



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월07일

(11) 등록번호 10-2712926

(24) 등록일자 2024년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

C12N 9/40 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 38/465 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7013086

(22) 출원일자(국제) 2017년10월19일

심사청구일자 2020년09월09일

(85) 번역문제출일자 2019년05월07일

(65) 공개번호 10-2019-0060829

(43) 공개일자 2019년06월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/057328

(87) 국제공개번호 WO 2018/075736

국제공개일자 2018년04월26일

(30) 우선권주장

62/410,543 2016년10월20일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

JP2015527881 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아주 94804 리치먼드 스위트 에이 100 501 카날 불러바드

(72) 발명자

휴스턴 마샬 더블유.

미국 캘리포니아 94804 리치먼드 스위트 에이 100 커널 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내

(74) 대리인

특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 18 항

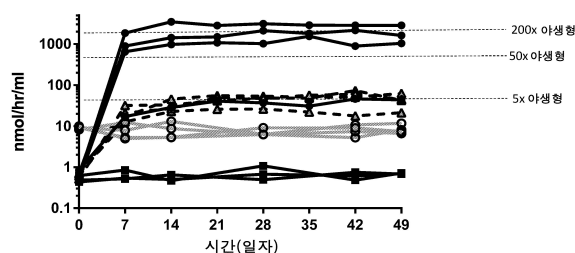
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 파브리병의 치료를 위한 방법 및 조성물

## (57) 요약

본 명세서에는 뉴클레아제, 및 이들 뉴클레아제를 사용하여 치료 알파-갈락토시다제 A(알파-Gal A) 단백질, 예컨대 효소를 암호화하는 서열을 세포 내로 삽입하고, 이로 인해 파브리병의 치료 및/또는 예방을 위한 단백질 또는 세포 요법을 제공한다. 또한, 적어도 하나의 알파-Gal A 단백질을 발현하기 위한 조성물이 제공된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 38/47* (2013.01)  
*A61K 48/0058* (2013.01)  
*A61K 48/0075* (2013.01)  
*A61P 3/00* (2018.01)  
*C12N 5/067* (2013.01)  
*C12N 9/2465* (2013.01)  
*C12Y 301/00* (2013.01)  
*C12Y 302/01022* (2013.01)  
*C12N 2510/00* (2013.01)

(30) 우선권주장

62/444,093	2017년01월09일	미국(US)
62/458,324	2017년02월13일	미국(US)
62/502,058	2017년05월05일	미국(US)
62/516,373	2017년06월07일	미국(US)
62/552,792	2017년08월31일	미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

알파 1-항트립신 (hAAT) 프로모터에 연결된 아포지질단백질 E (APOE) 인헨서, 인간 헤모글로빈 베타 (HBB)-IGG 인트론, 및 적어도 하나의 알파-갈락토시다제 A ( $\alpha$ -Gal A) 단백질을 암호화하는 cDNA 전이유전자를 포함하는, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 발현 작제물.

#### 청구항 2

알파 1-항트립신 (hAAT) 프로모터에 연결된 아포지질단백질 E (APOE) 인헨서, 인간 헤모글로빈 베타 (HBB)-IGG 인트론, 적어도 하나의 알파-갈락토시다제 A ( $\alpha$ -Gal A) 단백질을 암호화하는 cDNA 전이유전자, 및 폴리A 신호 서열을 포함하는, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 발현 작제물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, AAV 발현 작제물은 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 AAV 발현 작제물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 신호 펩타이드는  $\alpha$ -Gal A 신호 펩타이드인 것을 특징으로 하는 AAV 발현 작제물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, AAV 발현 작제물은 소 성장 호르몬 폴리 A 신호 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 AAV 발현 작제물.

#### 청구항 6

알파 1-항트립신 (hAAT) 프로모터에 연결된 아포지질단백질 E (APOE) 인헨서, 인간 헤모글로빈 베타 (HBB)-IGG 인트론,  $\alpha$ -Gal A 신호 펩타이드를 암호화하는 서열, 적어도 하나의 알파-갈락토시다제 A ( $\alpha$ -Gal A) 단백질을 암호화하는 cDNA 전이유전자, 및 소 성장 호르몬 폴리 A 신호 서열을 포함하는, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 발현 작제물.

#### 청구항 7

제1항, 제2항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 전이유전자는 야생형  $\alpha$ -GalA 서열 또는 코돈 최적화된  $\alpha$ -GalA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 AAV 발현 작제물.

#### 청구항 8

제2항에 있어서, 폴리A 신호 서열은 소 성장 호르몬 폴리 A 신호 서열인 것을 특징으로 하는 AAV 발현 작제물.

#### 청구항 9

제1항, 제2항, 제5항, 제6항, 및 제8항 중 어느 한 항의 AAV 발현 작제물을 포함하는 시험관내 세포.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 세포는 줄기 세포 또는 전구체 세포인 것을 특징으로 하는 시험관내 세포.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 세포는 간 또는 근육 세포인 것을 특징으로 하는 시험관내 세포.

#### 청구항 12

아데노-관련 바이러스 (AAV) 발현 작제물의 제조 방법으로서, AAV 발현 작제물은 제1항, 제2항, 제5항, 제6항, 및 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의  $\alpha$ -GalA 단백질을 암호화하는 전이유전자를 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제1항, 제2항, 제5항, 제6항, 및 제8항 중 어느 한 항의 AAV 발현 작제물을 포함하는, 파브리병을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 14

세포를 포함하는, 파브리병을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 세포는 제1항, 제2항, 제5항, 제6항, 및 제8항 중 어느 한 항의 AAV 발현 작제물을 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, AAV 발현 작제물은 비경구적으로 투여될 수 있도록 제제화되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, AAV 발현 작제물은 정맥내로 투여될 수 있도록 제제화되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, AAV 발현 작제물은 비경구적으로 투여될 수 있도록 제제화되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 18

제14항에 있어서, AAV 발현 작제물은 정맥내로 투여될 수 있도록 제제화되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호-참조

[0002] 본 발명은 미국가출원 제62/410,543호 (2016년 10월 20일 제출); 미국가출원 제62/444,093호 (2017년 1월 9일 제출); 미국 가출원 제62/458,324호 (2017년 2월 13일 제출); 미국 가출원 제62/502,058호 (2017년 5월 5일 제출); 미국가출원 제62/516,373호 (2017년 6월 7일 제출); 및 미국 가출원 제62/552,792호 (2017년 8월 31일 제출)의 이익을 주장하며, 이들은 전체로서 본원에 참고로 통합된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 파브리병의 예방 및/또는 치료 및 유전자 치료분야에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 유전자 치료는 새로운 영역의 인간 치료에 대한 높은 가능성을 갖는다. 이들 방법은 표준 의학 관행에 의해 해결되지 못했던 병태의 치료를 가능하게 할 것이다. 특히 유망한 하나의 영역은 전이유전자(transgene)가 세포에 첨가되어, 그 세포가 이전에 그 세포에서 생산되지 않았거나, 또는 반최적화 생산되었던 산물을 발현시키는 능력이다. 이러한 기술의 예에는 치료 단백질을 암호화하는 유전자의 삽입, 세포 또는 개인에서 다소 부족한 단백질을 암호화하는 암호화 서열의 삽입, 및 항시적인 핵산, 예컨대 마이크로RNA를 암호화하는 서열의 삽입이 포함된다.

[0006] 전이유전자는 다양한 방식에 의해 세포에 전달되어, 전이유전자가 세포 자체의 게놈에 통합되어 거기에 유지될 수 있게 된다. 최근 수년간, 전이유전자 통합을 위한 전략이 개발되었는데, 이는 선택된 게놈 좌위로의 표적화된 삽입을 위해 부위-특이적인 뉴클레아제에 의한 절단을 사용한다 (예를 들어, 공동-소유의 미국특허

7,888,121 참고). 뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 뉴클레아제 시스템, 예컨대 RNA 가이드 CRISPR/Cas 시스템 (조작된 가이드 RNA 사용)은 표적화 유전자에 특이적이며, 전이유전자 작제물이 상동성 유도 수선 (HDR) 또는 비-상동성 말단 연결 (NHEJ) 유도된 공정 동안의 말단 포획 중 어느 하나에 의해 삽입되도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 하기를 참고한다: 미국특허 9,394,545; 9,255,250; 9,200,266; 9,045,763; 9,005,973; 9,150,847; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 미국특허 공개 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130196373; 20140120622; 20150056705; 20150335708; 20160030477 및 20160024474를 참고하라 (상기의 기재 내용은 본원에 전체로서 참고된다).

[0007] 전이유전자는 다양한 방식으로 세포에 도입되고 유지될 수 있다. "cDNA" 접근에 따라, 전이유전자가 세포로 도입되고, 전이유전자는 세포의 염색사로 통합되기보다는 염색체-외부에 유지된다. 전이유전자는 원형 벡터 (예를 들어, 플라스미드, 또는 비-통합성 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 또는 렌티바이러스) 상에 유지될 수 있고, 상기 벡터는 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 폴리A 신호 서열, 인트론, 및 스플라이싱 신호 (미국공개 번호 20170119906)를 포함할 수 있다. 대안적인 접근은 고발현된 안전한 하버(harbor) 위치, 예컨대 알부민 유전자에 대한 전이유전자의 삽입과 관련된다 (미국특허 9,394,545 참고). 이러한 접근법은 생체내 단백질 대체 플랫폼(In Vivo Protein Replacement Platform)<sup>®</sup> 또는 IVPRP로 명명되었다. 이러한 접근법에 따라, 전이유전자는 뉴클레아제-매개 표적화 삽입을 통해 안전한 하버 (예를 들어, 알부민) 유전자로 삽입되며, 여기에서 전이유전자의 발현은 알부민 프로모터에 의해 유도된다. 전이유전자는 전이유전자에 의해 암호화된 단백질의 분비/배출을 도울 수 있는 신호 서열을 포함하도록 조작된다.

[0008] "안전한 하버" 좌위는 예컨대 인간 세포에서 AAVS1, HPRT, 알부민 및 CCR5 유전자, 및 쥐 세포에서 Rosa26와 같은 좌위를 포함한다. 예를 들어, 미국특허 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 미국특허 공개 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130177960 및 20140017212을 참고하라. 뉴클레아제-매개 통합은, 유전자 사일런싱 또는 근처의 암유전자의 활성화의 위험을 최소화하기 위한 정확한 전이유전자 위치 부여를 허용하기 때문에, 전이유전자의 무작위 통합에 의존하는 기존의 통합 접근법에 비해, 개선된 전이유전자 발현, 증가된 안전성 및 발현 지속성의 전망을 제공한다.

[0009] 표적 세포에 전이유전자를 전달하는 것이 이러한 기술을 완전히 실시하기 위해 극복해야만 하는 하나의 장애물이지만, 극복해야만 하는 또 다른 문제는 전이유전자가 세포에 삽입되어 발현된 이후, 그렇게 암호화된 유전자 산물이 유기체의 필요한 부분에 도달해야하고, 효능을 가지기에 충분한 국소 농도로 제조되어야 하는 것을 보장하는 것이다. 단백질의 결핍, 또는 이상 비-기능성 단백질의 존재를 특징으로 하는 질병에 대하여, 전이유전자 암호화 야생형 단백질의 전달은 매우 큰 도움이 될 수 있다.

[0010] 리소좀 저장 질병 (LSD)은 폐 지질, 당단백질 및 뮤코폴리사카라이드의 파괴와 통상 관련있는 기능성 개별 리소좀 단백질의 결핍을 특징으로 하는 희귀한 대사성 단일 유전자 질병의 그룹이다. 이들 질병은 세포 내의 이들 화합물의 축적을 특징으로 하며, 이는 특이적인 효소의 기능 부전에 기인하여 이들을 처리하여 재활용할 수 없기 때문이다. 가장 흔한 예는 (글루코세레브로시다제 결핍-유전자 명칭: GBA), 파브리병 ( $\alpha$  갈락토시다제 A 결핍- GLA), 헌터병 (이두로네이트-2-설파타제 결핍-IDS), 혈러병 (알파-L 이두로니다제 결핍- IDUA), 폼페병 (알파-글루코시다제 (GAA)) 및 니만-픽스병 (스핑고미엘린 포스포다이에스테라제 1 결핍- SMPD1)이다. 모두 함께 분류되는 경우, LSD는 군집 중에서 7000명당 약 1명의 출생 비율을 갖는다. 또한, 미국특허 공개 20140017212; 2014-0112896; 및 20160060656를 참고하라.

[0011] 예를 들어, 파브리병은  $\alpha$ -갈락토시다제 A 효소 ( $\alpha$ -GalA)의 결핍에 의해 유발된, 글리코스핑고지질 대사의 X-연관 장애이다. 이는 글로보트리아오실세라미드 (globotriaosylceramide) (또한, GL-3 및 Gb3으로도 알려짐) 및 글로보트리아오실스핑고신(Globosialosphingosine)(라이소-Gb3), 갈라비오아실세라미드, 및 그룹 B 물질을 포함하는 당스핑고지질의 점진적 침착과 관련이 있다. 질병의 증상은 다양한데, 작열감(burning), 따끔거리는 통증(tingling pain) [말단감각이상(acroparesthesia)], 또는 "파브리 위기(Fabry Crises)"라고 불리는 수분 내지 며칠 간에 걸쳐 일어날 수 있는 강렬한 통증들을 포함할 수 있다. 다른 증상에는 땀분비 장애, 낮은 운동 내성, 피각혈관종 (angiokeratoma)이라고 부르는 적색-자색 발진, 눈이상, 위장관 문제, 심장 문제, 예컨대 심장 비대 및 심근경색, 신부전 및 CNS 문제를 일으킬 수 있는 신장 문제가 포함되며, 일반적으로, 파브리 환자

에 대한 기대 수명은 실질적으로 짧다.

[0012] 파브리병에 대한 현재의 치료는 인간  $\alpha$ -GalA의 2개의 상이한 제제, 아갈시다제(agalsidase) 베타 또는 아갈시다제 알파에 의한 효소 대체 치료 (ERT)와 관계될 수 있으며, 이는 환자에 대해 2주마다 비용 및 시간 소모적인 투입 (통상, 약 0.2-1 mg/kg)을 요구한다. 이러한 치료는 단지 증상을 치료하기 위한 것이며, 치유적인 (curative) 것이 아니어서, 환자는 나머지 수명 동안 이들 단백질을 반복 투여하여야 하며, 잠재적으로 주입된 단백질에 대한 중화 항체를 개발할 수도 있다.

[0013] 게다가, 부작용은 ERT와 관련이 있는데, 이는 면역 반응, 예컨대  $\alpha$ -GalA 제제로 치료받은 피험체 내의 항- $\alpha$ -GalA 항체의 발달을 포함한다. 사실상, 아갈시다제 알파로 치료된 남성의 50%, 그리고 아갈시다제 베타로 치료된 남성의 88%는  $\alpha$ -GalA 항체를 발생시킨다. 중요하게는, 이들 항체의 상당한 부분은 중화 항체였고, 따라서 요법의 치료적 영향력을 감소시켰다 (Meghdari 등 (2015) PLoS One 10(2):e0118341. Doi:10.1371/journal.pone. 0118341). 추가로, ERT는 모든 환자에서 질병 진행을 멈추지 않는다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 따라서, 파브리병을 치료하는데 사용될 수 있는 비-ERT 방법 및 조성물에 대한 필요성이 남아있으며, 이에 는 게놈 편집을 통하여, 예를 들어 발현된 전이유전자 암호화 유전자 산물을 치료 관련 수준으로 전달하기 위한 치료가 포함된다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 개요

[0016] 본원에는 파브리병을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법 및 조성물이 기재되어 있다. 본 발명은 적합한 표적 세포 (예를 들어, 파브리병 피험체)에 전이유전자 서열을 삽입하는 방법을 기재하며, 상기 전이유전자는 질병을 치료하는 적어도 하나의 단백질을 (예를 들어, 적어도 하나의  $\alpha$ -GalA 단백질을) 암호화한다. 방법은 생체내 (살아있는 피험체의 세포에 전이유전자 서열을 전달함) 또는 생체의 (살아있는 피험체로의 변형된 세포의 전달)로 실시될 수 있다. 본 발명은 또한 발현 시스템을 갖는 적합한 표적 세포의 형질감염 및/또는 형질도입을 위한 방법에 대해서도 기재하며, 예를 들어  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자는 질병을 치료하는(예를 들어, 하나 이상의 관련 증상을 완화시키는) 단백질을 발현한다.  $\alpha$ -GalA 단백질은 표적 세포로부터 배출(분비)될 수 있어서, 전이유전자의 출입이 불가능한 다른 세포에 영향을 주거나, 또는 이에 의해 흡수될 수 있다 (교차 보정, cross correction). 본 발명은 또한 고수준의  $\alpha$ -GalA를 생산하는 세포 (예를 들어, 성숙한 또는 미분화 세포)의 생산을 위한 방법을 제공하며, 이때 이들 변형된 세포의 군집을 환자로 도입함으로써 필요한 단백질을 공급하여, 질병 또는 병태를 치료할 것이다. 추가로, 본 발명은 고효율 형태의(치료적)  $\alpha$ -GalA 를 생산하는 세포 (예를 들어, 성숙한 또는 미분화 세포)의 생산 방법을 제공하는데, 이 경우 환자 내의 이들 변형된 세포의 집단을 도입 또는 생성하는 것은 파브리병을 치료하는데 (예를 들어, 하나 이상의 증상을 감소 또는 제거하는데) 필요한 단백질 활성을 제공할 것이다. 본원에 기재된 바와 같이 제조된 고효율 형태의  $\alpha$ -GalA는 또한 본원에 기재된 세포로부터도 분리되어, 당업자에게 알려진 표준 효소 대체 공정을 사용하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

[0017] 본원에는 적어도 하나의  $\alpha$ -갈락토시다제 A ( $\alpha$ -Gal A) 단백질을 발현하기 위한 방법 및 조성물이 기재되어 있다. 상기 조성물 및 방법은 시험관내, 생체내 또는 생체의 사용을 위한 것일 수 있고,  $\alpha$ -Gal A 단백질을 암호화하는 GLA 전이유전자 (예를 들어, 야생형 또는 코돈 최적화 GLA 서열을 갖는 cDNA)를 암호화하는 적어도 하나의 세포에 투여하는 단계를 포함하여, 상기  $\alpha$ -Gal A 단백질이 세포 내에서 발현되게 할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 파브리병 피험체 내에 있다. 본원에 기재된 방법 중 어느 것에서, 전이유전자는 피험체의 간에 투여될 수 있다. 선택적으로, 상기 방법은 내인성 알부민 유전자를 절단하는 하나 이상의 뉴클레아제를 피험체의 간 세포에 투여하여, 전이유전자가 알부민 유전자로 통합되어, 이로부터 발현되게 하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 방법 중 어느 것에서, 전이유전자로부터 발현된  $\alpha$ -Gal A 단백질은 피험체 내의 당스핑고지질의 양을 적어도 2-배 감소시킬 수 있다. GLA 전이유전자는 추가 요소를 더 포함할 수 있는데, 이는 예를 들어 신호 펩타이드 및/또는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. (통합되거나 또는 염색체 외의) 외인성 GLA 전이유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포 (예를 들어, 줄기세포, 전구체 세포, 간 세포, 근육 세포 등) 도 또한 제공되는데, 이는 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 세포를 포함한다. 이들 세포는  $\alpha$ -Gal A 단백질을 파브



리병 피험체에, 예를 들어 세포(들)을 이를 필요로 하는 피험체에 투여하거나, 또는 대안적으로 세포에 의해 생산된  $\alpha$ -Gal A 단백질을 분리하여 상기 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에 투여함으로써(효소 대체 치료), 제공하는데 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 방법 중 어느 것에 사용하기 위해 (파브리병 치료에 사용하는 것을 포함), GLA 전이유전자를 포함하는 벡터 (예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 또는 Ad 또는 지질 나노입자)가 제공된다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 피험체의 세포 내에서 하나 이상의 치료(corrective) GLA 전이유전자를 암호화하는 전이유전자를 발현시키는 방법에 대해 기재하고 있다. 전이유전자는 적합한 표적 세포 (예를 들어, 혈액 세포, 간 세포, 뇌 세포, 줄기세포, 전구체 세포 등)의 게놈에 삽입되어, 그 치료 전이유전자에 의해 암호화된  $\alpha$ -GalA 산물이 세포의 게놈에 안정되게 통합되거나 (또한, "IVPRP<sup>®</sup>" 접근법으로도 지칭됨), 또는 대안적으로, 전이유전자는 세포 염색체-외부에 유지될 수 있다 (또한, "cDNA" 접근법으로도 지칭됨). 일 구현예에서, 치료 GLA 전이유전자는 대체 단백질의 시험관내 생산을 위한 세포주의 세포로 (안정되게 또는 염색체-외로) 도입되고, (선택적으로 정제 및/또는 분리된) 단백질은 추후 피험체에 투여되어 (예를 들어, 파브리병과 관련된 하나 이상의 증상을 감소 및/또는 치료함으로써) 파브리병 피험체를 치료할 수 있다. 특정 구현예에서, 치료 전이유전자에 의해 암호화된  $\alpha$ -GalA 산물은 비처리된 피험체에 비해, 피험체내 조직의  $\alpha$ -GalA 활성을 예를 들어, 2 내지 1000배 이상 (또는 그 사이의 임의의 값)의 양만큼 감소시키며, 이는 2 내지 100 배 (또는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 배를 포함하는, 그 사이의 임의의 값), 100 내지 500 배 (또는 그 사이의 임의의 값), 또는 500 내지 1000 배, 또는 그 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 또다른 측면에서, 본원에는 (예를 들어, 파브리병과 관련된 하나 이상의 증상을 감소 및/또는 제거함으로써) 파브리병 피험체를 치료하는 생체외 또는 생체내 방법이 기재되는데, 상기 방법은 GLA 전이유전자를 본원에 기재된 세포로 삽입하여 (cDNA 및/또는 IVPRP 접근법), 상기 단백질이 파브리병 피험체 내에서 생산되도록 하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, GLA 전이유전자를 포함하는 분리된 세포는 이를 필요로 하는 환자를, 예를 들어, 상기 세포를 파브리병 피험체에 투여함으로써 치료하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 치료 GLA 전이유전자는 체내 표적 조직에 삽입되어, 대체 단백질이 생체내에서 생산되게 된다. 일부 바람직한 구현예에서, 치료 전이유전자는 표적 조직의 세포의 게놈으로 삽입되는 반면, 다른 바람직한 구현예에서는 치료 전이유전자가 표적 조직의 세포로 삽입되어, 세포 염색체-외부에 유지된다. 본원에 기재된 방법 중 어느 것에서, 발현된  $\alpha$ -GalA 단백질은 세포로부터 분리되어 제2 표적 상에 작용하거나 또는 제2 표적에 의해 흡수되며, 이는 (예를 들어, 혈액으로의 배출을 통해) GLA 전이유전자가 결핍된 다른 조직의 다른 세포에 의한 흡수(교차 치료)를 포함한다. 일부 경우에, 1차 및/또는 제2 표적 조직은 간이다. 다른 경우에, 1차 및/또는 제2 표적 조직은 뇌이다. 다른 경우에, 1차 및/또는 제2 표적은 혈액 (예를 들어, 혈관)이다. 다른 경우에, 1차 및/또는 제2 표적은 골격근이다.

[0020] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 파브리병을 앓고 있는 피험체의 조직에 침착된 글로보트리아 오실세라마이드 (또한, GL-3 및 Gb3라고도 알려짐) 및 글로보트리아오실스핑고신(라이소-Gb3), 갈라비오아실레라미드를 포함하는 당스핑고지질의 양을 감소시키는데 사용된다. 특정 구현예에서, 치료 전이유전자에 의해 암호화된  $\alpha$ -GalA 산물은 비처리된 피험체에 비해, 피험체 조직 내의 당스핑고지질을 예를 들어, 2 내지 100배 이상 (또는 그 사이의 임의의 값)의 임의의 양만큼 감소되며, 이는 2 내지 100 배 (또는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 배를 포함하는 그 사이의 임의의 값)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본원에 기재된 방법 중 어느 것에서, 치료 GLA 전이유전자는 기능성 GLA 유전자의 야생형 서열을 포함하는 반면, 다른 구현예에서는, 치료 GLA 전이유전자의 서열은 강화된 생물학적 활성 (예를 들어, 생물학적 활성 증가에 최적화된 코돈, 및/또는 유전자 발현을 개선시키기 위한 전사 및 번역 조절 서열의 변화)를 주기 위해, 일부 방식으로 변경된다. 일부 구현예에서, GLA 유전자는 발현 특징을 개선시키기 위해 변형된다. 이러한 변경은 번역 개시 부위 (예를 들어 메티오닌)의 삽입, 최적화된 코작((Kozak)) 서열의 추가, 신호 펩타이드의 삽입, 및/또는 코돈 최적화를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 알부민 신호 펩타이드, F.IX 신호 펩타이드, IDS 신호 펩타이드 및/또는  $\alpha$ -GalA 신호 펩타이드로부터 선택될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, GLA 공여체는 도 1b, 도 1c, 도 10 및/또는 도 13 중 어느 것에 기재된 공여체를 포함할 수 있다.

[0022] 본원에 기재된 방법 중 어느 것에서, GLA 전이유전자는 뉴클레아제를 사용하여 표적 세포의 게놈에 삽입될 수 있다. 적합한 뉴클레아제의 비제한적인 예로는, 아연-핑커 뉴클레아제 (ZFN), TALEN (전사 활성화 유사 단백질 뉴클레아제) 및/또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템을 포함하며, 이는 세포의 게놈 내의 관심 영역 (예를 들어,

질병 관련 유전자, 고-발현된 유전자, 알부민 유전자, 또는 다르거나 안전한 하버 유전자) 내의 표적 부위, 및 하나 이상의 뉴클레아제 도메인 (예를 들어, 절단 도메인 및/또는 절단 반-도메인)에 결합하는 DNA-결합 분자를 포함한다. 절단 도메인 및 절단 반 도메인은 예를 들어, 다양한 제한 엔도뉴클레아제, Cas 단백질 및/또는 호밍 엔도뉴클레아제로부터 얻을 수 있다. 특정 구현예에서, 아연 핑거 도메인은 알부민 유전자 또는 적혈구 전구체 세포 (RBC) 내의 글로빈 유전자의 표적 부위를 인식한다. 예를 들어, 본원에 전체로서 참고된 미국특허 공보 2014001721를 참고하라. 다른 구현예에서, 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, TALEN, 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)은 안전한-하버 유전자, 예를 들어 CCR5 유전자, PPP1R12C (또한, AAVS1로도 알려짐) 유전자, 알부민, HPRT 또는 로사(Rosa) 유전자에 결합하여, 및/또는 이를 절단한다. 예를 들어, 미국특허 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 미국특허 공개 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130177960 및 20140017212을 참고하라. 뉴클레아제 (또는 이들의 구성요소)는 본원에 기재된 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, TALEN, 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로서 제공될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, mRNA일 수 있다. 일부 측면에서, mRNA는 화학적으로 변형될 수 있다 (예를 들어, Kormann 등, (2011) Nature Biotechnology 29(2): 154-157 참고). 다른 측면에서, mRNA는 ARCA 캡을 포함할 수 있다 (미국특허 제7,074,596호 및 제8,153,773호 참고). 추가적인 구현예에서, mRNA는 비변형 및 변형된 뉴클레오티드의 혼합물을 포함할 수 있다 (미국특허 공개 20120195936 참고). 다른 추가적인 구현예에서, mRNA는 WPRE 요소를 포함할 수 있다 (미국특허 공보 20160326548 참고).

[0023] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (선택적으로, 뉴클레아제를 사용하여 통합된) 원하는 GLA 전이유전자를 갖는 유전자 변형된 세포 (예를 들어, 줄기세포, 전구체 세포, 간 세포, 근육 세포 등)를 포함한다. 일부 측면에서, 편집된 줄기 또는 전구체 세포는 이후 확장되어, 생체외에서 성숙한 편집된 세포로 분화하도록 유도될 수 있으며, 이후 상기 세포가 환자에게 부여된다. 따라서, 본원에 기재된 유전적으로 편집된 (변형된) GLA-생산 줄기 또는 전구체 세포의 자손 세포가 본 발명에서의 사용을 위해 선택될 수 있다. 다른 측면에서, 편집된 전구체 (예를 들어, CD34+ 줄기세포)는 골수 이식에 주어지고, 이는 성공적인 이식 이후, 증폭되어 생체내에서 분화 및 성숙하는 편집된 세포를 생산하며, GLA 전이유전자로부터 생물학적으로 발현된 것들을 함유한다. 일부 구현예에서, 편집된 CD34+ 줄기세포는 환자에게 정맥내 부여되어, 편집된 세포는 골수로 이동하고, 분화 및 성숙하여, α-Gal A 단백질을 생산한다. 다른 측면에서, 편집된 줄기세포는 근육 조직에 추후 도입되는 근육 줄기세포이다. 일부 측면에서, 조작된 뉴클레아제는 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) (용어 "ZFN"은 한 쌍의 ZFN을 포함한다)이고, 다른 측면에서는 뉴클레아제는 TALE 뉴클레아제 (TALEN) (용어 "TALENs"는 한 쌍의 TALEN을 포함한다)이고, 다른 측면에서는 CRISPR/Cas 시스템이 사용된다. 뉴클레아제는 안전한 하버 좌위, 질병과 연관된 유전자, 또는 세포 내에서 고발현되는 유전자에 대한 특이성을 갖도록 조작될 수 있다. 오직 비-제한적 예시의 방식으로, 안전한 하버 좌위는 AAVS1 부위, CCR5 유전자, 알부민 또는 HPRT 유전자일 수 있으나, 반면 질병 관련 유전자는 GLA 유전자 암호화 α-갈락토시다제 A일 수 있다.

[0024] 또 다른 측면에서, (프로모터에 동작가능하게 연결된) 본원에 기재된 하나 이상의 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, ZFN 쌍, TALEN, TALEN 쌍 및/또는 CRISPR/Cas 시스템) 발현 벡터가 본원에 기재되어 있다. 일 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 추가적인 측면에서, (프로모터에 동작가능하게 연결된) 본원에 기재된 α-GalA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 GLA 발현 벡터가 본원에 기재되어 있다. 일 구현예에서, 발현은 바이러스 벡터이다.

[0025] 또다른 측면에서, 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, ZFN 쌍, TALEN, TALEN 쌍 및/또는 CRISPR/Cas 시스템) 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 α-GalA 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본원에 기재된다. 숙주 세포는 하나 이상의 뉴클레아제 발현 벡터를 갖도록 안정하게 형질전환되거나, 또는 일시적으로 형질감염되거나, 또는 상기의 조합이 될 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 간 세포이다.

[0026] 다른 구현예에서, 상기 방법은 본원에 기재된 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, ZFN 쌍, TALEN, TALEN 쌍 및/또는 CRISPR/Cas 시스템) (또는 상기 뉴클레아제를 암호화하는 하나 이상의 벡터) 및 상기 뉴클레아제에 의한 표적화 절단 이후 유전자 내로 삽입되는 "공여체" 서열 또는 GLA 전이유전자를 사용하여, 임의의 표적 유전자 내의 게놈 서열을 본원에 기재된 치료 GLA 전이유전자로 교체하기 위해 제공된다. 공여체 GLA 서열은 뉴클레아제 (또는 이의 구성요소)를 갖는 벡터 내에 존재하거나, 별개의 벡터 (예를 들어, Ad, AAV 또는 LV 벡터 또는 mRNA) 내에 존재하거나, 또는 대안적으로, 상이한 핵산 전달 기전을 사용하여 세포로 도입될 수 있다. 공여체 뉴클레오티드 서열의 표적 좌위 (예를 들어, 고발현된 유전자, 질병 관련 유전자, 다른 안전한-하버 유전자 등)로의 이러한 삽입으로, 표적 좌위 (예를 들어, 알부민, 글로빈 등)의 내인성 유전자 조절 요소의 조절 하에, GLA 전이유전자



가 발현되게 된다. 일부 측면에서, GLA 전이유전자의, 예를 들어 표적 유전자 (예를 들어, 알부민)로의 삽입은, 온전한  $\alpha$ -GalA 단백질 서열이 발현되게 하고, 표적에 의해 암호화된 임의의 아미노산 (예를 들어, 알부민)이 결핍된다. 다른 측면에서, 발현된 외인성  $\alpha$ -GalA 단백질은 융합 단백질이며, GLA 전이유전자, 및 GLA 전이유전자가 삽입된 내인성 좌위 (예를 들어, 내인성 표적 좌위 유래, 또는 대안적으로 표적 좌위의 서열을 암호화하는 전이유전자 상의 서열 유래)에 의해 암호화된 아미노산을 포함한다. 표적은 예를 들어, 안전한 하버 유전자, 예컨대 알부민 유전자, AAVS1 유전자, HPRT 유전자; CCR5 유전자; 또는 고-발현된 유전자, 예컨대 RBC 전구체 세포 내의 글로빈 유전자 (예를 들어, 베타 글로빈 또는 감마 글로빈)와 같은 임의의 유전자일 수 있다. 일부 경우에, 내인성 서열은 외인성  $\alpha$ -GalA 단백질의 아미노 (N)-말단 부위에 존재할 것이나, 다른 경우, 내인성 서열은 외인성  $\alpha$ -GalA 단백질의 카르복시 (C)-말단 부위에 존재할 것이다. 다른 경우에, 내인성 서열은  $\alpha$ -GalA 외인성 단백질의 N-말단 및 C-말단 부위 모두에 존재할 것이다. 일부 구현예에서, 내인성 서열은 세포로부터의  $\alpha$ -GalA 단백질의 분비 과정 동안 제거되는 분비 신호 펩타이드를 암호화한다. 내인성 서열은 전장 야생형 또는 돌연변이 내인성 서열을 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로, 부분적인 내인성 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자-전이유전자 융합체는 세포 내의 내인성 좌위에 위치하는 반면, 다른 구현예에서는 내인성 서열-전이유전자 암호화 서열이 게놈 내의 다른 좌위 (예를 들어, 알부민, HPRT 또는 CCR5 좌위에 삽입된 GLA-전이유전자 서열)에 삽입된다. 일부 구현예에서, GLA 전이유전자가 발현되어, 치료  $\alpha$ -GalA 단백질 산물이 세포 (예를 들어, 전구체 또는 성숙한 세포) 내에 보유된다. 다른 구현예에서, GLA 전이유전자는 막 단백질의 세포외 도메인에 융합되어, 발현시, 전이유전자  $\alpha$ -GalA 융합체는 치료 단백질의 표면 국제화를 유발시킬 것이다. 일부 측면에서, 세포외 도메인은 표 1에 나열된 단백질로부터 선택된다. 일부 측면에서, 편집된 세포는 막관통 단백질을 추가로 포함하여, 세포가 특정 조직형으로 이동한다. 일 측면에서, 막관통 단백질은 항체를 포함하나, 다른 측면에서는 막관통 단백질은 수용체를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 전구체 (예를 들어, CD34+ 또는 조혈 줄기세포) 또는 성숙한 RBC (본원에 기재된 유전자 변형된 GAL-생산 세포로부터 유래함)이다. 일부 측면에서, 전이유전자에서 암호화되는 치료  $\alpha$ -GalA 단백질 산물은 세포 외부로 배출되어, 전이유전자가 결핍된 세포에 영향을 미치거나 또는 상기 세포에 의해 흡수될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 치료  $\alpha$ -GalA 단백질을 혈류로 방출하여 원위 조직 (예를 들어, 신장, 비장, 심장, 뇌 등)에 작용하게 하는 간 세포이다.

[0027] 본 발명은 또한 알로제닉(allogenic) 산물로서 모든 환자에 보편적으로 사용될 수 있는, 파브리병 치료를 위한  $\alpha$ -GalA 치료 단백질을 함유하는 세포 (예를 들어, RBC)의 생산을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 이것은 예를 들어 파브리병 환자의 치료를 위한 단일 산물의 개발을 허용한다. 이들 담체는 막관통 단백질을 포함하여, 세포의 이동에 도움을 준다. 일 측면에서, 막관통 단백질은 항체를 포함하나, 다른 측면에서는 막관통 단백질은 수용체를 포함한다.

[0028] 일 구현예에서, GLA 전이유전자는 알부민 좌위로의 삽입 이후, 알부민 프로모터로부터 발현된다. GLA 전이유전자에 의해 암호화되는 생물학적 인자는, 전이유전자가 간 세포로 생체내 삽입되는 경우, 이후 혈류로 방출될 수 있다. 일부 측면에서, GLA 전이유전자는 바이러스 벡터 내에서 정맥내 주입을 통해 간으로 생체내 전달된다. 일부 구현예에서, 공여체 GLA 전이유전자는  $\alpha$ -GalA 암호화 서열의 앞에 코작 공통 서열을 포함하여 (Kozak (1987) Nucl Acid Res 15(20):8125-48), 발현된 산물은 알부민 신호 펩타이드가 결핍된다. 일부 구현예에서, 공여체  $\alpha$ -GalA 전이유전자는 원래의 GLA 신호 서열 대신에, 예컨대 알부민, IDS 또는 F9 유전자 유래의 대안적인 신호 펩타이드를 포함한다. 따라서, 공여체는 서열번호 1 내지 5에 나타난 신호 서열, 또는 신호 펩타이드로 작용하는 이들 서열과 동일성을 나타내는 서열 (예를 들어, 도 1b, 10, 13 및 25 참고)을 포함할 수 있다.

[0029] 일부 구현예에서, GLA 전이유전자 공여체는 전이유전자의 에피솜으로 유지 또는 염색체-외 유지를 위해, 세포로 형질 감염되거나 또는 형질도입된다. 일부 측면에서, GLA 전이유전자 공여체는 전이유전자 공여체의 발현을 조절하기 위해 조절 도메인을 포함하는 벡터 상에 유지된다. 일부 경우에, 전이유전자 발현을 조절하기 위한 조절 도메인은 발현될 전이유전자에 내재하는 도메인인 반면, 다른 경우에는, 조절 도메인은 전이유전자와는 이종이다. 일부 구현예에서, GLA 전이유전자는 바이러스 벡터 상에 유지되나, 다른 구현예에서는, 플라스미드 또는 미니 서클(mini circle) 상에 유지된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV, Ad 또는 LV이다. 추가적 측면에서, 전이유전자 공여체를 포함하는 벡터는 생체내에서 적합한 표적 세포에 전달되어, 전이유전자 공여체 벡터가 간 세포로 전달되는 경우, 상기 전이유전자 공여체에 의해 암호화된  $\alpha$ -GalA 치료 단백질이 혈류로 방출되게 된다.

[0030] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 GLA 전이유전자가 삽입되어, 이들 전구체로부터 유래한 성숙한 세포가 전이유전자에 의해 암호화되는 높은 수준의  $\alpha$ -GalA 산물을 함유하는, 전구체 세포 (근육 줄기세포, 전구 세포

(progenitor cell) 또는 CD34+ 조혈 줄기세포 (HSPC) 세포)에 대해 기재한다. 일부 구현예에서, 이들 전구체는 유도된 다능성 줄기세포 (iPSC)이다.

[0031] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 형질전환 동물 시스템의 생체내에서 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 형질전환 동물은 전이유전자가 인간  $\alpha$ -GalA 단백질을 암호화하는 모델 개발에 사용될 수 있다. 일부 경우에, 형질전환 동물은 상응하는 내인성 좌위가 녹아웃(knock out)될 수 있어서, 인간 단백질이 분리되어 연구될 수 있는 생체내 시스템의 개발을 가능하게 한다. 이러한 형질전환 모델은 관심 인간 단백질과 상호작용하거나 또는 이를 변형시킬 수 있는, 소분자, 또는 큰 생체 분자 또는 다른 독립체(entitiy)를 식별하기 위한 스크리닝 목적으로 사용될 수 있다. 일부 측면에서, GLA 전이유전자는 선택된 좌위 (예를 들어, 고발현된 또는 안전한-하버)가 본원에 기재된 임의의 방법 및 당업계의 기준에 의해 얻어진 줄기세포 (예를 들어, 배아 줄기세포, 유도된 다능성 줄기세포, 간 줄기세포, 신경 줄기세포 등) 또는 비-인간 동물 배아에 통합되고, 이후 배아가 이식되어 살아있는 동물이 태어난다. 동물은 이후 성장하여 성적으로 성숙하고 자손을 생산하며, 자손들 중 적어도 일부는 통합된 GLA 전이유전자를 포함한다.

[0032] 다른 추가적 측면에서, 본원에서는 핵산 서열을 염색체, 예를 들어 비-인간 배아의 염색체의 내인성 좌위 (예를 들어, 질병-관련, 고발현된, 예컨대 간 세포 내의 알부민 좌위, 또는 RBC 전구체 세포 내의 글로빈 좌위)로 부위-특이적으로 통합하기 위한 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 이하의 단계들을 포함한다:(a) 비-인간 배아에 (i) 적어도 하나의 DNA 벡터 (상기 DNA 벡터는 통합될  $\alpha$ -GalA 암호화 핵산 서열에 측접하는 상류 서열 및 하류 서열을 포함함), 및 (ii) 표적 좌위 내의 통합 부위를 인식하는 적어도 하나의 뉴클레아제 (아연 핑거, ZFN 쌍, TALE 뉴클레아제, TALEN 쌍 또는 CRISPR/Cas 시스템)을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 분자를 주입하는 단계; 및 (b) 상기 배아를 배양하여, 뉴클레아제 (ZFN, TALEN, 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)의 발현을 허용하는 단계로서, 상기 뉴클레아제에 의해 통합 부위로 도입된 이중 가닥 절단(double strand break)는 DNA 벡터에 의한 상동 재조합을 통해 수선되어, 상기 핵산 서열이 염색체 내로 통합되는 단계. 일부 구현예에서, 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 RNA이다.

[0033] 임의의 이전 구현예에서, 본 발명의 방법 및 화합물은 파브리병 피험체의 치료를 위해 다른 치료제와 조합될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법 및 조성물은 파브리 단백질의 정확한 폴딩을 보장하기 위한 분자 샤페론의 사용 (Hartl 등 (2011) Nature 465: 324-332)을 포함한다. 일부 측면에서, 샤페론은 잘-알려진 샤페론 단백질, 예컨대 AT1001 (Benjamin 등 (2012) Mol Ther 20(4):717-726), AT2220 (Khanna 등 (2014) PLoS ONE 9(7): e102092, doi:10.1371), 및 미갈라스타트(Migalastat) (Benjamin 등 (2016) Genet Med doi:10.1038/gim.2016.122)로부터 선택될 수 있다. 일부 측면에서, 방법 및 조성물은 혈액 뇌 장벽의 통과를 허용하는 방법 및 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 다른 측면에서, 방법 및 조성물은 피험체의 면역 반응을 억제한다고 알려진 화합물과 조합하여 사용된다.

[0034] 뉴클레아제 시스템 및/또는 본원에 기재된 GLA 공여체를 포함하는 키트도 또한 본원에 제공된다. 상기 키트는 하나 이상의 뉴클레아제 (ZFN, ZFN 쌍, TALENs, TALEN 쌍 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)를 암호화하는 핵산, 공여체 분자, 숙주 세포주에 적합한 단일-가이드 RNA를 암호화하는 발현 벡터, 본 발명의 방법을 실시하기 위한 지침 등을 포함한다 (예를 들어, RNA 분자 또는 ZFN, TALEN, 및/또는 CRISPR/Cas 시스템 암호화 유전자는 적합한 발현 벡터 내에 포함된다).

[0035] 이들 및 다른 측면은 전체로서 본원의 관점에서 당업자에게 쉽고 명백할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1a 내지 도 1c는 야생형  $\alpha$ -GalA 효소 및 초기 공여체 및 전이유전자 발현 카세트에 의해 수행된 효소 반응을 나타낸다. 도 1a는 Gb3 기질이 분해되는, 야생형 포유동물에서  $\alpha$ -GalA에 의해 수행되는 반응을 도시한다. 파브리(Fabry) 유기체에서, Gb3 기질은 독성 수준까지 축적한다. 도 1b는 cDNA로부터  $\alpha$ -GalA를 발현하는데 사용된 초기 바이러스 벡터를 도시하는 반면, 도 1c는 알부민 유전자 내로 뉴클레아제-매개된 삽입 후  $\alpha$ -GalA를 발현하는데 사용된 초기 바이러스 벡터를 도시한다.

도 2는 알부민-특이적 뉴클레아제(ZFN) 및 도 1c에 도시된 공여체로 형질도입된 세포의 7일의 기간에 걸친, HepG2/C3A 세포 배지에서 검출된  $\alpha$ -GalA 활성을 보여주는 그래프이다 (우측 패널에 도시된, 표지된 "IVPRP"는 "생체내 단백질 대체 플랫폼®"의 머리글자임). 모의(mock) 형질도입 과정을 거친 세포의 배지에서의 활성 수준이 좌측 패널에 표시된다. 좌측에서 우측으로의 막대 그래프는 3일, 5일, 7일 및 세포 단독에서의 활성을 보여

준다.

**도 3a 및 도 3b**는 cDNA 접근법을 사용하여 검출된  $\alpha$ -GalA 활성 수준을 나타내는 그래프이다. 도 3a는 도 1b에 도시된 cDNA 발현 카세트를 포함하는 다양한 용량의 AAV 바이러스에서 6일의 기간에 걸쳐 검출된, HepG2/C3A 세포 배지에서 활성을 나타낸다 (좌측에서 우측으로의 막대 그래프는 모의 형질감염, 10K, 30K, 100K, 300K, 1000K, 3000K 및 9000K를 나타냄). 도 3b는 실험의 최종 시점에서 도 3a의 세포의 세포 펠렛에서 검출된 활성을 나타내는 그래프이다.

**도 4a 및 도 4b**는 AAV를 함유하는 cDNA로 처리된 GLAKO 마우스에서의 생체내 활성을 나타내는 그래프이다. 도 4a는 cDNA 작제물을 포함하는 2.0e12 벡터 게놈/kg 체중(VG/kg) AAV2/6으로 처리된 각각의 개별 마우스에 대한 결과를 도시하는 반면, 도 4b는 2.0e13VG/kg AAV2/6-cDNA로 처리된 각 마우스에 대한 결과를 도시한다. 도 4a에서, 마우스 1마리를 지정일에 분자 샤페론 DGJ로 추가로 처리하였다. 또한, 두 도면에서 점선으로 표시된 것은 야생형 마우스에서 발견된  $\alpha$ -GalA 활성의 수준이다. 도시된 바와 같이, 처리된 마우스는 치료적으로 유리한 수준의 지표인 야생형 이상의 수준을 나타낸다.

**도 5a 내지 도 5f**는 GLAKO 마우스, 및 cDNA 작제물을 포함하는 AAV2/6으로 처리된 마우스에서의 Gb3 지질 기질의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 5a는 혈장에서 검출된 기질 수준을 도시하고, 도 5b는 심장 조직에서의 기질을 도시한다. 도 5c는 간에서 검출된 기질을 도시하고, 도 5d는 신장 조직에서 검출된 기질을 도시한다. 도시된 모든 조직에서, Gb3의 수준은 미처리된 GLAKO 마우스보다 낮다. 또한, 도 5d에는 이 검정을 위한 정량화(LLOQ)의 최저 수준이 도시되어 있다. 처리된 마우스에서의 Gb3 및 라이소-Gb3의 수준은 또한 미처리된 마우스 대비 발견된 기질의 양의 관점으로 표현되었다. 도 5e는 미처리된 GLAKO 마우스 대비 특정 조직에 잔존하는 Gb3의 퍼센트를 나타내고, 도 5f는 미처리된 GLAKO 마우스 대비 특정 조직에 잔류하는 라이소-Gb3의 퍼센트를 나타낸다. 도 5e 및 5f의 조직 데이터 세트는 막대 그래프가 (좌측에서 우측으로) 혈장, 간, 심장 및 신장의 데이터를 나타내는, 각각의 처리 그룹(미처리된 GLAKO, 저용량 및 고용량 처리된 GLAKO 및 야생형 마우스)에 대해 도시된다.

**도 6a 내지 도 6e**는 생체내에서 시험된 IVPRP 접근법에 대한 결과를 나타낸다. 도 6a는 경시적으로 도 1c에 나타낸, 전이유전자 공여체를 포함하는 AAV2/8 바이러스로 처리된 GLAKO 마우스의 혈장에서 검출된  $\alpha$ -GalA 활성을 도시하는데, 일부 마우스는 면역억제제를 부여받았다(실시예 4 참조). 야생형 마우스에서 발견되는 수준도 또한 도시된다. 도 6b는 90일째에 처리된 동물의 간에서 검출된 인델(indel)의 수준을 나타내는 그래프이다. 인델(삽입 및/또는 결실)은 뉴클레아제 활성의 지표이다. 도 6c, 6d 및 6e는 거의 30일의 기간에 걸쳐 처리된 마우스의 혈장에서 검출된 활성의 시간 경과이다. 도 6c는 저용량의 면역억제제로 추가로 처리된 동물에서의 활성을 도시하는 반면, 도 6d는 중간 정도 면역억제제로 처리된 동물에서의 활성을 나타내고, 도 6e는 높은 수준의 면역억제제로 처리된 동물을 나타낸다. 또한, 도 6c, 6d 및 6e에는 비교를 위해 야생형 마우스에서 발견된 수준(점선)이 도시되어 있다.

**도 7a 내지 도 7c**는 면역억제제("IS") 및 DGJ 샤페론 둘 다로 처리된 동물에서 경시적으로 검출된  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내는 그래프이다. 도 7a는 저수준의 면역억제제로 처리된 동물에 대한 결과를 도시하며, 이 때 화살표는 샤페론 투여의 타이밍 및 처리된 마우스를 나타낸다. 도 7a에서, 모든 마우스를 샤페론으로 처리하였으며, 결과는 활성이 증가함을 입증하였다. 도 7b는 2마리의 마우스가 DGJ로 처리된, 중간 정도 면역억제제 하의 동물에 대한 결과를 나타낸다. 이 두마리의 마우스는 혈장에서  $\alpha$ -Gal A 활성이 증가된 것으로 나타났다. 도 7c는 고용량의 면역억제제 하에 있는 마우스에 대한 결과를 도시하고, 3마리의 마우스가 DGJ로 처리된 경우를 다시 나타낸다. 이들 결과는 샤페론이 검출된 활성의 양을 증가시켰음을 입증한다. 점선은 비교를 위해 야생형 마우스에서 발견된 활성 수준을 나타낸다.

**도 8**은 cDNA 또는 IVPRP 접근법을 통해 처리된 마우스의 조직에서의  $\alpha$ -Gal A 활성의 비교를 나타내는 그래프이다. 또한, 비교를 위해 야생형 마우스 및 미처리된 GLAKO 마우스에서의 수준을 나타낸다. 표시된 조직은 간, 혈장, 비장, 심장 및 신장이다. Y축이 분할되며, 2.0e13VG/kg 용량에서의 cDNA 접근법은 야생형 수준의 거의 100배에 달하는  $\alpha$ -GalA 활성을 생성하였고, 시험한 모든 조직에서 그 활성을 검출할 수 있음을 알 수 있다.

**도 9a 내지 도 9c**는 cDNA 및 생체내 단백질 대체 플랫폼<sup>®</sup> (IVPRP) 접근법의 결과로서 검출된  $\alpha$ -GalA 활성 및 Gb3 지질 기질의 수준을 도시한다. 도 9a는 상이한 처리 그룹에서 검출된 평균 활성 수치를 나타낸다. 도 9b는 다양한 그룹에 대해 혈장, 간 및 심장 조직에서 검출된 Gb3의 양을 나타내며, cDNA 접근법이 야생형 마우스에 근접하는 Gb3의 감소를 초래함을 입증하며, 이는 전이유전자에서 발현된 단백질이 그것의 표적 기질 상에 효과적으로 작용함을 나타낸다. 도 9c는 도 9a의 표 (ZFN + 공여체 + DGJ 그룹은 도시되지 않음)로부터의 마우스의

$\alpha$ -GalA 활성의 양을 나타내는 그래프이다. cDNA 고용량 마우스( $2.0 \times 10^{13}$  vg/kg cDNA 공여체 벡터)는 흑색 선상에 흑색 원으로 도시되어 있다. cDNA 저용량 마우스( $2 \times 10^{12}$  vg/kg cDNA 공여체 벡터)는 점선 상에 음영 삼각형으로 도시되어 있다. 야생형 마우스는 회색 선에 흑색의 속이 빈 원으로 표시되고, GLAKO 마우스는 흑색 선에 흑색 정사각형으로 표시된다. 4마리의 고용량 cDNA 마우스 중 3마리가 야생형 마우스의 100배 이상의 수준을 보였다.

도 10은 IVPRP<sup>®</sup> 접근법에 사용된 다양한 예시적인 공여체 작제물 (변형체 #A 내지 #L; 또한, 변형체 A 내지 L로도 지칭됨)을 보여주는 개략도이다. 개략도의 약어는 다음과 같다: "ITR"은 AAV 역전된 말단 반복 영역이다. "HA-R" 및 "HA-L"은 ZFN 절단 부위에 축적한 알부민 서열과 상동성을 갖는 우측(R) 및 좌측(L) 상동성 아암이다. "SA"는 F9 유전자로부터의 스플라이스 수용체 부위인 반면, "HBB-IGG"는 인트론 서열이다. "GLAco"는 코돈 최적화된  $\alpha$ -GalA 암호화 서열인 반면, "GLAco v.2"는  $\alpha$ -GalA 암호화 서열의 대안적인 코돈 최적화이고, "bGHpA"는 소 성장 호르몬으로부터의 폴리A 서열이고, "GLA 신호 펩타이드"는 GLA 유전자로부터의 신호 펩타이드이며, "융합체"은 스플라이스 수용체 부위와 GLA 전이유전자 사이에 삽입된 2 내지 5개의 추가의 아미노산을 갖는 작제물을 지칭하며, "T2A" 및 "F2A"는 각각 *T. Assigna* 및 구제역 바이러스로부터의 자가-절단 서열이다. "IDS 신호 펩타이드"는 IDS 유전자의 신호 펩타이드인 반면, "FIX 신호 펩타이드"는 FIX 유전자로부터의 신호 펩타이드이다. "TI"는 전이유전자의 3'말단에 첨가된 5' NGS 프라이머 결합 서열, 및 이어서 야생형 유전자와 동일한 염기 조성을 갖는 표적화된 통합(TI)-특이적 서열이며, 이는 차세대 시퀀싱이 인텔 및 HDR-매개된 전이유전자 통합을 동시에 측정할 수 있도록 한다. 자세한 내용은 실시예를 참조한다.

도 11a 및 도 11b는 HepG2/C3A 세포에서의 시험관내  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내는 그래프이다. 도 11a에 도시된 것은 도 10에 나타낸 바와 같이, 초기 공여체 및 공여체 변이체 #A, #B 및 #E를 사용하여 세포 및 세포 상청액에서 검출된 활성이다. "Z + D"는 ZFN과 공여체 투여를 의미한다. 데이터는 변이체 #A 및 #B가 초기 공여체보다 더 큰 활성을 가졌다는 것을 나타낸다. 도 11b는 저용량 (300,000/600,000 VG/세포 ZFN/공여체) 또는 고용량 (600,000/1,200,000 VG/세포 ZFN/공여체)의 ZFNs와 GLA 공여체에서, 변이체 #A, #K, #J, #H 및 #I (변이체 A, K, J, H 및 I)를 비교하는  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내는 그래프이다. '공여체 단독' 데이터 세트는 임의의 ZFN없이 단지 공여체 작제물만을 처리한 세포를 나타낸다. 막대 그래프는 오차 막대 그래프로 표시된 표준 편차를 갖는 그룹 평균을 나타낸다. 데이터는 변이체 #K가 이 세트에서 최고 활성을 유도하는 것으로 나타났다.

도 12는 생체내 변이체 #A, #B 및 #E의 활성을 나타내는 그래프이다. GLAKO 마우스를 사용하였고, 혈장 샘플을 일주일에 한 번씩 채취하였다. 도 12는 주사 후 56일째 각 그룹의 데이터를 나타내며, 또한 비교를 위한 cDNA 접근법의 데이터도 나타낸다. 28일째에, "새로운" 변이체 공여체로 처리된 마우스는 초기 공여체보다 높은  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내었다. "초기" 공여체는 최적화 전에 사용된 공여체를 지칭하며, 도 10을 참조하여, 도 12에서 각각의 그룹의 좌측에 흑색 막대 그래프로 표시된다. cDNA 결과는 56일째에만 그래프의 우측 끝에 제시된다. 점선은 야생형 마우스의 활성 수준의 50-배를 나타내며, 이는 모든 샘플이 28일째에 야생형보다 적어도 40-배 이상의 활성을 나타내었음을 가리킨다.

도 13a 및 도 13b는 예시적인 cDNA 발현 카세트의 개략도이다. 도 13a는 이전에 기재된 cDNA 발현 시스템의 레이아웃을 나타내며(미국공개 번호 20170119906 참고), 여기서 GLA 암호화 서열은 상이한 코돈 최적화 프로토콜(DNA 2.0 v1 대 GeneArt v2, "GLAco v.2")을 사용하여 삽입된다. 도 13b는 대체 코돈 최적화 프로토콜에 의해 본 연구에서 사용된 cDNA 발현 카세트를 나타내며, IDS, FIX 또는 ALB 유전자로부터의 신호 펩타이드를 2개의 상이한 프로토콜을 사용하여 최적화된 GLA 암호화 서열과 조합하여 사용된, 변이체 #1 내지 #6 (변이체 1 내지 6이라고도 함)을 나타낸다.

도 14a 및 14b는 cDNA 접근법을 사용하여  $\alpha$ -GalA 활성의 발현을 나타내는 그래프이다. 도면에서, HepG2/C3A 세포를 지정 cDNA 작제물을 포함하는 AAV에 의해 형질도입하였고, 여기에서 도 13b에 나타낸 바와 같은 신호 펩타이드를 변화시키는 효과가 시험되었다.  $\alpha$ -Gal A 활성을 3일 및 5일째에 세포 상청액에서 측정하였고, 이 결과는 IDS 및 FIX(F9) 리더 서열이 GLA 또는 알부민(ALB) 리더 서열보다 더 높은 활성 수준을 유도하였음을 나타낸다. 도 14b는 변이체 #1, #2, #4, #5 및 #6에 대한 5일째의  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타낸다. 이들 연구에서, 세포는 AAV2/6 GLA cDNA 벡터의  $3.0 \times 10^5$  VG/세포를 부여받았다. 막대 그래프는 그룹 평균을 나타내고, 오차 막대 그래프는 표준 편차를 나타낸다.

도 15a 내지 도 15c는 혈장(도 15a) 또는 선별된 조직(도 15b)에서의  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타내는 그래프이다. GLAKO 마우스는 알부민 인트론 1에 이중-가닥 절단을 생성하도록 설계된  $3 \times 10^{11}$  VG의 ZFN, 및  $1.2 \times 10^{12}$  VG의 초기 GLA 공여체 작제물 또는 변이체 A, B, E 또는 J (총 AAV 용량/마우스 =  $6 \times 10^{13}$  VG/kg)를 주사받았다. 도 15a는 매 주 또는 격주 평가로 2개월 동안 추적된 마우스에서의 플라스미드  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타낸다. 좌측 패널은 초기

공여체, 변이체 A, 변이체 E 또는 변이체 B를 받은 동물의 결과를 도시한다. 우측 패널은 변이체 E 또는 J를 받은 동물 또는 야생형 동물의 결과를 도시한다. 도 15b는 도 15a에 도시된 동물을 희생시킨 후 분석된 간, 심장, 신장 및 비장에서 측정된  $\alpha$ -GalA 활성을 도시한다. 도 15b의 좌측 상의 그래프는 초기 GLA 공여체 작제물(각각의 그룹에서 가장 왼쪽 막대 그래프에 나타난 "초기"), 변이체 A(각각의 그룹에서 좌측으로부터 두번째 막대 그래프), 변이체 B(각각의 그룹의 중간 막대 그래프), 변이체 E(각각의 그룹의 오른쪽에서 두번째 막대 그래프) 및 야생형 동물(각각의 그룹의 가장 오른쪽 막대 그래프에 도시된 "야생형")로 처리한지 2개월 후의 데이터를 나타낸다. 도 15b의 우측 그래프는 변이체 E 및 J에 대한 활성을 나타내며, 각각의 데이터 세트에서, 미처리된 GLAKO 마우스의 활성은 가장 왼쪽 막대 그래프로 표시되고; 야생형 마우스에서의 활성은, 각 그룹의 왼쪽에서 두번째 막대 그래프로 표시되고; 변이체 E로 처리된 GLAKO 마우스에서의 활성은 왼쪽에서 세번째 막대 그래프로 표시되는 반면, 변이체 J에 대한 활성은 가장 오른쪽 막대 그래프로 표시된다.  $\alpha$ -Gal A는 혈장 및 GLA 공여체 변이체 A, B, E 및 J에 대한 모든 측정된 조직에서 야생형보다 다수-배 많았다. 도 15c는 혈장  $\alpha$ -GalA 활성 수준을 도시하고, 여기서 ZFN 쌍과 변이체 A 공여체로 처리된 각각의 마우스에 대한 데이터가 표시된다. 이는 도 15a에서 마우스에 대한 데이터가 그룹으로 도시되어 있는 것을 제외하면 변이체 A로 표시된 도 15a에 도시된 것과 동일한 실험인 반면, 도 15c에서는 데이터가 각각의 처리된 마우스에 대해 도시되어 있는 것을 유의하라.

**도 16a 및 도 16b**는 ZFN + 상이한 공여체 변이체로 처리한 후에 잔류하는  $\alpha$ -GalA 당지질 기질 (Gb3 및 라이소-Gb3)의 양을 나타내는 그래프이다. 질량 분광광도법을 통해 혈장, 심장, 간, 신장 및 비장(비장 데이터는 도시되지 않음)에서의 Gb3 (도 16a) 및 라이소-Gb3 (도 16b) 함량을 측정하였다. 각각의 데이터 세트는 (각각의 그룹에서 좌측에서 우측으로) 혈장, 간, 심장 및 신장의 수준을 도시한 4개의 그룹으로 나타낸다. 기질의 양은 미처리된 GLAKO 마우스 대비 잔류 분획으로 표현된다. Gb3 및 라이소-Gb3의 양 모두는 GLA 공여체 변이체 A, B 또는 E로 처리된 마우스의 조직에서 크게 감소되었다.

**도 17a 내지 도 17c**는  $\alpha$ -Gal A 단백질을 탈당화 효소 PNGaseF 또는 EndoH로 처리하는 효과를 나타낸다. 도 17a는 IVPRP 접근법에 의해 처리된 동물의 마우스 간으로부터 유래된 균질물로부터 제조된 웨스턴 블랏을 나타낸다. 야생형 마우스('WT')로부터의 샘플, 미처리된 GLAKO 마우스('GLAKO') 및 재조합 인간 Gal A의 샘플('rec. hGal A'), 뿐만 아니라 3마리의 마우스 샘플이 최상부 패널('GLA 공여체 변이체 A'로 표시됨)에 도시되어 있다. 하부 패널에는 'GLA 공여체 변이체 J'로 표시된 2개의 마우스 샘플이 야생형 마우스 샘플 및 미처리된 GLAKO 마우스 샘플, 뿐만 아니라 재조합 인간 Gal A의 샘플과 함께 도시된다. 두 블랏 상의 (+) 및 (-)는 PNGase F 또는 Endo H.에 의한 처리를 나타낸다. 도 17b는 마우스가 cDNA 접근법("초기" 작제물)을 사용하여 처리된 것을 제외하고는 도 17a에 기재된 바와 같이 제조된 웨스턴 블랏을 나타낸다. 도 17c는 복잡한 당화 구조에 대한 PNGaseF 절단을 도시하는 개략도이다. 데이터는 IVPRP<sup>®</sup> 또는 cDNA 접근법 이후 처리된 GLAKO 동물에서 발현된 GalA 효소가 PNGaseF 처리 후 탈당화된 인간 재조합 단백질과 유사한 탈당화를 나타낸다는 것을 입증한다.

**도 18a 내지 도 18c**는 변이체 #4 (상기 도 13b에 도시됨)와 비교된, 초기 cDNA 작제물을 사용하여 측정된 활성을 나타내는 그래프이다. 도 18a는 지정된 바와 같이 AAV2/6을 포함하는 2e12 VG/kg GLA cDNA로 처리된 GLAKO 마우스에서의 혈장  $\alpha$ -GalA 활성을 나타낸다. 활성은 주사 후 최대 60일 동안 측정되었다. 도 18b는 도 18a의 마우스에서 지정 바와 같은 조직에서의  $\alpha$ -GalA 활성을 나타낸다. 데이터 세트는 좌측에서 우측으로 GLAKO 미처리된 마우스(가장 왼쪽 막대 그래프); 야생형 마우스(왼쪽에서 두번째 막대 그래프); 초기 cDNA 변이체로 처리된 GLAKO 마우스(왼쪽에서 세번째 막대 그래프); 및 cDNA 변이체 D로 처리된 GLAKO 마우스에서  $\alpha$ -GalA 활성을 나타낸다. 수평 점선은 참조용 야생형 수준의 10배에 해당하는 활성을 나타낸다. 도 18c는 cDNA 변이체 #4로 처리된 3마리의 GLAKO 마우스의 간에서 인간  $\alpha$ -GalA를 검출하는 웨스턴 블랏을 나타낸다. 비교를 위해, 야생형 마우스("WT") 및 미처리된 GLAKO 마우스 활성이 도시된다. 비교 목적을 위해 재조합 hGalA도 도시되어 있다. 샘플을 도 17에 기재된 바와 같이 PNGaseF 또는 EndoH로 처리했다.

**도 19**는 초기 cDNA 작제물로 처리한 마우스의 혈장내  $\alpha$ -Gal A 활성의 수준을 나타내는 그래프이다(도 13에 도시됨). 각각의 그룹을 1.25e11 내지 5.0e12 vg/kg의 지정 용량의 작제물을 포함하는 AAV로 처리하였다 (실선, 그룹 평균값은 오차 막대 그래프로 표시됨). 야생형 및 미처리된 GLAKO 마우스도 포함되었으며, 도면에 표시되어 있다.

**도 20a 및 도 20b**는 변이체 E 및 J의 생체내 발현 후 검출된  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내는 그래프이다. 도 20a는 GLAKO 마우스에 대한 알부민 특이적 ZFN, 및 변이체 E 또는 변이체 J 공여체의 처리후, 혈장에서 검출된  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타낸다(도 10 참조). 도 20b는 다양한 관심 조직(간, 심장, 신장 및 비장)에서 검출된  $\alpha$ -GalA 활성



을 나타낸다. 도 20b의 각각의 데이터 세트에서, 막대 그래프는 좌측에서 우측으로 GLAKO 마우스, 야생형(WT) 마우스, 변이체 E 공여체 또는 변이체 J 공여체에 대한 결과를 나타낸다.

**도 21a 및 도 21b**는 다양한 관심 조직(혈장, 간, 심장 및 신장)에서 검출된  $\alpha$ -Gal A 기질의 양을 나타내는 그래프이다. 도 21a는 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 GB3의 양을 퍼센트로 나타낸 것이다. 도 21b는 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 라이소-Gb3의 양을 퍼센트로 나타낸 것이다. 도 21a 및 도 21b 모두에서, 좌측에서 우측으로의 각각의 데이터 세트는 혈장, 간, 심장 및 신장에서 검출된 결과를 나타낸다.

**도 22**는 GLA 전이유전자의 뉴클레아제-매개된 표적화 통합 후, 파브리병의 GLAKO 마우스 모델에서의 간세포의 영구적 변형을 나타낸 그래프이고, 이는 지정 조건 하에서 처리된 간세포에서 인텔의 백분율을 나타낸다.

**도 23a 및 도 23b**는 통합된 전이유전자로부터 발현되어, 혈류로 분비되고, 2차 조직에 의해 흡수된  $\alpha$ -Gal A를 나타내는 그래프이다. GLAKO 마우스를 ZFNs와 두 hGLA 공여체 작제물 중 하나로 처리하였다. 도 23a는 지정 작제물로 처리된 동물 또는 미처리된 동물로부터의 혈장내 GalA 활성을 나타낸다. 도 23b는 지정 조건 하의 지정 조직(간, 비장, 심장 및 신장)에서의 GalA 활성을 나타낸다. 가장 좌측의 막대 그래프는 미처리된 동물에서의 활성을 나타내고; 좌측에서 두번째 막대 그래프는 공여체 변이체 E로만 처리된 동물의 활성을 나타내고; 가운데 막대 그래프는 야생형 동물의 활성을 나타내고; 우측에서 두번째 막대 그래프는 ZFN 및 공여체 변이체 A로 처리된 동물에서의 활성을 나타내고; 및 가장 우측 막대 그래프는 ZFN 및 공여체 변이체 E로 처리된 동물에서의 활성을 나타낸다. 미처리된 GLAKO 마우스, 미처리된 야생형 마우스, 및 공여체로 처리되었으나 ZFN로는 처리되지 않은 GLAKO 마우스를 대조군으로 포함시켰다. 안정적인 혈장 활성은 야생형의 최대 80-배에 도달했다. 그래프는 시간 경과에 따른 혈장  $\alpha$ -Gal A 활성 및 연구 종결시의 조직 활성을 나타낸다(56일).

**도 24a 및 도 24b**는 표시된 조직에서의 파브리 기질 함량을 나타내는 그래프이다. 도 24a는 Gb3 함량을 나타내고, 도 24b는 지정 조건에서 미처리 GLAKO 마우스로부터의 라이소-Gb3 함량을 감소율(%)로서 나타낸다. 각각의 조건하의 막대 그래프는 좌측에서 우측으로 혈장, 간, 심장 및 신장의 수준을 보여준다. ZFN으로 처리된 마우스 및 hGLA 공여체의 변이체는 기질 함량을 크게 감소시켰다.

**도 25a 및 도 25b**는 변이체 L 및 변이체 M의 개략도, 및 야생형 알부민 유전자 좌위로의 표적화된 통합을 도시한다. 도 25a는 변이체 L 및 M을 나타내고, 변이체 M은 GLA 신호 펩타이드보다는 IDS 신호 펩타이드를 포함한다는 점에서 변이체 L과 상이하다는 것을 보여준다. 약어는 도 10에 기재되어 있다. 도 25b는 알부민 유전자 좌위로의 GLA 전이유전자의 통합을 나타낸다. "TI"는 전이유전자의 3' 말단에 첨가된 5' 차세대 서열분석(NGS) 프라이머 결합 서열, 및 이어서 야생형 유전자좌와 동일한 염기 조성을 갖는 표적화된 통합(TI)-특이적 서열이며, 이는 차세대 서열분석을 하여 인텔 및 HDR-매개된 전이유전자 통합을 동시에 측정할 수 있게 한다.

**도 26a 및 도 26b**는 지정 공여체를 사용하여 지정 투약량에서의 인간 혈액암종(hematocarcinoma) 세포주 HepG2로의 변형(% 인텔 또는 % TI)을 나타내는 그래프이다. 도 26a는 변이체 L 공여체를 사용한 결과를 나타내며, 도 26b는 변이체 M 공여체를 사용한 결과를 나타낸다.

**도 27a 및 도 27b**는 간-생성된  $\alpha$ -Gal A가 어떻게 혈류로 분비되고 이차 조직에 의해 흡수되는지를 나타내는 그래프이다. IDS 신호 펩타이드 및 표적화된 통합(TI)의 분석을 위한 3' 서열을 함유하는 GLA 공여체 작제물을, GLAKO 마우스의 처리에 사용하였다. 도 27a는 표시된 작제물로 처리된 동물 또는 미처리된 동물로부터의 혈장에서의 GalA 활성을 나타낸다. 도 27b는 지정 조건 하에서 상기 표시된 조직(간, 비장, 심장 및 신장)에서의 GalA 활성을 나타낸다. 가장 좌측의 막대 그래프는 미처리된 동물에서의 활성을 나타내고; 좌측에서 두번째 막대 그래프는 공여체 변이체 M으로만 처리된 동물에서의 활성을 나타내고; 가운데 막대 그래프는 야생형 동물에서의 활성을 나타내고; 우측에서 두번째 막대 그래프는 ZFN 및 공여체 변이체 M으로 저용량 처리된 동물에서의 활성을 나타내고; 및 가장 우측 막대 그래프는 ZFN 및 공여체 변이체 M으로 고용량 처리된 동물에서의 활성을 나타낸다. 도시된 바와 같이, 야생형보다 최대 250배의 안정한 혈장 활성이 관찰되었고, 심장 및 신장에서의  $\alpha$ -Gal A 활성은 각각 야생형의 20배 및 야생형의 4배 이상이였다.

**도 28a 및 도 28b**는 GLA 작제물을 포함하는 간 특이적 작제물로 처리된 세포에서의  $\alpha$ -GAL A 활성을 나타내는 그래프이다. 도 28a는 HepG2 세포 상청액에서의 활성을 나타내고, 도 28b는 도 28a에 도시된 바와 같이 처리되거나 미처리된 HepG2 세포로부터의 상청액의 존재 하에 배양된 K562 세포 펠릿에서의 활성을 나타낸다.

**도 29**는 1.25e11 내지 5.0e12 VG/KG의 초기 cDNA 작제물(실선, 그룹 평균, 그룹당 n = 4 내지 7)을 투여한 GLAXO 마우스의 혈장내  $\alpha$ -GAL A 활성, 및 이후 6개월간의 활성을 나타내는 그래프이다. 야생형(회색 점선, 화살표로 표시됨) 및 미처리된 GLAKO 마우스(흑색 점선, 화살표로 표시됨)도 나타낸다.

도 30은 지정 투약량으로 처리 후 6개월 쯤에 지정 조직(간, 비장, 심장 및 신장)에서의  $\alpha$ -GalA 활성을 나타내는 그래프를 도시한다. 야생형 동물 및 미처리된 동물도 도시된다.

도 31은 1.25e11 내지 5.0e12 VG/KG의 초기 cDNA 작제물을 갖는 GLAKO 마우스에서의 지정 조직(간, 비장, 심장 및 신장)에서 파브리 기질 Gb3 함량의 용량-의존적 감소를 미처리된 GLAKO 마우스(그룹 평균, 그룹당 n = 4 내지 7)로부터의 감소율(%)로서 나타내는 그래프를 도시한다. 마우스는 측정된 모든 조직에서 Gb3 함량의 용량-의존적인 감소를 나타내었다.

도 32a 및 도 32b는 지정 처리 프로토콜 후에 다양한 관심 조직(혈장, 간, 심장 및 신장) 내의 잔류 Gb3 기질의 퍼센트를 나타내는 그래프이다 (도 18도 참조하라). 도 32a는 미처리된 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 GB3의 양을 퍼센트로 나타낸 것이다. 도 32b는 미처리된 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 라이소-Gb3의 양을 퍼센트로 나타낸 것이다. 도 32a 및 32b 모두에서, 좌측에서 우측으로의 각각의 데이터 세트는 혈장, 간, 심장 및 신장에서 검출된 결과를 나타낸다.

도 33a 및 도 33b는 지정 처리 프로토콜 후에 다양한 관심 조직(혈장, 간, 심장 및 신장) 내에 잔류하는 Gb3 기질의 퍼센트를 나타내는 그래프이다 (도 27도 참조하라). 도 33a는 미처리된 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 GB3의 양을 퍼센트로 나타낸다. 도 33b는 미처리된 GLAKO 마우스(100%로 설정)에서 검출된 라이소-Gb3의 양을 퍼센트로 나타낸다. 도 33a 및 33b 모두에서, 좌측에서 우측으로의 각각의 데이터 세트는 혈장, 간, 심장 및 신장에서 검출된 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 파브리병을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물이 본 명세서에 개시된다. 본 발명은 유전자가 간에서 발현되고 치료적(대체) 단백질을 발현하도록, 파브리병 피험체에서 결핍되거나 불충분하게 발현되는 단백질을 암호화하는 GLA 전이유전자를 삽입하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 높은 수준의 치료제를 생산하는 하는 세포(예를 들어, 전구체 또는 성숙한 RBC, iPSC 또는 간세포)의 변형을 기술하는데, 이러한 변형화된 세포의 모집단을 환자로 도입하면 필요한 단백질을 공급할 수 있을 것이다. 전이유전자는 이를 필요로 하는 환자에게 치료적으로 유리한 목적 단백질 또는 구조적 RNA를 암호화할 수 있다.

[0038] 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 결함있는 효소 및/또는 파브리병에서 결핍된 효소를 대체하기 위해 임의의 유전자좌 (예를 들어, 고도로 발현된 알부민 유전자좌) 유래의 하나 이상의 치료적으로 유리한  $\alpha$ -GalA 단백질을 전이유전자로부터 발현시키는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 전이유전자 서열을 간세포와 같은 세포내의 고도로-발현된 유전자좌에 삽입함으로써, 파브리병의 치료(하나 이상의 증상의 경감 포함)를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명에는 바이러스 벡터를 통해 이를 필요로 하는 피험체의 간으로  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자를 전달하기 위한 방법 및 조성물이 본 발명에 포함되는데, 이 때 바이러스는 말초 정맥 시스템(peripheral venous system)으로의 주입, 또는 간-지향된 혈관(예를 들어, 문맥)으로의 직접 주사를 통해 도입된다. 상기 방법 및 조성물은 안전한 하버 유전자좌(예를 들어, 알부민) 내로의 전이유전자의 삽입을 유도하는데 사용될 수 있거나, 또는 간 세포내 바이러스성 cDNA 작제물을 염색체외에 유유도키는데 사용될 수 있다. 어느 경우에도, 전이유전자는 고도로 발현되며, 이를 필요로 하는 파브리 환자에게 치료적 이점을 제공한다.

[0039] 또한, 전이유전자는 최종 이식에 사용하기 위해, 환자 유래된 세포, 예를 들어 환자 유래된 유도만능 줄기세포(iPSCs) 또는 다른 유형의 줄기세포(배아 또는 조혈)로 도입될 수 있다. 특히 그것이 필요한 환자에게 이식하기 위해 치료적 전이유전자의 조혈 줄기세포로의 삽입이 유용하다. 줄기세포는 성숙한 세포로 분화되기 때문에, 이들은 조직에 전달하기 위한 높은 수준의 치료적 단백질을 함유할 것이다.

### [0040] 일반적 사항

[0041] 본 명세서에 개시된 조성물의 제조 및 용도, 뿐만 아니라 방법의 실시는 달리 명시되지 않는 한, 분자생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 전산 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 및 해당 관련 분야의 종래 기술을 사용한다. 이들 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예를 들어, 하기를 참조한다: Sambrook 등 MOLECULAR CLONING: LABORATORY MANUAL, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 및 제3판, 2001; Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 및 주기적 업데이트; METHODS IN ENZYMOLOGY 시리즈, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, 제3판, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman 및 A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 및 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin

Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

- [0042] 정의
- [0043] 용어들 "핵산(nucleic acid)", "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)" 및 "올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)"는 상호교환적으로 사용되며, 선형 또는 원형의 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 이들 용어는 중합체의 길이가 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 상기 용어는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체, 뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 인산 모이어티(예를 들어, 포스포로티오에이트 골격)가 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오타이드의 유사체는 동일한 염기쌍 특이성을 가지며; 즉, A의 유사체는 T와 염기쌍을 형성할 것이다.
- [0044] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되어 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 이 용어는 1개 이상의 아미노산이 상응하는 자연-발생 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유도체인 아미노산 중합체에도 적용된다.
- [0045] "결합"은 거대분자들 사이의 (예를 들어, 단백질과 핵산 사이의) 서열-특이적 비-공유 상호작용을 지칭한다. 전체적으로 상호작용이 서열-특이적인 한, 결합 상호작용의 모든 성분이 서열-특이적일 (예를 들어, DNA 골격의 인산 잔기와의 접촉할) 필요는 없다. 상기 상호 작용은 일반적으로  $10^{-6} \text{ M}^{-1}$  이하의 해리 상수 ( $K_d$ )를 갖는 것을 특징으로 한다. "친화도"는 결합 강도를 지칭하며: 결합 친화도 증가는  $K_d$  감소와 상관 관계가 있다.
- [0046] "결합 도메인"은 또 다른 분자에 비-공유 결합할 수 있는 분자이다. 결합 분자는 예를 들어 DNA 분자에 결합하거나(DNA-결합 단백질, 예컨대 아연 핑거 단백질 또는 TAL-이펙터 도메인 단백질 또는 단일 가이드 RNA), RNA 분자에 결합하거나(RNA-결합 단백질), 및/또는 단백질 분자(단백질-결합 단백질)에 결합할 수 있다. 단백질-결합 분자의 경우, 그것은 (동종이량체, 동종삼량체 등을 형성하기 위해) 자체 결합할 수 있고/있거나, 상이한 단백질 또는 단백질들의 1개 이상의 분자에 결합할 수 있다. 결합 분자는 하나 초과와 유형의 결합 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 아연 핑거 단백질은 DNA-결합, RNA-결합 및 단백질-결합 활성을 갖는다. 따라서, 인공 뉴클레아제 및 전사 인자의 DNA-결합 구성요소를 포함하는 DNA-결합 분자는 ZFP, TALE 및 sgRNA를 비제한적으로 포함한다.
- [0047] "아연 핑거(zinc finger) DNA 결합 단백질" (또는 결합 도메인)은 1개 이상의 아연 핑거를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는, 단백질 또는 더 큰 단백질 내의 도메인이며, 아연 이온의 배위를 통해 그 구조가 안정화되는 결합 도메인내의 아미노산 서열의 영역이 있다. 용어 아연 핑거 DNA 결합 단백질은 종종 아연 핑거 단백질 또는 ZFP로 약칭된다. 인공 뉴클레아제 및 전사 인자는 ZFP DNA-결합 도메인과 기능적 도메인 (ZFN에 대한 뉴클레아제 도메인 또는 ZFP-TF에 대한 전사 조절 도메인)을 포함할 수 있다. 용어 "아연 핑거 뉴클레아제"는 하나의 ZFN 뿐만 아니라, 표적 유전자를 절단하기 위해 이합체화되는 한 쌍의 ZFN을 포함한다.
- [0048] "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"은 유닛당 1개 이상의 TALE 반복 도메인을 포함하는 폴리펩타이드이다. 반복 도메인은 그것의 동족 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 관여한다. 단일 "반복 단위"(일명 "반복"이라고도 함)는 전형적으로 길이가 33-35개 아미노산이며, 자연 발생 TALE 단백질 내의 다른 TALE 반복 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. 예를 들어, 미국특허 제8,586,526호를 참고한다. 인공 뉴클레아제 및 전사 인자는 TALE DNA-결합 도메인 및 기능성 도메인 (TALEN의 경우 뉴클레아제 도메인 또는 TALEN-TF의 경우 전사 조절 도메인)을 포함할 수 있다. 용어 "TALEN"은 하나의 TALEN, 뿐만 아니라 표적 유전자를 절단하기 위해 이합체화되는 한쌍의 TALEN을 포함한다.
- [0049] 아연 핑거 및 TALE 결합 도메인은 예를 들어 자연 발생적인 아연 핑거 또는 TALE 단백질의 인식 나선(helix) 영역의 조작(1개 이상의 아미노산 변경)을 통해, 사전결정된 뉴클레오타이드 서열에 결합하도록 "조작"될 수 있다. 따라서, 조작된 DNA 결합 단백질(아연 핑거 또는 TALE)은 비-자연발생인 단백질이다. DNA-결합 단백질을 조작하는 방법의 비-제한적인 예는 설계 및 선택이다. 설계된 DNA 결합 단백질은 자연적으로 발생하지 않는 단백질로서, 그의 설계/구성은 주로 합리적인 기준에서 나온다. 합리적인 설계 기준에는 기존 ZFP 및/또는 TALE 설계 정보와 결합 데이터를 저장하는 데이터베이스에서 정보를 처리하기 위한 대체 규칙 및 전산화된 알고리즘의 적용이 포함된다. 예를 들어 미국특허 제8,568,526호; 제6,140,081호; 제6,453,242호; 및 또한 제6,534,261호; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496를 참고하라.
- [0050] "선택된" 아연 핑거 단백질 또는 TALE은 파아지 디스플레이, 상호작용 트랩 또는 하이브리드 선택과 같은 경험

적 과정으로부터 생산되는, 자연에서 발견되지 않는 단백질이다. 예를 들어, 특허 제8,586,526호; 제5,789,538호; 미국 특허 제5,925,523호; 미국 특허 제6,007,988호; 미국 특허 제6,013,453호; 미국 특허 제6,200,759호; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084를 참고한다.

[0051] "재조합"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 유전적 정보를 교환하는 과정을 지칭한다. 본 개시내용의 목적상, "상동성 재조합(HR)"은 예를 들어, 상동성-유도된 복구 기전을 통해 세포에서 이중-가닥 절단을 회복하는 동안 일어나는 특화된 형태의 이러한 교환을 지칭한다. 이 과정은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하고, "표적" 분자(즉, 이중-가닥 절단을 경험한 것)의 주형 회복을 위한 "공여체" 분자를 사용하며, "비-교차 유전자 전환(non-crossover gene conversion)" 또는 "짧은 관 유전자 전환(short tract gene conversion)"으로 다양하게 공지되어 있는데, 왜냐하면 그것이 공여체에서 표적으로의 유전 정보 전달을 유발시키기 때문이다. 임의의 특정 이론에 의한 구속되지 않고, 상기 전달은 파괴된 표적과 공여체 사이에 형성되는 이중이중나선 DNA의 불일치 정정, 및/또는 공여체가 표적 및/또는 관련 과정의 일부가 될 유전 정보를 재-합성하는데 사용되는 "합성-의존성 가닥 어닐링"을 포함할 수 있다. 상기 특화된 HR은 종종 공여체 폴리뉴클레오타이드의 서열의 일부 또는 전부가 상기 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼입되도록 표적 분자의 서열을 변경시킨다.

[0052] 본 개시내용의 방법에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 1개 이상의 표적화된 뉴클레아제는 사전결정된 부위에서 표적 서열(예를 들어, 세포 염색질)에 이중-가닥 절단을 생성하고, 파단 영역내 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상동성을 갖는 "공여체" 폴리뉴클레오타이드가 세포에 도입될 수 있다. 이중-가닥 절단의 존재는 공여체 서열의 통합을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 상기 공여체 서열은 물리적으로 통합될 수 있거나, 또는 대안적으로 상기 공여체 폴리뉴클레오타이드는 상동성 재조합을 통한 상기 파단의 회복을 위한 주형으로 사용되어, 상기 공여체 내의 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부를 세포 염색질로 도입시킬 수 있다. 따라서, 세포 염색질의 제1 서열은 변경될 수 있고, 특정 구현예에서, 공여체 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 서열로 전환될 수 있다. 따라서, "치환" 또는 "대체"라는 용어의 사용은 하나의 뉴클레오타이드 서열이 또 다른 뉴클레오타이드 서열로 대체되는 것으로 이해될 수 있으며(즉, 정보성 관점에서 서열의 대체), 반드시 또 다른 폴리뉴클레오타이드에 의해 하나의 폴리뉴클레오타이드가 물리적 또는 화학적으로 대체될 필요는 없다.

[0053] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 추가의 아연-핑거 또는 TALEN 단백질 쌍이 세포내 추가의 표적 부위의 추가의 이중-가닥 절단을 위해 사용될 수 있다.

[0054] 표적화된 재조합 및/또는 세포 염색질에서 관심 영역의 서열의 대체 및/또는 변경 방법의 특정 구현예에서, 염색체 서열은 외인성 "공여체" 뉴클레오타이드 서열과의 상동성 재조합에 의해 변경된다. 파단 영역과 상동성을 갖는 서열이 존재하는 경우에, 상기 상동성 재조합은 세포 염색질의 이중-가닥 절단의 존재에 의해 자극된다.

[0055] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 제1 뉴클레오타이드 서열("공여체 서열")은 관심 영역의 게놈 서열과 상동성이지만 동일하지 않은 서열을 포함할 수 있으며, 이에 의해 상동성 재조합을 촉진시켜 관심 영역내 비-동일 서열을 삽입시킬 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 관심 영역의 서열에 상동인 공여체 서열의 부분은 대체되는 게놈 서열과 약 80 내지 99% (또는 그 사이의 임의의 정수) 서열 동일성을 나타낸다. 다른 구현예에서, 예를 들어, 공여체 서열과 100개 이상의 인접 염기쌍을 갖는 게놈 서열들 간에 단 1개의 뉴클레오타이드가 상이한 경우에, 공여체와 게놈 서열 사이의 상동성은 99% 초과이다. 특정 경우에, 공여체 서열의 비-상동성 부분은 관심 영역에 존재하지 않는 서열을 함유할 수 있어서, 신규한 서열이 관심 영역으로 도입되게 된다. 이들 사례에서, 비-상동성 서열은 일반적으로 50~1,000개 염기쌍 (또는 그 사이의 임의의 정수값), 또는 1,000개 초과인 임의의 수의 염기쌍의 서열에 의해 측정되어 있고, 상기 서열은 관심 영역의 서열과 상동성을 갖거나 동일하다. 다른 구현예에서, 공여체 서열은 제1 서열과 비-상동성이고, 비-상동성 재조합 기전에 의해 게놈으로 삽입된다.

[0056] 본 명세서에 기재된 임의의 방법은, 관심 유전자(들)의 발현을 방해하는 공여체 서열의 표적화된 통합에 의한 세포내 1개 이상의 표적 서열의 부분적 또는 완전한 불활성화에 사용될 수 있다. 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 유전자를 갖는 세포주도 또한 제공된다.

[0057] 게다가, 본 명세서에 기재된 표적화된 통합 방법은 1개 이상의 외인성 서열을 통합하는데 사용될 수 있다. 외인성 핵산 서열은 예를 들어, 1개 이상의 조절 요소 (예를 들어, 프로모터) 뿐만 아니라 1개 이상의 유전자 또는 cDNA 분자, 또는 임의 유형의 암호화 또는 비-암호화 서열을 포함할 수 있다. 또한, 외인성 핵산 서열은 1개 이상의 RNA 분자[예를 들어, 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 억제성 RNA (RNAis), 마이크로RNA (miRNA) 등]를 생성할 수 있다.



- [0058] "절단(cleavage)"은 DNA 분자의 공유 골격의 파단을 지칭한다. 절단은 포스포다이에스테르 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 비제한적으로 포함하는 다양한 방법에 의해 개시될 수 있다. 단일-가닥 절단 및 이중-가닥 절단 모두 가능하며, 2개의 개별적인 단일-가닥 절단 사건의 결과로서, 이중-가닥 절단이 발생할 수 있다. DNA 절단은 평할 말단 또는 엇갈린 단부의 생산을 초래할 수 있다. 특정 구현예에서, 융합 폴리펩타이드는 표적화된 이중-가닥 DNA 절단을 위해 사용된다.
- [0059] "절단 반-도메인"은 (동일하거나 상이한) 제2 폴리펩타이드와 함께 절단 활성 (바람직하게는 이중-가닥 절단 활성)을 갖는 복합체를 형성하는 폴리펩타이드 서열이다. 용어들 "제1 및 제2 절단 반-도메인", "+ 및 - 절단 반-도메인" 및 "우측 및 좌측 절단 반-도메인"은, 이량체화하는 절단 반-도메인의 쌍을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0060] "조작된 절단 반-도메인"은 또 다른 절단 반-도메인(예를 들어, 또 다른 조작된 절단 반-도메인)과 함께 절대 이중이량체를 형성하도록 변형된 절단 반-도메인이다. 본 명세서에 참고로 그 전체가 포함되는, 미국 특허 제 7,888,121호; 제 7,914,796호; 제 8,034,598호 및 제 8,823,618호를 참고하라.
- [0061] 용어 "서열"은 DNA 또는 RNA일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오타이드 서열을 지칭하며; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있으며, 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 용어 "공여체 서열"은 게놈에 삽입되는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 공여체 서열은 임의의 길이, 예를 들어 길이가 2 내지 10,000개의 뉴클레오타이드(또는 이들 사이의 또는 그 이상의 임의의 정수 값), 바람직하게는 약 100 내지 1,000개의 뉴클레오타이드(또는 이들 사이의 임의의 정수), 더욱 바람직하게는 약 200 내지 500개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.
- [0062] "질환 관련된 유전자"는 단일유전자 질환에서 일부 방식으로 결합있는 유전자이다. 단일유전자 질환의 비-제한적인 예로는 중증 복합성 면역결핍, 낭포성 섬유증, 혈우병, 리소좀성 축적 질환(예를 들어, 고셔병, 혈러병, 헌터병, 파브리병, 니만-픽병, 테이-삭스병 등), 겸상 적혈구 빈혈 및 지중해빈혈을 포함한다.
- [0063] "염색질(chromatin)"은 세포 게놈을 구성하는 핵 단백질 구조이다. 세포 염색질은 히스톤 및 비-히스톤 염색체 단백질을 포함하는, 핵산, 주로 DNA 및 단백질을 포함한다. 진핵 세포 염색질의 대부분은 뉴클레오솜의 형태로 존재하며, 뉴클레오솜 코어는 히스톤 H2A, H2B, H3 및 H4를 각각 2개 포함하는 8량체 및 이와 결합된 약 150 염기쌍의 DNA를 포함하고; 및 (유기체에 따라 다양한 길이의) 링커 DNA는 뉴클레오솜 코어 사이를 연장한다. 히스톤 H1의 분자는 일반적으로 링커 DNA와 연관되어 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 "염색질"은 원핵 생물 및 진핵 생물 모두의 모든 유형의 세포 핵 단백질을 포함하는 것을 의미한다. 세포 염색질은 염색체 및 에피솜 염색질을 모두 포함한다.
- [0064] "염색체(chromosome)"는 세포의 게놈 전체 또는 일부를 포함하는 염색질 복합체이다. 세포의 게놈은 종종 그의 핵형에 의해 특징화되며, 이는 세포의 게놈을 구성하는 모든 염색체의 모음이다. 세포의 게놈은 1개 이상의 염색체를 포함할 수 있다.
- [0065] "에피솜(episome)"은 복제 핵산, 핵 단백질 복합체, 또는 세포의 염색체 핵형의 일부가 아닌 핵산을 포함하는 다른 작제물이다. 에피솜의 예는 플라스미드 및 특정 바이러스 게놈을 포함한다.
- [0066] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합을 위한 충분한 조건이 존재한다면, 결합 분자가 결합할 핵산의 부분을 정의하는 핵산 서열이다.
- [0067] "외인성(exogenous)" 분자는 세포 내에 정상적으로 존재하지 않지만, 1개 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있는 분자이다. "세포내 정상 존재(normal presence in the cell)"는 세포의 특정 발달 단계 및 환경 조건과 관련하여 결정된다. 따라서, 예를 들어, 근육의 배아 발생 중에만 존재하는 분자는 성인 근육 세포에 대하여 외인성 분자이다. 유사하게, 열 충격에 의해 유도된 분자는 비-열 충격 세포에 관해서는 외인성 분자이다. 외인성 분자는 예를 들어, 기능부전 내인성 분자의 기능성 버전, 또는 정상적으로-기능하는 내인성 분자의 기능부전 버전을 포함할 수 있다.
- [0068] 외인성 분자는 그 중에서도 소분자, 예컨대 조합 화학 프로세스에 의해 생성되는 것들, 또는 거대분자, 예컨대 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체, 또는 상기 분자 중 1개 이상을 포함하는 임의의 복합체일 수 있다. 핵산에는 DNA 및 RNA가 포함되며, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있으며; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있으며; 및 임의의 길이일 수 있다. 핵산은 삼중체-형성 핵산, 뿐만 아니라 이중체를 형성할 수 있는 것들을 포함한다. 예를 들어 미국특허 제 5,176,996호 및 제 5,422,251호를 참고하라. 단백질은 비제한적으로 DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 개질 인자(chromatin remodeling



factor), 메틸화된 DNA 결합 단백질, 중합효소(polymerase), 메틸화 효소(methylase), 탈메틸 효소(demethylase), 아세틸화효소(acetylase), 탈아세틸화효소(deacetylase), 키나제(kinase), 포스파타제(phosphatase), 인테그라제(integrase), 재조합효소(recombinase), 리가제(ligase), 토포이소머라제(topoisomerase), 자이라제(gyrase) 및 헬리카제(helicase)를 포함한다.

[0069] 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예를 들어, 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 감염성 바이러스 게놈, 세포 내로 도입된 플라스미드 또는 에피솜, 또는 세포 내에 정상적으로 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 외인성 분자를 세포에 도입하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 비제한적으로, 지질-매개된 전달(즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공, 직접 주사, 세포 융합, 입자 폭격, 인산칼슘 공동침전, DEAE-텍스트란-매개된 전달 및 바이러스 벡터-매개된 전달을 포함한다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 동일한 유형의 분자일 수 있지만, 세포가 유래한 종과는 상이한 종으로부터 유래된 것이다. 예를 들어, 인간 핵산 서열은 마우스 또는 햄스터로부터 본래 유래된 세포주에 도입될 수 있다.

[0070] 반대로, "내인성(endogenous)" 분자는 특정 환경 조건 하의 특정 발달 단계에서 특정 세포에 정상적으로 존재하는 분자이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아의 게놈, 엽록체 또는 기타 소기관, 또는 자연-발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가의 내인성 분자는 단백질, 예를 들어, 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.

[0071] "융합(fusion)" 분자는 2개 이상의 서브유닛 분자가 바람직하게는 공유 결합으로 연결된 분자이다. 서브유닛 분자들은 동일한 화학적 유형의 분자들일 수 있거나, 상이한 화학적 유형의 분자들일 수 있다. 제1 유형의 융합 분자의 예는, 비제한적으로 융합 단백질(예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인과 1개 이상의 활성화 도메인 사이의 융합체) 및 융합 핵산(예를 들어, 상기 기재된 융합 단백질을 암호화하는 핵산)을 포함한다. 제2 유형의 융합 분자의 예는, 비제한적으로 삼중체-형성 핵산과 폴리펩타이드 간의 융합체, 및 좁은 홈(minor groove) 결합체와 핵산 간의 융합체를 포함한다.

[0072] 세포에서 융합 단백질의 발현은 융합 단백질의 세포로의 전달 또는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 세포로의 전달에 의해 발생할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오타이드가 전사되고, 전사체가 번역되어 융합 단백질을 생성시킬 수 있다. 트랜스-스플라이싱, 폴리펩타이드 절단 및 폴리펩타이드 라이게이션은 또한 세포내 단백질의 발현에 관여할 수 있다. 세포로 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드를 전달하기 위한 방법은 본 개시내용의 다른 곳에서 제시된다.

[0073] 본 개시내용의 목적을 위한 "유전자"는 상기 조절 서열이 암호화 및/또는 전사된 서열에 인접하는 지와는 무관하게, 유전자 산물의 생산을 조절하는 모든 DNA 영역, 뿐만 아니라 유전자 산물(하기 참조)을 암호화하는 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 종결자, 번역 조절 서열, 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 유입 부위, 인핸서, 사일런서, 절연체(insulator), 경계 요소, 복제 기원, 매트릭스 부착 부위 및 유전자와 조절 영역을 포함할 수 있지만, 이에 반드시 한정되지는 않는다.

[0074] "유전자 발현"은 유전자에 함유된 정보를 유전자 산물로 전환시키는 것을 지칭한다. 유전자 산물은 유전자의 직접적인 전사 산물(예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 임의의 다른 유형의 RNA), 또는 mRNA의 번역에 의해 생성된 단백질일 수 있다. 유전자 산물은 또한 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 편집과 같은 과정에 의해 변형된 RNA, 및 예를 들어 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화(myristilation) 및 글리코실화(glycosylation)에 의해 변형된 단백질을 포함한다.

[0075] 유전자 발현의 "조절(modulation)"은 유전자의 활성 변화를 지칭한다. 발현의 조절에는 유전자 활성화 및 유전자 억제가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 게놈 편집(예를 들어, 절단, 변경, 불활성화, 무작위 돌연변이)은 발현을 조절하는데 사용될 수 있다. 유전자 불활성화는 본 명세서에 기재된 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 포함하지 않는 세포 대비, 유전자 발현의 임의의 감소를 지칭한다. 따라서, 유전자 불활성화는 부분적이거나, 완전할 수 있다.

[0076] "관심 영역(region of interest)"은 외인성 분자를 결합시키는 것이 바람직한 유전자, 또는 유전자 내 또는 유전자에 인접한 비-암호화 서열과 같은 세포 염색질의 어느 영역이다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합의 목적일 수 있다. 관심 영역은 예를 들어, 염색체, 에피솜, 소기관 게놈(예를 들어, 미토콘드리아, 엽록체) 또는 감염성 바이러스 게놈에 존재할 수 있다. 관심 영역은 유전자의 암호화 영역내, 전사된 비-암호화 영역내 유전자의 암호화 영역, 예컨대, 예를 들어 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론 내에, 또는 암호화 영

역의 업스트림 또는 다운스트림 중 비-전사된 영역 내에 있을 수 있다. 관심 영역은 단일 뉴클레오타이드 쌍 또는 최대 2,000 뉴클레오타이드 쌍 길이, 또는 임의의 정수값의 뉴클레오타이드 쌍만큼 작을 수 있다.

[0077] "진핵" 세포는 비제한적으로, 줄기세포(만능 및 다분화능)를 포함하여, 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포(예를 들어, 간세포, 근육 세포, RBC, T 세포 등)를 포함한다.

[0078] "적혈구"(RBC) 또는 적혈구는 조혈 줄기세포에서 유래된 최종 분화된 세포이다. 그들은 뉴클레아제 및 대부분의 세포 소기관이 부족하다. 적혈구 (RBC)에는 폐에서 주변 조직으로 산소를 전달하는 헤모글로빈이 함유되어 있다. 사실상, 개별 RBC의 33%는 헤모글로빈이다. 그들은 또한 CO<sub>2</sub>를 함유하는데, 이는 신진 대사 동안 세포에 의해 생산되어 조직 밖으로 내보내고 폐로 회수되어, 날숨시 배출된다. RBC는 신장에 의한 에리트로포이에틴 (EPO)의 방출에 의해 매개되는 혈액 저장소중에 반응하여 골수에서 생산된다. EPO는 전적혈모구 (proerythroblast)의 수를 증가시키고, 전체 RBC 성숙에 필요한 시간을 단축시킨다. RBC는 핵 또는 어느 다른 재생 능력을 포함하고 있지 않기 때문에, 약 120일 후에 간, 비장 및 림프절내 대식세포의 식세포 활성화(~ 90%) 또는 혈장 내 용혈 작용(~ 10%)에 의해 적혈구 세포가 순환으로부터 제거된다. 대식세포가 삼투된 후, RBC의 화학 성분은 리소좀 효소의 작용으로 인해 대식세포의 액포 내에서 분해된다. 시험관내 또는 생체내에서 RBC는 분명세에서 기재된 바와 같이 유전자 변형된 줄기세포 또는 RBC 전구체 세포로부터 유래될 수 있다.

[0079] "분비성 조직"은 개별 세포 밖으로, 전형적으로 상피로부터 유래되는 일부 유형의 내강내로, 생성물을 분비하는 동물의 조직이다. 위장관에 국소화된 분비성 조직의 예는 소화관, 췌장 및 담낭에 라이닝된 세포를 포함한다. 다른 분비성 조직은 간, 눈 및 점막과 관련된 조직, 예컨대 타액샘, 유선, 전립선, 뇌하수체샘 및 내분비 계통의 다른 구성원을 포함한다. 추가로, 분비성 조직은 분비할 수 있는 조직 유형의 개별 세포를 포함한다.

[0080] 용어들 "작동성 연결(operatively linkage)" 및 "작동식으로 연결된(operatively linked)" [또는 "작동가능하게 연결된((operably linked)"]은, 2개 이상의 구성 요소 (예컨대, 서열 요소)의 병치와 관련하여 상호교환적으로 사용되며, 이 두 성분이 정상적으로 기능하여 구성 요소들 중 적어도 하나가 다른 구성 요소들에 작용하는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하도록 배열된다. 예시적으로, 프로모터와 같은 전사 조절 서열은 전사 조절 서열이 1개 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 암호화 서열의 전사 수준을 조절하는 경우 암호화 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열은 일반적으로 암호화 서열과 시스(cis)로 작동가능하게 연결되지만, 그에 직접 인접할 필요는 없다. 예를 들어, 인핸서(enhancer)는 인접하지 않더라도 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 전사 조절 서열이다.

[0081] 융합 폴리펩타이드와 관련하여, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 각각의 구성 요소가 다른 구성 요소와의 연결시, 연결되지 않은 경우에 일어나는 것과 동일한 기능을 수행한다는 현상을 지칭한다. 예를 들어, ZFP, TALE 또는 Cas DNA-결합 도메인은 활성화 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드와 관련하여, ZEP 또는 TALE DNA-결합 도메인 부분은 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있는 반면, 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향-조절할 수 있는 경우, 융합 폴리펩타이드내에서 ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 및 활성화 도메인은 작동식으로 연결된 것이다. ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드의 경우, 상기 융합 폴리펩타이드에서 ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있는 반면, 절단 도메인은 표적 부위의 부근에서 DNA를 절단할 수 있다면, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은 작동식으로 결합된 것이다.

[0082] 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산의 "기능적 단편"은, 그의 서열이 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일하지는 않지만 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일한 기능을 유지하는 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산이다. 기능적 단편은 상응하는 천연 분자와 같은 잔기를 더 많이, 더 적게, 또는 동일한 수를 가질 수 있고/있거나, 1개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 치환을 포함할 수 있다. 핵산의 기능(예를 들어, 암호화 기능, 또 다른 핵산에 혼성화하는 능력)을 측정하는 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 유사하게, 단백질 기능을 결정하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 DNA-결합 기능은 예를 들어 필터-결합(filter-binding), 전기영동 이동성-변화(electrophoretic mobility-shift) 또는 면역침강 검정(immunoprecipitation assay)에 의해 결정될 수 있다. DNA 절단은 겔 전기영동으로 분석될 수 있다. Ausubel 등(상동)을 참조한다. 단백질이 또 다른 단백질과 상호작용하는 능력은 예를 들어 공동-면역침강, 2-하이브리드 검정 또는 상보성, 유전적 및 생화학적 보완법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, Fields 등 (1989) Nature 340: 245-246; 미국특허 제5,585,245호 및 PCT WO 98/44350을 참고하라.

[0083] "벡터"는 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 작제물(vector construct)", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 유전자의 발현을 유도할 수 있고 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있는

임의의 핵산 작제물을 의미한다. 따라서, 이 용어에는 통합 벡터뿐만 아니라 클로닝 및 발현 비히클이 포함된다.

[0084] "리포터 유전자" 또는 "리포터 서열"은, 바람직하게는 일상적인 검정에서 필수적이지는 않지만 용이하게 측정되는 단백질 생성물을 생성하는 임의의 서열을 지칭한다. 적합한 리포터 유전자는 비제한적으로 항생제 내성(예를 들어, 암피실린 내성, 네오마이신 내성, G418 내성, 퓨로마이신 내성)을 매개하는 단백질을 암호화하는 서열, 착색된 또는 형광 또는 발광성 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질, 증강된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시페라제)을 암호화하는 서열, 및 강화된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질(예를 들어, 디하이드로폴레이트 환원효소)을 포함한다. 에피토프 태그는 예를 들어, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출가능한 아미노산 서열의 1개 이상의 복제물을 포함한다. "발현 태그"는 관심 유전자의 발현을 모니터링하기 위해 원하는 유전자 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는 리포터를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0085] 용어 "피험체 (subject)" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용되고, 실험 동물, 예컨대 토끼, 개, 고양이, 랫트, 마우스 및 다른 동물, 뿐만 아니라 포유동물, 예컨대 인간 환자 및 비-인간 영장류를 지칭한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 용어 "피험체" 또는 "환자"는, 본 발명의 변형된 세포 및/또는 본 발명의 변형된 세포에 의해 생성된 단백질을 투여할 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 피험체를 의미한다. 본 발명의 피험체는 LSD를 갖는 피험체를 포함한다.

[0086] 뉴클레아제

[0087] 적어도 하나의 ZFN, TALEN, 호밍 엔도뉴클레아제 및 CRISPR/Cas 및/또는 Ttago 가이드 RNA를 포함하는 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 뉴클레아제가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있으며, 상기는 전이유전자가 표적화 방식으로 게놈에 통합되도록, 세포의 게놈 절단을 위한 뉴클레아제 및 전이유전자를 운반하는 공여체 분자를 생체내 절단하는데 유용하다. 따라서, 선택된 유전자를 절단하는 1개 이상의 뉴클레아제를 포함하고, 절단에 의해 유전자의 게놈 변형(예를 들어, 절단된 유전자 내로의 삽입 및/또는 결실)을 초래하는 조성물이 본 명세서에 기재된다. 특정 구현예에서, 1개 이상의 뉴클레아제는 자연 발생적이다. 다른 구현예에서, 1개 이상의 뉴클레아제는 비-자연 발생적이며, 즉, DNA-결합 분자 (DNA-결합 도메인으로도 지칭됨) 및/또는 절단 도메인에서 조작된다. 예를 들어, 자연 발생 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 선택된 표적 부위(예를 들어, 선택된 표적 부위에 결합하도록 조작된 CRISPR/Cas의 ZFP, TALE 및/또는 sgRNA)에 결합되도록 변형될 수 있다. 다른 구현예에서, 뉴클레아제는 이중성 DNA-결합 및 절단 도메인(예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제; TAL-이펙터 도메인 DNA 결합 단백질; 이중성 절단 도메인을 갖는 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인)을 포함한다. 다른 구현예에서, 뉴클레아제는 Ttago 시스템의 CRISPR/Cas와 같은 시스템을 포함한다.

[0088] A. DNA-결합 도메인

[0089] 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 공여체 분자에 결합 및/또는 세포 게놈에서 관심 영역에 결합시키기 위해 메가뉴클레아제(호밍 엔도뉴클레아제) DNA-결합 도메인을 사용한다. 자연적으로 발생하는 메가뉴클레아제는 15~40개의 염기쌍 절단 부위를 인식하며, 통상적으로 LAGLIDADG 계열, GIY-YIG 계열, His-Cyst 박스 계열 및 HNH 계열의 4가지 계열로 그룹화된다. 예시적인 호밍 엔도뉴클레아제는 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함한다. 이의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 제5,420,032호; 미국특허 제6,833,252호; Belfort 등(1997) Nucleic Acid Res. 25:3379-3388; Dujon 등 (1989) 유전자 82:115-118; Perler 등(1994) Nucleic Acid Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble 등. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast 등 (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 및 New England Biolabs 카탈로그를 참고하라. 또한, 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성을 조작하여, 비-천연 표적 부위에 결합할 수도 있다. 예를 들어, Chevalier 등 (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat 등(2003) Nucleic Acid Res. 31:2952-2962; Ashworth 등 (2006) Nature 441:656-659; Paques 등 (2007) 현 유전자 요법 7:49-66; 미국특허 공개 제20070117128호를 참고하라. 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 전체적으로 뉴클레아제의 맥락에서 변형될 수 있고 (즉, 뉴클레아제가 동족 절단 도메인을 포함하거나), 또는 이중성 절단 도메인에 융합될 수 있다.

[0090] 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 사용되는 1개 이상의 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은, 자연 발생적 또는 조작된 (비-자연 발생적) TAL 이펙터 DNA-결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 전체가 본원에 참고로 통합된 미국특허 제8,586,526호를 참고하라. 크산토모나스(*Xanthomonas*) 속의 식물 병원성 박테리아는 중요한 농작물에서 많은 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 크산토모나스의 병원성은 식물 세포에 25종 이상



의 다른 이펙터 단백질을 주입하는 보존된 유형 III 분비(T3S) 시스템에 따라 달라진다. 이들 주입된 단백질 중에는, 식물 전사 활성제를 모방하고 식물 전사체를 조작하는 전사 활성제-유사(TAL) 이펙터가 있다 [Kay 등 (2007) Science 318: 648-651 참고]. 이들 단백질은 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 함유한다. 가장 잘 특성화된 TAL-이펙터 중 하나는 크산토모나스 캄페스트리스 pv 베시카토리아 (*Xanthomonas campestris pv Vesicatoria*) 유래의 AvrBs3이다 (Bonas 등 (1989) Mol Gen Genet 218:127-136 및 WO2010079430 참고). TAL-이펙터는 탠덤 반복의 중앙 집중화된 도메인을 포함하며, 각 반복부는 약 34개의 아미노산을 함유하며, 이는 상기 단백질의 DNA 결합 특이성의 핵심이다. 또한, 그들은 핵 국제화 서열 및 산성 전사 활성화 도메인을 함유한다 (검토를 위해, Schornack S, 등(2006) J Plant Physiol 163(3):256-272 참조). 또한, 식물병원성 박테리아 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에서 2개의 유전자 (brg11 및 hpx17로 지정됨)이 발견되었고, 이들은 R. 솔라나세아룸바이오바르 1 균주 GMI1000 및 바이오바르(biovar) 4 균주 RS1000에서 크산토모나스의 AvrBs3 계열에 상동성을 갖는다 (하기 참고: Heuer 등(2007) Appl 및 Envir Micro 73(13):4379-4384). 이들 유전자는 뉴클레오타이드 서열에서 서로 98.9% 동일하지만, hpx17의 반복 도메인에서의 1,575 bp의 결실로 서로 상이하다. 그러나 두 유전자 산물은 크산토모나스의 AvrBs3 계열 단백질과 40% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 하기를 참고한다: 미국특허 제8,586,526호(전체가 본원에 참고 포함됨).

[0091] 이러한 TAL 이펙터의 특이성은 탠덤 반복부(tandem repeat)에서 발견되는 서열에 좌우된다. 반복 서열은 약 102 bp를 포함하고, 반복부들은 전형적으로 서로 91~100% 상동성을 갖는다 (Bonas 등, 상기 참조). 반복의 다형성은 일반적으로 위치 12 및 13에 위치되어 있으며, 위치 12 및 13에서의 초가변성 2잔기 (hypervariable diresidues)(RVDs)의 동일성과 TAL-이펙터의 표적 서열 내의 인접한 뉴클레오타이드들의 동일성 사이에는 1 대 1 관련성이 있는 것으로 보인다 (Moscou 및 Bogdanove, (2009) Science 326:1501 및 Boch 등 (2009) Science 326:1509-1512 참고). 실험적으로, 이들 TAL-이펙터의 DNA 인식을 위한 천연 코드는 위치 12 및 13의 HD 서열이 시토신(C)에 대한 결합을 유도하고, NG가 T에 결합하고, NI가 A, C, G 또는 T에 결합하고, NN이 A 또는 G에 결합하고, ING가 T에 결합하도록 결정되었다. 이러한 DNA 결합 반복은 신규한 서열과 상호작용하여 식물 세포에서 비-내인성 리포터 유전자의 발현을 활성화할 수 있는 인공 전사 인자를 만들기 위해, 신규한 조합과 반복 횟수로 단백질로 조립되었다(Boch 등, 상기 참조). 조작된 TAL 단백질은 FokI 절단 반-도메인에 연결되어, 효모 리포터 검정(플라스미드 기반 표적)에서 활성을 나타내는 TAL 이펙터 도메인 뉴클레아제 융합체(TALEN)을 생성한다. 예를 들어, 미국특허 제8,586,526호; Christian 등((2010) Genetics epub 10.1534/genetics. 110.120717)를 참고하라.

[0092] 특정 구현예에서, 세포의 게놈의 생체내 절단 및/또는 표적화된 절단에 사용되는 1개 이상의 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 아연 핑거 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 아연 핑거 단백질은 그것이 선택된 표적 부위에 결합하도록 조작된다는 점에서 비-자연 발생적이다. 예를 들어, Beerli 등 (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo 등 (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan 등 (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal 등 (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo 등. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 미국특허 제6,453,242호; 제6,534,261호; 제6,599,692호; 제6,503,717호; 제6,689,558호; 제7,030,215호; 제6,794,136호; 제7,067,317호; 제7,262,054호; 제7,070,934호; 제7,361,635호; 제7,253,273호; 및 미국특허 공보 번호 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061가 참고되며, 상기는 모두 참고로서 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0093] 조작된 아연 핑거 결합 도메인은 자연-발생적 아연 핑거 단백질에 비해 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 공학기술 방법은 합리적인 설계 및 다양한 유형의 선택을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 합리적인 설계는, 예를 들어, 각각의 삼중항 또는 사중항 뉴클레오타이드 서열이 특정한 삼중항 또는 사중항 서열을 결합하는 아연 핑거의 1개 이상의 아미노산 서열과 관련된 삼중항(triplet) [또는 사중항(quadruplet)] 뉴클레오타이드 서열 및 개별적인 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어 공유의 미국특허 제6,453,242호 및 제6,534,261호를 참고하며, 이들은 그의 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0094] 파지 디스플레이 및 2-하이드리드 시스템을 포함하는 예시적인 선택 방법은 하기에 개시되어 있다: 미국 특허 제5,789,538호; 제5,925,523호; 제6,007,988호; 제6,013,453호; 제6,410,248호; 제6,140,466호; 제6,200,759호; 및 제6,242,568호; WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; 및 WO 01/88197. 또한, 아연 핑거 결합 도메인에 대한 결합 특이성의 향상은 예를 들어, 공유의 WO 02/077227에 기재되어 있다.

[0095] 또한, 이들 및 다른 참고문헌에 개시된 바와 같이, 아연 핑거 도메인 및/또는 다중-핑거 아연 핑거 단백질은 예를 들어 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 임의의 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 또한 하기를 참고한다: 미국특허 제8,772,453호; 제6,479,626호; 제6,903,185호; 및 제7,153,949호, 예시

적인 링커 서열에 대하여, 본 명세서에 기재된 단백질은 단백질의 개별 아연 핑거 사이에 적합한 링커의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0096] 표적 부위의 선택; 융합 단백질(및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 설계 및 구축을 위한 ZFP 및 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있으며, 하기에 상세히 기재되어 있다: 미국특허 번호 제6,140,081호; 제 5,789,538호; 제6,453,242호; 제6,534,261호; 제5,925,523호; 제6,007,988호; 제6,013,453호; 제6,200,759호; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496.

[0097] 또한, 이들 및 다른 참고문헌에 개시된 바와 같이, 아연 핑거 도메인 및/또는 다중-핑거 아연 핑거 단백질은 (예를 들어 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는) 임의의 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 또한, 6개 이상의 아미노산 길이의 예시적인 링커 서열에 대해서는 미국특허 제6,479,626호; 제6,903,185호; 제7,153,949호를 참고한다. 본 명세서에 기재된 단백질은 단백질의 개별 아연 핑거 사이에 적합한 링커의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0098] 특정 구현예에서, DNA-결합 도메인은 예를 들어 단일 가이드 RNA (sgRNA)를 포함하는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템의 일부이다. 예를 들어, 하기를 참고한다: 미국특허 제8,697,359호 및 미국특허 공보 제20150056705호. 시스템의 RNA 성분을 암호화하는 CRISPR (규칙적으로 간격을 두고 군집을 이룬 짧은 회문성 반복) 유전자좌, 및 단백질을 암호화하는 Cas(CRISPR-관련) 유전자좌 (Jansen 등, 2002. Mol. Microbiol. 43:1565-1575; Makarova 등, 2002. 핵산 Res. 30:482-496; Makarova 등, 2006. Biol. Direct 1:7; Haft 등, 2005. PLoS Comput. Biol. 1: e60)는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템의 유전자 서열을 구성한다. 미생물 숙주의 CRISPR 유전자좌는 CRISPR-매개된 핵산 절단의 특이성을 프로그래밍할 수 있는 비-암호화 RNA 요소, 뿐만 아니라 CRISPR-관련된 (Cas) 유전자의 조합을 함유한다.

[0099] 유형 II CRISPR은 가장 잘 특성화된 시스템 중 하나이며, 4개의 순차적인 단계로 표적화된 DNA 이중-가닥 파단을 수행한다. 첫째, CRISPR 유전자좌로부터 2개의 비-암호화 RNA인 pre-crRNA 어레이 및 tracrRNA가 전사된다. 둘째, tracrRNA는 pre-crRNA의 반복 영역과 혼성화하며, pre-crRNA가 개별적인 스페이서 서열을 함유하는 성숙한 crRNA가 되도록 가공을 매개한다. 셋째, 성숙한 crRNA: tracrRNA 복합체는 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)(표적 인식을 위한 추가적인 요건) 옆의 표적 DNA 상의 프로토스페이서와 crRNA 상의 스페이서 사이에서 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성을 통해 Cas9를 상기 표적 DNA로 유도한다. 마지막으로, Cas9는 표적 DNA의 절단을 매개하여, 프로토스페이서 내에 이중-가닥 파단을 생성한다. CRISPR/Cas 시스템의 활성화는 3단계로 구성된다: (i) '적응'이라는 과정에서의 미래의 공격을 방지하기 위한, 외래 DNA 서열의 CRISPR 어레이로의 삽입 단계, (ii) 어레이의 발현 및 가공, 뿐만 아니라 관련된 단백질의 발현 단계, 및 이어서 (iii) 외래 핵산에 의한 RNA-매개 간섭단계. 따라서, 박테리아 세포에서, 몇 개의 소위 'Cas' 단백질은 CRISPR/Cas 시스템의 천연 기능과 관련되며, 외래 DNA 등의 삽입과 같은 기능에 역할을 한다.

[0100] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 자연 발생 Cas 단백질의 "기능성 유도체"일 수 있다. 천연 서열 폴리펩타이드의 "기능성 유도체"는 천연 서열 폴리펩타이드와 공통되는 정성적 생물학적 특성을 갖는 화합물이다. "기능성 유도체"는 천연 서열의 단편 및 천연 서열 폴리펩타이드의 유도체 및 그의 단편을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 단 이들이 상응하는 천연 서열 폴리펩타이드와 공통적인 생물학적 활성을 갖는 경우에 한한다. 본원에서 고려되는 생물학적 활성은 기능성 유도체가 DNA 기질을 단편으로 가수분해하는 능력이다. 용어 "유도체"는 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체, 공유적 변형체 및 그의 융합체를 모두 포함한다. Cas 폴리펩타이드 또는 그의 단편의 적합한 유도체는 돌연변이체, 융합체, Cas 단백질의 공유 변형체 또는 그의 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. Cas 단백질 유도체 또는 그의 단편 뿐만 아니라 Cas 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 Cas 단백질은, 세포로부터 수득가능할 수 있거나, 또는 화학적으로 수득할 수 있고, 또는 이들 두 가지 절차의 조합에 의해 합성될 수 있다. 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생성하는 세포일 수도 있고, Cas 단백질을 자연적으로 생산하고, 내인성 Cas 단백질을 보다 높은 발현 수준으로 생산하거나 외인성으로 도입된 핵산으로부터 Cas 단백질을 생산하도록 유전자 조작된 세포일 수 있으며, 핵산은 내인성 Cas와 동일하거나 상이한 Cas를 암호화한다. 일부 경우에, 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생산하지 못하여, Cas 단백질을 생산하도록 유전자 조작된다. Cas 단백질에 추가로 및/또는 그 대신에 사용될 수 있는 RNA 유도된 뉴클레아제의 비-제한적인 추가의 예는, Cpf1과 같은 부류 2 CRISPR 단백질을 포함한다. 예를 들어, Zetsche 등 (2015) Cell 163: 1-13을 참고한다.

[0101] 프란시셀라 종(Francisella spp.)에서 확인된 CRISPR-Cpf1 시스템은, 인간 세포에서 강력한 DNA 간섭을 매개하는 부류 2 CRISPR-Cas 시스템이다. 기능적으로 보존되어 있기는 하지만, Cpf1 및 Cas9는 그의 가이드 RNA 및 기



질 특이성을 포함하여 많은 측면에서 서로 상이하다 [Fagerlund 등, (2015) *Genom Bio* 16: 251 참고]. Cas9와 Cpf1 단백질 사이의 가장 큰 차이점은, Cpf1이 tracrRNA를 이용하지 않기 때문에 오직 crRNA만 필요하다는 점이다. FnCpf1 crRNA는 42~44개 뉴클레오타이드 길이 (19개-뉴클레오타이드 반복부 및 23~25개-뉴클레오타이드 스페이서)이고, 2차 구조를 유지하는 서열 변화를 허용하는 단일 스템-루프(stem-loop)를 포함한다. 또한, Cpf1 crRNA는 Cas9에 의해 요구되는 ~ 100개-뉴클레오타이드의 조작된 sgRNA보다 상당히 짧으며, FnCpf1에 대한 PAM 요건은 치환된 가닥의 5'-TTN-3' 및 5'-CTA-3'이다. Cas9 및 Cpf1 모두가 상기 표적 DNA에서 이중-가닥 절단을 하기는 하지만, Cas9는 RuvC- 및 HNH-유사 도메인을 사용하여 가이드 RNA의 시드 서열 내에서 블런트-말단(blunt-ended) 절단을 수행하는 반면, Cpf1은 RuvC-유사 도메인을 사용하여 시드 밖으로 엇갈린(staggered) 절단을 생성한다. Cpf1이 중요한 시드 영역에서 엇갈린 절단을 생성하기 때문에, NHEJ는 표적 부위를 방해하지 않으므로 원하는 HDR 재조합 사건이 발생할 때까지 Cpf1이 동일한 부위를 계속 절단할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에서, 용어 "Cas"는 Cas9 및 Cpf1 단백질을 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 "CRISPR/Cas 시스템"은 CRISPR/Cas 및/또는 CRISPR/Cpf1 시스템 모두를 지칭하며, 뉴클레아제 및/또는 전사 인자 시스템을 포함한다.

[0102] 일부 구현예에서, DNA 결합 도메인은 TtAgo 시스템의 일부이다(Swartz 등 참고, 상기 참조; Sheng 등, 상기 참조). 진핵생물에서, 유전자 사일런싱은 단백질의 아르곤노트(Argonaute(Ago)) 계열에 의해 매개된다. 이 패러다임에서, Ago는 작은(19 ~ 31nt) RNA에 결합된다. 이 단백질-RNA 사일런싱 복합체는 작은 RNA와 상기 표적 사이의 왓슨 크릭(Watson-Crick) 염기쌍을 통해 표적 RNA를 인식하고, 상기 표적 RNA를 엔도뉴클레아제로 절단한다(endonucleolytically cleave) (Vogel(2014) *Science* 344: 972-973). 대조적으로, 원핵 Ago 단백질은 작은 단일-가닥 DNA 단편에 결합하여, 외래성(종종 바이러스성) DNA를 검출하고 제거하는 기능을 한다(Yuan 등, (2005) *Mol. Cell* 19, 405; Olovnikov, 등 (2013) *Mol. Cell* 51, 594; Swartz 등, 상기 참조). 예시적인 원핵 Ago 단백질은 아키텍스 아에올리쿠스(*Aquifex aeolicus*), 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 및 테르무스 쉐모필루스(*Thermus thermophilus*) 유래의 단백질을 포함한다.

[0103] 가장 잘-특성화된 원핵 Ago 단백질 중 하나는 T. 쉐모필루스로부터의 단백질이다(TtAgo; Swartz 등 상기 참조). TtAgo는 5' 인산기를 갖는 15 nt 또는 13~25 nt 단일-가닥 DNA 단편과 연결된다. TtAgo가 결합된 이러한 "가이드 DNA"는 단백질-DNA 복합체가 제3-부분 분자의 DNA에서 왓슨-크릭 상보적인 DNA 서열을 결합하도록 유도하는 역할을 한다. 이들 가이드 DNA의 서열 정보에 의해 표적 DNA가 식별되면, TtAgo-가이드 DNA 복합체는 상기 표적 DNA를 절단한다. 그와 같은 기전은 또한 그의 표적 DNA에 결합되는 동안의 TtAgo-가이드 DNA 복합체의 구조에 의해 뒷받침된다(G. Sheng 등, 상기 참조). 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래의 Ago(RsAgo)는 유사한 특성들을 갖는다(Olovnikov 등, 상기 참조).

[0104] 임의의 DNA 서열의 외인성 가이드 DNA는 TtAgo 단백질 상에 로딩될 수 있다(Swartz 등 상기 참조). TtAgo 절단의 특이성이 가이드 DNA에 의해 유도되기 때문에, 외인성의 연구자-특이적 가이드 DNA와 함께 형성된 TtAgo-DNA 복합체는 TtAgo 표적 DNA 절단을 상보적인 연구자-특이적 표적 DNA로 유도할 것이다. 이런 방식으로, DNA에서 표적화된 이중-가닥 중단을 생성할 수 있다. TtAgo-가이드 DNA 시스템(또는 다른 유기체로부터의 이중상동성 Ago-가이드 DNA 시스템)을 사용하면, 세포 내에서 게놈 DNA의 표적화된 절단이 가능하다. 상기 절단은 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다. 포유동물 게놈 DNA의 절단을 위해서는, 포유동물 세포내 발현을 위해 최적화된 TtAgo 코돈의 버전을 사용하는 것이 바람직할 것이다. 또한, TtAgo 단백질이 세포-침투성 펩타이드에 융합된 시험관내 형성된 TtAgo-DNA 복합체로 세포를 처리하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 37°C에서 개선된 활성을 가지도록 돌연변이유발을 통해 변경된 TtAgo 단백질의 버전을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. TtAgo-RNA 매개된 DNA 절단은 DNA 파단을 이용하기 위한 당업계의 표준 기술을 사용하여, 유전자 킥아웃, 표적화된 유전자 첨가, 유전자 교정, 표적화된 유전자 결실을 포함하는 결과의 집합에 영향을 미치도록 사용될 수 있다.

[0105] 따라서, 뉴클레아제는 공여체(전이유전자)를 삽입하고자 하는 임의의 유전자 내의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함한다.

#### [0106] B. 절단 도메인

[0107] 임의의 적합한 절단 도메인은 DNA-결합 도메인에 작동가능하게 연결되어 뉴클레아제를 형성할 수 있다. 예를 들어, ZFP DNA-결합 도메인은 뉴클레아제 도메인에 융합되어 ZFN을 생성하였고, 상기 ZFN은 조작된(ZFP) DNA-결합 도메인을 통해 그의 의도된 핵산 표적을 인식할 수 있으며, 뉴클레아제 활성을 통해 ZFP 결합 부위 근처에서 DNA를 절단시킬 수 있는 기능적 독립체이다. 예를 들어, Kim 등(1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3): 1156-1160를 참고하라. 용어 "ZFN"은 표적 유전자를 절단하기 위해 이량체화되는 한 쌍의 ZFN을 포함한다. 최근에,

ZFN은 다양한 유기체에서 게놈 변형에 사용되어 왔다. 예를 들어, 미국 특허 공보 제20030232410호; 제20050208489호; 제20050026157호; 제20050064474호; 제20060188987호; 제20060063231호; 및 국제 공개 WO 07/014275를 참고한다. 마찬가지로 TALE DNA-결합 도메인은 TALEN을 생성하기 위해 뉴클레아제 도메인에 융합되어 있다. 예를 들어, 하기를 참고한다: 미국특허 제8,586,526호를 참고한다. 표적화된 절단을 유도하기 위해 DNA에 결합하고 절단 도메인(예를 들어, Cas 도메인)과 결합하는 단일 가이드 RNA (sgRNA)를 포함하는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템이 기재되어 있다. 예를 들어, 미국특허 제8,697,359호 및 제8,932,814호 및 미국 특허 공보 제20150056705호를 참고하라.

[0108] 전술한 바와 같이, 절단 도메인은 DNA-결합 도메인, 예를 들어, 아연 핑거 DNA-결합 도메인 및 뉴클레아제로부터의 절단 도메인 또는 TALEN DNA-결합 도메인의 절단 도메인 및 뉴클레아제로부터의 절단 도메인; sgRNA DNA-결합 도메인 및 뉴클레아제(CRISPR/Cas)로부터의 절단 도메인; 및/또는 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인 및 상이한 뉴클레아제로부터의 절단 도메인에 대해 이중성일 수 있다. 이중성 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 수득될 수 있다. 절단 도메인이 유래될 수 있는 예시적인 엔도뉴클레아제는 비제한적으로, 제한 엔도뉴클레아제 및 호밍 엔도뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; 및 Belfort 등 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388을 참고한다. DNA를 절단하는 추가 효소가 공지되어 있다 (예를 들어, S1 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제, 췌장 DNase I, 미세결핵 뉴클레아제, 효모 H0 엔도뉴클레아제; 또한 Linn 등(eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993를 참고하라). 1개 이상의 이들 효소 (또는 이의 기능적 단편)은 절단 도메인 및 절단 반-도메인의 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0109] 유사하게, 절단 반-도메인은 절단 활성을 위한 이량체화를 필요로 하는, 상기 제시된 임의의 뉴클레아제 또는 이의 일부로부터 유래될 수 있다. 일반적으로, 융합 단백질이 절단 반-도메인을 포함하는 경우, 2개의 융합 단백질이 절단에 필요하다. 대안적으로, 2개의 절단 반-도메인을 포함하는 단일 단백질이 사용될 수 있다. 2개의 절단 반-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 그의 기능적 단편)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 각각의 절단 반-도메인이 상이한 엔도뉴클레아제(또는 이의 기능적 단편)으로부터 유래될 수 있다. 또한, 2개의 융합 단백질에 대한 표적 부위는 바람직하게는 서로에 대해, 2개의 융합 단백질을 그들의 각각의 표적 부위에 결합시킴으로써, 절단 반-도메인을 서로에 대한 공간 배향으로 위치시켜, 절단 반-도메인을 예를 들어, 이량체화에 의해 기능적 절단 도메인을 형성시키도록 배치된다. 따라서, 특정 구현예에서, 표적 부위의 근변(near edge)은 5-8개 뉴클레오타이드 또는 15-18개 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 그러나, 2개의 표적 부위 사이를 임의의 정수의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 쌍 (예를 들어, 2 내지 50개 뉴클레오타이드 쌍 이상)이 개재할 수 있다. 일반적으로, 절단 부위는 표적 부위들 사이에 놓여있다.

[0110] 제한 엔도뉴클레아제 (제한 효소)는 많은 종에 존재하고, DNA(인식 부위)에 서열-특이적 결합할 수 있어, 결합 부위 또는 그 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소(예를 들어, 유형 IIS)는 인식 부위로부터 먼 부위에서 DNA를 절단하고, 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, 유형 IIS 효소 Fok I는 한 가닥 상의 그의 인식 부위로부터의 9개 뉴클레오타이드에서, 그리고 다른 가닥 상의 그의 인식 부위로부터의 13개 뉴클레오타이드에서, DNA의 이중-가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,356,802호; 제5,436,150호 및 제5,487,994호; 뿐만 아니라 Li 등(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim 등 (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim 등. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982를 참고한다. 따라서, 일 구현예에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 유형 IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인(또는 절단 반-도메인) 및 1개 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함하며, 이들은 조작되거나 또는 조작되지 않을 수 있다.

[0111] 절단 도메인이 결합 도메인으로부터 분리가능한 예시적인 유형 IIS 제한 효소는 Fok I이다. 이 특정 효소는 이량체로서 활성을 갖는다. Bitinaite 등. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10,570-10,575. 따라서, 본 개시내용의 목적을 위해, 개시된 융합 단백질에 사용된 Fok I 효소의 부분은 절단 반-도메인으로 간주된다. 따라서, 아연 핑거-Fok I 융합체를 사용하는 표적화된 이중-가닥 절단 및/또는 세포 서열의 표적화된 대체를 위해, 2개의 융합 단백질 (각각 FokI 절단 반-도메인을 포함)을 사용하여 촉매 활성 절단 도메인을 재구성할 수 있다. 대안적으로, 아연 핑거 결합 도메인 및 2개의 Fok I 절단 반-도메인을 함유하는 단일 폴리펩타이드 분자가 또한 사용될 수도 있다. 아연 핑거-Fok I 융합을 이용한 표적화된 절단 및 표적화된 서열 변경의 파라미터는 본 개시내용의 다른 곳에 제공된다.

[0112] 절단 도메인 또는 절단 반-도메인은 절단 활성을 보유하거나, 기능적 절단 도메인을 형성하기 위해 다량체화(예

를 들어, 이량체화)하는 능력을 보유하는 단백질의 어느 부분일 수 있다.

- [0113] 예시적인 유형 IIS 제한 효소는 본원에 전체로서 참고되는 미국특허 제7,888,121호에 기재되어 있다. 추가의 제한 효소는 또한 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 함유하고, 이들은 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어 Roberts 등 (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 418-420을 참고한다.
- [0114] 특정 구현예에서, 절단 도메인은 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같이, 동중이량체화를 최소화 또는 방지하는 1개 이상의 조작된 절단 반-도메인(일명 이량체화 도메인 돌연변이체로도 지칭됨)을 포함한다: 예를 들어, 미국특허 제8,772,453호; 제8,623,618호; 제8,409,861호; 제8,034,598호; 제7,914,796호; 및 제7,888,121호에 개시되어 있으며, 이들 모두의 개시내용은 본원에 참고문헌으로 포함된다. FokI의 위치 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537, 및 538의 아미노산 잔기는, Fok I 절단 반-도메인의 이량체화에 영향을 주는 모든 표적이다.
- [0115] 절대 이중이량체를 형성하는 FokI의 예시적인 조작된 절단 반-도메인은, 제1 절단 반-도메인이 FokI의 위치 490 및 538의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고, 제2 절단 반-도메인이 아미노산 잔기 486 및 499에 돌연변이를 포함하는 한 쌍을 포함한다.
- [0116] 따라서, 일 구현예에서, 490에서의 돌연변이는 Glu(E)를 Lys(K)로 대체하고; 538에서의 돌연변이는 Iso(I)를 Lys(K)로 대체하며; 486에서의 돌연변이는 Gln(Q)를 Glu(E)로 대체하고; 위치 499에서의 돌연변이는 Iso(I)를 Lys(K)로 대체한다. 구체적으로, 하나의 절단 반-도메인에서 위치 490(E→K) 및 538(I→K)을 돌연변이시켜 "E490K:I538K"("KK")로 명명된 조작된 절단 반-도메인을 생성함으로써, 그리고 또 다른 절단 반-도메인에서 위치 486(Q→E) 및 499(I→L)를 돌연변이시켜 "Q486E:I499L"("EL")로 명명된 조작된 절단 반-도메인을 생성함으로써, 본 명세서에 기재된 조작된 절단 반-도메인이 제조되었다. 본 명세서에 기재된 조작된 절단 반-도메인은 비정상적인 절단이 최소화되거나 폐지된 절대 이중이량체 돌연변이체이다. 미국특허 제7,914,796호 및 제8,034,598호에 개시되어 있으며, 이들의 개시내용은 전체적으로 참고문헌으로 포함된다. 특정 구현예에서, 조작된 절단 반-도메인은 위치 486, 499 및 496(야생형 FokI에 대해 넘버링됨)에서의 돌연변이를 포함하는데, 상기 돌연변이는 위치 486에서의 야생형 Gln(Q) 잔기를 Glu(E) 잔기로 대체하고, 위치 499에서의 야생형 Iso(I) 잔기를 Leu(L) 잔기로 대체하고, 및 위치 496에서의 야생형 Asn(N) 잔기를 Asp(D) 또는 Glu(E) 잔기(또한 각각 일명 "ELD" 및 "ELE" 도메인)로 대체한다. 다른 구현예에서, 조작된 절단 반-도메인은 위치 490, 538 및 537(야생형 FokI에 대해 넘버링됨)에서의 돌연변이를 포함하는데, 상기 돌연변이는 위치 490에서의 야생형 Glu(E) 잔기를 Lys(K) 잔기로 대체하고, 위치 538에서의 야생형 Iso(I) 잔기를 Lys(K) 잔기로 대체하고, 및 위치 537에서의 야생형 His(H) 잔기를 Lys(K) 잔기 또는 Arg(R) 잔기(또한 각각 일명 "KKK" 및 "KKR" 도메인)로 대체한다.
- [0117] 다른 구현예에서, 조작된 절단 반-도메인은 위치 490 및 537(야생형 FokI에 대해 넘버링됨)에서의 돌연변이를 포함하는데, 상기 돌연변이는 위치 490에서의 야생형 Glu(E) 잔기를 Lys(K) 잔기로 대체하고, 위치 537에서의 야생형 His(H) 잔기를 Lys(K) 잔기 또는 Arg(R) 잔기(또한 각각 일명 "KIK" 및 "KIR" 도메인)로 대체한다. 예를 들어, 미국특허 제8,772,453호를 참고한다. 다른 구현예에서, 조작된 절단 반-도메인은 "샤키(Sharkey)" 돌연변이를 포함한다(Guo 등, (2010) *J. Mol. Biol.* 400(1): 96-107 참고).
- [0118] 본 명세서에 기재된 조작된 절단 반-도메인은 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 미국특허 제8,623,618호; 제8,409,861호; 제8,034,598호; 제7,914,796호; 및 제7,888,121호에 기재된 바와 같은, 야생형 절단 반-도메인(Fok I)의 부위-특이적 돌연변이유발을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0119] 또한, 표적의 부위(off-target site)로 알려진, 의도하지 않은 다른 절단 부위에 비해 의도된 표적에 대한 뉴클레아제 쌍의 특이성을 증가시키기 위한 방법 및 조성물이 사용된다(하기 참고: 미국특허 제US-2017-0218349-A1호). 따라서, 본 명세서에 기재된 뉴클레아제는 DNA-결합 도메인 골격 영역 중 하나 이상에서의 돌연변이, 및/또는 뉴클레아제 절단 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이들 뉴클레아제는 DNA 골격 상의 인산과 비-특이적으로 상호작용할 수 있는 ZFP DNA-결합 도메인('ZFP 골격') 내의 아미노산에 대한 돌연변이를 포함할 수 있지만, DNA 인식 나선의 변화는 포함하지 않는다. 따라서, 본 발명은 뉴클레오타이드 표적 특이성에 요구되지 않는 ZFP 골격 내 양이온성 아미노산 잔기의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, ZFP 골격에서의 이들 돌연변이는 양이온성 아미노산 잔기를 중성 또는 음이온성 아미노산 잔기로 돌연변이시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ZFP 골격에서의 이들 돌연변이는 극성 아미노산 잔기를 중성 또는 무극성 아미노산 잔기로 돌연변이시키는 것을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 돌연변이는 DNA 결합 나선에 대해 위치 (-5), (-9) 및/또는 위치 (-14)에서 이루어진다. 일부 구현예에서, 아연 핑거는 (-5), (-9) 및/또는 (-14)에서 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 추가의 구현예에서, 다중-핑거 아연 핑거 단백질 중 하나 이상의 아연 핑거는



(-5), (-9) 및/또는 (-14)에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, (-5), (-9) 및/또는 (-14)의 아미노산 (예를 들어, 아르기닌(R) 또는 라이신(K))은 알라닌(A), 류신(L), Ser(S), Asp(N), Glu(E), Tyr(Y) 및/또는 글루타민(Q)으로 돌연변이된다.

[0120] 특정 구현예에서, 조작된 절단 반-도메인은 FokI 뉴클레아제 도메인으로부터 유래되고, 야생형 전장 FokI에 대해 넘버링된 아미노산 잔기 416, 422, 447, 448 및/또는 525 중 하나 이상에 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 잔기 416, 422, 447, 448 및/또는 525의 돌연변이는 FokI "ELD", "ELE", "KKK", "KKR", "KK", "EL", "KIK", "KIR" 및/또는 상기 기재된 Sharkey에 도입된다.

[0121] 또한, 뉴클레아제 복합체의 조작된 절단 반-도메인 파트너의 개별적인 적정을 통해 절단 활성의 특이성을 증가시키는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 2개의 파트너(절단 절단 도메인)의 비는 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:9, 1:10 또는 1:20 비, 또는 그 사이의 어느 값으로 주어진다. 다른 구현예에서, 2개의 파트너의 비는 1:30보다 크다. 다른 구현예에서, 2개의 파트너는 1:1과 상이한 것으로 선택되는 비로 전개된다. 본 발명의 방법 및 조성물은 개별적으로 또는 조합하여 사용되는 경우, 표적의 절단 활성의 감소를 통해 표적화 특이성에서 놀랍고 예기치 못한 증가를 제공한다. 이들 구현예에서 사용된 뉴클레아제는 ZFN, 한 쌍의 ZFN, TALEN, 한 쌍의 TALEN, CRISPR/Cas, CRISPR/dCas 및 TtAgo, 또는 이들의 어느 조합을 포함할 수 있다.

[0122] 대안적으로, 뉴클레아제는 소위 "분할-효소(split-enzyme)" 기술을 이용하여 핵산 표적 부위에서 생체내 조립될 수 있다(하기 참고: 예를 들어 미국특허 공보 제20090068164호). 상기 분할 효소의 구성 요소들은 별개의 발현 작제물에서 발현될 수 있거나, 예를 들어 자가-절단 2A 펩타이드 또는 IRES 서열에 의해 개별 구성요소가 분리되는 하나의 오픈 리딩 프레임에서 연결될 수 있다. 성분은 개별 아연 핑거 결합 도메인 또는 메가뉴클레아제 핵산 결합 도메인의 도메인일 수 있다.

[0123] 뉴클레아제는 사용 전에, 예를 들어 미국특허 제8,563,314호에 기재된 효모-기반 염색체 시스템에서 활성화에 대하여 선별될 수 있다. 상기 뉴클레아제의 발현은 항시성 프로모터 또는 유도성 프로모터, 예를 들어 라피노스 및/또는 갈락토스의 존재하에 활성화되고(탈-억제되고) 및/또는 글루코스의 존재하에 억제되는 갈락토키나아제 프로모터의 조절하에 있을 수 있다.

[0124] Cas9 관련 CRISPR/Cas 시스템은 2개의 RNA 비-암호화 성분을 포함한다: tracrRNA, 및 뉴클레아제 가이드 서열들(스페이서)을 함유하며 동일한 직접 반복부(DR)가 그 사이에 위치하는 pre-crRNA 어레이. 게놈 공학기술을 수행하기 위해 CRISPR/Cas 시스템을 사용하려면 이들 RNA의 두 가지 기능이 모두 존재해야 한다 (Cong 등, (2013) Scienceexpress 1/10.1126/science 1231143 참고). 일부 구현예에서, tracrRNA 및 pre-crRNA는 별개의 발현 작제물 또는 별개의 RNA를 통해 공급된다. 다른 구현예에서, 조작된 성숙한 crRNA (표적 특이성 부여)가 tracrRNA(Cas9와의 상호작용 제공)에 융합되어, 키메라성 cr-RNA-tracrRNA 하이브리드 (또한, 단일 가이드 RNA라고도 함)를 생성하는 경우, 키메라성 RNA가 구축된다. (Jinek 상기 참고 및 Cong, 상기 참고).

[0125] 표적 부위

[0126] 상술한 바와 같이, DNA 도메인은 유전자좌, 예를 들어 알부민 또는 다른 안전한-하버 유전자 내의 어느 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 DNA-결합 도메인은 자연 발생 DNA-결합 도메인에 비해 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 공학기술 방법은 합리적인 설계 및 다양한 유형의 선택을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 합리적인 설계는, 예를 들어, 삼중항 (또는 사중항) 뉴클레오타이드 서열 및 개별(예를 들어, 아연 핑거) 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하는 것을 포함하는데, 이는 각각의 삼중항 또는 사중항 뉴클레오타이드 서열이 특정 삼중항 또는 사중항 서열에 결합하는 DNA-결합 도메인의 하나 이상의 아미노산 서열과 연결된다. 예를 들어 공유의 미국특허 제6,453,242호 및 제6,534,261호를 참고하며, 이들은 그의 전체가 본원에 참고로 포함된다. 합리적 설계의 TAL-이펙터 도메인도 수행될 수 있다. 예를 들어, 미국공개 번호 20110301073를 참고한다.

[0127] 파아지 디스플레이 및 2-하이브리드 시스템을 포함하는 DNA-결합 도메인에 적용 가능한 예시적인 선택 방법은 미국 특허 제5,789,538호; 제5,925,523호; 제6,007,988호; 제6,013,453호; 제6,410,248호; 제6,140,466호; 제6,200,759호; 및 제6,242,568호; 뿐만 아니라 WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 및 GB 2,338,237에 개시되어 있다.

[0128] 표적 부위의 선정; 융합 단백질 (및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 설계 및 구축을 위한 뉴클레아제 및 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있으며, 미국특허 제7,888,121호 및 제8,409,891호에 상세히 기재되어 있으며, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

- [0129] 또한, 이들 및 다른 참고문헌에 개시된 바와 같이, DNA-결합 도메인(예를 들어, 다중-펩거 아연 핑거 단백질)은 어느 적합한 링커 서열(예를 들어 5개 이상의 아미노산의 링커를 포함)을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 6개 이상의 아미노산 길이의 예시적인 링커 서열에 대해서는 예를 들어, 미국특허 제6,479,626호; 제6,903,185호; 제7,153,949호를 참고한다. 본 명세서에 기재된 단백질은 단백질의 개별 DNA-결합 도메인 사이에 적합한 링커들의 어느 조합을 포함할 수 있다. 또한, 미국공개 번호 20110301073를 참고한다.
- [0130] 공여체
- [0131] 전술한 바와 같이, 예를 들어 돌연변이 유전자의 정정 또는 파브리병에서 부족 또는 결핍된 단백질을 암호화하는 유전자(예를 들어,  $\alpha$ -GalA)의 발현 증가를 위한 외인성 서열 (또한, 소위 "공여체 서열" 또는 "공여체"라고도 함)의 삽입이 제공된다. 공여체 서열은 전형적으로 그것이 배치된 게놈 서열과 동일하지 않음이 분명할 것이다. 공여체 서열은 상동성 영역("상동성 아암")이 축적된 비-상동 서열을 포함할 수 있어서 관심의 위치에서 효율적인 HDR을 가능하게 한다. 또한, 공여체 서열은 세포 염색질내 관심의 영역에 대해 상동성이 없는 서열을 함유하는 벡터 분자를 포함할 수 있다. 공여체 분자는 세포 염색질에 대한 상동성이 있는 여러 불연속 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 관심 영역에 정상적으로 존재하지 않는 서열이 표적화 삽입된 경우에 있어서, 상기 서열은 공여체 핵산 분자 내에 존재할 수 있고, 관심 영역의 서열과 상동성인 영역이 축적될 수 있다.
- [0132]  $\alpha$ -GalA 단백질을 암호화하는 전이유전자를 선택된 위치에 표적화 삽입하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. GLA 전이유전자는 전장  $\alpha$ -GalA 단백질을 암호화할 수 있거나, 절단된  $\alpha$ -GalA 단백질을 암호화할 수 있다. 삽입 폴리뉴클레오타이드는 "외인성" 폴리뉴클레오타이드, "공여체" 폴리뉴클레오타이드 또는 분자, 또는 "전이유전자"로 지칭될 수 있다. 비제한적인 예시적인 GLA 공여체는 도 1b, 1c, 10, 13 및 25에 도시되어 있다.
- [0133] 공여체 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 및/또는 이중-가닥일 수 있고, 선형 또는 원형 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제8,703,489호 및 제9,255,259호를 참고한다. 공여체 서열(들)은 또한 DNA MC 내에 함유될 수도 있는데, 이는 원형 또는 선형 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 공보 제20140335063호를 참고한다. 선형 형태로 도입되는 경우, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 [예를 들어, 엑소뉴클레아제성 분해 (exonucleolytic degradation)로부터] 공여체 서열의 말단이 보호될 수 있다. 예를 들어, 1개 이상의 디데옥시뉴클레오타이드 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 첨가되고/되거나 자기-상보적인 올리고뉴클레오타이드가 한쪽 또는 양쪽 말단에 라이게이션된다. 예를 들어, Chang 등 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls 등 (1996) Science 272:886-889를 참고한다. 외인성 폴리뉴클레오타이드를 분해로부터 보호하기 위한 추가의 방법은 비제한적으로, 말단 아미노기(들)의 첨가 및 변형된 뉴클레오타이드간 연결기, 예컨대 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트 및 0-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기의 사용을 포함한다.
- [0134] 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 복제 기원, 프로모터 및 항생제 내성을 암호화하는 유전자와 같은 추가 서열을 갖는 바이러스성 또는 비-바이러스 벡터 분자의 일부로서 세포 내로 도입될 수 있다. 또한, 공여체 폴리뉴클레오타이드는, 리포솜 또는 폴록사머와 같은 제제와 복합체화된 핵산으로서, 네이키드 핵산으로서 도입될 수 있으며, 또는 바이러스[예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 인테그라제 결합있는 렌티바이러스(IDLV)]에 의해 전달될 수 있다.
- [0135] 공여체는 일반적으로 통합 부위의 내인성 프로모터, 즉 공여체가 삽입된 내인성 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(예를 들어, 고도로 발현된 알부민, AAVS1, HPRT 등)에 의해 그의 발현이 유도되도록 삽입된다. 그러나, 공여체가 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어 항시성 프로모터 또는 유도성 또는 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있음은 분명할 것이다. 일부 구현예에서, 유전자가 염색체 외에서 발현되도록, 세포 내에서 발현 플라스미드로 공여체가 유지된다.
- [0136] 공여체 분자는 내인성 유전자의 전부, 일부가 발현되도록, 또는 아무것도 발현되지 않도록 내인성 유전자 내에 삽입될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 전이유전자는 알부민 또는 다른 유전자좌에 삽입되어,  $\alpha$ -GalA 단백질(들)을 암호화하는 전이유전자와의 융합체로서, 일부(예를 들어 리소솜 효소를 암호화하는 전이유전자의 N-말단 및/또는 C-말단)가 발현되거나, 또는 내인성 알부민 서열 중 어느 것도 발현되지 않을 수 있다. 다른 구현예에서, (예를 들어, 알부민과 같은 추가의 암호화 서열을 갖거나 갖지 않는) 전이유전자는 임의의 내인성 유전자좌, 예를 들어 안전한-하버 유전자좌에 통합된다.
- [0137] 내인성 서열(내인성 또는 전이유전자의 일부)이 전이유전자로 발현되는 경우, 내인성 서열(예를 들어, 알부민 등)은 전장 서열(야생형 또는 돌연변이체) 또는 부분 서열일 수 있다. 바람직하게는 내인성 서열은 기능을 갖는



다. 이들 전장 또는 부분 서열(예를 들어, 알부민)의 기능의 비-제한적 예는 전이유전자(예를 들어, 치료 유전자)에 의해 발현된 폴리펩타이드의 혈청 반감기를 증가시키는 것 및/또는 담체로서 작용하는 것을 포함한다.

[0138] 또한, 발현에 필요하지는 않지만, 외인성 서열은 전사 또는 번역 조절 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 절연체, 내부 리보솜 유입 부위, 2A 펩타이드를 암호화하는 서열, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0139] 전이유전자에 연결된 외인성 서열은 또한 암호화된 단백질의 가공 및/또는 분비를 보조하는 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 이들 신호 펩타이드의 비-제한적인 예는 알부민, IDS 및 인자 IX로부터의 것들을 포함한다(예를 들어, 도 13 참조).

[0140] 특정 구현예에서, 외인성 서열(공여체)은 관심 단백질 및 이의 융합체로서 막 단백질의 세포외 도메인의 융합체를 포함하여, 융합 단백질이 세포 표면에 위치하게 된다. 이것은 전이유전자에 의해 암호화된 단백질이 잠재적으로 혈청에서 작용하도록 한다. 파브리병의 경우, 전이유전자 융합에 의해 암호화된  $\alpha$ -GalA 효소는 세포(예를 들어, RBC) 표면상의 그의 위치에서 혈청에 축적되는 대사 산물에 작용한다. 또한, 정상적인 분해 과정에서 RBC가 비장 대식세포에 의해 식세포 작용화되면, 대식세포가 세포를 삼킬 때 형성되는 리소좀은 막 결합 융합 단백질을 자연적으로 효소에 더욱 유리한 pH에서 리소좀내 고농도의 대사 산물에 노출시킨다. 잠재적인 융합 파트너의 비-제한적인 예를 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

잠재적인 융합 파트너의 예

명칭	활성
밴드 3	음이온 전달체는 RBC 막 표면 단백질의 최대 25%를 생성한다
아쿠아포린 1	물 수송체
Glut1	글루코스 및 L-데하이드로아스코르브산 수송체
Kidd 항원 단백질	우레아 수송체
RhAG	가스 수송체
ATP1A1, ATP1B1	$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
NKCC1, NKCC2	$\text{Na}^+ \text{ K}^+ 2\text{Cl}^-$ - 공동수송체
SLC12A3	$\text{Na}^+ -\text{Cl}^-$ - 공동수송체
SLC12A1, SLA12A2	$\text{Na-K}$ - 공동수송체
KCC1	K-Cl 공동수송체
KCNN4	Gardos 채널

[0141]

[0142] 일부 경우에, 공여체는 변형된 내인성 유전자(GLA)일 수 있다. 예를 들어, 내인성 유전자를 코돈 최적화하여 공여체를 생성할 수 있다. 게다가, 효소 대체 요법에 대한 항체 반응은 문제의 특정 치료적 효소 및 개별 환자에 따라 다르지만, 야생형  $\alpha$ -GalA에 의한 효소 대체 요법으로 치료하는 많은 파브리병 환자에서 유의한 면역 반응이 관찰되었다. 전이유전자는 전이유전자가 없는 피험체에 비해 단백질의 양 (및/또는 그의 활성)이 증가될 때 치료적 단백질을 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 치료 효능에 대한 이들 항체의 관련성도 다양하다(Katherine Ponder, (2008) J Clin Invest 118(8): 2686 참고). 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 야생형 GLA에 비해 변형된 서열을 갖는 공여체의 생성을 포함할 수 있으며, 이들은 내인성 면역 반응에 대한 프라이밍 에피토프(priming epitope)로 알려진 부위에서 기능적으로 침묵하는 아미노산 변화를 생성하는 변형, 및/또는 이와 같은 공여체에 의해 생성된 폴리펩타이드가 면역원성이 낮아지는 절단(truncation)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0143] 파브리병 환자는 종종 뇌에  $\alpha$ -GalA 효소가 결여되어 신경적인 후유증을 갖는다. 불행하게도, 혈액 뇌 장벽의 불투과성 때문에 혈액을 통해 뇌에 치료제를 전달하는 것이 종종 어렵다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 치료제의 뇌 내로의 전달을 증가시키는 방법과 함께 사용될 수 있으며, 예컨대 고장성 만니톨 용액의 경동맥내 투여, 집중적인 초음파의 사용 및 브라디키닌 유사체의 투여를 통한 뇌 모세관의 세포들 사이의 융합막의 일시적인 개방, 예컨대 일시적 삼투 파괴를 야기하는 방법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다 (Matsukado 등 (1996))

Neurosurgery 39: 125). 대안적으로, 치료제는 뇌의 특정 수술을 위한 수용체 또는 수술 기전을 이용하도록 설계될 수 있다. 사용될 수 있는 특정 수용체의 예는 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체, 또는 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 1 및 2 (LRP-1 및 LRP-2)를 포함한다. LRP는 넓은 범위의 apoE, tPA, PAI-1 등과 같은 분비 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있으므로, LRP에 대한 이들 단백질 중 하나의 인식 서열을 융합시킴으로써 효소의 뇌 내로의 전달을 촉진할 수 있으며, 간에서 치료적 단백질을 발현한 후, 이를 혈류로 분비한다 (Gabathuler, (2010) 상기 참조).

[0144] 세포

[0145] 또한, 본원에는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성된 세포를 포함하는, 유전자 변형된 세포, 예를 들어 α-GalA 단백질을 암호화하는 전이유전자를 포함하는 간세포 또는 줄기세포가 제공된다. GLA 전이유전자는 전장 또는 변형된 것일 수 있으며, 염색체 외에서 발현되거나, 또는 1개 이상의 뉴클레아제를 사용하여 세포 계층에 표적화된 방식으로 통합될 수 있다. 무작위적으로 통합하는 것과 달리, 뉴클레아제-매개 표적화된 통합은 전이유전자가 특정 유전자에 통합되도록 한다. 전이유전자는 표적 유전자의 어느 곳이나 통합될 수 있다. 특정 구현예에서, 전이유전자는 뉴클레아제 결합 및/또는 절단 부위 또는 그 부근, 예를 들어 절단 및/또는 결합 부위의 1 내지 300개의 염기쌍 (또는 그 사이의 임의의 수의 염기 쌍)만큼의 업스트림 또는 다운스트림, 더욱 바람직하게는 절단 및/또는 결합 부위의 어느 한쪽의 1 내지 100개의 염기쌍(또는 그 사이의 임의의 수의 염기쌍) 이내, 더욱 더 바람직하게는 절단 및/또는 결합 부위의 어느 한쪽의 1 내지 50개의 염기쌍(또는 그 사이의 임의의 수의 염기쌍) 이내에 통합된다. 특정 구현예에서, 통합된 서열은 임의의 벡터 서열(예를 들어, 바이러스 벡터 서열)을 포함하지 않는다.

[0146] 세포 또는 세포주를 포함하나 이에 제한되지 않는 어느 세포 유형은, 본 명세서에 기재된 바와 같이 유전자 변형되어 전이유전자를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포의 다른 비-제한적인 예는, T-세포(예를 들어, CD4+, CD3+, CD8+ 등); 수지상 세포; B-세포; (예를 들어, 환자-유래된) 자가조직, 근육 세포, 뇌 세포 등을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 간 세포이며, 생체내에서 변형된다. 특정 구현예에서, 세포는 이중의 다능성, 분화전능성 또는 다분화능 줄기세포(예를 들어, CD34+ 세포, 유도 만능 줄기세포(iPSC), 배아 줄기세포 등)를 포함하는 줄기세포이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 세포는 환자로부터 유래된 줄기세포이다.

[0147] 본 명세서에 기재된 세포는 예를 들어 생체내 요법에 의해, 질병을 갖는 피험체에서 파브리병을 치료 및/또는 예방하는데 유용하다. 예를 들어 뉴클레아제-변형된 세포가 팽창되어 표준 기술을 사용하여 환자에게 재도입될 수 있는 경우와 같은 생체의 요법도 제공된다. 예를 들어 Tebas 등 (2014) New Eng J Med 370 (10): 901을 참고한다. 줄기세포의 경우, 상기 피험체 내에 주입한 후에, 또한 이들 전구체가 (삽입된 공여체로부터) 기능성 단백질을 발현하는 세포로 생체내 분화된다.

[0148] 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포를 포함하는 약제학적 조성물도 또한 제공된다. 또한, 세포는 환자에게 투여하기 전에 동결보존될 수 있다.

[0149] 전달

[0150] 본 명세서에 기재된 뉴클레아제, 이들 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 공여체 폴리뉴클레오타이드 및/또는 조성물(예를 들어, 세포, 단백질, 폴리뉴클레오타이드 등)은 임의의 적당한 수단에 의해 생체내 또는 생체외로 전달될 수 있다.

[0151] 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레아제의 전달 방법은 예를 들어, 미국특허 제6,453,242호; 제6,503,717호; 제6,534,261호; 제6,599,692호; 제6,607,882호; 제6,689,558호; 제6,824,978호; 제6,933,113호; 제6,979,539호; 제7,013,219호; 및 제7,163,824호에 개시되어 있으며, 이들 모두의 개시내용은 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0152] 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 및/또는 공여체 작제물은 또한 아연 핑거, TALEN 및/또는 Cas 단백질(들) 중 하나 이상을 암호화하는 서열을 함유하는 벡터를 사용하여 전달될 수 있다. 비제한적으로, 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터 등을 포함하는 임의의 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 미국특허 제6,534,261호; 제6,607,882호; 제6,824,978호; 제6,933,113호; 제6,979,539호; 제7,013,219호; 및 제7,163,824호를 참고하며, 이들은 그 전체가 본 명세서에서 참고로 포함된다. 게다가, 이들 벡터 중 임의의 벡터는 치료에 필요한 하나 이상의 서열을 포함할 수 있음이 분명할 것이다. 따라서, 하나 이상의 뉴클레아제 및 공여체 작제

물이 세포 내로 도입될 때, 뉴클레아제 및/또는 공여체 폴리뉴클레오타이드는 동일한 벡터 상에 또는 상이한 벡터 상에 보유될 수 있다. 다수의 벡터가 사용되는 경우, 각각의 벡터는 하나 또는 다수의 뉴클레아제 및/또는 공여체 작제물을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

- [0153] 통상적인 바이러스성 및 비-바이러스성 유전자 전달 방법을 사용하여, 뉴클레아제 및 공여체 작제물을 암호화하는 핵산을 세포(예를 들어, 포유동물 세포) 및 표적 조직에 도입할 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 네이키드 핵산 및 리포솜 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체를 이룬 핵산을 포함한다. 바이러스성 벡터 전달 시스템은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함하며, 세포로 전달된 후에 에피솜 또는 통합된 게놈을 갖는다. 유전자 요법 과정에 대한 검토를 위해, Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175(1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51 (1): 31-44(1995); Haddada 등, in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Bohm(eds. )(1995); 및 Yu 등, *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994)를 참고한다.
- [0154] 핵산의 비-바이러스성 전달 방법으로는, 전기천공, 리포펙션, 미세주입, 바이오리스틱, 바이로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다중양이온 또는 지질:핵산 콘주게이트, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 체제-향상된 흡수를 포함한다. 초음파천공, 예를 들어, Sonitron 2000 시스템 (Rich-Mar)을 사용하여 핵산을 전달할 수도 있다.
- [0155] 추가의 예시적인 핵산 전달 시스템은 하기에 제공된 것들을 포함한다: Amaxa Biosystems(Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX 분자 전달 시스템(Holliston, MA) 및 Copernicus Therapeutics Inc (예를 들어, US6008336 참고). 리포펙션은 예를 들어 미국특허 제5,049,386호; 제4,946,787호; 및 제4,897,355호)에 기재되며, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예를 들어, 트랜스펙탐™ 및 리포펙틴™). 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024의 것들을 포함한다.
- [0156] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하는 지질:핵산 복합체의 제조는 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese 등, *Cancer Gene Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr 등, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy 등, *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654(1994); Gao 등, *Gene Therapy* 2: 710-722(1995); Ahmad 등, *Cancer Res.* 52: 4817-4820 (1992); 미국특허 제4,186,183호, 제4,217,344호, 제4,235,871호, 제4,261,975호, 제4,485,054호, 제4,501,728호, 제4,774,085호, 제4,837,028호, 및 제4,946,787호 참고).
- [0157] 본 명세서에 기재된 조성물(cDNA 및/또는 뉴클레아제)은, 또한 나노입자, 예를 들어 지질 나노입자(LNP)를 사용하여 전달될 수 있다. 예를 들어, Lee 등 (2016) *Am J Cancer Res* 6(5): 1118-1134; 미국특허 공보 제20170119904호; 미국가출원 제 62/559,186호를 참고한다.
- [0158] 추가의 전달 방법에는 EnGeneIC 전달 비히클(EDV)로 전달되는 핵산의 패키징 사용이 포함된다. 이들 EDV는 이중 특이적 항체를 사용하여 표적 조직에 특이적으로 전달되며, 여기에서 항체의 한 아암은 상기 표적 조직에 대한 특이성을 갖고, 다른 아암은 EDV에 대한 특이성을 갖는다. 항체는 EDV를 표적 세포 표면에 가져온 다음, EDV를 세포내이입(endocytosis)에 의해 세포로 가져온다. 세포에 들어가면 내용물이 방출된다(MacDiarmid 등 (2009) *Nature Biotechnology* 27(7): 643 참고).
- [0159] 조작된 ZFP를 암호화하는 핵산을 전달하기 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은, 바이러스를 신체의 특정 세포로 표적화하고 바이러스 적재물을 핵으로 이동조절하는, 고도로 진화된 공정을 이용한다. 바이러스성 벡터는 피험체에 직접 (생체내) 투여될 수 있거나, 시험관내에서 세포를 처리하는데 사용될 수 있고, 변형된 세포가 피험체에 (생체외) 투여된다. ZFP를 전달하기 위한 종래의 바이러스 기반 시스템으로는, 비제한적으로, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련, 백시니아, 및 유전자 전달을 위한 단순 포진 바이러스 벡터가 포함된다. 숙주 게놈에서 통합은 종종 삽입된 전이유전자의 장기간 발현을 초래하는 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노-관련 바이러스의 유전자 전달 방법으로 가능하다. 추가로, 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 높은 형질도입 효율성이 관측되었다.
- [0160] 레트로바이러스의 굴성(tropism)은 외부 외피막 단백질을 통합하여 표적 세포의 잠재 표적 모집단을 확장시킴으로써 변경될 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분할 세포에 형질도입되거나 감염될 수 있는 레트로바이러스 벡터이며, 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생성한다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 상기 표적

조직에 좌우된다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6~10 kb의 외래 서열에 대한 패키징 용량을 갖는 시스-작용성 긴 말단 반복부를 갖도록 구성된다. 최소 시스-작용의 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이는 표적 세포로 치료 유전자를 통합하기 위해 사용되어, 영구적 전이유전자 발현을 제공한다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 쥐 백혈병 바이러스(MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SIV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 이들의 조합을 기반으로 하는 벡터들을 포함한다 (예를 들어, Buchscher 등, J. Virol. 66: 2731-2739 (1992); Johann 등, J. Virol. 66: 1635-1640 (1992); Sommerfelt 등, Virol. 176: 58-59 (1990); Wilson 등, J. Virol. 63: 2374-2378 (1989); Miller 등, J. Virol. 65: 2220-2224 (1991) 참고).

[0161] 일시적인 발현이 바람직한 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율을 나타낼 수 있으며, 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터로 높은 역가와 높은 수준의 발현이 얻어졌다. 이 벡터는 상대적으로 간단한 시스템에서 대량으로 생산될 수 있다. 아데노-관련 바이러스("AAV") 벡터는 또한 표적 핵산으로 세포를 형질전환하는데 사용되며, 예를 들어, 핵산 및 펩타이드의 시험관내 생성 및 생체내 및 생체의 유전자 요법 절차에 사용된다(예를 들어, West 등, Virology 160: 38-47 (1987); 미국특허 제4,797,368호; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994) 참고). 재조합 AAV 벡터의 구축은 하기를 포함하는 다수의 공보에 기재되어 있다: 미국특허 제5,173,414호; Tratschin 등, Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985); Tratschin, 등, Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466-6470 (1984); 및 Samulski 등, J. Virol. 63: 03822-3828(1989).

[0162] 적어도 6가지 바이러스 벡터 접근법이 현재 임상 시험에서 유전자 전달에 이용 가능하며, 이는 형질전환제를 생성하기 위해 헬퍼 세포주에 삽입된 유전자에 의한 결함 벡터의 상보성을 포함하는 접근법을 이용한다.

[0163] pLASN 및 MFG-S는 임상 시험에 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다 (Dunbar 등, Blood 85: 3048-305 (1995); Kohn 등, Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech 등, PNAS 94:22 12133-12138(1997)). PA317/pLASN은 유전자 요법 시험에 사용된 최초의 치료용 벡터였다. (Blaese 등, Science 270: 475-480(1995)). MFG-S 패키지 벡터에 대해 50% 이상의 형질도입 효율성이 관측되었다. (Ellem 등, Immunol Immunother. 44(1): 10-20 (1997); Dranoff 등, Hum. Gene Ther. 1: 111-2(1997).

[0164] 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터(rAAV)는 결함이 있고 비병원성인 파코바이러스 아데노-관련 2형 바이러스에 기초한 유망한 대안적인 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 전이유전자 발현 카세트에 측접하는 AAV 145bp 역전된 말단 반복부를 보유하는 플라스미드로부터 유래된다. 형질도입된 세포의 계놈으로의 통합으로 인한 효율적인 유전자 전달 및 안정적인 전이유전자 도입은 이 벡터 시스템의 주요 특징이다. (Wagner 등, Lancet 351: 9117 1702-3 (1998), Kearns 등, Gene Ther. 9: 748-55(1996)). 비-제한적인 예, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV8. 2, AAV9 및 AAV rh10 및 슈도타이핑된 AAV, 예컨대 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6을 포함하는 다른 AAV 혈청형은 또한, 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0165] 복제-결핍된 재조합 아데노바이러스 벡터(Ad)는 고 역가에서 생산될 수 있고, 수많은 상이한 세포 유형을 쉽게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 전이유전자가 Ad E1a, E1b 및/또는 E3 유전자를 대체하도록 조작되며; 후속으로 복제 결함 벡터는 트랜스에서 결실 유전자 기능을 제공하는 인간 293 세포에서 증식된다. Ad 벡터는 간, 신장 및 근육에서 발견되는 것과 같은 비-분할, 분화된 세포를 포함하여 생체내에서 여러 유형의 조직을 형질도입할 수 있다. 종래의 Ad 벡터는 큰 운반 용량을 갖는다. 임상 시험에서 Ad 벡터를 사용하는 예는 근육내 주사에 의한 항종양 면역화를 위한 폴리뉴클레오타이드 요법을 포함한다(Sterman 등, Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998)). 임상 시험에서 유전자 전달을 위한 아데노바이러스 벡터 사용의 추가 예는 하기를 포함한다: Rosenecker 등, Infection 24: 1 5-10 (1996); Sterman 등 Hum. Gene Ther. 9: 7 1083-1089 (1998); Welsh 등, Hum. Gene Ther. 2: 205-18 (1995); Alvarez 등, Hum. Gene Ther. 5: 597-613 (1997); Topf 등, Gene Ther. 5: 507-513 (1998); Sterman 등, Hum. Gene Ther. 7: 1083-1089 (1998).

[0166] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 상기 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포 및 레트로바이러스를 패키징하는  $\psi$ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터는 핵산 벡터를 바이러스 입자로 패키징하는 생산자 세포주에 의해 일반적으로 생성된다. 벡터는 전형적으로 숙주의 패키징 및 (적용가능한 경우) 후속적 통합에 필요한 최소의 바이러스 서열을 함유하고, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 암호화하는 발현 카세트에 대체된다. 누락된 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 숙주 계놈으로의 패키징 및 통합에 필요한 AAV 계놈으로부터의 역전사 말단 반복(ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스성



DNA는 다른 AAV 유전자를 암호화하는 헬퍼 플라스미드, 즉 rep 및 cap을 함유하지만 ITR 서열이 결핍된 세포주에 패키징된다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스에 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열이 없기 때문에 상당한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은 예를 들어 열처리에 의해 감소될 수 있으며, 이 열처리에 의해 아데노바이러스는 AAV보다 더 민감하다.

[0167] 많은 유전자 요법 적용에서, 유전자 요법 벡터는 특정 조직 유형에 고도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스 외부 표면 상에 바이러스성 코트 단백질과의 융합 단백질로서 리간드를 발현시킴으로써 주어진 세포 유형에 대한 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 관심있는 세포 유형에 존재하는 것으로 공지된 수용체에 대한 친화도를 가지도록 선택된다. 예를 들어, Han 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9747-9751 (1995)은 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린(heregulin)을 발현하도록 변형될 수 있고, 재조합 바이러스가 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시키는 것으로 보고했다. 이 원리는 표적 세포가 수용체를 발현하고 바이러스가 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현하는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 확장될 수 있다. 예를 들어, 섬유상 파아지는 사실상 임의의 선택된 세포 수용체에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는 항체 단편(예를 들어, Fab 또는 Fv)을 디스플레이하도록 조작될 수 있다. 상기 설명은 주로 바이러스 벡터에 적용되지만, 비 바이러스 벡터에도 동일한 원리가 적용될 수 있다. 이러한 벡터는 특정 표적 세포에 의한 흡수를 선호하는 특정 흡수 서열을 함유하도록 조작될 수 있다.

[0168] 유전자 요법 벡터는 아래에 기재된 바와 같이 전형적으로 전신 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 두개내 주입) 또는 국소 도포에 의해 개별 환자에게 투여함으로써 생체내 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 생체의 세포, 예컨대 개별 환자로부터 외삽된 세포(예를 들어, 림프구, 골수 천자, 조직 생검) 또는 보편적인 공여체 조혈 줄기세포로 전달될 수 있으며, 이어서 일반적으로 벡터를 통합한 세포에 대한 선택후, 세포를 환자에게 재삽입할 수 있다.

[0169] 뉴클레아제 및/또는 공여체 작제물을 함유하는 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 리포좀 등)는 또한 생체내 세포의 형질도입을 위한 유기체에 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 투여는 비제한적으로 주사, 주입, 국소 도포 및 전기천공을 포함하는, 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적인 접촉으로 분자를 도입하기 위해 정상적으로 사용되는 임의의 경로에 의한다. 상기 핵산을 투여하기 위한 적합한 방법이 이용가능하고, 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있으며, 특정 조성물을 투여하기 위해 하나 이상의 경로가 사용될 수 있지만, 특정 경로는 종종 또 다른 경로보다 더 신속하고 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0170] 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드의 도입에 적합한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터(IDLV)를 포함한다. 예를 들어, Ory 등 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11382-11388; Dull 등(1998) J. Virol. 72: 8463-8471; Zuffery 등(1998) J. Virol. 72: 9873-9880; Follenzi 등(2000) Nature Genetics 25 : 217-222; 미국특허 공개 제2009/054985호를 참고하라.

[0171] 약제학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법뿐만 아니라 투여되는 특정 조성물에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 하기에 기재된 바와 같이, 이용가능한 약제학적 조성물의 다양한 적합한 제형이 있다(예를 들어, Remington 's Pharmaceutical Sciences, 17판, 1989 참고).

[0172] 뉴클레아제-암호화 서열 및 공여체 작제물이 동일하거나 상이한 시스템을 사용하여 전달될 수 있음은 자명할 것이다. 예를 들어, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드에 의해 운반될 수 있는 반면, 하나 이상의 뉴클레아제는 AAV 벡터에 의해 운반될 수 있다. 게다가, 상이한 벡터는 동일하거나 상이한 경로(근육내 주사, 꼬리 정맥 주사, 다른 정맥내 주사, 복강내 투여 및/또는 근육내 주사)에 의해 투여될 수 있다. 벡터는 동시에 또는 임의의 순차적 순서로 전달될 수 있다.

[0173] 생체의 투여 및 생체내 투여 모두를 위한 제형은 액체 또는 에멀전화된 액체 중의 현탁액을 포함한다. 활성 성분은 종종 약제학적으로 허용가능하고 활성 성분과 양립가능한 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 조성물은 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제 또는 약제학적 조성물의 유효성을 향상시키는 다른 시약을 함유할 수 있다.

[0174] 적용

[0175] 본 발명의 방법은 파브리병(예를 들어, 리소좀 축적 질환)의 치료 및/또는 예방을 고려한다. 치료는 필요한 효



소의 발현 및 혈류로의 방출을 위해, 세포 내의 안전한 하버 유전자좌 (예를 들어, 알부민)에 치료적 질병 관련 GLA 전이유전자를 삽입하는 것을 포함할 수 있다. 치료적  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자는 야생형 또는 변형된 단백질질을 암호화할 수 있으며; 및/또는 코돈 최적화된 GLA 전이유전자를 포함할 수 있으며; 및/또는 단백질질을 기능적으로 변경시키지 않으면서도 에피토프가 제거될 수 있는 전이유전자를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 필요한 효소의 발현 및 혈류로의 방출을 위해, 세포에  $\alpha$ -GalA 암호화하는 전이유전자를 발현하는 에피솜을 삽입하는 단계를 포함한다. 혈류로의 생성물 방출을 위해서는, 간세포와 같은 분비 세포로의 삽입이 특히 유용하다. 본 발명의 방법 및 조성물은 조혈 줄기세포 내에 하나 이상의 치료제를 암호화하는 GLA 전이유전자를 공급하여 이들 세포로부터 유래된 (이들 세포의 자손인) 성숙한 세포(예를 들어, RBC)가 치료용  $\alpha$ -GalA 단백질을 함유하도록 요구되는 어떠한 상황에서도 사용될 수 있다. 이들 줄기세포는 시험관내 또는 생체내에서 분화될 수 있으며, 모든 환자에게 사용될 수 있는 보편적인 공여체 세포 유형으로부터 유래될 수 있다. 추가로, 세포는 체내의 세포를 포획(trapping)하기 위해 막관통 단백질을 함유할 수 있다. 치료는 또한 환자 세포의 사용을 포함할 수 있는데, 이는 세포가 생체외에서 개발된 후 환자에게 다시 도입되는 치료적 전이유전자를 포함한다. 예를 들어, 적합한  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자를 함유하는 HSC는 골수 이식을 통해 환자에게 삽입될 수 있다. 대안적으로,  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자를 사용하여 편집되는 줄기세포, 예컨대 근육줄기세포 또는 iPSC가 근육 조직에 주사될 수 있다.

[0176] 따라서, 이 기술은 환자가 문제(예를 들어, 발현 수준의 문제 또는 단백질이 하위-기능적(sub-functioning) 또는 비-기능적으로 발현되는 문제)로 인해 일부 단백질이 결핍된 상태에서 사용할 수 있다. 본 발명에 특히 유용한 것은 파브리병을 가진 피험체에서 기능을 교정하거나 회복시키는 전이유전자의 발현이다.

[0177] 비-제한적인 예로써, 결함이 있거나 결여된  $\alpha$ -Gal A 단백질을 대체하기 위한 기능적  $\alpha$ -Gal A 단백질의 상이한 생산 방법들이 달성되어, 파브리병의 치료에 사용된다. 단백질을 암호화하는 핵산 공여체는 안전한 하버 유전자좌 (예를 들어, 알부민 또는 HPRT)에 삽입될 수 있고, 외인성 프로모터를 사용하거나 세이프 하버에 존재하는 프로모터를 사용하여 발현될 수 있다. GLA 전이유전자가 간세포로부터 혈류 내로 발현된  $\alpha$ -Gal A 단백질의 분비를 매개하는 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 추가로 포함하는 경우, 간세포의 알부민 유전자좌에 GLA 전이유전자를 삽입하는 것이 특히 유용하다. 대안적으로, 공여체는 결함있는 유전자를 그 자리에서(*in situ*) 교정하는데 사용될 수 있다. 원하는  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자는 CD34+ 줄기세포에 삽입될 수 있으며, 골수 이식 중에 환자에게 반환될 수 있다. 최종적으로, 핵산 공여체는 베타 글로빈 유전자좌의 CD34+ 줄기세포에 삽입되어, 이 세포로부터 유래된 성숙한 적혈구가 상기 핵산 공여체에 의해 암호화된 고농도의 생물학적 물질을 갖도록 한다. 이어서, 생물학적-함유 RBC는 막관통 단백질(예를 들어, 수용체 또는 항체)을 통해 정확한 조직으로 표적화될 수 있다. 추가로, RBC는 전기 감작(electrosensitization)을 통해 생체 외에서 민감화되어, 에너지 공급원에 노출된 후 더욱 파손되기 쉽다(WO2002007752 참고).

[0178] 일부 적용에서, 내인성 유전자는 본 발명의 방법 및 조성물의 사용에 의해 녹아낼 수 있다. 이러한 양태의 예들은 비정상적인 유전자 조절인자 또는 비정상적인 질환 관련 유전자를 녹아낼 수 있는 것을 포함한다. 일부 적용에서, 비정상적인 내인성 유전자는 유전자의 야생형 버전으로 기능적으로 또는 원위치로 대체될 수 있다. 삽입된 유전자는 또한 치료적  $\alpha$ -GalA 단백질의 발현을 개선시키거나 그의 면역원성을 감소시키기 위해 변경될 수 있다. 일부 적용에서, 삽입된  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자는 뇌와 같은 선택된 조직으로의 수송을 증가시키는 융합 단백질이다.

[0179] 하기 실시예는 뉴클레아제가 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) (또는 한 쌍의 ZFN) 또는 TALEN (또는 한 쌍의 TALEN)을 포함하는 본 개시내용의 예시적인 구현예에 관한 것이다. 이것은 예시의 목적만을 위한 것이며, 조작된 DNA-결합 도메인을 갖는 호밍 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제) 및/또는 자연 발생적 융합체를 포함하는 호밍 엔도뉴클레아제(메가뉴클레아제) DNA-결합 도메인과 이중성 절단 도메인의 융합체, 및/또는 조작된 단일 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas 시스템과 같은 다른 뉴클레아제 또는 뉴클레아제 시스템이 사용될 수 있음은 자명한 사실일 것이다. 유사하게, 적합한 GLA 공여체는 비제한적으로 하기에 예시된 것들이지만, 임의의 GLA 전이유전자를 포함하는 것으로 인정될 것이다.

[0180] **실시예**

[0181] 실시예 1:  $\alpha$ -GalA 암호화 전이유전자의 설계 및 작제

[0182] GLA 전이유전자의 발현을 위해 두 가지 접근법을 취했다. 생체내 단백질 대체 플랫폼<sup>®</sup> ("IVPRP")이라 불리는 한 가지 방법은, 조작된 뉴클레아제를 이용하여 알부민 프로모터에 의해 발현이 유도되도록 전이유전자를 알부민 유전자좌에 삽입하는 것이다(미국 특허 제9,394,545호 및 제9,150,847호 참고). 두번째 접근법은 전이유전자의

cDNA 복사본을 포함하는 AAV로 세포를 형질도입하는 것을 포함하며, 여기서 cDNA는 프로모터 및 다른 조절 서열을 추가로 포함한다. 이 두 가지 접근법에 대한 GLA 전이유전자 발현 카세트 설계는 도 1에 설명되어 있다.

[0183] 실시예 2: 방법

[0184] HepG2/C3a 및 K562 세포 형질도입

[0185] cDNA 및 IVP<sup>®</sup> 시스템에서 표준 기술을 사용하여 HepG2 세포를 형질도입하였다.

[0186] A. cDNA

[0187] cDNA 접근법은 hAAT 프로모터에 연결된 APOE 인헨서(Okuyama 등 (1996) Hum Gene Ther 7(5): 637-45), HBB-IGG 인트론(인간 베타-글로빈 유전자의 제1 인트론 유래의 5'-공여체 부위 및 면역글로불린 유전자 중쇄 가변 영역의 인트론 유래의 3'-수용체 부위로 구성된 키메라성 인트론), 신호 펩타이드, 암호화 서열(여기서, 암호화 서열은 선택적으로 코돈 최적화됨) 및 소 성장 호르몬(bGH) 폴리A 신호 서열을 포함하는, AAV 전달된 발현 작제물의 사용을 포함할 수 있다.

[0188] cDNA 시스템의 경우, HepG2 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같이 AAV GLA cDNA 벡터로 형질도입시키고, 상청액을 수집하고 α-Gal A 활성을 시험하였다. 또한, 과량의 만노스-6 인산(M6P, 5mM)의 부재 및 존재하에 상기 형질도입된 HepG2 세포로부터 수집된 상청액에서 K562 세포를 배양하였고, 이로 인해 M6P 수용체를 세포 표면 상에 포화시키고 α-Gal A의 흡수를 차단한다. 세포 펠릿을 수집하고, α-Gal A 활성을 시험하였다.

[0189] B. IVP<sup>®</sup>

[0190] 파브리 IVP<sup>®</sup>에는 3개의 구성요소가 있다: 인간 알부민 인트론 1에서 특정 유전자좌를 절단하도록 설계된, ZFN SBS 47171 및 SBS 47898을 암호화하는 2개의 rAAV2/6 벡터; 및 hGLA 공여체 주형을 암호화하는 1개의 rAAV2/6 벡터. 공여체 hGLA 주형은 상동성 아암이 축적하는 hGLA cDNA의 코돈 최적화된 버전으로, 인간 알부민에 공여체의 상동성-지정 복구(homology-directed repair; HDR) 통합을 촉진한다.

[0191] HepG2/C3A 세포("HepG2" 세포라고도 함)(ATCC, CRL 10741)를, 10% 우태 혈청(FBS)을 포함하고 이글스(Earle's) 염 및 L 글루타민(Corning) 및 1×페니실린 스트렙토마이신 글루타민(Life Technologies)를 포함하는 최소 필수 배지(MEM) 중에 유지하고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 세포는 3~4일마다 계대 배양하였다.

[0192] IVP<sup>®</sup> 형질도입을 위해, 세포를 세정하고, 0.25% 트립신/2.21 mM EDTA (Corning)로 트립신화한 다음 성장 배지에 재현탁시켰다. 작은 분취액을 인산 완충 식염수(PBS; Corning)에서 트립판 블루 용액 0.4%(w/v)와 1:1로 혼합하고, TC20 자동화 세포 계수기(Bio Rad)로 카운팅하였다. 세포를 성장 배지에서 1ml 당 2e5의 밀도로 재현탁하고, 웰 당 0.5ml 배지 중에 1e5로 24 웰 플레이트(Corning)에 분주하였다. 재조합 AAV2/6 입자를 성장 배지와 함께 적절한 다중 감염도(MOI)로 혼합하고, 세포에 첨가하였다.

[0193] HepG2 세포는 hGLA 공여체(2회; 대조군) 또는 2개의 hALB ZFN SB 47171 및 SB 47931 + SB IDS 공여체(3회)로 형질도입하였다. 공여체 단독 형질도입을 위한 MOI는 6e5 벡터 계농(vg)/세포였다. ZFN+ 공여체 형질도입을 위한 MOI는 각각의 ZFN에 대해 3e5 vg/세포, 그리고 hGLA 공여체에 대해 6e5 vg/세포였다. 이는 1:1:2의 ZFN1:ZFN2: 공여체 비를 나타내었고, 시험관내 실험에서 최적의 비율로 사전 결정되었다. hGLA 공여체는 시험관내 형질도입 효율을 최대화하기 위해 ZFN 벡터 후 24시간에 첨가하였다.

[0194] 형질도입 후, 세포를 6~10일 동안 배양하였다. 상청액을 3일, 5일, 7일 및 10일 (해당되는 경우)에 수집하고, 새로운 배지로 대체하였다. 최종 상청액 수집 단계 후, 세포를 트립신화하고 상기 기재된 바와 같이 재현탁시킨 다음, 원심분리하여 세포 펠릿을 생성하고, PBS로 세정하고, -80°C에서 저장하였다.

[0195] 유사한 방법을 사용하여 HepG2 세포에 GLA cDNA 작제물을 형질도입하였다. GLA cDNA 작제물에 대한 MOI는 3e4, 1e5, 3e5 또는 1e6 vg/세포 중 하나이다.

[0196] α-GalA 활성 측정

[0197] α-GalA 활성은 합성 기질인 4-메틸움벨리페릴-α-D-갈락토피라노시드(4MU-α-Gal, Sigma)를 사용하여 형광 검정으로 평가하였다.

[0198] 간단히, 10 마이크로리터의 HepG2 세포 배양 상청액을, 인산 완충액 (0.1M 시트레이트/0.2M 인산 완충액, pH

4.6, 1% 트리톤 X-100)에 용해된 5mM 4MU- $\alpha$ -Gal 40 $\mu$ l와 혼합하였다. 반응물을 37℃에서 배양하고, 100 $\mu$ l의 0.5M 글리신 완충액(pH 10.3)을 첨가하여 중결시켰다. SpectraMax Gemini XS 형광 판독기(Molecular Device, Sunnyvale CA)를 사용하여 형광 측정(Ex365/Em450)에 의해, 4 메틸움벨리페론(4 MU)의 방출을 측정하였다.

[0199] 4 MU의 연속 2배 희석을 사용하여 표준 곡선을 생성하였다. 수득된 데이터는 로그 로그 곡선과 일치했으며; 시험 샘플에서 4 MU의 농도는 상기 최적 곡선을 사용하여 계산되었다. 효소 활성은 세포 배양 상청액 1ml당 검정 배양시간 1시간당 방출된 nmol 4MU (nmol/hr/ml)로 표시된다.

[0200] Gb3 검출

[0201] Gb3 및 라이소-Gb3 기질 정량화 및 분석:

[0202] 파브리 기질인 글로보트리아오실세라마이드(Gb3)는 선택된 쥐 혈장 및 조직에서 질량 분광법을 통해 측정하였다. 간단히 말해서, 조직을 칭량하여, 이를 조직 파괴 유체(5% MeOH, 95% 물 및 0.1% 아세트산(ascetic acid)) 중에서 조직 1mg당 5ml 유체의 비율로 기계적으로 파괴하였다. 그런 다음, 10 $\mu$ l의 혈장 또는 조직 슬러리를 실리콘 튜브 내의 90 $\mu$ l의 침전 용매 [내부 표준 N-트리코사노일 세라마이드 트리헥소사이드(C23:0, Matreya)를 용액으로 스파이크한 MeOH]에 첨가하고, 볼텍스시키고, 실온에서 30분 동안 진탕 플레이트에 놓았다. 그런 다음 샘플을 원심분리하고, 유리 LC-MS 바이알 내의 90 $\mu$ l의 단일 블랭크 매트릭스(DMSO/MeOH 1:1 + 0.1% FA)에 샘플 10 $\mu$ l를 첨가하였다. GLAKO 마우스에 존재하는 우세한 Gb3 종인, Gb3 사슬 길이 24:0에 대해 샘플을 분석하고, 세라마이드 트리헥소사이드(Gb3, Matreya)로 생성된 표준 곡선에 대해 측정하였다.

[0203] 글로보트리아오실스핑고신(라이소-Gb3)은 내부 표준으로서의 글루코실스핑고신(Matreya) 및 라이소-세라마이드 트리헥소사이드(라이소-Gb3, Matreya)를 사용하여, 유사한 방식으로 측정하여 표준 곡선을 생성하였다.

[0204] 유전자 변형의 평가(% 인텔)

[0205] ZFN 표적 부위를 MiSeq 시스템(Illumina, San Diego CA)을 사용하여 서열 분석하였다. 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 인간 알부민 유전자와 또는 마우스 알부민 유전자와의 ZFN 표적 부위에 걸친 194bp 단편의 증폭을 위해, 그리고 증폭의 두번째 라운드를 위한 결합 서열의 도입을 위해 설계되었다. 이 PCR 증폭의 생성물을 정제하고, 시퀀싱 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 결합시키기 위해 설계된 말단 영역뿐만 아니라 애플리온-특이적 식별자 서열("바코드")을 도입하도록 설계된 올리고뉴클레오타이드로 두번째 PCR을 수행하였다. 혼합된 집단의 바암호화된 애플리온은 단일 검정 칩에서 수천개의 샘플을 병렬 분석할 수 있는 고체상 시퀀싱 절차인 MiSeq 분석을 거쳤다.

[0206] GLAKO 마우스 모델에서 파브리 IVP<sup>®</sup> 및 cDNA 벡터의 생체내 시험

[0207] 파브리병의 동물 모델에서 이들 치료제의 효능을 입증하기 위해, GLAKO 마우스를 HepG2 세포에서 사용된 동일한 AAV2/6 GLA cDNA 작제물로 형질도입하였다. 마우스 알부민을 절단하기 위해 설계된 ZFN SB-48641 및 SB-31523을 암호화하는 2개의 rAAV2/8 벡터 및 마우스 상동성 아암을 갖는 hGLA cDNA 공여체 주형을 암호화하는 1개의 rAAV2/8 벡터로 구성된, 파브리 IVP의 마우스 버전으로 다른 GLAKO 마우스를 형질도입시켰다. 대조군으로서, 추가의 GLAKO 마우스 및 야생형 마우스에는 벡터 입자를 함유하지 않는 AAV 벡터 체형 완충액(PBS, 35mM NaCl, 1% 수크로스, 0.05% 플루론산) F-68, pH 7.1)을 주사하였다. 동물들에게 AAV 주사 전일부터 시작하여 2주마다 50mg/kg 사이클로포스파마이드를 투여하였다. 모든 마우스는 주사 당시 4~12주령이었다. 마우스를 2~3개월 동안 모니터링하고, 혈장을 매주 또는 격주로 턱밑 천자(submandibular puncture)를 통해 혈장  $\alpha$ -GalA 활성을 측정하였다. 실험 종료시 마우스를 안락사시키고,  $\alpha$ -GalA 활성을 상기 기재한 바와 같이 혈장, 간, 신장, 심장 및 비장에서 측정하였다. 질량 분광분석법을 통해 혈장, 간, 신장, 심장 및 비장에서 Gb3 및 라이소-Gb3 기질 수준을 측정하였다. 파브리 IVP로 처리된 마우스의 경우, 상기한 MiSeq을 통해 간 조직의 인텔을 측정하였다.

[0208] 웨스턴 블랏 및 탈당화 절차:

[0209] 마우스 간을 0.1 M 시트레이트 /0.2 M 인산 완충액, pH 4. 6에서 균질화시켰다. 간 균질물을 10분간 끓인 다음, NEB 프로토콜에 따라 1시간 동안 PNGase F(New England Biolabs, NEB)로 처리하여 각각의 샘플의 분취액을 탈당화시켰다.

[0210] 1 $\mu$ g의 총 단백질을 NuPage 4~12% Bis-Tris Midi 겔(Invitrogen)에 로딩하였다. PNGase F 처리 전후의 0.5ng의 재조합 인간 GLA 로딩(R & D Systems)이 크기 기준으로 포함되었다.

[0211] 웨스턴 블랏에 사용된 항체는 하기와 같다: 1차 항체:  $\alpha$ -GLA, Sino 생물학적 토끼 단클론성 항체, 1:1000; 2차

항체: 염소  $\alpha$ -토끼 IgG-HRP, Thermo Fisher, 1: 10,000.

실시예 3: 시험관내에서 GLA 전이유전자의 발현

IVPRP<sup>®</sup> 접근법: 방법은 상기 실시예 2에 기술되어 있다. 간단히 말해, HepG2/C3a 세포는 각각의 ZFN에 대하여 100k vg/세포 및 GLA 공여체에 대하여 200k vg/세포의 용량, 또는 ZFN 및 공여체에 대하여 300k/600k의 용량의 AAV2/6ZFN 및 hGLA 공여체 벡터에 의해 각각 형질도입하였다.

도 2에 도시된 바와 같이, 형질도입된 세포를 상청액 및 세포 펠릿에서  $\alpha$ -GalA 활성을 증가시켰으며, 활성은 ZFN+ 공여체 그룹에서 3×모의-형질도입된 HepG2 수준에 도달했다. ZFN 활성의 측정자인 알부민 유전자좌에서의 인델은 GLA 공여체 작제물 A 및 B에 대하여 각각의 벡터 용량으로 측정하였다. 공여체 A와 B의 인델은 300/600 벡터 용량의 경우 43.46% 및 39.81%이었고, 100/200 벡터 용량의 경우 8.81% 및 9.69%였다.

cDNA 접근법: 도 1b에 나타난 cDNA 작제물을 상기 기재된 HepG2/G3 세포에서도 또한 시험하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, AAV2/6 GLA cDNA 벡터로 형질도입된 HepG2/C3a 세포는 상청액 및 세포 펠릿에서  $\alpha$ -GalA 활성을 용량-의존적으로 증가시켰다. 각각의 용량은 도 3에 표시되어 있으며, 세포 당 수천개의 바이러스 벡터의 복제본(K)을 나타낸다. 상청액  $\alpha$ -GalA 활성은 높은 cDNA 용량에서 200×모의 수준에 도달했다.

단백질은 분리되어 효소 대체 요법에서 피험체에게 투여될 수 있다.

실시예 4: 2개의 접근법의 생체내 시험

다음으로, 두 가지 유형의 접근법(cDNA 및 IVPRP<sup>®</sup>)을 생체내에서 시험하였다. 작제물을 AAV 2/6 또는 AAV 2/8로 패키징한 다음, GLA 녹아웃(GLAKO) 마우스에 정맥 내 주사하였다. 이것은 파브리병의 마우스 모델이다 (Bangari 등 (2015) Am J Pathol. 185(3): 651-65). 시험 물품은 투약 요법(표 3)과 함께 하기 (표 2)에 개시되어 있다.

## 표 2

IVPRP<sup>®</sup>에 대한 시험 물품 및 cDNA 접근법

	시험 물품 표지	시험 물품	역가(vg/mL)
IVPRP	SB-GLA 에 대한 마우스 AAV2/8 대리 시약	AAV8-hAAT-pCI-인트론-3FN-48641-DNA2. 0-FokELD	3. 55E+13
		AAV8-hAAT-pCI-인트론-3FN-31523-DNA2. 0-FokKKR	3. 33E+13
		AAV2/8-AAV-파브리-태그 없음-DNA2. 0-MsAlb LS	2. 33E+13
cDNA	SB-GLA 에 대한 마우스 AAV2/6 cDNA	AAV2/6- AAV-hAAT-pCI-GLA-cDNA2. 0	1. 94E+13

표 3

IVPRP® 및 cDNA 접근법의 생체내 시험을 위한 투약 요법

그룹 지정	유전자형	AAV 혈청형	ZFN 각각의 용량 수준 (vg/마우스)	hGLA 공여자 용량 수준 (vg/마우스)	hGLA cDNA 용량 수준 (vg/마우스)	총 AAV 용량 (vg/마우스)	총 AAV 용량 * (vg/kg)
제형 완충액 대조군 WT	야생형	N/A	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	0	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
제형 완충액 대조군 KO	GLAKO	N/A	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	0	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
ZFN+공여자	GLAKO	AAV 2/8	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	0	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
cDNA 저용량	GLAKO	AAV 2/6	0	0	$5.0 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{12}$
cDNA 고용량	GLAKO	AAV 2/6	0	0	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{13}$

\* vg/마우스 기준으로 투여된 동물. 모든 마우스 체중을 0.020 kg로 추정하면, 총 AAV 용량 수준은 ZFNs+공여체를 부여받은 동물에 대하여  $7.5 \times 10^{13}$  vg/kg 이다.

[0220]

[0221]

cDNA 접근법:

[0222]

도 4에 나타난 바와 같이, cDNA 처리 그룹으로부터의 GLAKO 마우스는 AAV 투여 후 가능한한 7일에 혈장내 과생리적  $\alpha$ -GalA 활성을 나타냈다. 도면에는 개별 마우스로부터의 결과가 도시되어 있다. 혈장  $\alpha$ -GalA 활성을 매주 측정하였고, 용량-의존적인 활성 수준이 연구 기간 동안 지속되었다. 혈장 활성은 저용량 ( $2.0 \times 10^{12}$  vg/kg) 그룹에서 최대  $6 \times$  야생형에 도달하였고, 고용량( $2.0 \times 10^{13}$  vg/kg) 그룹에서는  $280 \times$  야생형에 도달했다. 마우스를 2개월 후에 안락사시키고, 간 및 2차 원위 조직내  $\alpha$ -GalA 활성 및 Gb3 축적을 분석하였다.

[0223]

도 5에 도시된 바와 같이, 간, 심장 및 신장에서  $\alpha$ -GalA 활성의 용량-의존적 증가가 Gb3 기질 함량의 상응하는 감소와 함께 발견되었다. Gb3은 높은 AAV2/6 cDNA 용량으로 투여된 일부 GLAKO 마우스의 조직에서는 검출되지 않았다. 데이터는 또한 미처리된 GLAKO 마우스(도 5e 및 도 5f) 대비 기질의 청소능(clearance)의 양의 관점에서 분석하였고, 높은 cDNA 용량으로 처리된 마우스가 미처리된 GLAKO 마우스에서 발견된 기질의 평균 10% 미만만을 가지고 있음을 입증하였다.

[0224]

IVPRP® 접근법:

[0225]

IVPRP® 접근법 투여된 GLAKO 마우스에 대해 90일의 기간 동안 혈장 수준을 측정하였다. 데이터(도 6a)는  $\alpha$ -Gla 단백질 활성이 야생형 마우스에 대해 관찰된 것의 대략 25~30% 수준으로 혈청에서 검출되었음을 나타낸다. 이 실험에서는 한 그룹의 세포에 경미한 면역억제 요법 (2주마다 50mg/kg 사이클로포스파마이드)을 투여했다. 간에서 ZFN 활성을 측정한 결과(인텔), 경미한 면역억제로 처리한 동물이 약간 더 높은 수준의 인텔을 보였으나(도 6b), 두 그룹 모두 기대된 범위의 인텔을 가졌음을 발견하였다.

[0226]

점점 더 엄격한 면역억제제(이하에 표 4에 개시된 투약)를 사용하여, 제2 실험을 수행하였으며, 이 데이터(도 6c, 6d 및 6e)는 면역억제가  $\alpha$ -GalA 단백질 활성을 유의미하게 증가시키지 않는다는 것을 입증하였다.



표 4

IVPRP® 생체내 연구 #2, 면역 억제 적정

그룹	그룹 지정	면역억제	hGLA 공여체 (vg/마우스)	hGLA cDNA 용량 수준 (vg/마우스)	총 AAV 용량 (vg/kg)
1	저 IS	50 mg/kg 사이클로포스파미드 매 2 주마다	$1.2 \times 10^{12}$	0	$6.0 \times 10^{13}$
2	중간 IS	70 mg/kg 사이클로포스파미드 매주마다	$1.2 \times 10^{12}$	0	$6.0 \times 10^{13}$
3	고 IS	120 mg/kg 사이클로포스파미드 매주마다	$1.2 \times 10^{12}$	0	$6.0 \times 10^{13}$
4	cDNA 5e10	50 mg/kg 사이클로포스파미드 매 2 주마다	0	$5.0 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{13}$
5	cDNA 5e11	50 mg/kg 사이클로포스파미드 매 2 주마다	0	$5.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{13}$

[0227]

[0228]

$\alpha$ -Gal A는 이 단백질의 활성 부위에서 떨어져있는 일부 돌연변이가 파브리병을 유발하므로, 미스-폴딩에 기인한 불활성화에 취약할 것으로 생각되어 (Garman 및 Garboczi (2004) J Mol Biol 337 (2): 319-35), 디옥시갈락토노지리마이신 (Deoxygalactonojirimycin, DGJ)을 포함한 분자 샤페론의 사용이 일부 GLA 돌연변이체와 함께 사용하기 위해 제안되었다 (Moise 등 (2016) J. Am. Soc. 질량 스펙트럼 27(6): 1071-8). 따라서, 상기 기재된 연구에서 약 30-35일에 DGJ를 첨가하였다. 구체적으로, 매일 200 $\mu$ l의 물에 희석한 3mg/kg을 경구 위관영양법을 통해 투여했다. DGJ로 처리된 동물에서,  $\alpha$ -Gal A 활성의 급격한 증가가 검출되었다(도 7).

[0229]

이 연구에서 동물로부터의 조직은 또한 상기 기재된 바와 같이  $\alpha$ -GLA 활성에 대해 검사하였다. 결과(도 8)는 조직, 특히 간과 비장에서 활성이 검출될 수 있음을 보여주었다. 모든 조직에서 고용량 cDNA 접근법으로 검출된 활성은 야생형 마우스보다 더 높았다.

[0230]

$\alpha$ -Gal A 1차 기질의 수준은 또한 상기 기재된 바와 같이 혈장, 간 및 심장 조직에서 측정하였다. 데이터(도 9)는 IVPRP® 샘플의 경우 혈장에서 검출가능한 Gb3의 감소를 나타내었으며, cDNA 샘플의 경우 검출가능한 Gb3는 발견되지 않았다(야생형 마우스와 동일). 간 및 심장 조직의 경우, IVPRP® 샘플도 검출가능한 Gb3의 감소를 보여주었으며, 저용량 cDNA 샘플에서도 마찬가지였다. 고용량 cDNA 샘플의 경우, 야생형 샘플과 거의 동일한 수준이었다.

[0231]

이러한 결과는 본 명세서에 기재된 바와 같이 cDNA 또는 IVPRP® 접근법에 의한 GLA 전이유전자의 제공이 생체내에서 치료적 이점을 제공한다는 것을 보여준다.

[0232]

실시예 5: IVPRP® 공여체 설계 최적화

[0233]

GLA 암호화 영역의 설계를 최적화하고 신호 펩타이드를 최적화하기 위해 IVPRP® 접근법에 대한 공여체 설계를 조사했다. 시작하기 위해, 공여체 설계는  $\alpha$ -Gal A(GLA) 신호 펩타이드 (서열: MQLRNPEHLHLCALALRFLALVSWDIPGARA, 서열 번호 1)를 GLA 암호화 서열 앞에, 및 코작 서열 (서열: GCCACCATG, 서열 번호 2)를  $\alpha$ -Gal A 신호 펩타이드 앞에 삽입하여, 알부민 신호 펩타이드와는 별도의 신규한 번역 사건을 유도하도록 변화시켰다(도 10 참조, 그 예는 변이체 #A, 변이체 #B). 또한, 번역 동안 신호 펩타이드의 5' 서열을 제거하기 위해, *T. assigna* ("T2A") 유래의 2A-유사 서열의 사용 (Luke 등 (2008) J Gen Virol. 89(Pt 4): 1036-1042)을 포함하는 대안적인 IDS 신호 펩타이드의 사용 (서열: MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALG, 서열 번호 3)을 분석하였다 (도 10, 변이체 #H). 이전에 기재

한 바와 같이, HepG2/C3A 세포에서 신규한 작제물을 시험하였다.

[0234] 결과는 변이체 #A 및 변이체 #B가 시험관내 초기 공여체(도 11a)보다 훨씬 더 높은 수준의 α-GalA 활성을 갖는 것을 보여주었다. 또한, 변이체 K는 변이체 A 또는 초기 공여체에 비해, 훨씬 더 높은 수준의 α-GalA 활성을 나타내었다(도 11b).

[0235] 이어서, 하기 표 5에 열거된 투여 프로토콜을 사용하여 GLAKO 마우스에서 생체내에서 작제물을 시험하였다.

표 5

GLAKO 마우스에서 IVPRP® 공여체 설계의 생체내 시험

그룹 #	그룹 명칭	유전자형	마우스 수	ZFN 각각의 용량 수준 (vg/마우스)	hGLA 공여체 용량 수준 (vg/마우스)	총 AAV 용량 (vg/마우스)	총 AAV 용량* (vg/kg)
1	ZFN+ 초기 공여체	GLAKO	5	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
2	ZFN + 신규한 공여체 #A +GLA <sub>sp</sub>	GLAKO	5	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
3	ZFN + 신규한 공여체 #B + 조각, +GLA <sub>sp</sub>	GLAKO	5	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$
4	ZFN + 신규한 공여체 #E +T2A, +GLA <sub>sp</sub>	GLAKO	5	$1.5 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$6.0 \times 10^{13}$

[0236] 상기 기재된 바와 같이 α-Gal A 활성을 측정하기 위해 주당 1회씩 혈장을 채취하였다. 각 마우스의 모든 샘플에서 활성이 발견되었으며, 신규한 설계는 초기 공여체(도 12)보다 더 개선되었으며, 수준은 28일째 야생형(점선으로 표시)보다 적어도 40배 더 높았다. 샘플은 경시적으로 그룹 2(공여체 #A)에 대하여 대략 80×야생형 수준 및 그룹 4(공여체 #E)에 대해 50×WT으로 활성이 측정되는 증가를 보였다. 조직 샘플을 마우스로부터 취하여, Gb3의 수준을 측정하였고, 이는 미처리된 GLAKO 마우스에 비해 감소되는 것으로 밝혀졌다.

[0238] 상기 실험을 56일 동안 수행하였고, 이 때 동물을 희생시키고 간, 심장, 신장 및 비장 내의 α-Gal A 활성을 분석하였다. 확장된 데이터(도 15)는 야생형 동물의 혈장에 비해 처리된 동물의 혈장 내의 α-Gal A 활성이 100배 증가하고, 야생형(미처리된) 동물의 심장에 비해 처리된 동물의 심장내 α-Gal A 활성이 9-배 증가하는 것, 미처리된(야생형) 동물에 비해 처리된 동물의 신장내 α-Gal A 활성이 80% 증가한 것을 포함하여, 이 접근법이 시험된 조직내 α-Gal A 활성을 증가시킨다는 것을 입증한다.

[0239] 이어서, 처리 후 다양한 조직(혈장, 간, 심장 및 신장)에서 α-Gal A 당지질 기질 [Gb3(도 16a) 및 라이소-Gb3(도 16b)]의 수준을 측정하기 위한 조직 분석을 수행하였다. 도 16에 도시된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 처리는 처리전(초기) 및 미처리된(야생형) 동물에 비해, A, B 또는 E 변이체로 처리된 동물에 대한 모든 시험된 조직(혈장, 간, 심장 및 신장)에서 두 기질(Gb3 및 라이소-Gb3)의 수준이 감소되었으며, 이는 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법이 생체내에서 치료적으로 유리한 수준의 단백질을 제공한다는 것을 나타낸다.

[0240] 알부민-표적화된 ZFN과 함께 변이체 E 및 변이체 J(도 10 참조)를 투여한 후에 혈장 및 다양한 조직(간, 심장, 신장 및 비장) 내의 α-Gal A 활성을 검정하기 위해, 상기 기재한 실험을 반복하였다. 도 20 및 도 21에 도시된 바와 같이, 변이체 J 공여체를 투여한 동물의 혈장 내의 α-Gal A 활성(도 20a), 및 간, 심장, 신장 및 비장 내의 α-Gal A 활성(도 20b)은, 야생형의 거의 300배의 혈장 α-Gal A 활성, 및 간, 심장 및 비장 야생형보다 10~100배 또는 그 이상 큰 조직 α-Gal A 활성을 나타낸다.

[0241] 처리 후 다양한 조직(혈장, 간, 심장 및 신장) 내의 α-Gal A 당지질 기질 [Gb3(도 21a) 및 라이소-Gb3(도 21b)]의 농도를, 본 명세서에 기재된 바와 같이 측정하였다. 도 21에 나타난 바와 같이, 변이체 J의 발현은 기질 수준을 크게 감소시켰다.

[0242] 실시예 6: cDNA 접근법을 위한 GLA 전이유전자 카세트 설계의 최적화

- [0243] cDNA 접근법을 위한 GLA 전이유전자 카세트 또한 최적화되었다. 전이유전자는  $\alpha$ -Gal A 펩타이드, IDS 유전자 (이듀로네이트 2-설파타제)에 대한 신호 펩타이드, FIX 유전자 [인자 IX, (서열: MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC, 서열번호 4)] 및 알부민(서열: MKWVTFISLLFLFSSAYS, 서열번호 5) 신호 펩타이드를 포함하는 상이한 신호 펩타이드를 암호화하는 서열에 연결되었다(도 13b). 또한, GLA 전이유전자는 대안적으로 최적화된 cDNA 발현 벡터에 삽입되었다(도 13a, 또한 미국공개 번호 20170119906). 모든 작제물을 HepG2/C3A 세포에서 상기 기재된 바와 같이 세포 당 3만~60만 (K)의 바이러스 벡터 복제량 범위로 시험관내 시험하였고, IDS 및 FIX(F9) 리더 서열은 GLA 또는 ALB(알부민) 리더 서열(도 14a)을 사용할 때보다 더 큰  $\alpha$ -GalA 활성을 유도하는 것으로 나타났다. cDNA 변이체 #4, #5 및 #6(도 13)에 대한 데이터가 도 14b에 도시되어 있다.
- [0244] 작제물은 또한 상기 기재된 바와 같이 GLAKO 마우스에서 시험되고, 생체내에서 활성이다.
- [0245] 실시예 7: 웨스턴 블랏 및 탈당화에 의한  $\alpha$ -Gal A 단백질의 분석
- [0246] IVP<sup>®</sup> 접근법 또는 cDNA 접근법으로 처리된 마우스로부터의 혈장을, 실시예 2에 기재된 바와 같이  $\alpha$ -GalA 단백질의 존재에 대해 분석하였다. 또한, 샘플을 PNGaseF로 처리하여 탈당화시켰다.
- [0247] 도 17에 나타난 바와 같이, IVP<sup>®</sup> (도 17a는 변이체 A와 변이체 J에 대한 결과를 나타냄) 또는 초기 cDNA 작제물(도 13b에 도시된 작제물, 데이터는 도 17b에 나타냄) 처리후에 GLAKO 마우스에서 생체내 생산된  $\alpha$ -GalA 단백질이 재조합 hGalA 단백질과 유사하게 거동하며, 이는 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법이 임상적으로 관련된 수준, 즉 효소 대체 요법에서 현재 사용되는 재조합 치료 단백질과 유사한 치료 수준의 단백질을 제공한다 하는 것을 나타낸다.
- [0248] 실시예 8: cDNA 투여 후 시험관내 단백질 생산
- [0249] Hep2G 세포를 AAV GLA cDNA 변이체 #4로 형질도입시키고, 5일 후에 상청액을 수집하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이  $\alpha$ -Gal A 활성 및 K562 세포의 배양에 사용된 상청액을 시험하였다.
- [0250] 도 28a에 나타난 바와 같이, HepG2 세포를 AAV GLA cDNA 변이체 #4로 형질도입시키고 5일 후에 수집된 상청액은, 높은  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타내었다. 도 28b는 HepG2 상청액으로부터의  $\alpha$ -Gal A가 24시간 내에 K562에 의해 흡수되었고, 그 흡수가 M6P에 의해 차단되었음을 보여준다.
- [0251] 따라서, 본 명세서에 기재된 세포는  $\alpha$ -Gal A를 다량으로 생산 및 분비하며, 분비된  $\alpha$ -Gal A는 다른 세포에 의해 흡수된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 시스템은 예를 들어 효소 대체 요법에서, 이를 필요로 하는 피험체의 투여를 위한  $\alpha$ -Gal A의 생산에 사용될 수 있다.
- [0252] 실시예 9: cDNA 변이체 #4로 처리된 마우스의 생체내 활성
- [0253] GLAKO 마우스에 cDNA 변이체 #4(도 13 참조) 또는 초기 cDNA 작제물(도 13b 참조)을 포함하는 5.0e10 VG(2.0e12 VG/kg)의 AAV를 함유하는 제형 완충액 200 $\mu$ l을 정맥내 처리하고, 및 2개월의 기간 동안 혈장  $\alpha$ -GalA 활성에 대하여 분석하였다. 변이체 #4로 처리된 GLAKO 마우스의 혈장 내의  $\alpha$ -GalA 활성은 초기 cDNA 작제물에서 관찰된 것의 약 10배였다(도 18a). 상기 기재된 바와 같이, 두 처리 그룹에 대한 간, 심장, 신장 및 비장 내 활성을 측정하였고, 도 18b에 표시하였다. 또한, 처리된 마우스의 간에서  $\alpha$ -GalA 단백질을 분석하였고, 상기 논의된 바와 같이 PNGase F 또는 Endo H로 처리한 후에 분자량의 변화를 관측하였다(도 18c). 추가로, 도 32에 나타난 바와 같이, 초기 및 변이체 #4 cDNA 모두로 처리된 GLAKO 마우스는 시험된 모든 조직에서 파브리 기질 농도가 감소된 것으로 나타났다.
- [0254] 이러한 데이터는 cDNA 접근법이 생체 내에서 치료적으로 유리한 수준의  $\alpha$ -GalA 단백질 생산을 위한 강력한 플랫폼임을 입증한다.
- [0255] 실시예 10: 초기 cDNA 작제물로 처리한 마우스의 생체내 용량 적정
- [0256] GLAKO 마우스를 1.25e11 VG/kg 내지 5.0e12 VG/kg 범위의 초기 cDNA 작제물(도 13b)을 포함하는 AAV의 용량으로 정맥내 처리하고, 실시예 4 및 5에 기재된 바와 같이, 6개월의 기간동안 혈장  $\alpha$ -GalA 활성을 분석하였다.
- [0257] 초기 cDNA로 처리된 GLAKO 마우스는 야생형의 1 $\times$  내지 최대 40 $\times$ 야생형의 용량-의존적인 혈장내  $\alpha$ -GalA 활성을 보였다(도 19). 또한, 도 29에 도시된 바와 같이,  $\alpha$ -GalA 활성은 형질도입 후 6개월 동안 (용량-의존적 방

식으로) 치료 수준으로 유지되어, 장기적인 치료적 이점을 나타낸다. 도 30은 180일(치료 후 6개월)에서의 간, 비장, 심장 및 신장내  $\alpha$ -Gal A 활성을 나타내며, 또한 이들 조직에서 치료 수준을 나타낸다.  $\alpha$ -Gal A 활성의 용량-의존적 증가는 또한 Gb3 기질 함량의 감소와도 상응하였다. 도 31 및 32를 참조하라. 이는 평가된 모든 조직에서 Gb3 함량의 용량-의존적 감소를 나타낸다.

[0258] 상기 데이터는 본 명세서에 기재된 cDNA 접근법으로 치료된 대상에서  $\alpha$ -GalA 단백질의 치료 수준이 생성된다는 것을 입증한다.

[0259] 실시예 11: 추가 생체내 IVPRP<sup>®</sup> 연구

[0260] GLAKO 마우스를 ZFN 및 다양한 예시적인 hGLA 공여체 작제물로 처리하고, 생체내 게놈 변형, 생체내 GLA 활성 및 생체내 파브리 기질의 감소에 대해 상기 기재된 바와 같이 평가하였다. 실시예 5를 참고한다.

[0261] 도 22에 나타난 바와 같이, GLA 공여체의 뉴클레아제-매개된 통합은 파브리병의 GLAKO 마우스 모델에서 간세포를 영구적으로 변형시켰다. 도 23은 표시된 조직 내의  $\alpha$ -Gal A 활성을 경시적으로 나타내었고(도 23a), 그리고 동물에 뉴클레아제 및 GLA 공여체를 투여한 후 2개월 시점에서(도 23b) 나타내었다. 도면에 도시된 바와 같이, 간-생성된  $\alpha$ -Gal A는 혈류로 분비되어 2차 조직에 의해 흡수되며, 안정적인 혈장 활성이 야생형의 최대 80배가 되었다. 도 24에서는 미처리된 동물, 야생형 동물 및 공여체 단독으로 처리된 동물에 비해, 뉴클레아제 및 공여체로 처리된 동물에서 시험된 모든 조직내 기질 농도가 크게 감소된 것으로 나타났다.

[0262] HepG2 및 GLAKO 마우스에서의 실험은 변이체 L 및 변이체 M으로 명명된 변형된 공여체를 사용하여 수행하였으며(도 25), 상기 변이체 M은 변이체 L의 GLA 신호 펩타이드 대신에 IDS 신호 펩타이드를 포함한다.

[0263] L 및 M 공여체 통합의 검출을 위해, NGS 접근법을 사용하였고 이는 통합 사건이 결여된 야생형 유전자에 대해 생성된 생성물에 비해 공여체가 통합되었을 때 상이한 생성물을 생성하는 비편향된(unbiased) PCR 기법에 기초한다. 간단히, 5-NGS 프라이머 서열(도 25b의 프라이머 1과 동일함)을 전이유전자의 3' 말단에 첨가하였다(도 25a 참조). NGS 프라이머 서열의 바로 다운스트림에, 표적화된 통합(TI) 서열을 첨가하였다. TI 서열은 알부민 유전자좌에서 상응하는 서열과 동일한 염기 조성 및 길이를 갖지만, 염기 서열이 혼동되어 전이 유전자 통합을 포함하는 좌위에 비해, 통합이 없는 야생형 좌위과 관련된 PCR 산물의 증폭을 위한 PCR 편향이 도입되지 않는다. 따라서 2개의 PCR 생성물은 동일한 프라이머를 사용하여, 동일한 크기 및 조성의 PCR 산물을 생산하지만, 상이한 서열을 가져서, NGS에 의한 인텔 및 TI 사건의 동시 분석, 뿐만 아니라, NGS에 의한 TI 사건의 준비된 확인(ready identification)이 가능하게 된다.

[0264] 인간 세포에서의 통합 사건의 분석을 위하여, 사용된 프라이머는 이하와 같다:

[0265] 프라이머 1: 5' GCACTAAGGAAAGTGCAAAG (서열번호 6)

[0266] 프라이머 2: 5' TAATACTCTTTTAGTGTCTA (서열번호 7)

[0267] 인간 세포에 사용된 TI 서열은 이하에 나타나있으며, 여기에서 혼동된(scrambled) 서열은 이탤릭체로 나타내었고, 프라이머 1 결합 부위의 위치는 밑줄친 부위로 나타내었다:

5' GCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAAGATTGACCAGACCAGATAGAAGAATGT  
[0268] *AACTGTAGTTCTAATAGGACTTATTATCCCAAAGAC* (서열번호 8).

[0269] 2개의 프라이머를 사용하는 증폭으로, 이하에 나타난 바와 같은 222 bp 앰플리콘(amplicon)을 생성하였다:

[0270] 야생형 앰플리콘 (삽입 없음):

5'GCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACCTAGAGTGACTGAAACTTCACAGA  
ATAGGGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCA  
CTATGCTTTATTTAAAAACCAAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAG  
AACTTGATTTTATTTTATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTTGTTGCTGTTGA  
TAGACACTAAAAGAGTATTA (서열번호 9).

[0271]



[0272] TI 앰플리콘 [이탤릭체는 혼동된 서열을 나타낸다]:

5'GCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAAGATTGACCAGACCAGATAGAAGAATGT  
AACTGTAGTTCTAATAGGACTTATTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATG  
CTTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTT  
GTATTTATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTGATAGA  
CACTAAAAGAGTATTA (서열번호 10).

[0273]

[0274] 유사하게, 마우스 세포에 사용된 TI 서열 및 프라이머가 이하에 나타나있다. 통합 사건의 분석을 위하여, 사용된 프라이머는 이하와 같다:

[0275] 프라이머 1: 5' TTGAGTTTGAATGCACAGAT (서열번호 11)

[0276] 프라이머 2: 5' GAAACAGGGAGAGAAAAACC (서열번호 12).

[0277] 마우스 세포에 사용된 TI 서열은 이하에 나타나있으며, 여기에서 혼동된 서열은 이탤릭체로 나타났고, 프라이머 1 결합 부위의 위치는 밑줄친 부위로 나타내었다:

5'AAATCTTGAGTTTGAATGCACAGATCAATTGTAACTAAAGAAATAGTAATA  
TAGAGTTTAAATATAGATAGCTATGACTGCACTTGATAGAAGGTAACGGTGCCA  
CCTTCAGATTT (서열번호 13)

[0278]

[0279] 2개의 프라이머를 사용하는 증폭으로, 이하에 나타난 247 bp 앰플리콘을 생성하였다:

[0280] 야생형 앰플리콘 (삽입 없음):

5'TTGAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACGGGTTTTAAAAATAAT  
AATGTTGGTGAAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGC  
CACCTTCAGATTTTCTGTAAACGATCGGGAACCTGGCATCTTCAGGGAGTAG  
CTTAGGTCAGTGAAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGT  
CTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTC  
(서열번호 14)

[0281]

[0282] TI 앰플리콘 (이탤릭체는 혼동된 서열을 나타낸다):

5'TTGAGTTTGAATGCACAGATCAATTGTAACTAAAGAAATAGTAATATAGAG  
TTTAAATATAGATAGCTATGACTGCACTTGATAGAAGGTAACGGTGCCACCTTC  
AGATTTTCTGTAAACGATCGGGAACCTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGG  
TCAGTGAAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCAT  
CAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTC (서열번호 15)

[0283]

[0284] 추가로, 이러한 기술은 이하에 나타난 프라이머 및 삽입된 TI 서열을 사용하여 비-인간 영장류 [레서스 원숭이 (rhesus macaque), NHP] 에서 사용할 수 있다:

[0285] 프라이머 1: 5' CCACTAAGGAAAGTGCAAAG (서열번호 16)

[0286] 프라이머 2: 5' TGAAAGTAAATATAAATACAAGTTC (서열번호 17)

[0287] NHP 세포에 사용된 TI 서열이 이하에 나타나있고, 여기에서 혼동된 서열은 이탤릭체로 나타나며, 프라이머 1 결합 부위의 위치는 밑줄친 상태로 나타나있다:

5'CCACTAAGGAAAGTGCAAAGGAGCGCTAACTGGAACATACTCGCTATTTAA  
GAACATTATAAGATACTAATTCAGTATTCGAAGAC (서열번호 18).

[0288]



[0289] 2개의 프라이머를 사용하는 증폭으로, 이하에 나타난 173 bp 앰플리콘을 제조하였다:

야생형 앰플리콘 (삽입 없음): 5'CCACTAAGGAAAGTGCAAAG  
TAACCTTAGAGTGACTTAACTTCACAGAACAGAGTTGAAGATTGAATTCA  
TAACCTGTCCCTAAGACCTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAGCCACA  
AAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTTGTATTTATATTTACTTTTC

[0290] A (서열 번호 19)

[0291] TI 앰플리콘 (이텔릭체는 혼동된 서열을 나타낸다):

5'CCACTAAGGAAAGTGCAAAGGAGCGCTAACTGGAACATACTCGCTATTTAA  
GAACATTATAAGATACTAATTCAGTATTCGAAGACCTATCCATTGCACTATGCT  
TTATTTAAAAGCCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTTGT

[0292] ATTTATATTTACTTTTCA (서열번호 20).

[0293] 따라서, 간암 세포주 HepG2 유래의 인간 세포는 HDR의 분석을 위해 ZFN 및 TI 서열을 포함하는 GLA 공여체 변이체 #L로 처리되었다. 형질도입 7일 이후에 형질도입된 세포로부터 DNA를 정제하고, NGS를 통하여 분석하였다.

[0294] 도 26에 나타난 바와 같이, 시험관내 인텔 및 TI (HDR)는 ZFN 대 TI 공여체의 고정된 비율로 투여량-의존적 반응을 나타내었다. 게다가, GLAKO 마우스에서 나타난 바와 같이, 변이체 M의 뉴클레아제-매개된 표적화 통합 (TI)은 야생형의 최대 250-배의 안정된 혈장 활성을 얻었고, 및 심장 및 신장 내의  $\alpha$ -Gal A 활성은 각각 야생형의 20-배 이상, 및 야생형의 4-배 이상이었다.

[0295] GLA 공여체 작제물의 뉴클레아제-매개 TI 이후,  $\alpha$ -Gal A가 제2 조직에서 흡수되는지 여부를 추가로 평가하기 위한 검정이 실시되었다. 간략히, 상기에 기재된 바와 같이, IDS 신호 펩타이드 및 표적화 통합 (TI) (공여체 변이체 M)의 분석을 위한 3' 서열을 포함하는 GLA 공여체 작제물이 GLAKO 마우스를 치료하는데 사용되었고, 혈장 및 조직 샘플 (예를 들어, 간, 심장, 비장, 신장, 뇌 등)은  $\alpha$ -Gal A 활성 및 기질 농도 모두에 대해 검정되었다.

[0296] 도 27에 나타나 바와 같이,  $\alpha$ -Gal A 안정된 혈장 활성은 야생형의 최대 250-배 이상이고, 심장 및 신장의  $\alpha$ -Gal A 활성은 각각 야생형의 20-배 및 야생형의 4-배 이상이다.

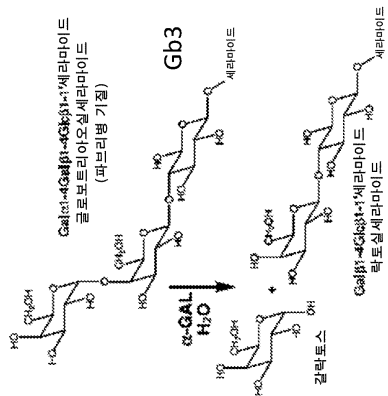
[0297] 데이터는 치료 수준의  $\alpha$ -Gal A 단백질이 본원에 기재된 IVPRP 접근법에 의해 치료된 피험체s (제2 조직 포함)에서 생성되었음을 입증하였다.

[0298] 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원, 및 공개는 전체로서 본원에 참고로 통합된다.

[0299] 본원의 기재 내용이 명확한 이해를 목적으로 설명 및 예시의 방식으로 일부 상세 사항에서 제공되었으나, 당업자는 본원의 사상 또는 범주를 벗어나지 않고도 다양한 변화 및 변경 사항이 실시될 수 있다는 것을 명확하게 이해할 것이다. 따라서, 상술한 설명 및 실시예는 제한으로 해석되어서는 안된다.

도면

도면 1a



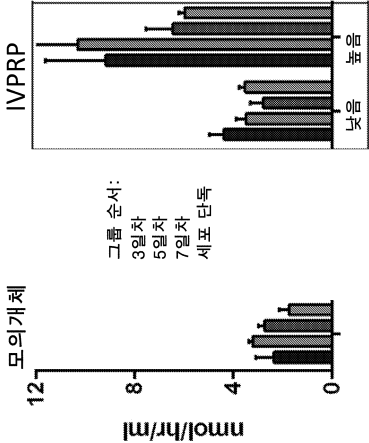
도면 1b

	입원처	프로모터	인트론	신호 펩티드	GLA 암호화 영역	몰리타
ITR	ApoE	hAAT	HBB-IGG	GLA 신호	GLA 암호화	bGHpA
						ITR

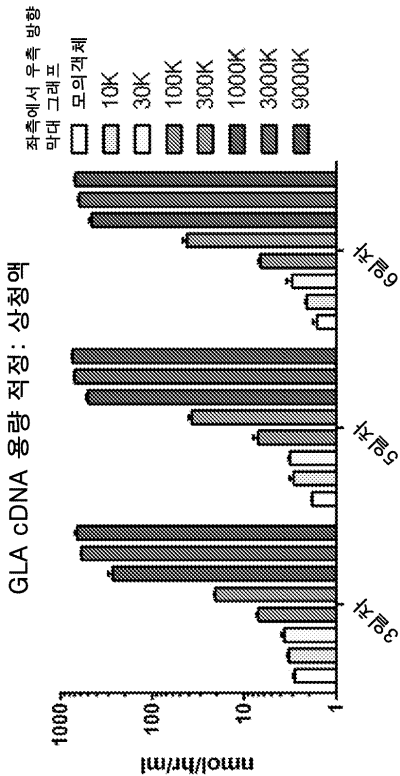
도면1c

Hom. arm		스플라이스-acc.	신호 펄티드	GLA 암호화 영역	폴리A	Hom. arm	
ITR	HA-L	SA	GLA 신호	GLA 암호화	bGHpA	HA-R	ITR

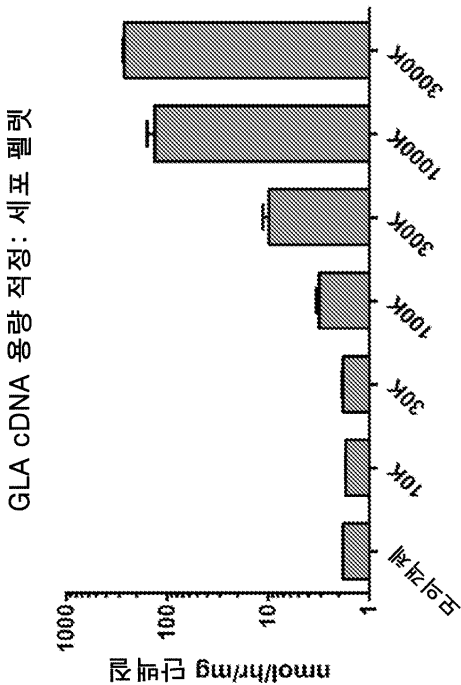
도면2



도면3a

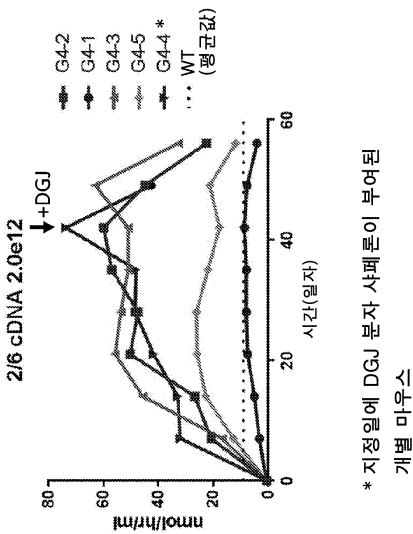


도면3b

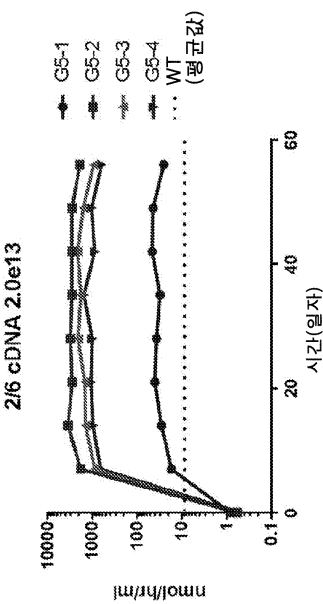




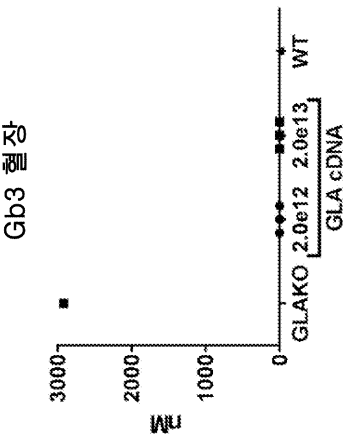
도면4a



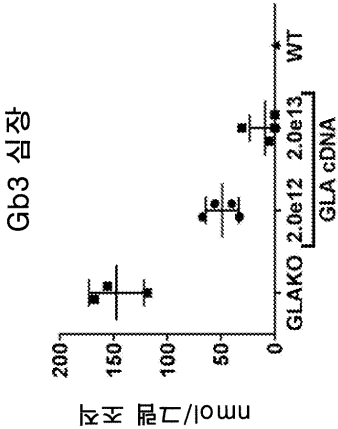
도면4b



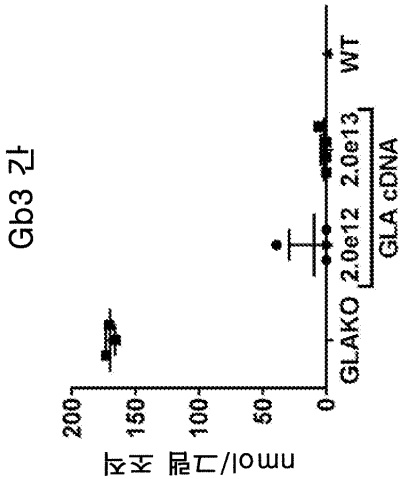
도면5a



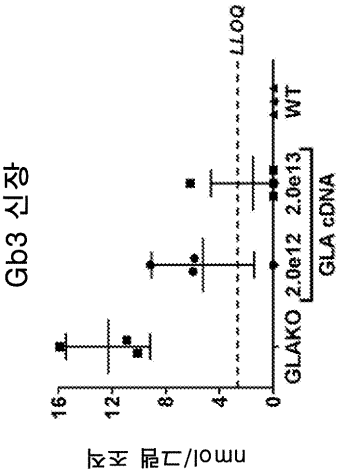
도면5b



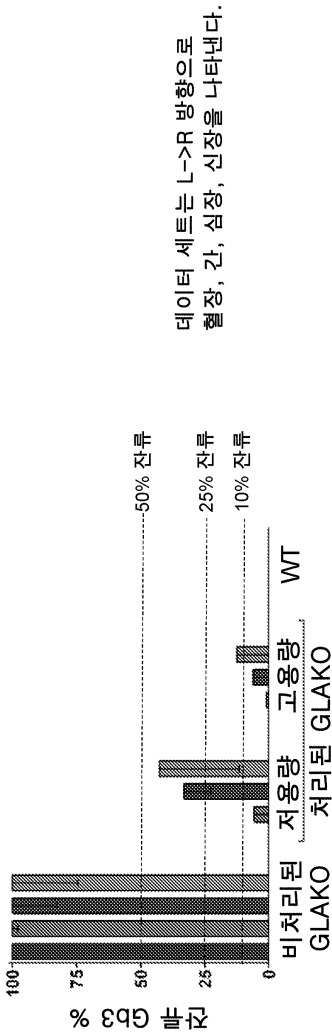
도면5c



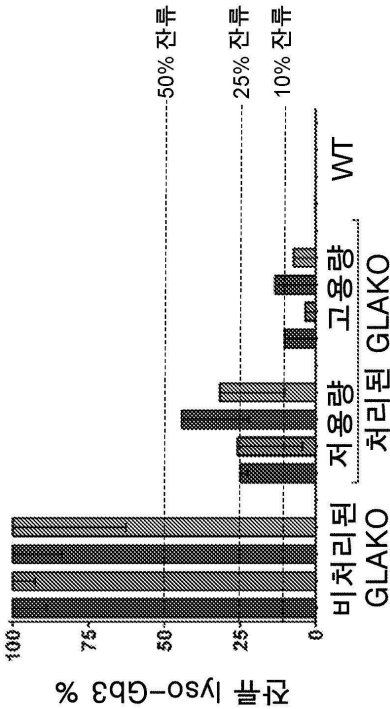
도면5d



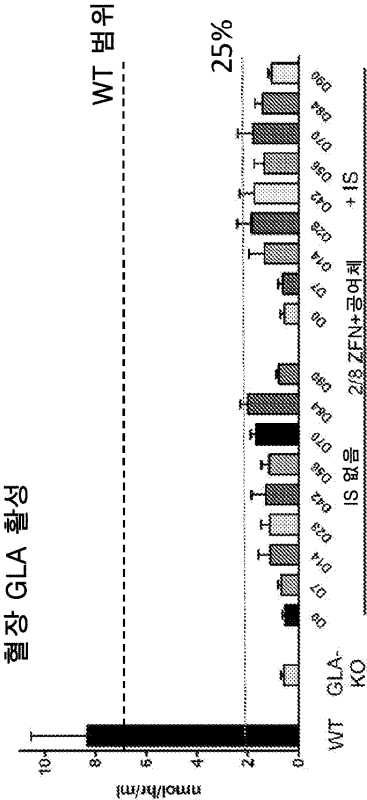
도면5e



도면5f

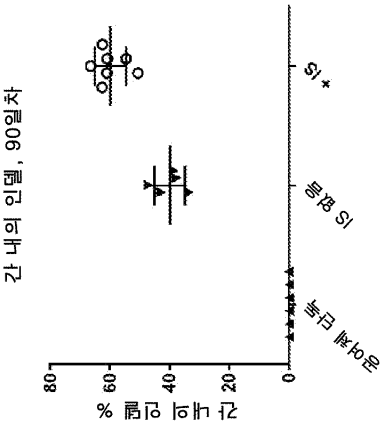


도면6a

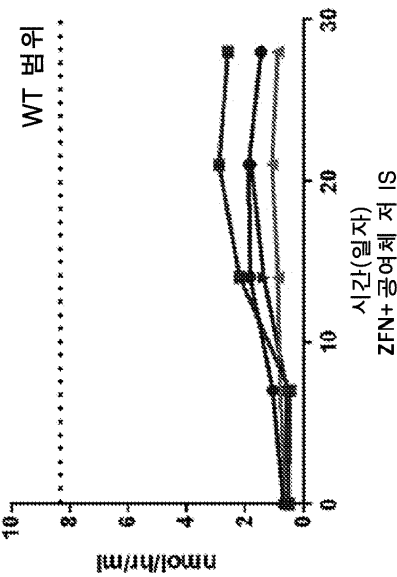




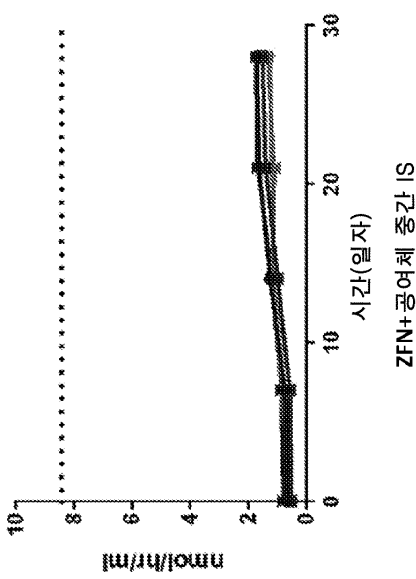
도면6b



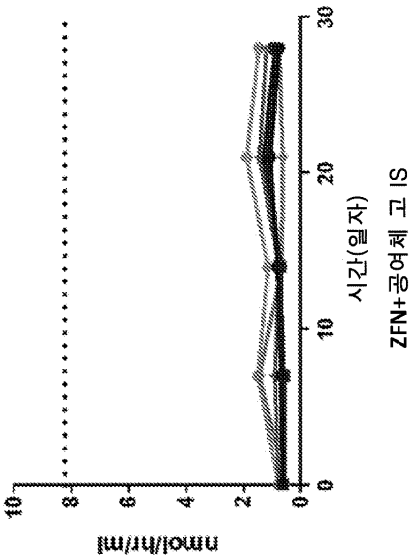
도면6c



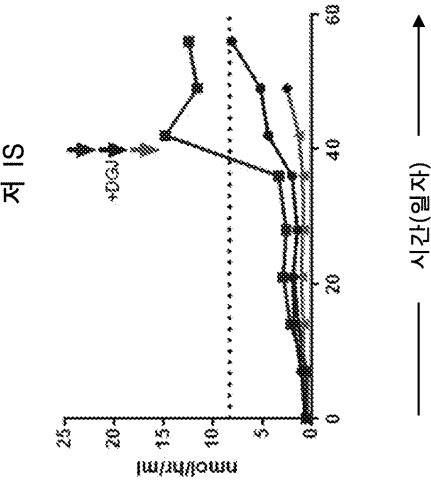
도면6d



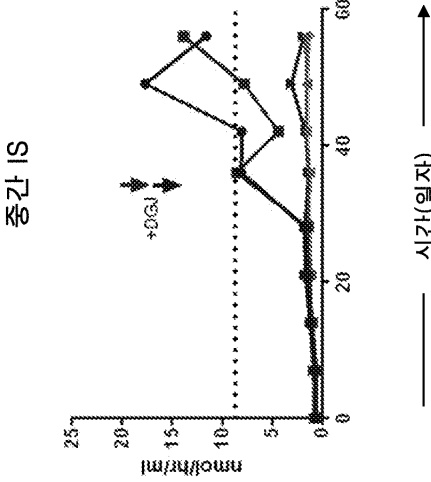
도면6e



도면7a



도면7b





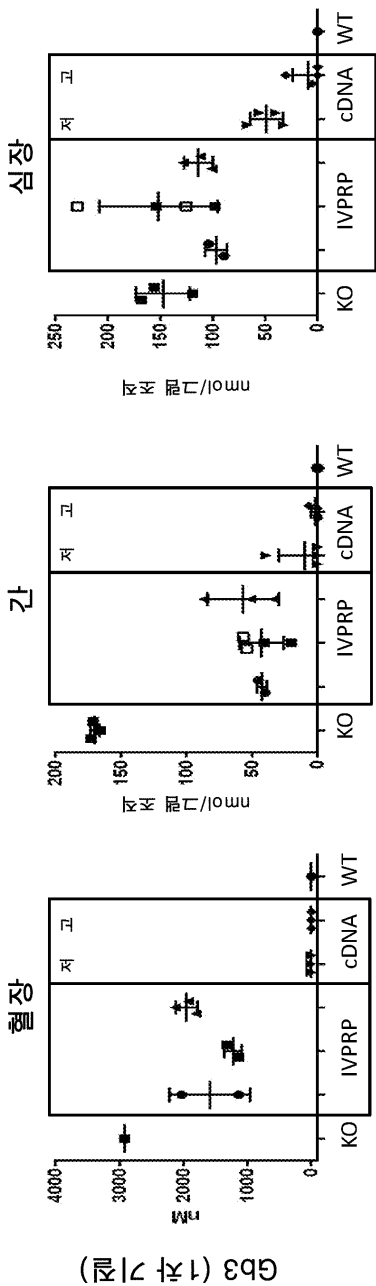
도면9a

혈장 α-Gal 활성

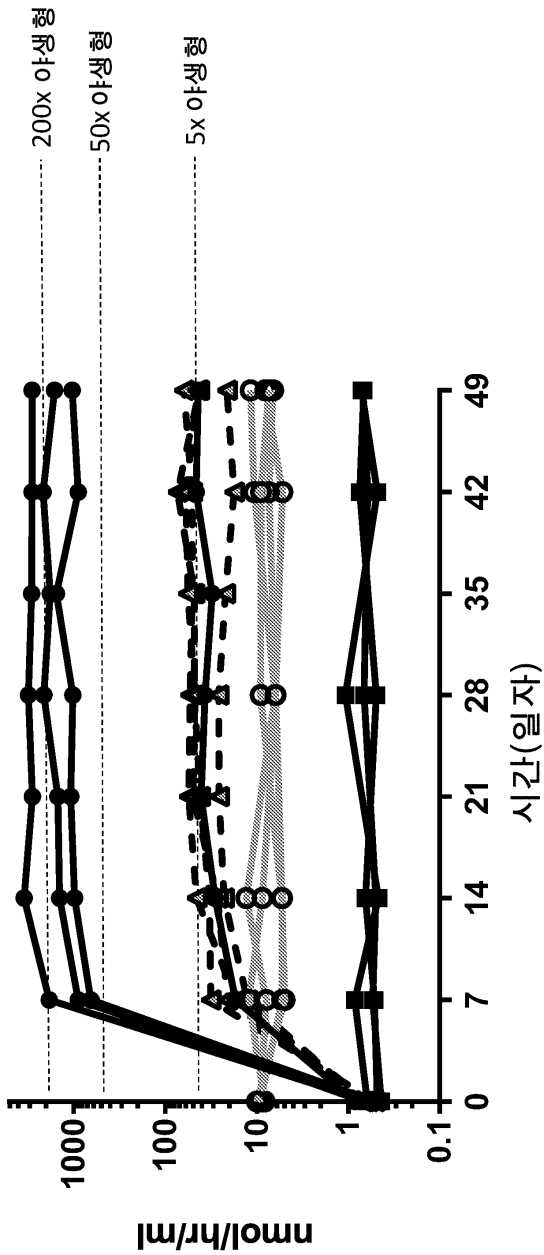
그룹	GLAKO	ZFN+공여체+DGJ	cDNA 저	cDNA 고	WT
혈장 α-GalA 활성 (그룹 평균) nmol/hr/mg 단백질	0.6	8.8	35.9	1387.5	8.5



도면9b



도면9c





도면10b

변이체 #I

ITR	HA-L	SA	FIX 신호 펄티드	GLAco v.2	bGHpA	HA-R	ITR
-----	------	----	---------------	-----------	-------	------	-----

변이체 #J

ITR	HA-L	SA	IDS 신호 펄티드	GLAco	bGHpA	HA-R	ITR
-----	------	----	---------------	-------	-------	------	-----

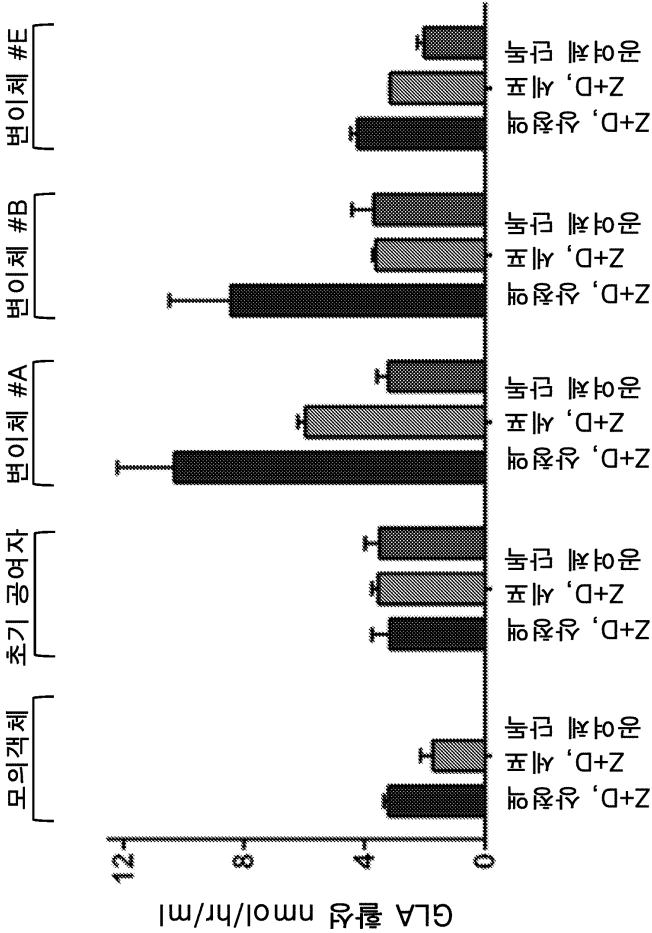
변이체 #K

ITR	HA-L	SA	FIX 신호 펄티드	GLAco	bGHpA	HA-R	ITR
-----	------	----	---------------	-------	-------	------	-----

변이체 #L

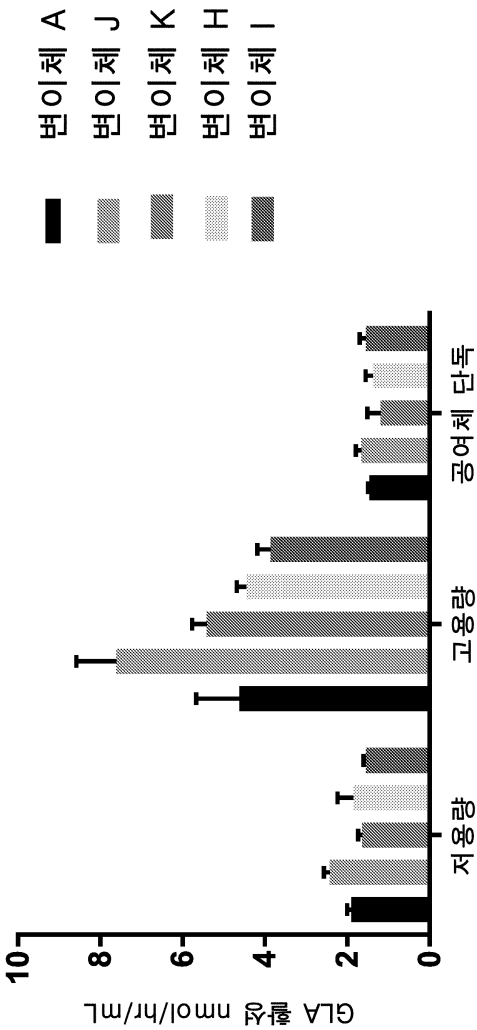
ITR	HA-L	SA	IDS 신호 펄티드	GLAco	bGHpA	HA-R	ITR
-----	------	----	---------------	-------	-------	------	-----

도면11a

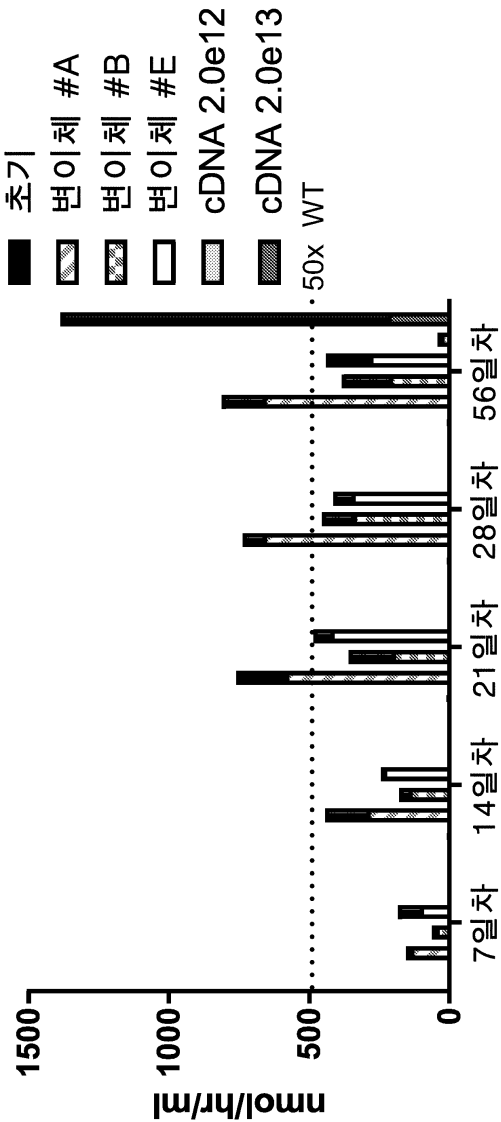




도면11b

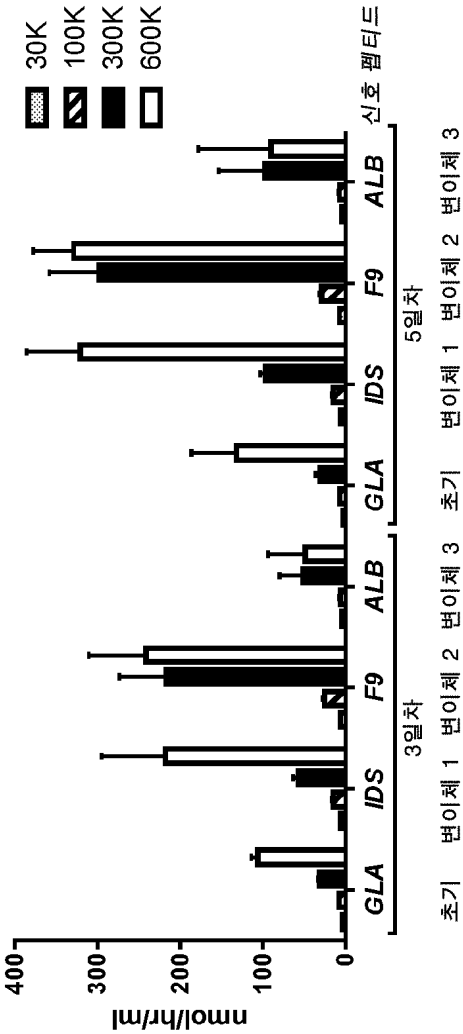


도면12

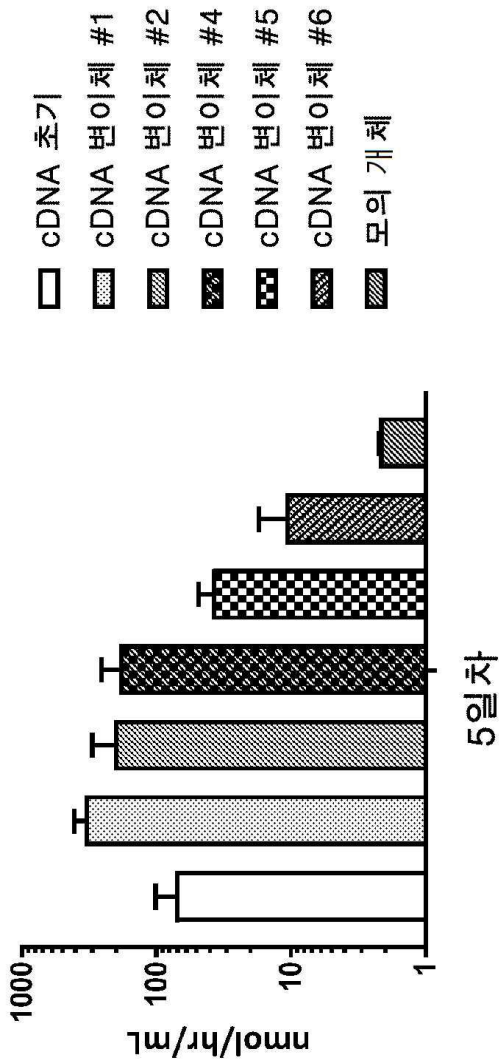




도면14a



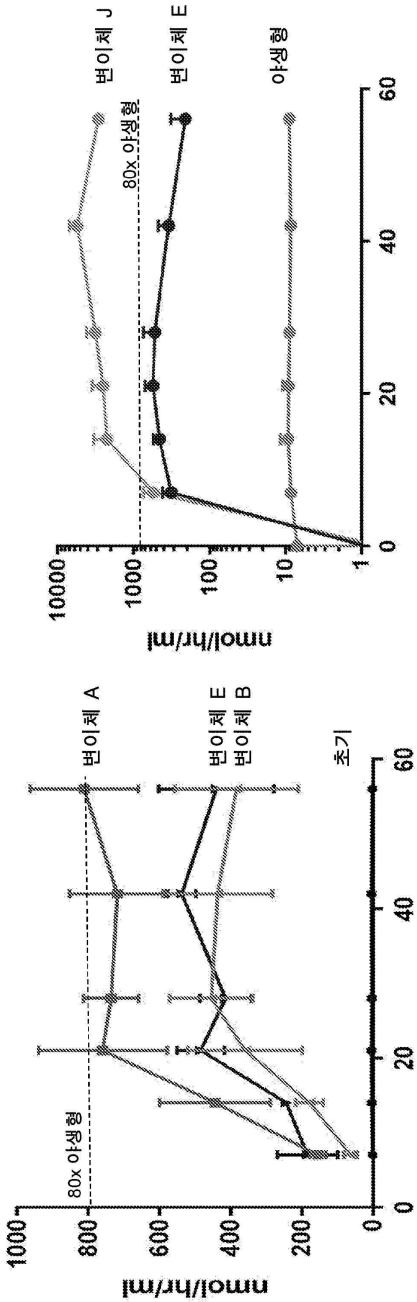
도면14b





도면15a

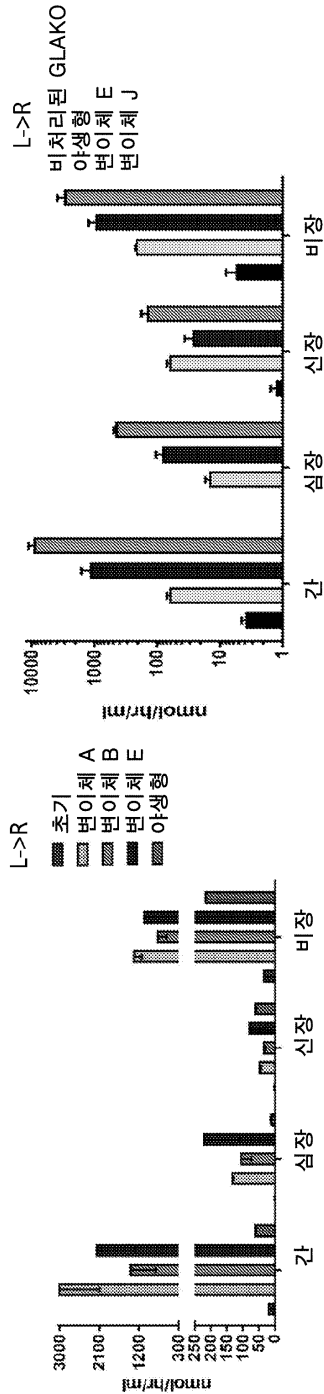
혈장내 α-Gal A 활성



AAV 형질 도입 후의 일차

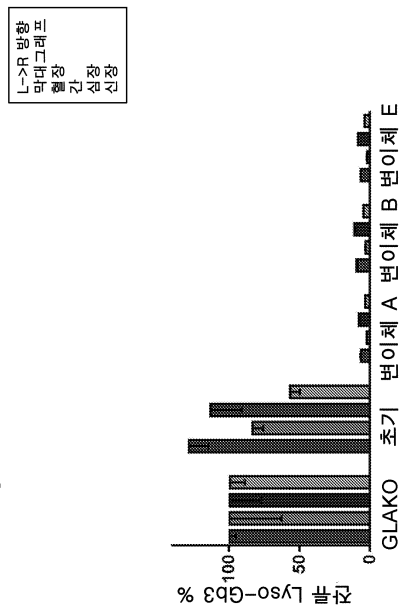
도면15b

조직내 α-Gal A 활성

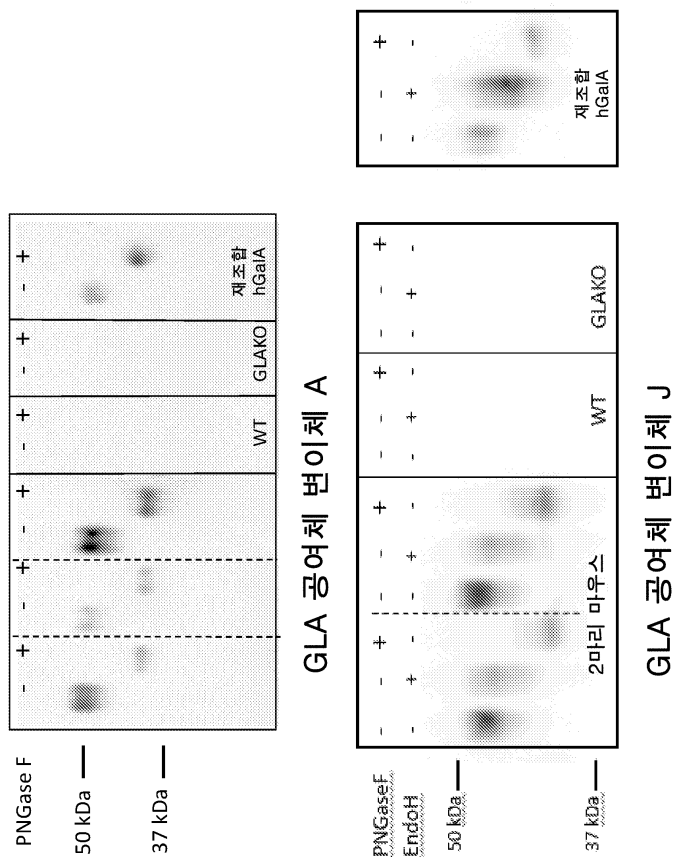




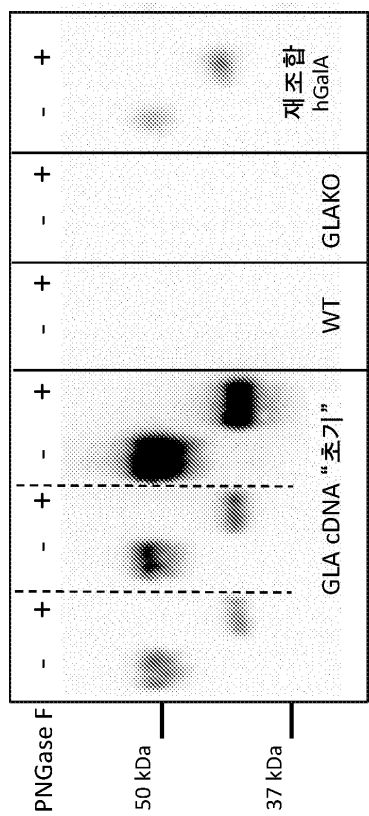
도면 16b



도면17a

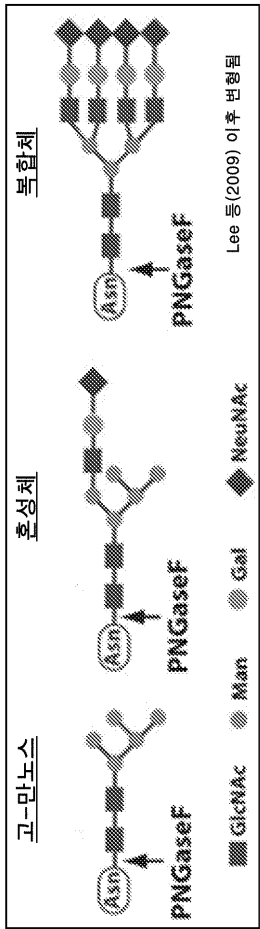


도면17b

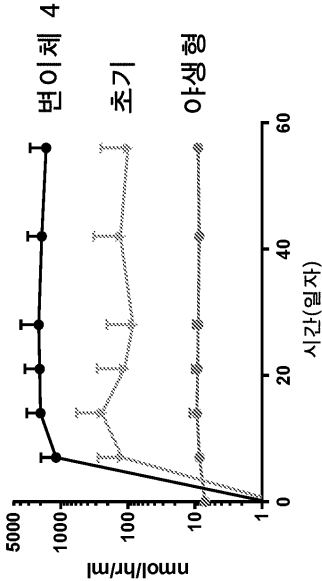




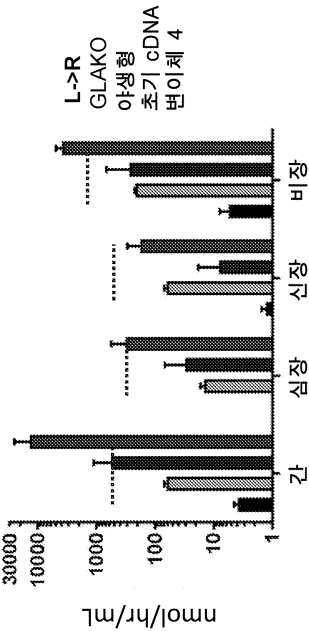
도면17c



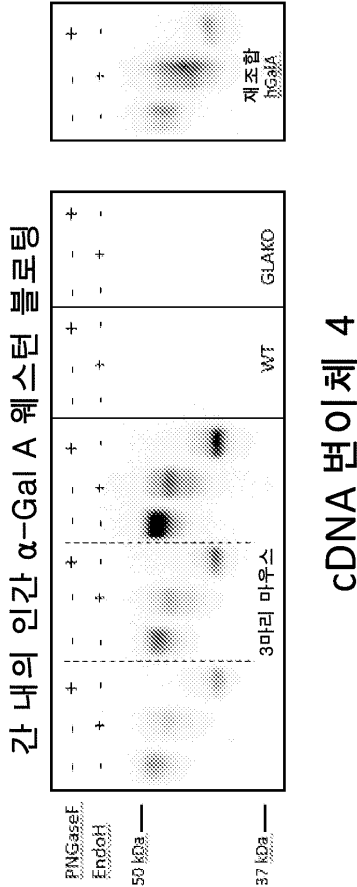
도면18a



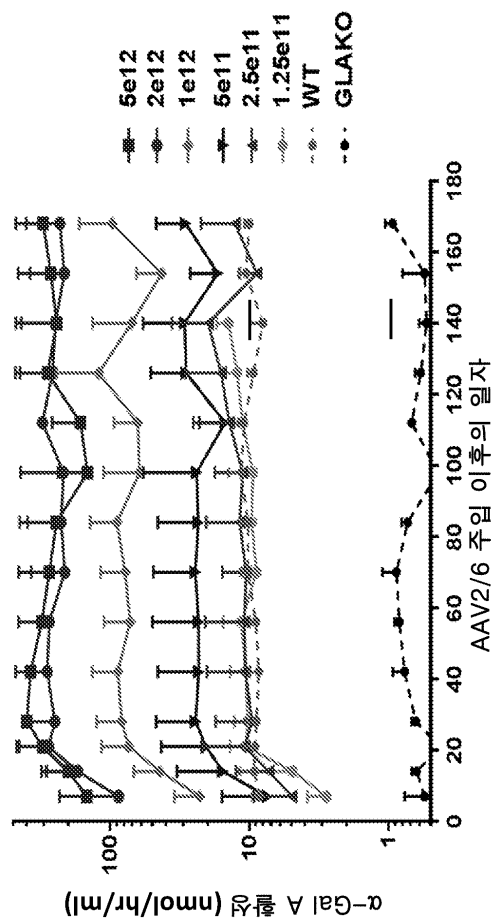
도면18b



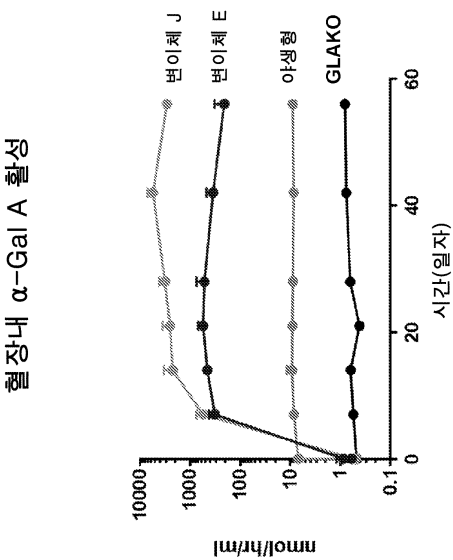
도면18c



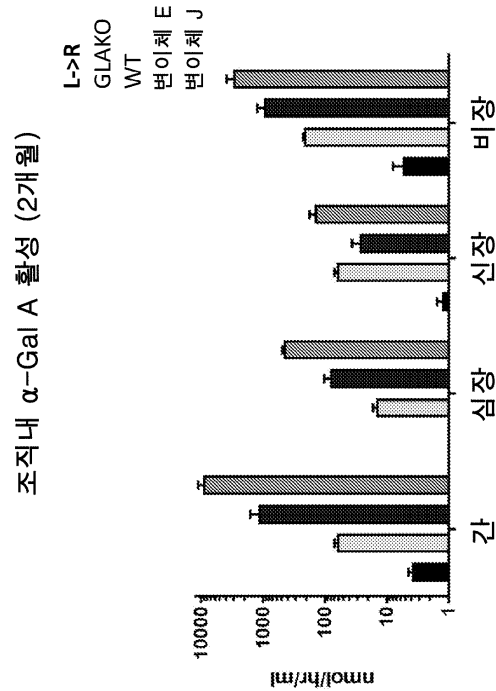
도면19



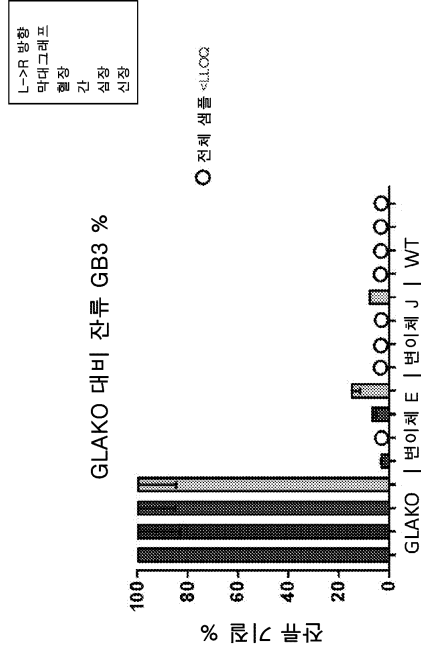
도면20a



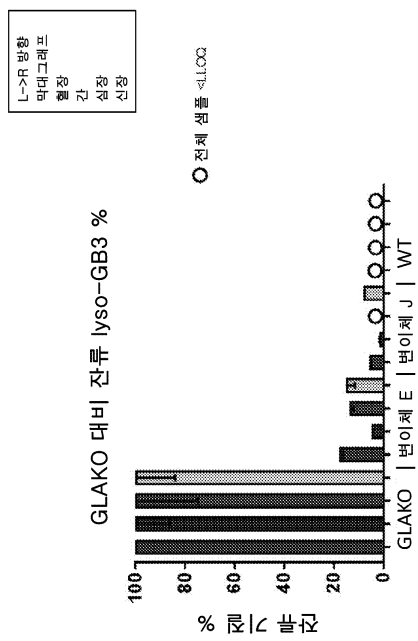
도면20b



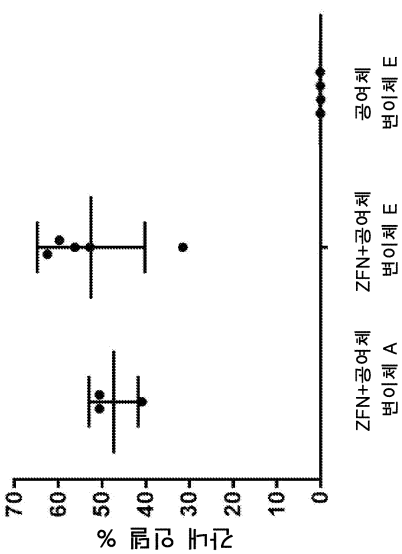
도면21a



도면21b

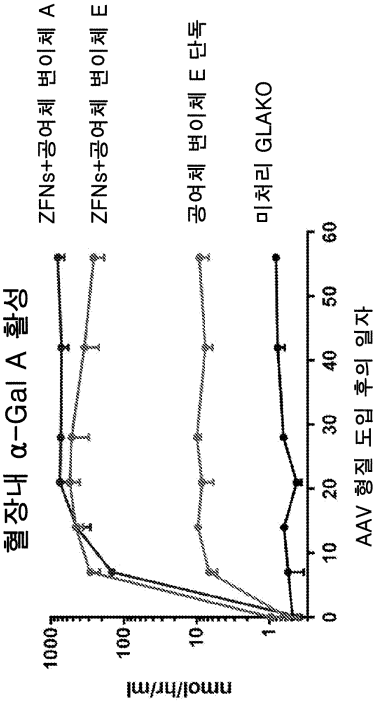


도면22

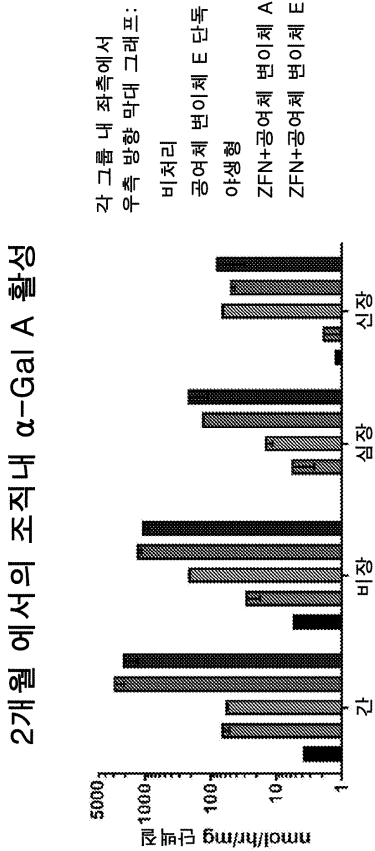




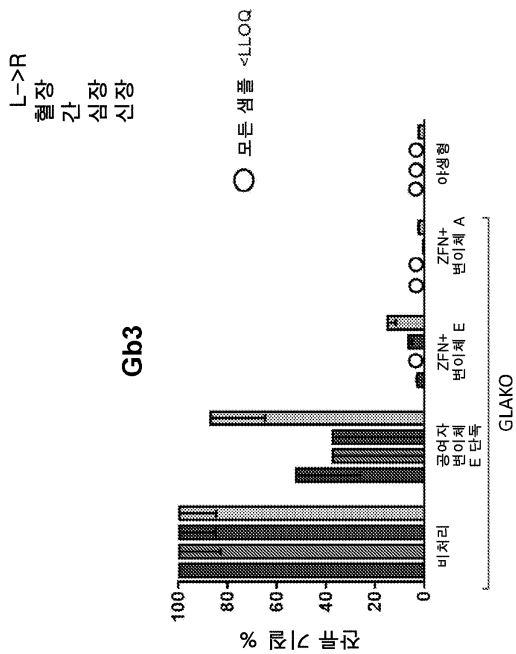
도면23a



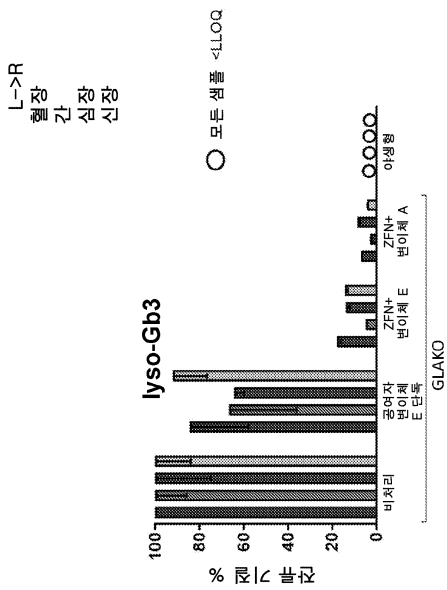
도면23b



도면24a



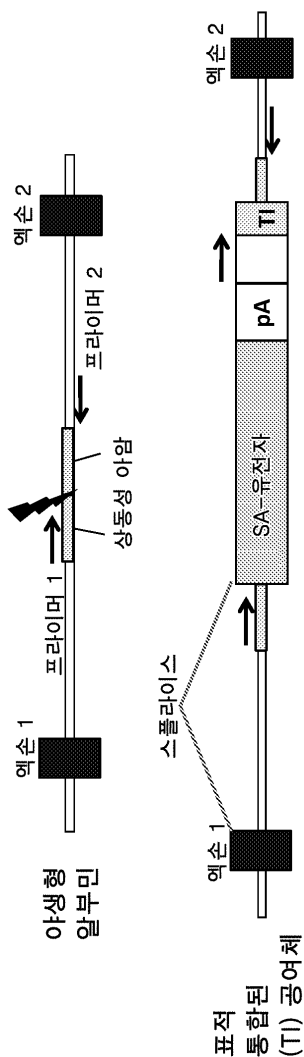
도면24b



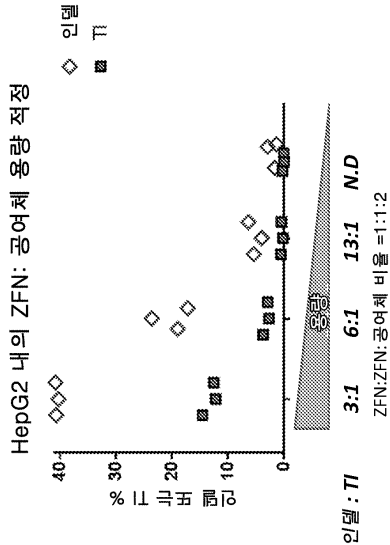
도면25a

변이체 #L							
ITR	HA-L	SA	GLA 신호 펩티드	GLAco	bGHpA	T1	HA-R
ITR	HA-L	SA	IDS 신호 펩티드	GLAco	bGHpA	T1	HA-R
ITR	HA-L	SA	IDS 신호 펩티드	GLAco	bGHpA	T1	ITR

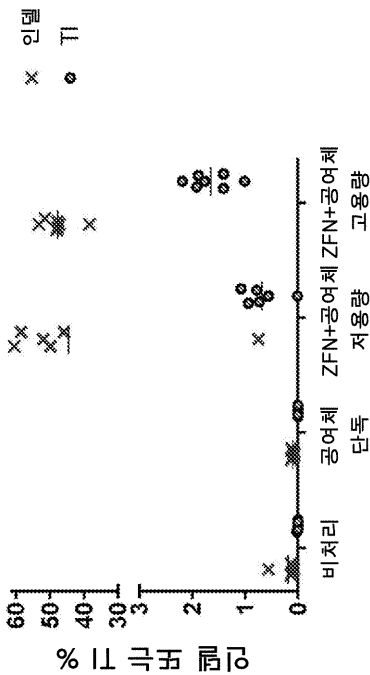
도면25b



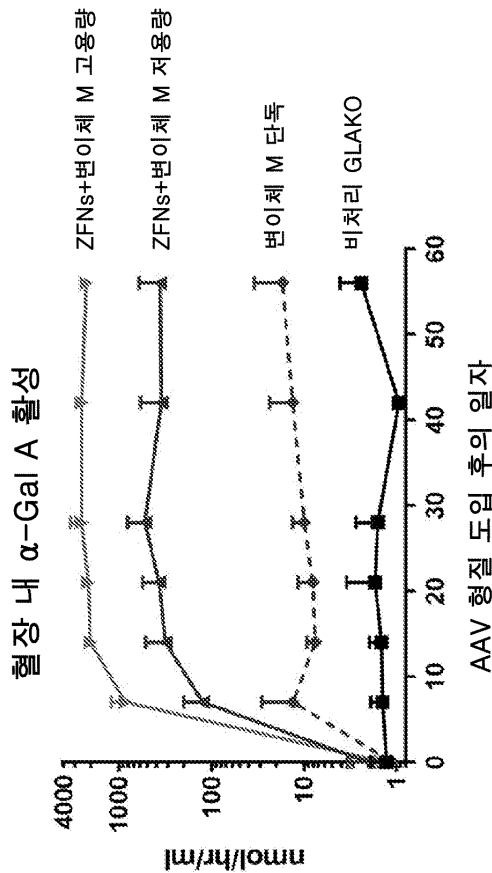
도면26a



도면26b

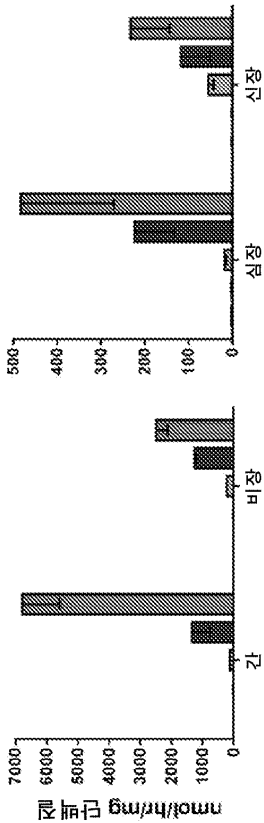


도면27a

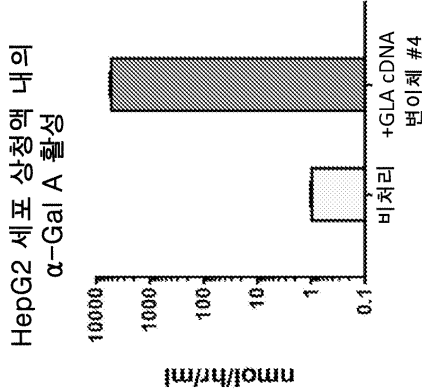


도면27b

각 그룹 내 좌측에서  
우측 방향 막대 그래프  
비처리  
변이체 M 단독  
아생형  
ZFN+공여자 M 저용량  
ZFN+공여자 M 고용량

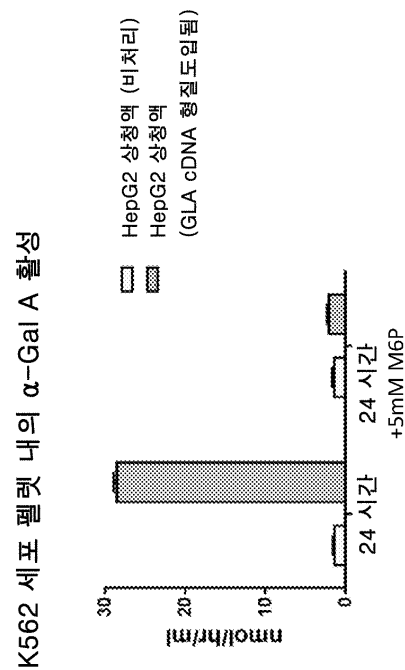


도면28a

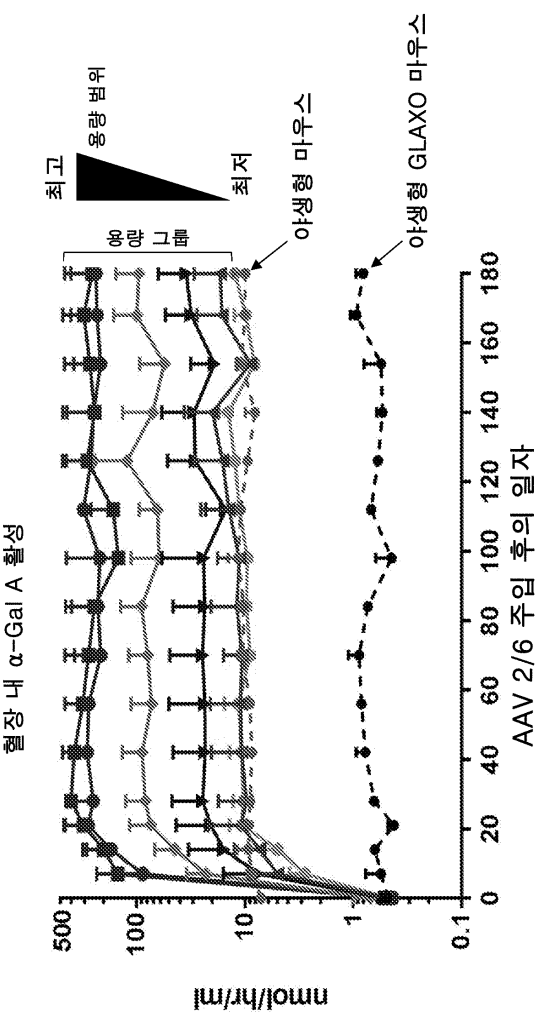




도면28b

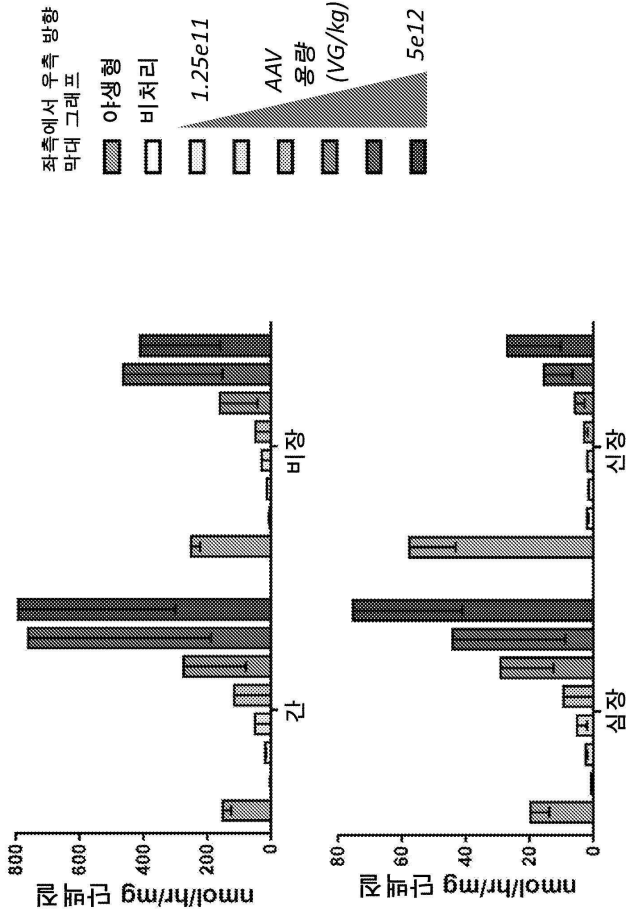


도면29

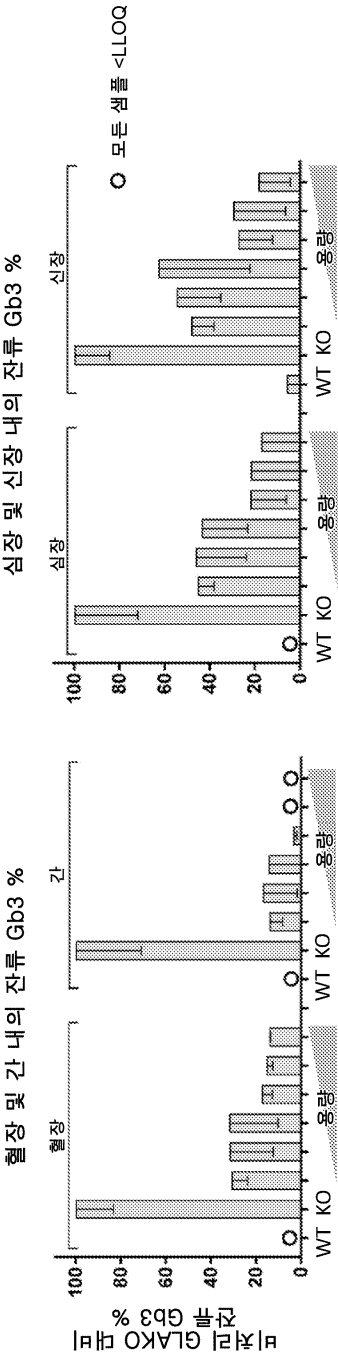


도면30

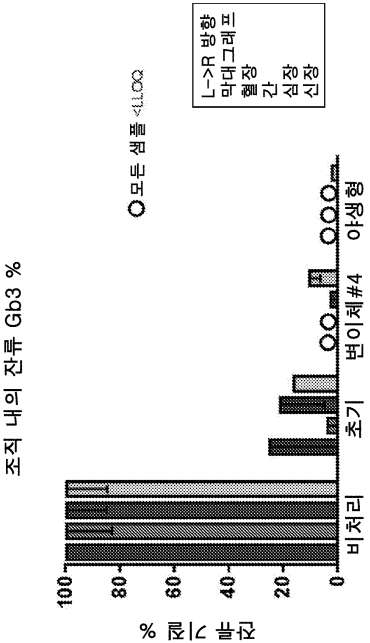
조직내 α-Gal A 활성  
(처리 후 6개월)



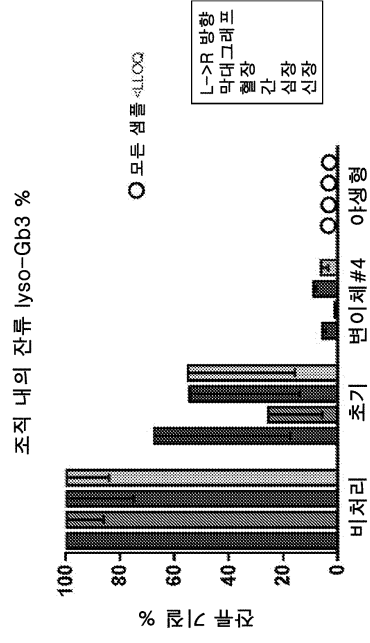
도면31



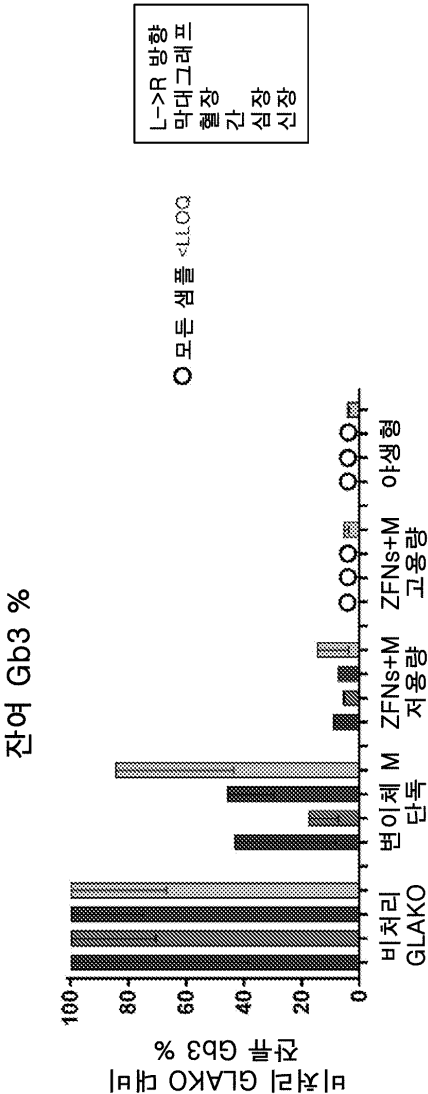
도면32a



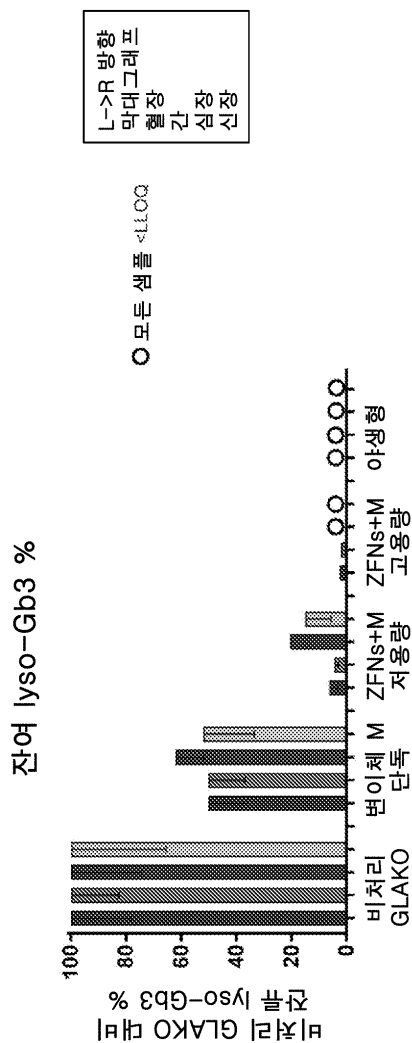
도면32b



도면33a



도면33b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO THERAPEUTICS, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF FABRY DISEASE

<130> 8325-0142.40

<140> PCT/US2017/057328

<141> 2017-10-19

<150> 62/552,792

<151> 2017-08-31

<150> 62/516,373

<151> 2017-06-07

<150> 62/502,058

<151> 2017-05-05



<150> 62/458,324

<151> 2017-02-13

<150> 62/444,093

<151> 2017-01-09

<150> 62/410,543

<151> 2016-10-20

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 1

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 2

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 2

gccaccatg

9

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 3

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly

20 25

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 4

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys

20 25

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 5

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 6	
gcactaagga aagtgcaaag	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 7	
taatactctt ttagtgtcta	20
<210> 8	
<211> 86	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 8	
gcactaagga aagtgcaaag taagattgac cagaccagat agaagaatgt aactgtagtt	60
ctaataaggac ttattatccc aaagac	86
<210> 9	
<211> 222	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 9	
gcactaagga aagtgcaaag taacttagag tgactgaaac ttcacagaat agggttgaag	60
attgaattca taactatccc aaagacctat ccattgcact atgctttatt taaaaaccac	120
aaaacctgtg ctgttgatct cataaataga acttgatatt atatttattt tcattttagt	180
ctgtcttctt ggttgctgtt gatagacact aaaagagtat ta	222
<210> 10	
<211> 222	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 10

gcactaagga aagtgcaaag taagattgac cagaccagat agaagaatgt aactgtagtt	60
ctaataaggac ttattatccc aaagacctat ccattgcact atgctttatt taaaaaccac	120
aaaacctgtg ctgttgatct cataaataga acttgatatt atatttattt tcattttagt	180
ctgtcttctt ggttgctgtt gatagacact aaaagagtat ta	222

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

ttgagtttga atgcacagat	20
-----------------------	----

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

gaaacaggga gagaaaaacc	20
-----------------------	----

<210> 13

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 13

aaatcttgag ttigaatgca cagatcaatt gtaactaaa gaaatagtaa tatagagttt	60
aaatatagat agctatgact gcaattgata gaaggtaacg gtgccacctt cagattt	117

<210> 14

<211> 247

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 14

ttgagtttga atgcacagat ataaacactt aacgggtttt aaaaataata atgttggtga 60

aaaaatataa ctttgagtgt agcagagagg aaccattgcc accttcagat tttcctgtaa 120

cgatcgggaa ctggcatctt caggagtag cttaggtcag tgaagagaag aacaaaaagc 180

agcatattac agttagttgt cttcatcaat ctttaaataat gttgtgtggt ttttctctcc 240

ctgtttc 247

<210> 15

<211> 247

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 15

ttgagtttga atgcacagat caattgtaaa ctaaagaaat agtaatatag agtttaaata 60

tagatagcta tgactgcact tgatagaagg taacggtgcc accttcagat tttcctgtaa 120

cgatcgggaa ctggcatctt caggagtag cttaggtcag tgaagagaag aacaaaaagc 180

agcatattac agttagttgt cttcatcaat ctttaaataat gttgtgtggt ttttctctcc 240

ctgtttc 247

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 16

ccactaagga aagtcaaag 20

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 17

tgaaagtaaa tataaataca agttc 25

<210> 18

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 18

ccactaagga aagtgcaaag gagcgctaac tggaacatac tcgctattta agaacattat 60

aagatactaa ttcagtattc gaagac 86

<210> 19

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 19

ccactaagga aagtgcaaag taacttagag tgacttaaac ttcacagaac agagttgaag 60

attgaattca taactgtccc taagacctat ccattgcact atgctttatt taaaagccac 120

aaaacctgtg ctgttgatct cataaataga acttgatatt atatttactt tca 173

<210> 20

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 20

ccactaagga aagtgcaaag gagcgctaac tggaacatac tcgctattta agaacattat 60

aagatactaa ttcagtattc gaagacctat ccattgcact atgctttatt taaaagccac 120

aaaacctgtg ctgttgatct cataaataga acttgatatt atatttactt tca 173

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

"LAGLIDADG" homing endonuclease sequence

<400> 21

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5