcg tgatggagga gaaaaccatc 1440
 ctgtcttgta tectgagaca cttctggatc gagagcaatc agaagagga ggagctgggc 1500
 ctggagggac agctgatcct gcggccaagc aacggcatct ggatcaact gaaaagaagg 1560
 aacgctgacg agaggtaa 1578

<210> 3
 <211> 1578
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated coding sequence
 <400> 3

atggcggggc tctggctggg gctcgtgtgg cagaagctgc tgctgtggg gcggcgagt 60

gccctttccc tggccggcgc cagtctggtc ctgagcctgc tgcagagggt ggcgagctac 120
 gcgcggaaat ggcagcagat gcggccatc cccacggtgg cccgcgcta cccactggtg 180
 ggccacgcgc tgctgatgaa gccggacggg cgagaat ttcagcagat cattgagtac 240
 acagaggaat accgccacat gccctgctg aagctctggg tcgggccagt gccatggtg 300
 gccctttata atgcagaaaa tgtggaggta attttaacta gttcaaagca aattgacaaa 360
 tcctctatgt acaagttttt agaaccatgg cttggcctag gacttcttac aagtactgga 420
 aacaaatggc gctccaggag aaagatgtta acaccactt tccat tttac cattctggaa 480

gatttcttag atatcatgaa tgaacaagca aatataatgg ttaagaaact tgaaaaacac 540
 attaaccaag aagcatttaa ctgctttttt tacatcactc tttgtgcctt agatatcacc 600
 tgtgaaacag ctatggggaa gaatattggt gctcaaagta atgatgattc cgagtatgtc 660
 cgtgcagttt atagaatgag tgagatgata tttcgaagaa taaagatgcc ctggctttgg 720
 cttgatctct ggtaccttat gtttaagaa ggatgggaac acaaaaagag ccttaagatc 780
 ctacatactt ttaccaacag tgtcatcgcg gaacgggcca atgaaatgaa cgccaatgaa 840
 gactgtagag gtgatggcag gggctctgcc cctccaaaa ataacgcag gccctttctt 900

gacttgcctt taagtgtgac tgatgacgaa gggaacaggc taagtcatga agatattcga 960
 gaagaagtgg acaccttcat gtttgagggg cacgatacaa ctgcagctgc aataaactgg 1020

tccttataacc tgttgggttc taaccagaa gtccagaaaa aagtggatca tgaattggat 1080
gacgtgtttg ggaagtctga ccgtcccgt acagtagaag acctgaaga acttcggtat 1140
ctggaatgtg ttattaagga gacccttcgc ctttttcctt ctgttccttt atttgcccg 1200
agtgttagtg aagatttga agtggcaggt tacagagttc taaaaggcac tgaagccgtc 1260
atcattccct atgcattgca cagagatccg agatacttcc ccaaccccga ggagtccag 1320

cctgagcggg tcttccccga gaatcacaaa gggcgccatc catatgccta cgtgccttc 1380
tctgctggcc ccaggaactg tataggtcaa aagtttctg tgatggaaga aaagaccatt 1440
ctttcgtgca tctgaggca cttttggata gaatccaacc agaaaagaga agagcttgg 1500
ctagaaggac agttgattct tcgtccaagt aatggcatct ggatcaagtt gaagaggaga 1560
aatgcagatg aacgctaa 1578

<210> 4

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Leu Trp Leu Gly Leu Val Trp Gln Lys Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15
Gly Ala Ala Ser Ala Leu Ser Leu Ala Gly Ala Ser Leu Val Leu Ser

20 25 30
Leu Leu Gln Arg Val Ala Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg

35 40 45
Pro Ile Pro Thr Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu

50 55 60
Leu Met Lys Pro Asp Gly Arg Glu Phe Phe Gln Gln Ile Ile Glu Tyr

65 70 75 80
Thr Glu Glu Tyr Arg His Met Pro Leu Leu Lys Leu Trp Val Gly Pro

85 90 95
Val Pro Met Val Ala Leu Tyr Asn Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu

100 105 110
Thr Ser Ser Lys Gln Ile Asp Lys Ser Ser Met Tyr Lys Phe Leu Glu

115 120 125

Pro Trp Leu Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Asn Lys Trp Arg
 130 135 140
 Ser Arg Arg Lys Met Leu Thr Pro Thr Phe His Phe Thr Ile Leu Glu
 145 150 155 160
 Asp Phe Leu Asp Ile Met Asn Glu Gln Ala Asn Ile Leu Val Lys Lys
 165 170 175
 Leu Glu Lys His Ile Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Tyr Ile
 180 185 190
 Thr Leu Cys Ala Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn
 195 200 205
 Ile Gly Ala Gln Ser Asn Asp Asp Ser Glu Tyr Val Arg Ala Val Tyr
 210 215 220
 Arg Met Ser Glu Met Ile Phe Arg Arg Ile Lys Met Pro Trp Leu Trp
 225 230 235 240
 Leu Asp Leu Trp Tyr Leu Met Phe Lys Glu Gly Trp Glu His Lys Lys
 245 250 255
 Ser Leu Gln Ile Leu His Thr Phe Thr Asn Ser Val Ile Ala Glu Arg
 260 265 270
 Ala Asn Glu Met Asn Ala Asn Glu Asp Cys Arg Gly Asp Gly Arg Gly
 275 280 285
 Ser Ala Pro Ser Lys Asn Lys Arg Arg Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Val Thr Asp Asp Glu Gly Asn Arg Leu Ser His Glu Asp Ile Arg
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala
 325 330 335
 Ala Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Pro Glu Val Gln
 340 345 350
 Lys Lys Val Asp His Glu Leu Asp Asp Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg
 355 360 365
 Pro Ala Thr Val Glu Asp Leu Lys Lys Leu Arg Tyr Leu Glu Cys Val

Ser Val Thr Asp Asp Glu Gly Asn Arg Leu Ser His Glu Asp Ile Arg
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala
 325 330 335
 Ala Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Pro Glu Val Gln
 340 345 350
 Lys Lys Val Asp His Glu Leu Asp Asp Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg
 355 360 365

 Pro Ala Thr Val Glu Asp Leu Lys Lys Leu Arg Tyr Leu Glu Cys Val
 370 375 380
 Ile Lys Glu Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg
 385 390 395 400
 Ser Val Ser Glu Asp Cys Glu Val Ala Gly Tyr Arg Val Leu Lys Gly
 405 410 415
 Thr Glu Ala Val Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr
 420 425 430

 Phe Pro Asn Pro Glu Glu Phe Gln Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn
 435 440 445
 Ala Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro
 450 455 460
 Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile
 465 470 475 480
 Leu Ser Cys Ile Leu Arg His Phe Trp Ile Glu Ser Asn Gln Lys Arg
 485 490 495

 Glu Glu Leu Gly Leu Glu Gly Gln Leu Ile Leu Arg Pro Ser Asn Gly
 500 505 510
 Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Glu Arg
 515 520 525
 <210> 6
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Val Ala Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg Pro Ile Pro
 1 5 10 15

Thr Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu Leu Met Lys
 20 25 30

Pro Asp Gly Arg Glu Phe Phe Gln Gln Ile Ile Glu Tyr Thr Glu Glu
 35 40 45

Tyr Arg His Met Pro Leu Leu Lys Leu Trp Val Gly Pro Val Pro Met
 50 55 60

Val Ala Leu Tyr Asn Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu Thr Ser Ser
 65 70 75 80

Lys Gln Ile Asp Lys Ser Ser Met Tyr Lys Phe Leu Glu Pro Trp Leu
 85 90 95

Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Asn Lys Trp Arg Ser Arg Arg
 100 105 110

Lys Met Leu Thr Pro Thr Phe His Phe Thr Ile Leu Glu Asp Phe Leu
 115 120 125

Asp Ile Met Asn Glu Gln Ala Asn Ile Leu Val Lys Lys Leu Glu Lys
 130 135 140

His Ile Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Tyr Ile Thr Leu Cys
 145 150 155 160

Ala Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn Ile Gly Ala
 165 170 175

Gln Ser Asn Asp Asp Ser Glu Tyr Val Arg Ala Val Tyr Arg Met Ser
 180 185 190

Glu Met Ile Phe Arg Arg Ile Lys Met Pro Trp Leu Trp Leu Asp Leu
 195 200 205

Trp Tyr Leu Met Phe Lys Glu Gly Trp Glu His Lys Lys Ser Leu Gln
 210 215 220

Ile Leu His Thr Phe Thr Asn Ser Val Ile Ala Glu Arg Ala Asn Glu
 225 230 235 240

Met Asn Ala Asn Glu Asp Cys Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Ala Pro
 245 250 255

Ser Lys Asn Lys Arg Arg Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu Ser Val Thr
 260 265 270

Asp Asp Glu Gly Asn Arg Leu Ser His Glu Asp Ile Arg Glu Glu Val
 275 280 285

Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala Ala Ile Asn
 290 295 300

Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Pro Glu Val Gln Lys Lys Val
 305 310 315 320

Asp His Glu Leu Asp Asp Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg Pro Ala Thr
 325 330 335

Val Glu Asp Leu Lys Lys Leu Arg Tyr Leu Glu Cys Val Ile Lys Glu
 340 345 350

Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg Ser Val Ser
 355 360 365

Glu Asp Cys Glu Val Ala Gly Tyr Arg Val Leu Lys Gly Thr Glu Ala
 370 375 380

Val Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr Phe Pro Asn
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Phe Gln Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn Ala Gln Gly
 405 410 415

Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro Arg Asn Cys
 420 425 430

Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile Leu Ser Cys
 435 440 445

Ile Leu Arg His Phe Trp Ile Glu Ser Asn Gln Lys Arg Glu Glu Leu
 450 455 460

Gly Leu Glu Gly Gln Leu Ile Leu Arg Pro Ser Asn Gly Ile Trp Ile
 465 470 475 480

Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Glu Arg

485 490

<210> 7

<211> 500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Phe

1 5 10 15

Gly Leu Cys Cys Thr Phe Val His Arg Ala Arg Ser Arg Tyr Glu His

20 25 30

Ile Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ser Phe Leu Leu Gly His Leu Pro Cys

35 40 45

Phe Trp Lys Lys Asp Glu Val Gly Gly Arg Val Leu Gln Asp Val Phe

50 55 60

Leu Asp Trp Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Val Arg Val Asn Val Phe

65 70 75 80

His Lys Thr Ser Val Ile Val Thr Ser Pro Glu Ser Val Lys Lys Phe

85 90 95

Leu Met Ser Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ser Lys Met Tyr Arg Ala Leu

100 105 110

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

115 120 125

Cys Asn Tyr Glu Arg Trp His Lys Gln Arg Arg Val Ile Asp Leu Ala

130 135 140

Phe Ser Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Met Glu Thr Phe Asn Glu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Gln Leu Val Glu Ile Leu Glu Ala Lys Ala Asp Gly Gln Thr

165 170 175

Pro Val Ser Met Gln Asp Met Leu Thr Tyr Thr Ala Met Asp Ile Leu

180 185 190

Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln

195 200 205

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

 Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp
 245 250 255
 Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro
 260 265 270
 Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp
 275 280 285
 Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

 Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile
 325 330 335
 Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr
 340 345 350
 Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp
 355 360 365

 Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg
 370 375 380
 Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg
 385 390 395 400
 Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe
 405 410 415
 Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu
 420 425 430

 Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys
 435 440 445
 Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro

Leu Met Ala Asp Ser Val Arg Val Met Leu Asp Lys Trp Glu Glu Leu
 165 170 175
 Leu Gly Gln Asp Ser Pro Leu Glu Val Phe Gln His Val Ser Leu Met
 180 185 190
 Thr Leu Asp Thr Ile Met Lys Cys Ala Phe Ser His Gln Gly Ser Ile
 195 200 205
 Gln Val Asp Arg Asn Ser Gln Ser Tyr Ile Gln Ala Ile Ser Asp Leu
 210 215 220
 Asn Asn Leu Val Phe Ser Arg Val Arg Asn Ala Phe His Gln Asn Asp
 225 230 235 240
 Thr Ile Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Gly Arg Trp Thr His Arg Ala Cys
 245 250 255
 Gln Leu Ala His Gln His Thr Asp Gln Val Ile Gln Leu Arg Lys Ala
 260 265 270
 Gln Leu Gln Lys Glu Gly Glu Leu Glu Lys Ile Lys Arg Lys Arg His
 275 280 285
 Leu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Leu Leu Ala Lys Met Glu Asn Gly Ser
 290 295 300
 Ile Leu Ser Asp Lys Asp Leu Arg Ala Glu Val Asp Thr Phe Met Phe
 305 310 315 320
 Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ser Trp Ile Leu Tyr Ala
 325 330 335
 Leu Ala Thr His Pro Lys His Gln Glu Arg Cys Arg Glu Glu Ile His
 340 345 350
 Ser Leu Leu Gly Asp Gly Ala Ser Ile Thr Trp Asn His Leu Asp Gln
 355 360 365
 Met Pro Tyr Thr Thr Met Cys Ile Lys Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
 370 375 380
 Pro Val Pro Gly Ile Gly Arg Glu Leu Ser Thr Pro Val Thr Phe Pro
 385 390 395 400
 Asp Gly Arg Ser Leu Pro Lys Gly Ile Met Val Leu Leu Ser Ile Tyr

Val Gln Leu Tyr Asp Pro Asp Tyr Met Lys Val Ile Leu Gly Arg Ser
 100 105 110
 Asp Pro Lys Ser His Gly Ser Tyr Lys Phe Leu Ala Pro Arg Ile Gly
 115 120 125
 Tyr Gly Leu Leu Leu Leu Asn Gly Gln Thr Trp Phe Gln His Arg Arg
 130 135 140
 Met Leu Thr Pro Ala Phe His Asn Asp Ile Leu Lys Pro Tyr Val Gly
 145 150 155 160
 Leu Met Ala Asp Ser Val Arg Val Met Leu Asp Lys Trp Glu Glu Leu
 165 170 175
 Leu Gly Gln Asp Ser Pro Leu Glu Val Phe Gln His Val Ser Leu Met
 180 185 190
 Thr Leu Asp Thr Ile Met Lys Ser Ala Phe Ser His Gln Gly Ser Ile
 195 200 205
 Gln Val Asp Arg Asn Ser Gln Ser Tyr Ile Gln Ala Ile Ser Asp Leu
 210 215 220
 Asn Ser Leu Val Phe Cys Cys Met Arg Asn Ala Phe His Glu Asn Asp
 225 230 235 240
 Thr Ile Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Gly Arg Trp Thr His Arg Ala Cys
 245 250 255
 Gln Leu Ala His Gln His Thr Asp Gln Val Ile Gln Leu Arg Lys Ala
 260 265 270
 Gln Leu Gln Lys Glu Gly Glu Leu Glu Lys Ile Lys Arg Lys Arg His
 275 280 285
 Leu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Leu Leu Ala Lys Met Glu Asn Gly Ser
 290 295 300
 Ile Leu Ser Asp Lys Asp Leu Arg Ala Glu Val Asp Thr Phe Met Phe
 305 310 315 320
 Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ser Gly Ile Ser Trp Ile Leu Tyr Ala
 325 330 335
 Leu Ala Thr His Pro Lys His Gln Glu Arg Cys Arg Glu Glu Ile His

340 345 350
 Gly Leu Leu Gly Asp Gly Ala Ser Ile Thr Trp Asn His Leu Asp Gln

355 360 365
 Met Pro Tyr Thr Thr Met Cys Ile Lys Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro

370 375 380
 Pro Val Pro Gly Ile Gly Arg Glu Leu Ser Thr Pro Val Thr Phe Pro

385 390 395 400
 Asp Gly Arg Ser Leu Pro Lys Gly Ile Met Val Leu Leu Ser Ile Tyr

405 410 415
 Gly Leu His His Asn Pro Lys Val Trp Pro Asn Leu Glu Val Phe Asp

420 425 430
 Pro Ser Arg Phe Ala Pro Gly Ser Ala Gln His Ser His Ala Phe Leu

435 440 445
 Pro Phe Ser Gly Gly Ser Arg Asn Cys Ile Gly Lys Gln Phe Ala Met

450 455 460
 Asn Gln Leu Lys Val Ala Arg Ala Leu Thr Leu Leu Arg Phe Glu Leu

465 470 475 480
 Leu Pro Asp Pro Thr Arg Ile Pro Ile Pro Met Ala Arg Leu Val Leu

485 490 495
 Lys Ser Lys Asn Gly Ile His Leu Arg Leu Arg Arg Leu Pro Asn Pro

500 505 510
 Cys Glu Asp Lys Asp Gln Leu

515

<210> 10

<211> 511

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Val Pro Ser Phe Leu Ser Leu Ser Phe Ser Ser Leu Gly Leu Trp

1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Ile Leu Val Leu Gly Phe Leu Lys Leu Ile His Leu

Val Arg Lys Lys Ile Gln Asn Arg Arg His Leu Asp Phe Leu Asp Ile

275 280 285

Leu Leu Gly Ala Arg Asp Glu Asp Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ala Asp

290 295 300

Leu Arg Ala Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr

305 310 315 320

Thr Ser Gly Ile Ser Trp Phe Leu Tyr Cys Met Ala Leu Tyr Pro Glu

325 330 335

His Gln His Arg Cys Arg Glu Glu Val Arg Glu Ile Leu Gly Asp Gln

340 345 350

Asp Phe Phe Gln Trp Asp Asp Leu Gly Lys Met Thr Tyr Leu Thr Met

355 360 365

Cys Ile Lys Glu Ser Phe Arg Leu Tyr Pro Pro Val Pro Gln Val Tyr

370 375 380

Arg Gln Leu Ser Lys Pro Val Thr Phe Val Asp Gly Arg Ser Leu Pro

385 390 395 400

Ala Gly Ser Leu Ile Ser Met His Ile Tyr Ala Leu His Arg Asn Ser

405 410 415

Ala Val Trp Pro Asp Pro Glu Val Phe Asp Ser Leu Arg Phe Ser Thr

420 425 430

Glu Asn Ala Ser Lys Arg His Pro Phe Ala Phe Met Pro Phe Ser Ala

435 440 445

Gly Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Met Ser Glu Met Lys

450 455 460

Val Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Arg Phe Glu Phe Ser Leu Asp Pro

465 470 475 480

Ser Arg Leu Pro Ile Lys Met Pro Gln Leu Val Leu Arg Ser Lys Asn

485 490 495

Gly Phe His Leu His Leu Lys Pro Leu Gly Pro Gly Ser Gly Lys

500 505 510

<210> 11

<211> 520

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Gln Leu Ser Leu Ser Trp Leu Gly Leu Trp Pro Val Ala Ala

1 5 10 15

Ser Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Gly Ala Ser Trp Leu Leu Ala

20 25 30

His Val Leu Ala Trp Thr Tyr Ala Phe Tyr Asp Asn Cys Arg Arg Leu

35 40 45

Arg Cys Phe Pro Gln Pro Pro Arg Arg Asn Trp Phe Trp Gly His Gln

50 55 60

Gly Met Val Asn Pro Thr Glu Glu Gly Met Arg Val Leu Thr Gln Leu

65 70 75 80

Val Ala Thr Tyr Pro Gln Gly Phe Lys Val Trp Met Gly Pro Ile Ser

85 90 95

Pro Leu Leu Ser Leu Cys His Pro Asp Ile Ile Arg Ser Val Ile Asn

100 105 110

Ala Ser Ala Ala Ile Ala Pro Lys Asp Lys Phe Phe Tyr Ser Phe Leu

115 120 125

Glu Pro Trp Leu Gly Asp Gly Leu Leu Leu Ser Ala Gly Asp Lys Trp

130 135 140

Ser Arg His Arg Arg Met Leu Thr Pro Ala Phe His Phe Asn Ile Leu

145 150 155 160

Lys Pro Tyr Met Lys Ile Phe Asn Glu Ser Val Asn Ile Met His Ala

165 170 175

Lys Trp Gln Leu Leu Ala Ser Glu Gly Ser Ala Cys Leu Asp Met Phe

180 185 190

Glu His Ile Ser Leu Met Thr Leu Asp Ser Leu Gln Lys Cys Val Phe

195 200 205

Ser Phe Asp Ser His Cys Gln Glu Lys Pro Ser Glu Tyr Ile Ala Ala

Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Thr Phe Ala Met Ala Glu Met Lys Val
 465 470 475 480

Val Leu Ala Leu Thr Leu Leu Arg Phe Arg Val Leu Pro Asp His Thr
 485 490 495

Glu Pro Arg Arg Lys Pro Glu Leu Val Leu Arg Ala Glu Gly Gly Leu
 500 505 510

Trp Leu Arg Val Glu Pro Leu Ser
 515 520

<210> 12
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Pro Gln Leu Ser Leu Ser Ser Leu Gly Leu Trp Pro Met Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Trp Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Ala Ser Trp Leu Leu Ala
 20 25 30

Arg Ile Leu Ala Trp Thr Tyr Thr Phe Tyr Asp Asn Cys Cys Arg Leu
 35 40 45

Arg Cys Phe Pro Gln Pro Pro Lys Arg Asn Trp Phe Leu Gly His Leu
 50 55 60

Gly Leu Ile His Ser Ser Glu Glu Gly Leu Leu Tyr Thr Gln Ser Leu
 65 70 75 80

Ala Cys Thr Phe Gly Asp Met Cys Cys Trp Trp Val Gly Pro Trp His
 85 90 95

Ala Ile Val Arg Ile Phe His Pro Thr Tyr Ile Lys Pro Val Leu Phe
 100 105 110

Ala Pro Ala Ala Ile Val Pro Lys Asp Lys Val Phe Tyr Ser Phe Leu
 115 120 125

Lys Pro Trp Leu Gly Asp Gly Leu Leu Leu Ser Ala Gly Glu Lys Trp
 130 135 140

Ser Arg His Arg Arg Met Leu Thr Pro Ala Phe His Phe Asn Ile Leu

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

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

 Arg Arg Ala Cys Arg Leu Val His Asp Phe Thr Asp Ala Val Ile Gln
 260 265 270
 Glu Arg Arg Arg Thr Leu Pro Ser Gln Gly Val Asp Asp Phe Leu Gln
 275 280 285
 Ala Lys Ala Lys Ser Lys Thr Leu Asp Phe Ile Asp Val Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Lys Leu Ser Asp Glu Asp Ile Arg Ala
 305 310 315 320

 Glu Ala Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ser Gly
 325 330 335
 Leu Ser Trp Val Leu Tyr His Leu Ala Lys His Pro Glu Tyr Gln Glu
 340 345 350
 Arg Cys Arg Gln Glu Val Gln Glu Leu Leu Lys Asp Arg Glu Pro Lys
 355 360 365
 Glu Ile Glu Trp Asp Asp Leu Ala Gln Leu Pro Phe Leu Thr Met Cys
 370 375 380

 Ile Lys Glu Ser Leu Arg Leu His Pro Pro Val Pro Ala Val Ser Arg
 385 390 395 400

Cys Cys Thr Gln Asp Ile Val Leu Pro Asp Gly Arg Val Ile Pro Lys
 405 410 415
 Gly Ile Ile Cys Leu Ile Ser Val Phe Gly Thr His His Asn Pro Ala
 420 425 430
 Val Trp Pro Asp Pro Glu Val Tyr Asp Pro Phe Arg Phe Asp Pro Lys
 435 440 445

 Asn Ile Lys Glu Arg Ser Pro Leu Ala Phe Ile Pro Phe Ser Ala Gly
 450 455 460
 Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Ala Phe Ala Met Ala Glu Met Lys Val
 465 470 475 480
 Val Leu Gly Leu Thr Leu Leu Arg Phe Arg Val Leu Pro Asp His Thr
 485 490 495
 Glu Pro Arg Arg Lys Pro Glu Leu Val Leu Arg Ala Glu Gly Gly Leu
 500 505 510

 Trp Leu Arg Val Glu Pro Leu Ser
 515 520
 <210> 13
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Ser Leu Leu Ser Leu Ser Trp Leu Gly Leu Arg Pro Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Val Gly Ala Ser Trp Leu Leu Ala
 20 25 30
 Arg Ile Leu Ala Trp Thr Tyr Ala Phe Tyr His Asn Gly Arg Arg Leu
 35 40 45

 Arg Cys Phe Pro Gln Pro Arg Lys Gln Asn Trp Phe Leu Gly His Leu
 50 55 60
 Gly Leu Val Thr Pro Thr Glu Glu Gly Leu Arg Val Leu Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Tyr Pro Gln Gly Phe Val Arg Trp Leu Gly Pro Ile Thr

	85	90	95
Pro Ile Ile Asn Leu Cys His Pro Asp Ile Val Arg Ser Val Ile Asn			
	100	105	110
Thr Ser Asp Ala Ile Thr Asp Lys Asp Ile Val Phe Tyr Lys Thr Leu			
	115	120	125
Lys Pro Trp Leu Gly Asp Gly Leu Leu Leu Ser Val Gly Asp Lys Trp			
	130	135	140
Arg His His Arg Arg Leu Leu Thr Pro Ala Phe His Phe Asn Ile Leu			
145	150	155	160
Lys Pro Tyr Ile Lys Ile Phe Ser Lys Ser Ala Asn Ile Met His Ala			
	165	170	175
Lys Trp Gln Arg Leu Ala Met Glu Gly Ser Thr Cys Leu Asp Val Phe			
	180	185	190
Glu His Ile Ser Leu Met Thr Leu Asp Ser Leu Gln Lys Cys Ile Phe			
	195	200	205
Ser Phe Asp Ser Asn Cys Gln Glu Lys Pro Ser Glu Tyr Ile Thr Ala			
	210	215	220
Ile Met Glu Leu Ser Ala Leu Val Val Lys Arg Asn Asn Gln Phe Phe			
225	230	235	240
Arg Tyr Lys Asp Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Pro Cys Gly Arg Arg Phe			
	245	250	255
His Arg Ala Cys Arg Leu Val His Asp Phe Thr Asp Ala Val Ile Gln			
	260	265	270
Glu Arg Arg Arg Thr Leu Thr Ser Gln Gly Val Asp Asp Phe Leu Gln			
	275	280	285
Ala Lys Ala Lys Ser Lys Thr Leu Asp Phe Ile Asp Val Leu Leu Leu			
	290	295	300
Ser Glu Asp Lys Asn Gly Lys Glu Leu Ser Asp Glu Asp Ile Arg Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Asp Thr Phe Met Phe Gly Gly His Asp Thr Thr Ala Ser Gly			
	325	330	335

Leu Ser Trp Val Leu Tyr Asn Leu Ala Arg His Pro Glu Tyr Gln Glu
 340 345 350
 Arg Cys Arg Gln Glu Val Gln Glu Leu Leu Lys Asp Arg Glu Pro Lys
 355 360 365

 Glu Ile Glu Trp Asp Asp Leu Ala Gln Leu Pro Phe Leu Thr Met Cys
 370 375 380
 Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu His Pro Pro Ile Pro Thr Phe Ala Arg
 385 390 395 400
 Gly Cys Thr Gln Asp Val Val Leu Pro Asp Ser Arg Val Ile Pro Lys
 405 410 415
 Gly Asn Val Cys Asn Ile Asn Ile Phe Ala Ile His His Asn Pro Ser
 420 425 430

 Val Trp Pro Asp Pro Glu Val Tyr Asp Pro Phe Arg Phe Asp Pro Glu
 435 440 445
 Asn Ala Gln Lys Arg Ser Pro Met Ala Phe Ile Pro Phe Ser Ala Gly
 450 455 460
 Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Met Ala Glu Met Lys Val
 465 470 475 480
 Val Leu Ala Leu Thr Leu Leu Arg Phe Arg Ile Leu Pro Asp His Arg
 485 490 495

 Glu Pro Arg Arg Thr Pro Glu Ile Val Leu Arg Ala Glu Asp Gly Leu
 500 505 510
 Trp Leu Arg Val Glu Pro Leu Gly
 515 520
 <210> 14
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Met Pro Gln Leu Ser Leu Ser Trp Leu Gly Leu Gly Pro Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Gly Gly Ser Trp Leu Leu Ala

Glu Arg Arg Cys Thr Leu Pro Thr Gln Gly Ile Asp Asp Phe Leu Lys
 275 280 285

 Asn Lys Ala Lys Ser Lys Thr Leu Asp Phe Ile Asp Val Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ser Asp Glu Asp Ile Arg Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ser Gly
 325 330 335
 Leu Ser Trp Val Leu Tyr His Leu Ala Lys His Pro Glu Tyr Gln Glu
 340 345 350

 Gln Cys Arg Gln Glu Val Gln Glu Leu Leu Lys Asp Arg Glu Pro Ile
 355 360 365
 Glu Ile Glu Trp Asp Asp Leu Ala Gln Leu Pro Phe Leu Thr Met Cys
 370 375 380
 Ile Lys Glu Ser Leu Arg Leu His Pro Pro Val Pro Val Ile Ser Arg
 385 390 395 400
 Cys Cys Thr Gln Asp Phe Val Leu Pro Asp Gly Arg Val Ile Pro Lys
 405 410 415

 Gly Ile Val Cys Leu Ile Asn Ile Ile Gly Ile His Tyr Asn Pro Thr
 420 425 430
 Val Trp Pro Asp Pro Glu Val Tyr Asp Pro Phe Arg Phe Asp Gln Glu
 435 440 445
 Asn Ile Lys Glu Arg Ser Pro Leu Ala Phe Ile Pro Phe Ser Ala Gly
 450 455 460
 Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Ala Phe Ala Met Ala Glu Met Lys Val
 465 470 475 480

 Val Leu Ala Leu Thr Leu Leu His Phe Arg Ile Leu Pro Thr His Thr
 485 490 495
 Glu Pro Arg Arg Lys Pro Glu Leu Ile Leu Arg Ala Glu Gly Gly Leu
 500 505 510
 Trp Leu Arg Val Glu Pro Leu Gly Ala Asn Ser Gln

Asn Ser Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ala Phe Ile Pro Phe Ser Ala Gly
 450 455 460

Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Ala Phe Ala Met Ala Glu Met Lys Val
 465 470 475 480

Val Leu Ala Leu Met Leu Leu His Phe Arg Phe Leu Pro Asp His Thr
 485 490 495

Glu Pro Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ile Met Arg Ala Glu Gly Gly Leu
 500 505 510

Trp Leu Arg Val Glu Pro Leu Asn Val Ser Leu Gln
 515 520

<210> 16

<211

> 531

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Leu Pro Ile Thr Asp Arg Leu Leu His Leu Leu Gly Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Thr Ala Phe Arg Ile Tyr Ala Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Leu
 20 25 30

Phe Phe Leu Phe Arg Leu Leu Leu Arg Phe Leu Arg Leu Cys Arg Ser
 35 40 45

Phe Tyr Ile Thr Cys Arg Arg Leu Arg Cys Phe Pro Gln Pro Pro Arg
 50 55 60

Arg Asn Trp Leu Leu Gly His Leu Gly Met Tyr Leu Pro Asn Glu Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Gln Asp Glu Lys Lys Val Leu Asp Asn Met His His Val Leu
 85 90 95

Leu Val Trp Met Gly Pro Val Leu Pro Leu Leu Val Leu Val His Pro
 100 105 110

Asp Tyr Ile Lys Pro Leu Leu Gly Ala Ser Ala Ala Ile Ala Pro Lys
 115 120 125

Asp Asp Leu Phe Tyr Gly Phe Leu Lys Pro Trp Leu Gly Asp Gly Leu
 130 135 140
 Leu Leu Ser Lys Gly Asp Lys Trp Ser Arg His Arg Arg Leu Leu Thr
 145 150 155 160
 Pro Ala Phe His Phe Asp Ile Leu Lys Pro Tyr Met Lys Ile Phe Asn
 165 170 175
 Gln Ser Ala Asp Ile Met His Ala Lys Trp Arg His Leu Ala Glu Gly
 180 185 190
 Ser Ala Val Ser Leu Asp Met Phe Glu His Ile Ser Leu Met Thr Leu
 195 200 205
 Asp Ser Leu Gln Lys Cys Val Phe Ser Tyr Asn Ser Asn Cys Gln Glu
 210 215 220
 Lys Met Ser Asp Tyr Ile Ser Ala Ile Ile Glu Leu Ser Ala Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Arg Arg Gln Tyr Arg Leu His His Tyr Leu Asp Phe Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Arg Ser Ala Asp Gly Arg Arg Phe Arg Gln Ala Cys Asp Met Val His
 260 265 270
 His Phe Thr Thr Glu Val Ile Gln Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Gln
 275 280 285
 Gln Gly Ala Glu Ala Trp Leu Lys Ala Lys Gln Gly Lys Thr Leu Asp
 290 295 300
 Phe Ile Asp Val Leu Leu Leu Ala Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu
 305 310 315 320
 Ser Asp Glu Asp Ile Arg Ala Glu Ala Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly
 325 330 335
 His Asp Thr Thr Ser Ser Gly Ile Ser Trp Met Leu Phe Asn Leu Ala
 340 345 350
 Lys Tyr Pro Glu Tyr Gln Glu Lys Cys Arg Glu Glu Ile Gln Glu Val
 355 360 365
 Met Lys Gly Arg Glu Leu Glu Glu Leu Glu Trp Asp Asp Leu Thr Gln

Pro Pro Thr His Trp Phe Leu Gly His Gln Lys Phe Ile Gln Asp Asp
 50 55 60
 Asn Met Glu Lys Leu Glu Glu Ile Ile Glu Lys Tyr Pro Arg Ala Phe
 65 70 75 80
 Pro Phe Trp Ile Gly Pro Phe Gln Ala Phe Phe Cys Ile Tyr Asp Pro
 85 90 95

 Asp Tyr Ala Lys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Asp Pro Lys Ser Gln Tyr
 100 105 110
 Leu Gln Lys Phe Ser Pro Pro Leu Leu Gly Lys Gly Leu Ala Ala Leu
 115 120 125
 Asp Gly Pro Lys Trp Phe Gln His Arg Arg Leu Leu Thr Pro Gly Phe
 130 135 140
 His Phe Asn Ile Leu Lys Ala Tyr Ile Glu Val Met Ala His Ser Val
 145 150 155 160

 Lys Met Met Leu Asp Lys Trp Glu Lys Ile Cys Ser Thr Gln Asp Thr
 165 170 175
 Ser Val Glu Val Tyr Glu His Ile Asn Ser Met Ser Leu Asp Ile Ile
 180 185 190
 Met Lys Cys Ala Phe Ser Lys Glu Thr Asn Cys Gln Thr Asn Ser Thr
 195 200 205
 His Asp Pro Tyr Ala Lys Ala Ile Phe Glu Leu Ser Lys Ile Ile Phe
 210 215 220

 His Arg Leu Tyr Ser Leu Leu Tyr His Ser Asp Ile Ile Phe Lys Leu
 225 230 235 240
 Ser Pro Gln Gly Tyr Arg Phe Gln Lys Leu Ser Arg Val Leu Asn Gln
 245 250 255
 Tyr Thr Asp Thr Ile Ile Gln Glu Arg Lys Lys Ser Leu Gln Ala Gly
 260 265 270
 Val Lys Gln Asp Asn Thr Pro Lys Arg Lys Tyr Gln Asp Phe Leu Asp
 275 280 285

 Ile Val Leu Ser Ala Lys Asp Glu Ser Gly Ser Ser Phe Ser Asp Ile

290 295 300
 Asp Val His Ser Glu Val Ser Thr Phe Leu Leu Ala Gly His Asp Thr
 305 310 315 320
 Leu Ala Ala Ser Ile Ser Trp Ile Leu Tyr Cys Leu Ala Leu Asn Pro
 325 330 335
 Glu His Gln Glu Arg Cys Arg Glu Glu Val Arg Gly Ile Leu Gly Asp
 340 345 350

 Gly Ser Ser Ile Thr Trp Asp Gln Leu Gly Glu Met Ser Tyr Thr Thr
 355 360 365
 Met Cys Ile Lys Glu Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala Val Pro Ser Ile
 370 375 380
 Ser Arg Asp Leu Ser Lys Pro Leu Thr Phe Pro Asp Gly Cys Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Ala Gly Ile Thr Val Val Leu Ser Ile Trp Gly Leu His His Asn
 405 410 415

 Pro Ala Val Trp Lys Asn Pro Lys Val Phe Asp Pro Leu Arg Phe Ser
 420 425 430
 Gln Glu Asn Ser Asp Gln Arg His Pro Tyr Ala Tyr Leu Pro Phe Ser
 435 440 445
 Ala Gly Ser Arg Asn Cys Ile Gly Gln Glu Phe Ala Met Ile Glu Leu
 450 455 460
 Lys Val Thr Ile Ala Leu Ile Leu Leu His Phe Arg Val Thr Pro Asp
 465 470 475 480

 Pro Thr Arg Pro Leu Thr Phe Pro Asn His Phe Ile Leu Lys Pro Lys
 485 490 495
 Asn Gly Met Tyr Leu His Leu Lys Lys Leu Ser Glu Cys
 500 505

<210> 18

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Pro Ser Trp Leu Gln Glu Leu Met Ala His Pro Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ile Leu Leu Cys Met Ser Leu Leu Leu Phe Gln Val Ile Arg Leu
 20 25 30
 Tyr Gln Arg Arg Arg Trp Met Ile Arg Ala Leu His Leu Phe Pro Ala
 35 40 45
 Pro Pro Ala His Trp Phe Tyr Gly His Lys Glu Phe Tyr Pro Val Lys
 50 55 60
 Glu Phe Glu Val Tyr His Lys Leu Met Glu Lys Tyr Pro Cys Ala Val
 65 70 75 80
 Pro Leu Trp Val Gly Pro Phe Thr Met Phe Phe Ser Val His Asp Pro
 85 90 95
 Asp Tyr Ala Lys Ile Leu Leu Lys Arg Gln Asp Pro Lys Ser Ala Val
 100 105 110
 Ser His Lys Ile Leu Glu Ser Trp Val Gly Arg Gly Leu Val Thr Leu
 115 120 125
 Asp Gly Ser Lys Trp Lys Lys His Arg Gln Ile Val Lys Pro Gly Phe
 130 135 140
 Asn Ile Ser Ile Leu Lys Ile Phe Ile Thr Met Met Ser Glu Ser Val
 145 150 155 160
 Arg Met Met Leu Asn Lys Trp Glu Glu His Ile Ala Gln Asn Ser Arg
 165 170 175
 Leu Glu Leu Phe Gln His Val Ser Leu Met Thr Leu Asp Ser Ile Met
 180 185 190
 Lys Cys Ala Phe Ser His Gln Gly Ser Ile Gln Leu Asp Ser Thr Leu
 195 200 205
 Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Val Phe Asn Leu Ser Lys Ile Ser Asn Gln
 210 215 220
 Arg Met Asn Asn Phe Leu His His Asn Asp Leu Val Phe Lys Phe Ser
 225 230 235 240
 Ser Gln Gly Gln Ile Phe Ser Lys Phe Asn Gln Glu Leu His Gln Phe

Ile His Val Phe Ala Lys Lys Val Cys

500 505

<210> 19

<211> 525

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 19

Met Ala Gly Leu Trp Leu Gly Leu Val Trp Gln Lys Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ala Val Ser Leu Ala Gly Ala Ser Leu Val Leu Ser

20 25 30

Leu Leu Gln Arg Val Ala Thr Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg

35 40 45

Pro Ile Pro Thr Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu

50 55 60

Leu Met Lys Pro Asp Gly Arg Glu Phe Phe Gln Gln Ile Ile Glu Tyr

65 70 75 80

Thr Glu Glu Tyr Arg His Met Pro Leu Leu Lys Leu Trp Val Gly Pro

85 90 95

Val Pro Met Val Ala Leu Tyr Asn Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu

100 105 110

Thr Ser Ser Lys Gln Ile Asp Lys Ser Ser Met Tyr Lys Phe Leu Glu

115 120 125

Pro Trp Leu Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Asn Lys Trp Arg

130 135 140

Ser Arg Arg Lys Met Leu Thr Pro Thr Phe His Phe Thr Ile Leu Glu

145 150 155 160

Asp Phe Leu Asp Ile Met Asn Glu Gln Ala Asn Thr Leu Val Lys Lys

165 170 175

Leu Glu Lys His Ile Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Tyr Ile

180 185 190

Thr Leu Cys Ala Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn

Ala Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro
 450 455 460

Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile

465 470 475 480

Leu Ser Cys Ile Leu Arg His Phe Trp Ile Glu Ser Asn Gln Lys Arg

485 490 495

Glu Glu Leu Gly Leu Glu Gly Gln Leu Ile Leu Arg Pro Ser Asn Gly

500 505 510

Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Glu Arg

515 520 525

<210> 20

<211> 525

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 20

Met Ala Gly Ile Trp Leu Gly Leu Val Trp Gln Lys Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ala Val Ser Leu Ala Gly Ala Ser Leu Val Leu Ser

20 25 30

Leu Leu Gln Arg Val Ala Ser Tyr Val Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg

35 40 45

Pro Ile Pro Thr Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu

50 55 60

Leu Met Lys Arg Asp Gly Arg Glu Phe Phe Gln Gln Ile Ile Glu Tyr

65 70 75 80

Thr Glu Glu Tyr Arg His Met Pro Leu Leu Lys Leu Trp Val Gly Pro

85 90 95

Val Pro Met Val Ala Leu Tyr Asn Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu

100 105 110

Thr Ser Ser Lys Gln Ile Asp Lys Ser Ser Met Tyr Lys Phe Leu Glu

115 120 125

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

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

 Ser Leu Lys Ile Leu His Ala Phe Thr Asn Asn Val Ile Ala Glu Arg
 260 265 270
 Ala Asn Glu Met Asn Val Asp Glu Asp Cys Arg Gly Asp Gly Arg Asp
 275 280 285
 Ser Ala Pro Ser Lys Asn Lys Arg Arg Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Val Thr Asp Asp Glu Gly Asn Arg Leu Ser His Glu Asp Ile Arg
 305 310 315 320

 Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala
 325 330 335
 Ala Met Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Pro Glu Val Gln
 340 345 350
 Lys Lys Val Asp His Glu Leu Asp Asp Val Phe Gly Arg Ser Asp Arg
 355 360 365
 Pro Ala Thr Val Glu Asp Leu Lys Lys Leu Arg Tyr Leu Glu Cys Val

370

375

380

Ile Lys Glu Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg

385 390 395 400

Ser Val Ser Glu Asp Cys Glu Val Ala Gly Tyr Arg Val Leu Lys Gly

405 410 415

Thr Glu Ala Val Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr

420 425 430

Phe Pro Asn Pro Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn

435 440 445

Ala Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro

450 455 460

Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile

465 470 475 480

Leu Ser Cys Ile Leu Arg His Phe Trp Ile Glu Ser Asn Gln Lys Arg

485 490 495

Glu Glu Leu Gly Leu Glu Gly Gln Leu Ile Leu Arg Pro Thr Asn Gly

500 505 510

Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Glu Pro

515 520 525

<210> 21

<211> 539

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 21

Met Leu Lys Val Lys Trp Lys Glu Asn Val Phe Arg Glu Gly Asp Lys

1 5 10 15

Asp Ser Asn Met Leu Asp Ala Val Gln Leu Pro Ser Ile Lys Val Glu

20 25 30

Ser Ala Leu Ser Asp Ala Glu Ala Gly Gly Ser Pro Gly Gly Arg Arg

35 40 45

Pro Val Leu Thr Val Glu Arg Gly Arg Leu Ala Gln Gly Ser Met Ser

Pro Ser Lys Asn Lys Arg Arg Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu Asn Val
 305 310 315 320

Thr Asp Asp Glu Gly Asn Lys Leu Arg His Glu Asp Val Arg Glu Glu
 325 330 335

Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala Ala Ile
 340 345 350

Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Tyr Pro Glu Val Gln Lys Gln
 355 360 365

Val Asp Ser Glu Leu Glu Asp Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg Pro Ala
 370 375 380

Thr Leu Glu Asp Leu Lys Lys Leu Lys Tyr Leu Glu Cys Val Ile Lys
 385 390 395 400

Glu Ser Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg Asn Leu
 405 410 415

Asn Glu Asp Cys Val Val Ala Gly Tyr Lys Val Val Lys Gly Ser Gln
 420 425 430

Ala Ile Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr Phe Pro
 435 440 445

Asn Pro Glu Glu Phe Gln Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn Leu Gln
 450 455 460

Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Ile Pro Phe Ser Ala Gly Pro Arg Asn
 465 470 475 480

Cys Ile Gly Gln Arg Phe Ala Ile Met Glu Glu Lys Thr Val Leu Ser
 485 490 495

Cys Val Leu Arg His Phe Trp Val Glu Ser Asn Gln Lys Arg Glu Glu
 500 505 510

Leu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Ile Leu Arg Pro Thr Asn Gly Ile Trp
 515 520 525

Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Glu Ser
 530 535

<210> 22

<211> 527

<212> PRT

<213> Bos Taurus

<400> 22

Met Leu Ala Pro Trp Leu Leu Ser Val Gly Pro Lys Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Ser Gly Leu Cys Ala Val Ser Leu Ala Gly Ala Thr Leu Thr Leu Asn
 20 25 30

Leu Leu Lys Met Val Ala Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Arg Gln Met Arg
 35 40 45

Pro Val Pro Thr Ile Gly Asp Pro Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu
 50 55 60

Met Met Lys Pro Asp Ala Arg Asp Phe Phe Gln Gln Ile Ile Asp Phe
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Cys Arg His Leu Pro Leu Leu Lys Leu Trp Leu Gly Pro
 85 90 95

Val Pro Leu Val Ala Leu Tyr Asn Ala Glu Thr Val Glu Val Ile Leu
 100 105 110

Ser Ser Ser Lys His Ile Glu Lys Ser Tyr Met Tyr Lys Phe Leu Glu
 115 120 125

Pro Trp Leu Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Asn Lys Trp Arg
 130 135 140

Ser Arg Arg Lys Met Leu Thr Pro Thr Phe His Phe Thr Ile Leu Glu
 145 150 155 160

Asp Phe Leu Asp Val Met Asn Glu Gln Ala Asn Ile Leu Val Thr Lys
 165 170 175

Leu Glu Lys His Val Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Tyr Val
 180 185 190

Thr Leu Cys Thr Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn
 195 200 205

Ile Gly Ala Gln Arg Asn Asp Asp Ser Glu Tyr Val Arg Ala Val Tyr
 210 215 220

Arg Met Ser Asp Ser Ile His Gln Arg Met Lys Met Pro Trp Leu Trp
 225 230 235 240
 Leu Asp Leu Ile Phe Tyr Met Phe Lys Asn Gly Arg Glu His Arg Arg
 245 250 255
 Ser Leu Lys Ile Val His Asp Phe Thr Asn Asn Val Ile Thr Glu Arg
 260 265 270

 Ala Asn Glu Met Lys Arg His Glu Glu Gly Thr Ser Asn Asp Lys Glu
 275 280 285
 Lys Asp Phe Pro Pro Arg Lys Thr Lys Cys Arg Ala Phe Leu Asp Leu
 290 295 300
 Leu Leu Asn Val Thr Asp Asp Gln Gly Asn Lys Leu Ser His Glu Asp
 305 310 315 320
 Ile Arg Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr
 325 330 335

 Ala Ala Ala Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Trp Tyr Pro Glu
 340 345 350
 Val Gln Gln Arg Val Asp Thr Glu Leu Glu Glu Val Phe Gly Lys Ser
 355 360 365
 Asp Arg Pro Val Thr Leu Glu Asp Leu Lys Lys Leu Lys Tyr Leu Asp
 370 375 380
 Cys Val Ile Lys Glu Ser Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Phe Phe
 385 390 395 400

 Ala Arg Asn Leu Thr Glu Asp Cys Glu Val Ala Gly His Lys Ile Val
 405 410 415
 Gln Gly Cys Gln Val Ile Ile Val Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro
 420 425 430
 Lys Tyr Phe Pro Asp Pro Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Phe Pro
 435 440 445
 Glu Asn Leu Lys Gly Arg His Thr Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala
 450 455 460

 Gly Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Ile Met Glu Glu Lys

465 470 475 480
 Thr Ile Leu Ser Cys Ile Leu Arg His Phe Trp Val Glu Ser Asn Gln
 485 490 495
 Lys Arg Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Ile Leu Arg Pro Ser
 500 505 510
 Asn Gly Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Thr Asp Glu Ser
 515 520 525

 <210> 23
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 23
 Met Leu Trp Leu Trp Leu Gly Leu Ser Gly Gln Lys Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Ser Ala Val Ser Leu Ala Gly Ala Thr Ile Leu Ile Ser
 20 25 30
 Ile Phe Pro Met Leu Val Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg
 35 40 45
 Ser Ile Pro Ser Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu

 50 55 60
 Tyr Met Lys Pro Asn Asn Ala Glu Phe Phe Gln Gln Leu Ile Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Thr Glu Glu Phe Arg His Leu Pro Ile Ile Lys Leu Trp Ile Gly Pro
 85 90 95
 Val Pro Leu Val Ala Leu Tyr Lys Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu
 100 105 110
 Thr Ser Ser Lys Gln Ile Asp Lys Ser Phe Leu Tyr Lys Phe Leu Gln

 115 120 125
 Pro Trp Leu Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ser Lys Trp Arg
 130 135 140
 Thr Arg Arg Lys Met Leu Thr Pro Thr Phe His Phe Thr Ile Leu Glu
 145 150 155 160

Asn Phe Leu Asp Val Met Asn Glu Gln Ala Asn Ile Leu Val Asn Lys
 165 170 175
 Leu Glu Lys His Val Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Tyr Ile
 180 185 190
 Thr Leu Cys Ala Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn
 195 200 205
 Ile Gly Ala Gln Ser Asn Asn Asp Ser Glu Tyr Val Arg Thr Val Tyr
 210 215 220
 Arg Met Ser Asp Met Ile Tyr Arg Arg Met Lys Met Pro Trp Leu Trp
 225 230 235 240
 Phe Asp Leu Trp Tyr Leu Val Phe Lys Glu Gly Arg Asp His Lys Arg
 245 250 255
 Gly Leu Lys Cys Leu His Thr Phe Thr Asn Asn Val Ile Ala Glu Arg
 260 265 270
 Val Lys Glu Arg Lys Ala Glu Glu Asp Trp Thr Gly Ala Gly Arg Gly
 275 280 285
 Pro Ile Pro Ser Lys Asn Lys Arg Lys Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Val Thr Asp Glu Glu Gly Asn Arg Leu Ser Gln Glu Asp Ile Arg
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala
 325 330 335
 Ala Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Thr Asn Pro Glu Val Gln
 340 345 350
 Arg Lys Val Asp Gln Glu Leu Asp Glu Val Phe Gly Arg Ser His Arg
 355 360 365
 Pro Val Thr Leu Glu Asp Leu Lys Lys Leu Lys Tyr Leu Asp Cys Val
 370 375 380
 Ile Lys Glu Thr Leu Arg Val Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg
 385 390 395 400
 Ser Leu Ser Glu Asp Cys Glu Val Gly Gly Tyr Lys Val Thr Lys Gly

405 410 415
 Thr Glu Ala Ile Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr

420 425 430
 Phe Pro Asp Pro Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn

435 440 445
 Ser Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro

450 455 460
 Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile

465 470 475 480
 Leu Ala Cys Ile Leu Arg Gln Phe Trp Val Glu Ser Asn Gln Lys Arg

485 490 495
 Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Asp Leu Ile Leu Arg Pro Asn Asn Gly

500 505 510
 Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg His Glu Asp Asp Pro

515 520 525

<210> 24

<211> 525

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

Met Leu Trp Leu Trp Leu Gly Leu Ser Gly Gln Lys Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ala Val Ser Val Ala Gly Ala Thr Val Leu Leu Asn

20 25 30

Ile Leu Gln Met Leu Val Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg

35 40 45

Pro Ile Pro Ser Val Ala Arg Ala Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu

50 55 60

Phe Met Lys Pro Asn Asn Thr Glu Phe Phe Gln Gln Ile Ile Gln Tyr

65 70 75 80

Thr Glu Glu Phe Arg His Leu Pro Ile Ile Lys Leu Trp Ile Gly Pro

85 90 95

Val Pro Leu Val Ala Leu Tyr Lys Ala Glu Asn Val Glu Val Ile Leu

100 105 110

Thr Ser Ser Lys Gln Ile Asp Lys Ser Phe Met Tyr Lys Phe Leu Gln

115 120 125

Pro Trp Leu Gly Leu Gly Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ser Lys Trp Arg

130 135 140

Ala Arg Arg Lys Met Leu Thr Pro Ser Phe His Phe Thr Ile Leu Glu

145 150 155 160

Asp Phe Leu Asp Val Met Asn Glu Gln Ala Asn Ile Leu Val Asn Lys

165 170 175

Leu Glu Lys His Val Asn Gln Glu Ala Phe Asn Cys Phe Phe Pro Ile

180 185 190

Thr Leu Cys Ala Leu Asp Ile Ile Cys Glu Thr Ala Met Gly Lys Asn

195 200 205

Ile Gly Ala Gln Ser Asn Gly Asp Ser Glu Tyr Val Arg Thr Val Tyr

210 215 220

Arg Met Ser Asp Met Ile Tyr Arg Arg Met Lys Met Pro Trp Phe Trp

225 230 235 240

Phe Asp Leu Trp Tyr Leu Met Phe Lys Glu Gly Arg Asp His Lys Lys

245 250 255

Gly Leu Lys Ser Leu His Thr Phe Thr Asn Asn Val Ile Ala Glu Arg

260 265 270

Val Asn Ala Arg Lys Ala Glu Gln Asp Cys Ile Gly Ala Gly Arg Gly

275 280 285

Pro Leu Pro Ser Lys Thr Lys Arg Lys Ala Phe Leu Asp Leu Leu Leu

290 295 300

Ser Val Thr Asp Glu Glu Gly Asn Lys Leu Ser His Glu Asp Ile Arg

305 310 315 320

Glu Glu Val Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala

325 330 335

Ala Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Pro Glu Val Gln
 340 345 350

Arg Lys Val Asp Lys Glu Leu Asp Asp Val Phe Gly Arg Ser His Arg
 355 360 365

Pro Val Thr Leu Glu Asp Leu Lys Lys Leu Lys Tyr Leu Asp Cys Val
 370 375 380

Ile Lys Glu Thr Leu Arg Val Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg
 385 390 395 400

Ser Leu Ser Glu Asp Cys Glu Val Ala Gly Tyr Lys Ile Ser Lys Gly
 405 410 415

Thr Glu Ala Val Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Arg Tyr
 420 425 430

Phe Pro Asp Pro Glu Glu Phe Gln Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn
 435 440 445

Ser Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro
 450 455 460

Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Val Met Glu Glu Lys Thr Ile
 465 470 475 480

Leu Ala Cys Ile Leu Arg Glu Phe Trp Ile Glu Ser Asn Gln Lys Arg
 485 490 495

Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Asp Leu Ile Leu Arg Pro Asn Asn Gly
 500 505 510

Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg His Glu Asp Asp Pro
 515 520 525

<210> 25

<211> 530

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 25

Met Ala Met Glu Ile Thr Leu Gly Ser Met Glu Gly Thr Gln Leu Leu

1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Asn Asn Gly Ile Trp Val Gln Leu Lys Arg Arg Pro Lys Thr Val
 515 520 525
 Thr Glu
 530
 <210> 26
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> *Xenopus tropicalis*
 <400> 26
 Met Glu Leu Gly Gly Glu Val His Leu Leu Val Trp Val Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Val Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Ser Ile Leu Pro Ala Leu Gln
 20 25 30
 Asp Tyr Val Arg Lys Arg Arg Ile Leu Lys Pro Ile Pro Gly Pro Gly
 35 40 45

 Pro Asn Tyr Pro Leu Ile Gly Asp Ala Leu Phe Leu Lys Asn Asn Gly
 50 55 60
 Gly Asp Phe Phe Leu Gln Ile Cys Glu Tyr Thr Glu Ser Tyr Arg Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Leu Leu Lys Val Trp Ile Gly Thr Ile Pro Phe Ile Val Val
 85 90 95
 Tyr His Ala Asp Thr Val Glu Pro Val Leu Ser Ser Ser Lys His Met
 100 105 110

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

Gly Glu Ser Phe Asp Cys Phe Met Asp Val Thr Leu Cys Ala Leu Asp
 180 185 190

Ile Ile Ser Glu Thr Ala Met Gly Arg Lys Ile Gln Ala Gln Ser Asn
 195 200 205

Arg Asp Ser Glu Tyr Val Gln Ala Ile Tyr Lys Met Ser Asp Ile Ile
 210 215 220

Gln Arg Arg Gln Lys Met Pro Trp Leu Trp Leu Asp Phe Leu Tyr Ala
 225 230 235 240

His Leu Arg Asp Gly Lys Glu His Asp Lys Asn Leu Lys Ile Leu His
 245 250 255

Ser Phe Thr Asp Lys Ala Ile Leu Glu Arg Ala Glu Glu Leu Lys Lys
 260 265 270

Met Gly Glu Gln Lys Lys Glu His Cys Asp Ser Asp Pro Glu Ser Asp
 275 280 285

Lys Pro Lys Lys Arg Ser Ala Phe Leu Asp Met Leu Leu Met Ala Thr
 290 295 300

Asp Asp Ala Gly Asn Lys Met Ser Tyr Met Asp Ile Arg Glu Glu Val
 305 310 315 320

Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ala Ala Ala Leu Asn
 325 330 335

Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gly Ser His Pro Glu Ala Gln Arg Gln Val
 340 345 350

His Lys Glu Leu Asp Glu Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg Pro Val Thr
 355 360 365

Met Asp Asp Leu Lys Lys Leu Arg Tyr Leu Glu Ala Val Ile Lys Glu
 370 375 380

Ser Leu Arg Ile Tyr Pro Ser Val Pro Leu Phe Gly Arg Thr Val Thr
 385 390 395 400

Glu Asp Cys Ser Ile Arg Gly Phe His Val Pro Lys Gly Val Asn Val
 405 410 415

Val Ile Ile Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Glu Tyr Phe Pro Glu

Ala Gly Tyr Lys Ile Val Lys Gly Ser Gln Ala Ile Ile Val Ser Tyr
 355 360 365

Ala Leu His Arg Asp Ser Arg Tyr Phe Pro Asn Pro Glu Glu Phe Lys
 370 375 380

Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn Ser Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala
 385 390 395 400

Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro Arg Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe
 405 410 415

Ala Val Met Glu Glu Lys Ile Ile Leu Ser Cys Ile Leu Arg His Phe
 420 425 430

Trp Val Glu Ser Asn Gln Lys Arg Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Glu
 435 440 445

Leu Ile Leu Arg Pro Ser Asn Gly Ile Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg
 450 455 460

Asn Thr Glu Glu Ser
 465

<210> 28

<211> 524

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 28

Met Trp Leu Trp Leu Gly Leu Val Gly Gln Lys Leu Leu Phe Trp Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Val Ser Leu Ala Gly Ala Ser Leu Phe Leu Asn Leu
 20 25 30

Leu Gln Met Val Ala Ser Tyr Ala Arg Lys Trp Gln Gln Met Arg Pro
 35 40 45

Ile Pro Thr Ile Gly Arg Pro Tyr Pro Leu Val Gly His Ala Leu Tyr
 50 55 60

Met Lys Pro Ser Gly Lys Glu Phe Phe Gln Gln Leu Ile Gln Tyr Thr
 65 70 75 80

Glu Glu Tyr Arg His Leu Pro Leu Leu Lys Leu Trp Leu Gly Pro Leu

Ile Asn Trp Ser Leu Tyr Leu Leu Gly Ser His Pro Glu Val Gln Arg
 340 345 350
 Lys Val Asp Asp Glu Leu Asp Glu Val Phe Gly Lys Ser Asp Arg Pro
 355 360 365
 Ala Thr Ser Glu Asp Leu Lys Lys Leu Lys Tyr Leu Glu Cys Val Ile
 370 375 380

Lys Glu Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Leu Phe Ala Arg Ser
 385 390 395 400
 Leu Ser Asp Asp Cys Glu Val Ala Gly Phe Arg Val Val Lys Gly Thr
 405 410 415
 Gln Ala Val Ile Val Pro Tyr Ala Leu His Arg Asp Pro Lys Tyr Phe
 420 425 430
 Pro Asn Pro Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Phe Pro Glu Asn Ala
 435 440 445

Gln Gly Arg His Pro Tyr Ala Tyr Val Pro Phe Ser Ala Gly Pro Arg
 450 455 460
 Asn Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Ile Met Glu Glu Lys Thr Ile Leu
 465 470 475 480
 Ser Cys Ile Leu Arg Lys Leu Trp Val Glu Ser Asn Gln Lys Met Glu
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Ile Leu Arg Pro Thr Asn Gly Ile
 500 505 510

Trp Ile Lys Leu Lys Arg Arg Asn Ala Asp Lys Ala
 515 520

<210> 29

<211> 535

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 29

Met Ser Ser Lys Val Ile Thr Ser Leu Met Ala Glu Ser Ile Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Lys Val Gly Gln Val Ile Ser Gly Tyr Ser Pro Ile Thr Val Phe

20 25 30
 Leu Leu Gly Ser Ile Leu Ile Phe Leu Val Val Tyr Asn Lys Arg Arg

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

 100 105 110
 Pro Glu Thr Val Glu Pro Ile Leu Asn Ser Gln Lys Phe Val Asn Lys
 115 120 125
 Ser His Asp Tyr Asp Tyr Leu His Pro Trp Leu Gly Glu Gly Leu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Thr Asp Arg Lys Trp His Ser Arg Arg Lys Ile Leu Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Phe His Phe Lys Ile Leu Asp Asp Phe Ile Asp Val Phe Asn Glu

 165 170 175
 Gln Ser Ala Val Leu Ala Arg Lys Leu Ala Val Glu Val Gly Ser Glu
 180 185 190
 Ala Phe Asn Leu Phe Pro Tyr Val Thr Leu Cys Thr Leu Asp Ile Val
 195 200 205
 Cys Glu Thr Ala Met Gly Arg Arg Ile Tyr Ala Gln Ser Asn Ser Glu
 210 215 220
 Ser Glu Tyr Val Lys Ala Val Tyr Gly Ile Gly Ser Ile Val Gln Ser

 225 230 235 240
 Arg Gln Ala Lys Ile Trp Leu Gln Ser Asp Phe Ile Phe Ser Leu Thr
 245 250 255
 Ala Glu Tyr Lys Leu His Gln Ser Tyr Ile Asn Thr Leu His Gly Phe
 260 265 270

Ser Asn Met Val Ile Arg Glu Arg Lys Ala Glu Leu Ala Ile Leu Gln
 275 280 285
 Glu Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ala Pro Asp Ala Tyr Asp Asp
 290 295 300
 Val Gly Lys Lys Lys Arg Leu Ala Phe Leu Asp Leu Leu Ile Asp Ala
 305 310 315 320
 Ser Lys Glu Gly Thr Val Leu Ser Asn Glu Asp Ile Arg Glu Glu Val
 325 330 335
 Asp Thr Phe Met Phe Glu Gly His Asp Thr Thr Ser Ala Ala Ile Ser
 340 345 350
 Trp Thr Leu Phe Leu Leu Gly Cys His Pro Glu Tyr Gln Glu Arg Val
 355 360 365
 Val Glu Glu Leu Asp Ser Ile Phe Gly Asp Asp Lys Glu Thr Pro Ala
 370 375 380
 Thr Met Lys Asn Leu Met Asp Met Arg Tyr Leu Glu Cys Cys Ile Lys
 385 390 395 400
 Asp Ser Leu Arg Leu Phe Pro Ser Val Pro Met Met Ala Arg Met Val
 405 410 415
 Gly Glu Asp Val Asn Ile Gly Gly Lys Ile Val Pro Ala Gly Thr Gln
 420 425 430
 Ala Ile Ile Met Thr Tyr Ala Leu His Arg Asn Pro Arg Val Phe Pro
 435 440 445
 Lys Pro Glu Gln Phe Asn Pro Asp Asn Phe Leu Pro Glu Asn Cys Ala
 450 455 460
 Gly Arg His Pro Phe Ala Tyr Ile Pro Phe Ser Ala Gly Pro Arg Asn
 465 470 475 480
 Cys Ile Gly Gln Lys Phe Ala Ile Leu Glu Glu Lys Ala Val Ile Ser
 485 490 495
 Thr Val Leu Arg Lys Tyr Lys Ile Glu Ala Val Asp Arg Arg Glu Asp
 500 505 510
 Leu Thr Leu Leu Gly Glu Leu Ile Leu Arg Pro Lys Asp Gly Leu Arg

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated promoter sequence

<400> 32

```

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc      60
cataatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca      120
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga      180
ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc      240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccccct      300
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat      360
tagtcatcgc tattaccatg ggtcgagggt agccccacgt tctgtctcac tctccccatc      420
tccccccct cccaccccc aattttgtat ttatttattt ttaattatt ttgtgcagcg      480
atggggcgcg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg      540
cggggcgagg cggagagggt cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc      600
ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg      660

agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgcc gcctcgcgcc gcccgccccg      720
gctctgactg acccggttac tcccacaggt gagcgggcgg gacggcctt ctctccggg      780
ctgtaattag cgcttggttt aatgacggct cgtttctttt ctgtggctgc gtgaaagcct      840
taaagggtc cgggagggcc ctttgtgcgg gggggagcgg ctcggggggt gcgtgcgtgt      900
gtgtgtcgtg ggggagcggc gcgtgcccgc cgcgctgccc ggcggctgtg agcgctgcgg      960
gcgcggcgcg gggctttgtg cgctccgcgt gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt      1020
gcccccggtg gcgggggggc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg      1080

gggggtgagc aggggtgtg ggcgcggcgg tcgggctgta accccccct gcacccccct      1140
ccccagttg ctgagcacgg cccgcttcg ggtgcggggc tccgtgcggg gcgtgcccgc      1200
gggctcgcgg tccgggcggg ggggtggcgg caggtggggg tgccgggcgg ggcggggcgg      1260
cctcgggccc gggagggtc gggggagggg cgcggcggcc ccggagcggc ggcggctgtc      1320
gaggcggcgg gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac      1380
ttcctttgtc ccaaactcgg cggagccgaa atctgggagg cgcccgca cccctctag      1440
cgggcgcggg cgaagcgtg cggcggcggc aggaagaaa tgggcgggga gggccttcgt      1500

gcgtcggcgc gcccgctcc cttctccat ctccagctc ggggtgcgg cagggggacg      1560
gctgccttcg ggggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcggct      1620

```

ctagagcctc tgctaaccat gttcatgcct tcttcttttt cctacagctc ctgggcaacg 1680
 tgctggttat tgtgctgtct catcattttg gcaaa 1715
 <210> 33
 <211> 589
 <212> DNA
 <213> Woodchuck hepatitis virus
 <400> 33
 aatcaacctc tggattacaa aatttgtaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgc 60
 ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120
 atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcttggttgc tgtctcttta tgaggagtgg 180
 tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
 ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccccctcct 300
 attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 360
 ttgggcactg acaattccgt ggtgttgcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc 420
 gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480
 aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccgctc tgcggcctct tccgcgtctt 540
 cgcttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgc 589
 <210> 34
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Bos Taurus
 <400> 34
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgctcct tccttgacct 60
 tggaaagtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 120
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180
 gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatgg 225
 <210> 35
 <211> 235
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated promoter sequence
 <400> 35

gattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 60
 gggggagggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga 120
 aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaac cgtatataag 180
 tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacag 235
 <210> 36
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated signal sequence
 <400> 36
 gatccaataa aagatcttta ttttcattag atctgtgtgt tggttttttg tgtg 54

 <210> 37
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated signal sequence
 <400> 37
 gccacc 6
 <210> 38
 <211> 5
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated signal sequence
 <400> 38
 ccacc 5
 <210> 39
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Simian virus 40
 <400> 39
 ttgtttattg cagettataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat 60

 aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgcaca aactcatcaa tgtatcttat 120
 <210> 40

<211> 576

<212> DNA

<213> Cytomegalovirus

<400> 40

```

tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata tggagtccg cgttacataa      60
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata    120
atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag    180
tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc     240
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta    300

tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg    360
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt    420
ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca    480
aatgtcgtta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag    540
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcag                                576
    
```

<210> 41

<211> 1184

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt    60

tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaacggg    120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa cgtatataa    180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa    240
gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcctt tgcgtgcctt    300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg    360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg    420
cctggcctgg gcgctggggc cgcccgtgct gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg    480

ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt    540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg    600
gggcccgggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc    660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca agctggccgg cctgctctgg    720
tgctggcct cgcgccgccg tgtatgccc cgcctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg    780
    
```

caccagtgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900

ttcctctctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgcgc tccagcacc 960
 tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
 cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
 tgtaattctc ctiggaatit gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
 agacagtggc tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 42
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated virus
 <400> 42

ctcgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60

gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc t 141

<210> 43
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated virus
 <400> 43

aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacccccgg gctttgcccc ggcgccctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgcag ctgcctgcag g 141

<210> 44
 <211> 117
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> Synthetically generated mutant adeno-associated virus 2 inverted
 terminal repeat sequence

<400> 44

ctcgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60
 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtgg 117

<210> 45
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated virus
 <400> 45
 aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggccggcctca gtgagcgagc 120

 gagcgcgcag ctgcctgcag g 141
 <210> 46
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 caaacagaag catgtgatta tcattcaaag cgaacgggcc aatgaaatga acgccaatga 60
 <210> 47
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 caaacagaag catgtgatta tcattcaaat catacaggtc atcgctgaac gggccaatga 60
 aatgaacgcc aatga 75
 <210> 48
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><
 223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 48
 ugauuaucau ucaaagcgaa 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide

<400> 49
 gauuaucauu caaagcgaac 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 50
 gauaaucaca ugcucuguu 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 51
 uucauuggcg uucauuucau 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 52
 cacaugcuuc uguuuggacu 20

<210> 53
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400>
 > 53
 guuuuagagc uaugcu 16

<210> 54
 <211> 67
 <212> RNA

<213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 54
 agcauagcaa guaaaaauaa ggcuaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg 60
 gugcuuu 67
 <210> 55
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 55
 gttttagagc tagaaatagc aagttaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt 60

 ggcaccgagt cggtgctttt tt 82
 <210> 56
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 56
 agaaaaataa atgaaagaaa ctagcatatt ttataagaaa atgtgttaac tagggtgcat 60
 ccaagtccaa acagaagcat gtgattatca ttcaaatcat acaggatcatc gctgaacggg 120
 ccaatgaaat gaacccaat gaagactgta gaggtgatgg caggggctct gccccctcca 180
 aaaataaacg cagggccttt 200
 <210>
 > 57
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated oligonucleotide
 <400> 57
 aaagccctg cgtttatttt tggagggggc agagcccctg ccatcacctc tacagtcttc 60
 attggcgttc atttcattgg cccgttcagc gatgacctgt atgatttgaa tgataatcac 120
 atgcttctgt ttggacttgg atgcacccta gttaacacat tttcttataa aatatgctag 180
 tttctttcat ttattttct 200

<210> 58

<211> 1368

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 58

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15
Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

 20 25 30
Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

 35 40 45
Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

 50 55 60
Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80
Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

 85 90 95
Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

 100 105 110
His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

 115 120 125
His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

 130 135 140
Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160
Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

 165 170 175
Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

 180 185 190
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

 195 200 205

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

450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys

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

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

 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu

705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly

 725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly

 740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln

 755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro

785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu

 805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg

 820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys

835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg

850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys

865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys

 885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp

900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr

915 920 925

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

930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser

945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg

 965 970 975
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe

 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr

 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys

 1145 1150 1155
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
 1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu

1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly

1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val

1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser

1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys

1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys

1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala

1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn

1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala

1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser

1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1355 1360 1365

<210> 59

<211> 1

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated spacer sequence

<400> 59

g

1

<210> 60

<211> 4799

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated expression construct

<400> 60

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60
 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc tgcggccaat tcagtcgata actataacgg tccctaaggtta 180
 gcgatttaaa tacgcgctct cttaaggttag ccccgggacg cgtcaattga gatctcgaca 240
 ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata 300

tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 360
 cccccccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttccata gtaacccaa tagggacttt 420
 ccattgacgt caatgggtgg actatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 480
 gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca 540
 ttatgccag tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt 600
 catcgtatatt accatgggtc gaggtgagcc ccacgttctg cttcactctc cccatctccc 660
 ccccctccc accccaatt ttgtatttat ttatTTTTTA attatTTTgt gcagcgatgg 720

gggcgggggg ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg 780
 gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt 840
 atggcgaggc ggcggcgggc gcggccctat aaaaagcгаа gcgcgcgcg gcggggagtc 900
 gctgcgttgc cttcggcccc tgccccgctc cgcgccgctt cgcgccgccc gccccggctc 960
 tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc tccgggctgt 1020
 aattagcgtt tggtttaatg acggctcgtt tcttttctgt ggctcgtga aagccttaaa 1080
 gggtccggg agggcccttt gtgcgggggg gagcggctcg ggggtgctg gcgtgtgtgt 1140

gtgcgtgggg agcggccgct gcggcccgcg ctccccggcg gctgtgagcg ctgcgggcgc 1200
 ggcgcggggc tttgtgcgtt ccgctgtgct gcgaggggag cgcggccggg ggcggtgccc 1260
 cgcggtgcgg gggggctcgc aggggaacaa aggctgcgtg cggggtgtgt gcgtgggggg 1320
 gtgagcaggg ggtgtgggcg cggcggtcgg gctgtaacc cccctgcac cccctcccc 1380
 gagttgtga gcacggcccc gcttcgggtg cggggctccg tgcggggcgt ggcgcggggc 1440
 tcgccgtgcc ggcggggggg tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg gggccgctc 1500

gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg gcggccccgg agcgccggcg gctgtcgagg 1560

 cgcggcgagc cgcagccatt gccttttatg gtaatcgtgc gagagggcgc agggacttcc 1620
 ttigtcccaa atctggcga gccgaatct gggagggcgc gccgcacccc ctctagcggg 1680
 cgcgggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt 1740
 cgccgcgcc ccgtcccctt ctccatctcc agcctcgggg ctgccgcagg gggacggctg 1800
 cttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggttctg cgtgtgaccg gcggctctag 1860
 agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttcta cagctcctgg gcaacgtgct 1920
 ggttatgtg ctgtctcatc attttgcaa agaattctaa tacgactcac tatagggaga 1980

 cccaagctgg ctagagccac catggctgga ctgtggctgg gactggtgtg gcagaaactg 2040
 ctgctgtggg gggccgcttc cgcactgtca ctggctgggg cttcactggt gctgagcctg 2100
 ctgcagaggg tggcctccta cgccagaaaag tggcagcaga tgaggccat ccctaccgtg 2160
 gccagagcct atccactggt gggacacgca ctgctgatga agcctgacgg cagagagttc 2220
 tttcagcaga tcatcgagta cacagaggag tataggcaca tgccactgct gaagctgtgg 2280
 gtgggacccg tgctatggt ggccctgtac aacgccgaga atgtggaagt gatcctgacc 2340
 agcagcaagc agatcgataa gtctagcatg tataagtcc tggagccttg gctgggcctg 2400

 ggctgtgta cctctacagg caacaagtgg aggagccgga gaaagatgct gacccaaca 2460
 ttccacttta caatcctgga ggacttctg gacatcatga acgagcagc caatatcctg 2520
 gtgaagaagc tggagaagca catcaaccag gaggcctta attgcttctt ttacatcacc 2580
 ctgtgcgcc tggacatcat ctgtgagaca gctatgggca agaacatcgg cgcccagtct 2640
 aatgacgata gcgagtacgt gcgggccgtg tatagaatga gcgagatgat ctttagcgc 2700
 atcaagatgc cctggctgtg gctggatctg tggatctga tgttcaagga gggctgggag 2760
 cacaagaagt cctgcagat cctgcacacc ttacaaact ctgtgatcgc cgagagagcc 2820

 aatgagatga acgccaatga ggactgtagg ggcgatggaa ggggcagcgc cccttccaag 2880
 aacaagcgga gagccttctt ggacctgctg ctgagcgtga ccgacgatga gggcaatcgc 2940
 ctgtcccacg aggacatccg ggaggaggig gataattca tgtttgaggg acacgacacc 3000
 acagccgcc ccatcaactg gtcctgtac ctgctgggct ctaatcaga ggtgcagaag 3060
 aaggtggatc acgagctgga cgacgtgttc ggcaagtccg acaggccagc aaccgtggag 3120
 gatctgaaga agctgagata cctggagtgc gtgatcaagg agacactgcg cctgttcccc 3180
 tctgtgctc tgtttgccg gtcctgtct gaggactgtg aggtggccgg ctatcgcgtg 3240

ctgaaggca ccgaggcct gatcatcct tacgcctgc accgggaccc caggatattc 3300
 cctaaccag aggagtttca gccagagaga ttctttcccg agaatgccca gggcaggcac 3360
 ccttacgct atgtgccatt ctccgccga ccaaggaact gcatcggaca gaagtttgcc 3420
 gtgatggagg agaaaacat cctgtcttgt atcctgagac acttctggat cgagagcaat 3480
 cagaagagg aggagctggg cctggaggga cagctgatcc tgcggccaag caacggcatc 3540
 tggatcaaac tgaagaag gaacgctgac gagaggtaaa agcttggtac cgatatcgcg 3600
 gccgcctag ggagctctc gaggcggccc gctcgagtct agagggcct tcgaaggtaa 3660

gcctatcct aacctctcc tcggtctega ttctacgct accggtcatc atcaccatca 3720
 ccattgagtt tcgataatca acctctggat tacaatttt gtgaaagatt gactggtatt 3780
 cttactatg ttgctcttt tacgctatgt ggatacctg ctttaatgcc tttgatcat 3840
 gctattgctt cccgtatggc ttctattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct 3900
 ctttatgagg agttgtggcc cgtttgcagg caacgtggcg tgggtgacac tgtgtttgct 3960
 gacgcaacc cactggttg ggcattgcc accacctgac agctcctttc cgggactttc 4020
 gctttcccc tcctattgc cacggcgga ctcatcgcc cctgccttgc ccgtgctgg 4080

acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa atcatcgtcc 4140
 ttctcttggc tctctcctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc ctctctctac 4200
 gtcccttggc cctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcttctgccc ggctctgccc 4260
 cctcttccgc gtcttccct tcgacctcag acgagtcgga tctcctttg ggccgctcc 4320
 ccgcatgaa acccgctgat cagcctgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt 4380
 ttgcccctcc cccgtgctt ccttgacctt ggaagggtgcc actcccactg tcctttccta 4440
 ataaatgag gaaattgcat cgcattgtct gtaggtgt cattctattc tgggggtgg 4500

ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc 4560
 ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagatcc tctcttaagg tagcatcgag 4620
 atttaatta gggataacag ggtaatggcg cggcccgag gaaccctag tgatggagtt 4680
 ggccactccc tctctgccc ctcgctcct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcggccc 4740
 acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgagcagct gcctgcagg 4799

<210> 61

<211> 4539

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated expression construct

<400> 61

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60
 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc tgcggcctaa ggcaattgag atctcgacat tgattattga 180
 ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagtca tagcccatat atggagtcc 240
 gcgttacata acttacgta aatggcccgc ctggctgacc gccaacgac ccccgccat 300
 tgacgtcaat aatgacgtat gttccatag taacccaat agggacttcc cattgacgtc 360
 aatgggtgga ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 420

 caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat tatgccagct 480
 acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta 540
 ccatgggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttactctcc ccatctcccc cccctccca 600
 ccccaattt tgiatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 660
 gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 720
 aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttccttita tggcgaggcg 780
 gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgttgcc 840

 ttgccccgt gccccgtcc gcgccgctc gcgccccc ccccggctct gactgaccgc 900
 gtactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctct cgggctgta attagcctt 960
 ggtttaatga cgctcgttt ctttctgtg gctgcgtgaa agccttaaag ggctccggga 1020
 gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgctg cgtgtgtgtg tgcgtgggga 1080
 gcgcccgctg cggcccgcgc tgcccggcgg ctgtgagcgc tgcggcgcg gcgcggggct 1140
 ttgtgcctc cgcgtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg gcggtgcccc gcggtgcggg 1200
 ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg 1260

 gtgtgggcgc ggcggtcggg ctgtaacccc ccctgcacc cccctcccc agttgctgag 1320
 cacggccccg cttcgggtgc ggggctccgt gcggggcgtg gcgcggggct cgccgtgccg 1380
 ggcggggggt ggcggcaggt ggggtgcccg gcggggcgg ggccgcctcg ggccggggag 1440
 ggctcggggg aggggcgcgg cggccccgga gcgccgcgg ctgtcgagcc gcggcgagcc 1500
 gcagccattg cttttatg taatcgtgcg agagggcgca gggacttctt ttgtccaaa 1560
 tctggcgag ccgaaatctg ggagggcgg ccgcacccc tctagcgggc gcgggcgaag 1620
 cgggtgcggc ccggcaggaa ggaatgggc ggggagggcc ttcgtgcgtc gccgcgccgc 1680

cgcccccttc tccatctcca gcctcggggc tgccgcaggg ggacggctgc cttcgggggg 1740
 gacggggcag ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg cggctctaga gcctctgcta 1800
 accatgttca tgccttcttc ttttctctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc 1860
 tgtctcatca ttttggcaaa gaattctaatac acgactcact ataggagac ccaagctggc 1920
 tagccaaagc ttccaccatg gcggggctct ggctggggct cgtgtggcag aagctgctgc 1980
 tgtggggcgc ggcgagtgcc ctttccctgg ccggcgccag tctggtcctg agcctgctgc 2040
 agagggtggc gagctacgcg cggaaatggc agcagatgcg gcccatcccc acggtggccc 2100

 ggcctacce actggtgggc cacgcgctgc tgatgaagcc ggacgggcga gaatttttc 2160
 agcagatcat tgagtacaca gaggaatacc gccacatgcc gctgctgaag ctctgggtcg 2220
 ggccagtgcc catggtggcc ctttataatg cagaaaatgt ggagtaatt ttaactagtt 2280
 caaagcaaat tgacaaatcc tctatgtaca agtttttaga accatggctt ggccatggac 2340
 ttcttacaag tactggaaac aaatggcgct ccaggagaaa gatgttaaca cccactttcc 2400
 attttaccat tctggaagat ttcttagata tcatgaatga acaagcaaat atattggtta 2460
 agaaacttga aaaacacatt aaccaagaag catttaactg ctttttttac atcactcttt 2520

 gtgccttaga tatcatctgt gaaacagcta tggggaagaa tattggtgct caaagtaatg 2580
 atgattccga gtatgtccgt gcagtttata gaatgagtga gatgatattt cgaagaataa 2640
 agatgccctg gctttggctt gatctctggt acctatggtt taaagaagga tgggaacaca 2700
 aaaagagcct tcagatccta catactttta ccaacagtgt catcctgaa cgggccaatg 2760
 aaatgaacgc caatgaagac tgtagaggtg atggcagggg ctctgcccc tccaaaata 2820
 aacgcagggc ctttcttgac ttgcttttaa gtgtgactga tgacgaaggg aacaggttaa 2880
 gtcatagaaga tattcgagaa gaagtgtaca cttcatggtt tgaggggcac gatacaactg 2940

 cagctgcaat aaactggtcc ttatacctgt tgggttctaa cccagaagtc cagaaaaaag 3000
 tggatcatga attgatgac gtgtttggga agtctgaccg tcccgtaca gtagaagacc 3060
 tgaagaaact tcggtatctg gaatgtgtta ttaaggagac ccttcgctt tttccttctg 3120
 ttcttttatt tgcccgtagt gttagtgaag attgtgaagt ggcaggttac agagttctaa 3180
 aaggcactga agccgtcacc attccctatg cattgcacag agatccgaga tacttcccca 3240
 accccgagga gttccagcct gagcggttct tccccagaa tgcacaaggg cgcctccat 3300
 atgcctacgt gccttctct gctggcccca ggaactgtat aggtcaaaag tttgctgtga 3360

 tggaagaaaa gaccattctt tcgtgcatcc tgaggcactt ttgatagaa tccaaccaga 3420
 aaagagaaga gcttggctca gaaggacagt tgattcttctg tccaagtaat ggcatctgga 3480
 tcaagttgaa gaggagaaat gcagatgaac gctaagcggc cgcaactcga gactctagag 3540

gttaatcgat aatcaacctc tggattacaa aattttgtaa agattgactg gtattcttaa 3600
 ctatgttgcct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat 3660
 tgcttcccgt atggctttca ttttctctc cttgtataaa tcttggttgc tgtctcttta 3720
 tgaggagtgg tggccccgtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc 3780

aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt 3840
 cccccctcct attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct getggacagg 3900
 ggctcggctg ttgggcaactg acaattccgt ggtgttctcg gggaaatcat cgtcctttcc 3960
 ttggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc 4020
 ttcggccctc aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct 4080
 tccgcgtctt cgccttcgcc ctacagcag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgca 4140
 tcgaaacccg ctgactagac gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 4200

tccccctgct cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat 4260
 gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgcattcta ttctgggggg tggggtgggg 4320
 caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 4380
 tctatggccg cgggcccgag gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4440
 ctgctcgtc cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccc acgccccggc tttgccccgg 4500
 cggcctcagt gagcgcagca gcgcgcagct gcctgcagg 4539

<210> 62

<211> 4539

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated expression construct

<400> 62

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc tgcggcctaa ggcaattgag atctcgacat tgattattga 180
 ctagtatta atagtaatca attacggggt cattagtcca tagccatata atggagtcc 240
 gcgttacata acctacggtg aatggccccg ctggctgacc gccaacgac cccccccat 300
 tgactcaat aatgacgat gttccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 360

aatgggtgga ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 420
 caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt 480

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 540
 ccatgggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttactctcc ccatctcccc ccctcccca 600
 cccccaatth tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 660
 gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 720
 aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 780

 gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgttgcc 840
 ttcgccccgt gccccgctcc gcgccgcctc gcgccgccg ccccggtct gactgaccgc 900
 gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct ccgggctgta attagcgtt 960
 ggtttaatga cggctcgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttaaag ggctccggga 1020
 gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg cgtgtgtgtg tgcgtgggga 1080
 gcgcccgctg cggccccgcg tgccccggcg ctgtgagcgc tgcgggcgcg gcgcggggct 1140
 ttgtgcgctc cgcgtgtcgc cgaggggagc gcggccgggg gcggtgcccc gcggtgcggg 1200

 ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg 1260
 gtgtgggcgc ggcggtcggg ctgtaacecc ccctgcacc cccctcccc agttgtctgag 1320
 cacggcccgg cttcgggtgc ggggctccgt gcggggcgtg gcgcggggct cggcgtgccg 1380
 ggcggggggg ggcggcaggt gggggtgccg ggcggggcgg ggcccctcg ggcgggggag 1440
 ggctcggggg aggggcgcgg cggeccccga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc 1500
 gcagccattg cttttatgg taatcgtcgc agagggcgca gggacttctt ttgtccaaa 1560
 tctggcgagg ccgaaatctg ggaggcggcg ccgcaccccc tctagcgggc gcgggcgaag 1620

 cgggtcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc ttcgtgcgtc gccgcgccg 1680
 cgtccccttc tccatctcca gcctcggggc tgcccgaggg ggacggctgc cttcgggggg 1740
 gacggggcag ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg cggtctaga gcctctgcta 1800
 accatgttca tgcttcttc ttttctac agctcctggg caactgtctg gttattgtgc 1860
 tgtctcatca ttttgcaaa gaattctaatac agactcact atagggagac ccaagctggc 1920
 tagccaaage ttccaccatg gcggggctct ggctggggct cgtgtggcag aagctgctgc 1980
 tgtggggcgc ggcgagtgcc ctttcctgg ccggcgccag tctggtcctg agcctgctgc 2040

 agagggtggc gagctacgcg cggaaatggc agcagatgcg gcccatcccc acggtggccc 2100
 gcgcctacc actgggtggc cacgcgctgc tgatgaagcc ggacggcgga gaatttttc 2160
 agcagatcat tagtacaca gaggaatacc gccacatgcc gctgctgaag ctctgggtcg 2220
 ggccagtgcc catgggtggc ctttataatg cagaaaatgt ggaggttaatt ttaactagtt 2280
 caaagcaaat tgacaaatcc tctatgtaca agtttttaga accatggctt gcctaggac 2340

ttcttacaag tactggaaac aaatggcgct ccaggagaaa gatgtaaca cccactttcc 2400
 attttaccat tctggaagat ttcttagata tcatgaatga acaagcaaat atattggtta 2460

 agaaacttga aaaacacatt aaccaagaag catttaactg ctttttttac atcactcttt 2520
 gtgccttaga tatcatctgt gaaacagctt tggggaagaa tattgggtgct caaagtaatg 2580
 atgatccga gtatgtccgt gcagtttata gaatgagtga gatgatattt cgaagaataa 2640
 agatgcctg gctttggctt gatctctggt accttatggt taaagaagga tgggaacaca 2700
 aaaagagcct taagatccta catactttta ccaacagtgt catcgcggaa cgggccaatg 2760
 aatgaacgc caatgaagc tgtagagtg atggcagggg ctctgcccc tccaaaaata 2820
 aacgcagggc ctttcttgac ttgcttttaa gtgtgactga tgacgaaggg aacaggctaa 2880

 gtcataaga tattcgagaa gaagtgaca ctttcatggt tgaggggcac gatacaactg 2940
 cagctgcaat aaactggctc ttatacctgt tgggttctaa cccagaagtc cagaaaaaag 3000
 tggatcatga attggatgac gtgtttggga agtctgaccg tcccgtaca gtagaagacc 3060
 tgaagaaact tcggtatctg gaatgtgta ttaaggagac ctttcgctt tttccttctg 3120
 ttcctttatt tgcccgtagt gttagtgaag attgtgaagt ggcaggttac agagtctaa 3180
 aaggcactga agccgtcacc attcctatg cattgcacag agatccgaga tacttcccca 3240
 accccgagga gttccagcct gagcggttct tccccgagaa tgcacaaggg cgccatccat 3300

 atgcctacgt gcccttctct gctggcccca ggaactgtat aggtcaaaag tttgctgtga 3360
 tggaaagaaa gaccattctt tcgtgcatcc tgaggcactt ttggatagaa tccaaccaga 3420
 aaagagaaga gcttggctta gaaggacagt tgattcttcg tccaagtaat ggcactctgga 3480
 tcaagttgaa gaggagaaat gcagatgaac gctaagcggc cgcaactcga gactctagag 3540
 gttaatcgat aatcaacctc tggattacaa aattttgtgaa agattgactg gtattcttaa 3600
 ctatgttgc cttttacgc tatgtggata cgtgcttta atgcctttgt atcatgctat 3660
 tgcttcccgt atggctttca ttttctctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta 3720

 tgaggagttg tgccccgtg tcaggcaacg tggcgtgggtg tgcactgtgt ttgctgacgc 3780
 aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt 3840
 cccctccct attgccacgg cggaactcat cgcgcctgc cttgcccgct gctggacagg 3900
 ggctcggctg ttgggactg acaattccgt ggtgttctc gggaaatcat cgtcctttcc 3960
 ttggctgctc gcctgtgtg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc 4020
 ttcggccctc aatccagcgg accttcttc ccgcggcctg ctgccgctc tgcggcctct 4080

tccgcgtctt cgccttcgcc ctacagacgag tcggatctcc ctttgggccc cctccccgca 4140
 tcgaaacccg ctgactagac gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 4200
 tcccccgctgc cttccttgac cctggaaggt gccactecca ctgtccttcc ctaataaaat 4260
 gaggaattg catcgattg tctgagtagg tgcattcta ttctgggggg tggggtgggg 4320
 caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 4380
 tctatggccg cgggcccag gaaccctag tgatggagt ggccactccc tctctgcgcg 4440
 ctgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgccc acgcccgggc ttgcccggg 4500
 cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct gcctgcagg 4539

<210> 63

<211> 4539

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetically generated expression construct

<400> 63

cctgcaggca gctcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60
 gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc tgcgcctaa ggcaattgag atctcgacat tgattatga 180
 ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagtca tagcccatat atggagtcc 240
 gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gccaacgac ccccgccat 300

 tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 360
 aatgggtgga ctatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc 420
 caagtacgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgccagct 480
 acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 540
 ccatgggtcg aggtgagccc cagttctgc ttcactctcc ccactcccc cccctccca 600
 ccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 660
 gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 720

 aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 780
 gcgvcggcg cgccctata aaaagcgaag gcgcggcg gcgggagtcg ctgcgttgc 840
 ttcgccccgt gccccgtcc gcgccctc gcgccccc ccccggctct gactgaccgc 900
 gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cctttctct cgggctgta attagcgtt 960
 ggtttaatga cggctcgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttaaag ggctccggga 1020

gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg cgtgtgtgtg tgcgtgggga 1080
 gcgccgcgtg cggccccgcg tccccggcgg ctgtgagcgc tgcgggcgcg gcgcggggct 1140

 ttgtgcgctc cgcgtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg gcggtgcccc gcggtgcggg 1200
 ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg 1260
 gtgtgggcgc ggcggtcggg ctgtaacccc cccctgcacc cccctccccg agttgctgag 1320
 cacggccccg cttcgggtgc ggggctcctg gcggggcgtg gcgcggggct ccccgtgccg 1380
 ggccgggggt ggcggcaggt gggggtgccg gcggggcggg ggccgcctcg ggccggggag 1440
 ggctcggggg aggggcgcgg cggccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc 1500
 gcagccattg cttttatgg taatcgtgcg agagggcgca gggacttctt ttgtccaaa 1560

 tctggcggag ccgaaactg ggaggcgcgg ccgcaccccc tctagcgggc gcgggcgaag 1620
 cgggtgcggc ccggcagaaa ggaatgggc ggggagggcc ttcgtgcgtc gccgcgccgc 1680
 cgtccccttc tccatccca gcctcggggc tgccgcaggg ggacggctgc cttcgggggg 1740
 gacggggcag ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg cggctctaga gcctctgcta 1800
 accatgttca tgccttcttc ttttcttac agctcctggg caactgctg gttattgtgc 1860
 tgtctcatca ttttggcaa gaattcta atcactcact ataggagac ccaagctggc 1920
 tagccaaage ttccaccatg gctggactgt ggctgggact ggtgtggcag aaactgctgc 1980

 tgtggggggc cgcttccgca ctgtcactgg ctggggcttc actggtgctg agcctgctgc 2040
 agagggtggc ctctacgcc agaaagtggc agcagatgag gccatccct accgtggcca 2100
 gagcctatcc actggtggga cacgcactgc tgatgaagcc tgacggcaga gatttcttc 2160
 agcagatcat cgagtacaca gaggagtata ggcacatgcc actgctgaag ctgtgggtgg 2220
 gaccctgccc tatggtggcc ctgtacaacg ccgagaatgt ggaagtgatc ctgaccagca 2280
 gcaagcagat cgataagtct agcatgtata agttcctgga gccttggtg ggcctgggcc 2340
 tgctgacctc tacaggcaac aagtggagga gccggagaaa gatgctgacc ccaacattcc 2400

 actttacaat cctggaggac ttctggaca tcatgaacga gcaggccaat atcctggtga 2460
 agaagctgga gaagcacatc aaccaggagg ctttaattg cttcttttac atcacctgt 2520
 gcgcctgga catcatctgt gagacagcta tggcaagaa catcggcgcc cagtctaatg 2580
 acgatagcga gtacgtgccc gccgtgtata gaatgagcga gatgatctt aggcgcatca 2640
 agatgcctg gctgtggctg gatctgtggt atctgatgtt caaggaggc tgggagcaca 2700
 agaagtccct gcagatcctg cacacctta caactctgt gatgccgag agagccaatg 2760

agatgaacgc caatgaggac tgtaggggcg atggaagggg cagcggccct tccaagaaca 2820

 agcggagagc cttcctggac ctgctgctga gcgtgaccga cgatgagggc aatcgctgt 2880
 cccacgagga catccgggag gaggtggata cattcatgtt tgaggggacac gacaccacag 2940
 ccgccccat caactgggcc ctgtacctgc tgggctctaa tccagagggtg cagaagaagg 3000
 tggatcacga gctggacgac gtgttcggca agtccgacag gccagcaacc gtggaggatc 3060
 tgaagaagct gagatacctg gagtgcgtga tcaaggagac actgcgcctg ttccctctg 3120
 tgcctctgtt tgcccgggcc gtgtctgagg actgtgaggt ggccggctat cgcgtgctga 3180
 agggcaccga ggccgtgac atcccttacg cctgcaccg ggaccccagg tatttccta 3240

 acccagagga gtttcagcca gagagattct ttcccagaaa tgcccagggc aggcaccctt 3300
 acgcctatgt gccattctcc gccggaccaa ggaactgcat cggacagaag ttgcccgtga 3360
 tggaggagaa aaccatcctg tcttgtatcc tgagacactt ctggatcgag agcaatcaga 3420
 agagggagga gctgggctg gagggacagc tgatcctgcg gccaaagcaac ggcactctgga 3480
 tcaaactgaa aagaaggaac gctgacgaga ggtaagcggc cgcaactcga gactctagag 3540
 gttaatcgat aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa 3600
 ctatgttgct ccttttacg tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat 3660

 tgcttcccgt atggcttca ttttctctc cttgtataaa tcttggttgc tgtctcttta 3720
 tgaggagtgg tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtgggtg tgactgtgt ttgctgacgc 3780
 aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttgccttt 3840
 cccccctct attgccacgg cggaaactcat cgcgcctgc cttgcccgct gctggacagg 3900
 ggctcggctg ttgggactg acaattccgt ggtgttgcg gggaaatcat cgtcctttcc 3960
 ttggctgctc gcctgtgtg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc 4020
 ttcggcctc aatccagcgg accttcttc ccgggectg ctgccgctc tgcggcctct 4080

 tccgcgtctt cgccttcgcc ctgagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccga 4140
 tcgaaacccg ctgactagac gactgtgctt tctagtggc agccatctgt tgtttgcccc 4200
 tccccctgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtccttc ctaataaaat 4260
 gaggaattg catcgattg tctgagtagg tgcattcta ttctgggggg tggggtgggg 4320
 caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 4380
 tctatggccg cgggcccgag gaaccctag tgatggagt ggccactccc tctctgcgcg 4440
 ctgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcggccg acgcccgggc ttgcccggg 4500

cggcctcagt gagcgagcga gcgcgagcgt gcctgcagg 4539
 <210> 64
 <211> 2403
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetically generated expression construct
 <400> 64
 cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggacg 120
 cgtaggcctg attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgacatcgc ccacagtccc 180
 cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggt 240

 aaactgggaa agtgatgctg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg ggggagaacc 300
 gtataaagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac 360
 acagggtgctg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaaata taaaattttt 420
 aagtgtataa tigtttaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt 480
 tggaaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact gtggctggga 540
 ctggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgcttccg cactgtcact ggctggggct 600
 tcactggtgc tgagcctgct gcagaggggtg gcctcctacg ccagaaagtg gcagcagatg 660

 aggcccatcc ctaccgtggc cagagcctat cactggtgg gacacgact gctgatgaag 720
 cctgacggca gagagtctt tccagcagatc atcgagtaca cagaggagta taggcacatg 780
 cactgctga agctgtgggt gggaccctg cctatggtgg ccctgtaca cgccgagaat 840
 gtggaagtga tctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctagcatgta taagtctctg 900
 gagccttggc tggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag gagccggaga 960
 aagatgctga cccaacatt ccactttaca atcctggagg acttcttga catcatgaac 1020
 gagcaggcca atatcctggt gaagaagctg gagaagcaca tcaaccagga ggcctttaat 1080

 tgcttctttt acatcacctt gtgcgccctg gacatcatct gtgagacagc tatgggcaag 1140
 aacatcggcg cccagtctaa tgacgatagc gactacgtgc gggccgtgta tagaatgagc 1200
 gagatgatct ttagcgcat caagatgcc tggtgtggc tggatctgtg gtatctgatg 1260
 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt taaaactct 1320
 gtgatcgccg agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggg cgatggaagg 1380
 ggcagcgccc ctccaagaa caagcggaga gccttctctg acctgctgct gagcgtgacc 1440

gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga tacattcatg 1500

tttgaggac acgacaccac agccgccgcc atcaactggt ccctgtacct gctgggctct 1560

aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg caagtccgac 1620

agggcagcaa ccgtggagga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt gatcaaggag 1680

acactgcgcc tgttcccctc tgtgectctg tttgcccggt ccgtgtctga ggactgtgag 1740

gtggccggct atcgcgtgct gaagggcacc gaggccgtga tcatccctta cgccctgcac 1800

cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt ctttcccgag 1860

aatgcccagg gcaggcaccc ttacgcctat gtgccattct ccgccggacc aaggaactgc 1920

atcggacaga agtttgccgt gatggaggag aaaacatcc tgtcttgtat cctgagacac 1980

ttctggatcg agagcaatca gaagaggag gagctgggcc tggagggaca gctgatcctg 2040

cggccaagca acggcatctg gatcaaacctg aaaagaagga acctgacga gagttaaag 2100

cttgaattcc tcaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtt 2160

ttttgtgtgt ctagtggcca gccatctgtt gtttgccctt cccccgtgcc ttccttgacc 2220

ctggaaggtg ccactcccag tttaaacctta attaagggcc gcaggaacce ctagtgatgg 2280

agttggccac tcctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcca ccaaaggtcg 2340

cccagcggc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc 2400

agg 2403