

(11) 공개번호 10-2025-0021303
(43) 공개일자 2025년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) *C12Q 1/6827* (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7036183

(22) 출원일자(국제) 2023년03월30일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년10월29일

(86) 국제출원번호 PCT/NL2023/050168

(87) 국제공개번호 WO 2023/191631
국제공개일자 2023년10월05일

(30) 우선권주장
22165710.9 2022년03월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
스티칭 암스테르담 유엠씨
네덜란드 1081 에이치브이 암스테르담, 드 볼레란 1117

(72) 발명자
핀토, 이갈-마르틴
네덜란드, 1105 에이제트 암스테르담, 썬/오 메이 버그드리프 9
티센, 안케 요한나 마리나
네덜란드, 1105 에이제트 암스테르담, 썬/오 메이 버그드리프 9
드 브리스, 딜런 크리스탄토
네덜란드, 1105 에이제트 암스테르담, 썬/오 메이 버그드리프 9

(74) 대리인
특허법인충현

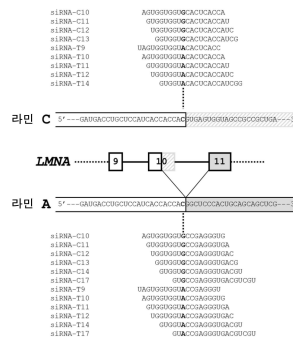
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 LMNA 돌연변이 보인자에 대한 치료에 사용하기 위한 안티센스 핵산

(57) 요약

본 발명은 포유류 세포에서 LMNA 유전자의 발현을 억제할 수 있는 단리된 안티센스 분자에 관한 것이며, 여기서 상기 안티센스 분자는 LMNA 유전자에 의해 인코딩된 전사체의 표적 영역에 실질적으로 상보적인 안티센스 핵산 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서의 SNP rs538089, rs505058 또는 rs4641에 적어도 상보적이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 9/04 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.05)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/531 (2013.01)

C12N 2320/34 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유류 세포에서 LMNA 유전자의 대립유전자-특이적 발현을 억제 감소할 수 있는 단리된 안티센스 분자로서, 여기서 상기 안티센스 분자는 LMNA 유전자에 의해 인코딩된 전사체의 표적 영역에 실질적으로 상보적인 안티센스 핵산 가닥을 포함하고, 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서의 SNP rs538089, rs505058 또는 rs4641에 적어도 상보적인, 단리된 안티센스 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 이의 화학적으로 변형된 버전, 또는

안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)로부터 선택된, 단리된 안티센스 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적 영역은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열:

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA(서열번호:1),

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA(서열번호:2),

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGGCUCCACUGCAGCAGCUC(서열번호:3), 및

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGGCUCCACUGCAGCAGCUC(서열번호:4)

또는 이와 적어도 80% 상동성인 서열을 포함하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 핵산 가닥은 서열번호:151, 서열번호:152, 서열번호:153 또는 서열번호:154에 따른 핵산 서열로부터 선택된 적어도 12개 뉴클레오티드의 연속적인 가닥을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열번호:71, 서열번호:72, 서열번호:73 및 서열번호:74로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호:73 및 서열번호:74에 따른 안티센스 핵산을 포함하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 분자는 길이가 15-30개 뉴클레오티드인 센스 핵산 가닥을 포함하고; 여기서 센스 핵산 가닥은 상기 안티센스 영역에 상보적이고 센스 및 안티센스 핵산 가닥은 듀플렉스 영역을 형성하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 가닥 및 센스 가닥은 RNA 루프 가닥의 수단에 의해 작동가능하게 연결되어 듀플렉스 구조와 루프 구조를 포함하는 헤어핀 구조를 형성하는, 단리된 안티센스 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 단리된 안티센스 분자를 인코딩하는 핵산.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 상기 안티센스 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트.

청구항 11

제10항의 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 단리된 안티센스 분자, 제9항의 핵산, 제10항의 발현 카세트 또는 제11항의 발현 벡터 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항, 제9항, 제10항, 제11항 또는 제12항에 있어서, 의료 치료에 사용하기 위한, 단리된 안티센스 분자, 핵산, 발현 카세트, 발현 벡터 또는 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항, 제9항, 제10항, 제11항 또는 제12항에 있어서, 심부전 치료에 사용하기 위한, 단리된 안티센스 분자, 핵산, 발현 카세트, 발현 벡터 또는 약학적 조성물.

청구항 15

유전자의 돌연변이체 대립유전자에 존재하는 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환의 의료 치료에 적합한 안티센스 분자를 선택하는 방법으로서, 상기 방법은:

유전자의 돌연변이체 대립유전자에 존재하는 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환을 앓고 있는 대상체의 핵산 샘플을 마련하는 것,

상기 질환의 책임이 있는 상기 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 이형접합성을 결정하는 것,

상기 유전자에서 이형접합체 SNP의 존재를 결정하는 것,

상기 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 전사체에서 이형접합체 SNP를 포함하는 표적 영역의 핵산 서열을 결정하는 것,

상기 표적 영역에 상보적인 단리된 안티센스 분자를 선택하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 16

세포에서 돌연변이체 LMNA 대립유전자의 발현을 억제 감소시키는 시험관내 방법으로서, 다음 단계를 포함하는, 방법:

LMNA 돌연변이체 대립유전자를 발현하는 세포 안으로 접촉 도입시 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 발현을 억제 감소시키는 본 발명의 안티센스 분자를 세포 안으로 도입하는 단계; 및

단계 (a)에서 생성된 세포를 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 mRNA 전사체의 분해를 얻기에 충분한 시간 동안 유지하여, 세포에서 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 발현을 억제 감소시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 심장 질환의 치료에 적합한 안티센스 분자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 발명은 심장 박출병, 특히 확장형 심근증의 치료에 사용하기 적합한 siRNA 및 shRNA에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 현재 심부전에 사용되는 요법은 대부분 형태의 심부전에 대한 증상과 생존을 성공적으로 개선했다. 그러나, 소수의 환자에서 이들 증거-기반된 치료법은 질환의 진행을 중단시키지 못해 이들 환자에게 요법-저항성 심부전을 남긴다. 아이러니하게도, 이는 라민 A/C(LMNA) 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된 심부전을 가진 환자를 포함하여 유전성 형태의 심부전을 가진 젊은 환자와 가장 관련이 있다.
- [0003] 현재 450 초과의 LMNA 돌연변이가 보고되었으며, 이는 확장형 심근증을 포함한 광범위한 질환(박충병)으로 이어진다.
- [0004] 본 발명의 목적은 LMNA 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된 유전성 형태의 심부전에 대한 치료법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

- [0005] 본 발명은 포유류 세포에서 LMNA 유전자의 대립유전자의 발현을 감소 또는 억제할 수 있는 단리된 안티센스 분자를 제공하며, 상기 안티센스 분자는 LMNA 유전자에 의해 인코딩된 전사체의 표적 영역에 실질적으로 상보적인 안티센스 핵산 가닥을 포함하며, 여기서 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서의 SNP rs538089, rs505058 또는 rs4641에 적어도 상보적이다.
- [0006] 바람직하게는, 상기 안티센스 분자는 돌연변이체 LMNA 대립유전자의 발현을 감소시킬 수 있다. 가장 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 분자는 돌연변이체 LMNA 대립유전자의 발현을 감소시킬 수 있는 반면, 돌연변이되지 않은 LMNA 대립유전자는 감소시키지 않는다.
- [0007] 바람직하게는, 상기 단리된 안티센스 분자는 다음으로부터 선택된다:
- [0008] a. 이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 이의 화학적으로 변형된 버전, 또는
- [0009] b. 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).
- [0010] 바람직하게는, 상기 dsNA는 RNA, 더 바람직하게는 짧은 헤어핀(shRNA) 또는 작은 간섭 RNA(siRNA)이다. 바람직하게는, 상기 dsNA는 dsRNA이다.
- [0011] 발명에 따른 바람직한 단리된 안티센스 분자는 길이가 15-30개 뉴클레오티드의 안티센스 핵산 가닥을 포함한다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서 적어도 7개, 보다 바람직하게는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개 뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 구체예에서, 안티센스 분자가 돌연변이체 LMNA 대립유전자에 특이적으로 결합한다면, 안티센스 핵산 가닥과 표적 영역 사이에 1개 또는 2개의 불일치가 있을 수 있다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 적어도 7개, 보다 바람직하게는 8, 9, 10, 11 또는 12개 연속적인 뉴클레오티드에 상보적이다. 바람직하게는, 상기 표적 영역은 상기 표적 영역에서 적어도 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0012] 상기 단리된 안티센스 분자의 바람직한 구체예에서, 상기 표적 영역은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열:
- [0013] i. GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA(서열번호:1),
- [0014] ii. GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGUGA(서열번호:2),
- [0015] iii. GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGGCUCCACUGCAGCAGCUC(서열번호:3), 및
- [0016] iv. GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGGCUCCACUGCAGCAGCUC(서열번호:4)
- [0017] 또는 이와 적어도 80% 상동성인 핵산 서열을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 이와 적어도 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 상동성.
- [0018] 다른 바람직한 구체예에서, 상기 표적 영역은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열:
- [0019] i. CCUGCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGCCGC(서열번호:5),
- [0020] ii. CCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGC(서열번호:6),
- [0021] iii. CCUGCUCCAUCACCACCACGGCUCCACUGCAGCAGC(서열번호:7), 및

- [0022] iv. CCUGCUCCAUCACCACCAUGGCUCCACUGCAGCAGC(서열번호:8)
- [0023] 또는 이와 적어도 80% 상동성인 핵산 서열을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 이와 적어도 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 상동성.
- [0024] 발명에 따른 단리된 안티센스 분자의 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 핵산 가닥은 서열번호:151, 서열번호:152, 서열번호:153 또는 서열번호:154에 따른 핵산 서열로부터 선택된 적어도 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오타이드의 연속적인 가닥을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 표 1에 정의된 안티센스 가닥 또는 그의 핵산 유사체 서열을 포함한다. 바람직하게는 상기 안티센스 핵산 가닥은 표 1에 정의된 센스 가닥 또는 그의 핵산 유사체 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 단리된 안티센스는 서열번호:71, 서열번호:72, 서열번호:73 및 서열번호:74로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열을 포함한다.
- [0025] 상기 단리된 dsNA의 바람직한 구체예에서, dsNA는 길이가 15-30개 뉴클레오타이드의 센스 핵산 가닥을 포함하고; 여기서 센스 핵산 가닥은 상기 안티센스 핵산 가닥과 상보적이고 센스 핵산 가닥과 안티센스 핵산 가닥은 듀플렉스 영역을 형성한다.
- [0026] 바람직하게는, 안티센스 가닥과 센스 가닥은 루프 가닥의 수단에 의해 작동가능하게 연결되어 듀플렉스 구조와 루프 구조를 포함하는 헤어핀 구조를 형성한다. 루프 구조는 4개에서 13개 뉴클레오타이드, 예컨대 4개, 5개 또는 6개 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 상기 루프는 UCAAGAC 서열을 함유한다.
- [0027] 상기 단리된 이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)의 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 핵산 가닥은 바람직하게는 길이가 15-30개 뉴클레오타이드이다. 바람직하게는, 상기 dsNA는 5' 말단과 3' 말단을 갖는 길이가 15 내지 30개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 19개 뉴클레오타이드의 RNA의 단리된 안티센스 가닥으로서, 여기서 안티센스 가닥은 바람직하게는 상기 표적 영역의 적어도 15개 뉴클레오타이드와 상보적이고, 바람직하게는 RNA의 센스 가닥의 5' 말단은 G 뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결되어 RNA의 첫 번째 세그먼트를 형성하는, 안티센스 가닥, 및 5' 말단과 3' 말단을 갖는 길이가 15 내지 30개 뉴클레오타이드의 RNA의 단리된 안티센스 가닥으로서, 여기서 바람직하게는 안티센스 및 센스 가닥의 적어도 12개 뉴클레오타이드는 서로 상보적이고 바람직하게는 생리적 조건 하에서 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스를 형성하는, 안티센스 가닥을 함유하는 shRNA이다. 바람직하게는 상기 siRNA는 세포에서 LMNA 유전자의 대립유전자 하나만을 침묵시킨다. RNA의 두 가닥에 의해 형성된 듀플렉스는 길이가 15 내지 25개 염기쌍, 바람직하게는 길이가 19개 염기쌍일 수 있다. 안티센스 가닥은 바람직하게는 길이가 19개 뉴클레오타이드이다. 센스 가닥은 바람직하게는 길이가 19개 뉴클레오타이드이다.
- [0028] 본 발명에서, RNA의 센스 및 안티센스 가닥은 RNA 루프 가닥의 수단에 의해 함께 작동가능하게 연결되어 헤어핀 구조를 형성하여 "듀플렉스 구조" 및 "루프 구조"를 형성할 수 있다. 이들 루프 구조는 길이가 4 내지 13개, 보다 바람직하게는 4 - 10개 뉴클레오타이드 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, 루프 구조는 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. shRNA는 추가로 오버행 영역을 함유할 수 있다. 이러한 오버행은 3' 오버행 영역 또는 5' 오버행 영역일 수 있다. 오버행 영역은 예를 들어 길이가 1개부터 6개 뉴클레오타이드일 수 있다. 바람직한 구체예에서 5'오버행은 핵산 서열 CCGG를 갖는다. 바람직한 구체예에서 3'오버행은 핵산 서열 G를 갖는다.
- [0029] 본 발명은 발명의 단리된 이중 가닥 핵산 또는 ASO를 인코딩하는 핵산을 추가로 제공한다. 바람직한 구체예에서, 발명의 상기 안티센스 RNA, 예컨대 shRNA는 다음 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드에 의해 인코딩된다: 5'-CCGGAA-19bp 센스 가닥-TCAAGAC-19bp 안티센스 가닥-TTTTTTIG-3' 및 역방향 5'-AATTCAAAAAA-19bp 센스 가닥-GTCTTGA-19bp 안티센스 가닥-TT-3'. 본원에서 센스 가닥은 정확하게 mRNA에서 표적화된 서열이고 안티센스 가닥은 최종적으로 mRNA에 결합하고 그 분해 및/또는 억제를 유도하는 그 역방향 상보적 서열이다.
- [0030] 본 발명은 또한 발명에 따른 상기 안티센스 핵산 가닥을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 발명의 상기 안티센스 핵산 가닥을 인코딩하는 상기 핵산은 임의의 서열번호 75-150에 따른 핵산 서열을 포함한다.
- [0031] 이들 발현 카세트는 프로모터를 더 함유할 수 있다. 이러한 프로모터는 조절가능한 프로모터 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 적합한 프로모터의 예는 CMV, RSV, pol II 또는 pol III 프로모터를 포함한다. 발현 카세트는 합성 최소 폴리아데닐화 신호와 같은 폴리아데닐화 신호를 더 함유할 수 있다. 발현 카세트는 마커 유전자를 더 함유할 수 있다. 구체예에서, 상기 발현 카세트는 발명에 따른 상기 안티센스 핵산 가닥을 인코딩하는 2개 핵산을 포함하며, 여기서 첫 번째 핵산은 라민 A 이소폼을 감소시키는 안티센스 가닥을 인코딩하고 두 번째 핵산은 라민 C 이소폼을 감소시킬 수 있는 안티센스 가닥을 인코딩한다. 안티센스 핵산 가닥의 발현은 바람직하게는 안

티센스 핵산 가닥 중 하나만이 표적 세포에서 발현되거나 발현될 수 있도록 조절가능하다.

- [0032] 본 발명은 상기 기술된 발현 카세트를 함유하는 벡터를 제공한다. 더욱이, 벡터는 두 개의 발현 카세트를 함유할 수 있는데, 첫 번째 발현 카세트는 RNA 듀플렉스의 안티센스 가닥을 인코딩하는 핵산을 함유하고 두 번째 발현 카세트는 RNA 듀플렉스의 센스 가닥을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 적절한 벡터의 예는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-연관된 바이러스(AAV), 폴리오바이러스, HSV 또는 뮤어라인 말로니-기반된 바이러스 벡터를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 벡터는 AAV이다. 바람직하게는 상기 발현 카세트는 상기 기술된 바와 같은 임의의 ASO 또는 dsNA를 인코딩한다.
- [0033] 발명은 발명에 따른 발현 카세트를 함유하는 세포를 추가로 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 포유류 세포, 바람직하게는 인간 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포는 심장 세포, 바람직하게는 인간 유도된 다능성 줄기 세포-유래된 심근세포(hiPSC-CM)이다.
- [0034] 발명은 발명의 안티센스 분자와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 생물체에서 LMNA 유전자의 발현을 감소시키기 위한 약학적 조성물을 추가로 제공한다.
- [0035] 발명은 의료 치료에 사용하기 위한 발명에 따른 단리된 안티센스 분자를 추가로 제공한다.
- [0036] 발명은 발명에 따른 단리된 안티센스 분자, 발명의 단리된 안티센스 분자를 인코딩하는 핵산, 발명의 발현 카세트 또는 발명의 발현 벡터, 심부전의 치료에 사용하기 위한 발명에 따른 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 바람직하게는, 상기 치료는 박충병, 바람직하게는 확장형 심근증의 치료이다.
- [0037] 발명은 유전자의 돌연변이체 대립유전자 상에 존재하는 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환의 의료 치료에 적합한 안티센스 분자를 선택하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0038] a. 유전자의 돌연변이체 대립유전자 상에 존재하는 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환을 앓고 있는 대상체의 핵산 샘플을 제공하는 것,
- [0039] b. 상기 질환을 담당하는 상기 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 이형접합성을 결정하는 것,
- [0040] c. 상기 유전자에서 이형접합체 SNP의 존재를 결정하는 것,
- [0041] d. 상기 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 이형접합체 SNP를 포함하는 표적 영역의 핵산 서열을 결정하는 것,
- [0042] e. 상기 표적 핵산 가닥에 상보적인 단리된 안티센스 분자를 선택하는 것.
- [0043] 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 분자는 본원에서 기술된 바와 같다. 바람직하게는, 상기 유전자는 LMNA 유전자이다. 바람직하게는, 상기 SNP는 rs538089, rs505058 및 rs4641로부터 선택된다.
- [0044] 상기 질환은 심부전, 구체적으로 박충병, 예전대 확장성 심근증이다.
- [0045] 발명은 세포에서 돌연변이체 LMNA 대립유전자의 발현을 감소시키는 시험관내 방법을 추가로 제공하며, 이는 다음 단계를 포함한다:
- [0046] (a) LMNA 돌연변이체 대립유전자를 발현하는 세포 안으로 도입시 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 발현을 감소시키는 발명의 안티센스 분자를 세포 안으로 도입하는 단계; 및
- [0047] (b) 단계 (a)에서 생성된 세포를 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 mRNA 전사체의 분해를 얻기에 충분한 시간 동안 유지하여 세포에서 LMNA 돌연변이체 대립유전자의 발현을 감소시키는 단계. 바람직하게는, 상기 LMNA 돌연변이체 유전자의 발현은 적어도 20%이다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 설계되고 테스트된 siRNA의 개요를 보여준다. 검은색 윤곽이 있는 사각형은 라민 A와 라민 C 이소폼 사이의 공통 공유된 엑손 10을 보여준다. SNP rs4641(굵은 글씨로 된 뉴클레오티드, C 뉴클레오티드 = C 대립유전자; T 뉴클레오티드 = T 대립유전자) 후, 라민 C는 엑손 10B(회색 빗금친 사각형)로 계속되는 반면, 라민 A는 엑손 11(회색 채워진 사각형)과 엑손 12(표시되지 않음)로 계속된다. shRNA는 각 특정 이소폼에 대해 설계되었고 C 대립유전자 또는 T 대립유전자를 표적화하도록 설계되었다.

도 2는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 C를 표적화하는 shRNA의 결과의 개요를 보여준다. 도 2a는 라민 C에서 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현

을 보여준다. 도 2b는 라민 C에서 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리한 후 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 도 2c는 라민 C에서 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리한 후 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현을 보여준다. 도 2d는 라민 C에서 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리한 후 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 막대는 평균을 나타내고 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 3-4회 실험에서 N = 4-12.

도 3은 LMNA H222P 및 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 결과의 개요를 보여준다. 도 3a는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현을 보여준다. 도 3b는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 도 3c는 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현을 보여준다. 도 3d는 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 막대는 평균을 나타내고 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 2-3회 실험에서 N = 4-9.

도 4는 LMNA H222P와 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 결과의 개요를 보여준다. 도 4a는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현을 보여준다. 도 4b는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 도 4c는 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 A의 상대적 발현을 보여준다. 도 4d는 건강한 hiPSC-CM에서 라민 A에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA로 처리 후의 C 대립유전자, T 대립유전자 및 총 라민 C의 상대적 발현을 보여준다. 막대는 평균을 나타내고 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 2-3회 실험에서 N = 5-9.

도 5는 LMNA H222P hiPSC-CM에서 shRNA T17에 의한 rs4641의 T 대립유전자를 표적화함에 의한 돌연변이체 LMNA 대립유전자의 하향조절 후 핵 동글기의 개선을 보여준다. 음성 대조군 shRNA(NC), rs4641의 C 대립유전자를 표적화함에 의한 야생형 LMNA 대립유전자를 하향조절하는 대립유전자-특이적 shRNA C17(C17) 및 rs4641의 T 대립유전자를 표적화함에 의한 돌연변이체 LMNA 대립유전자를 하향조절하는 대립유전자-특이적 shRNA T17(T17)로 H222P hiPSC-CM의 처리. 3가지 다른 분화로부터 N = 305-364. 검은색 막대는 평균을 나타내고, *** = $p < 0.001$.

도 6: 표적화 siRNA의 도식적 표현. LMNA 유전자는 LMNA와 LMNC인 2개의 mRNA 스플라이스 이소폼을 인코딩한다. SNP rs4641(굵은 글씨로 표시)은 엑손 10의 중간에 있는 양 이소폼에 의해 공유된 마지막 뉴클레오타이드이며, 그 후 LMNC는 스플라이스되지 않고 엑손 10에서 종료되는 반면 LMNA는 rs4641 후에 엑손 11에 즉시 스플라이스한다. 스플라이싱 때문에 본 발명자들은 LMNA(siRNA의 하부 패널)와 LMNC(siRNA의 상부 패널) 특이적 siRNA를 설계해야 하며 대립유전자-특이성을 테스트할 그 서열은 도면에 표시되어 있다. siRNA 서열은 3'에서 5'로 쓰여지고 반면 다른 모든 서열은 5'에서 3'으로 쓰여진다는 점에 유의한다.

도 7. shRNA 설계 및 활성 siRNA로 그의 전환. 바이러스에 의해 인코딩된 shRNA는 중간에 비-상보적 서열을 갖는 2개의 상보적 서열(회색 음영)로 구성된다. 이들 서열은 바이러스로부터 전사될 때 헤어핀 같은 구조를 형성하여 상보적 부분이 결합하고 비-상보적 부분이 루프를 형성한다. 이 루프는 효소 Dicer에 의해 제거되어 siRNA 듀플렉스를 형성한다. 이 듀플렉스 중 소위 가이드 또는 안티센스 가닥(짙은 회색 음영)은 RNA 유도된 사일런싱 복합체 안으로 통합되어 표적화 mRNA에 결합하고 분해하는 반면 siRNA 듀플렉스의 다른 패신저 또는 센스 가닥은 분해된다.

도 8. 각각 LMNA와 LMNC 스플라이스 이소폼의 대립유전자-특이적 발현에 대한 LMNA의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 영향. A & C 각각 LMNA와 LMNC의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현과 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비하여 총 LMNA 발현 수준에 미치는 영향. B & D는 LMNA와 LMNC의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현의 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 9. LMNA 스플라이스 이소폼을 표적화하는 shRNA-C17 및 shRNA-T17에서의 불일치의 개략적 표현. 도면에는 원래 서열과 각각의 추가 불일치가 있는 shRNA(굵은 밑줄로 표시)가 표시되어 있다. siRNA 서열은 3'에서 5'로 쓰여지고 반면 다른 모든 서열은 5'에서 3'으로 쓰여진다는 점에 유의한다.

도 10. LMNA의 C 대립유전자를 표적화하는 shC17에서 추가적 불일치의 효과. A & C: 각각 LMNA 및 LMNC의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현, 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNA 및 LMNC의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 보여준다.

도 11. 각각 LMNA 및 LMNC 스플라이스 이소폼의 대립유전자-특이적 발현에 대한 LMNA의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 효과. A & C 각각 LMNA 및 LMNC의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNA 및 LMNC의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 12. LMNA의 T 대립유전자를 표적화하는 shT17에서의 추가적 불일치의 효과. A & C 각각 LMNA 및 LMNC의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNA 및 LMNC의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 13. 각각 LMNC와 LMNA 스플라이스 이소폼의 대립유전자-특이적 발현에 대한 LMNC의 C 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 효과. A & C 각각 LMNC 및 LMNA의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNC 및 LMNA의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 14. LMNC 스플라이스 이소폼을 표적화하는 shRNA-C11, shRNA-C13 및 shRNA-T14에서의 불일치의 개략적 표현. 도면에는 원래 서열과 각각의 추가 불일치가 있는 shRNA(굵은 밑줄로 표시)가 표시되어 있다. siRNA 서열은 3'에서 5'로 쓰여지고 반면 다른 모든 서열은 5'에서 3'으로 쓰여진다는 점에 유의한다.

도 15. LMNC의 C 대립유전자를 표적화하는 shC11에서의 추가적 불일치의 효과. A & C 각각 LMNC 및 LMNA의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNC 및 LMNA의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 16. LMNC의 C 대립유전자를 표적화하는 shC13에서의 추가적 불일치의 효과. A & C 각각 LMNC 및 LMNA의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNC 및 LMNA의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 17. 각각 LMNC와 LMNA 스플라이스 이소폼의 대립유전자-특이적 발현에 대한 LMNC의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA의 효과. A & C 각각 LMNC 및 LMNA의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNC 및 LMNA의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

도 18. LMNC의 T 대립유전자를 표적화하는 shT14에서의 추가적 불일치의 효과. A & C 각각 LMNC 및 LMNA의 야생형(C) 대립유전자와 돌연변이체(T) 대립유전자의 대립유전자 특이적 발현 및 SCR 음성 대조군 조건에서의 발현에 비한 총 LMNA/C 발현 수준에 미치는 효과. B & D는 LMNC 및 LMNA의 돌연변이체(T) 및 야생형 대립유전자(C)의 발현 백분율을 각각 나타내어 두 대립유전자의 발현 간 균형을 시각화한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 본 발명은 작은 간섭 RNA(siRNA)의 발현을 통한 LMNA 유전자의 대립유전자-특이적 사일런싱의 놀라운 발견에 기초한다. 발명자들은 단일-뉴클레오타이드 다형성 rs4641을 함유하는 유전자의 영역을 표적화함에 의해 이 유전자의 특정 대립유전자의 발현을 현저히 감소시켰다. 발명자들은 건강한 대조군과 LMNA H222P 인간 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC) 세포주로부터 유래된 게놈 DNA를 사용함에 의해 rs4641을 함유하는 PCR 앰플리콘을 서열화하고 두 hiPSC 세포주 모두 SNP rs4641(C/T)의 이형접합체 담체이고 다른 변이체를 담지하지 않는다는 것을 발견했다.

[0050] SNP rs4641은 LMNA로부터 유래된 두 mRNA 이소폼, 즉 라민 A와 라민 C의 마지막 공유된 뉴클레오타이드이다. 두

이소폼 모두는 처음 566개 아미노산을 공유하지만 대체 스플라이싱으로 인해 엑손 10 후에는 다르다. 라민 A는 엑손 11과 12로 이어지는 반면 라민 C는 엑손 10B로 이어진다. SNP rs4641은 두 이소폼 모두의 마지막 공유된 뉴클레오타이드이므로 발명자들은 이소폼 특이적 siRNA를 설계했다. 더욱이, LMNA 돌연변이, 즉 질환을 야기하는 돌연변이는 SNP의 양 대립유전자(C 또는 T 대립유전자) 상에 위치될 수 있어, 발명자들은 라민 A와 라민 C 이소폼 둘 모두 상에서 양 SNP 대립유전자에 대한 siRNA를 설계했다는 것을 의미한다.

[0051] 발명자들은 상기 기술된 영역을 표적화하는 shRNA에 의한 LMNA의 돌연변이체 대립유전자의 하향조절 후 핵의 둥글기의 개선을 보여주었으며 이는 이 사일런싱이 효과적임을 입증한다.

[0052] 본 발명의 한 가지 목표는 돌연변이체 대립유전자가 억제되는 치료법을 제공하는 것이다. 돌연변이체 대립유전자와 야생형(=건강한) 대립유전자를 구별하기 위해, 발명자들은 LMNA에서 공통적인 변이체(SNP rs4641)을 사용한다. 따라서, 어떤 대립유전자가 억제될 필요가 있는지 결정하기 위해서는 돌연변이가 어느 대립유전자에 위치되는지를 결정할 필요가 있다. 예를 들어, 특정 돌연변이가 SNP T 대립유전자 상에 위치되는 경우(즉, 돌연변이와 SNP T가 시스에 있는 경우), SNP T 대립유전자가 억제될 필요가 있다. 그러나, 돌연변이가 SNP C 대립유전자 상에 위치되는 경우(즉, 돌연변이와 SNP C가 시스에 있는 경우), SNP C 대립유전자가 억제될 필요가 있다. 발명자들은 박충병을 야기하는 특정 돌연변이와 독립적으로 돌연변이체 대립유전자를 억제하기 때문에, 발명의 단리된 안티센스 분자는 LMNA 유전자에서의 모든 돌연변이에 작용한다.

[0053] 발명자들은 LMNA H222P 돌연변이를 보유하는 세포주를 사용했다. H222P 돌연변이는 rs4641 T 대립유전자 상에 위치된다. 그래서, rs4641 C 대립유전자를 억제함에 의해 그것은 잠재적으로 질환을 악화시킬 수 있고(야생형이 건강한 대립유전자이기 때문), 반면 rs4641 T 대립유전자를 억제함에 의해 그것은 잠재적으로 질환을 완화시킬 수 있다(돌연변이체 대립유전자를 억제함).

[0054] I. 정의

[0055] 용어 "안티센스 분자"는 mRNA, 바이러스 RNA 또는 기타 RNA 종과 같은 표적 RNA 분자에 대한 서열 상보성을 함유하고 서열-특이적 결합 후 그 표적 RNA의 기능을 감소시키는 올리고뉴클레오타이드 분자를 지칭한다. 안티센스 분자의 예는 용어 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), siRNA, shRNA, 간섭 RNA 분자 및 안티센스 올리고머에 의해 제공되며, 이 용어는 이하 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0056] 용어 "핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 형태에서의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체를 지칭하며, 당, 인산 및 퓨린 또는 피리미딘인 염기를 함유하는 단량체(뉴클레오타이드)로 구성된다. 특별히 제한되지 않는 한, 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 알려진 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 표시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 명시적으로 표시된 서열뿐만 아니라 보수적으로 변형된 이의 변이체(예를 들어, 변성 코돈 치환) 및 상보적 서열을 포괄한다. 구체적으로, 변성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함에 의해 달성될 수 있다(Batzer 등, (1991) Nucleic Acids Research 19: 5081; Ohtsuka 등, (1985) J Biol Chem 260: 2605-2608; Rossolini 등, (1994) Mol Cell Probes 8: 91-98).

[0057] "핵산 단편"은 주어진 핵산 분자의 일부이다.

[0058] 용어 "뉴클레오타이드 서열"은 단일- 또는 이중-가닥일 수 있는 DNA 또는 RNA의 중합체를 지칭하며, 임의적으로 DNA 또는 RNA 중합체 안으로 통합될 수 있는 합성, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드 염기를 함유한다.

[0059] 용어 "핵산", "핵산 분자", "핵산 단편", "핵산 서열 또는 세그먼트" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환가능하게 사용되고 또한 유전자, cDNA, DNA 및 유전자에 의해 인코딩된 RNA와 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0060] 용어 "핵산 유사체"는 자연적으로 발생하는 RNA 및 DNA와 유사한(구조적으로 비슷한) 화합물을 지칭한다. 예를 들어, RNA는 DNA의 자연적으로 발생하는 핵산 유사체이다. 핵산은 인산 골격, 펜토스 당, 어느 하나의 리보스 또는 데옥시리보스, 및 4가지 핵염기 중 하나로 구성된 뉴클레오타이드의 사슬이다. 유사체는 임의의 변경된 이들을 가질 수 있다. 전형적으로 유사체 핵염기는 다른 것들 중에서도 다른 염기 페어링 및 염기 스테킹 특성을 부여한다. 예로는 모든 4개의 규범적 염기와 쌍을 이룰 수 있는 범용 염기와 PNA와 같은 인산-당 골격 유사체가 포함된다. 인공 핵산에는 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산(LNA), 뿐만 아니라 글리콜 핵산(GNA), 트레오스 핵산(TNA) 및 핵시톨 핵산(HNA)이 포함된다. 이들 각각은 분자의 골격에 대한 변경에 의해 자연적으로 발생하는 DNA 또는 RNA로부터 구별된다.

- [0061] 용어 "특정 서열번호의 핵산 서열의 핵산 유사체 서열"은 상기 서열번호와 유사한 핵산 서열을 지칭한다. 예로서 서열번호: 83은 DNA 서열 ccggaaatca ccaccacgtg agtgggtcaag acccactcac gtggtggtga ttttttttg를 지칭한다. 이의 RNA 유사체 핵산은 우라실에 대해 교환된 티미딘을 갖는다. 서열번호 83의 핵산 서열의 핵산 유사체 서열의 또 다른 예는 동일한 염기를 갖는 PNA 핵산 서열이다.
- [0062] 용어 "핵산의 화학적으로 변형된 버전"은 핵산에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 지칭하며, 이는 상기 핵산과 그 상보적 가닥의 결합을 저하시키지 않는다. 많은 알려진 화학적 변형에 대한 긴 설명은 공개된 PCT 특허 출원 WO 200370918에 제시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함되며 여기서는 반복되지 않을 것이다. 적합한 변형에는 당 모이어티(즉, 당 모이어티의 2' 위치, 예컨대 예로서 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE)(Martin 등, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) 즉, 알콕시알콕시 그룹) 또는 염기 모이어티(즉, 대체 뉴클레오타이드 사슬에서 다른 특정 염기와 쌍을 이루는 능력을 유지하는 비-천연 또는 변형된 염기)에 대한 변형이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 다른 변형에는 인산에스테르기를 대체하는 것(인접한 리보뉴클레오타이드를 예로서 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트와 연결하는 것)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 소위 '골격' 변형이 포함된다.
- [0063] 발명의 안티센스 분자 또는 dsNA 분자는 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드로 구성될 수 있거나, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드, 5'-포스포로티오에이트기를 포함하는 뉴클레오타이드, 및 콜레스테릴 유도체 또는 도데칸산 비스테릴아미드기에 연결된 말단 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 대안적으로, 변형된 뉴클레오타이드는 다음의 군으로부터 선택될 수 있다: 2'-데옥시-2'-플루오로 변형된 뉴클레오타이드, 2'-데옥시-변형된 뉴클레오타이드, 잠금 뉴클레오타이드, 무염기성 뉴클레오타이드, 2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드, 2'-알킬-변형된 뉴클레오타이드, 모르폴리노 뉴클레오타이드, 포스포라미데이트, 뉴클레오타이드를 포함하는 비-천연 염기.
- [0064] 용어 "단리된 및/또는 정제된"은 천연 세포 환경 및 핵산 또는 폴리펩티드와 같은 세포의 다른 성분과의 연관으로부터 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA 분자를 그것이 서열분석, 복제 및/또는 발현될 수 있도록 시험관내에서 단리를 지칭한다. 예를 들어, "단리된 핵산"은 siRNA로 전사되는 31개 미만의 연속적인 뉴클레오타이드를 함유하는 DNA 분자일 수 있다. 이러한 단리된 siRNA는 예를 들어 관심 유전자의 서열과 상보적이거나 혼성화되고 엄격한 조건 하에서 안정적으로 결합된 상태로 유지되는 21개 염기쌍 길이의 듀플렉스를 갖는 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 따라서, RNA 또는 DNA는 RNA 또는 DNA의 천연 공급원에 일반적으로 회합되어 있는 적어도 하나의 오염 핵산이 없고 바람직하게는 임의의 다른 포유류 RNA 또는 DNA가 실질적으로 없다는 점에서 "단리"된다. "일반적으로 회합되어 있는 적어도 하나의 오염 공급원 핵산이 없음"이라는 문구에는 핵산이 공급원 또는 천연 세포에 재도입되지만 다른 염색체 위치에 있거나 달리는 공급원 세포에서, 예를 들어, 벡터 또는 플라스미드에서 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열에 의해 측정되어 있는 경우가 포함된다.
- [0065] 개시된 뉴클레오타이드 서열 및 단백질 또는 이에 의해 인코딩된 부분-길이 단백질의 단편 및 변이체도 본 발명에 포함된다. "단편" 또는 "일부"는 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 그의 아미노산 서열의 전체 길이 또는 전체 길이보다 짧은 길이를 의미한다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환가능하게 사용된다는 점에 유의한다. 두 용어 모두는 공유 펩티드 결합을 통해 함께 결합된 아미노산 잔기의 사슬로 구성된 분자를 지칭한다.
- [0066] 용어 "유전자"는 생물학적 기능과 연관된 핵산의 임의의 세그먼트를 지칭하는 데 광범위하게 사용된다. 따라서, 유전자에는 그 발현에 필요한 코딩 서열 및/또는 조절 서열이 포함된다. 예를 들어, "유전자"는 mRNA, 기능적 RNA 또는 특정 단백질을 발현하는 핵산 단편을 지칭하며, 여기에는 조절 서열이 포함된다. "유전자"에는 또한 예를 들어 다른 단백질에 대한 인식 서열을 형성하는 비발현된 DNA 세그먼트가 포함된다. "유전자"는 관심 있는 공급원으로부터 클로닝하거나 알려지거나 예측된 서열 정보에서 합성하는 것을 포함하여 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있고, 원하는 매개변수를 갖도록 설계된 서열을 포함할 수 있다. "대립유전자"는 염색체 상의 주어진 좌위를 차지하는 유전자의 여러 대체 형태 중 하나이다.
- [0067] 분자의 "변이체"는 천연 분자의 서열과 실질적으로 유사한 서열이다. 뉴클레오타이드 서열의 경우, 변이체에는 유전 코드의 퇴화로 인해 천연 단백질의 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 그들 서열이 포함된다. 이와 같은 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체는 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 하이브리다이제이션 기술과 같은 분자 생물학 기술을 사용하여 식별될 수 있다. 변이체 뉴클레오타이드 서열에는 또한 천연 단백질을 인코딩하는, 예를 들어, 부위-지향된 돌연변이를 사용하여 생성된 것과 같은 합성적으로 유래된 뉴클레오타이드 서열뿐 아니라 아미노산 치환을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열도 포함된다. 일반적으로, 발명의 뉴클레오타이드 서열

변이체는 천연(내인성) 뉴클레오타이드 서열과 적어도 40%, 50%, 60%, 내지 70%, 예를 들어 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 내지 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들어 81%-84%, 적어도 85%, 예를 들어 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 내지 98%의 서열 동일성을 갖는다.

[0068] 특정 핵산 서열의 "보수적으로 변형된 변형"은 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 이들 핵산 서열을 지칭한다. 유전 코드의 축퇴로 인해 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 주어진 폴리펩티드를 인코딩한다. 예로서, 코돈 CGT, CGC, CGA, CGG, AGA 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌을 인코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 아르기닌이 특정되어 지는 모든 위치에서 코돈은 인코딩된 단백질을 변경하지 않고 기술된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변형은 "사일런트 변형"으로, "보수적으로 변형된 변형"의 한 종류이다. 폴리펩티드를 인코딩하는 본원에 기술된 모든 핵산 서열은 달리 언급되지 않는 한 모든 가능한 사일런트 변형을 또한 기술한다. 당업자는 핵산에서의 각 코돈(일반적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 ATG 제외)이 표준 기술에 의해 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 각 "사일런트 변형"은 기술된 각 서열에 내재되어 있다.

[0069] "재조합 DNA 분자"는 재조합 DNA 기술과 예를 들어 문헌(Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning". CSHL Press: Long Island, NY, USA)에 기술된 바와 같은 DNA 서열을 함께 조인하는 데 사용되는 절차를 사용하여 함께 조인된 DNA 서열의 조합이다.

[0070] "상동" DNA 또는 RNA 서열은 그것이 도입되는 숙주 세포와 자연스럽게 회합되는 서열이다.

[0071] "벡터"는, 그 중에서도, 자가 전달되거나 이동가능할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있고, 세포 계능 안으로 통합되거나 염색체 외부에 존재하여(예를 들어, 복제 기점이 있는 자율 복제 플라스미드) 원핵 또는 진핵 숙주를 변형할 수 있는, 임의의 바이러스 벡터, 뿐만 아니라 이중 또는 단일 가닥 선형 또는 원형 형태에서의 임의의 플라스미드, 코스미드, 파지 또는 바이너리 벡터를 포함하도록 정의된다.

[0072] 본원에서 사용되는 "발현 카세트"는 적절한 숙주 세포에서 특정 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있는 핵산 서열을 의미하며, 이는 종결 신호에 작동가능하게 연결될 수 있는 관심 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 또한 뉴클레오타이드 서열의 적절한 번역에 필요한 서열을 포함할 수 있다. 코딩 영역은 일반적으로 관심 단백질을 코딩하지만 관심 기능 RNA, 예를 들어 발명에 따른 안티센스 분자, 안티센스 RNA, 센스 또는 안티센스 방향에서의 비번역된 RNA 또는 siRNA를 코딩할 수도 있다. 관심 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트는 키메라일 수 있다. 발현 카세트는 또한 자연적으로 발생하지만 이중 발현에 유용한 재조합 형태로 얻어지는 것일 수 있다. 발현 카세트에서 뉴클레오타이드 서열의 발현은 구성적 프로모터 또는 숙주 세포가 특정 자극에 노출될 때만 전사를 개시하는 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 다세포 유기체의 경우 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발달의 단계에 특이적일 수 있다.

[0073] "유전자 사일런싱"은 유전자 발현, 예를 들어 이식유전자, 이중 유전자 및/또는 내인성 유전자 발현의 억제를 지칭한다. 유전자 사일런싱은 전사에 영향을 미치는 과정 및/또는 전사-후 메커니즘에 영향을 미치는 과정을 통해 매개될 수 있다. 일부 구체예에서, 유전자 사일런싱은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 서열-특이적 방식으로 관심 유전자의 mRNA의 분해를 개시할 때 발생한다. 일부 구체예에서, 유전자 사일런싱은 대립유전자-특이적일 수 있다. "대립유전자-특이적" 유전자 사일런싱은 유전자의 한 대립유전자의 특이적 사일런싱을 지칭한다.

[0074] "RNA 간섭(RNAi)"은 siRNA에 의해 개시되는 서열-특이적, 전사-후 유전자 사일런싱의 과정이다. RNAi는 초파리, 선충류, 균류 및 식물과 같은 다수의 유기체에서 발견되고 항바이러스 방어, 트랜스포존 활성의 조절 및 유전자 발현의 조절에 관여하는 것으로 여겨진다. RNAi 동안 siRNA는 표적 mRNA의 분해를 유도하여 결과적으로 서열-특이적 감소 또는 심지어 유전자 발현의 억제를 유도한다.

[0075] 발명에 따른 "siRNA" 또는 "작은-간섭 리보핵산"은 다음의 양태를 포함하여 당업계에 알려진 의미를 갖는다. siRNA는 생리적 조건 하에서 상보적 영역을 따라 혼성화하는 두 가닥의 리보뉴클레오타이드로 구성된다. 가닥은 분리되어 있지만 특정 구체예에서 분자 링커에 의해 조인될 수 있다. 개별 리보뉴클레오타이드는 변형되지 않은 자연적으로 발생하는 리보뉴클레오타이드, 변형되지 않은 자연적으로 발생하는 데옥시리보뉴클레오타이드일 수 있거나 본원에서 다른 곳에서 기술된 바와 같이 화학적으로 변형되거나 합성될 수 있다.

[0076] "RNA 듀플렉스" 또는 "dsRNA"는 RNA 분자의 두 영역 사이의 상보적 페어링에 의해 형성된 구조를 지칭한다. siRNA는 siRNA의 듀플렉스 부분의 뉴클레오타이드 서열이 LMNA 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 상보적이라는 점에서 유전자를 "표적화"한다. 일부 구체예에서, siRNA의 듀플렉스의 길이는 30개 뉴클레오타이드 미만이다. 일부 구체예에서, 듀플렉스는 길이가 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11

또는 10개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시예에서, 듀플렉스의 길이는 19-25개 뉴클레오타이드 길이이다. siRNA의 RNA 듀플렉스 부분은 헤어핀 구조의 일부일 수 있다. 듀플렉스 부분 외에도, 헤어핀 구조는 듀플렉스를 형성하는 두 서열 사이에 위치한 루프 부분을 함유할 수 있다. 루프는 길이가 다양할 수 있다. 일부 구체예에서, 루프는 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개 뉴클레오타이드이다. 헤어핀 구조는 또한 3' 또는 5' 오버행 부분을 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 오버행은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개 뉴클레오타이드 길이의 3' 또는 5' 오버행이다.

[0077] siRNA는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있고, 핵산 서열은 또한 프로모터를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리아데닐화 신호는 합성 최소 폴리아데닐화 신호이다.

[0078] 본원에서 사용되는 "뉴클레오타이드 오버행"은 dsRNA의 한 가닥의 3'-말단이 다른 가닥의 5'-말단을 넘어 확장되거나 그 반대의 경우 dsRNA의 듀플렉스 구조에서 돌출하는 페어링되지 않은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드들을 지칭한다. "블런트" 또는 "블런트 말단"은 dsRNA의 그 말단에 페어링되지 않은 뉴클레오타이드가 없다, 즉 뉴클레오타이드 오버행이 없다는 것을 의미한다. "블런트 말단의" dsRNA는 그 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥인, 즉 분자의 어느 쪽 말단에도 뉴클레오타이드 오버행이 없는 dsRNA이다.

[0079] 용어 "안티센스 가닥"은 표적 서열에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA의 가닥을 지칭한다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "상보성의 영역"은 본원에 정의된 바와 같은, 서열, 예를 들어 표적 서열에 실질적으로 상보적인 안티센스 가닥 상의 영역을 지칭한다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "센스 가닥"은 안티센스 가닥의 영역에 실질적으로 상보적인 영역을 포함하는 dsRNA의 가닥을 지칭한다.

[0082] 본원에서 사용되는 "치료하는"은 질환 또는 병태의 적어도 하나의 증상을 개선하고/하거나, 그 발달을 치유하고/하거나, 예방하는 것을 지칭한다.

[0083] 본원에서 사용되는 용어 "에 의해 인코딩된다"는 유전자 또는 서열번호의 DNA 서열이 관심 RNA로 전사됨을 의미한다.

[0084] 용어 "LMNA 유전자의 발현을 감소시킬 수 있음"은 RNA 간섭을 통해 LMNA 유전자의 실질적인 사일런싱의 과정을 지칭한다. RNA 간섭은 이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)에 의한 것을 포함하여 안티센스 분자에 의해 촉발될 수 있다.

[0085] "라민 A/C" 유전자는 LMNA 유전자로도 알려져 있다. LMNA 유전자는 라민 A나 라민 C와 같은 상이한 라민 단백질을 인코딩하는 여러 대체 mRNA로 스플라이스되는 mRNA를 인코딩한다.

[0086] RNA 간섭을 통한 LMNA 유전자의 상당한 사일런싱의 상기 과정은 바람직하게는 LMNA 유전자의 대립유전자를 구체적으로 사일런싱하는 데 대한 것인 반면 두 번째 대립유전자의 발현은 상기 과정에 의해 변경되지 않는다. 바람직한 구체예에서 LMNA 유전자의 한 대립유전자가 사일런싱된다. 이의 장점은 이것이 많은 유전적 형태의 심부전의 질환 표현형을 완화하는 돌연변이체 대립유전자를 사일런싱할 수 있다는 것이다. 현재, 확장형 심근증을 포함한 광범위한 질환(박충병)으로 이어지는 450 초과의 LMNA 돌연변이가 보고되었다. 이들 모든 박충병에 대해 돌연변이 핫스팟(들)을 식별할 수는 없지만, 이들 돌연변이의 대부분이 우성적 부정적 효과를 가지고 있다는 점은 공유하며, 이는 돌연변이된 유전자 생성물이 야생형 생성물의 존재에서 표현형을 야기한다는 것을 나타낸다.

[0087] 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이체 LMNA 대립유전자" 또는 "돌연변이체 LMNA 유전자"는 그 생성물이 핵 구조 및 기능에 부정적인 영향을 미치는 LMNA 대립유전자 또는 유전자의 변이체를 지칭한다. 바람직하게는, 돌연변이체 LMNA 대립유전자는 우성적 부정적 효과를 갖는데, 이는 돌연변이체 대립유전자의 이형접합체 발현이 핵 구조 및 기능에 부정적인 영향을 미친다는 것을 의미한다.

[0088] 용어 "안티센스 올리고머" 또는 "안티센스 화합물" 또는 "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고 각각 염기-페어링 모이어티를 갖고, 염기-페어링 모이어티가 왓슨-크릭 염기 페어링에 의해 핵산(전형적으로 RNA)에서의 표적 서열에 혼성화되어 표적 서열 내에서 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성할 수 있도록 하는 서브유닛 간 연결에 의해 연결된 환형 서브유닛의 서열(즉, 퓨린 또는 피리미딘)을 지칭한다. 환형 서브유닛은 리보스 또는 다른 펜토스 당 또는 특정 구체예에서 모노폴리노기를 기반으로 할 수 있다. 또한 캡티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 및 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드 및 당염기에 알려진 기

타 안티센스 작용제가 고려된다.

[0089] 이러한 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 억제하거나 천연 사전-mRNA 스플라이스 프로세싱을 억제하거나 표적화된 mRNA의 분해를 유도하도록 설계될 수 있고, 이와 혼성화하는 표적 서열에 "지향되거나" 또는 "이에 대해 표적화된다"고 언급될 수 있다. 특정 구체예에서, 표적 서열은 mRNA의 AUG 시작 코돈, 사전-처리된 mRNA의 3' 또는 5' 스플라이스 부위 또는 분기점을 둘러싸거나 포함하는 영역이다. 표적 서열은 엑손 내에 있거나 인트론 내에 있거나 또는 조합될 수 있다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은 사전처리된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 접합부의 하류에 그 5' 말단이 1 내지 약 25개 염기 쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 스플라이스에 대한 바람직한 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나 엑손 코딩 서열 내에 완전히 함유되거나 스플라이스 수용체 또는 공여체 부위에 걸쳐있는 사전처리된 mRNA의 임의의 영역이다. 유전자의 표적 영역에서 상기 바람직한 표적 서열은 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함하여, 예를 들어 돌연변이를 담지하는 특정 대립유전자의 분해를 허용한다. 올리고머는 보다 일반적으로, 상기 기술된 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화될 때, 본 발명에서 라민 A 단백질을 인코딩하는 인간 *LMNA* 유전자 pre-mRNA와 같은 생물학적으로 관련된 표적에 "대해 표적화된다"고 언급된다. 상기 안티센스 올리고머는 바람직하게는 질환-악기 돌연변이를 시스 배열로 담지하는 SNP rs4641 T 또는 SNP rs4641 C 대립유전자와 같은 인간 *LMNA* 유전자의 특정 대립유전자의 분해를 유도하도록 설계된다. 본원에서 사용되는 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"(ASO)는 변형되지 않았거나 화학적으로 변형된 단일-가닥 핵산 분자(일반적으로 길이가 15-30nt)인 작용제를 의미하며, 이는 왓슨-크릭 염기 페어링을 통해 mRNA 내의 그 표적 상보적 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있다. ASO-mRNA 헤테로듀플렉스의 형성은 다음과 같은 효과를 유도한다: 1) RNase H 엔도뉴클레아제 또는 박테리아에서와 같이 엔도리보뉴클레아제 - RNase III 및 RNase E를 활성화하여 결합된 mRNA의 분해를 유도하고 ASO를 그대로 둔다; 2) 리보솜 활성의 입체 장애로 번역 정지를 야기한다; 3) mRNA 스플라이싱을 억제한다; 4) pre-mRNA를 불안정화한다. 실제로, 어떤 효과가 발생하는지는 ASO 화학 조성 및 하이브리다이제이션의 위치에 의존하지만, 그에 따른 결과는 표적 유전자와 단백질 발현의 특정한 하향-조절이다.

[0090] 본원에서 사용되는 용어 "rs4641"은 chr1:156137743(GRCh38.p13)에 위치한 SNP를 지칭한다. 2021년 4월 9일에 공개된 ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4641에서 월드 와이드 웹을 참조한다. 본원에서 사용되는 그것은 또한 LMNA 유전자에 의해 인코딩된 전사체에 존재할 때 상응하는 뉴클레오타이드 다형성을 지칭한다.

[0091] 본원에서 사용되는 용어 "*LMNA* 돌연변이"는 LMNA 유전자에서의 돌연변이를 지칭하며, 이는 바람직하게는 우성적 부정적 효과를 가지고 특히 박충병, 더 구체적으로는 심근증을 야기한다.

[0092] 본원에서 RNA 간섭을 통해 특정 표적화된 대립유전자의 상당한 사일런싱을 초래하는 전략이 개시된다. 이 전략의 사용은 표적화된 유전자 또는 대립유전자의 시험관내 및 생체내 발현을 현저히 감소시킨다. 이 전략은 생물학적 과정을 모델링하거나 인간 질환에 대한 요법을 제공하기 위해 표적화된 유전자 또는 대립유전자의 발현을 감소시키는 데 유용하다.

[0093] 대립유전자를 사일런싱시키는 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "실질적인 사일런싱"은 표적화된 대립유전자의 mRNA가 도입된 안티센스 분자의 존재에 의해 특이적으로 억제되고/되거나 분해되어, 표적화된 대립유전자의 발현이 발명의 안티센스 분자가 존재하지 않을 때 관찰되는 발현의 수준에 비해 약 10% 내지 100% 감소되는 것을 의미한다. 일반적으로 대립유전자가 실질적으로 사일런싱될 때, 그것은 단리된 안티센스 분자가 존재하지 않을 때와 비교하여 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 예를 들어 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들어 81%-84%, 적어도 85%, 예를 들어 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100% 발현 감소를 가질 것이다. 대조적으로, 비-표적화된 대립유전자의 발현은 발명의 안티센스 분자가 존재하지 않을 때 관찰되는 발현 수준에 비해 실질적으로 변경되지 않는다. 유전자를 사일런싱시키는 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "실질적인 사일런싱"은 표적화된 대립유전자의 mRNA가 도입된 단리된 안티센스 분자의 존재에 의해 억제되고/되거나 분해되어 표적화된 대립유전자의 발현이 단리된 안티센스 분자가 존재하지 않을 때 관찰되는 발현 수준에 비해 약 10% 내지 100% 감소되는 것을 의미한다. 일반적으로 대립유전자가 실질적으로 사일런싱될 때, 그것은 단리된 안티센스 분자가 존재하지 않을 때와 비교하여 적어도 40%, 50%, 60%, 내지 70%, 예를 들어 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 내지 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들어 81%-84%, 적어도 85%, 예를 들어 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100%의 발현 감소를 가질 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 정상적인 활성"은 단리된 안티센스 분자가 세포에 도입되지 않았을 때 대립유전자 또는 유전자의 발현 수준을 의미한다.

- [0094] 도 1에서의 전략에 설명된 대로, 발명자들은 돌연변이체 대립유전자, 즉 질환-야기 돌연변이를 가진 대립유전자로부터 라민 A/C 단백질의 생성을 특이적으로 제거하는 siRNA를 개발했다. 야생형과 돌연변이체 대립유전자 간의 염기쌍 차이를 활용하여, 발명자들은 야생형 mRNA의 발현을 방해함이 없이 돌연변이체 LMNA mRNA의 발현을 대립유전자-특이적으로 성공적으로 사일런싱시켰다. 라민 A/C는 필수 단백질이므로 돌연변이체 대립유전자만 사일런싱시키기 위해 노력하는 것이 매우 중요하다. 이 대립유전자-특이적 전략은 LMNA 돌연변이로 인한 질환, 특히 확장성 심근증을 포함한 박충병을 치료하는 데 명백한 치료적 잠재력이 있다.
- [0095] 바람직한 구체예에서, 상기 안티센스 핵산 가닥은 길이가 15-30개 뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서 적어도 7개, 보다 바람직하게는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개 뉴클레오티드와 상보적이다. 일부 구체예에서 안티센스 핵산 가닥과 표적 영역 사이에 1개 또는 2개의 불일치가 있을 수 있다. 바람직하게는, 2개 이하의 불일치가 있고, 보다 바람직하게는 1개 이하의 불일치가 있다. 존재하는 경우, 상기 불일치는 예를 들어 SNP rs538089, rs505058 또는 rs4641의 대립유전자-특이적 표적화를 방해하지 않을 것이다. 특정 바람직한 구체예에서 상보성에는 불일치가 없다. 적합하게, 숙련된 사람은 문헌(Huang 등 [Nucleic Acids Res 2009, 37, 7560-7569, doi:10.1093/nar/gkp835])에 기술된 바와 같이 뉴클레오티드 변화의 유형에 따라 가장 높은 판별 잠재력을 가진 불일치 위치를 설계할 수 있다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 적어도 7개, 더 바람직하게는 8, 9, 10, 11 또는 12개 연속 뉴클레오티드와 상보적이다. 바람직하게는, 상기 표적 영역은 적어도 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0096] 바람직한 구체예에서, 단리된 안티센스 분자는 다음으로부터 선택된다:
- [0097] a. 이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 이의 화학적으로 변형된 버전, 또는
- [0098] b. 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).
- [0099] dsNA의 바람직한 구체예는 합성 이중 가닥 작은 간섭 RNA(siRNA)와 벡터 구동 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. siRNA와 벡터 구동 shRNA 둘 모두는 시험관내 및 생체내 적용에서 효과적인 것으로 입증되었으며, 각각은 그 각각의 장점을 갖는다. 대부분의 siRNA는 구조적으로 Ago2 함유 RISC 안으로 효율적인 통합을 촉진하도록 설계되었으며, Dicer-기질 설계를 함유하는 RNase III는 pre-RISC에서 초기 회합 및 처리에 의해 siRNA의 효율성을 적어도 10-배 향상시킨다. 벡터 구동 shRNA는 매우 효율적인 것으로 보이는 숙주 microRNA 생합성 경로를 활용한다. siRNA는 화학적으로 더 쉽게 변형되는 반면 shRNA 발현은 특정 프로모터에 의해 조정되고 조절될 수 있다. 부가하여, shRNA에 의한 대립유전자-특이적 억제는 shRNA를 인코딩하는 벡터가 세포의 게놈 안으로 통합될 수 있으므로 오래 지속될 수 있다.
- [0100] 일 구체예에서, 치료적 siRNA의 세포내 발현을 달성하기 위해, 바람직하게는 2개의 상보적 가닥 또는 SNP rs538089, rs505058 또는 rs4641을 포함하는 LMNA 유전자의 일부를 인코딩한 표적 영역에 대해 지향된 서열을 나타내는 헤어핀 서열(예컨대 21-bp 헤어핀)을 함유하는 RNA 분자가 구성된다. siRNA 또는 siRNA를 인코딩하는 핵산은 질환에 걸린 심장 세포와 같은 표적 세포에 도입된다. siRNA는 표적 mRNA 및 표적화된, 돌연변이된 대립유전자의 단백질 발현을 감소시킨다.
- [0101] 일 구체예에서, 발명의 dsRNA는 안정성을 강화하기 위해 화학적으로 변형된다. 발명의 핵산은 본원에 참고로 포함된, 문헌("Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA)에 기술된 것과 같이 당업계에서 잘 확립된 방법에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 화학적 변형에는 2' 변형, 비-천연적 염기의 도입, 리간드에 대한 공유 부착, 인산 연결의 티오인산 연결로의 대체 및 이의 조합이 포함될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 이 구체예에서, 듀플렉스 구조의 무결성은 적어도 하나, 바람직하게는 두 개의 화학적 연결에 의해 강화된다. 화학적 연결은 임의의 다양한 잘 알려진 기술, 예를 들어 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 도입함에 의해; 소수성 상호작용, 반데르발스 또는 스택킹 상호작용; 금속-이온 배위의 수단에 의해 또는 퓨린 유사체의 사용을 통해 및 이의 조합에 의해 달성될 수 있다. 바람직하게는, dsRNA를 변형하는 데 사용될 수 있는 화학적 그룹에는, 제한 없이, 메틸렌 블루; 이중 작용기, 바람직하게는 비스-(2-클로로에틸)아민; N-아세틸-N'-(p-글리옥실벤조일)시스타민; 4-티오우라실; 및 소랄렌이 포함된다. 바람직한 구체예에서, 링커는 헥사에틸렌 글리콜 링커이다. 이 경우, dsRNA는 고체상 합성에 의해 생산되고, 헥사-에틸렌 글리콜 링커는 표준 방법(예를 들어, Williams, D.J., and K.B. Hall, Biochem. (1996) 35:14665-14670)에 따라 통합된다. 특정 구체예에서, 안티센스 가닥의 5'-말단과 센스 가닥의 3'-말단은 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 화학적으로 연결된다. 또 다른 구체예에서, dsRNA의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 기를 포함한다. dsRNA의 말단은 바람직하게는

삼중-나선 구조에 의해 형성된다.

- [0102] 치료적 siRNA를 인코딩하는 작제물은 siRNA의 하나 이상의 가닥이 프로모터에 바로 인접하고 상기 프로모터의 제어 하에 있는 핵산에 의해 인코딩되도록 구성되며 이는 상기 프로모터가 표적 세포 안으로 도입 후에 상기 핵산의 발현을 유도한다는 것을 의미한다. 작제물은 주입에 의한 것과 같이 표적 세포 안으로 도입되어 세포에서 표적-대립유전자의 감소된 발현을 허용한다.
- [0103] 본 발명은 적어도 상기 안티센스 핵산 가닥을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 발현 카세트는 발명에 따른 완전한 단리된 안티센스 분자를 인코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0104] 구체예에서, 발명의 siRNA는 듀플렉스 구조와 루프 구조를 함유하는 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 루프 구조는 4 내지 13개, 더 바람직하게는 4-10개 뉴클레오타이드, 예컨대 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 바람직하게는 상기 루프는 UCAAGAC 서열을 함유한다. 듀플렉스는 길이가 30개 미만의 뉴클레오타이드, 예컨대 19 내지 25개 뉴클레오타이드이다. siRNA는 추가로 오버행 영역을 함유할 수 있다. 이러한 오버행은 3' 오버행 영역 또는 5' 오버행 영역일 수 있다. 오버행 영역은 예를 들어 길이가 1 내지 6개 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0105] 본 발명은 또한 첫 번째 세그먼트, 첫 번째 세그먼트의 바로 3'에 위치한 두 번째 세그먼트, 및 두 번째 세그먼트의 바로 3'에 위치한 세 번째 세그먼트를 인코딩하는 단리된 핵산 서열을 함유하는 발현 카세트를 제공하며, 여기서 첫 번째 및 세 번째 세그먼트는 각각 길이가 30개 미만의 염기쌍이고 각각 길이가 10개 이상의 염기쌍이며, 세 번째 세그먼트의 서열은 첫 번째 세그먼트의 서열의 보체이고, 단리된 핵산 서열은 관심 유전자에 대해 표적화된 작은 간섭 RNA 분자(siRNA)로서 기능한다. 발현 카세트는 바이러스 벡터와 같은 벡터에 함유될 수 있다.
- [0106] 발현 카세트는 추가로 본원에 기술된 바와 같이 pol II 프로모터를 함유할 수 있다. pol II 프로모터의 예는 조절가능한 프로모터와 구성적 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 CMV 또는 RSV 프로모터일 수 있다. 발현 카세트는 추가로 폴리아데닐화 신호, 예컨대 합성 최소 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다. 핵산 서열은 추가로 마커 유전자를 함유할 수 있다. 발현 카세트는 바이러스 벡터에 함유될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 아데노-회합된 바이러스(AAV), 폴리오바이러스, 단순포진 바이러스(HSV) 또는 뮤어라인 말로니-기반 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0107] 본 발명은 상기 기술된 발현 카세트와 세포를 접촉시킴에 의해 세포에서 특정 유전자 생성물의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, 상기 기술된 발현 카세트의 조성물을 환자에게 투여하여 환자를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0108] 본 발명은 추가로 상기 기술된 바와 같이 발현 카세트와 세포를 접촉시킴에 의해 세포에서 특정 유전자 생성물의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0109] 본 발명은 또한 발명에 따른 발현 카세트를 함유하는 조성물을 환자에게 투여함에 의해 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 발현 카세트는 바람직하게는 실시예 2에 기술된 바와 같이 shC17, shC17mm5, shC17mm7, shC13mm17, shT14, shT17, shT17mm5 및 shT17mm7을 포괄한다.
- [0110] II. 발명의 핵산 분자
- [0111] 본 핵산 분자를 얻을 수 있는 뉴클레오타이드 서열의 공급원에는 임의의 척추동물, 바람직하게는 포유류 세포 공급원이 포함된다. siRNA를 인코딩하는 DNA 서열 외에도, 발명의 핵산 분자에는 단일 및 이중-가닥 간섭 RNA 분자가 포함되며, 이는 또한 표적 대립유전자의 발현을 감소시키는 데 유용하다.
- [0112] 올리고뉴클레오타이드-매개된 돌연변이유발은 치환 변이체를 제조하는 방법이다. 이 기술은 당업계에 알려져 있다. 간단히 말해서, siRNA를 인코딩하는 핵산은 원하는 돌연변이를 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 DNA 주형에 혼성화함에 의하여 변경할 수 있으며, 여기서 주형은 변경되지 않은 또는 천연 유전자 서열을 함유하는 플라스미드 또는 박테리오파지의 단일-가닥 형태이다. 하이브리다이제이션 후, DNA 중합효소를 사용하여 주형의 전체 두 번째 상보적 가닥을 합성하며 따라서 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 통합하고 siRNA를 인코딩하는 핵산의 선택된 변형을 코딩할 것이다. 일반적으로 길이가 적어도 25개 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 최적의 올리고뉴클레오타이드는 선택된 변형을 코딩하는 뉴클레오타이드(들)의 어느 하나의 측상에 주형과 완전히 상보적인 12 내지 15개 뉴클레오타이드를 갖는다. 이는 올리고뉴클레오타이드가 단일-가닥 DNA 주형 분자에 적절하게 혼성화되는 것을 보장한다. 올리고뉴클레오타이드는 당업계에서 알려진 기술을 사용하여 쉽게 합성된다.
- [0113] DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터에서 유래된 이들 벡터(상업적으로 이용가능한 M13 mp 18 및 M13 mp 19 벡터

가 적합함) 또는 단일-가닥 파지 복제 원점을 함유하는 이들 벡터에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 변형되어 지는 DNA를 이들 벡터 중 하나에 삽입하여 단일-가닥 주형을 생성할 수 있다. 대안적으로 표준 기술을 사용하여 이중-가닥 플라스미드(또는 기타) DNA를 변형시킴에 의해 단일-가닥 DNA 주형을 생성할 수 있다.

[0114] 천연의 DNA 서열의 변경을 위해 올리고뉴클레오티드는 적합한 하이브리다이제이션 조건 하에서 단일-가닥 주형에 혼성화된다. DNA 중합효소, 일반적으로 DNA 중합효소 I의 클레노우 단편을 첨가하여 올리고뉴클레오티드를 합성을 위한 프라이머로 사용하여 주형의 상보적 가닥을 합성한다. 따라서 한 가닥의 DNA가 변경된 DNA의 형태를 인코딩하고 다른 가닥(원래 주형)이 변경되지 않은 DNA의 천연 서열을 인코딩하도록 헤테로듀플렉스 분자가 형성된다. 이 헤테로듀플렉스 분자는 그 다음 일반적으로 대장균 JM101과 같은 원핵생물인 적합한 숙주 세포 안으로 형질전환된다. 세포는 성장된 후 아가로스 플레이트 상에 도말되고 32-인산으로 방사성 표지된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 변형된 DNA를 함유하는 박테리아 콜로니를 식별하기 위해 스크리닝된다. 그런 다음 변경된 영역이 제거되고 적절한 벡터, 일반적으로 적절한 숙주의 형질전환에 전형적으로 이용되는 유형의 발현 벡터에 위치된다.

[0115] 바로 위에 기술된 방법은 플라스미드의 두 가닥 모두가 변경(들)을 함유하는 호모듀플렉스 분자가 생성되도록 변형될 수 있다. 변형은 다음과 같다: 단일-가닥 올리고뉴클레오티드는 상기에서 기술된 바와 같이 단일-가닥 주형에 어닐링된다. 3가지 데옥시리보뉴클레오티드인, 데옥시리보아데노신(dATP), 데옥시리보구아노신(dGTP), 및 데옥시리보티미딘(dTTP)의 혼합물은 dCTP-(^{*}S)(Amersham Corporation에서 구할 수 있음)라는 변형된 티오데옥시리보시토신과 조합된다. 이 혼합물은 주형-올리고뉴클레오티드 복합체에 추가된다. 이 혼합물에 DNA 중합효소의 추가 시 변경된 염기를 제외하고는 주형과 동일한 DNA의 가닥이 생성된다. 부가하여, 이 새로운 DNA의 가닥은 dCTP 대신 dCTP-(^{*}S)를 함유하게 되며, 이는 제한 엔도뉴클레아제 소화로부터 그것을 보호하는 역할을 한다.

[0116] 이중-가닥 헤테로듀플렉스의 주형 가닥을 적절한 제한 효소로 니킹한 후, 주형 가닥을 ExoIII 뉴클레아제 또는 다른 적절한 뉴클레아제로 소화하여 변경되는 부위(들)를 함유하는 영역을 지나갈 수 있다. 그런 다음 반응을 중단하여 부분적으로만 단일-가닥인 분자를 남긴다. 그런 다음 모든 4개의 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트, ATP 및 DNA 리가제의 존재에서 DNA 중합효소를 사용하여 완전한 이중-가닥 DNA 호모듀플렉스를 형성한다. 그런 다음 이 호모듀플렉스 분자를 대장균 JM101과 같은 적합한 숙주 세포 안으로 형질전환할 수 있다.

[0117] III. 발명의 발현 카세트

[0118] 발현 카세트를 제조하기 위해, 재조합 DNA 서열 또는 세그먼트는 원형 또는 선형, 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있다. 일반적으로, DNA 서열 또는 세그먼트는 플라스미드 DNA 또는 벡터와 같은 키메라 DNA의 형태로 되며 이는 또한 얻어진 형질전환된 세포에 존재하는 재조합 DNA의 발현을 촉진하는 제어 서열에 의해 축적된 코딩 영역을 함유할 수 있다.

[0119] 본원에서 사용되는 "키메라" 벡터 또는 발현 카세트는 적어도 2개의 다른 종으로부터 핵산 서열을 포함하는 벡터 또는 카세트를 의미하거나, 종의 "천연" 또는 야생형에서 발생하지 않는 방식으로 연결 또는 연관된 동일한 종으로부터 핵산 서열을 갖는다.

[0120] RNA 전사체 또는 그 일부에 대한 전사 단위로 작용하는 재조합 DNA 서열 외에도, 재조합 DNA의 일부는 전사되지 않을 수 있으며, 이는 조절 또는 구조적 기능을 제공한다. 예를 들어, 재조합 DNA는 포유류 세포에서 활성인 프로모터를 가질 수 있다.

[0121] 인트론, 인핸서, 폴리아데닐화 서열 등과 같은 숙주 세포에서 기능하는 다른 요소가 또한 재조합 DNA의 일부일 수 있다. 이러한 요소는 DNA의 기능에 필요할 수도 있고 필요하지 않을 수도 있지만, 전사, siRNA의 안정성 등에 영향을 미쳐 DNA의 개선된 발현을 제공할 수 있다. 이러한 요소는 세포에서 siRNA의 최적 수행성을 얻기 위해 원하는 대로 DNA에 포함될 수 있다.

[0122] 제어 서열은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열이다. 예를 들어, 원핵 세포에 적합한 제어 서열에는 프로모터, 및 임의적으로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위가 포함된다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 인핸서를 활용하는 것으로 알려져 있다.

[0123] 작동가능하게 연결된 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있는 핵산이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치된 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열

은 연결된 DNA 서열이 연속적이어야 한다. 그러나, 인헨서는 연속적일 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결찰에 의해 성취된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 기존 관행에 따라 사용된다.

[0124] 세포에 도입되는 재조합 DNA는 선택가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염되거나 감염되도록 하는 세포의 모집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 구체예에서, 선택가능한 마커는 별도의 DNA 조각에 담지되어 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택가능한 마커와 리포터 유전자 둘 모두는 적절한 조절 서열로 축적되어 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 유용한 선택가능한 마커는 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 네오 등과 같은 항생제-내성 유전자를 포함한다.

[0125] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절가능한 서열의 기능성을 평가하는 데 사용된다. 쉽게 검정할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리포터 유전자는 당업계에서 잘 알려져 있다. 일반적으로 리포터 유전자는 수령체 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않고 일부 쉽게 검출가능한 특성, 예를 들어, 효소적 활성에 의해 그 발현이 나타나는 단백질을 인코딩하는 유전자이다. 예를 들어, 리포터 유전자에는 대장균의 Tn9로부터 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 유전자(cat)와 반딧불이 *포티너스 피칼리스*로부터 루시퍼라제 유전자가 포함된다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수령체 세포 안으로 도입된 후 적절한 시간에 검정된다.

[0126] 표적 세포를 형질감염시킬 수 있는 재조합 DNA를 구축하는 일반적인 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고 동일한 조성물 및 구축의 방법을 이용하여 본원에서 유용한 DNA를 생산할 수 있다. 예를 들어, 아래의 Sambrook 및 Russell은 적합한 구축의 방법을 제공한다.

[0127] 재조합 DNA는 특정 세포 안으로 도입에 유용한 임의의 절차, 예를 들어 물리적 또는 생물학적 방법에 의해 siRNA를 인코딩하는 DNA로 구성된 발현 벡터로 형질감염에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유류, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포에 쉽게 도입될 수 있어, 재조합 DNA가 그 계놈 안으로 안정적으로 통합되거나 에피솜 요소로 존재하는 세포를 생성하여 본 발명의 DNA 분자 또는 서열이 숙주 세포에 의해 발현된다. 바람직하게는, DNA는 벡터를 통해 숙주 세포 안으로 도입된다. 숙주 세포는 바람직하게는 진핵생물 기원, 예를 들어 식물, 포유류, 곤충, 효모 또는 균류 공급원이지만, 비-진핵생물 기원의 숙주 세포도 이용될 수 있다.

[0128] 사전선택된 DNA를 숙주 세포 안으로 도입하는 물리적 방법에는 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 폭격, 미세주입, 전기천공 등이 포함된다. 관심 DNA를 숙주 세포 안으로 도입하는 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 바이러스 벡터의 사용이 포함된다. 아래에 기술된 포유류 유전자 요법의 경우, 숙주 계놈 안으로 복제 유전자를 삽입하는 효율적인 수단을 사용하는 것이 바람직하다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 포유류, 예를 들어 인간 세포 안으로 유전자를 삽입하는 데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 폭스바이러스, 단순포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스 등에서 유래될 수 있다.

[0129] 상기에서 논의한 바와 같이, "형질감염된" 또는 "형질도입된" 숙주 세포 또는 세포주는 계놈이 적어도 하나의 이중 또는 재조합 핵산 서열의 존재에 의해 변경되거나 증강된 것이다. 본 발명의 숙주 세포는 전형적으로 안티센스 분자, 플라스미드 발현 벡터에서의 DNA 서열, 바이러스 발현 벡터로 형질감염에 의해, 또는 단리된 선형 DNA 서열로서 생산된다. 형질감염된 DNA는 siRNA를 인코딩하는 서열로 구성된 염색체에 관해 통합된 재조합 DNA 서열이 될 수 있다.

[0130] 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정에는 예를 들어, 당업자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 검정, 예컨대 서던 및 노던 블로팅, RT-PCR 및 PCR; 예를 들어, 면역학적 수단(ELISA 및 Western blot) 또는 발명의 범주 내에 속하는 작용제를 식별하기 위해 본원에 기술된 검정에 의한 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 검정이 포함된다.

[0131] 도입된 재조합 DNA 세그먼트에서 생성된 RNA를 검출하고 정량화하기 위해 RT-PCR이 이용될 수 있다. 이 PCR의 적용에서, 먼저 역전사효소와 같은 효소를 사용하여 RNA를 DNA로 역전사한 다음 기존 PCR 기술을 사용하여 DNA를 증폭할 필요가 있다. 대부분의 경우 PCR 기술은 유용하지만 RNA 생성물의 무결성을 입증하지 못한다. RNA 생성물의 특성에 대한 추가 정보는 노던 블로팅에 의해 얻을 수 있다. 이 기술은 RNA 종의 존재를 입증하고 그 RNA의 무결성에 대한 정보를 제공한다. RNA 종의 존재 또는 부재는 또한 도트 또는 슬롯 블롯 노던 하이브리다이제이션을 사용하여 확인할 수 있다. 이들 기술은 노던 블로팅의 변형이고 RNA 종의 존재 또는 부재만 입증한다.

[0132] 서던 블로팅과 PCR은 문제의 재조합 DNA 세그먼트를 검출하는 데 사용될 수 있지만 사전선택된 DNA 세그먼트가

발현되고 있는지에 대한 정보는 제공하지 않는다. 발현은 도입된 재조합 DNA 서열의 펩티드 생성물을 구체적으로 식별하거나 도입된 재조합 DNA 세그먼트의 숙주 세포에서의 발현에 의해 발생한 표현형 변화를 평가함에 의해 평가될 수 있다.

[0133] 본 발명은 포유류 수령체에서 외인성 핵산 물질을 발현하기 위한 세포 발현 시스템을 제공한다. "유전자 변형 세포"로도 지칭되는 발현 시스템은 외인성 핵산 물질을 발현하기 위한 세포와 발현 벡터를 포함한다. 유전자 변형 세포는 포유류 수령체에서 투여하기에 적합하며, 여기서 그것은 수령체의 내인성 세포를 대체한다. 따라서, 바람직한 유전자 변형 세포는 비-불멸화되고 비-종양형성성이다.

[0134] 한 구체예에 따르면, 세포는 체외에서 형질감염되거나 달리는 유전자 변형된다. 세포는 포유류(바람직하게는 인간)로부터 단리되고, 핵산은 안티센스 분자를 발현하는 치료제를 인코딩하는 이중(예를 들어, 재조합) 유전자를 발현하기 위한 벡터가 도입(즉, 시험관내에서 형질도입 또는 형질감염됨)된 다음, 치료제의 현장에서의 전달을 위해 포유류 수령체에게 투여된다. 포유류 수령체는 인간일 수 있고, 변형되는 세포는 자가 세포이고, 즉, 세포는 포유류 수령체로부터 단리된다.

[0135] 다른 구체예에 따르면, 세포는 생체내에서 형질감염 또는 형질도입되거나 달리는 유전자 변형된다. 포유류 수령체로부터 세포는 안티센스 분자를 발현하는 치료제를 인코딩하는 이중(예를 들어, 재조합) 유전자를 발현하기 위한 외인성 핵산 물질을 함유하는 벡터로 생체내에서 형질도입 또는 형질감염되고, 치료제는 현장에서 전달된다.

[0136] VI. 발명의 발현 카세트를 위한 전달 비히클

[0137] 세포에서 특정 siRNA를 발현하기 위한 특정 발현 벡터의 선택 및 최적화는 아마도 하나 이상의 적절한 제어 영역(예를 들어, 프로모터, 삽입 서열)을 갖는, siRNA의 핵산 서열을 획득하고; siRNA를 인코딩하는 핵산 서열이 삽입되는 벡터를 포함하는 벡터 작제물을 제조하고; 벡터 작제물로 시험관내에서 배양된 세포를 형질감염 또는 형질도입하고; siRNA가 배양된 세포에 존재하는지 여부를 결정함에 의해 달성될 수 있다.

[0138] 세포 유전자 요법을 위한 벡터에는 복제-결핍 바이러스와 같은 바이러스가 포함된다. 예시적인 바이러스 벡터는 하비 육종 바이러스, ROUS 육종 바이러스(MPSV), 몰로니 뮤어라인 백혈병 바이러스 및 DNA 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스)에서 유래된다.

[0139] 복제-결핍 레트로바이러스는 모든 바이러스 단백질의 합성을 지시할 수 있지만 감염성 입자를 만들 수 없다. 따라서, 이들 유전자 변경된 레트로바이러스 발현 벡터는 배양된 세포에서 핵산 서열의 고효율성 형질도입에 대한 일반적인 유용성과 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 특정한 유용성을 갖는다. 이러한 레트로바이러스는 더욱이 생체내에서 세포 안으로 핵산 서열의 효율적인 형질도입을 위한 유용성을 갖는다. 레트로바이러스는 핵산 물질을 세포 안으로 전달하는 데 광범위하게 사용되어 왔다. 유전자 요법에 대해 레트로바이러스를 사용하는 이점은 바이러스가 siRNA를 인코딩하는 핵산 서열을 숙주 세포 게놈 안으로 삽입하여 세포가 분열될 때 siRNA를 인코딩하는 핵산 서열이 세포의 자손에게 계대될 수 있도록 한다는 것이다. LTR 영역에서의 프로모터 서열은 다양한 세포 유형에서 삽입된 코딩 서열의 발현을 증강시키는 것으로 보고되었다. 레트로바이러스 발현 벡터를 사용하는 것의 몇 가지 단점은 (1) 삽입 돌연변이유발, 즉, 예를 들어 조절되지 않는 세포 성장으로 이어지는 siRNA를 인코딩하는 핵산 서열의 표적 세포 게놈에서의 바람직하지 않은 위치 안으로의 삽입, 및 (2) 벡터에 의해 담지된 siRNA를 인코딩하는 핵산 서열이 표적 게놈 안으로 통합되어 지도록 하기 위한 표적 세포 증식에 대한 필요성이다.

[0140] 세포의 형질전환을 위한 발현 벡터로 유용한 또 다른 바이러스 후보는 이중-가닥 DNA 바이러스인 아데노바이러스이다. 아데노바이러스는, 예를 들어 근육 및 내피 세포를 포함한 광범위한 세포 유형에서 감염성이 있다. 아데노바이러스는 또한 생체내 근육 세포에서 발현 벡터로 사용되었다.

[0141] 아데노바이러스(Ad)는 36kb 게놈을 가진 이중-가닥 선형 DNA 바이러스이다. 아데노바이러스의 여러 가지 특징은 이를 생체내 유전자 전달을 용이하게 하는 것과 같이 치료적 적용을 위한 이식유전자 전달 비히클로 유용하게 했다. 재조합 아데노바이러스 벡터는 폐, 뇌, 췌장, 담낭 및 간을 포함한 다양한 장기의 실질 세포에 효율적인 현장 유전자 전달이 가능한 것으로 나타났다. 이는 낭포성 섬유증과 같은 유전성 유전 질환을 치료하는 방법에서 이들 벡터의 사용을 허용하였으며, 여기서 벡터는 표적 장기에 전달될 수 있다. 부가하여, 현장 종양 형질도입을 달성하는 아데노바이러스 벡터의 능력은 비-과증성 질환에 대한 다양한 항암 유전자 요법 방법의 개발을 허용했다. 이들 방법에서 벡터 봉쇄는 종양 세포-특이적 전달을 선호한다.

[0142] 레트로바이러스와 마찬가지로, 아데노바이러스 게놈은 유전자 요법을 위한 발현 벡터로서, 즉 바이러스 자체의

생성을 제어하는 유전적 정보를 제거함에 의해 사용하기에 적합하다. 아데노바이러스는 염색체외 방식으로 기능하기 때문에, 재조합 아데노바이러스는 삽입 돌연변이유발의 이론적 문제를 갖지 않는다.

[0143] 전통적으로 여러 가지 접근방식을 사용하여 재조합 아데노바이러스를 생성했다. 한 가지 접근방식은 관심 있는 핵산 서열을 함유하는 제한 엔도뉴클레아제 단편의 아데노바이러스 게놈의 일부에 대한 직접적인 결찰을 포함한다. 대안적으로, 관심 있는 핵산 서열이 상동 재조합 결과에 의해 결함이 있는 아데노바이러스 안으로 삽입될 수 있다. 원하는 재조합체는 상보성 세포의 빈 공간에서 생성된 개별 플라크를 스크리닝함에 의해 식별된다.

[0144] 대부분의 아데노바이러스 벡터는 관심 있는 핵산 서열을 함유하는 발현 카세트가 초기 영역 1(E1) 또는 초기 영역 3(E3) 대신 도입된 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 골격을 기반으로 한다. E1이 결실된 바이러스는 복제에 결함이 있으며, 인간 상보성 세포(예를 들어, 293 또는 911 세포)에서 증식하여, 결여 유전자 E1 및 pIX를 트랜스로 공급한다.

[0145] 따라서, 당업자에게 명백한 바와 같이, 다양한 적합한 바이러스 발현 벡터가 세포 안으로 외인성 핵산 물질을 전달하기 위해 이용가능하다. 유전자 사일런싱 요법에 적합한 특정 상태에 대한 치료제를 발현하기 위한 적절한 발현 벡터의 선택 및 선택된 발현 벡터를 세포 안으로 삽입하기 위한 조건의 최적화는 과도한 실험을 필요로 하지 않으면서 당업자의 범주 내에 있다.

[0146] 또 다른 구체예에서, 발현 벡터는 플라스미드의 형태로 되며, 이는 다양한 방법인: 물리적, 전기천공, 스크레이프 장입, 미립자 폭격 또는 화학적 복합체(예를 들어, 칼슘 또는 스트론튬 공동-침전, 지질과의 복합체화, 리간드와의 복합체화))로서 세포의 섭취 중 하나에 의해 표적 세포 안으로 전달된다. Lipofectin™(Gibco-BRL, 메릴랜드주 게이트스버그 소재) 및 Transfectam™(ProMega, 위스콘신주 매디슨 소재)을 포함하여 양이온성 리포솜 복합체화를 위한 여러 가지 상업적 제품이 이용가능하다. 그러나, 이들 방법에 의한 형질감염의 효율성은 표적 세포의 특성에 크게 의존하고 따라서 상기-언급된 절차를 사용하여 핵산의 세포 안으로의 최적의 형질감염을 위한 조건이 최적화되어야 한다. 이러한 최적화는 과도한 실험을 필요로 하지 않으면서 당업자의 범주 내에 있다.

[0147] VII. 안티센스 분자를 선택하는 방법

[0148] 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환에서, 유전자의 대립유전자 중 하나는 우성적 부정적 효과를 갖는 돌연변이를 함유한다. 따라서 영향을 받는 대립유전자에 존재하는 이러한 돌연변이를 억제하는 동시에 상기 유전자의 영향을 받지 않는 대립유전자가 발현되도록 하는 것이 바람직하다. 영향을 받는 대립유전자를 선택적으로 억제, 즉 감소시킬 수 있는 적합한 안티센스 분자를 선택하기 위해, 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기된 질환을 앓고 있는 환자로부터 핵산 샘플을 제공한다. 많은 이러한 질환이 알려져 있다. 이러한 질환의 비-제한적인 예로는 결절성 경화증, 유방암, 1형 신경섬유종증, 헌팅턴병, 비대성 심근증, 다낭성 신장 질환, 골형성 부전증, 연골 이형성증, 중심핵 근병증 및 마르판 증후군이 포함된다. 원칙적으로 임의의 이러한 질환은 발명에 따라 선택된 안티센스 분자에 의해 치료될 수 있다. 발명의 방법은 환자의 핵산, 바람직하게는 DNA 샘플을 필요로 한다. 혈액 샘플, 타액, 땀 점막 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는, DNA를 함유하는 환자로부터의 임의의 생물학적 샘플이 사용될 수 있다. 특정 구체예에서 RNA가 사용될 수 있다. DNA는 당업계에 알려진 방법에 따라 상기 샘플로부터 단리될 수 있다. 그 후, 상염색체 우성 돌연변이의 존재는 존재하는 두 대립유전자 모두의 상기 유전자의 핵산 서열을 결정함에 의해 결정된다. 그 후, 대립유전자는 상기 유전자의 대립유전자에서 이형접합체 SNP의 존재에 대해 스크리닝된다. 바람직한 구체예에서 이형접합체 SNP는 동의어 SNP를 선택함에 의해 결정되는데, 동의어 SNP는 가장 높은 소수 대립유전자 빈도(MAF)를 가질 것으로 예상되기 때문이다. 그런 다음 상기 유전자의 상기 SNP의 센스 가닥의 핵산 서열은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 결정된다. 그 후, 상기 유전자에 의해 인코딩된 전사체의 표적 영역과 실질적으로 상보적인 안티센스 핵산 가닥을 포함하는 단리된 안티센스 분자가 선택되며, 여기서 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서 상기 SNP와 적어도 상보적이다.

[0149] 바람직한 구체예에서, 발명의 안티센스 분자를 선택하는 상기 방법은 선택된 안티센스 분자를 세포에서 테스트하여 상기 유전자의 발현의 감소에 대한 효과를 결정하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게는 상기 방법은 상기 유전자의 돌연변이체 및/또는 돌연변이되지 않은 대립유전자의 발현의 감소 효과를 결정하는 것을 포함한다. 바람직하게는 상기 방법은 상기 유전자의 대립유전자 불균형에서의 변화를 결정하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 단계는 환자로부터 세포에서 수행된다.

[0150] 바람직한 구체예에서, 단리된 안티센스 분자는 다음으로부터 선택된다:

[0151] a. 이중 가닥 핵산(dsNA) 또는 이의 화학적으로 변형된 버전, 또는

- [0152] b. 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO).
- [0153] 바람직하게는, 상기 dsNA는 RNA, 더 바람직하게는 짧은 헤어핀(shRNA) 또는 작은 간섭 RNA(siRNA)이다. 바람직하게는, 상기 dsNA는 dsRNA이다.
- [0154] 본원에서 사용되는 용어 siRNA는 15-31개의 염기쌍(bp), 바람직하게는 20-25bp로 구성되고 2개의 RNA 분자를 포함하는 이중 가닥 RNA 분자를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 shRNA는 15-31개의 염기쌍(bp), 바람직하게는 20-25bp로 구성된 부분적으로 이중 가닥 RNA 분자와 단일 가닥 루프를 포함하는 헤어핀 구조를 형성하는 단일 RNA 분자를 지칭한다.
- [0155] 발명에 따른 단리된 안티센스 분자의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 안티센스 핵산 가닥은 길이가 15-30개 뉴클레오타이드의 것이다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 상기 표적 영역에서 적어도 7개, 더 바람직하게는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개 뉴클레오타이드와 상보적이다. 일부 구체예에서 안티센스 핵산 가닥과 표적 영역 사이에 하나 또는 두 개의 불일치가 있을 수 있다. 바람직하게는, 상기 안티센스 핵산 가닥은 적어도 7개, 더 바람직하게는 8, 9, 10, 11 또는 12개 연속된 뉴클레오타이드와 상보적이다. 바람직하게는, 상기 표적 영역은 상기 표적 영역에서 적어도 15, 16, 17, 18 또는 19개 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0156] 발명에 따른 단리된 이중 가닥 핵산(dsNA)의 바람직한 구체예에서, dsNA는 길이가 15-30개 뉴클레오타이드의 센스 핵산 가닥을 포함하고; 센스 핵산 가닥은 상기 안티센스 핵산 가닥과 상보적이고, 센스 및 안티센스 핵산 가닥은 듀플렉스 영역을 형성한다. 바람직하게는, 상기 dsNA는 5' 말단과 3' 말단을 갖는 15 내지 30개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 19개 뉴클레오타이드 길이의 RNA의 안티센스 핵산 가닥을 함유하는 shRNA이며, 여기서 안티센스 핵산 가닥은 바람직하게는 상기 표적 영역의 적어도 15개 뉴클레오타이드와 상보적이고, 바람직하게는 RNA의 센스 가닥의 5' 말단은 G 뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결되어 RNA의 첫 번째 세그먼트, 및 5' 말단과 3' 말단을 갖는 15 내지 30개 뉴클레오타이드 길이의 RNA의 센스 가닥을 형성하며, 여기서 바람직하게는 안티센스 및 센스 가닥의 적어도 12개 뉴클레오타이드는 서로 상보적이고 바람직하게는 생리적 조건 하에서 작은 간섭 RNA(siRNA) 듀플렉스를 형성한다.
- [0157] 바람직하게는, 안티센스 가닥과 센스 가닥은 RNA 루프 가닥의 수단에 의해 작동가능하게 연결되어 듀플렉스 구조와 루프 구조를 포함하는 헤어핀 구조를 형성한다. 바람직하게는, 루프 구조는 바람직하게는 4 내지 13개, 더 바람직하게는 4 내지 10개 뉴클레오타이드를 포함한다. 구체예에서, 상기 루프 구조는 4, 5 또는 6개 뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는 상기 루프는 서열 UCAAGAC를 함유한다.
- [0158] RNA의 두 가닥에 의해 형성된 듀플렉스는 길이가 15 내지 25개 염기쌍, 바람직하게는 길이가 19개 염기쌍일 수 있다. 안티센스 가닥은 바람직하게는 길이가 19개 뉴클레오타이드이다. 센스 가닥은 바람직하게는 길이가 19개 뉴클레오타이드이다. shRNA는 추가로 오버행 영역을 함유할 수 있다. 이러한 오버행은 3' 오버행 영역 또는 5' 오버행 영역일 수 있다. 오버행 영역은 예를 들어 길이가 1 내지 6개 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0159] 발명은 발명의 단리된 안티센스 분자를 인코딩하는 핵산을 추가로 제공한다. 바람직한 구체예에서, 발명의 상기 shRNA는 다음의 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드에 의해 인코딩된다: 전방향 5'-CCGGAA-19 bp 센스 가닥-TCAAGAC-19bp 안티센스 가닥-TTTTTT-3' 및/또는 역방향 5'-AATTCAAAAA-19bp 센스 가닥-GTCTTGA-19bp 안티센스 가닥-TT-3'. 본원에서 센스 가닥은 mRNA에서의 표적화된 서열과 동일한 서열을 갖고 안티센스 가닥은 최종적으로 mRNA에 결합하여 그 분해 및/또는 억제에 유도하는 그 역방향 상보성 서열을 갖는다.
- [0160] 바람직하게는, 상기 유전자는 LMNA, 칼륨 전압-게이팅된 채널 서브패밀리 Q 멤버 1(KCNQ1), 신경섬유종 1(NF1), 피브릴린 1(FBN1), 유방암 유전자 1(BRCA1), BRCA2, 결절성 경화증 복합체 1(TSC1) 및 TSC2 유전자로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 SNP는 rs1057128, rs8234 및 rs17215465로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 질환은 심부전, 결절성 경화증, 유방암, 1형 신경섬유종증, 헌팅턴병, 비대성 심근증, 다낭성 신장 질환, 골형성 부전증, 연골 이형성증, 중심핵 근병증 및 마르판 증후군이다. 바람직하게는, 상기 심부전은 박충병, 바람직하게는 확장형 심근증이다.
- [0161] 발명은 이제 다음의 비-제한적인 실시예에 의해 예시될 것이다.
- [0162] **실시예**
- [0163] **실시예 1**

- [0164] **재료 및 방법**
- [0165] **인간 iPSC 배양**
- [0166] LMNA H222P 돌연변이를 담지하는 남성 환자로부터 유래된 LMNA H222P SV1122 hiPSC 세포주는 독일 함부르크에서 생성되었다. UN1-22 세포주는 건강한 남성으로부터 유래되었고 전체 특성은 이전에 공개되었다(Shinnawi, 2015 Stem Cell Reports 2015;5:582-596.). 두 세포주 모두는 LMNA에 위치한 SNP rs4641에 대해 이형접합자이다. 본 발명자들은 1:500 희석된 성장 인자 감소된 Matrigel(Corning; FAL356231)로 코팅된 플레이트 상에서 mTeSR-1(StemCell Technologies; 85850)에서 두 hiPSC 세포주 모두의 콜로니를 배양했다. 본 발명자들은 0.5mM EDTA(Invitrogen; 15575-038)로 해리를 통해 4-6일마다 세포를 계대시키고, 2 μ M 티아조비딘(Selleck Chemicals; S1459)이 보충된 mTeSR-1에 이를 재도말했다. 계대 사이에 본 발명자들은 계대한 후 첫날을 제외하고 매일 mTeSR-1 배지를 교체했다.
- [0167] **hiPSC의 심장 분화**
- [0168] 본 발명자들은 이전에 공개된 프로토콜을 약간 각색하여 심장 분화를 수행했다(Burridge, 2014 Nat Methods 2014;11:855-860). 본 발명자들은 6 μ M CHIR99021(Stemgent; 04-0004-10)이 보충된 CDM3 배지(RPMI 1640, Gibco 21875; 500 μ g/ml 인간 혈청 알부민, Sigma A9731; 213 μ g/ml L-아스코르브산 2 인산염, Sigma A8960; 1% 페니실린/스트렙토마이신)로 2일 동안 변경하고, 이어 2 μ M Wnt-C59(Selleck Chemicals; S7037)를 갖는 CDM3으로 2일 동안 변경하여 계대 3-5일 후에 분화를 유도했다. 4일차에서 10일차까지 본 발명자들은 RPMI/B27 배지(RPMI-1640, 2% B27 보충물 마이너스 인슐린(Gibco; A1895601), 1% 페니실린/스트렙토마이신)로 격일로 배지를 교체했다. 8일차 이후로부터 자발적 수축이 식별될 수 있었다. 10일차 이후로부터는 본 발명자들은 hiPSC-CM에 대해 적어도 2주 동안 1M HEPES-용액에 용해된 20mM 젖산나트륨(Sigma-Aldrich; L7022)이 보충된, 글루코스가 없는 CDM3 배지(글루코스가 없는 RPMI-1640, Gibco; 11879)로 매주 한 번씩 배지를 교체하여 심근세포를 대사적으로 선택했다. 선택 후, 본 발명자들은 일주일에 한 번씩 CDM3 배지에 글루코스를 넣어 배지를 교체했다.
- [0169] 본 발명자들은 TrypLE Express(Gibco; 12604) 인큐베이션에 의해 15분 동안 정제된 심근세포의 모집단을 해리시키고, 이를 추가 실험을 위해 2 μ M 티아조비딘을 갖는 RPMI/B27에서 매트릭셀 코팅된 플레이트 상에 도말했다. 본 발명자들은 분화 시작 40-60일 후에 hiPSC-CM에서 모든 실험을 수행했고, 다른 분화로부터의 hiPSC-CM으로 2 내지 4회의 독립적인 실험에서 각 관찰을 복제했다.
- [0170] **플라스미드 생성**
- [0171] shRNA 발현을 위해 본 발명자들은 pLKO.1 골격을 선택 마커로 푸로마이신(pLKO.1 puro; Addgene; 8453)과 함께 사용했다. shRNA 서열의 클로닝하기 위해 본 발명자들은 다음의 올리고뉴클레오타이드를 설계했다: 전방향 5'-CCGGAA-19 bp 센스가닥-TCAAGAC-19bp 안티센스 가닥-TTTTTTTG-3' 및 역방향 5'-AATTCAAAAAA-19bp 센스 가닥-GTCTTGA-19bp 안티센스 가닥-TT-3'. 여기서 센스 가닥은 정확히 mRNA 표적화 서열이고 안티센스 가닥은 최종적으로 mRNA에 결합할 그 역방향 상보성 서열이다. 본 발명자들은 Huang 등(2014)에 따라 shRNA 서열을 설계했다. 본 발명자들은 이들 올리고뉴클레오타이드 1nmol을 어닐링하여 이를 pLKO.1-puro 플라스미드에서 AgeI 및 EcoRI 제한 부위 안으로 클로닝했다. ShRNA 서열은 표 1에 자세히 나타나 있다. 본 발명자들은 Sanger 서열분석에 의해 모든 플라스미드 서열을 검증하고 돌연변이를 함유하는 플라스미드를 제외했다.
- [0172] **바이러스 생산**
- [0173] pLKO.1-puro 기반 작제물의 3-세대 렌티바이러스를 생산하기 위해 본 발명자들은 4×10^6 HEK293T 세포에 4 μ g의 발현 플라스미드, 2.7 μ g pMDLg/pRRE, 1 μ g pRSV-Rev, 1.4 μ g pVSVG를 Genejammer(Agilent; 204130)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 공동-형질감염시켰다. 다음 날 본 발명자들은 HEK293T 배지를 CDM3 배지로 교체했다. 본 발명자들은 이전 변경 24시간 후에 생산된 렌티바이러스를 함유하는 이 배지를 수집하여 hiPSC-CM 형질도입에 그것을 직접적으로 사용했다.
- [0174] **HiPSC-CM 감염**
- [0175] 본 발명자들은 렌티바이러스 형질도입 2 내지 4일 전에 hiPSC-CM을 해리하여 조건 간에 균일한 세포 모집단을 확보했다. 본 발명자들은 hiPSC-CM에 바이러스를 갖는 배지의 6-웰 플레이트에서 2ml/웰을 신선하게 첨가했다. 24시간 후에 본 발명자들은 바이러스를 함유하는 배지를 제거하고 신선한 CDM3 배지로 대체했다. 5일 후에 본 발명자들은 배지를 교체하고 48시간 동안 CDM3 배지에 8 μ g/ml 푸로마이신으로 푸로마이신 선택을 시작했다. 본

발명자들은 푸로마이신 선택 후 세포를 수확했다.

[0176] RNA 분리

[0177] 본 발명자들은 1ml TriReagent(Sigma Aldrich; T9424)를 사용하여 모든 샘플에서 총 RNA를 분리했다. 본 발명자들은 접시 상에서 성장하는 살아있는 세포에 TriReagent를 직접적으로 첨가했다. 본 발명자들은 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA 분리를 수행했다.

[0178] mRNA에 대한 대립유전자-특이적 qRT-PCR

[0179] 각 LMNA 대립유전자의 mRNA 발현을 검출하기 위해, 250ng 내지 1 μ g RNA는 DNaseI 증폭 등급(Invitrogen; 18068015)으로 DNase 처리하였고 올리고-dT 및 랜덤 헥사머 프라이머로 제조업체의 프로토콜에 따라 Superscript II 역전사효소(Invitrogen; 18064014)를 사용하여 역전사하였다. cDNA를 5배 희석하고 2 μ l를 qPCR을 위한 입력으로 사용했다.

[0180] qPCR은 1 μ M 프라이머(표 2)와 LightCycler 480SYBR Green master 1(Roche; 04887352001)을 사용하여 LightCycler 480 system II(Roche) 상에서 다음 사이클링 프로그램을 사용하여 수행했다: 95 $^{\circ}$ C에서 5분 사전-인큐베이션; 95 $^{\circ}$ C에서 10초 변성, 20초 어닐링(표 2에서의 온도), 72 $^{\circ}$ C에서 20초 연장의 40회 주기. 데이터는 LinRegPCR 정량적 PCR 분석 소프트웨어(Ruijter, 2009)를 사용하여 분석했으며 이 소프트웨어에 의해 추정된 전 사체의 시작 농도는 3가지 참조 유전자인 GAPDH, HPRT 및 TBP의 추정된 시작 농도의 기하 평균에 대해 보정했다.

[0181] 표 1. shRNA 표적화 서열

표적	shRNA 수	불일치 위치	센스 가닥 (5'-3')	안티센스 가닥 (3'-5')
음성 대조군	178	-	GAAATGTACTGCGTGGAGA 서열번호:9	TCTCCACGCAGTACATTTC 서열번호:10
C 대립유전자 LMNC	209	C10	TCACCACCACGTGAGTGGT 서열번호:11	ACCACTCACGTGGTGGTGA 서열번호:12
	210	C11	CACCACCACGTGAGTGGTA 서열번호:13	TACCACTCACGTGGTGGTG 서열번호:14
	211	C12	ACCACCACGTGAGTGGTAG 서열번호:15	CTACCACTCACGTGGTGGT 서열번호:16
	212	C13	CCACCACGTGAGTGGTAGC 서열번호:17	GCTACCACTCACGTGGTGG 서열번호:18
T 대립유전자 LMNC	213	T9	ATCACCACCATGTGAGTGG 서열번호:19	CCACTCACATGGTGGTGA 서열번호:20
	214	T10	TCACCACCATGTGAGTGGT 서열번호:21	ACCACTCACATGGTGGTGA 서열번호:22
	215	T11	CACCACCATGTGAGTGGTA 서열번호:23	TACCACTCACATGGTGGTG 서열번호:24
	216	T12	ACCACCATGTGAGTGGTAG 서열번호:25	CTACCACTCACATGGTGGT 서열번호:26
	217	T14	CACCATGTGAGTGGTAGCC 서열번호:27	GGCTACCACTCACATGGTG 서열번호:28
C 대립유전자 LMNA	230	C10	TCACCACCACGGCTCCAC 서열번호:29	GTGGGAGCCGTGGTGGTGA 서열번호:30
	231	C11	CACCACCACGGCTCCCACT 서열번호:31	AGTGGGAGCCGTGGTGGTG 서열번호:32
	232	C12	ACCACCACGGCTCCCACTG 서열번호:33	CAGTGGGAGCCGTGGTGGT 서열번호:34
	233	C13	CCACCACGGCTCCCACTGC 서열번호:35	GCAGTGGGAGCCGTGGTGG 서열번호:36
	234	C14	CACCACGGCTCCCACTGCA 서열번호:37	TGCAGTGGGAGCCGTGGTG 서열번호:38
	235	C17	CACGGCTCCCACTGCAGCA 서열번호:39	TGCTGCAGTGGGAGCCGTG 서열번호:40
T 대립유전자 LMNA	236	T9	ATCACCACCATGGTCCCA 서열번호:41	TGGGAGCCATGGTGGTGA 서열번호:42
	237	T10	TCACCACCATGGTCCCACT 서열번호:43	GTGGGAGCCATGGTGGTGA 서열번호:44
	238	T11	CACCACCATGGTCCCACT 서열번호:45	AGTGGGAGCCATGGTGGTG 서열번호:46
	239	T12	ACCACCATGGTCCCACTG 서열번호:47	CAGTGGGAGCCATGGTGGT 서열번호:48
	240	T14	CACCATGGTCCCACTGCA 서열번호:49	TGCAGTGGGAGCCATGGTG 서열번호:50
	241	T17	CATGGCTCCCACTGCAGCA 서열번호:51	TGCTGCAGTGGGAGCCATG 서열번호:52

표 2. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열

표적 (mRNA)	전방향 프라이머 (5'-3')	역방향 프라이머 (5'-3')	어닐링 온도
C 대립유전자 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACCAC 서열번호:53	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 서열번호:54	66
T 대립유전자 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACCAT 서열번호:55	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 서열번호:56	66
총 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACC 서열번호:57	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 서열번호:58	66
C 대립유전자 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACCAC 서열번호:59	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 서열번호:60	66
T 대립유전자 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACCAT 서열번호:61	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 서열번호:62	66
총 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACC 서열번호:63	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 서열번호:64	66
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC 서열번호:65	ACCCTGTTGCTGTAGCCAAATT 서열번호:66	60
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA 서열번호:67	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT 서열번호:68	60
TEP	GCTCACCACCAACAATTTAG 서열번호:69	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG 서열번호:70	60

결과

인과적 돌연변이와 무관하게 공통 변이체를 표적화하는 대립유전자-특이적 siRNA에 의해 돌연변이체 대립유전자를 사일런싱시킨다는 본 발명자들의 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 본 발명자들의 2개 인간 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC) 세포주에서 LMNA에서의 공통 변이체를 검색했다. LMNA에는 3개의 알려진 공통 단일-뉴클레오티드 다형성(SNP)이 존재하는데, 즉 rs538089, rs505058 및 rs4641이 각각 21.8%, 20.4% 및 32.8%의 이형접합성으로 존재한다. 본 발명자들은 본 발명자들의 hiPSC 세포주에서 유래된 게놈 DNA를 사용하여 이들 3개의 SNP를 함유하는 3개의 PCR 앰플리콘을 서열분석했고, 두 hiPSC 세포주 모두 SNP rs4641(C/T)의 이형접합체 담체이고 다른 변이체를 담지하지 않다는 것을 발견했다. 이 이유로, 본 발명자들은 LMNA에서 표적화가능한 변이체로 SNP rs4641을 선택했다.

SNP rs4641은 LMNA에서 유래된 두 mRNA 이소폼, 즉 라민 A와 라민 C의 마지막 공유된 뉴클레오티드이다. 두 이소폼 모두는 처음 566개 아미노산을 공유하지만, 엑손 10 이후의 대체 스플라이싱이 다르기 때문에 라민 A는 엑손 11과 12로 계속되는 반면 라민 C는 엑손 10B로 계속된다. SNP rs4641은 두 이소폼의 마지막 공유된 뉴클레오티드이므로 본 발명자들은 이소폼 특이적 siRNA를 설계할 필요가 있었다. 더욱이 LMNA 돌연변이는 SNP의 두 대립유전자(C 또는 T 대립유전자) 상에 위치할 수 있으며, 이는 본 발명자들이 라민 A와 라민 C 이소폼 둘 모두 상에서 두 SNP 대립유전자에 대한 siRNA를 필요로 한다는 것을 의미한다. siRNA의 설계에 대한 문헌과 얻어진 지식을 바탕으로 본 발명자들은 각 이소폼의 각 대립유전자에 대한 작제물을 설계했다(도 1 참조). 본 발명자들은 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)를 사용하여 유전자 요법을 통해 본 발명자들의 작제물을 전달하고자 하기 때문에, 본 발명자들은 인간 유도된 다능성 줄기 세포 유래된 심근세포(hiPSC-CM)에서 shRNA의 효과를 즉시 테스트하기 위해 본 발명자들의 실험에서 shRNA를 사용했다.

라민 C를 하향조절하는 shRNA의 대립유전자-특이적 효과는 관찰되지 않음

먼저, 본 발명자들은 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 C의 C 대립유전자를 표적화하는 본 발명자들의 shRNA를 테스트하기 시작했다. 예상대로, 본 발명자들은 라민 A 이소폼의 C 또는 T 대립유전자의 하향조절은 관찰하지 않았으며, 이는 라민 C의 C 대립유전자에 대한 본 발명자들의 설계된 shRNA가 이소폼 특이적임을 나타낸다(도 2, 패널 A). 본 발명자들은 shRNA C11에 의한 라민 C의 C 대립유전자의 하향조절을 관찰했다(도 2, 패널 B). 그러나, 본 발명자들은 또한 이 shRNA에 의한 라민 C의 T 대립유전자의 하향조절을 관찰했으며, 이는 이 shRNA가 대립유전자-특이적이지 않음을 나타낸다. 다른 모든 테스트된 shRNA는 임의의 하향조절을 보이지 않았다(도 2, 패널 B).

다음으로, 본 발명자들은 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 C의 T 대립유전자를 표적화하는 본 발명자들의 shRNA를 테스트하기 위해 이동했다. 또한 이들 shRNA는 라민 A 이소폼의 하향조절이 관찰되지 않았기 때문에 이소폼 특이적이다(도 2, 패널 C). 본 발명자들은 shRNA T14에 의한 라민 C의 T 대립유전자의 하향조절을 관찰했다(도 2, 패널 D). 그러나, 이 효과는 라민 C의 C 대립유전자에서 동일한 양의 하향조절이 관찰되었기 때문에 대립유전자-특이적이지 않다. 다른 모든 테스트된 shRNA는 임의의 하향조절을 보이지 않았다(도 2, 패널 D).

결론적으로, C 대립유전자나 T 대립유전자를 표적화하는 본 발명자들의 설계된 shRNA 중 어느 것도 라민 C의 대

립유전자-특이적 하향조절을 보이지 않았다.

[0192] *shRNA C17 및 T17은 라민 A의 이소폼 및 대립유전자-특이적 하향조절을 제공한다*

[0193] 다음으로, 본 발명자들은 라민 A의 C 대립유전자를 표적화하는 것으로 시작하는, 라민 A 이소폼의 대립유전자를 표적화하는 shRNA를 테스트했다. 본 발명자들은 LMNA H222P hiPSC-CM에서 라민 A의 표적화된 C 대립유전자의 40%의 shRNA C17에 의한 하향조절을 관찰했다(도 3, 패널 A). 더욱이, 본 발명자들은 라민 A의 T 대립유전자의 하향조절을 관찰하지 못했기 때문에 이 효과는 대립유전자-특이적이다. 나아가, shRNA C17은 임의의 라민 C 대립유전자의 하향조절을 보이지 않았기 때문에 대립유전자-특이적 효과도 이소폼 특이적이다(도 3, 패널 B). 다른 모든 테스트된 shRNA는 라민 A 또는 라민 C 하향조절을 보이지 않았다. 그 후, 본 발명자들은 건강한 hiPSC-CM에서 동일한 shRNA를 테스트했다. 본 발명자들은 라민 A의 표적화된 C 대립유전자의 50%의 이제 훨씬 더 높은 하향조절을 갖는 shRNA C17의 동일한 효과를 관찰했다(도 3, 패널 C 및 D). 그러나, 본 발명자들은 이제 라민 A의 T 대립유전자에 대한 약간의 효과도 관찰했다.

[0194] 마지막으로, 본 발명자들은 라민 A의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA를 테스트했다. 본 발명자들은 LMNA H222P hiPSC-CM에서 shRNA T17에 의해 얻은 53%의 하향조절을 관찰했다(도 4, 패널 A). 더 중요한 것은, 이 관찰된 효과는 대립유전자-특이적이고 이소폼 특이적이다(도 4, 패널 B). 테스트된 다른 shRNA는 하향조절을 보이지 않았다. 이전과 마찬가지로, 본 발명자들은 건강한 hiPSC-CM에서 동일한 shRNA를 테스트했다. 유사하게, shRNA T17은 55%의 이소폼 및 대립유전자-특이적 하향조절을 보였다(도 4, 패널 C 및 D).

[0195] 결론적으로, 본 발명자들은 2개의 다른 hiPSC-CM 세포주에서 대략 50% 효율로 라민 A의 SNP rs4641의 C 또는 T 대립유전자를 이소폼 및 대립유전자-특이적으로 하향조절하는 2개의 shRNA를 발견했다.

[0196] *shRNA T17로 돌연변이체 H222P 대립유전자의 하향조절은 핵의 둥글기를 개선한다*

[0197] shRNA C17 및 T17에 의한 C 대립유전자 또는 T 대립유전자의 하향조절이 핵의 표현형에 미치는 영향을 평가하기 위해, 본 발명자들은 H222P hiPSC-CM을 음성 대조군 shRNA, shRNA C17(C 대립유전자의 하향조절) 및 shRNA T17(T 대립유전자의 하향조절)로 처리했다. H222P-세포주의 cDNA 상의 돌연변이와 SNP 둘 모두를 둘러싼 LMNA PCR 생성물의 플라스미드 클로닝과 박테리아 클론의 Sanger 서열분석은 이형접합체 H222P 돌연변이가 rs4641의 T 대립유전자와 동일한 대립유전자 상에 위치된다는 것을 밝혔다. 따라서, H222P hiPSC-CM에서 rs4641 C 대립유전자의 하향조절은 야생형 대립유전자의 하향조절을 초래하여 표현형을 증대할 것으로 예상되는 반면 rs4641 T 대립유전자의 하향조절은 돌연변이체 대립유전자를 하향조절하고 표현형을 완화할 것으로 예상된다.

[0198] LMNA는 핵막에 대한 지지를 제공하는 핵 판을 인코딩하기 때문에 LMNA는 핵의 아키텍처에 중요하다. 따라서, 핵의 형상은 특정 돌연변이에 의해 세포가 얼마나 심각하게 영향을 받는지의 측정이다. 본 발명자들은 야생형 또는 돌연변이체 대립유전자의 shRNA-기반 하향조절이 세포의 핵의 둥글기에 미치는 영향을 평가했다. 본 발명자들은 음성 대조군과 비교하여 2가지 다른 조건으로 처리 후 핵의 둥글기를 측정했다. 본 발명자들은 야생형 대립유전자의 하향조절 후 핵의 둥글기의 감소를 관찰하지 못했다. 그러나, 치료적으로 훨씬 더 흥미로운 점은 rs4641 T 대립유전자와 이에 의한 돌연변이체 대립유전자의 하향조절이 핵의 둥글기를 유의하게 개선했다는 것이다($p < 0.001$). 도 5를 참조한다. 따라서, T 대립유전자의 하향조절과 이에 의해 shRNA T17에 의한 H222P 돌연변이체 대립유전자를 하향조절하는 것은 LMNA H222P hiPSC-CM에서 핵의 둥글기의 개선을 초래하며, 이는 이들 LMNA H222P hiPSC-CM이 SNP rs4641의 shRNA-표적화에 의한 돌연변이체 대립유전자의 하향조절 후 돌연변이에 의해 거의 심하게 영향을 받지 않았다는 것을 나타낸다.

[0199] **실시예 2**

[0200] 재료 및 방법

[0201] 다음 추가사항이 있는 실시예 1을 참조한다.

[0202] hiPSC의 심장 분화는 기술된 대로 수행되었거나, 0일차에 3ml CDM3 배지에 6 microM CHIR99021, 1일차에 2ml CDM3 배지의 추가, 2일차에 또 다른 1ml CDM3 배지의 추가, 및 3일차에 CDM3에 2 microM WNT-C59로 구성되는 CHIR-회색 프로토콜에 따라 수행되었다. 4일차 또는 5일차(회색 없음 대 회색 프로토콜)부터 10일차까지, 본 발명자들은 RPMI/B27 배지(RPMI-1640, 2% B27 보충물 마이너스 인슐린(Gibco; A1895601), 1% 페니실린/스트렙토마이신)로 격일로 배지를 교체했다.

[0203] 심근세포는 TrypLE Express(Gibco; 12604) 인큐베이션에 의해 15 내지 45분 동안 해리되었고, 그 후 추가 실험

을 위해 2 μ M 티아조비딘을 갖는 RPMI/B27에서 매트릭셀-코팅된 플레이트 상에 도말되었다

[0204] 플라스미드 생성을 위해, 본 발명자들은 Huang 등(2014)에 따라 shRNA 서열을 설계하고 miRNA의 그 표적과의 알려진 상호작용 영역 및 원래 shRNA 선택의 결과에 기반하여 불일치를 추가했다. qRT-PCR에 사용된 추가 shRNA 표적화 서열과 프라이머 서열은 각각 표 3과 표 4에 포함되어 있다.

[0205] 결과

[0206] *대립유전자-특이적 표적화를 위한 SNP 식별*

[0207] 일반적인 SNP를 표적화함에 의한 LMNA의 대립유전자-특이적 하향조절을 허용하기 위해, 본 발명자들은 동의어 SNP에 대해 LMNA의 코딩 영역을 검색했는데, 이는 이들이 가장 높은 소수 대립유전자 빈도(MAF)를 가질 것으로 예상되기 때문이다. 결과적으로, 가장 많은 수의 환자가 이들 SNP에 대해 이형접합체일 것이고, 이는 대립유전자-특이적 표적화를 허용한다. 이 검색은 게놈 집계 데이터베이스(gnomAD) 모집단에서 각각 18, 24 및 21%의 MAF를 가진 LMNA에서 3개의 동의어 SNP(rs538089, rs505058 및 rs4641)를 밝혀냈다. 이들 MAF는 하디-와인버그 평형에 따르면 환자의 29%가 SNP rs538089에 대해 이형접합체이고, 36%가 rs505058에 대해 이형접합체이고, 33%가 SNP rs4641에 대해 이형접합체여야 함을 나타낸다. 이는 이들 각각의 SNP를 표적화하는 것은 질환을 야기하는 돌연변이와 무관하게 유사한 양의 LMNA 환자를 치료할 수 있음을 의미한다. 본 발명자들은 암스테르담 UMC 외래 진료소에서 LMNA 돌연변이체 보유자 8명과 LMNA에서 H222P 돌연변이가 있는 hiPSC-세포주를 이들 SNP에 대한 이형접합성에 대해 스크리닝하였으며, 이는 5명의 환자와 hiPSC-세포주가 rs4641에 대해 이형접합체이고 rs538089 또는 rs505058에 대해 이형접합성이 없는 것을 밝혔다. 따라서, 본 발명자들은 SNP rs4641에 본 발명자들의 대립유전자-특이적 shRNA 접근방식을 집중했다.

[0208] *LMNA 및 LMNC에서 rs4641의 두 대립유전자 모두에 대한 대립유전자-특이적 shRNA의 설계*

[0209] LMNA 유전자는 처음 566개 아미노산을 인코딩하는 서열을 공유하는 2개의 mRNA 스플라이스 이소폼인, LMNA와 LMNC를 인코딩한다. 엑손 10에서 대체 스플라이싱은 2개 이소폼의 C-말단에서 그 사이의 차이를 초래하며, 여기서 LMNC 이소폼은 스플라이싱되지 않고 엑손 10의 말단에서 종결되는 반면 LMNA 이소폼은 엑손 10의 중앙에서의 스플라이스 부위를 사용하여 엑손 11과 12 쪽으로 스플라이싱한다(도 1 및 6). SNP rs4641은 두 이소폼 사이에 공유되는 마지막 뉴클레오티드에 위치된다. 이는 두 대립유전자 모두를 구별하는 뉴클레오티드가 siRNA의 중앙에 위치될 때 가장 높은 대립유전자-특이성이 얻진다는 것을 보여준 Huang 등(Huang 등, 2009. Nucleic Acids Res 37: 7560-7569)의 데이터와 조합하여, 본 발명자들이 LMNA와 LMNC 둘 모두를 별도로 표적화하는 대립유전자-특이적 siRNA를 설계해야 할 필요가 있음을 나타낸다. 더욱이, SNP의 T 대립유전자와 C 대립유전자 둘 모두가 서로 다른 환자의 돌연변이체 대립유전자 상에 존재할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 SNP rs4641의 두 대립유전자 모두를 표적화하는 siRNA를 설계해야 할 필요가 있다. Huang 등의 데이터를 기반으로, 본 발명자들은 10, 11, 12, 13, 14 및 17 위치에서 비-표적화된 T 대립유전자에 불일치를 갖는 LMNA의 C 대립유전자를 표적화하는 것으로 예측되는 6개 siRNA; 및 9, 10, 11, 12, 14 및 17 위치에서 비-표적화된 C 대립유전자에 불일치를 갖는 LMNA의 T 대립유전자를 표적화하는 것으로 예측되는 6개 siRNA를 선택했다(도 6). 비슷한 접근 방식을 사용하여 본 발명자들은 10, 11, 12, 13 및 17 위치에서 비-표적화된 T 대립유전자에 불일치를 갖는 LMNC의 C 대립유전자를 표적화하는 것으로 예측되는 5개 siRNA; 및 9, 10, 11, 12, 14, 16, 및 17 위치에서 비-표적화된 C 대립유전자에 불일치를 갖는 LMNC의 T 대립유전자를 표적화하는 것으로 예측되는 7개 siRNA를 선택했다(도 6). 본 발명자들은 바이러스 매개된 shRNA 발현을 통해 이들 siRNA의 치료적 전달을 계획하기 때문에, 본 발명자들은 또한 도 7에 묘사된 설계에 따라 이들 siRNA를 시험관내에서 바이러스 shRNA 작제물로 발현시켰다.

[0210] *LMNA 이소폼에서 rs4641의 대립유전자-특이적 표적화*

[0211] shRNA를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 H222P hiPSC-세포주에서 유래된 심근세포를 렌티바이러스로 형질도입했다. 이 세포주는 골격근과 심장근 둘 모두에 영향을 미치는 에메리-드레이푸스-근이영양증 표현형을 가진 남성 환자로부터 유래되었다(Bonne 등, 2000. Ann Neurol 48: 170-80). 렌티바이러스 shRNA 형질도입 후, 본 발명자들은 대립유전자-특이적 qRT-PCR에 의해 돌연변이체 및 야생형 LMNA 대립유전자의 발현 수준을 스크램블된 음성 대조군 shRNA(Scr)로 형질도입된 세포의 발현 수준과 비교했다. 야생형 LMNA 대립유전자 상의 이 H222P hiPSC-세포주에 있는 LMNA 스플라이스 이소폼에서 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 것은 야생형 LMNA 대립유전자를 거의 50%까지 하향조절하고 비-표적화된 돌연변이체 대립유전자는 단 10%만 하향조절하는 하나의 shRNA인 shC17을 밝혀냈다(도 8a). H222P 돌연변이를 포함한 LMNA에서의 대부분 돌연변이는 우성-음성 작용 모드를 가지고 있기 때문에, 돌연변이된 대립유전자가 야생형 대립유전자의 기능을 방해하여 야생형과 그러한 돌

연변이된 대립유전자 간의 대립유전자 균형이 질환의 심각성을 결정한다는 것을 의미한다. 따라서 본 발명자들은 또한 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 것이 두 LMNA 대립유전자 간의 대립유전자 균형에 어느 정도 영향을 미치는지를 조사했다(도 8b). 이것은 SCR 음성 대조군 세포에서의 이 실험에서 두 대립유전자의 거의 동일한 발현(52:48%)을 밝혀냈고, 이는 shC17에 의해 형질도입된 세포에서는 표적화된 야생형 LMNA 대립유전자의 상대적 저발현(40:60%)으로 전환되었다. 놀랍게도 다른 shRNA는 임의의 LMNA 대립유전자를 하향조절하지 않았지만, 대신 야생형과 돌연변이체 LMNA 대립유전자 둘 모두의 상향조절을 초래했다. 비록 본 발명자들은 이들 shRNA에 의한 LMNA 스플라이스 이소폼만 표적화하고 있지만 본 발명자들은 또한 LMNC에서 대립유전자-특이적 qRT-PCR을 수행했는데, 이는 임의의 LMNC 대립유전자의 하향조절을 나타내지 않았고 따라서 또한 돌연변이체와 야생형 LMNC 이소폼 간의 균형에 큰 영향도 나타내지 않았다(도 8c/d).

[0212] 이전 연구에서는 shRNA의 시드 영역이나 아르고너트 인식 영역에 추가 불일치의 도입은 표적화된 대립유전자와 비-표적화된 대립유전자 간의 구별을 향상시킬 수 있다고 제안했다. 본 발명자들은 LMNA에 대해 shC17에 의한 LMNA 스플라이스 이소폼의 rs4641의 비-표적화된 T 대립유전자의 10% 녹다운을 가졌기 때문에, 본 발명자들은 이 표적화를 더욱 줄이기 위해 이 shC17 서열에 추가의 불일치를 추가했다. 본 발명자들은 시드 영역에서의 5, 6, 및 7 위치와 아르고너트 인식 영역에서의 10, 및 11 위치에 불일치를 추가했다(도 9). 본 발명자들은 GC 함량이 안정되도록 하는 방식으로 shRNA에서의 뉴클레오타이드를 변화시켰지만, 다른 변화도 비슷한 효과를 낼 것으로 예상된다. 원래 shC17 서열 및 추가 불일치가 있는 shRNA의 형질도입 후 대립유전자-특이적 qRT-PCR은 shC17mm5가 LMNA 이소폼에서 rs4641의 표적화된 C 대립유전자의 하향조절을 더 강하게 유도했지만, 비-표적화된 T 대립유전자의 하향조절도 더 강하게 유도했음을 밝혔다(도 10a). 이는 원래 C17 서열에 비해 대립유전자 균형에서 약간 더 강한 이동을 초래했다(36:63% shC17mm5 및 39:61% shC17; 도 10b). 흥미롭게도, shC17mm7은 표적화된 대립유전자보다 비-표적화된 대립유전자의 더 강한 상향조절에 의해 유도된 LMNA의 비슷한 대립유전자 불균형(40:60%)을 초래했다. 본 발명자들은 다시 한 번 LMNA 스플라이스 이소폼을 표적화하는 이들 shRNA가 LMNC 스플라이스 이소폼 수준에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다. 돌연변이체 대립유전자의 절대 수준 또는 대립유전자 불균형이 환자에서의 질환 심각도와 본 발명자들의 hiPSC-CM에서 표현형을 결정하는 가장 중요한 요소인지 여부를 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 shC17, shC17mm5 및 shC17mm7을 추가로 연구하고 hiPSC-CM에서 질환 표현형에 미치는 그 효과를 비교하기로 결정했다.

[0213] SNP의 두 대립유전자 모두가 다른 환자에서의 돌연변이체 LMNA 대립유전자 상에 존재할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 또한 본 발명자들의 H222P hiPSC-CM에서 돌연변이체 대립유전자 상에 존재하는 LMNA에서의 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하였다. 이는 표적화된 T 대립유전자를 53% 그리고 비-표적화된 대립유전자를 8%만큼 하향조절하는 하나의 shRNA인 shT17을 밝혔고(도 11a) 반면에 다시 다른 모든 shRNA는 두 LMNA 대립유전자 모두의 상향조절을 유도했다. 표적 대립유전자의 이 53% 하향조절은 또한 SCR 음성 대조군 형질도입된 세포에서 45:55%에서 shT17 형질도입된 세포에서 61:39% 비율로 대립유전자 균형에서의 이전을 초래했으며, 이는 이들 세포에서 비율이 돌연변이체 대립유전자의 작은 상대적 과발현에서 shT17에 의한 돌연변이체 대립유전자의 상대적 과소-발현을 향해 이전했음을 의미한다(도 11b). 또한 LMNA 스플라이스 이소폼의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA는 LMNC 스플라이스 이소폼의 대립유전자 불균형에 영향을 미치지 않았다. 또한 본 발명자들은 shT17 서열에 대해, 다시 시드 영역에서 위치 5, 6, 및 7과 아르고너트 인식 영역에서 위치 10, 및 11에서 여분의 불일치를 추가했다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 shC17 서열에 이들 불일치의 추가와 같은 유사한 효과를 관찰했다(도 9). 다시 말하면 위치 5에서 불일치는 표적화된 T 대립유전자의 하향조절을 더 강하게 유도했고, 최대 83%까지 유도했지만, 비-표적화된 C 대립유전자의 하향조절도 44%까지 더 강하게 유도했다. 위치 7에서 불일치는 이 실험에서 원래 T17 서열에 유사한 하향조절(20%)을 초래했지만, 다시 비-표적화된 C 대립유전자의 강한 상향조절을 초래했다(도 12a). 결과적으로 위치 5와 7에서 불일치가 있는 두 shRNA 모두(76:24% 및 74:26%)는 원래 T17 서열에 비해 대립유전자 불균형에 더 강한 영향을 초래했다(70:30%, 도 12b). 다시 말하면 이들 shRNA는 LMNC의 대립유전자 불균형에 영향을 미치지 않았다(도 12c/d). 돌연변이체 대립유전자의 절대 수준 또는 대립유전자 불균형이 환자에서 질환 심각도와 본 발명자들의 hiPSC-CM의 표현형을 결정하는 가장 중요한 요인인지에 대한 동일한 질문 때문에, 본 발명자들은 또한 shT17, shT17mm5 및 shT17mm7을 추가로 연구하고 hiPSC-CM에서의 질환 표현형에 미치는 그 효과를 비교하기로 결정했다.

[0214] LMNC 이소폼에서 rs4641의 대립유전자-특이적 표적화

[0215] LMNC를 표적화하는 shRNA를 시험하기 위해, 본 발명자들은 이들 shRNA를 갖는 H222P hiPSC-세포주로부터 유래된 심근세포를 렌티바이러스로 형질도입하고, 돌연변이체 및 야생형 LMNC 대립유전자의 대립유전자-특이적 qRT-PCR 발현 수준을 스크램블된 음성 대조군 shRNA(Scr)로 형질도입된 세포의 발현 수준과 비교했다. 야생형 LMNC 대립

유전자 상의 이 H222P hiPSC-세포주에 있는 LMNA 스플라이스 이소폼에서 rs4641의 C 대립유전자를 표적화하는 것은 각각 C 대립유전자의 31%, 6% 및 16%의 녹다운을 갖는 3개의 shRNA, shC11, shC13 및 shC17을 밝혀냈다(도 13). 그러나, shC11은 비-표적화된 T 대립유전자의 30% 녹다운 및 shC17 6% 녹다운을 가졌다. 이는 스크램블된 형질도입된 세포에서 48:51%로부터 shC11의 경우 59:41%, shC13의 경우 57:43%, 및 shC17의 경우 36:64%로 대립유전자 균형에서 작은 이전을 초래했다. 본 발명자들은 또한 이들 shRNA가 LMNA 발현 수준에 미치는 영향을 결정했고 shC11은 또한 비 대립유전자-특이적으로 LMNA 이소폼을 25% 억제하고 shC17은 C 및 T 대립유전자 수준 둘 모두를 증가시켰지만 T 대립유전자의 수준은 더 큰 정도로 증가하여, 따라서 또한 LMNA의 대립유전자 균형에서의 약간의 이동을 초래했다(SCR에서의 48:52%에서 shC17에서의 43:57%)는 것을 인지했다. 이는 shC17이 두 스플라이스 이소폼 모두에 영향을 미칠 수 있는 양호한 후보일 수 있음을 의미한다. 상기에서 기술된 LMNA 이소폼을 표적화하는 shC17에 추가된 불일치의 결과를 감안할 때, 본 발명자들은 LMNC 이소폼을 표적화하는 shC17에 불일치 5와 7을 추가하는 것은 또한 LMNA에도 즉시 영향을 미쳐 두 스플라이스 이소폼 모두를 별도로 표적화할 필요성을 감소시킬 수 있을 가능성으로 LMNC의 대립유전자-특이적 표적화 또는 대립유전자 불균형 유도를 더욱 개선할 수 있다는 것을 추측한다.

[0216] LMNC 이소폼의 C 대립유전자를 표적화하는 shC11과 shC13에 의한 대립유전자-특이적 표적화를 더욱 개선하기 위해 본 발명자들은 이들 shRNA 서열에 불일치를 추가했다(도 14). shC11에 추가된 불일치는 부가하여 표적화된 또는 비-표적화된 LMNC 대립유전자의 하향조절을 초래하지 않았고(도 15), shC11mm5는 비-표적화된 대립유전자에서 더 강한 작은 상향조절을 초래하여 약간 더 강한 대립유전자 불균형을 초래했다(40:60% scr; 36:64% shC11; 및 30:70% shC11mm5). C13 shRNA 서열에 불일치의 추가는 shC13mm17에 대한 표적화된 C 대립유전자의 더 강한 하향조절을 초래하였다(도 16). 그러나, 비-표적화된 대립유전자의 하향조절은 거의 똑같이 강하여, 원래 C13 shRNA와 shC13mm17 사이에 비슷한 대립유전자 균형을 초래했다(66:34% 대 65:35%). 그러나, shRNA를 표적화하는 LMNA에서 수행된 표현형 결과에 의존하여, 돌연변이체 대립유전자의 절대 수준의 손실이 대립유전자 균형에 미치는 영향보다 더 중요한 것으로 판명되면 이 shC13mm17은 추가 표현형에 대한 흥미로운 후보가 될 수 있다.

[0217] 다시 말하면 rs4641의 두 대립유전자가 다른 환자에서 돌연변이체 대립유전자 상에 있을 수 있기 때문에, 본 발명자들은 또한 LMNC 이소폼에서 rs4641의 T 대립유전자를 표적화하는 shRNA를 테스트했다. 이는 두 shRNA가 shT14의 경우 표적화된 T 대립유전자를 33%, shT17의 경우 22%만큼 하향조절할 수 있는 반면, 이들은 또한 비-표적화된 C 대립유전자를 각각 20%와 15%만큼 하향조절할 수 있음을 밝혔다. 놀랍게도 shT17에 대한 대립유전자 불균형은 더 강한 하향조절된 표적화된 T 대립유전자의 상대적 과발현(scr의 경우 40:60% 대 43:57%)으로 이전했다. shT14는 표적화된 T 대립유전자의 상대적 과소-발현으로 예상된 방향에서 대립유전자 불균형을 이전했다(51:49%, 도 17). 두 shRNA 모두는 LMNA 스플라이스 이소폼의 대립유전자 불균형에 영향을 미치지 않았다. 본 발명자들은 아직 LMNC 이소폼을 표적화하는 shT17에 추가적인 불일치를 추가하지 않았지만, LMNA 스플라이스 이소폼을 표적화하는 shT17에 불일치의 추가 후 관찰된 효과에 기반하여 본 발명자들은 불일치 5와 7이 또한 shT17에 의한 표적화를 개선할 수 있다고 생각할 수 있었다. 본 발명자들은 shT14에 추가적인 불일치를 추가했으며(도 18), 이는 표적화된 T 대립유전자를 더 강하게 억제하거나 대립유전자 불균형에 추가로 영향을 미칠 수 있는 shRNA가 없다는 것을 밝혔다.

[0218] 표 3. 추가적인 shRNA 표적화 서열

표적	shRNA No.	동일의 위치	센스 가닥 (5'-3')	안티센스 가닥 (5'-3')
C 대립유전자 LMNC	324	C17	CACGTGAGTGGTAGCCGCC 서열번호:179	GGCGGCTACCACTCACGTG 서열번호:180
	327	C11mm5	CACCACCACGTGAGaGGTA 서열번호:181	TACCTCTACGTGGTGGTG 서열번호:182
	328	C11mm6	CACCACCACGTGAcTGGTA 서열번호:183	TACCAgTCACGTGGTGGTG 서열번호:184
	329	C11mm7	CACCACCACGTGcTGGTA 서열번호:185	TACCACaCACGTGGTGGTG 서열번호:186
	330	C11mm13	CACCACgACGTGAGTGGTA 서열번호:187	TACCACTCACGTGGTGGTG 서열번호:188
	331	C11mm17	CAgCACCACGTGAGTGGTA 서열번호:189	TACCACTCACGTGGTGGTG 서열번호:190
	332	C13mm5	CCACCACGTGAGTGcTAGC 서열번호:191	GCTAgCACTCACGTGGTGG 서열번호:192
	333	C13mm6	CCACCACGTGAGTcGTAGC 서열번호:193	GCTACgACTCACGTGGTGG 서열번호:194
	334	C13mm7	CCACCACGTGAGaGGTAGC 서열번호:195	GCTACCTCTCACGTGGTGG 서열번호:196
T 대립유전자 LMNC	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC 서열번호:197	GCGGCTACCACTCACATGG 서열번호:198
	326	T17	CATGTGAGTGGTAGCCGCC 서열번호:199	GGCGGCTACCACTCACATG 서열번호:200
	342	T14mm5	CACCATGTGAGTGGaAGCC 서열번호:201	GGCTcCACTCACATGGTG 서열번호:202
	343	T14mm6	CACCATGTGAGTGcTAGCC 서열번호:203	GGCTAgCACTCACATGGTG 서열번호:204
	344	T14mm7	CACCATGTGAGTcGTAGCC 서열번호:205	GGCTACgACTCACATGGTG 서열번호:206
	345	T14mm10	CACCATGTGcTGGTAGCC 서열번호:207	GGCTACCACaCACATGGTG 서열번호:208
	346	T14mm11	CACCATGTcAGTGGTAGCC 서열번호:209 서열번호:200	GGCTACCACTgACATGGTG 서열번호:210

[0219]

C 대립유전자 LMNA	347	T14mm17	CAgCATGTGAGTGGTAGCC 서열번호:211	GGTACCACTCACATGcTG 서열번호:212
	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC 서열번호:213	GCGGCTACCACTCACATGG 서열번호:214
	314	C17mm5	CACGGCTCCCAGTGGAGCA 서열번호:215	TGCTCCAGTGGGAGCCGTG 서열번호:216
	315	C17mm6	CACGGCTCCCAGTCCAGCA 서열번호:217	TGCTGGAGTGGGAGCCGTG 서열번호:218
	316	C17mm7	CACGGCTCCCAGCAGCA 서열번호:219	TGCTGCTGTGGGAGCCGTG 서열번호:220
	317	C17mm10	CACGGCTCCGACTGCAGCA 서열번호:221	TGCTGCAGTGGGAGCCGTG 서열번호:222
	318	C17mm11	CACGGCTCGCACTGCAGCA 서열번호:223	TGCTGCAGTGGGAGCCGTG 서열번호:224
T 대립유전자 LMNA	319	T17mm5	CATGGCTCCCAGTGGAGCA 서열번호:225	TGCTCCAGTGGGAGCCATG 서열번호:226
	320	T17mm6	CATGGCTCCCAGTCCAGCA 서열번호:227	TGCTGGAGTGGGAGCCATG 서열번호:228
	321	T17mm7	CATGGCTCCCAGCAGCA 서열번호:229	TGCTGCTGTGGGAGCCATG 서열번호:230
	322	T17mm10	CATGGCTCCGACTGCAGCA 서열번호:231	TGCTGCAGTGGGAGCCATG 서열번호:232
	323	T17mm11	CATGGCTCGCACTGCAGCA 서열번호:233	TGCTGCAGTGGGAGCCATG 서열번호:234

[0220]

[0221]

표 4. pLKO-puro 플라스미드에서 각각의 shRNA를 클로닝하는 데 사용된 올리고. 전방향 프라이머는 클로닝을 위해 추가된 오버행을 갖는 전체 shRNA 서열을 함유한다. ShRNA는 5/6 위치에서 대문자가 아닌 aa로 시작하고 대문자가 아닌 t-스트레치로 종결된다. Ref: 참조 번호. Fw: 전방향. Rv: 역방향.

Ref	표적 유전자	형질	방향	서열번호	서열
314	LMNA	C17m5	fw	233	ccggaaCACGGCTCCCACTGGAGCAAtcaagacTGCTCCAGTGGGAGCCGTGttttttg
			rv	236	aattcaaaaaaCACGGCTCCCACTGGAGCAggtcttgaTGCTCCAGTGGGAGCCGTGtt
315	LMNA	C17m6	fw	237	ccggaaCACGGCTCCCACTCCAGCAAtcaagacTGCTGGAGTGGGAGCCGTGttttttg
			rv	238	aattcaaaaaaCACGGCTCCCACTCCAGCAggtcttgaTGCTGGAGTGGGAGCCGTGtt
316	LMNA	C17m7	fw	239	ccggaaCACGGCTCCCACTCAGCAGCAAtcaagacTGCTGCTGTGGGAGCCGTGttttttg
			rv	240	aattcaaaaaaCACGGCTCCCACTCAGCAGCAggtcttgaTGCTGCTGTGGGAGCCGTGtt
317	LMNA	C17m10	fw	241	ccggaaCACGGCTCCGACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGGAGCCGTGttttttg
			rv	242	aattcaaaaaaCACGGCTCCGACTGCAGCAggtcttgaTGCTGCAGTCGGAGCCGTGtt
318	LMNA	C17m11	fw	243	ccggaaCACGGCTCGCACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTGGGAGCCGTGttttttg
			rv	244	aattcaaaaaaCACGGCTCGCACTGCAGCAggtcttgaTGCTGCAGTGGGAGCCGTGtt
319	LMNA	T17m5	fw	245	ccggaaCATGGCTCCCACTGGAGCAAtcaagacTGCTCCAGTGGGAGCCATGttttttg
			rv	246	aattcaaaaaaCATGGCTCCCACTGGAGCAggtcttgaTGCTCCAGTGGGAGCCATGtt
320	LMNA	T17m6	fw	247	ccggaaCATGGCTCCCACTCCAGCAAtcaagacTGCTGGAGTGGGAGCCATGttttttg
			rv	248	aattcaaaaaaCATGGCTCCCACTCCAGCAggtcttgaTGCTGGAGTGGGAGCCATGtt
321	LMNA	T17m7	fw	249	ccggaaCATGGCTCCCACTCAGCAGCAAtcaagacTGCTGCTGTGGGAGCCATGttttttg
			rv	250	aattcaaaaaaCATGGCTCCCACTCAGCAGCAggtcttgaTGCTGCTGTGGGAGCCATGtt
322	LMNA	T17m10	fw	251	ccggaaCATGGCTCCGACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGGAGCCATGttttttg
			rv	252	aattcaaaaaaCATGGCTCCGACTGCAGCAggtcttgaTGCTGCAGTCGGAGCCATGtt
323	LMNA	T17m11	fw	253	ccggaaCATGGCTCGCACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTGGGAGCCATGttttttg

[0222]

			rv	254	aattcaaaaaaCATGGCTCGCACTGCAGCAgtcttgaTGCTGCAGTGCAGCCATGtt
324	LMNC	C17	fw	255	ccggaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGGCGGCTACCACTCACGTgttttttg
			rv	256	aattcaaaaaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACGTgtt
325	LMNC	T16	fw	257	ccggaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGGCGGCTACCACTCACATGGttttttg
			rv	258	aattcaaaaaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACATGGtt
326	LMNC	T17	fw	259	ccggaaCATGTGAGTGGTAGCCGCCtcaagacGGCGGCTACCACTCACATgttttttg
			rv	260	aattcaaaaaaCATGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACATGtt
327	LMNC	C11mm5	fw	261	ccggaaCACCACCACGTGAGaGGTAtcaagacTACCtCTCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	262	aattcaaaaaaCACCACCACGTGAGaGGTAgcttgaTACCtCTCACGTGGTGGTgtt
328	LMNC	C11mm6	fw	263	ccggaaCACCACCACGTGAcTGGTAtcaagacTACCAGTCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	264	aattcaaaaaaCACCACCACGTGAcTGGTAgcttgaTACCAGTCACGTGGTGGTgtt
329	LMNC	C11mm7	fw	265	ccggaaCACCACCACGTGtGTGGTAtcaagacTACCACaCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	266	aattcaaaaaaCACCACCACGTGtGTGGTAgcttgaTACCACaCACGTGGTGGTgtt
330	LMNC	C11mm13	fw	267	ccggaaCACCACgACGTGAGTGGTAtcaagacTACCACtCACGTGTGGTgttttttg
			rv	268	aattcaaaaaaCACCACgACGTGAGTGGTAgcttgaTACCACtCACGTGTGGTgtt
331	LMNC	C11mm17	fw	269	ccggaaCAgCACCACGTGAGTGGTAtcaagacTACCACtCACGTGGTGTgttttttg
			rv	270	aattcaaaaaaCAgCACCACGTGAGTGGTAgcttgaTACCACtCACGTGGTGTgtt
332	LMNC	C13mm5	fw	271	ccggaaCCACCACGTGAGTGcTAGCtcaagacGCTAgCACTCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	272	aattcaaaaaaCCACCACGTGAGTGcTAGCgtcttgaGCTAgCACTCACGTGGTGGtt
333	LMNC	C13mm6	fw	273	ccggaaCCACCACGTGAGTcGTAGCtcaagacGCTACgACTCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	274	aattcaaaaaaCCACCACGTGAGTcGTAGCgtcttgaGCTACgACTCACGTGGTGGtt
334	LMNC	C13mm7	fw	275	ccggaaCCACCACGTGAGaGGTAGCtcaagacGCTACCcCTCACGTGGTGGTgttttttg
			rv	276	aattcaaaaaaCCACCACGTGAGaGGTAGCgtcttgaGCTACCcCTCACGTGGTGGtt
335	LMNC	C13mm11	fw	277	ccggaaCCACCACGaGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACtCtCGTGGTGGTgttttttg
			rv	278	aattcaaaaaaCCACCACGaGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACtCtCGTGGTGGtt
336	LMNC	C13mm17	fw	279	ccggaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACtCACGTGGaGgttttttg
			rv	280	aattcaaaaaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACtCACGTGGaGGtt
342	LMNC	T14mm5	fw	281	ccggaaCACCATGTGAGTGGaAGCCtcaagacGGCTcCCACTCACATGGTgttttttg
			rv	282	aattcaaaaaaCACCATGTGAGTGGaAGCCgtcttgaGGCTcCCACTCACATGGTgtt
343	LMNC	T14mm6	fw	283	ccggaaCACCATGTGAGTGcTAGCCtcaagacGGCTAgCACTCACATGGTgttttttg
			rv	284	aattcaaaaaaCACCATGTGAGTGcTAGCCgtcttgaGGCTAgCACTCACATGGTgtt
344	LMNC	T14mm7	fw	285	ccggaaCACCATGTGAGTcGTAGCCtcaagacGGCTACgACTCACATGGTgttttttg
			rv	286	aattcaaaaaaCACCATGTGAGTcGTAGCCgtcttgaGGCTACgACTCACATGGTgtt
345	LMNC	T14mm10	fw	287	ccggaaCACCATGTGcGTGGTAGCCtcaagacGGCTAACCACaCACATGGTgttttttg
			rv	288	aattcaaaaaaCACCATGTGcGTGGTAGCCgtcttgaGGCTAACCACaCACATGGTgtt
346	LMNC	T14mm11	fw	289	ccggaaCACCATGTcAGTGGTAGCCtcaagacGGCTAACCAGtACATGGTgttttttg
			rv	290	aattcaaaaaaCACCATGTcAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTAACCAGtACATGGTgtt
347	LMNC	T14mm17	fw	291	ccggaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACTCACATGcTgttttttg
			rv	292	aattcaaaaaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACTCACATGcTgtt

[0223]

[0224]

서열목록

<110> Academisch Medisch Centrum

<120> ANTISENSE NUCLEIC ACIDS FOR USE IN THE TREATMENT FOR LMNA MUTATION CARRIERS

<130> 2021-066

<160> 178

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> target nucleic acid 1

<400> 1

gaugaccugc uccaucacca ccacgugagu gguagccgcc gcuga 45

<210> 2

<211> 45

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> target sequence 2

<400> 2

gaugaccugc uccaucacca ccaugugagu gguagccgcc gcuga 45

<210> 3

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> target sequence 3

<400> 3

gaugaccugc uccaucacca ccacggcucc cacugcagca gcuc 44

<210> 4

<211> 44

[0225]

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target sequence 4

<400> 4
gaugaccugc uccaucacca ccauggcucc cacugcagca gcuc 44

<210> 5
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target sequence 5

<400> 5
ccugcuccau caccaccacg ugagugguag ccgccgc 37

<210> 6
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target sequence 6

<400> 6
ccugcuccau caccaccaug ugagugguag ccgccgc 37

<210> 7
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target sequence 7

<400> 7
ccugcuccau caccaccacg gcucccacug cagcagc 37

<210> 8
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

[0226]

<220>	
<223> target sequence 8	
<400> 8	
ccugcuccau caccaccaug gcucccacug cagcagc	37
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 175 sense	
<400> 9	
gaaatgtact gcgtggaga	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 175 antisense	
<400> 10	
tctccacgca gtacatttc	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 209 sense	
<400> 11	
tcaccaccac gtgagtgt	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

[0227]

<220>
 <223> 209 antisense

 <400> 12
 accactcacg tgggtggtga 19

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 210 sense

 <400> 13
 caccaccacg tgagtggta 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 210 antisense

 <400> 14
 taccactcac gtggtggtg 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 211 sense

 <400> 15
 accaccacgt gagtggtag 19

<210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 211 antisense

[0228]

<400> 16
ctaccactca cgtggtggt 19

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 212 sense

<400> 17
ccaccacgtg agtggtagc 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 212 antisense

<400> 18
gctaccactc acgtggtgg 19

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 213 sense

<400> 19
atcaccacca tgtgagtgg 19

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 213 antisense

<400> 20

[0229]

ccactcacat ggtggtgat 19

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 214 sense

<400> 21
tcaccacat gtgagtgtg 19

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 214 antisense

<400> 22
accactcaca tgggtgtga 19

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 215 sense

<400> 23
caccacatg tgagtgtga 19

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 215 antisense

<400> 24
taccactcac atggtgtgtg 19

[0230]

<210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 216 sense

 <400> 25
 accaccatgt gagtggtag 19

 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 216 antisense

 <400> 26
 ctaccactca catggtggt 19

 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 217 sense

 <400> 27
 caccatgtga gtggtagcc 19

 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 217 antisense

 <400> 28
 ggctaccact cacatggtg 19

 <210> 29

[0231]

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 230 sense

<400> 29
 tcaccaccac ggctccac 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 230 antisense

<400> 30
 gtgggagccg tgggtgga 19

<210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 231 sense

<400> 31
 caccaccacg gctccact 19

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 231 antisense

<400> 32
 agtgggagcc gtggtggtg 19

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA

[0232]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 232 sense

<400> 33

accaccacgg ctcccactg

19

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 232 antisense

<400> 34

cagtgggagc cgtggtggt

19

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 233 sense

<400> 35

ccaccacggc tcccactgc

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 233 antisense

<400> 36

gcagtgggag ccgtggtgg

19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0233]

<220>
 <223> 234 sense

 <400> 37
 caccacggct cccactgca 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 234 antisense

 <400> 38
 tgcagtggga gccgtggtg 19

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 235 sense

 <400> 39
 cacggctccc actgcagca 19

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 235 antisense

 <400> 40
 tgctgcagtg ggagccgtg 19

<210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

[0234]

<223> 236 sense

<400> 41
atcaccacca tggtccca 19

<210> 42
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 236 antisense

<400> 42
tgggagccat ggtggtgat 19

<210> 43
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 237 sense

<400> 43
tcaccacccat ggctccac 19

<210> 44
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 237 antisense

<400> 44
gtgggagcca tgggtgtga 19

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 238 sense

[0235]

<400> 45
caccacatg gctccact 19

<210> 46
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 238 antisense

<400> 46
agtgggagcc atggtgtg 19

<210> 47
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 239 sense

<400> 47
accacatgg ctccactg 19

<210> 48
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 239 antisense

<400> 48
cagtgggagc catggtgt 19

<210> 49
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 240 sense

<400> 49
caccatggct cccactgca 19

[0236]

<210> 50
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 240 antisense

 <400> 50
 tgcatgtggga gccatggtg 19

 <210> 51
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 241 sense

 <400> 51
 catggctccc actgcagca 19

 <210> 52
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 241 antisense

 <400> 52
 tgctgcagtg ggagccatg 19

 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> C LMNA FW

 <400> 53
 acctgctcca tcaccaccac 20

[0237]

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> C LMNA REV

<400> 54
 agccgctggc agatgccttg 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T LMNA FW

<400> 55
 acctgctcca tcaccacat 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T LMNA REV

<400> 56
 agccgctggc agatgccttg 20

<210> 57
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Total LMNA FW

<400> 57
 acctgctcca tcaccacc 18

<210> 58
 <211> 20

[0238]

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Total LMNA REV

<400> 58
agccgctggc agatgccttg 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C LMNC FW

<400> 59
acctgctcca tcaccaccac 20

<210> 60
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C LMNC REV

<400> 60
tggccccagt gcaggctc 18

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T LMNC FW

<400> 61
acctgctcca tcaccacat 20

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

[0239]

<220>
 <223> T LMNC REV
 <400> 62
 tggccccagt gcaggctc 18

<210> 63
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Total LMNC FW
 <400> 63
 acctgctcca tcaccacc 18

<210> 64
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Total LMNC REV
 <400> 64
 tggccccagt gcaggctc 18

<210> 65
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GAPDH FW
 <400> 65
 acccactcct ccacctttga c 21

<210> 66
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0240]

<220>
 <223> GAPDH REV

 <400> 66
 accctgttgc ttagcctaaa tt 22

<210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HPRT FW

 <400> 67
 tgacactggc aaaacaatgc a 21

<210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HPRT REV

 <400> 68
 ggtccttttc accagcaagc t 21

<210> 69
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TBP FW

 <400> 69
 gctcaccac caacaattta g 21

<210> 70
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TBP REV

[0241]

<400> 70
tctgctctga ctttagcacc tg 22

<210> 71
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C11-lamin C

<400> 71
uaccacucac gugguggug 19

<210> 72
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T14-lamin C

<400> 72
ggcuaccacu cacauggug 19

<210> 73
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C17-lamin A

<400> 73
ugcugcagug ggagccgug 19

<210> 74
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T17-lamin A

<400> 74

[0242]

ugcugcagug ggagccaug

19

<210> 75
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-C1

<400> 75
ccggaacctg ctccatcacc accactcaag acgtggtggt gatggagcag gtttttttg 59

<210> 76
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-C2

<400> 76
ccggaactgc tccatcacca ccacgtcaag accgtggtgg tgatggagca gtttttttg 59

<210> 77
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-C3

<400> 77
ccggaatgct ccatcaccac cacgttcaag acacgtggtg gtgatggagc atttttttg 59

<210> 78
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-C4

<400> 78
ccggaagctc catcaccacc acgtgtcaag accacgtggt ggtgatggag ctttttttg 59

[0243]

<210> 79
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C5

<400> 79
 ccggaactcc atcaccacca cgtgatcaag actcacgtgg tggatgatga gtttttttg 59

<210> 80
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C6

<400> 80
 ccggaatcca tcaccaccac gtgagtcaag acctcacgtg gggatgatgg atttttttg 59

<210> 81
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C7

<400> 81
 ccggaaccat caccaccacg tgagttcaag acactcacgt ggtggatgatg gtttttttg 59

<210> 82
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C8

<400> 82
 ccggaacatc accaccacgt gagtgtcaag accactcacg tggatgatgat gtttttttg 59

[0244]

<210> 83

<211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C9

<400> 83
 ccggaaatca ccaccacgtg agtgggtcaag acccactcac gtgggtggtga ttttttttg 59

<210> 84
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C10

<400> 84
 ccggaatcac caccacgtga gtgggtcaag acaccactca cgtgggtggtg atttttttg 59

<210> 85
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C11

<400> 85
 ccggaacacc accacgtgag tgggtatcaag actaccactc acgtgggtgtg ttttttttg 59

<210> 86
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C12

<400> 86
 ccggaaacca ccacgtgagt ggtagtcaag acctaccact cacgtgggtgg ttttttttg 59

<210> 87
 <211> 59
 <212> DNA

[0245]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNC-C13

<400> 87

ccggaaccac cacgtgagtg gtagctcaag acgctaccac tcacgtgggtg gtttttttg 59

<210> 88

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNC-C14

<400> 88

ccggaacacc acgtgagtggt tagcctcaag acggctacca ctcacgtgggt gtttttttg 59

<210> 89

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNC-C15

<400> 89

ccggaaacca cgtgagtggt agccgtcaag accggctacc actcacgtgg ttttttttg 59

<210> 90

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNC-C16

<400> 90

ccggaaccac gtgagtggtta gccgtcaag acgcggctac cactcacgtg gtttttttg 59

<210> 91

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0246]

<220>
 <223> LMNC-C17

<400> 91
 ccggaacacg tgagtggtag cgcctcaag acggcggcta ccactcacgt gtttttttg 59

<210> 92
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C18

<400> 92
 ccggaacagt gagtggtagc cgcctcaag accggcggct accactcacg ttttttttg 59

<210> 93
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-C19

<400> 93
 ccggaacgtg agtggtagcc gccgctcaag acggcgggc taccactcac gtttttttg 59

<210> 94
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T1

<400> 94
 ccggaacctg ctccatcacc accattcaag acatggtggt gatggagcag gtttttttg 59

<210> 95
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

[0247]

<223> LMNC-T2

<400> 95
ccggaactgc tccatcacca ccatgtcaag accatggtgg tgatggagca gtttttttg 59

<210> 96
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T3

<400> 96
ccggaatgct ccatcaccac catgttcaag acacatggtg gtgatggagc atttttttg 59

<210> 97
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T4

<400> 97
ccggaagctc catcaccacc atgtgtcaag accacatggt ggtgatggag ctttttttg 59

<210> 98
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T5

<400> 98
ccggaactcc atcaccacca tgtgatcaag actcacatgg tggatgatgga gtttttttg 59

<210> 99
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T6

[0248]

<400> 99
ccggaatcca tcaccacat gtgagtcaag acctcacatg gtggtgatgg atttttttg 59

<210> 100
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T7

<400> 100
ccggaacat caccacatg tgagtcaag acactcacat ggtggtgatg gtttttttg 59

<210> 101
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T8

<400> 101
ccggaacatc accacatgt gagtgtcaag accactcaca tgggtggtgat gtttttttg 59

<210> 102
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T9

<400> 102
ccggaatca ccacatgtg agtgggtcaag accactcac atggtggtga ttttttttg 59

<210> 103
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNC-T10

<400> 103
ccggaatcac caccatgtga gtggttcaag acaccactca catggtggtg atttttttg 59

[0249]

<210> 104
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T11

<400> 104
 ccggaacacc accatgtgag tggatatcaag actaccactc acatgggtgg gtttttttg 59

<210> 105
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T12

<400> 105
 ccggaacca ccatgtgagt ggtagtcaag acctaccact cacatgggtg ttttttttg 59

<210> 106
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T13

<400> 106
 ccggaaccac catgtgagtg gtagtcaag acgctaccac tcacatgggt gtttttttg 59

<210> 107
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T14

<400> 107
 ccggaacacc atgtgagtg tagcctcaag acggctacca ctcacatggt gtttttttg 59

[0250]

<210> 108
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNC-T15

 <400> 108
 ccggaaacca tgtgagtgggt agccgtcaag accggctacc actcacatgg ttttttttg 59

 <210> 109
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNC-T16

 <400> 109
 ccggaaccat gtgagtggta gccgctcaag acggcggtac cactcacatg gtttttttg 59

 <210> 110
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNC-T17

 <400> 110
 ccggaacatg tgagtggtag ccgcctcaag acggcggtta ccactcacat gtttttttg 59

 <210> 111
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNC-T18

 <400> 111
 ccggaaatgt gagtggtagc cgccgtcaag accggcggct accactcaca ttttttttg 59

 <210> 112
 <211> 59

[0251]

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNC-T19

<400> 112
 ccggaatgtg agtggtagcc gccgctcaag acgcggcggc taccactcac atttttttg 59

<210> 113
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C1

<400> 113
 ccggaactg ctccatcacc accactcaag acgtggtggt gatggagcag gtttttttg 59

<210> 114
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C2

<400> 114
 ccggaactgc tccatcacca ccacgtcaag accgtggtgg tgatggagca gtttttttg 59

<210> 115
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C3

<400> 115
 ccggaatgct ccatcaccac cacggtcaag acccgtggtg gtgatggagc atttttttg 59

<210> 116
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0252]

<220>
 <223> LMNA-C4

 <400> 116
 ccggaagctc catcaccacc acggctcaag acgccgtggt ggtgatggag ctttttttg 59

 <210> 117
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNA-C5

 <400> 117
 ccggaactcc atcaccacca cggcttcaag acagccgtgg tggatgatga gtttttttg 59

 <210> 118
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNA-C6

 <400> 118
 ccggaatcca tcaccaccac ggctctcaag acgagccgtg gtggtgatgg atttttttg 59

 <210> 119
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> LMNA-C7

 <400> 119
 ccggaaccat caccaccacg gtcctcaag acggagccgt ggtggtgatg gtttttttg 59

 <210> 120
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0253]

<220>
 <223> LMNA-C8
 <400> 120
 ccggaacatc accaccacgg ctccctcaag acgggagccg tgggtggtgat gtttttttg 59

<210> 121
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C9
 <400> 121
 ccggaaatca ccaccacggc tcccatcaag actgggagcc gtggtggtga ttttttttg 59

<210> 122
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C10
 <400> 122
 ccggaatcac caccacggct ccactcaag acgtgggagc cgtggtggtg atttttttg 59

<210> 123
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C11
 <400> 123
 ccggaacacc accacggctc ccacttcaag acagtgggag ccgtggtggt gtttttttg 59

<210> 124
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-C12

[0254]

<400> 124
ccggaaacca ccacggctcc cactgtcaag accagtggga gccgtggtg tttttttg 59

<210> 125
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C13

<400> 125
ccggaaccac cacggctccc actgtcaag acgcagtggg agccgtggtg gttttttg 59

<210> 126
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C14

<400> 126
ccggaacacc acggctccca ctgcatcaag actgcagtgg gagccgtggt gttttttg 59

<210> 127
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C15

<400> 127
ccggaaacca cggctccac tgcagtcaag acctgcagtg ggagccgtg tttttttg 59

<210> 128
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C16

<400> 128

[0255]

ccggaaccac ggctcccact gcagctcaag acgctgcagt gggagccgtg gtttttttg 59

<210> 129
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C17

<400> 129
ccggaacacg gctcccactg cagcatcaag actgctgcag tgggagccgt gtttttttg 59

<210> 130
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C18

<400> 130
ccggaacagg ctcccactgc agcagctcaag acctgctgca gtgggagccg ttttttttg 59

<210> 131
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-C19

<400> 131
ccggaacggc tcccactgca gcagctcaag acgctgctgc agtgggagcc gtttttttg 59

<210> 132
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LMNA-T1

<400> 132
ccggaacctg ctccatcacc accattcaag acatggtggt gatggagcag gtttttttg 59

[0256]

<210> 133
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T2

<400> 133
 ccggaactgc tccatcacca ccatgtcaag accatggtgg tgatggagca gtttttttg 59

<210> 134
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T3

<400> 134
 ccggaatgct ccatcaccac catggtcaag acccatggtg gtgatggagc atttttttg 59

<210> 135
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T4

<400> 135
 ccggaagctc catcaccacc atggctcaag acgccatggt ggtgatggag ctttttttg 59

<210> 136
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T5

<400> 136
 ccggaactcc atcaccacca tggcttcaag acagccatgg tggatgagga gtttttttg 59

<210> 137

[0257]

<211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T6

<400> 137
 ccggaatcca tcaccacccat ggctctcaag acgagccatg gtggtgatgg atttttttg 59

<210> 138
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T7

<400> 138
 ccggaacccat caccacccatg gctcctcaag acggagccat ggtggtgatg gtttttttg 59

<210> 139
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T8

<400> 139
 ccggaacatc accacccatgg ctccctcaag acgggagcca tgggtggtgat gtttttttg 59

<210> 140
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T9

<400> 140
 ccggaaatca ccacccatggc tcccatcaag actgggagcc atggtggtga ttttttttg 59

<210> 141
 <211> 59
 <212> DNA

[0258]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNA-T10

<400> 141

ccggaatcac caccatggct ccactcaag acgtgggagc catggtggtg atttttttg 59

<210> 142

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNA-T11

<400> 142

ccggaacacc accatggctc ccacttcaag acagtgggag ccatggtggt gtttttttg 59

<210> 143

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNA-T12

<400> 143

ccggaaccca ccatggctcc cactgtcaag accagtggga gccatggtgg ttttttttg 59

<210> 144

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LMNA-T13

<400> 144

ccggaaccac catggctccc actgtcaag acgcagtggg agccatggtg gtttttttg 59

<210> 145

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0259]

<220>
 <223> LMNA-T14

 <400> 145
 ccggaacacc atggctccca ctgcatcaag actgcagtgg gagccatggt gtttttttg 59

<210> 146
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T15

 <400> 146
 ccggaaacca tggctccac tgcagtcaag acctgcagtg ggagccatgg ttttttttg 59

<210> 147
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T16

 <400> 147
 ccggaacccat ggctcccact gcagctcaag acgctgcagt gggagccatg gtttttttg 59

<210> 148
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T17

 <400> 148
 ccggaacatg gctcccactg cagcatcaag actgctgcag tgggagccat gtttttttg 59

<210> 149
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

[0260]

<223> LMNA-T18

<400> 149
 ccggaatgg ctcccactgc agcagtcaag acctgctgca gtgggagcca ttttttttg 59

<210> 150
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LMNA-T19

<400> 150
 ccggaatggc tcccactgca gcagctcaag acgctgctgc agtgggagcc atttttttg 59

<210> 151
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> antisense of C variant of LMNC

<400> 151
 gcggcggcua ccacucacgu gguggugaug gagcagg 37

<210> 152
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> antisense of U variant of LMNC

<400> 152
 gcggcggcua ccacucacau gguggugaug gagcagg 37

<210> 153
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> antisense LMNA C variant

[0261]

<400> 153
gcugcugcag ugggagccgu gguggugaug gagcagg 37

<210> 154
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense of U variant of LMNA

<400> 154
gcugcugcag ugggagccau gguggugaug gagcagg 37

<210> 155
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA p. 3, 26 and 29

<400> 155
aattcaaaaa aa 12

<210> 156
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-C10

<400> 156
agugguggug cacucacca 19

<210> 157
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-C11

<400> 157
gugguggugc acucaccau 19

[0262]

<210> 158
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-C12

<400> 158
 ugguggugca cucaccauc 19

<210> 159
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-C13

<400> 159
 gguggugcac ucaccaucg 19

<210> 160
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T9

<400> 160
 uagugguggu acacucacc 19

<210> 161
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T10

<400> 161
 agugguggua cacucacca 19

[0263]

<210> 162
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T11

<400> 162
 guggugguac acucaccau

19

<210> 163
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T12

<400> 163
 uggugguaca cucaccauc

19

<210> 164
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T13

<400> 164
 ggugguacac ucaccaucg

19

<210> 165
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T14

<400> 165
 gugguacacu caccaucgg

19

<210> 166
 <211> 44

[0264]

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Lamin A Fig. 1

<400> 166
gaugaccugc uccaucacca ccacggcucc cacugcagca gcuc 44

<210> 167
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-C10

<400> 167
agugguggug ccgagggug 19

<210> 168
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-C11

<400> 168
gugguggugc cgaggguga 19

<210> 169
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-C12

<400> 169
ugguggugcc gagggugac 19

<210> 170
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

[0265]

<220>
 <223> siRNA-C13

 <400> 170
 gguggugccg agggugacg 19

<210> 171
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-C14

 <400> 171
 guggugccga gggugacgu 19

<210> 172
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T9

 <400> 172
 uagugguggu accgaggggu 19

<210> 173
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T10

 <400> 173
 agugguggua ccgagggug 19

<210> 174
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

[0266]

<220>
 <223> siRNA-T11

 <400> 174
 guggugguac cgaggguga 19

<210> 175
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T12

 <400> 175
 uggugguacc gagggugac 19

<210> 176
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T14

 <400> 176
 gugguaccga gggugacgu 19

<210> 177
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA-T17

 <400> 177
 guaccgaggg ugacgucgu 19

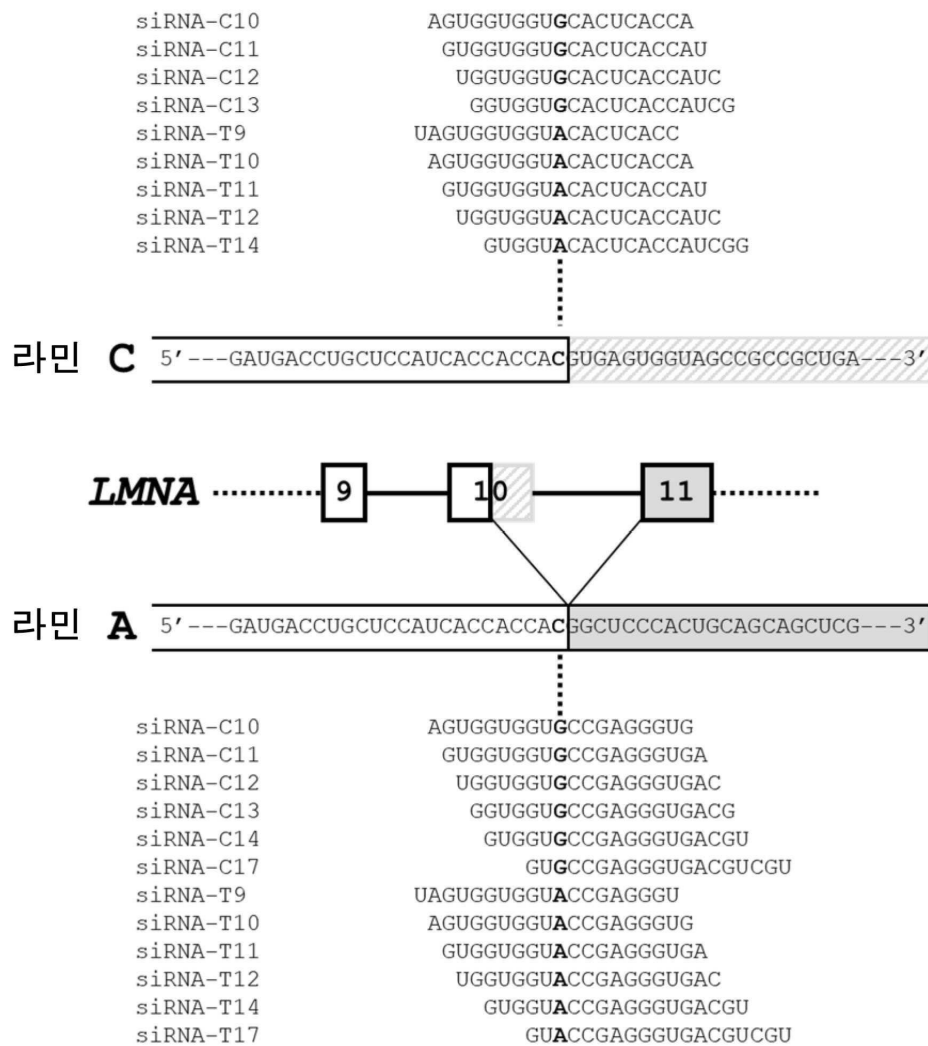
<210> 178
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

[0267] <220>
 <223> siRNA-C17

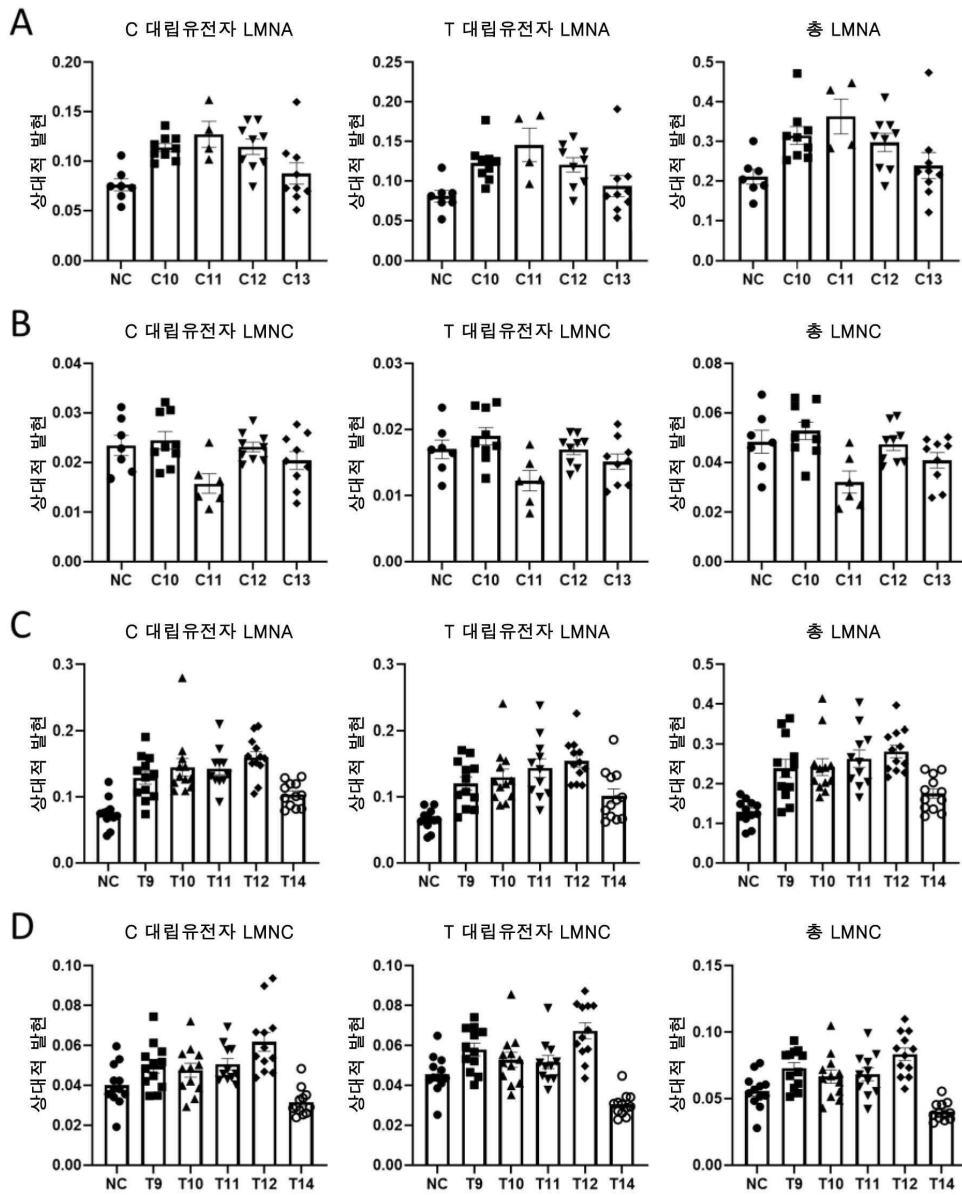
 <400> 178
 gugccgaggg ugacgucgu 19
 [0268]

도면

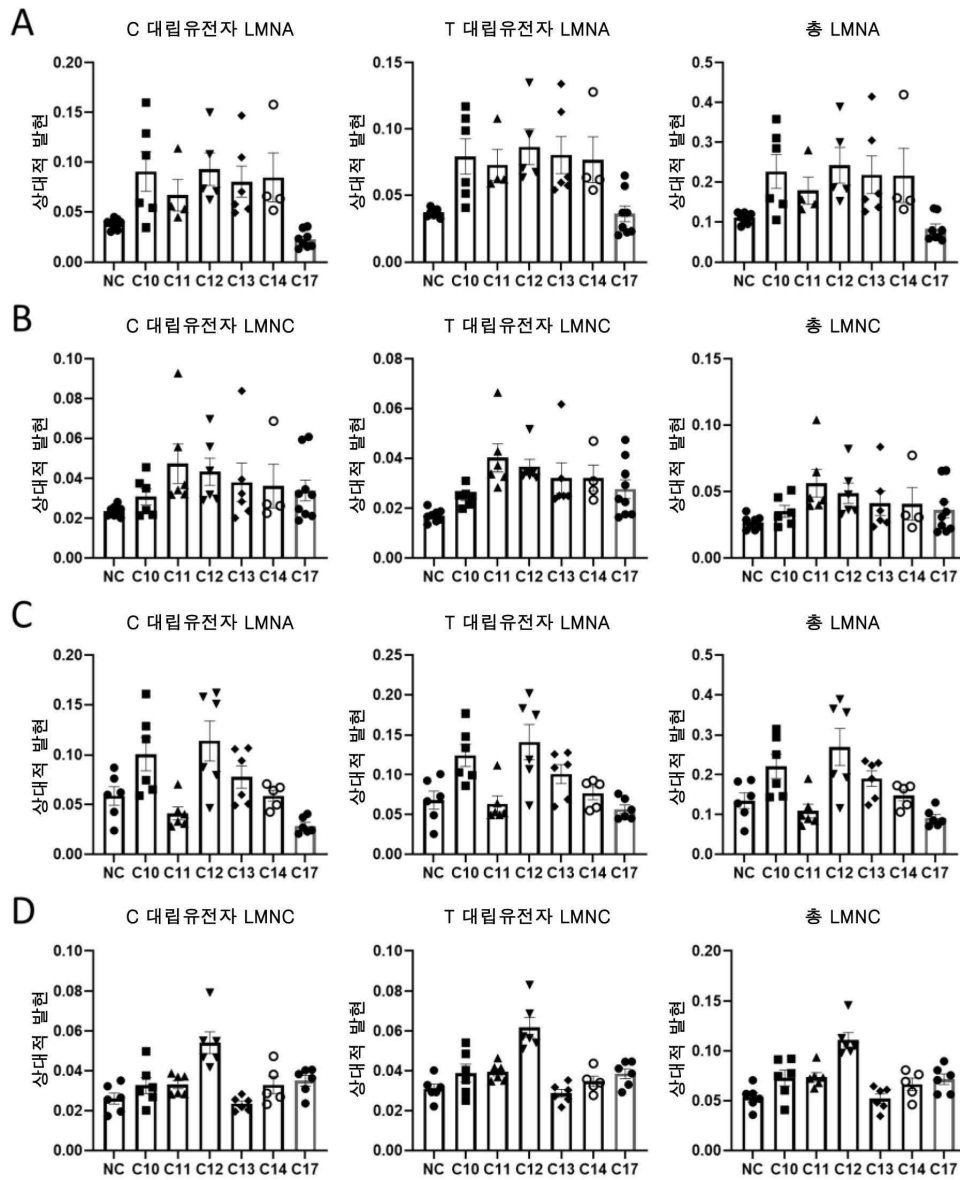
도면1



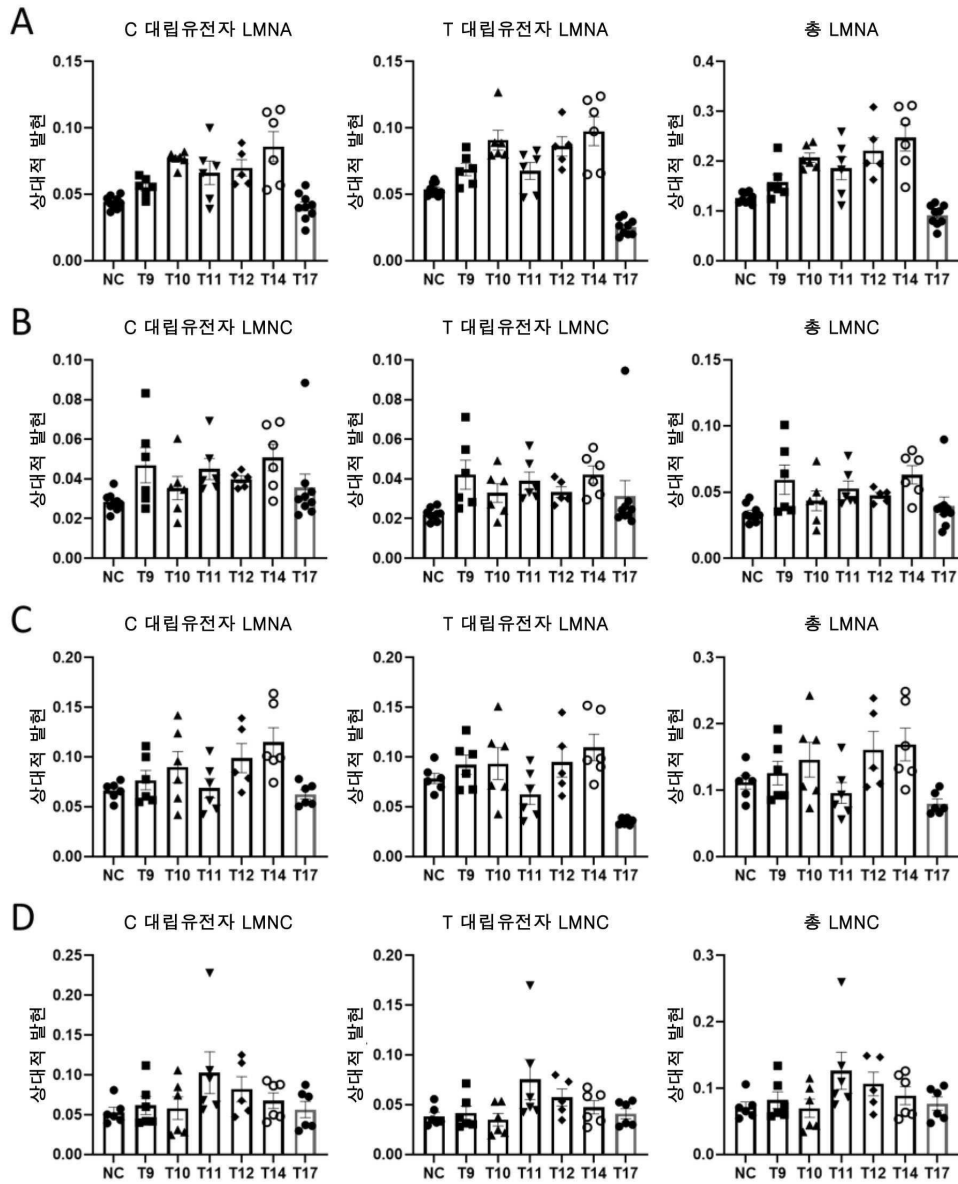
도면2



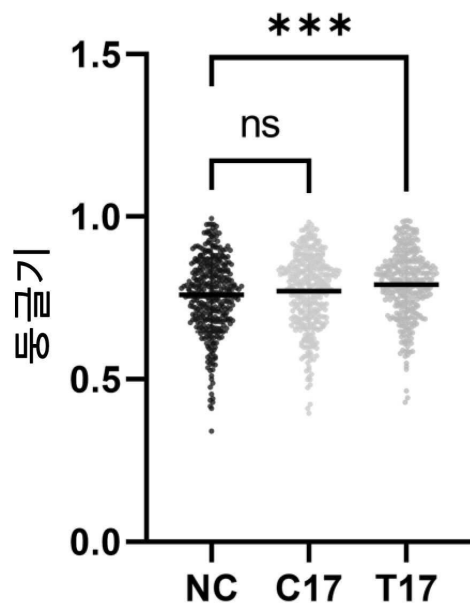
도면3



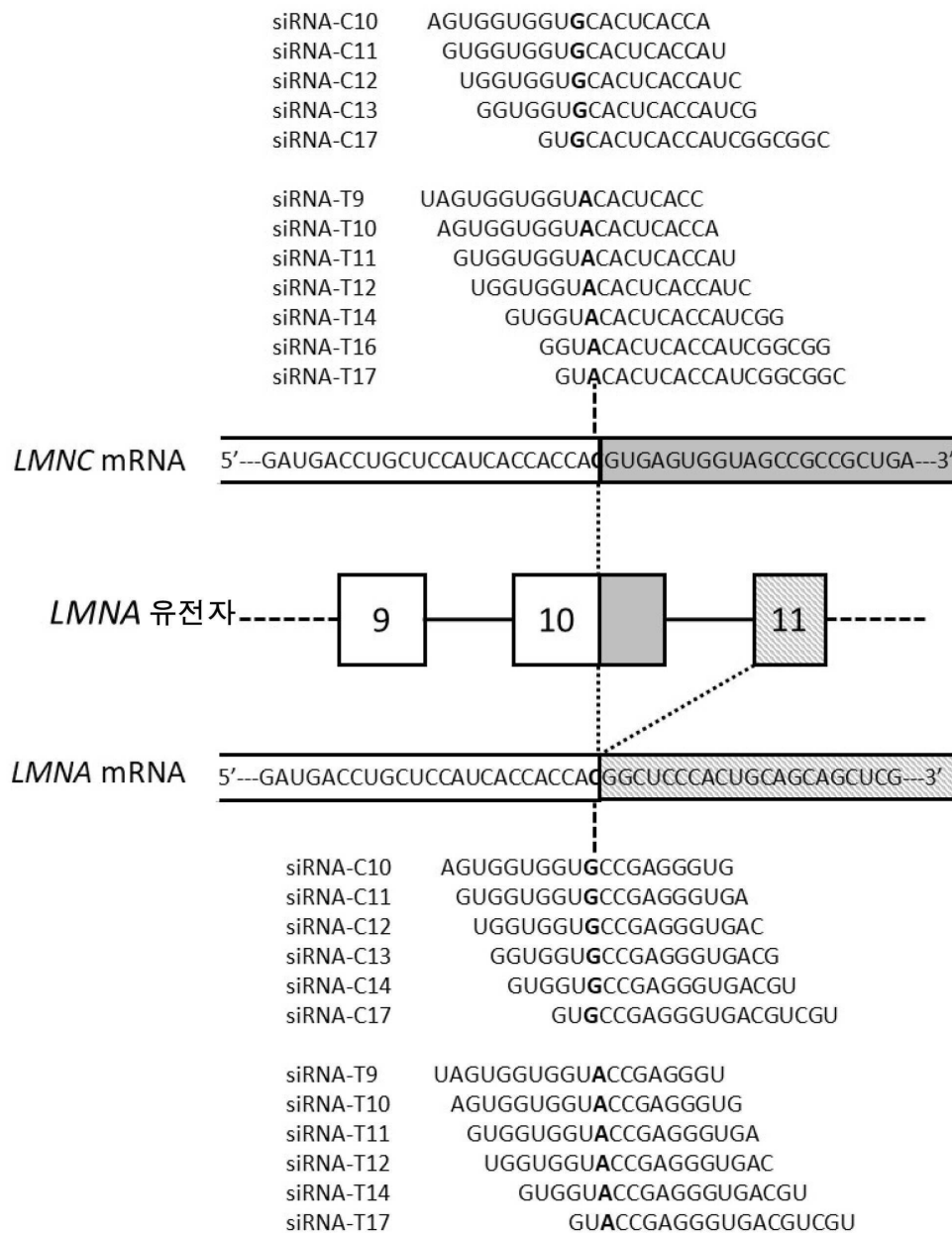
도면4



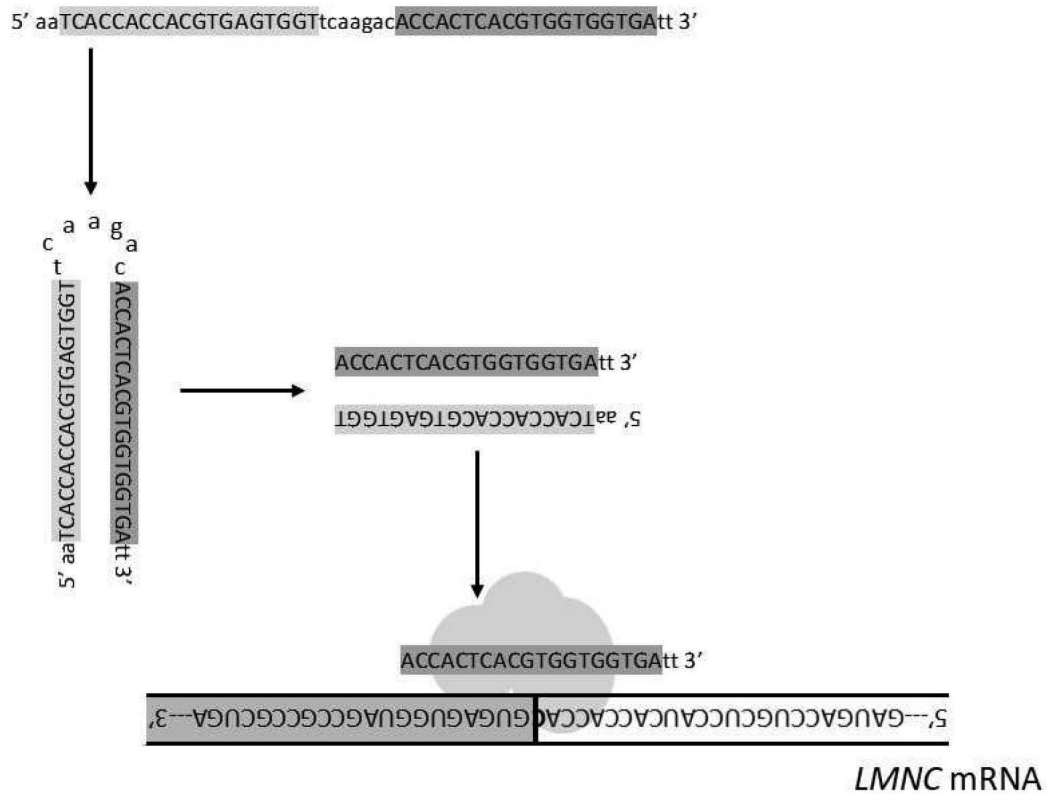
도면5



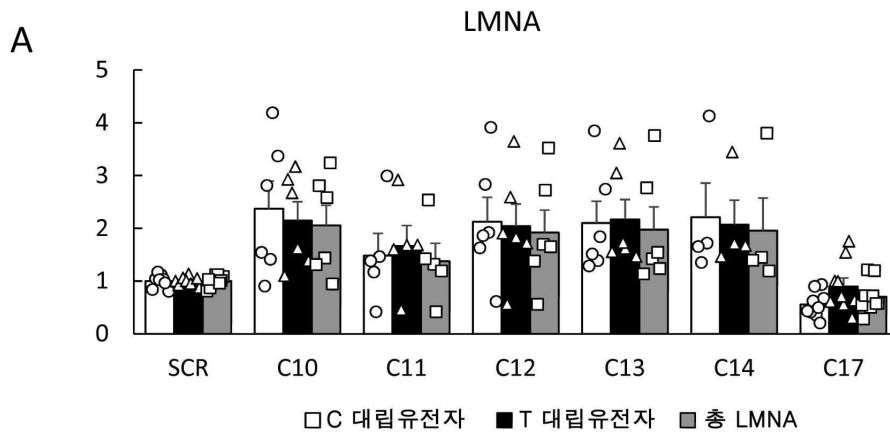
도면6



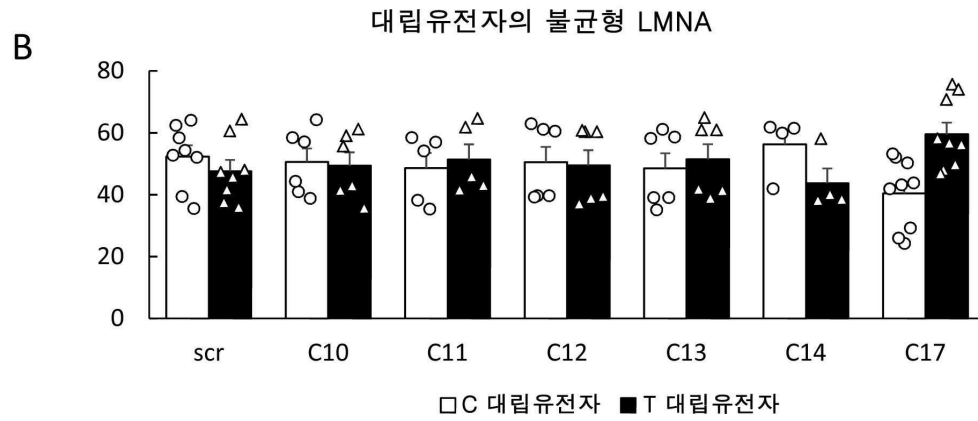
도면7



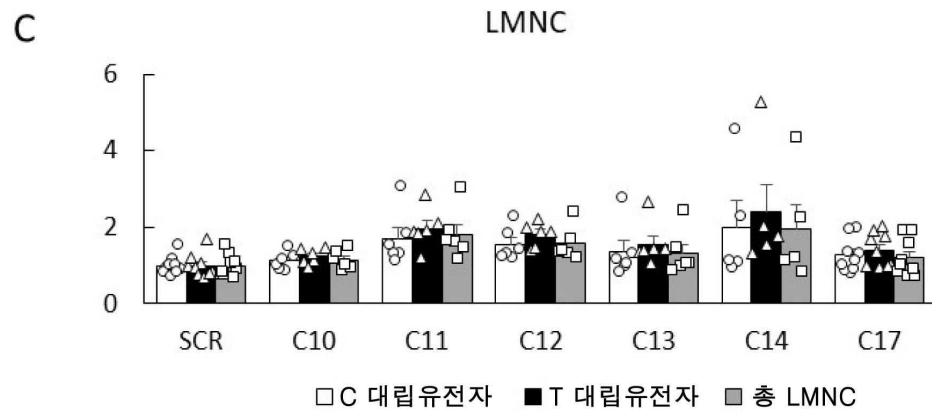
도면8a



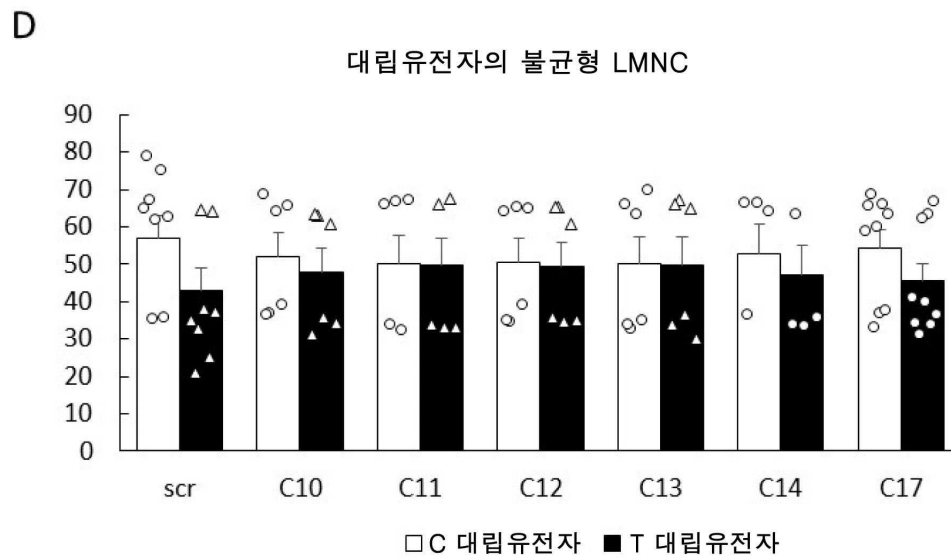
도면8b



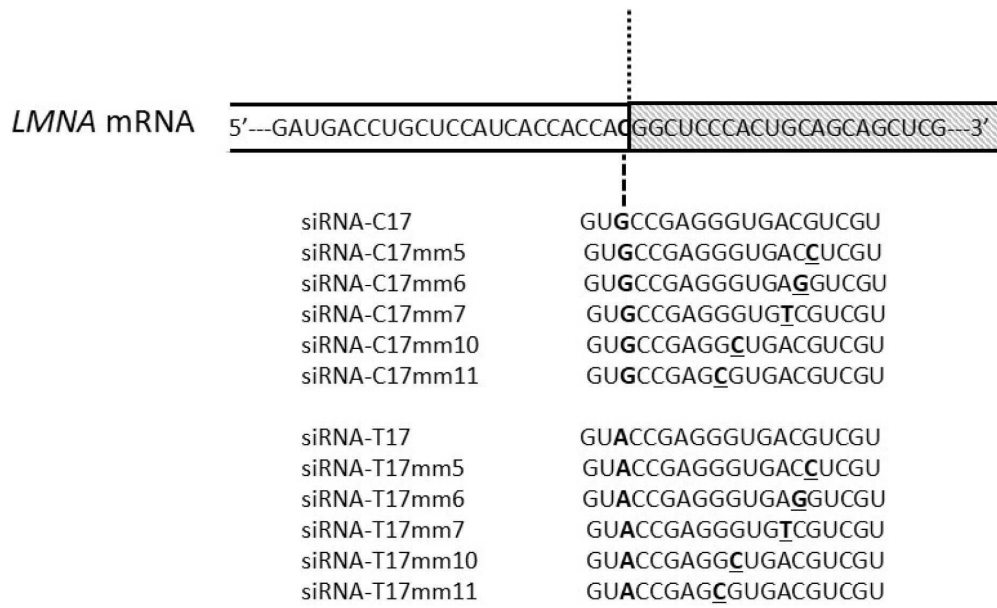
도면8c



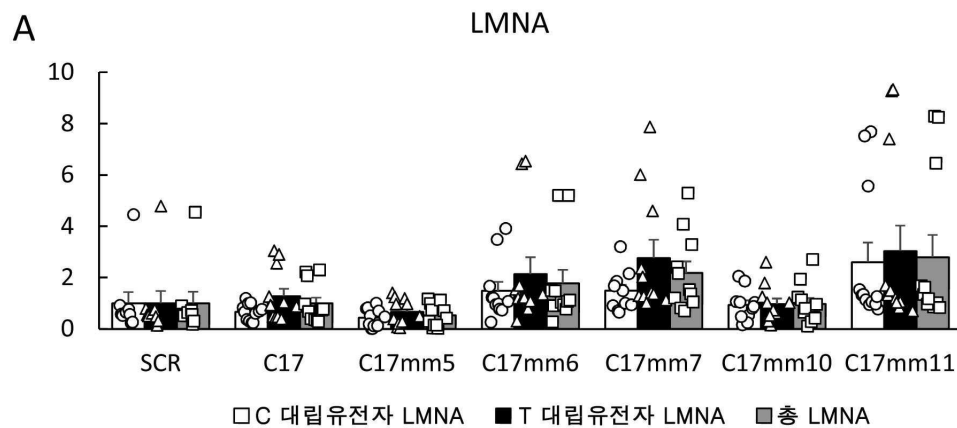
도면8d



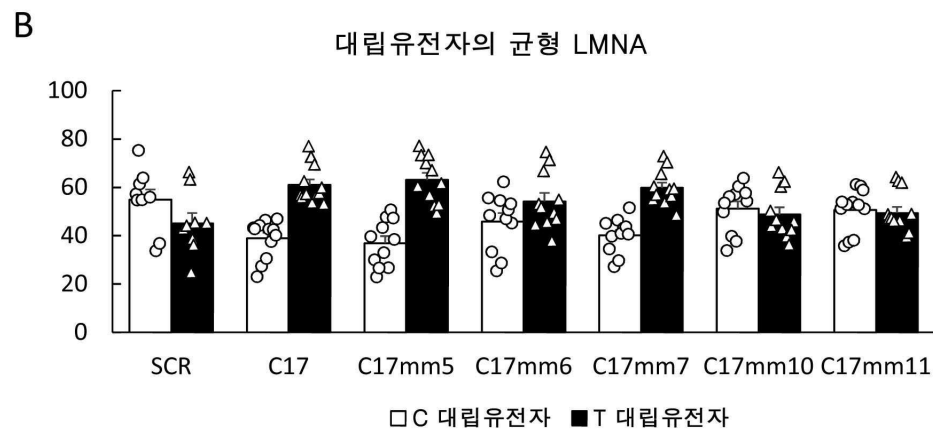
도면9



도면10a

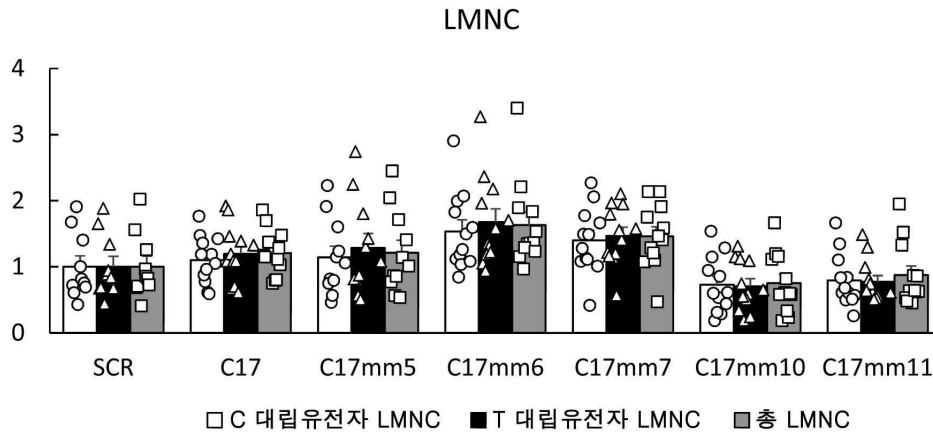


도면10b



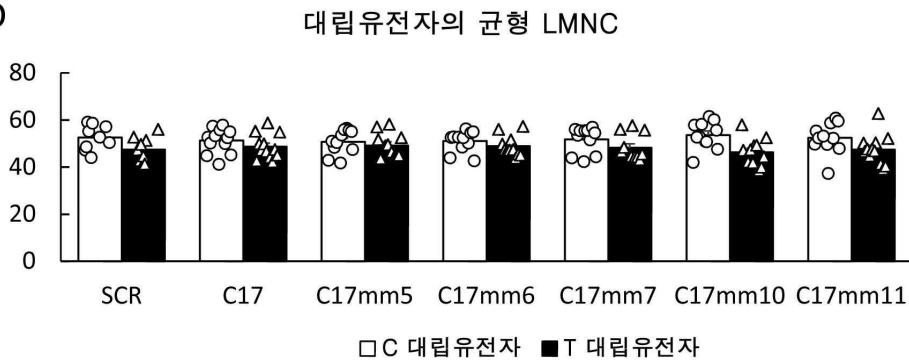
도면10c

C



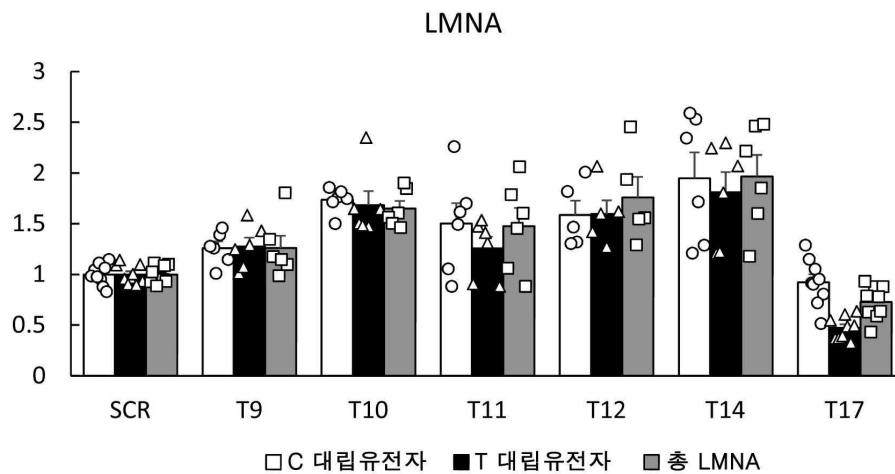
도면10d

D



도면11a

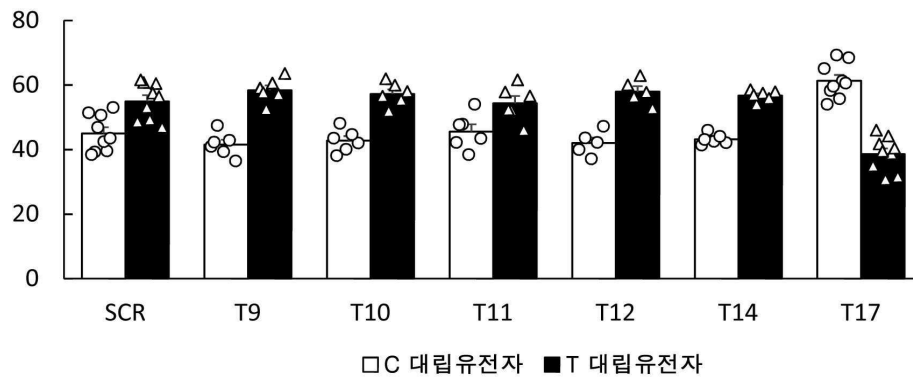
A



도면11b

B

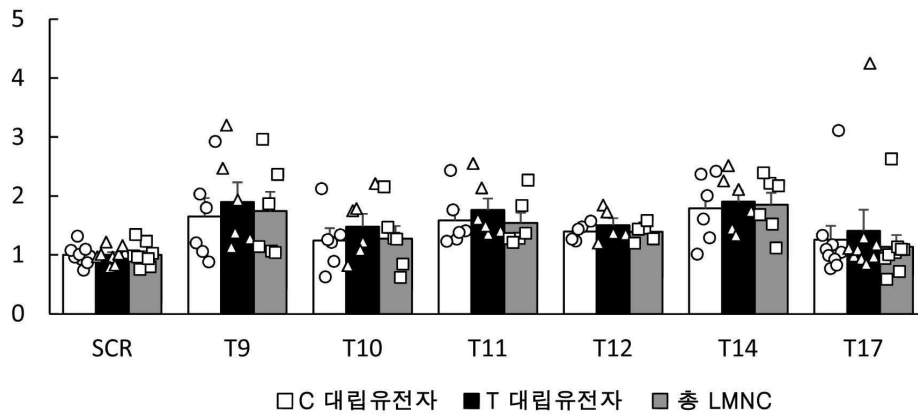
대립유전자의 불균형 LMNA



도면11c

C

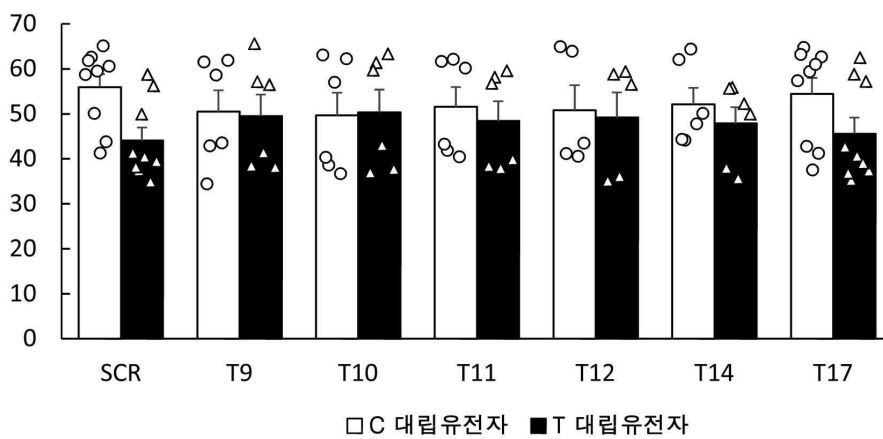
LMNC



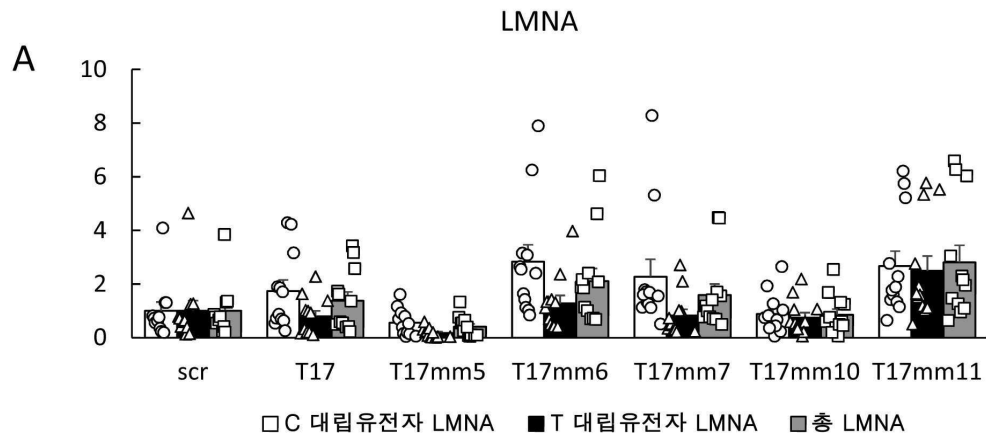
도면11d

D

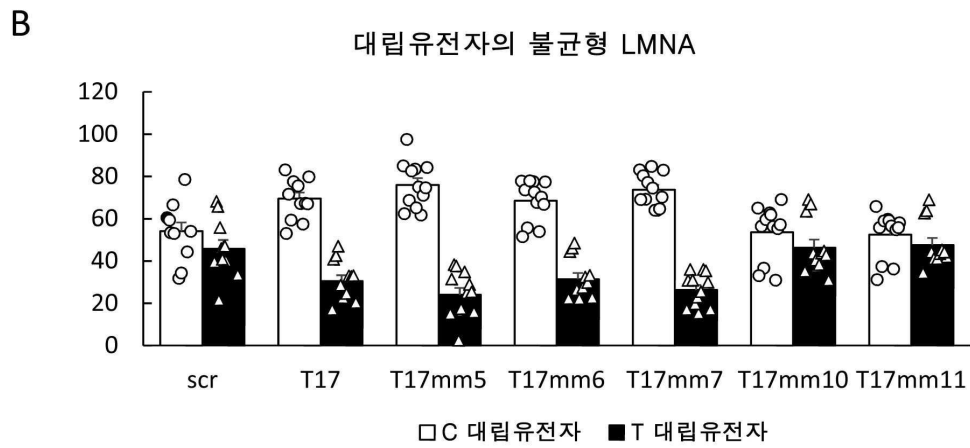
대립유전자의 불균형 LMNC



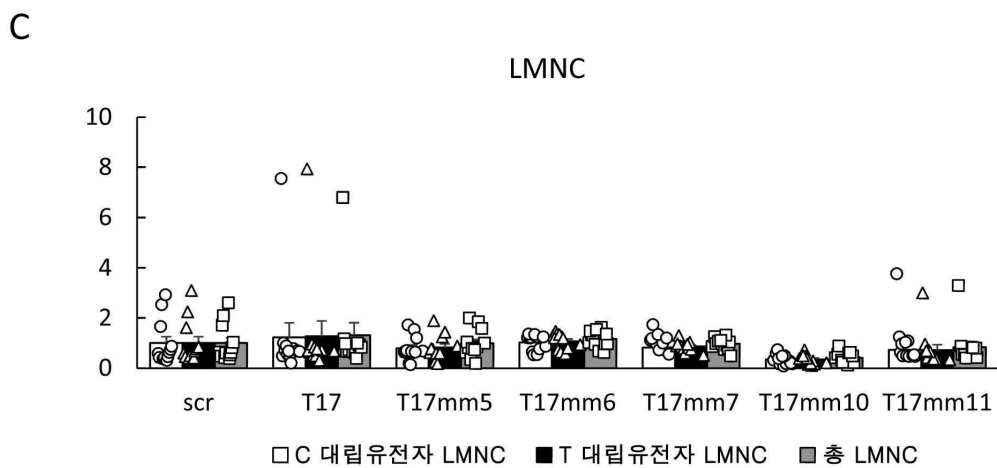
도면12a



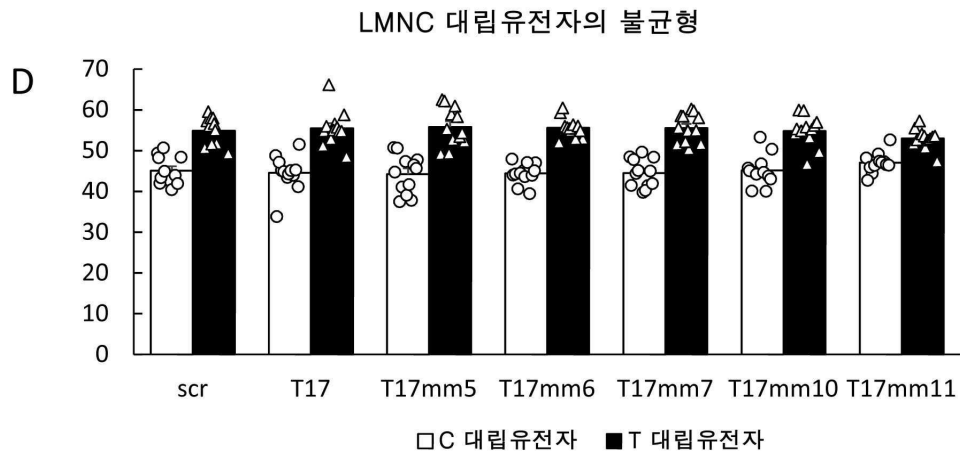
도면12b



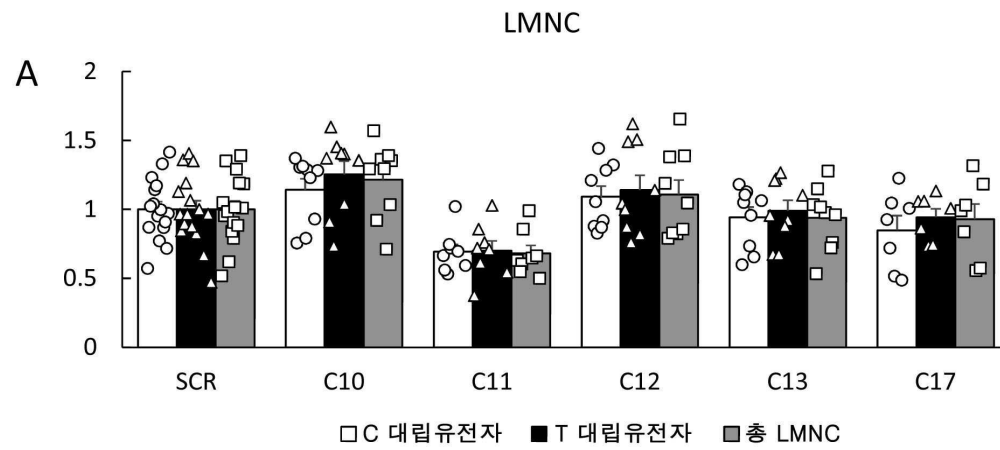
도면12c



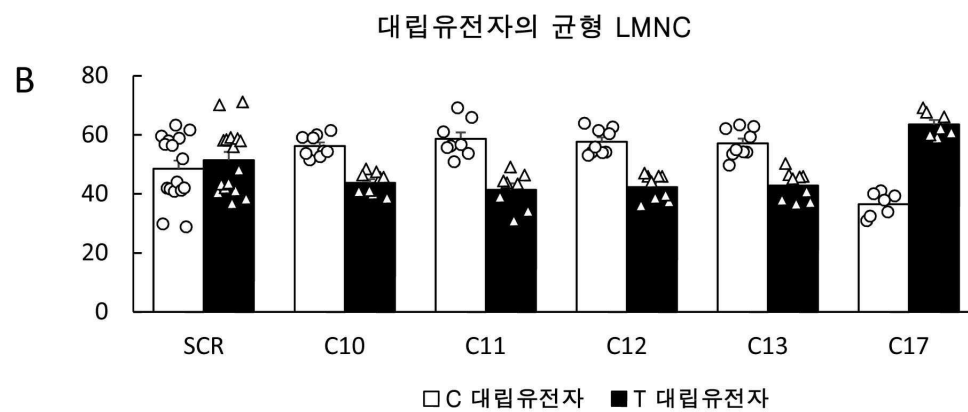
도면12d



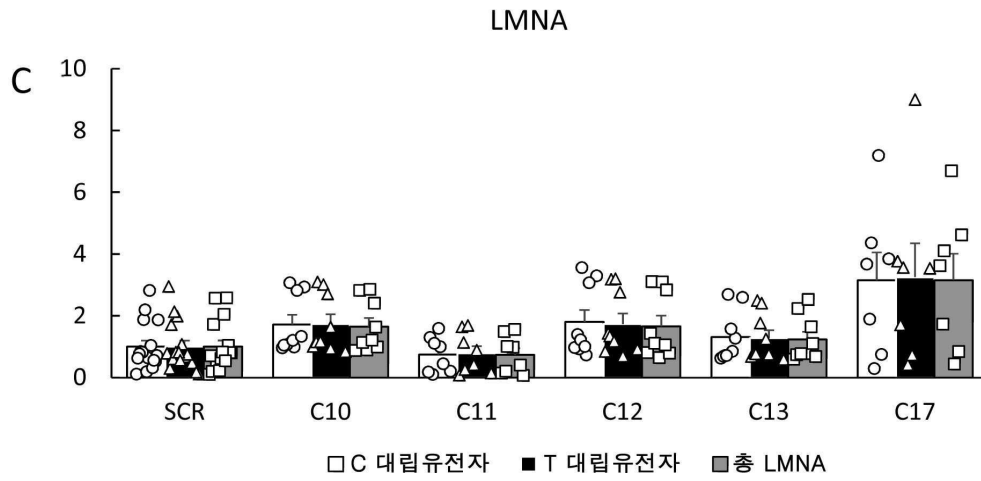
도면13a



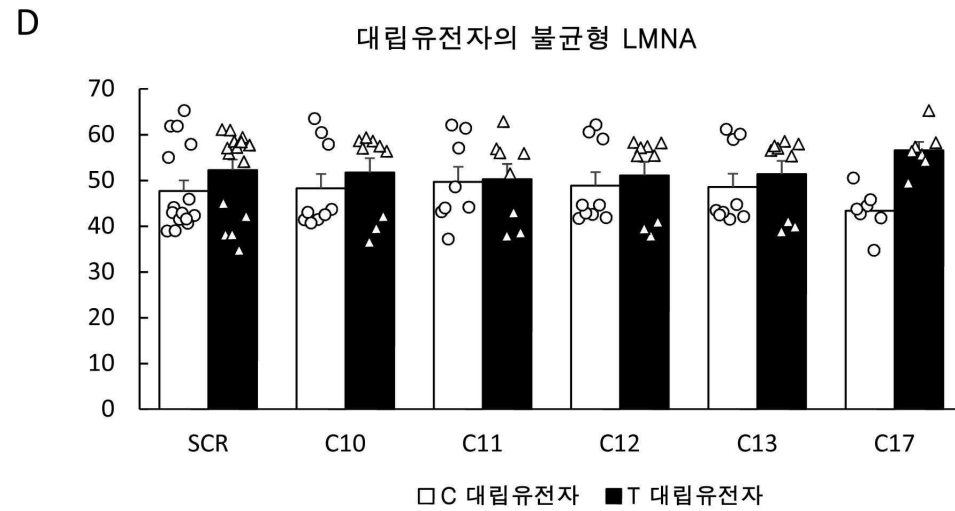
도면13b



도면13c



도면13d



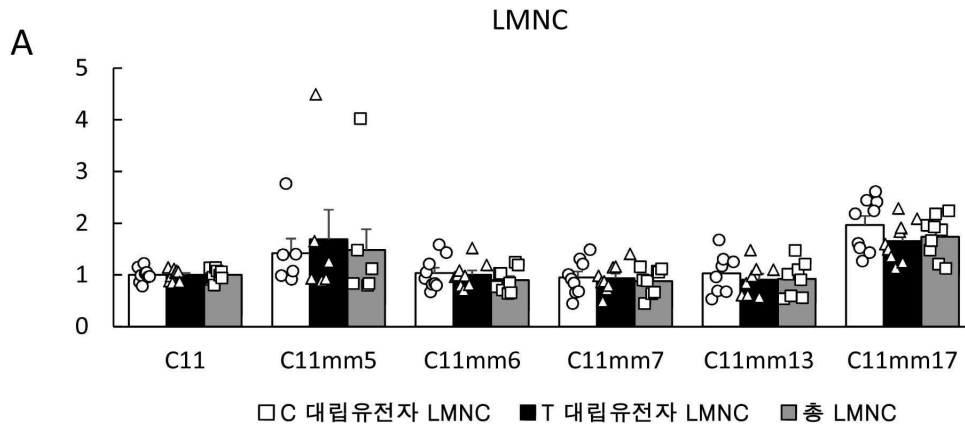
도면14

siRNA-C11	GUGGUGGUGCACUCACCAU
siRNA-C11mm5	GUGGUGGUGCACUC <u>T</u> CCAU
siRNA-C11mm6	GUGGUGGUGCACU <u>G</u> ACCAU
siRNA-C11mm7	GUGGUGGUGCAC <u>A</u> CACCAU
siRNA-C11mm13	GUGGUGGUG <u>C</u> UGCACUCACCAU
siRNA-C11mm17	GU <u>C</u> GUGGUGCACUCACCAU
siRNA-C13	GGUGGUGCACUCACCAUCG
siRNA-C13mm5	GGUGGUGCACUCAC <u>G</u> AUCG
siRNA-C13mm6	GGUGGUGCACUCA <u>G</u> CAUCG
siRNA-C13mm7	GGUGGUGCACUC <u>T</u> CCAUCG
siRNA-C13mm11	GGUGGUG <u>C</u> TUCACCAUCG
siRNA-C13mm17	GG <u>A</u> GGUGCACUCACCAUCG
siRNA-T14	GUGGUACACUCACCAUCGG

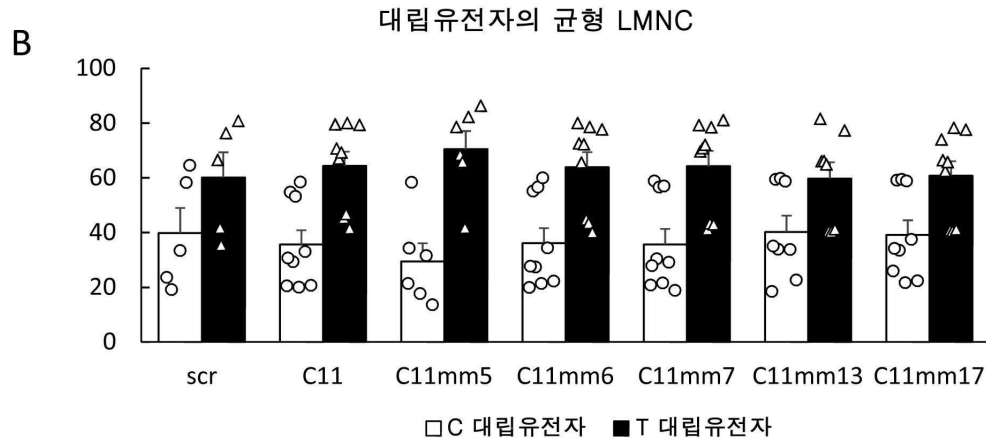
LMNC mRNA



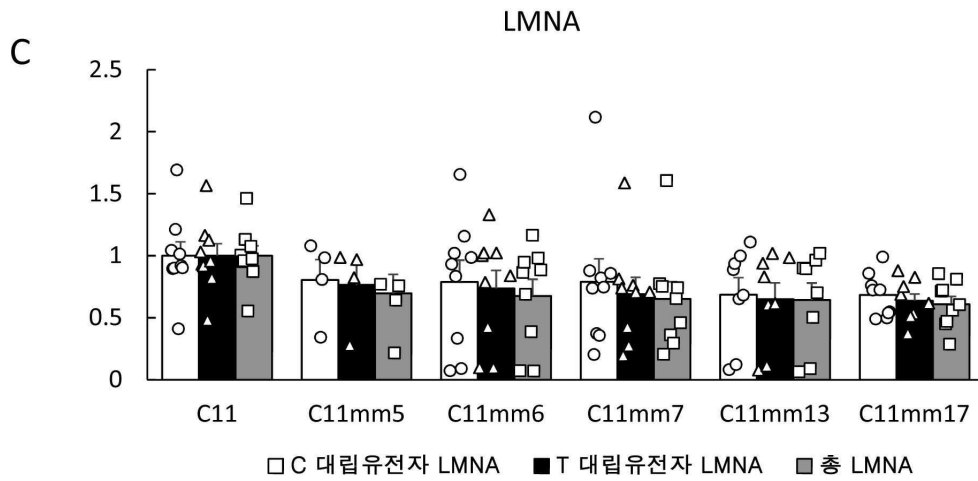
도면15a



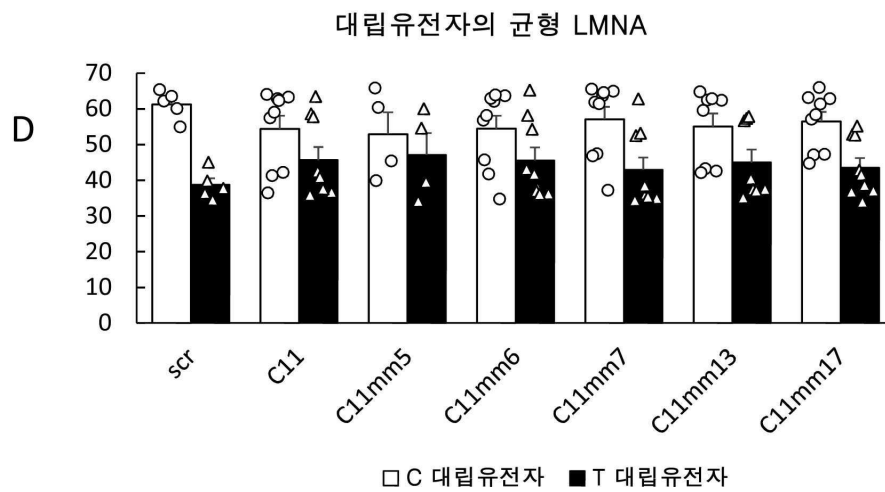
도면15b



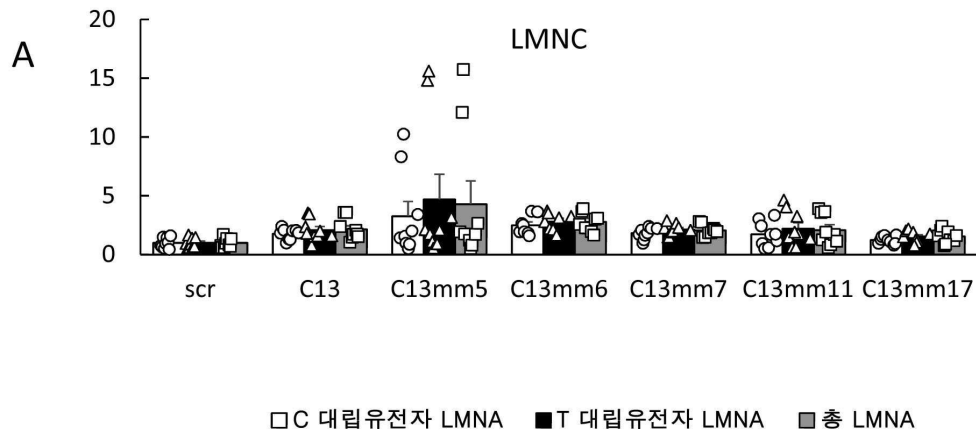
도면15c



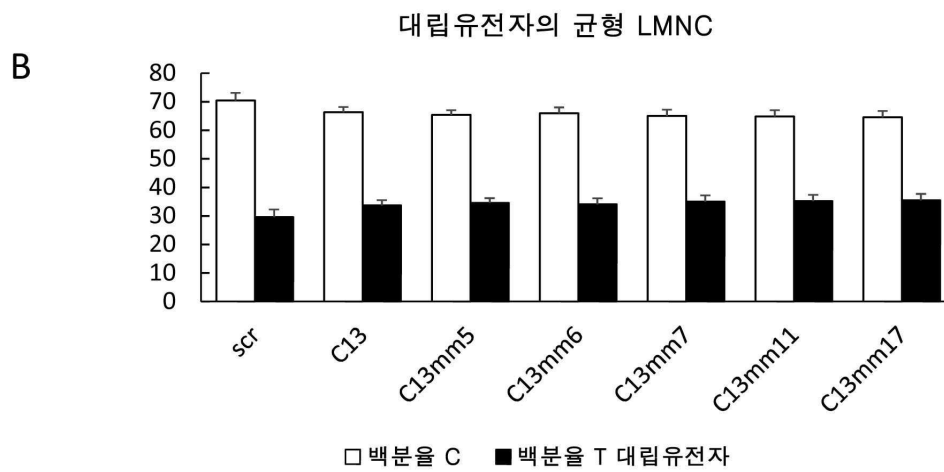
도면15d



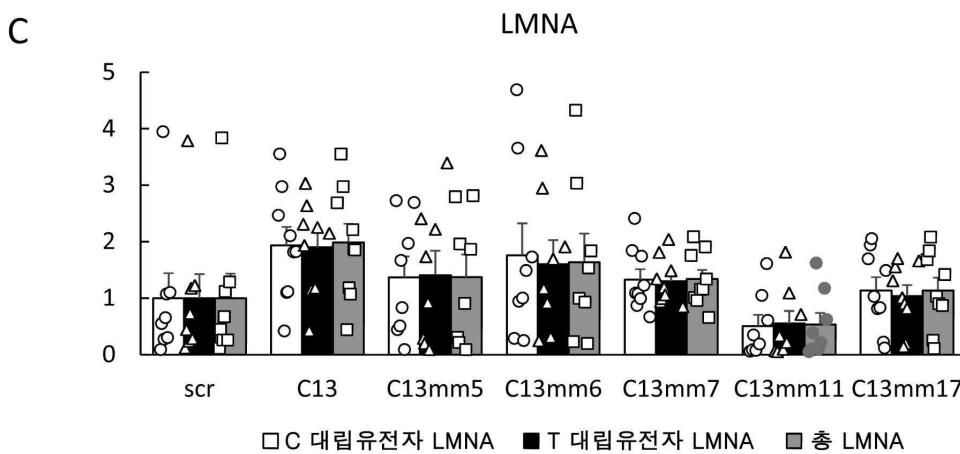
도면16a



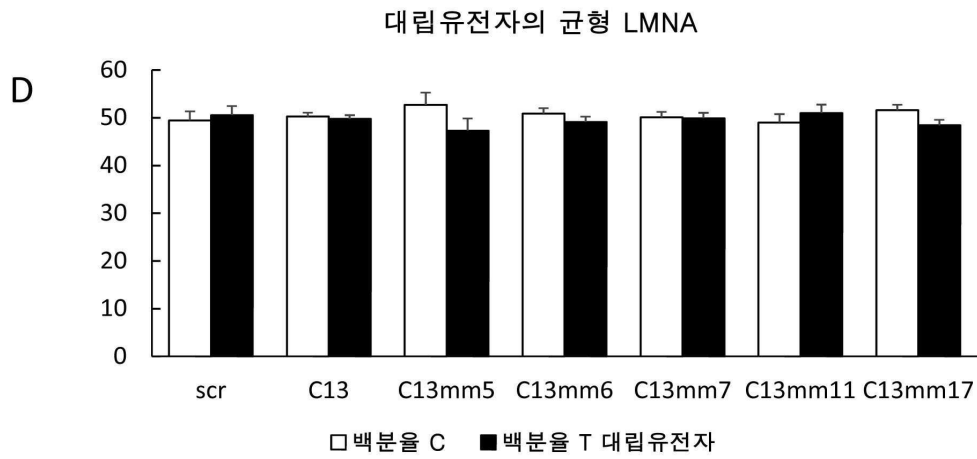
도면16b



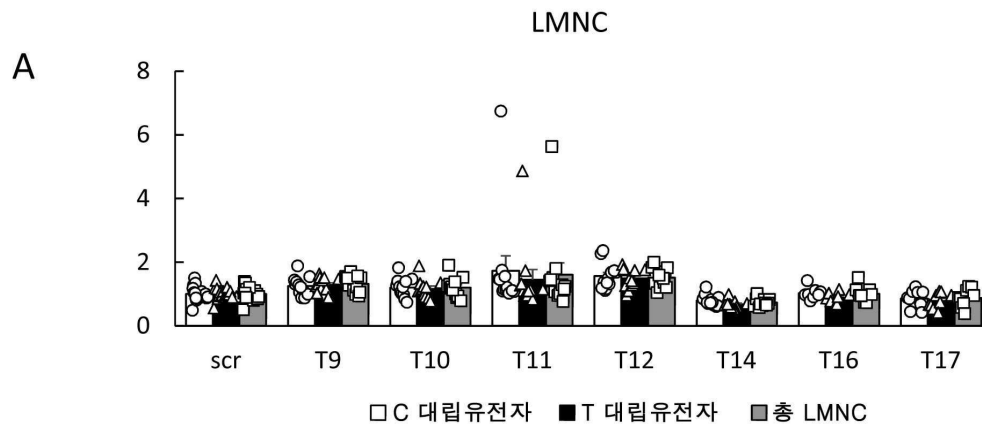
도면16c



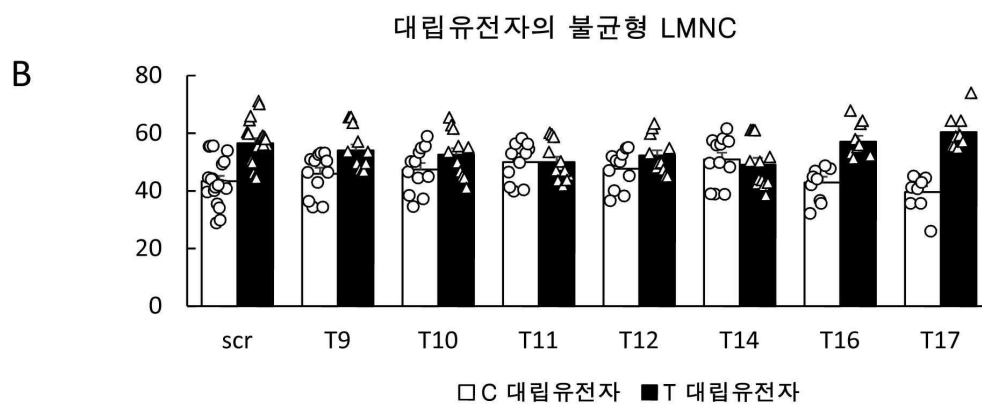
도면16d



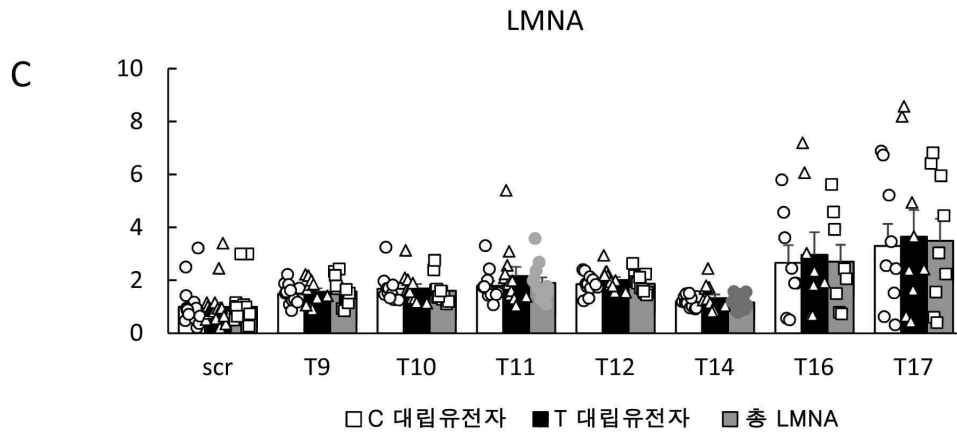
도면17a



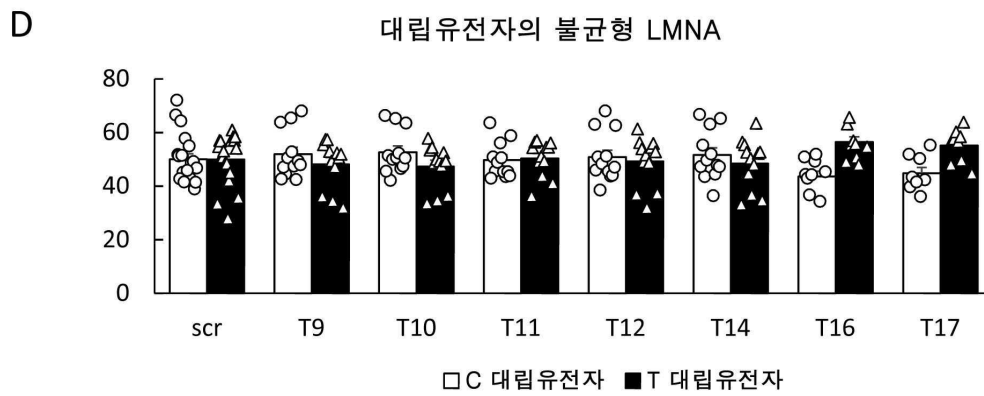
도면17b



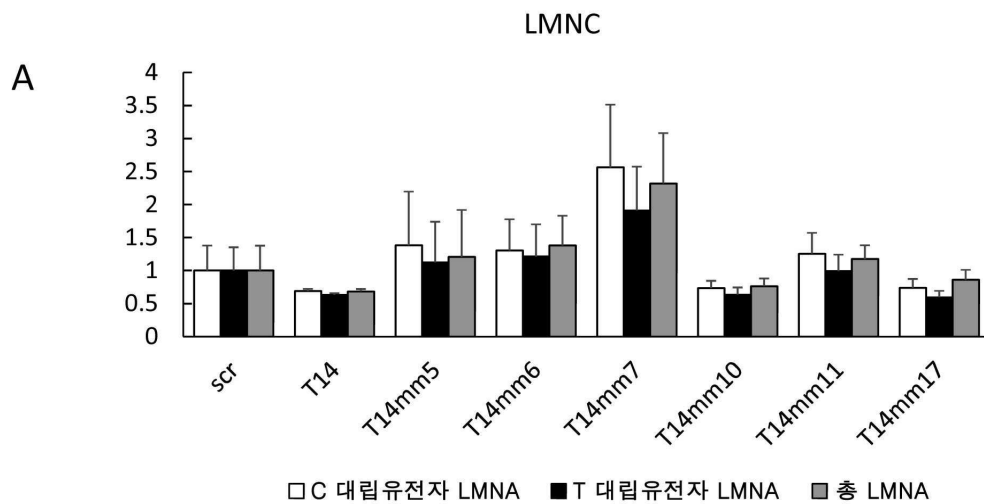
도면17c



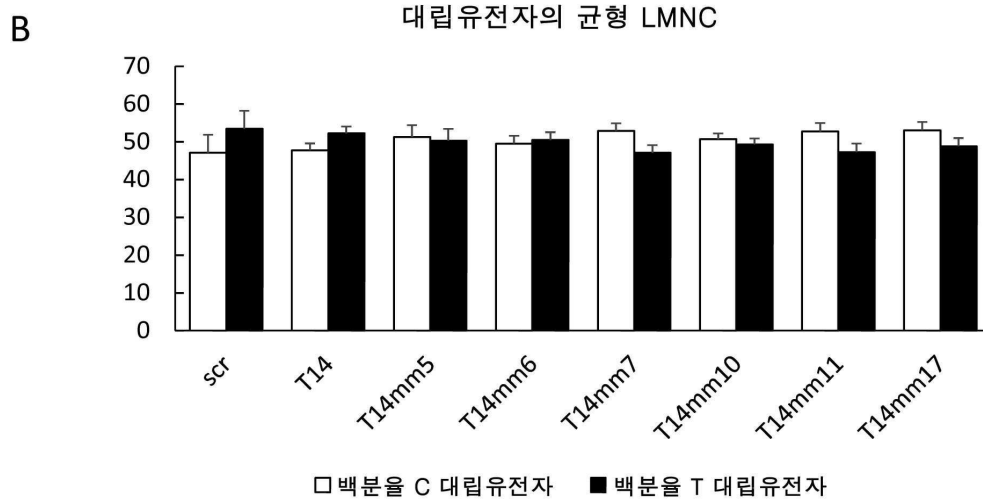
도면17d



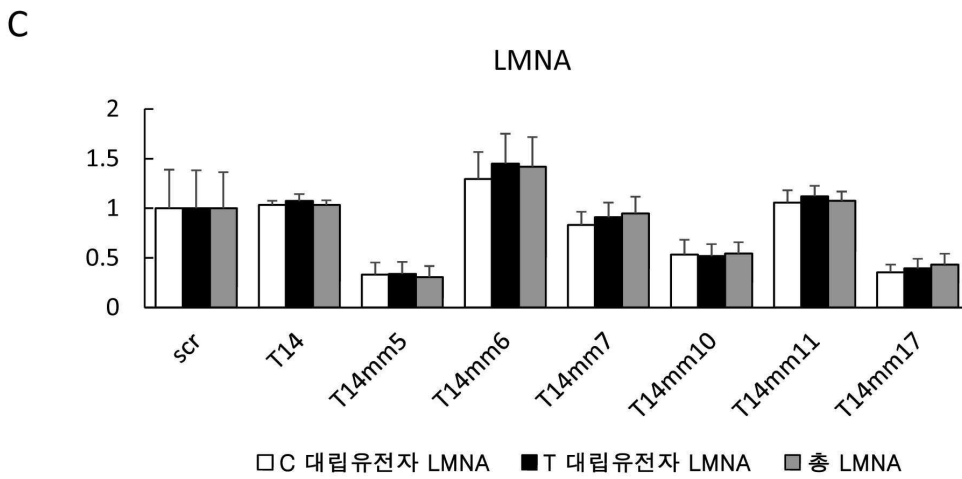
도면18a



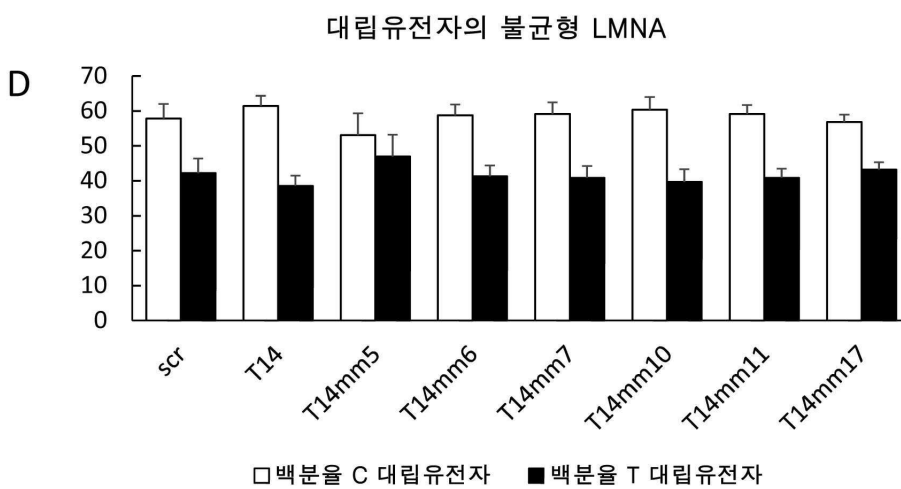
도면18b



도면18c



도면18d



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.