(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0007092
(43) 공개일자 2022년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7039551
(22) 출원일자(국제) 2020년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/032364
(87) 국제공개번호 WO 2020/227713
국제공개일자 2020년11월12일
(30) 우선권주장
62/924,910 2019년10월23일 미국(US)
62/845,637 2019년05월09일 미국(US)

(71) 출원인
더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
미국 펜실베니아 필라델피아 시빅 센터 블러바드 3401 (우: 19104)
(72) 발명자
알마드 아크샤타
미국 펜실베니아 19129 필라델피아 헤이우드 스트리트 3660
반더버 아델린 엘.
미국 펜실베니아 19010 브린 마워 웨이크필드 로드 204
(74) 대리인
특허법인와이에스장

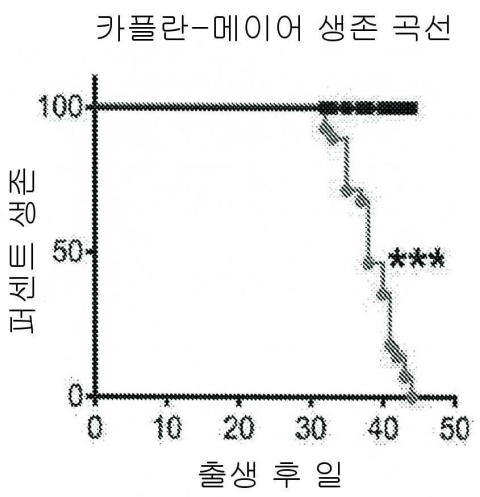
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **대뇌백질이영양증의 치료용 조성물 및 방법과 그것의 치료에 효과적인 작용제를 확인하기 위한 전체 동물 및 세포 모델**

(57) 요 약

대뇌백질이영양증, 특히, H-ABC의 치료용 조성물 및 방법이 개시된다.

대 표 도 - 도1c



(52) CPC특허분류
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 돌연변이 *Tubb4-a* 단백질을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된, 마우스 세포에서 발현을 구동시키기에 효과적인 프로모터를 포함하는 게놈을 가진 트랜스제닉 마우스로서, 인간 돌연변이된 *Tubb4*-단백질은 마우스의 뉴런 및/또는 희돌기교세포에서 발현되고 대뇌백질이영양증 표현형을 생산하는, 트랜스제닉 마우스.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 Tubb4-A 단백질은 표 1에서 나열된 핵산에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 트랜스제닉 마우스.

청구항 3

제1 항에 있어서, *Tubb4-A* 단백질은 $Tubb4a^{D249N}$ 변이체인 것을 특징으로 하는 트랜스제닉 마우스.

청구항 4

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 트랜스제닉 마우스에서 대뇌백질이영양증의 존재를 평가하기 위한 방법으로서, 운동 기능 장애, 비정상적인 걸음걸이, 운동 실조, 및 감소된 생존 중 하나 이상으로부터 선택된 대뇌백질이영양증 증상을 측정하는 단계를 포함하며, *TUBB4A* 전이유전자가 결핍된 대조군 마우스에 관하여 상기 증상의 존재는 마우스가 대뇌백질이영양증을 갖는다는 것을 나타내는, 방법.

청구항 5

대뇌백질이영양증의 치료를 위한 후보 화합물을 확인하는 방법으로서, 방법은

제1 항 또는 제2 항의 트랜스제닉 마우스 또는 제1 항 또는 제2 항의 트랜스제닉 마우스의 세포, 조직, 또는 뉴런의 기관을 테스트 화합물과 접촉시키는 단계;

테스트 화합물의 존재시 및 부재시 동물, 세포, 조직, 또는 기관에서 대뇌백질이영양증과 관련된 물리적 변수의 수준을 측정하는 단계; 및 후보 화합물로서 이들 변수 중 하나 이상을 변화시키는 테스트 화합물을 확인하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 6

제5 항에 있어서, 대뇌백질이영양증과 관련된 상기 물리적 변수는 희돌기교세포 수의 감소, 저미엘린 형성, 소뇌 과립 신경 손실, 선조 뉴런 손실, 미엘린 형성 장애, 미엘린화 지연, 비정상적인 걸음걸이, 운동 실조, 및 감소된 뉴런 생존 중 하나 이상으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC)의 치료를 위한 후보 치료 화합물을 확인하는 방법으로서, 방법은 H-ABC의 마우스 모델인, 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 트랜스제닉 마우스를 테스트 화합물에 노출시키는 단계; 테스트 화합물의 존재시 및 부재시 마우스에서 대뇌백질이영양증의 하나 이상의 변수를 측정하는 단계; 및 후보 치료 화합물로서 하나 이상의 변수를 개선하는 테스트 화합물을 확인하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

제7 항에 있어서, 하나 이상의 변수는 희돌기교세포 수의 감소, 저미엘린 형성, 소뇌 과립 신경 손실 선조 뉴런 손실, 미엘린 형성 장애, 미엘린화 지연, 비정상적인 걸음걸이, 운동 실조, 및 감소된 뉴런 생존으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC)의 치료를 위한 후보 치료 화합물을 확인하는 방법으로서, 방법은

a) i) TUBB-4A 돌연변이를 가지고 있는 대상체 및

ii) 임의의 TUBB4-A 돌연변이가 결핍된 대조군 대상체

로부터 PBMC를 얻는 단계;

b) 단계 a)의 단핵구를 재프로그래밍하여 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 생성하는 단계;

c) 선조 가시 뉴런 운명에 대한 iPSC의 분화를 지시하는 단계로서, 상기 세포는 DARPP32, CTIP2, GABA 및 FoxP1로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는, 단계; 및

d) 상기 세포를 상기 화합물과 접촉시키고 상기 화합물이 상기 돌연변이가 결핍된 대조군 세포에 비해 대뇌백질이영양증 표현형과 관련된 변수를 변화시키는지 여부를 평가하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 10

제9 항에 있어서, 세포는 이중 SMAD 억제 프로토콜을 적용함으로써 분화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9 항에 있어서, 분화된 세포는 DARPP32, CTIP2, GABA 및 FoxP1을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제9 항에 있어서, 상기 변수는 감소된 세포 생존, 변화된 가시 뉴런 마커 발현, 및 변화된 세포 표현형 또는 신호전달 중 하나 이상으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제9 항에 있어서, 상기 TUBB-4A 돌연변이는 표 1에서 나열된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제9 항에 있어서, 상기 TUBB-4A 돌연변이는 $Tubb4a^{D249N}$인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제9 항에 있어서, 상기 작용제는 TUBB-4A의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제9 항에 있어서, 상기 작용제는 야생형 TUBB-4A의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC) 대뇌백질이영양증의 치료 또는 예방을 위한 방법으로서 야생형 및 돌연변이된 TUBB4-A 둘 다의 발현을 하향조절하여, H-ABC의 증상을 개선하는 것을 포함하는 화합물의 유효량의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17 항에 있어서, 상기 화합물은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 안티센스 RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 DNA/RNA, 마이크로RNA, 및 *TUBB4A*를 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 충분히 상보적인 리보자임으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제18 항에 있어서, 상기 화합물은 siRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19 항에 있어서, 상기 화합물은 안티센스 RNA 또는 안티센스 핵산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제20 항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

약학적으로 허용 가능한 담체에서 *TUBB4A* 유전자 발현을 하향조절하는 안티센스 핵산을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 23

제22 항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열 번호: 1인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 24

제22 항에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 서열 번호: 2인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 25

제22 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 나노입자와 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 26

제22 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 리포솜에 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 27

약학적으로 허용 가능한 담체에서 관심있는 세포에서 TUBB4A의 발현을 증가시키기 위해 *TUBB4A* 야생형 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 28

제27 항에 있어서, 상기 TUBB4A 암호화 핵산은 코돈 최적화되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 29

제27 항 또는 제28 항에 있어서, 상기 핵산은 UniProt, 수탁 번호 P04350-TBB4A_human에서 제공되는 아미노산 서열, 또는 그것의 기능적 단편을 암호화하는 핵산을 암호화하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 30

제29 항에 있어서, 상기 핵산은 발현 벡터 또는 바이러스 벡터에 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 31

제29 항에 있어서, 상기 핵산 또는 벡터는 나노입자와 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 32

제29 항에 있어서, 상기 핵산 또는 벡터는 리포솜에 존재하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 33

TUBB4A 암호화 핵산의 게놈 편집을 위한 방법으로서, 방법은

(a) 대상체에게 벡터를 투여하는 단계로서, 대상체는 인간이고, 벡터는 CRISPR-매개된 염기 편집자 3 (BE3) 시스템의 핵산 구성요소 및 *TUBB4A* 유전자에서 돌연변이를 표적화하는 가이드 RNA (gRNA)를 포함하는, 단계; 및

(b) 치료 유전자를 염기 편집함으로써 치료 유전자에서 변형된 코돈을 도입하는 단계로서, 염기 편집은 벡터에 의해 수행되는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33 항에 있어서, 염기 편집은 질환 발생 전에 일어나며, 질환은 *TUBB4A* 유전자의 돌연변이로부터 발생한 표현형인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제33 항에 있어서, 변형된 코돈은 표 1에서 나열된 돌연변이에서 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

돌연변이된 *TUBB4A* 유전자를 가지고 있는대상체에서 기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC) 대뇌백질이영양증의 치료 또는 예방 방법으로서, 야생형 *TUBB4-A* 단백질의 발현을 증가시켜, H-ABC의 증상을 개선하는 제29 항의 조성물의 유효량의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 37

제35 항에 있어서, 상기 조성물은 야생형 *Tubb4-a* 단백질 또는 그것의 기능적 단편을 암호화하는 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

Tubb4a를 발현하는 핵산의 발현을 하향조절하는 siRNA.

청구항 39

*Tubb4a*의 발현을 하향조절하는 안티센스 핵산.

청구항 40

제1 항 내지 제39 항 중 어느 한 항의 방법을 실시하기 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2019년 5월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/845,637, 및 2019년 10월 23일에 출원된 미국 가출원 번호 62/924,910에 대한 우선권을 주장하며, 상기 언급된 출원들 각각의 전체 개시내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **전자적 형태로 제출된 자료의 참조에 의한 포함**

[0004] SequenceListing.txt로 명명된 텍스트 파일로서 EFS-Web을 통해 제출되고 2020년 5월 7일에 생성되고 1,167 바이트의 크기를 갖는 서열 목록이 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] **본 발명의 분야**

[0006] 본 발명은 대뇌백질이영양증(Leukodystrophy) 및 이 장애의 증상을 개선하기 위한 개선된 치료제의 분야에 관한 것이다. 본 발명은 또한 대뇌백질이영양증, 특히 H-ABC의 치료 또는 예방에 유용한 작용제를 확인하기 위한 전체 동물 모델을 제공한다.

배 경 기 술

[0007] 본 발명이 속한 분야의 상태를 기재하기 위해 명세서 전반에 걸쳐 여러 간행물 및 특허 문서가 인용된다. 이들 인용문들 각각은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0008] 기저핵과 소뇌 위축증을 동반한 저미엘린 형성 (Hypomyelination with Atrophy of Basal Ganglia and Cerebellum: H-ABC)은 *TUBB4A* 유전자에서 산발적인, 전형적으로는 데 노보(*de novo*) 이형접합성 돌연변이에 의해 유발되는 대뇌백질이영양증이다 (Simons *et al.*, 2013a). 이 유전자는 베타 튜불린 4a 단백질을 암호화하며, 이것은 알파 튜불린과 헤테로다이머화하여 미세관으로 조립된다. *TUBB4A*에서의 단일대립유전자성 돌연변이는 초기 발생 백질뇌병증(leukoencephalopathy)에서 성인-발생 4형 이긴장증 (Dystonia type 4: DYT4; 속삭임형 음성장애(whispering dysphonia))의 범위의 광범위한 신경학적 장애를 초래한다. H-ABC에 걸린 개체는 이 범위 내에 있으며, 전형적으로 유아기에 이긴장증 (Hersheson *et al.*, 2013), 진행성 걸음걸이 장애, 언어 및 인지 결함과 함께 나타난다. 그것들은 특징적인 신경이미지화 특성에 의해 *TUBB4A*에서의 돌연변이를 가진 다른 개체로부터 추가로 기재된다: 소뇌 위축증(cerebellar atrophy)과 함께 저미엘린 형성 및 미상(caudate) 및 내과피(putamen)의 위축증 (van der Knaap *et al.*, 2007).

[0009] 병리학적 표본에서, 등측(dorsal) 선조체 영역 및 소뇌의 과립층은 축삭돌기 팽윤 및 미엘린의 확산의 결핍과 함께 신경 손실을 나타낸다 (Simons *et al.*, 2013a; Curiel *et al.*, 2017b). H-ABC의 특징적인 특성을 가진 개체는 발표된 사례의 약 65%에 해당하고 (Blumkin *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014; Miyatake *et al.*, 2014; Pizzino *et al.*, 2014; Purnell *et al.*, 2014) 단일 공통 돌연변이, p. Asp249Asn에 의해 불균형적으로 영향을 받을 가능성이 크다 (166명의 개체의 코호트(cohort)에서 전체 돌연변이의 24.1%, 아래에서 $TUBB4A^{D249N}$이라고 불림). H-ABC는 현재 심각하게 영향을 받는 초기 영아 변이와 청소년-성인 경증 변이 사이의 중간 표현형으로 간주된다 (Nahhas N, 2016).

[0010] *TUBB4A*는 중추신경계 (CNS), 특히 소뇌 및 뇌의 백질 신경로에서 고도로 발현되며, 선조체에서 더 중간으로 발현된다 (Hersheson *et al.*, 2013). 세포 수준에서, *TUBB4A*는 주로 희돌기교세포 (OL) 계통의 뉴런 및 세포에 국한되며, 성숙한 미엘린 형성 OL에서 가장 높게 발현된다 (Zhang *et al.*, 2014). 발현 패턴 및 관련된 질환 표현형이 뉴런 및 희돌기교세포 집단 둘 다에서 베타 튜불린 4a 단백질의 기능적 역할을 나타내지만, *TUBB4A* 돌연변이의 병리학적 메커니즘에 대해서는 알려진 것이 거의 없다. 발명자 그룹에서는 OL 세포주, 뿐만 아니라 마우스 소뇌 뉴런에서의 과발현 연구를 사용하여 더 넓은 범위의 *TUBB4A* 돌연변이의 효과를 보고하였다. OL 세포주에서 $Tubb4a^{D249N}$ 돌연변이의 과발현은 $Tubb4a^{WT}$ 발현과 비교하여 더 적은 과정으로 미성숙 OL의 미엘린 유전자 발현 및 형성을 감소시켰다 (Curiel *et al.*, 2017b). 유사하게, 더 짧은 축삭돌기, 더 적은 수상돌기 및 감소된 수상돌기 분기를 가진 비정상적인 뉴런의 표현형이 $Tubb4a^{WT}$ 발현과 비교하여 H-ABC 원인 $Tubb4a^{D249N}$ 돌연변이로 검사되었다 (Curiel *et al.*, 2017b). 다른 *TUBB4A* 돌연변이는 특이적으로 뉴런 및/또는 OL 세포주에서만 표현형의 이상을 강조하였으며, 돌연변이 특이적 효과를 시사하며, 가변적인 임상적 표현형에 상응한다. 동형접합성 p. Ala302Thr *Tubb4a* 돌연변이를 가진 자발적으로 발생한 래트 모델, *taiep* 래트는 뇌, 시신경 및 척수의 특정 관에서 저미엘린화 표현형으로 보고되었다. 이 특이적 돌연변이는 인간에서는 이전에 보인 적이 없었다. *taiep*에서 관찰된 흥미로운 특징은 추후의 탈미엘린화와 함께, 특히 OL에서의 미세관의 축적이었다 (Duncan *et al.*, 2017b). 현재 H-ABC와 특이적으로 관련이 있는 p. Asp249Asn 돌연변이에 대한 동물 모델이 없다.

[0011] 분명하게도, 이러한 모델 및 약화 장애를 치료하기 위한 새로운 치료적 접근법이 필요하다.

발명의 내용

[0012] 본 발명에 따르면, H-ABC의 트랜스제닉(transgenic) 마우스 모델이 제공된다. 한 양태에서, 마우스는 인간 돌연변이 *Tubb4-a* 단백질을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된, 마우스 세포에서 발현을 구동시키기에 효과적인 프로모터를 포함하는 게놈을 가지며, 인간 돌연변이된 *Tubb4*-단백질은 마우스의 뉴런 및/또는 희돌기교세포에서 발현되고 대뇌백질이영양증 표현형을 생산한다. 표 1에서는 돌연변이 *Tubb4*를 암호화하는 핵산의 목록이 제공되며, 이것들은 본원에서 기재된 동물 모델, 세포 모델, 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 돌연변이된 Tubb4-a 단백질은 $Tubb4a^{D249N}$ 변이체이다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 기재된 트랜스제닉 마우스에서 대뇌백질이영양증의 존재를 평가하기 위한 방법을 제공하며, 트랜스제닉 마우스에서 운동 기능 장애, 비정상적인 걸음걸이, 운동 실조(ataxia), 및 감소된 생존 중 하나 이상으로부터 선택된 대뇌백질이영양증 증상을 측정하는 단계를 포함하며, 상기 증상의 존재는 변이체 *TUBB4A* 전이유전자가 없는 대조군 마우스에 비해 마우스가 대뇌백질이영양증을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0014] 또 다른 구체예에서, 대뇌백질이영양증의 치료를 위한 후보 화합물을 확인하는 방법이 제공된다. 예시의 방법은 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 마우스의 세포, 조직, 또는 뉴런의 기관을 테스트 화합물과 접촉시키는 단계; 및 테스트 화합물의 존재 및 부재시 동물, 세포, 조직, 또는 기관에서 대뇌백질이영양증과 관련된 물리적 변수의 수준을 측정하는 단계; 및 후보 화합물로서 이들 변수 중 하나 이상을 변화시키는 테스트 화합물을 확인하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 대뇌백질이영양증과 관련된 물리적 변수는 희돌기교세포 수의 감소, 저미엘린 형성, 소뇌 과립 신경 손실, 선조 뉴런 손실, 미엘린 형성 장애(dysmyelination), 미엘린 형성 지연, 비정상적인 획득, 운동 실조, 및 감소된 뉴런 생존 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0015] 또 다른 양태에서, 기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC)의 치료를 위한 후보 치료 화합물을 확인하는 방법이 개시된다. 예시의 방법은 H-ABC의 트랜스제닉 마우스 모델을 테스트 화합물에 노출시키는 단계; 테스트 화합물의 존재 및 부재시 마우스에서 대뇌백질이영양증의 하나 이상의 변수를 측정하는 단계; 및 후보 치료 화합물로서 하나 이상의 변수를 개선하는 테스트 화합물을 확인하는 단계를 포함한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC)의 치료를 위한 후보 치료 화합물을 확인하는 방법을 제공하며, TUBB-4A 돌연변이를 가지고 있는 대상체 및 임의의 TUBB4-A 돌연변이가 결핍된 대조군 대상체로부터 PBMC를 얻는 단계; 단계 a)의 단핵구를 재프로그래밍하여(reprogra mming) 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 생성하는 단계; 선조 가시 뉴런(spiny neuron) 운명에 대한 iPSC의 직접적인 분화에 이중 SMAD 억제 프로토콜을 적용하는 단계로서, 세포는 DARPP32, CTIP2, GABA 및 FoxP1로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는, 단계; 및 상기 세포를 상기 화합물과 접촉시키고 상기 화합물이 상기 돌연변이가 결핍된 대조군 세포에 비해 대뇌백질이영양증 표현형과 관련된 변수를 변화시키는지 여부를 평가하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 변수는 감소된 세포 생존, 변화된 가시 뉴런 마커 발현, 및 변화된 세포 형태학 또는 신호전달 중 하나 이상으로부터 선택된다. 세포는 표 1에서 나열된 TUBB-4A 돌연변이 중 하나를 가지고 있는 환자로부터 얻어질 수 있다.

[0017] H-ABC를 치료하기 위한 또 다른 접근법은 TUBB4-A의 전체적인 발현을 하향 조절하여, H-ABC의 증상을 개선하는 화합물의 유효량의투여를 수반한다. 특정 양태에서, 화합물은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 안티센스(antisense) RNA, 안티센스 DNA, 키메라 안티센스 DNA/RNA, 마이크로RNA(microRNA), 및 돌연변이된 *TUBB4A*를 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 충분히 상보적인 리보자임으로부터 선택된다.

[0018] 치료를 위한 또 다른 접근법에서, *TUBB4A* 암호화 핵산의 게놈 편집 방법이 개시된다. 예시의 방법은 대상체에게 벡터를 투여하는 단계를 포함하며, 대상체는 인간이고, 벡터는 CRISPR-매개된 염기 편집자 3 (BE3) 시스템 및 *TUBB4A* 유전자의 돌연변이를 표적화하는 가이드 RNA (gRNA)의 핵산 구성요소를 포함한다. 변형된 코돈은 치료 유전자를 염기 편집함으로써 치료 유전자에 도입되며, 염기 편집은 벡터에 의해 수행된다.

[0019] 돌연변이된 *TUBB4A* 유전자를 가지고 있는 대상체에서 기저핵의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC) 대뇌백질이영양증의 치료 또는 예방을 위한 또 다른 방법은 야생형 *TUBB4-A* 단백질의 발현을 증가시켜, H-ABC의 증상을 개선하는 화합물의 유효량의 투여를 포함한다. 특정 구체예에서, 증가된 발현은 야생형 TUBB4-A 암호화 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터, 또는 나노입자의 도입을 통한 야생형 *TUBB4-A*의 과발현에 의해 달성된다.

[0020] 마지막으로, 본 발명은 상기 언급된 청구범위 중 어느 것의 방법을 실시하기 위한 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1A-1M: *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 감소된 생존, 걸음걸이 비정상 및 진행성 운동 기능 장애를 나타낸다 (도 1A)** 마우스 *Tubb4a* 유전자를 나타내는 개략도 및 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 시퀀싱 (sequencing) 차트. 빨간색 화살표는 엑손 4에서의 위치 745 뉴클레오타이드를 입증하고; WT는 G의 하나의 피크를 나타내고, *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 'G' 및 'A' 각각의 하나의 피크를 나타내고 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 T에 대해 2개의 피크를 나타낸다. **(도 1B)** WT와 비교하여 중증 이긴장증 및 운동 실조를 가진 말기 (ES) *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (~P35-P40)의 대표 이미지. **(도 1C)** WT 한 배 새끼와 비교되는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 및 *Tubb4a*^{D249N} 마우스의 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선 (게한-브레슬로-윌콕슨 테스트(Gehan-Breslow-Wilcoxon test), n=28). **(도 1D)** 행동 기능 테스트의 시간 과정을 나타내는 개략도. **(도 1E)** 기어가기 (crawling) 및 걷기의 예시: 보행 측정을 위해, 기어가기 및 걷기에 점수가 매겨진다 (표 3 참조); 기어가기 전반에 걸쳐, 뒷발 전체가 (#)로 지정된 땅에 닿고 꼬리는 낮거나 땅에 닿는다 (빨간색 화살표로 나타남). 기어가

기에서 걷기로 전환될 때, 머리가 올라가기 시작한다. 걷기는 뒷발가락이 땅에 닿고 뒤꿈치가 올라갈 때에만 보이며, [##]로 지정된다. **(도 1F)** P7, P10 및 P14에 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 보행 결함. 이원 ANOVA에 의한 통계 분석에 이어지는, 투키 사후 분석(Tukey post-hoc analysis), n=10. **(도 1G)** P7, P21 및 P35에 WT 한 배 새끼와 비교되는 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 보행 각도의 대표 이미지. **(도 1H)** P7, P14, P21, P28 및 P35에 WT 한 배 새끼와 비교하여 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 보행 각도의 측정. 이원 ANOVA에 의한 통계 테스트에 이어지는, 사후 투키 테스트, n=14. **(도 1I)** 매달리기 그립(grip) 강도 설정의 그림 표현. **(도 1J)** WT와 비교하여 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 반전 낙하 각도에 의해 측정된 그립 강도. 일원 ANOVA에 의한 통계 테스트에 이어지는, 투키 사후 분석, n=10. **(도 1K)** P21, P28 및 P35에 WT에 비해 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 낙하 대기 시간(latency to fall) (초 단위)을 입증하는 로타로드(Rota-rod) 테스트, n=14. **(도 1L)** P7로부터 *Tubb4a*^{D249N}, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 및 WT의 체중 측정을 위한 그래프, n=10. **(도 1M)** *Tubb4a*^{D249N}, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 및 WT 마우스의 정향 반사(Righting reflex)의 변화, n=14. 반복 측정 이원 ANOVA에 의해 수행된 통계 테스트에 이어지는, 투키 사후 분석. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 2A-2D *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 1연령에 저미엘린 형성을 나타낸다 (도 2A) WT와 비교되는 *Tubb4a*^{D249N} 마우스의 카플란-메이어 생존 곡선 (게한-브레슬로-윌콕슨 테스트, n=10). **(도 2B)** WT와 비교하여 9개월령 및 1연령의 *Tubb4a*^{D249N} 마우스에서 로타로드 테스트 성능, n=7-8. **(도 2C)** 일원 ANOVA에 의해 수행되는 통계 테스트에 이어지는, 투키 사후 테스트. **(도 2D)** WT 및 *Tubb4a*^{D249N} 마우스의 ES에서의 PLP (녹색).

도 3A-3Z: *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 미엘린 형성의 심각한 발달 지연을 나타낸다 (도 3A) 면역조직화학적 분석의 시간 과정을 나타내는 개략도. **(도 3B)** 뇌량 (corpus callosum: CC) 및 소뇌 (Cb)에 대한 분석을 나타내는 개략도. **(도 3C-3D)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색 (미엘린 [파란색])의 대표적인 말기 이미지 (ES) **(도 3C)** 및 정량화 **(도 3D)**. 기준자=250㎛ ('$$$'는 P21과 ES 간의 유의한 차이를 나타낸다) **(도 3E-3F)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 Eri-C 염색의 대표적인 ES 이미지 **(도 3E)** 및 정량화 **(도 3F)**. 기준자=1 mm. ('$$$'는 P21과 ES 간의 유의한 차이를 나타낸다) **(도 3G-3J)** 1연령 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 볼 수 있는 CC에서의 Eri-C 염색 **(도 3G 및 도 3H)** 및 MBP 염색 **(도 3I 및 도 3J)**의 손실의 대표 이미지 및 정량화. **(도 3K-3L)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P14, P21 및 ES에서의 PLP (녹색)의 대표적인 말기 이미지 **(도 3K)** 및 정량화 **(도 3L)**. 기준자=250㎛ **(도 3M-3N)** 전뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P21 및 ES에서의 표준화된 PLP 단백질 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 이미지 **(도 3M)** 및 정량화 **(도 3N)** **(도 3O-3P)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P14, P21 및 ES에서의 PLP (녹색)의 대표적인 말기 이미지 **(도 3O)** 및 정량화 **(도 3P)**. 기준자=1 mm **(도 3Q-3R)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P21 및 ES에서의 표준화된 PLP 단백질 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 이미지 **(도 3Q)** 및 정량화 **(도 3R)**. **(도 3S-3T)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P14, P21 및 ES에서의 MBP (빨간색)의 대표적인 ES 이미지 **(도 3S)** 및 정량화 **(도 3T)**. 기준자=250㎛ **(도 3U-3V)** 전뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P21 및 ES에서의 표준화된 MBP 단백질 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 이미지 **(도 3U)** 및 정량화 **(도 3V)**. **(도 3W-3X)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P14, P21 및 ES에서의 MBP (빨간색)의 대표적인 ES 이미지 **(도 3W)** 및 정량화 **(도 3X)**. 기준자=1 mm **(도 3Y-3Z)** 전뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P21 및 ES에서의 표준화된 MBP 단백질 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 이미지 **(도 3Y)** 및 정량화 **(도 3Z)**. 이원 ANOVA에 이어서, 투키 사후 테스트에 의해 통계 테스트가 수행된다. P14 및 P21에 대해 n=4 마우스/군 (P14 시점에 대해 *Tubb4a*^{D249N}에 대해서 n=3인 것을 제외하고) 및 ES에 대해 n=3 마우스/군을 이용한 대표적인 데이터. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. *p<0.05 및 *** 및 $$$ p<0.001.

도 4A-4F: 척수의 전자 현미경법 분석은 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스가 저미엘린 형성 및 미엘린 형성 장애를 나타낸다는 것을 보여준다 (도 4A-F) 말기에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스의 복측(ventral) 척수의 대표적인 전자 현미경법 (EM) 이미지. 기준자=1㎛ **(도 4A-F)** *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 조직에서 축삭돌기 (파란색 별표)의 대식 세포 (M) 매개된 식균 작용(phagocytosis)을 가진 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 동물에서의 수초(myelin sheath) 두께를 나타내는 더 높은 배율의 척수. 기준자=800 nm

도 5A-5J: 시신경의 전자 현미경법은 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스가 저미엘린 형성 및 미엘린 형성 장애를 나타낸다는 것을 입증한다 (도 5A-5C 및 도 5H-5J) 말기에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스의 시신경의 대표적인 전자 현미경법 (EM) 이미지. 기준자=800 nm **(도 5A-5C 및 도 5H-5J)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 동물에서 수초 두께를 나타내는 더 높은 배율의 시신경. 빨간색 별표 = 미엘린화되지 않은 축삭돌기, 검은색 별표 = 얇게 미엘린화된 축삭돌기. 기준자=400 nm **(도 5D)** *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 조직에서 축삭돌기의 대식세포 (M) 매개된 식균 작용 (파란색 별표). 기준자=2 ㎛ **(도 5E)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 조직에 대한 시신경에서 G 비율 측정 **(도 5F)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 조직에 대한 축삭돌기 직경에 대해 플롯팅된 (plotted) G-비율의 산점도. **(도 5G)** 모든 군에 대해 축삭돌기 직경이 플롯팅되었다. 군 당 n=3의 동물에서 동물 당 50개의 축삭돌기가 계수되었으며, 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. 일원 ANOVA가 데이터 세트에 대해 수행된 후 이어서 투키 사후 테스트가 수행되었다. *p<0.05, ***p<0.001.

도 6A-6G: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 P21에서 저미엘린 형성을 나타낸다 (도 6A) 면역조직화학적 분석의 시간 과정을 나타내는 개략도. **(도 6B)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색 (미엘린 [파란색])의 대표적인 P21 이미지. 기준자=1 mm **(도 6C)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 PLP (녹색)의 대표적인 P21 이미지. 기준자=250㎛ **(도 6D)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 MBP (빨간색)의 대표적인 P21 이미지. 기준자=250㎛ **(도 6E)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 말기 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색 (미엘린 [파란색])의 대표적인 P21 이미지. 기준자=1 mm **(도 6F)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 PLP (녹색)의 대표적인 P21 이미지. 기준자=1 mm **(도 6G)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 MBP (빨간색)의 대표적인 P21 이미지. 기준자=250㎛

도 7A-7J: *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 희돌기교세포 (OL)의 감소된 수를 나타낸다 (도 7A) 면역조직화학적 분석의 시간 과정을 나타내는 개략도. **(도 7B)** 계수를 수행하는데 사용된 뇌량의 영역을 나타내는 개략도. **(도 7C)** 말기에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 ASPA 양성 OL의 대표 이미지. 기준자=50 ㎛ 및 25 ㎛. **(도 7D)** P14, P21 및 ES에WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 ASPA 양성 OL 개수/mm^2의 정량화. **(도 7E)** ES에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 이중 양성 NG2+ Olig2+의 대표 이미지. 기준자=50 ㎛ 및 25 ㎛ **(도 7F)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 P14, P21 및 ES에서의 이중 양성 NG2+ Olig2+ 개수/mm^2의 정량화 **(도 7G)** P14 (P14 시점에 대해 *Tubb4a*^{D249N} 에 대한 n=3 제외) 및 P21에 대해 n=4 마우스/군 및 ES에 대해 n=3 마우스/군을 이용한 2번의 독립적인 실험의 대표적인 데이터. **(도 7H)** WT, Tubb4aD249N/+, 및 ES Tubb4aD249N/D249N 마우스의 P14, P21, 및 ~P35-P40에서의 이중-양성 NG2+ 카스파제 세포/mm2의 정량화. **(도 7I)** WT, Tubb4aD249N/+, 및 Tubb4aD249N/D249N 마우스에서 ES에서의 이중-양성 NG2+ Ki-67 세포의 대표 이미지. **(도 7J)** WT, Tubb4aD249N/+, 및 ES Tubb4aD249N/D249N 마우스의 P14, P21, 및 ~P35-P40에서의 이중-양성 NG2+ Ki-67 세포/mm2의 정량화. 통계 테스트는 이원 ANOVA에 의해 수행된 후 이어서, 투키 사후 테스트에 의해 수행된다. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. *p<0.05 및 ***p<0.001.

도 8A-8G: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 P14에서 저미엘린 형성을 나타낸다 (도 8A) 면역조직화학적 분석의 시간 과정을 나타내는 개략도. **(도 8B)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색 (미엘린 [파란색])의 대표적인 P14 이미지. 기준자=1 mm **(도 8C)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마

우스의 PLP (녹색)의 대표적인 P14 이미지. 기준자=250㎛ **(도 8D)** 뇌량에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 MBP (빨간색)의 대표적인 P14 이미지. 기준자=250㎛ **(도 8E)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 말기 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색 (미엘린 [파란색])의 대표적인 P14 이미지. 기준자=1 mm **(도 8F)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 PLP (녹색)의 대표적인 P14 이미지. 기준자=1 mm **(도 8G)** 소뇌에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 MBP (빨간색)의 대표적인 P14 이미지. 기준자=250㎛

도 9A-9J: *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 극심한 소뇌 과립 신경 손실 및 상당한 선조 신경 손실을 나타낸다 (도 9A) 면역조직화학적 분석의 시간 과정을 나타내는 개략도 **(도 9B)** P40에서 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 전체 뇌의 양을 나타내는 개략도. **(도 9C)** P21 및 P40에 WT 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 소뇌의 니슬 염색 (Nissl stain) 이미지. 기준자=1 mm **(도 9D)** P21 및 말기 (ES)에 WT 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 소뇌 과립 뉴런을 나타내는 NeuN (녹색)의 대표 이미지. 기준자=1 mm **(도 9E)** P14, P21 및 ES에서의 소뇌 과립 뉴런 개수/mm^2의 정량화. **(도 9F)** P21 및 ES에 WT 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 NeuN (녹색) 및 절단된 카스파제 3 (빨간색)에 의해 염색된 이중 면역-양성 소뇌 과립 뉴런의 대표 이미지 (흰색 화살표로 나타남). 기준자=25 ㎛ **(도 9H)** 뉴런 수를 정량화하는데 사용된 영역을 나타내는 선조체의 개략도 (파선 상자). 기준자=1 mm **(도 9I)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 ES에서의 NeuN (녹색)에 의해 염색된 선조 뉴런의 대표 이미지. 기준자=100 ㎛ **(도 9J)** P14, P21 및 ES에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 선조 뉴런 개수/mm^2의 정량화. 통계 테스트는 이원 ANOVA에 의해 수행된 후 이어서, 투키 사후 테스트에 의해 수행된다. P14 및 P21에 대해 n=4 마우스/군 (P14 시점에 대해 *Tubb4a*^{D249N}에 대한 n=3 제외) 및 ES에 대해 n=3 마우스/군을 이용한 2번의 독립적인 실험의 대표적인 데이터. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. *p<0.05 및 ***p<0.001.

도 10A-10C: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 P14 (도 10A), P21 (도 10B) 및 ES (도 10C)에서 WT 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$의 시상 절편의 저미엘린 형성의 대표적인 Eri-C (미엘린) 염색 이미지를 나타낸다 (기준자=1 mm).

도 11A-11K: *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스의 희돌기교세포 및 뉴런은 감소된 분기 및 과정을 나타낸다 (도 11A-C) WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스로부터 단리된 PLP 라벨링된(labeled) 희돌기교세포 (OL)의 대표 이미지. 기준자=50 ㎛ **(도 11D)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스로부터의 Olig2 라벨링된 세포의 수는 커버슬립(coverslip)에서 계수되었고 WT 동물에서의 Olig2+ 세포의 퍼센트로서 플롯팅되었다. **(도 11E)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스로부터 정량화된 PLP+ 세포의 총 수는 WT 동물에서의 PLP+ 세포의 퍼센트로서 플롯팅되었다. **(도 11F)** 전체 Olig2+ 세포로부터의 성숙한 PLP+ 세포의 수는 WT 동물의 퍼센트로서 플롯팅되었다. 실험은 적어도 3회 독립적으로 반복되었다. **(도 11G)** Tuj1 (축삭돌기 마커) 및 MAP2 (수상돌기 마커)로 염색된 WT 마우스로부터의 피질 뉴런의 대표 이미지. **(도 11H)** Tuj1 및 MAP2로 염색된 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스로부터의 피질 뉴런의 대표 이미지. 기준자=75 ㎛ **(도 11I)** 평판배양 후 1주에 살아있는 뉴런의 수를 정량화하고 WT 뉴런의 퍼센트로서 플롯팅되었다 **(도 11J)** 축삭돌기 길이는 신경돌기 추적자 플러그인(neurite tracer plugin)을 사용하여 측정되었고 모든 군에 대해 플롯팅되었다 **(도 11K)** 수상돌기 길이는 신경돌기 추적자 플러그인을 사용하여 측정되었고 모든 군에 대해 플롯팅되었다. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. 일원 ANOVA가 데이터 세트에 대해 수행된 후 이어서 투키 사후 테스트가 수행되었다. *p<0.05, ***p<0.001

도 12A-12E: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 P14 및 P21에서 감소된 수의 희돌기교세포를 나타낸다 (도 12A-B) P14 **(도 12A)** 및 P21 **(도 12B)**에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 ASPA 양성 OL의 대표 이미지. 기준자=50 ㎛ 및 25 ㎛ **(도 12C-12D)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 P14 **(도 12C)** 및 P21 **(도 12D)**에서의 이중 양성 NG+ Olig2+의 대표 이미지. 기준자=50 ㎛ 및 25 ㎛ **(도 12E)** P14, P21 및 ES에서 Olig2+ 세포 수의 정량화. 통계 테스트는 이원 ANOVA에 의해 수행된 후 이어서, 투키 사후 테스트에 의해 수행된다. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다.

도 13A-13F: 미세관 폴리머화는 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스에서 영향을 받는다 (도 13A) WT,

Tubb4a^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 피질 뉴런으로부터의 EB3 추적을 기반으로 생성된 예시의 운동기록기(kymograph). **(도 13B)** 10 min 기간 동안 이어진 100 μm 당 EB3 코멧(comet) 수에 대한 그래프가 플롯팅된다. **(도 13C)** EB3 트래피킹(trafficking)을 기반으로 하는 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 미세관 폴리머화에 대해 플롯팅된 속도. **(도 13D-E)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ EB3 코멧에 대해 플롯팅된 총 달린 시간 **(도 13D)** 및 달린 시간의 막대그래프 **(도 13E)**. **(도 13F)** WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ EB3 코멧에 대해 플롯팅된 총 달린 길이. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다. 일원 ANOVA이 데이터 세트에 대해 수행된 후 이어서 투키 사후 테스트가 수행된다. *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.001.

도 14A-14E: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P14에서 소뇌 과립 뉴런의 비슷한 푸르키네(Purkinje) 뉴런 수 (도 14A) 대표 이미지 및 카스파제 염색을 나타낸다. 기준자=1 mm 및 50μm **(도 14B)** P14 및 P21에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 선조 뉴런의 대표 이미지. 기준자=100 μm **(도 14C)** P14에 WT 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 니슬 염색. 기준자=1 mm **(도 14D)** P21 및 말기에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 칼빈딘에 의해 염색된 푸르키네 뉴런의 대표 이미지. 기준자=100μm **(도 14E)** P21 및 말기에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 푸르키네 뉴런 개수/mm^2의 정량화. 통계 테스트는 이원 ANOVA에 의해 수행된 후 이어서, 투키 사후 테스트에 의해 수행된다. 데이터는 평균 및 SEM으로 제공된다.

도 15A-15B: *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ 마우스는 P14 및 P21에서 IL 세포 사멸을 나타낸다 (도 15A) P14에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 이중 양성 Olig2+ 카스파제의 대표 이미지. **(도 15B)** P21에 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 이중 양성 Olig2+ 카스파제의 대표 이미지. 기준자=50 μm 및 25 μm

도 16A-16D: 야생형 (도 16A) 및 *Tubb4a*$^{D249/D249N}$ (도 16B) 세포의 Map2 및 Dapi 염색. *TUBB4A*^{D249N} iPSC 유래된 뉴런으로부터의 전체 뉴런 **(도 16C)** 및 선조 뉴런 **(도 16D**, CTIP2+뉴런)은 대조군 iPSC 유래된 뉴런과 비교하여 감소된 생존률을 나타냈고 **(도 16E)** *TUBB4A*^{D249N}은 증가된 아폽토시스(apoptosis) 및 신경병리학을 나타냈다. **(도 16F-G)** 대조군 환자 라인에서 TUBB4A의 CRISPR 매개된 결실은 뉴런의 발달/형성에 영향을 미치지 않는다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 17A-17B: TUBB4A의 결실은 TUBB4^{AD249N} MSN에서 신경보호적이다 전체 뉴런 **(도 17A)** 및 중간 가시 뉴런 **(도 17B)** TUBB4^{AD249N} MSN의 정량화

도 18A-18C: **(도 18A)** ASO 전기천공법의 도표 **(도 18B)** ASO 작용 원리의 도표 **(도 18C)** ASO 라이브러리의 스크리닝 후 2개의 유망한 ASO의 선택. ***p<0.0001.

도 19: H-ABC에 대한 생체 내(in vivo) 전체 동물 모델 및 치료 프로토콜의 개략도

도 20A-20C: 확립된 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 모델에서 TUBB4A 하향조절의 치료적 효능. 확립된 마우스 모델을 생존 가능하고 정상인 것으로 보이는 *Tubb4a* 넉아웃 (knock out: KO) 마우스와 교배시켰다. **(도 20A)** *Tubb4a* 트랜스제닉 마우스 교배의 도표. **(도 20B)** 결과의 *Tubb4a*$^{D249N/KO}$ 마우스는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에 비해 개선된 운동 기능 및 증가된 생존력을 나타내며, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (~P35-P40)와 비교하여 *Tubb4a*$^{D249N/KO}$ (~P108)의 생존이 연장되었다. **(도 20C)**. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$에 대한 *Tubb4a*$^{D249N/KO}$의 로타로드 성능을 기반으로 하여 개선된 운동 기능 (n=2-3, ***p<0.0001).

도 21A-21D: 살아있는 치료 표적으로서 ASO의 평가. ASO의 라이브러리는 마우스 Oli-neu 세포를 사용하여 스크리닝되었다. 2개의 강력한 ASO (ASO 1316 및 1851)가 최대의 Tubb4a 넉다운(knockdown)을 나타낸다. **(도 21A)** Oli-Neu 세포에서 qRT-PCR에 의한 시험관 내에서(in vitro) ASO 라이브러리의 스크리닝 후 2개의 유망한 ASO의 선택. ***p<0.0001. 다양한 ASO 용량 (25, 10, 5, 2, 1 및 0.5 μg/g의 용량)으로의 단일 뇌실내 (ICV) 볼루스(bolus) 주사의 투여는 용량-반응을 확립하였다. 최소한의 독성을 가지며 가장 강력한 ASO 1316이 선택되었다 (데이터 미도시). **(도 21B)** P1 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 2μg/g 용량으로의 단일 ICV 주사는 대조군 마우스

(PBS, 스크램블된(scrambled) ASO)와 비교하여 처리된 마우스에서 증가된 생존을 입증한다. **(도 21C)** *Tubb4a* ASO로 처리된 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 또한 대조군 마우스 (PBS, 스크램블된 ASO)와 비교하여 P34-P37로부터 감소된 발작을 나타낸다. **(도 21D)** 또한, 이들 마우스는 P28 및 P35에서 로타로드에 의해 측정된 바와 같이 운동 기능의 상당한 개선을 나타낸다 (NC5-스크램블된 ASO; *p<0.01, **p<0.001, *** p<0.0001).

도 22: GFP-WT-Tubb4a의 과발현은 배양된 Oli-Neu 세포에서 qRT-PCR에서 알 수 있는 바와 같이 MBP, PLP 및 CNP mRNA 수준을 증가시켰다 (n=4-6, ***p<0.05). (목-비히클 대조군(Mock-Vehicle control)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 기저핵 및 소뇌의 저미엘린 형성 및 위축증 (H-ABC)은 튜불린 알파 4 (*TUBB4A*)의 원인 변이체와 관련된 희귀성 저미엘린화 대뇌백질이영양증이고; p.Asp249Asn (D249N)은 대부분의 영향을 받은 개체에서 발생하는 재발성 변이체이다. *TUBB4A*에서 단일대립유전자성 돌연변이는 또한 초기 발생 뇌병증에서부터 4형 성인-발생 이긴장증(속삭임형 음성장애)까지의 더 넓은 범위의 신경학적 장애를 초래할 수 있다. H-ABC는 이 스펙트럼 내에 있고, 전형적으로 아동기 초반에 시작하며 삶의 처음 10년이 끝나기 전에 보행 손실과 함께 이긴장증, 운동 실조, 변화된 걸음걸이 및 진행성 운동 기능 장애를 특징으로 한다. 지금까지, 이 진행성 및 불능성 소아 장애에 이용 가능한 치료적 접근법이 없었다. *TUBB4A* 돌연변이가 H-ABC를 유발하는 방법을 이해하고 치료 전략의 발달 및 전임상 테스트를 용이하게 하기 위해, 발명자의 그룹은 CRISPR-Cas9 접근법을 사용하여 이형접합성 (*Tubb4a*^{D249N}) 또는 동형접합성 (*Tubb4a*$^{D249N/D249N}$) *Tubb4a* 돌연변이를 가지고 있는 넉인(knock-in) 마우스 모델을 개발하였다.

[0023] 발명자들은 고전적인 H-ABC의 제1 마우스 모델 (*Tubb4a*$^{D249N/D249N}$)을 제공하는데, 이것은 감소된 생존, 떨림을 동반한 진행성 운동 기능 장애, 비정상적인 걸음걸이 및 운동 실조를 나타내며, 따라서 질환의 표현형 특징을 요약한다. 출생일 후 (P) 14, P21 및 말기 P40에 면역라벨링 및 웨스턴 블롯을 사용한 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 신경병리학적적 평가는 미엘린 형성의 초기 지연에 이어서 궁극적으로는 탈미엘린화를 나타낸다. 시간이 흐름에 따라 미엘린 단백질이 감소하고 ASPA 양성 희돌기교세포 (CNS의 미엘린화 세포)가 극적으로 손실된다. 전자 현미경법을 위한 매우 얇은 뇌 절편은 이들 마우스의 척수 및 시신경에서 저미엘린 형성 및 진행중인 미엘린 손실을 더 입증하였다. 이에 더하여, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터의 배양 중인 희돌기교세포에 대한 시험관 내 연구는 감소된 성숙화 및 미엘린 마커를 입증하였다. 유사하게, 신경병리학은 선조체 및 소뇌 과립 세포에서 극심한 신경 손실을 입증한다. 또한, 배양 중인 뉴런에서의 효과는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터의 세포에서 불안정한 미세관 역학과 함께 감소된 뉴런 생존으로 나타났다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 H-ABC에 대한 신규한 마우스 모델을 제공하고, *TUBB4A* 돌연변이로부터의 잠재적인 미세관 불안정성과 함께 이 장애에서 세포 생리학의 복잡성을 입증하며, 희돌기교세포, 선조 뉴런 및 소뇌 과립 세포에 대한 세포 자발적 효과, 및 엄청난 신경발달적 표현형을 발생시킨다.

[0024] 추가적인 연구에서, 발명자들은 H-ABC 환자로부터 얻어진 말초 혈액 샘플로부터의 재프로그래밍된 유도 만능 줄기 세포주를 제공한다. 이들 세포주의 사용은 돌연변이 *Tubb-4a* 암호화 핵산을 이 서열을 표적화하는 핵산을 사용하여 하향조절함으로써 대뇌백질이영양증의 치료에 대한 새로운 치료적 패러다임(paradigm)을 보여주었다. 대안의 접근법에서, 관심있는 부위에서 야생형 *Tubb-4a*를 과발현하는 벡터가 제공된다. *Tubb-4a*의 과발현은 증가된 MBP, PLP, 및 CNP mRNA 수준과 관련이 있으며, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 H-ABC 증상을 완화해야 한다.

[0025] 발명자들은 또한 *TUBB4A* 발현을 효과적으로 하향조절하는 새로운 치료적 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 개발하여, 대뇌백질이영양증의 치료를 위한 새로운 접근법을 제공한다.

[0026] **정의**

[0027] 본 주제는 본 발명의 일부를 형성하는 다음의 상세한 설명을 참조하여 더 쉽게 이해될 수 있다. 본 발명은 본원에서 기재되고 및/또는 나타난 특정 생성물, 방법, 조건 또는 변수에 제한되지 않으며, 본원에서 사용된 용어는 단지 예로서 특정 구체예를 기재할 목적을 위한 것이고 청구된 본 발명을 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0028] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에 관하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가져야 한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함해야 하고 복

수형 용어는 단수형을 포함해야 한다.

[0029] 상기 및 본 발명 전반에 걸쳐 이용된 바와 같이, 다음 용어 및 약어는 달리 지시되지 않는 한 다음의 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 본 발명에서 단수형 "하나(a)", "하나(an)", 및 "그(the)"는 복수의 지시대상을 포함하고, 특정 수치에 대한 지시대상은 문맥상 달리 분명하게 나타나지 않는 한 적어도 상기 특정 값을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 화합물"에 대한 지시대상은 이러한 화합물 및 당업자에게 공지된 그것의 동등물 중 하나 이상에 대한 지시대상이다. 용어 "복수"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 하나 초과를 의미한다. 값의 범위가 표시될 때, 또 다른 구체예는 하나의 특정 값에서부터 및/또는 다른 특정 값까지 포함한다. 유사하게, 값이 선행사 "약"의 사용에 의해 근사치로 표현될 때, 특정 값은 또 다른 구체예를 형성하는 것으로 이해된다. 모든 범위는 포괄적이고 병합 가능하다.

[0031] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구성요소", "조성물", "화합물의 조성물", "화합물", "약물", "약리학적 활성제", "활성제", "치료제", "요법", "치료", 또는 "약제"는 대상체 (인간 또는 동물)에게 투여될 때 국소 및/또는 전신 작용에 의해 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 유도하는 화합물 또는 화합물들 또는 물질의 조성물을 나타내기 위해 본원에서 교체 가능하게 사용된다. 용어 "작용제" 및 "테스트 화합물"은 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 박테리아, 식물, 균류, 또는 동물 (특히 포유류) 세포 또는 조직과 같은 생물학적 재료로부터 제조된 추출물을 나타낸다. 생물학적 거대분자는 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 펩타이드/DNA 복합체, 및 본원에서 기재된 핵산 또는 그것의 암호화된 단백질을 함유하는 *TUBB4A*의 활성을 조절하는 능력을 나타내는 임의의 핵산 기반 분자를 포함한다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, "*TUBB4A*"는 베타 튜불린 패밀리의 구성원을 암호화하는 유전자를 나타낸다. 베타 튜불린은 헤테로다이머화 및 조립되어 미세관을 형성하는 2개의 코어 단백질 패밀리 (알파 및 베타 튜불린) 중 하나이다. 이 유전자의 돌연변이는 저미엘린화 대뇌백질이영양증-6 및 상염색체 우성 비틀림 이긴장증-4 및 H-ABC를 유발하며, 현재는 더 일반적으로 TUBB4A-관련된 백질뇌병증이라고 불린다. TUBB4A에 대한 참조 서열은, 예를 들어, NM_001289123.1, NM_001289127.1 NM_001289129.1을 포함하며, 이것들은 GenBank에서 발견될 수 있다. 대안의 스플라이싱(splicing)은 상이한 아이소폼을 암호화하는 다수의 전사물 변이체를 발생시킨다. 야생형 Tubb4a 단백질 서열은 UniProt, 수탁 번호 P04350-TBB4A_human에서 발견된다. 인간 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있는 여러 TUBB4A 변이체가 확인되었고 하기 표 1에서 나열된다. 본 발명은 D249N 변이체에 초점을 맞추었지만, 결과는 다른 기존의 TUBB4A 돌연변이로 일반화할 수 있다.

표 1

[0033]

표 1: TUBB4A 변이체			
c.76A>T	c.1190G>T	c.535G>A	c.731G>C
c.1052C>T	c.1228G>A	c.535G>C	c.731G>T
c.1054G>A	c.1254G>T	c.535G>T	c.743C>A
c.1061G>A	c.1325G>A	c.538G>A	c.745G>A
c.1062C>G	c.286G>A	c.539A>C	c.755A>G
c.1088T>C	c.293G>A	c.568C>T	c.763G>A
c.1099T>A	c.395G>C	c.5G>A	c.785G>A
c.1099T>C	c.467G>T	c.691G>A	c.796T>A
c.1162A>G	c.4C>G	c.716G>A	c.811G>A
c.1164G>A	c.4C>T	c.716G>T	c.845G>C
c.1164G>T	c.518A>T	c.730G>A	c.874C>A
c.1171C>T	c.523G>A	c.730G>C	c.916G>A
c.1172G>A	c.533C>A	c.730G>T	c.968T>G
c.1172G>T	c.533C>G	c.731G>A	c.971A>C
c.1181T>G	c.533C>T		

[0034] 표 2는 상이한 형태의 TUBB4A-관련된 백질뇌병증과 관련이 있는 특정 아미노산 변화의 목록을 제공한다.

표 2

[0035]

표 2		
돌연변이	인간 표현형	영향을 받는 세포 유형
p.Arg2Gly (R2G)	속삭임형 음성장애	뉴런
p.Asp249Arg (D249N)	고전적인 H-ABC	뉴런 및 희돌기교세포
p.Arg28Pro (R282P)	단독성 저미엘린 형성	희돌기교세포
p.Arg391His (R391H)	단독성 저미엘린 형성	희돌기교세포

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "요법" (뿐만 아니라 이것들의 상이한 형태)은 예방적(preventative) (예를 들어, 예방적(prophylactic)), 치유적 또는 고식적(palliative) 치료를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는 것"은 병태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 부작용 또는 부정적인 효과 또는 증상을 완화하거나 감소시키는 것을 포함한다.

[0037] 용어 "대상체", "개체", 및 "환자"는 본원에서 교체 가능하게 사용되고, 예방적 치료를 포함한, 본 발명에 따르는 약학적 조성물로의 치료가 제공되는 동물, 예를 들어, 인간을 나타낸다. 용어 "대상체"는 본원에서 사용된 바와 같이 인간 및 비-인간 동물을 나타낸다. 용어 "비-인간 동물" 및 "비-인간 포유동물"은 본원에서 교체 가능하게 사용되고 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류 (특히 고등 영장류), 양, 개, 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트), 기니피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 소, 말 및 비-포유동물, 예컨대 파충류, 양서류, 닭, 및 칠면조를 포함한다.

[0038] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 교체 가능하게 사용된다. 그것들은 임의의 길이의 폴리머 형태의 뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이것들의 유사체를 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머의 조립 전에 또는 후에 전달될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는, 예컨대 라벨링 구성요소와의 컨쥬게이션에 의해, 폴리머화 이후 추가로 변형될 수 있다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "야생형"은 당업자에 의해 이해되는 해당 분야의 용어이며 돌연변이 또는 변이체 형태와 구별되는 바와 같이 자연에서 발생하는 전형적인 형태의 유기체, 균주, 유전자 또는 특징을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 야생형으로부터 벗어나거나 자연적으로 발생하지 않는 구성요소를 포함하는 패턴을 갖는 자질을 나타내는 것을 의미하는 것으로 받아들여져야 한다.

[0040] 용어 "비-자연적으로 발생하는" 또는 "조작된"은 교체 가능하게 사용되고 사람의 손의 개입을 나타낸다. 용어는, 핵산 분자 또는 폴리펩타이드를 나타낼 때, 핵산 분자 또는 폴리펩타이드에 적어도 실질적으로 자연에서 자연스럽게 관련이 있거나 자연에서 발견되는 하나의 다른 구성요소가 없다는 것을 의미한다.

[0041] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 유익한 또는 원하는 결과를 얻기에 충분한 작용제의 양을 나타낸다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 질환 상태, 대상체의 체중 및 연령, 질환 상태의 심각도, 투여 방식 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있으며, 이것들은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 용어는 또한 본원에서 기재된 이

미지화 방법 중 어느 하나에 의해 검출되는 이미지를 제공하는 용량에 적용된다. 특정 용량은 선택된 특정 작용제, 뒤따르는 주입 양생법, 다른 화합물과 조합하여 투여되는지 여부, 투여 시기, 이미지화되는 조직, 및 그것이 운반되는 육체적인 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.

[0042] 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 면역학, 생화학, 화학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 유전학 및 재조합 DNA의 통상적인 기술을 이용하며, 이것들은 해당 분야의 기술 범위 내에 있다. Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)) 참조.

[0043] 본 발명의 여러 양태는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템, 또는 이와 같은 벡터에 관한 것이다. 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서 CRISPR 전사물 (예를 들어, 핵산 전사물, 단백질, 또는 효소)의 발현을 위해 디자인될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 전사물은 박테리아 세포, 예컨대 대장균(Escherichia coli), 곤충 세포 (바큘로바이러스 발현 벡터를 사용함), 효모 세포, 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press. San Diego, Calif. (1990)에서 추가로 논의된다. 대안으로, 재조합 발현 벡터는, 예를 들어, T7 프로모터 조절 서열 및 T7 폴리머라제를 사용하여, 시험관 내에서 전사 및 번역될 수 있다.

[0044] 일부 구체예에서, 벡터는 포유류 발현 벡터를 사용하여 포유류 세포에서 하나 이상의 서열의 발현을 구동시킬 수 있다. 포유류 발현 벡터의 예는 pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) 및 pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195)를 포함한다. 포유류 세포에서 사용될 때, 발현 벡터의 제어 기능은 전형적으로 하나 이상의 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 일반적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시토메갈로바이러스, 유인원 바이러스 40, 및 본원에서 개시되고 해당 분야에 공지된 다른 것들로부터 유래된다. 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘 다에 적합한 다른 발현 시스템에 대해서는, 예를 들어, Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989의 챕터 16 및 17을 참조하면 된다.

[0045] 일부 구체예에서, 재조합 포유류 발현 벡터는 특정 세포 유형에서 우선적으로 핵산의 발현을 지시할 수 있다 (예를 들어, 조직-특이적 조절 요소가 핵산을 발현하는데 사용된다). 조직-특이적 조절 요소는 해당 분야에 공지되어 있다. 적합한 조직-특이적 프로모터의 비-제한적 예는 알부민 프로모터 (간-특이적; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277), 림프-특이적 프로모터 (Calame and Eaton, 1988. Adv. I mmunol. 43: 235-275), 특히 T 세포 수용체 (Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) 및 면역글로불린 (Baneiji, et al., 1983. 세포 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748)의 프로모터, 뉴런-특이적 프로모터 (예를 들어, 신경사상체(neurofilament) 프로모터; Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477), 췌장-특이적 프로모터 (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916), 및 유선-특이적 프로모터 (예를 들어, 우유 유장 프로모터, 미국 특허 번호 4,873,316 및 유럽 출원 공개 번호 264,166)를 포함한다. 발달적으로 조절되는 프로모터, 예를 들어, 쥐 hox 프로모터 (Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379) 및 α-태아 단백질 프로모터 (Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546)가 또한 포함된다. 높은 수준의 발현을 얻기 위해서, *Tubb4-A* 암호화 핵산이 코돈-최적화될 수 있다.

[0046] 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 전체적으로 전사물 및 CRISPR-관련된 ("Cas") 유전자의 발현에 수반되거나 그 활성을 지시하는 다른 요소를 나타내며, Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr (트랜스(trans)-활성화 CRISPR) 서열 (예를 들어 tracrRNA 또는 활성 부분적 tracrRNA), tracr-메이트(mate) 서열 ("직접 반복부" 및 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 tracrRNA-처리된 부분적인 직접 반복부를 포함함), 가이드 서열 (내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서(spacer)"라고도 불림), 또는 CRISPR 유전자좌로부터의 다른 서열 및 전사물을 포함한다. 일부 구체예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소가 I형, II형, 또는 III형 CRISPR 시스템으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소가 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체, 예컨대 스트렙토코쿠스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)로부터 유래된다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열의 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하는 요소 (내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 프로토스페이서(protospacer)라고도 불림)를 특징으로 한다. CRISPR 복합체 형성의 맥락에서, "표적 서열"은 가이드 서열이 상보성을 갖도록 디자인된 서열을 나타내며, 표적 서열과 가이드 서열 간의 혼성체화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성체화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 존재하면, 완전한 상보성

이 반드시 필요한 것은 아니다. 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질에 위치한다. 일부 구체예에서, 표적 서열은 진핵생물 세포의 세포 기관, 예를 들어, 미토콘드리아 또는 엽록체 내에 있을 수 있다. 표적 서열을 포함하는 표적화된 유전자좌로의 재조합에 사용될 수 있는 서열 또는 주형은 "편집 주형" 또는 "편집 폴리뉴클레오타이드" 또는 "편집 서열"이라고 불린다. 본 발명의 양태에서, 외인성 주형 폴리뉴클레오타이드는 편집 주형이라고 불릴 수 있다. 본 발명의 양태에서 재조합은 상동 재조합이다.

[0047] 일부 구체예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 구동시키는 하나 이상의 벡터는 숙주 세포로 도입되어 CRISPR 시스템의 요소의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 지시한다. 예를 들어, Cas 효소, tracr-메이트 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열은 각각 별개의 벡터 상에서 별개의 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안으로, 동일하거나 상이한 조절 요소로부터 발현된 요소 중 둘 이상은 단일 벡터에서 조합될 수 있으며, 하나 이상의 추가적인 벡터가 제1 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 구성요소를 제공한다. 단일 벡터에서 조합된 CRISPR 시스템 요소는 임의의 적합한 배향으로 배열될 수 있으며, 예컨대 하나의 요소가 제2 요소에 관하여 5' (제2 요소의 "업스트림(upstream)") 또는 제2 요소에 관하여 3' (제2 요소의 "다운스트림(downstream)")에 위치한다. 하나의 요소의 암호화 서열은 제2 요소의 암호화 서열의 동일한 또는 반대의 가닥 상에 위치하고, 동일한 또는 반대의 방향으로 배향될 수 있다. 일부 구체예에서, 단일 프로모터는 CRISPR 효소를 암호화하는 전사물 및 가이드 서열, tracr 메이트 서열 (선택적으로 가이드 서열에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인트론 서열 내에 임베딩된(embedded) tracr 서열 (예를 들어, 상이한 인트론에서 각각, 적어도 하나의 인트론에서 둘 이상, 또는 단일 인트론에서 전부) 중 하나 이상의 발현을 구동시킨다. 일부 구체예에서, CRISPR 효소, 가이드 서열, tracr 메이트 서열, 및 tracr 서열은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고 그것으로부터 발현된다.

[0048] 일부 구체예에서, 벡터는 하나 이상의 삽입 부위, 예컨대 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열 ("클로닝 부위"라고도 불림)을 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 삽입 부위 (예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상의 삽입 부위)가 하나 이상의 벡터의 하나 이상의 서열 요소의 업스트림 및/또는 다운스트림에 위치한다. 일부 구체예에서, 벡터는 tracr 메이트 서열의 업스트림, 및 선택적으로 tracr 메이트 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소의 다운스트림에 삽입 부위를 포함하여, 삽입 부위로의 가이드 서열의 삽입 후 및 발현 시 가이드 서열은 진핵생물 세포에서 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 지시한다. 일부 구체예에서, 벡터는 2개 이상의 삽입 부위를 포함하며, 각각의 삽입 부위는 각각의 부위에서 가이드 서열의 삽입을 허용하도록 2개의 tracr 메이트 서열 사이에 위치한다. 이러한 배열에서, 2개 이상의 가이드 서열은 단일 가이드 서열의 2개 이상의 카피, 2개 이상의 상이한 가이드 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다수의 상이한 가이드 서열이 사용될 때, 단일 발현 작제물이 CRISPR 활성을 세포 내 다수의 상이한 상응하는 표적 서열로 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단일 벡터는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개, 또는 그 이상의 가이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상의 이러한 가이드-서열-함유 벡터가 제공되고, 선택적으로 세포에 전달될 수 있다. 대안의 구체예에서, CRISPR-매개된 염기 편집자는 BE3이 아니라 염기 편집자 4 (BE4)이다. 특히, 염기 편집은 표 1에서 나열된 돌연변이된 핵산을 변화시키는데 이용될 수 있다.

[0049] 일부 구체예에서, 방법은 또 다른 염기로의 변화를 위한 창(window) 내에서 C 염기를 평가하는 단계를 더 포함한다. 구체예에서, BE3 PAM 서열 (NGG)이 표적 시토신 염기(들)의 원위의 13-17개의 뉴클레오타이드인 경우 gRNA가 선택된다. 특정 구체예에서, 변화는 센스(sense) 가닥에서 C를 통해 T로 이루어지고, 변형된 코돈은 넌센스(nonsense) 코돈으로 변화된다. 추가적인 구체예에서, 변화는 안티센스 가닥에서 G를 통해 A로 이루어지고, 변형된 코돈은 넌센스 코돈으로 변화된다. 추가의 구체예에서, 변화는 센스 가닥에서 C를 통해 T로 이루어지고, 변화는 미스센스(missense) 변이체이다. 추가적인 구체예에서, 변화는 안티센스 가닥에서 G를 통해 A로 이루어지고, 변화는 미스센스 변이체이다. 염기 편집은 질환 발생 전에 일어날 수 있으며, 질환은 치료 유전자의 돌연변이로부터 발생하는 표현형이다. 특정 구체예에서, 염기 편집은 질환에 걸릴 위험을 감소시킨다.

[0050] 용어 "벡터"는 세포에 감염, 트랜스펙션 또는 형질전환되어 독립적으로 또는 숙주 세포 게놈 내에서 복제할 수 있는 단일 또는 이중 가닥 원형 핵산 분자를 나타낸다. 원형 이중 가닥 핵산 분자는 제한 효소의 처리시 잘라져서 선형화될 수 있다. 다양한 벡터, 제한 효소, 및 제한 효소에 의해 표적화되는 뉴클레오타이드 서열의 지식은 당업자가 쉽게 이용할 수 있고, 부착된 서열 또는 요소의 복제를 유발하기 위해 또 다른 유전자 서열 또는 요소(DNA 또는 RNA)가 부착될 수 있는 임의의 레플리콘, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 바크미드, 파지 또는 바이러스를 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 제한 효소로 벡터를 절단하고 2개의 조각을 함께 결찰시킴으로써 벡터에

삽입될 수 있다.

[0051] 일부 양태에서, 본 발명은 예컨대 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, CRISPR 시스템, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, 트리플렉스(triplex) 핵산, 등) 또는 본원에서 기재된 하나 이상의 벡터, 이것들의 하나 이상의 전사물, 및/또는 그것들로부터 전사된 하나 이상의 단백질을 숙주 세포로 전달하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 이러한 방법에 의해 생산된 세포, 및 이러한 세포를 포함하거나 이것들로부터 생산된 유기체 (예컨대 동물, 식물, 또는 균류)를 더 제공한다. 일부 구체예에서, 가이드 서열과 조합된 (그리고 선택적으로 가이드 서열과 복합체를 형성한) CRISPR 효소가 세포로 전달된다. 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법이 포유류 세포 또는 표적 조직에서 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 배양액, 또는 숙주 유기체에서 CRISPR 시스템의 구성요소를 암호화하는 핵산을 세포에 투여하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, RNA (예를 들어, 본원에서 기재된 벡터의 전사물), 네이키드(naked) 핵산, 및 전달 비히클, 예컨대 리포솜과 복합체를 형성한 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함하며, 이것들은 세포로의 전달 후 에피솜 또는 통합된 게놈을 갖는다. 유전자 요법 절차의 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 et al., in Current Topics in Microbiology and I mmunology Doerfler and Bihm (eds) (1995); 및 Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)를 참조하면 된다.

[0052] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 리포펙션, 뉴클레오펙션, 미량주사, 유전자총법(biolistic), 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다중 양이온 또는 지질:핵산 컨쥬게이트, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 작용제-향상된 DNA 흡수를 포함한다. 리포펙션은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,049,386, 4,946,787; 및 4,897,355에 기재되어 있고 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다 (예를 들어, Transfectam™ 및 Lipofectin™). 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 Feigner, WO 91/17424; WO 91/16024의 것들을 포함한다. 전달은 세포 (예를 들어 시험관 내 또는 생체 외(ex vivo) 투여) 또는 표적 조직 (예를 들어, 생체 내 투여)으로 이루어질 수 있다.

[0053] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함한 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 미국 특허 번호 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 및 4,946,787 참조).

[0054] 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 체내에서 바이러스를 특정 세포로 표적화하고 바이러스 페이로드(payload)를 핵으로 이동시키기 위한 고도로 진화된 과정을 이용한다. 바이러스 벡터는 환자에게 직접 투여될 수 있거나 (생체 내) 또는 그것들은 시험관 내에서 세포를 치료하는데 사용될 수 있고, 변형된 세포는 선택적으로 환자에게 투여될 수 있다 (생체 외). 통상적인 바이러스 기반 시스템은 유전자 전달을 위해 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 및 단순 헤르페스 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 숙주 게놈에서 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-관련 바이러스 유전자 전달 방법으로 가능하며, 종종 삽입된 전이유전자의 장기간 발현을 초래한다. 추가적으로, 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 높은 형질도입 효율이 관찰되었다.

[0055] 레트로바이러스의 굴성(tropism)은 외래의 외피 단백질을 통합하여, 표적 세포의 잠재적인 표적 집단을 확장함으로써 변화될 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 형질도입하거나 감염시킬 수 있고 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생산할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 그러므로 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 달라질 것이다. 레트로바이러스 벡터는 외래의 서열의 최대 6-10 kb에 대한 패키징 능력을 가진 씨스(cis)-작용 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 씨스-작용 LTR이 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이것은 치료 유전자를 표적 세포로 통합시켜 영구적인 전이유전자 발현을 제공하는데 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 쥐 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이것들의 조합을 기반으로 하는 것들을 포함한다 (예를 들어, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992); So mmnerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller et

al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700 참조).

[0056] 일과성 발현이 선호되는 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율이 가능하고 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터를 이용하여, 높은 역가 및 발현 수준이 얻어졌다. 이 벡터는 상대적으로 단순한 시스템으로 대량으로 생산될 수 있다.

[0057] 아데노-관련 바이러스 ("AAV") 벡터는 또한 핵산 및 펩타이드의 시험관 내 생산에서, 및 생체 내 및 생체 외 유전자 요법 절차를 위해 세포를 표적 핵산으로 형질도입하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, West et al., Virology 160:38-47 (1987); 미국 특허 번호 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994) 참조). 재조합 AAV 벡터의 구성은 미국 특허 번호 5,173,414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)를 포함한 많은 간행물에서 기재되어 있다.

[0058] 패키징 세포는 전형적으로 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 ψ2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용된 바이러스 벡터는 보통 핵산 벡터를 바이러스 입자로 패키징하는 세포주를 생산함으로써 생성된다. 벡터는 전형적으로 숙주로의 패키징 및 이후의 통합에 필요한 최소한의 바이러스 서열을 함유하며, 다른 바이러스 서열은 발현되는 폴리뉴클레오타이드(들)에 대해 발현 카세트로 대체된다. 상실된 바이러스 기능은 전형적으로 패키징 세포주에 의해 트랜스로(in trans) 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용된 AAV 벡터는 전형적으로 숙주 게놈로의 패키징 및 통합에 필요한 AAV 게놈으로부터의 ITR 서열만을 소유한다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 암호화하는 헬퍼(helper) 플라스미드를 함유하지만, ITR 서열이 없는 세포주에서 패키징된다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염될 수 있다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열이 없기 때문에 대량으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로의 오염은, 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다.

[0059] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 본원에서 기재된 하나 이상의 벡터로 일과성으로 또는 비-일과성으로 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 세포는 그것이 대상체에서 자연 발생하는 것처럼 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 트랜스펙션되는 세포는 대상체로부터 취해진다. 일부 구체예에서, 세포는 대상체로부터 취해진 세포, 예컨대 세포주로부터 유래된다.

[0060] 한 양태에서, 본 발명은 진핵생물 세포에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 변형시키는 방법을 제공하며, 이것은 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내로부터 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 방법은 인간 또는 비-인간 동물로부터 세포 또는 세포 집단의 샘플을 추출하는 단계, 및 세포 또는 세포들을 변형시키는 단계를 포함한다. 배양 단계는 생체 외에서 어떠한 스테이지에서도 발생할 수 있다. 세포 또는 세포들은 인간 또는 비-인간 동물로 재도입될 수 있다.

[0061] 한 양태에서, 본 발명은 진핵생물 세포에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 방법은 CRISPR 복합체를 표적 폴리뉴클레오타이드에 결합시켜 표적 폴리뉴클레오타이드를 절단시키고 이로 인해 표적 폴리뉴클레오타이드를 변형시키는 단계를 포함하며, CRISPR 복합체는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 내 표적 서열에 혼성체화된 가이드 서열과 복합체를 ㅎ ud성한 CRISPR 효소를 포함하고, 상기 가이드 서열은 차례로 tracr 서열에 혼성체화하는 tracr 메이트 서열에 연결된다.

[0062] 한 양태에서, 본 발명은 상기 방법에서 개시된 요소 중 하나 이상 및 조성물을 함유하는 키트를 제공한다. 일부 구체예에서, 키트는 상기 기재된 것들과 같은 대안의 전달 시스템을 위한 벡터 시스템 또는 구성요소 및 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 구체예에서, 벡터 또는 전달 시스템은 (a) tracr 메이트 서열 및 tracr 메이트 서열의 업스트림에 가이드 서열을 삽입하기 위한 하나 이상의 삽입 부위에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서, 발현될 때, 가이드 서열이 진핵생물 세포에서 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 지시하고, CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성체화되는 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성체화되는 tracr 메이트 서열과 복합체를 형성하는 CRISPR 효소를 포함하는, 제1 조절 요소; 및/또는 (b) 핵 국소화 서열을 포함하는 상기 CRISPR 효소를 암호화하는 효소-암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소를 포함한다. 요소는 개별적으로 또는 조합으로 제공될 수 있고, 임의의 적합한 용기, 예컨대 바이알, 병, 또는 튜브에서 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 하나 이상의 언어, 예를 들어, 하나 초과의 언어로 된 설명서를 포함한다.

[0063] 일부 구체예에서, 키트는 본원에서 기재된 요소 중 하나 이상을 이용하는 과정에서 사용하기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 시약은 임의의 적합한 용기에서 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트는 하나 이상의 반응 또는 저장 완충액을 제공하 수 있다. 시약은 특정 분석에 사용 가능한 형태로, 또는 사용 전에 하나 이상의 다른 구성요소의 추가를 필요로 하는 형태 (예를 들어 농축물 또는 동결건조된 형태)로 제공될 수 있다. 완충액은, 제한되는 것은 아니지만, 나트륨 카보네이트 완충액, 나트륨 바이카보네이트 완충액, 보레이트 완충액, Tris 완충액, MOPS 완충액, HEPES 완충액, 및 이것들의 조합을 포함하는 임의의 완충액일 수 있다. 일부 구체예에서, 완충액은 알칼리성이다. 일부 구체예에서, 완충액은 약 7 내지 약 10의 pH를 갖는다. 일부 구체예에서, 키트는 가이드 서열 및 조절 요소에 작동 가능하게 연결되도록 벡터로의 삽입을 위한 가이드 서열에 상응하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 상동 재조합 주형 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0064] 하향조절 핵산 또는 억제 핵산은, 제한되는 것이 아니라, 안티센스 분자, 압타머, 리보자임, 트리플렉스 형성 분자, RNA 간섭 (RNAi), CRISPR (클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)) RNA (crRNA), 및 외부 가이드 서열을 포함한다. 이들 핵산 분자는 표적 분자에 의해 소유되는 특이적 활성의 영향 물질(affector), 억제자, 조절자, 및 자극 물질(stimulator)로서 작용할 수 있거나, 또는 기능적 핵산 분자는 임의의 다른 분자에 독립적인 데 노보 활성을 소유할 수 있다. 특정 구체예에서, 억제 핵산이 이용된다.

[0065] 안티센스 분자는 표준적인 또는 비-표준적인 염기 쌍 형성을 통해 표적 핵산 분자와 상호작용하도록 디자인된다. 안티센스 분자와 표적 분자의 상호작용은, 예를 들어, RNase H 매개된 RNA-DNA 하이브리드(hybrid) 분해를 통해 표적 분자의 파괴를 촉진하도록 디자인된다. 대안으로, 안티센스 분자는 일반적으로 표적 분자에서 일어나는 처리 기능, 예컨대 전사 또는 복제을 방해하도록 디자인된다. 안티센스 분자는 표적 분자의 서열을 기반으로 디자인될 수 있다. 표적 분자의 대부분의 접근 가능한 영역을 발견함으로써 안티센스 효율의 최적화를 위한 많은 방법이 존재한다. 예시의 방법은 시험관 내 선택 실험 및 DMS 및 DEPC를 사용한 DNA 변형 연구일 것이다. 안티센스 분자는 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 또는 10^{-12} 이하의 해리 상수 (K_d)로 표적 분자에 결합하는 것이 바람직하다. 안티센스 분자의 디자인 및 사용을 돕는 방법 및 기술의 대표적인 샘플은 미국 특허 번호 5,135,917, 5,294,533, 5,627,158, 5,641,754, 5,691,317, 5,780,607, 5,786,138, 5,849,903, 5,856,103, 5,919,772, 5,955,590, 5,990,088, 5,994,320, 5,998,602, 6,005,095, 6,007,995, 6,013,522, 6,017,898, 6,018,042, 6,025,198, 6,033,910, 6,040,296, 6,046,004, 6,046,319, 및 6,057,437에서 발견될 수 있다.

[0066] 트리플렉스 형성 기능적 핵산 분자는 이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산과 상호작용할 수 있는 분자이다. 트리플렉스 분자가 표적 영역과 상호작용할 때, 트리플렉스라고 불리는 구조가 형성되며, 여기에서 왓슨-크릭(Watson-Crick) 및 후그스틴(Hoogsteen) 염기 쌍 형성 둘 다에 의존적으로 복합체를 형성하는 3개의 DNA 가닥이 존재한다. 트리플렉스 분자는 그것들이 높은 친화도 및 특이성으로 표적 영역에 결합할 수 있기 때문에 바람직하다. 트리플렉스 형성 분자는 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 또는 10^{-12} 미만의 K_d로 표적 분자에 결합하는 것이 바람직하다. 다양한 상이한 표적 분자에 결합하도록 트리플렉스 형성 분자를 제조하고 사용하는 방법의 대표적인 예는 미국 특허 번호 5,176,996, 5,645,985, 5,650,316, 5,683,874, 5,693,773, 5,834,185, 5,869,246, 5,874,566, 및 5,962,426에서 발견될 수 있다. 유전자 발현은 또한 RNA 간섭 (RNAi)을 통해 고도로 특이적인 방식으로 효과적으로 침묵하게 될 수 있다. 이 침묵(silencing)은 원래 이중 가닥 RNA (dsRNA)의 추가로 관찰되었다 (Fire, A., et al., Nature, 391:806-11 (1998); Napoli, C., et al., Plant Cell, 2:279-89 (1990); Hannon, G. J., Nature, 418:244-51 (2002)). dsRNA가 세포에 들어가면, 그것은 RNase III-유사 효소, 다이서(Dicer)에 의해, 3' 단부에 2개의 뉴클레오타이드 돌출부(overhang)를 함유하는, 길이가 21-23개 뉴클레오타이드인 이중 가닥 작은 간섭 RNA (siRNA)로 절단된다 (Elbashir, S. M., et al., Genes Dev., 15:188-200 (2001); Bernstein, E., et al., Nature, 409:363-6 (2001); Ha mmond, S. M., et al., Nature, 404:293-6 (2000)). ATP-의존적인 단계에서, siRNA는 일반적으로 RNAi 유도된 침묵 복합체 (RISC)로 알려져 있는 다중-서브유닛 단백질 복합체로 통합되며, 이것은 siRNA를 표적 RNA 서열로 안내한다 (Nykanen, A., et al., Cell, 107:309-21 (2001)). 일부 시점에서 siRNA 듀플렉스(duplex)이 풀리고, 안티센스 가닥은 RISC에 결합된 채로 남아있고 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제의 조합에 의한 상보적 mRNA 서열의 분해를 지시하는 것으로 보인다 (Martinez, J., et al., Cell, 110:563-74 (2002)). 하지만, RNAi 또는 siRNA 또는 그것들의 사용의 효과는 어떠한 유형의 메커니즘에도 제한되지 않는다.

[0067] 작은 간섭 RNA (siRNA)는 서열-특이적 전사 후 유전자 침묵을 유도하여, 유전자 발현을 감소시키거나 억제할 수

있는 이중 가닥 RNA이다. 한 예에서, siRNA는 siRNA와 표적 RNA 간의 서열 동일성의 영역 내에서 상동성 RNA 분자, 예컨대 mRNA의 특이적 분해를 촉발시킨다. 예를 들어, WO 02/44321에서는 3' 돌출 단부와 염기-쌍 형성될 때 표적 mRNA의 서열-특이적 분해 가능한 siRNA가 개시되며, 이들 siRNA를 제조하는 방법에 대해 본원에 참조로 포함된다. 서열 특이적 유전자 침묵은 포유류 세포에서 효소 다이서에 의해 생산된 siRNA를 모방하는 합성 짧은 이중 가닥 RNA를 사용하여 달성될 수 있다 (Elbashir, S. M., et al., Nature, 411:494 498(2001); Ui-Tei, K., et al., FEBS Lett, 479:79-82 (2000)). siRNA는 화학적으로 또는 시험관 내에서 합성될 수 있거나 또는 세포 내부에서 siRNA로 가공되는 짧은 이중 가닥 헤어핀-유사 RNA (shRNA)의 결과일 수 있다. 합성 siRNA는 일반적으로 알고리즘 및 통상적인 DNA/RNA 합성기를 사용하여 디자인된다. 공급자는 Ambion (Austin, Tex.), ChemGenes (Ashland, Mass.), Dharmacon (Lafayette, Colo.), Glen Research (Sterling, Va.), MWB Biotech (Esbersberg, Germany), Proligo (Boulder, Colo.), 및 Qiagen (Vento, The Netherlands)이 포함된다. siRNA는 또한 Ambion's SILENCER.RTM. siRNA Construction Kit와 같은 키트를 사용하여 시험관 내에서 합성될 수 있다.

[0068] RNAi와 유사하게, CRISPR (클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부) 간섭은 내인성으로 발현되는 단백질의 유전자 발현을 감소시키기 위한, 선택적 DNA 절단을 통한 강력한 접근법이다. CRISPR은 고유한 스페이서에 의해 구분되는 직접 반복부를 함유하는 유전적 요소이이며, 이것들 중 다수는 파지 및 다른 외래의 유전적 요소에서 발견되는 서열과 동일하다. 최근의 작업은 적응성 면역력에서 CRISPR의 역할을 입증하였고 CRISPR로부터 유래된 작은 RNA (crRNA)가 외래의 DNA의 표적화된 간섭에 대해 귀소성(homing) 올리고뉴클레오타이드로 구현된다는 것을 나타낸다 (Jinek et al., Science, 337:816-821 (2012)). crRNA는 유전적 수준에서 DNA를 선택적으로 절단하는데 사용된다.

[0069] 용어 shRNA는 단단한 헤어핀 회전을 형성하는 RNA 구조인 짧은 헤어핀 RNA를 나타내며, 이것은 또한 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 침묵시키는데 사용될 수 있다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 기전에 의해 작은 간섭 RNA (siRNA)로 절단되며, 이것은 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)에 결합된다. 이 복합체는 mRNA에 결합하여 그것을 절단시키며, 이는 mRNA에 결합하는 siRNA와 일치한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "과발현하는 것"은 숙주 세포에서 단백질의 생산을 언급할 때 단백질이 자연 발생 환경에서 생산되는 것보다 더 많은 양으로 생산된다는 것을 의미한다.

[0071] 용어 "유전적 변화"는 본원에서 사용된 바와 같이 하나 이상의 핵산 분자의 야생형 또는 참조 서열로부터의 변화를 나타낸다. 유전적 변화는, 제한되는 것이 아니라, 공지된 서열의 핵산 분자로부터 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 염기 쌍 치환, 추가 및 결실을 포함한다.

[0072] 용어 "고체 매트릭스"는 본원에서 사용된 바와 같이 비드, 미세입자, 마이크로어레이(microarray), 미세적정 웰 또는 테스트 튜브의 표면, 계량봉(dipstick) 또는 필터과 같은 임의의 포맷을 나타낸다. 매트릭스의 재료는 폴리스티렌, 셀룰로스, 라텍스, 니트로셀룰로스, 나일론, 폴리아크릴아미드, 덱스트란 또는 아가로스일 수 있다.

[0073] 구절 "근본적으로 ~로 이루어지는 것"은 특정 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 나타낼 때 주어진 서열 번호의 성질을 가진 서열을 의미한다. 예를 들어, 아미노산 서열에 관하여 사용될 때, 구절은 서열 그 자체 및 서열의 기능적 및 신규한 특성에 영향을 미치지 않는 분자적 변형을 포함한다.

[0074] "표적 핵산"은 본원에서 사용된 바와 같이 복합 핵산 혼합물에 존재하는 핵산의 이전에 정의된 영역을 나타내며 정의된 야생형 영역은 대뇌백질이영양증과 관련된 적어도 하나의 공지된 뉴클레오타이드 변이를 함유한다. 핵산 분자는 cDNA 클로닝 또는 감수성(subtractive) 혼성체화에 의해 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나 또는 수동으로 합성될 수 있다. 핵산 분자는 트리에스터 합성 방법에 의해 수동으로 또는 자동화된 DNA 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

[0075] 용어 "상보적"은 서로와 다수의 유리한 상호작용을 형성할 수 있는 2개의 뉴클레오타이드를 설명한다. 예를 들어, 아데닌은 티민에 대해 상보적이며 그것들이 2개의 수소 결합을 형성할 수 있기 때문이다. 유사하게, 구아닌 및 시토신은 그것들이 3개의 수소 결합을 형성할 수 있기 때문에 상보적이다. 따라서 핵산 서열이 다음 염기 서열, 티민, 아데닌, 구아닌 및 시토신을 함유하면, 이 핵산 분자의 "보체"는 티민 대신에 아데닌, 아데닌 대신에 티민, 구아닌 대신에 시노신, 및 시토신 대신에 구아닌을 함유하는 분자일 것이다. 보체가 모 핵산 분자와 최적의 상호작용을 형성하는 핵산 서열을 함유할 수 있기 때문에, 이러한 보체는 모 분자에 높은 친화도로 결합할 수 있다.

[0076] 용어 "프로모터 요소"는 적절한 세포 내부에 있을 때, 전사 인자 및/또는 폴리머라제 결합 및 mRNA로의 벡터

DNA의 일부의 추후의 전사를 촉진할 수 있는 벡터로 통합된 뉴클레오타이드 서열을 설명한다. 한 구체예에서, 본 발명의 프로모터 요소는 대뇌백질이영양증 특이적 마커 핵산 분자의 5' 단부에 선행하여 후자가 mRNA로 전사된다. 숙주 세포 기전은 mRNA를 폴리펩타이드로 번역한다.

[0077] 당업자는 핵산 벡터가 프로모터 요소 및 대뇌백질이영양증 특이적 마커 유전자 핵산 분자 이외의 핵산 요소를 함유할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이들 다른 핵산 요소는, 제한되는 것은 아니지만, 복제 기원, 리보솜 결합 부위, 약물 저항성 효소 또는 아미노산 대사 효소를 암호화하는 핵산 서열, 및 분비 신호, 국소화 신호, 또는 폴리펩타이드 정제에 유용한 신호를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0078] "레플리콘"은 대부분 자체적인 제어 하에 복제 가능한 임의의 유전적 요소, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바크미드, 플라스티드, 파지 또는 바이러스이다. 레플리콘은 RNA 또는 DNA일 수 있고 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0079] "발현 오페론"은 전사 및 번역 제어 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 번역 시작 신호 (예를 들어, ATG 또는 AUG 코돈), 폴리아데닐화 신호, 종결자, 등을 소유할 수 있고, 숙주 세포 또는 유기체에서 폴리펩타이드 암호화 서열의 발현을 촉진하는 핵산 세그먼트를 나타낸다.

[0080] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리포터", "리포터 시스템", "리포터 유전자", 또는 "리포터 유전자 생성물"은 핵산이, 발현될 때, 예를 들어, 생물학적 분석, 면역분석, 방사선 면역분석에 의해, 또는 비색 분석법, 형광 방법, 화학 발광 방법 또는 기타 방법에 의해 쉽게 측정 가능한 리포터 신호를 생산하는 생성물을 암호화하는 유전자를 포함하는, 작동 가능한 유전자 시스템을 의미한다. 핵산은 RNA 또는 DNA, 선형 또는 원형, 단일 가닥 또는 이중 가닥, 안티센스 또는 센스 극성일 수 있고, 리포터 유전자 생성물의 발현을 위해 필수적인 제어 요소에 작동 가능하게 연결된다. 필요한 제어 요소는 리포터 시스템의 성질 및 리포터 유전자가 DNA 또는 RNA의 형태로 되어있는지 여부에 따라 달라질 것이며, 프로모터, 인핸서, 번역 제어 서열, 폴리 A 추가 신호, 전사 종결 신호, 등과 같은 요소를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 상기 언급된 바와 같이, 도입된 핵산은 수령체 세포 또는 유기체의 핵산으로 통합 (공유 결합)될 수 있거나 되지 않을 수도 있다. 박테리아, 효모, 식물 및 포유류 세포에서, 예를 들어, 도입된 핵산은 에피솜 요소 또는 독립적인 레플리콘, 예컨대 플라스미드로서 유지될 수 있다. 대안으로, 도입된 핵산은 수령체 세포 또는 유기체의 핵산으로 통합될 수 있고 상기 세포 또는 유기체 내에 안정하게 유지될 수 있으며 수령체 세포 또는 유기체의 자손 세포 또는 유기체로 추가로 전해지거나 유전될 수 있다. 마지막으로, 도입된 핵산은 수령체 세포 또는 숙주 유기체 내에 일과성으로만 존재할 수 있다.

[0082] 용어 "작동 가능하게 결합된"은 암호화 서열의 발현에 필요한 조절 서열이 암호화 서열의 발현에 영향을 미치도록 DNA 분자 내에서 암호화 서열에 대해 적절한 위치에 배치된다는 것을 의미한다. 이 동일한 정의는 때때로 발현 벡터에서 전사 유닛 및 다른 전사 제어 요소 (예를 들어, 인핸서)의 배열에 적용된다.

[0083] 구절 "변형된 백본 연결"은, 제한되는 것은 아니지만, 포스포로티오에이트 연결, 메틸포스포네이트 연결, 에틸포스포네이트 연결, 보라노포스페이트 연결, 설폰아미드, 카르보닐아미드, 포스포로디아미데이트, 양으로 대전된 측기를 포함하는 포스포로디아미데이트 연결, 포스포로디티오에이트, 아미노에틸글리신, 포스포트리에스터, 아미노알킬포스포트리에스터; 3'-알킬렌 포스포네이트; 5'-알킬렌 포스포네이트, 비대칭(chiral) 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트, 아미노알킬포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트; 티오노알킬-포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스터, 셀레노포스페이트, 2-5' 연결된 보라노포스포네이트 유사체, 반전된 극성을 가진 연결, 무염기 연결, 단쇄 알킬 연결, 사이클로알킬 뉴클레오사이드 간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오사이드 간 연결, 실옥산 백본을 가진 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로환형 뉴클레오사이드 간 연결, 설파이드, 설폭사이드, 설폰, 포름아세틸 연결, 티오포름아세틸 연결, 메틸렌 포름아세틸 연결, 티오포름아세틸 연결, 리보아세틸 연결, 알켄 연결, 설파메이트 백본, 메틸렌이미노 연결, 메틸렌하이드라지노 연결, 설포네이트 연결, 및 아미드 연결을 포함한다.

[0084] 구절 "변형된 당"은, 제한없이, 2' 플루오로, 2' 플루오로 치환된 리보스, 2'-플루오로-D-아라비노핵산 (FANA), 2'-O-메톡시에틸 리보스, 2'-O-메톡시에틸 데옥시리보스, 2'-O-메틸 치환된 리보스, 모르폴리노, 피페라진, 및 잠김(locked) 핵산 (LNA)을 포함한다.

[0085] "특이적 결합 쌍"은 서로에 대해 특정 특이성을 갖고 정상 조건에서 다른 분자에 우선하여 서로 결합하는 특이적 결합 구성원 (sbm) 및 결합 파트너 (bp)를 포함한다. 특이적 결합 쌍의 예는 항원과 항체, 리간드와 수용체 그리고 상보적 뉴클레오타이드 서열들이다. 당업자는 많은 다른 예를 알고 있다. 또한, 용어 "특이적 결합 쌍"

은 또한 특이적 결합 구성원 및 결합 파트너 중 하나 또는 둘 다가 큰 분자의 일부를 포함하는 경우 적용 가능하다. 특이적 결합 쌍이 핵산 서열을 포함하는 구체예에서, 그것들은 분석 조건 하에서 서로 혼성체화하기 위한 길이, 바람직하게는 10개 초과의 뉴클레오타이드 길이, 더 바람직하게는 15 또는 20개 초과의 뉴클레오타이드 길이일 것이다.

[0086] "샘플" 또는 "환자 샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 일반적으로 특정 분자, 바람직하게는 대뇌백질이영양증 특이적 마커 분자, 예컨대 하기 제공되는 표에서 나타난 마커에 대해 테스트될 수 있는 샘플을 나타낸다. 샘플은, 제한되는 것이 아니라, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 타액, 뇌척수액, 눈물, 흉수 등을 포함하는 체액을 포함할 수 있다.

[0087] **키트 및 제조 물품**

[0088] 상기 언급된 생성물은 약학적으로 허용 가능한 담체에서 핵산의 하향조절과 관련된 TUBB-4A를 함유하는 키트로 통합될 수 있다. 핵산은 포유류 세포를 형질도입할 수 있는 벡터에 배치될 수 있거나 배치되지 않을 수도 있다. 다른 양태에서, 키트는 관심있는 표적 세포에서 인간 야생형 *TUBB-4A* 및/또는 이것을 과발현하기 위한 핵산을 암호화하는 돌연변이 *TUBB4A*를 발현하는 벡터를 함유한다. 키트는 선택적으로 세포로의 핵산의 전달을 촉진하는 나노입자 또는 리포솜 제제를 포함할 수 있다. 키트는 또한 사용 설명서, 용기, 투여용 그릇, 분석 기질, 또는 이것들의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0089] **치료제의 개발 및 스크리닝 방법**

[0090] 본원에서 확인된 *TUBB4-A*의 유전적 변화는 H-ABC의 병인과 관련이 있기 대문에, 돌연변이된 유전자 및 그들의 암호화된 생성물의 활성을 조절하는 작용제를 확인하기 위한 방법은 대뇌백질이영양증, 특히 H-ABC의 치료에 효과적인 치료제를 생성해야 한다.

[0091] 분자 모델링은 기능에 필요한 입체구조 또는 핵심 아미노산 잔기를 기반으로 하여 변화된 *TUBB4-A* 단백질의 활성 부위에 결합하는 능력을 가진 특이적 유기 분자의 확인을 촉진해야 한다. 결합 화학적 접근법이 가장 큰 활성을 가진 분자를 확인하는데 사용될 것이고 이들 분자의 반복이 추가의 스크리닝 주기 동안 개발될 것이다.

[0092] 약물 스크리닝 분석에서 이용된 폴리펩타이드 또는 단편은 용액 내에서 유리되거나, 고체 지지체에 부착되거나 또는 세포 내에 부착될 수 있다. 약물 스크리닝의 한 가지 방법은 바람직하게는 경쟁 결합 분석에서 폴리펩타이드 또는 단편을 발현하는 재조합 폴리뉴클레오타이드로 안정하게 형질전환된 진핵생물 또는 원핵생물 숙주 세포를 이용한다. 이러한 세포는, 살아있는 형태이든 고정된 형태이든, 표준 결합 분석에 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드 또는 단편과 테스트되는 작용제 사이에서 복합체 형성을 결정하거나, 또는 폴리펩타이드 또는 단편과 공지된 기질 사이에서 복합체 형성이 테스트되는 작용제에 의해 방해되는 정도를 검사할 수 있다.

[0093] 약물 스크리닝을 위한 또 다른 기술은 암호화된 폴리펩타이드에 적합한 결합 친화도를 가진 화합물에 대해 고처리량 스크리닝을 제공하고 1984년 9월 13일에 공개된 Geysen의 PCT 공개된 출원 WO 84/03564에서 상세히 기재되어 있다. 간략히 언급하면, 상기 기재된 것들과 같은 다수의 상이한 작은 펩타이드 테스트 화합물은 고체 기질, 예컨대 플라스틱 핀 또는 어떤 다른 표면 상에서 합성된다. 펩타이드 테스트 화합물은 표적 폴리펩타이드와 반응되고 세척된다. 결합된 폴리펩타이드는 해당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 검출된다.

[0094] 약물 스크리닝을 위한 추가의 기술은 비기능적 또는 변화된 *TUBB4-A* 관련된 유전자를 가진 숙주 진핵생물 세포주 또는 세포 (예컨대 상기 기재된 것들)의 사용을 수반한다. 이들 숙주 세포주 또는 세포는 폴리펩타이드 수준에서 결함이 있다. 숙주 세포주 또는 세포는 약물 화합물의 존재 하에 성장한다. 화합물이 결함 세포에서 세포 대사를 조절할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 숙주 세포의 세포 대사 속도가 측정된다. DNA 분자를 도입하기 위한 방법이 또한 상기 논의된 바와 같이 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0095] 본 발명의 H-ABC 관련된 핵산을 발현하는 숙주 세포 또는 이것의 기능적 단편은 대뇌백질이영양증의 발달을 조절할 수 있는 능력에 대해 잠재적인 화합물 또는 작용제를 스크리닝하기 위한 시스템을 제공한다. 따라서, 한 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자는 신경 신호전달 및 신경 세포 소통 및 구조와 관련된 세포 대사의 양태를 조절하는 작용제를 확인하기 위한 분석에서 사용하기 위한 재조합 세포주를 생성하는데 사용될 수 있다. 또한 *TUBB4-A* 함유 핵산에 의해 암호화되는 단백질의 기능을 조절할 수 있는 화합물을 스크리닝하기 위한 방법이 본원에서 제공된다.

[0096] 또 다른 접근법은 파지 표면 상에서 변화된 TUBB4-A 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 단편을 발현하도록 조작된 파지 디스플레이 라이브러리(phage display library)의 사용을 수반한다. 이러한 라이브러리는 발현된

펩타이드와 화학적 라이브러리의 구성요소 간의 결합 친화도가 검출될 수 있는 조건 하에서 결합 화학적 라이브러리와 접촉된다. 미국 특허 번호 6,057,098 및 5,965,456에서는 이러한 분석을 수행하기 위한 방법 및 장치가 제공된다. 이러한 화합물 라이브러리는, 제한되는 것은 아니지만, Maybridge Chemical Co., (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, N.J.), Microsour (New Milford, Conn.) Aldrich (Milwaukee, Wis.) Akos Consulting and Solutions GmbH (Basel, Switzerland), Ambinter (Paris, France), Asinex (Moscow, Russia) Aurora (Graz, Austria), BioFocus DPI (Switzerland), Bionet (Camelford, UK), Chembridge (San Diego, Calif.), Chem Div (San Diego, Calif.)을 포함하는 많은 회사들로부터 상업적으로 이용 가능하다. 당업자는 다른 공급처를 알고 있으며 그것들을 쉽게 구입할 수 있다. 치료적으로 효과적인 화합물이 본원에서 기재된 스크리닝 분석에서 확인되면, 그것들은 약학적 조성물로 제제화되고 H-ABC의 치료에 사용될 수 있다.

[0097] 합리적인 약물 디자인의 목표는, 예를 들어, 폴리펩타이드의 더 활성이거나 안정한 형태이거나, 또는, 예를 들어, 생체 내에서 폴리펩타이드의 기능을 향상시키거나 방해하는 약물을 제조하기 위해 생물학적으로 활성인 관심있는 폴리펩타이드 또는 그것들이 상호작용하는 소분자 (예를 들어, 아고니스트, 안타고니스트, 억제자)의 구조적 유사체를 생산하는 것이다. 예를 들어, Hodgson, (1991) Bio/Technology 9:19-21을 참조하면 된다. 상기 논의된 한 접근법에서, 예를 들어, 단백질-기질 복합체의 관심있는 단백질의 3차원 구조가 x-선 결정학, 핵 자기 공명, 컴퓨터 모델링 또는 가장 전형적으로 접근법들의 조합에 의해 해석된다. 덜 빈번하게는, 폴리펩타이드의 구조에 관한 유용한 정보는 상동성 단백질의 구조를 기반으로 모델링함으로써 획득할 수 있다. 합리적인 약물 디자인의 예는 HIV 프로테아제 억제자의 개발이다 (Erickson et al., (1990) Science 249:527-533). 이에 더하여, 펩타이드는 알라닌 스캔에 의해 분석될 수 있다 (Wells, (1991) Meth. Enzym. 202:390-411). 이 기술에서, 아미노산 잔기는 Ala로 대체되고, 펩타이드 활성에 대한 효과가 결정된다. 펩타이드의 각각의 아미노산 잔기는 펩타이드의 중요한 영역을 결정하기 위해 이 방식으로 분석된다.

[0098] 기능적 분석에 의해 선택된 표적-특이적 항체를 단리시킨 다음, 그 결정 구조를 해석하는 것이 또한 가능하다. 원칙적으로, 이 접근법은 이후의 약물 디자인이 기반이 될 수 있는 파마코어(pharmacore)를 획득한다.

[0099] 기능적인 약리학적 활성 항체에 대한 항-이디오타입 항체 (항-id)를 생성함으로써 단백질 결정학을 완전히 우회할 수 있다. 거울 이미지로서, 항-id의 결합 부위는 원래의 분자의 유사체일 것으로 예상된다. 항-id는 화학적으로 또는 생물학적으로 생산된 펩타이드 은행으로부터 펩타이드를 확인하고 단리시키는데 사용될 수 있다. 선택된 펩타이드는 파마코어로서 작용할 것이다.

[0100] 또 다른 구체예에서, 변화된 *TUBB-4A* 핵산의 이용 가능성은 본 발명의 대뇌백질이영양증-관련된 *TUBB4-A* 핵산을 가지고 있는 실험실 마우스의 계통의 생산을 가능하게 한다. 본 발명의 대뇌백질이영양증-관련된 핵산을 발현하는 트랜스제닉 마우스는 대뇌백질이영양증을 향한 발달 및 진행에서 g 핵산에 의해 암호화된 돌연변이된 *Tubb4-a* 단백질의 역할을 검사하기 위한 모델 시스템을 제공한다. 실험실 마우스에서 전이유전자를 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고 하기 기재되어 있다. 3개의 공통적인 방법은 1. 초기 배아로의 관심있는 외래의 유전자를 암호화하는 레트로바이러스 벡터의 통합; 2. 새로운 수정란의 전핵으로 DNA의 주사; 및 3. 초기 배아로의 유전적으로 조작된 배아 줄기 세포의 통합을 포함한다. 상기 기재된 트랜스제닉 마우스의 생산은 표적 단백질이 다양한 세포 대사 및 신경 처리에서 수행하는 역할의 분자적 설명을 용이하게 할 것이다. 이러한 마우스는 전체 동물 모델에서 추정 치료제를 연구하기 위한 생체 내 스크리닝 도구를 제공하고 본 발명에 포함된다.

[0101] 용어 "동물"은 본원에서 인간을 제외한 모든 척추동물을 포함하도록 사용된다. 그것은 또한 배아기 및 태아기를 포함한 모든 발달기의 개개의 동물을 포함한다. "트랜스제닉 동물"은 세포 이하의 수준에서 의도적인 유전적 조작에 의해, 예컨대 표적화된 재조합 또는 미량주사 또는 재조합 바이러스로의 감염에 의해, 직접적으로 또는 간접적으로, 변화되거나 수신된 유전 정보를 함유하는 하나 이상의 세포를 함유하는 임의의 동물이다. 용어 "트랜스제닉 동물"은 고전적인 이종 교배 또는 시험관 내 수정을 포함하는 것이 아니라, 하나 이상의 세포가 재조합 DNA 분자에 의해 변화되거나 이것을 수신하는 동물을 포함하는 것을 의미한다. 이 분자는 정의된 유전자좌로 특이적으로 표적화되거나, 염색체 내에서 무작위로 통합되거나, 또는 염색체 외에서 DNA를 복제할 수 있다. 용어 "생식계열 세포주 트랜스제닉 동물"은 유전적 변화 또는 유전 정보가 생식계열 세포로 도입되어, 자손에게 유전 정보를 전달할 수 있는 능력을 부여하는 트랜스제닉 동물을 나타낸다. 이러한 자손들이, 실제로, 상기 변화 또는 유전 정보 중 일부 또는 전부를 소유하는 경우, 그것들이 또한 트랜스제닉 동물이다. 표적 유전자를 변화시키는데 사용된 DNA는, 제한되는 것은 아니지만, 게놈 공급원으로부터의 단리, 단리된 mRNA 주형으로부터 cDNA의 제조, 직접적인 합성, 또는 이것들의 조합을 포함하는 다양한 기술에 의해 얻어질 수 있다.

[0102] 전이유전자 도입을 위해 바람직한 표적 세포의 유형은 배아 줄기 세포 (ES)이다. ES 세포는 시험관 내에서 배양

된 사전 이식 배아로부터 얻어질 수 있다 (Evans et al., (1981) Nature 292:154-156; Bradley et al., (1984) Nature 309:255-258; Gossler et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9065-9069). 전이유전자는 DNA 트랜스펙션과 같은 표준 기술에 의해 또는 레트로바이러스-매개된 형질도입에 의해 ES 세포로 효율적으로 도입될 수 있다. 결과로 생성된 형질전환된 ES 세포는 그 이후 비-인간 동물의 배반포와 조합될 수 있다. 도입된 ES 세포는 그 이후 배아를 군집화하고 결과의 키메라 동물의 생식계열에 기여한다.

[0103] 기술들은 유전적 영역을 비활성화시키거나 또는 원하는 돌연변이로 변화시키는데 이용 가능하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 넉인 동물은 내인성 쥐 유전자가, 예를 들어, 본 발명의 인간 대뇌백질이영양증-관련된 *TUBB4-A* 유전자와 대체된 것이다. 이러한 넉인 동물은 대뇌백질이영양증의 발달을 연구하기 위한 이상적인 모델 시스템을 제공한다. 넉아웃 동물이 또한 생성될 수 있다.

[0104] 본원에서 사용된 바와 같이, 대뇌백질이영양증 관련된 핵산, 이것의 단편의 발현은 대뇌백질이영양증-관련된 핵산의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열이 특정 조직 또는 세포 유형에서 암호화된 단백질의 발현을 지시하는 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)에 작동 가능하게 연결된 벡터를 사용하는 "조직 특이적 방식" 또는 "세포 유형 특이적 방식"으로 표적화될 수 있다. 이러한 조절 요소는 시험관 내 및 생체 내 적용 둘 다에 대해 유리하게 하는데 사용된다. 조직 특이적 단백질을 지시하기 위한 프로모터는 해당 분야에 널리 공지되어 있고 본원에서 기재되어 있다.

[0105] 본 발명의 트랜스제닉 마우스에 대한 사용 방법이 또한 본원에서 제공된다. 대뇌백질이영양증-관련된 *TUBB4-A*을 함유하는 핵산 또는 그것의 암호화된 단백질이 도입된 트랜스제닉 마우스가, 예를 들어, 발달을 조절할 수 있는 것을 확인하기 위해 치료제를 스크리닝하기 위한 스크리닝 방법을 개발하는데 유용하다.

[0106] **제약 및 펩타이드 요법**

[0107] 신경 신호전달 및 뇌 구조에서 대뇌백질이영양증 관련된 CNV/SNP에 의해 수행되는 역할의 설명은 대뇌백질이영양증의 치료 및 진단에 유용한 약학적 조성물의 개발을 촉진한다. 이들 조성물은 상기 재료들 중 하나에 더하여 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 완충액, 안정화제 또는 당업자에게 널리 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 비-독성이어야 하고 활성 성분의 효능을 방해해서는 안 된다. 담체 또는 다른 재료의 정확한 성질은 투여 경로, 예를 들어, 구강, 정맥내, 피부 또는 피하, 비강, 근육내, 복강내 경로에 따라 달라질 수 있다.

[0108] **약학적 조성물**

[0109] 치료제, 예방제, 또는 진단제 유도체, 예컨대 기능적 핵산 유도체를 함유하는 약학적 조성물은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 주사기, 선택적으로 펜-유사 주사기에 의한 피하, 근육내 또는 정맥내 주사에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 비경구 투여는 주입 펌프에 의해 수행될 수 있다. 추가의 옵션은, 바람직하게는 목적을 위해 특이적으로 디자인된 조성물, 분말 또는 액체로 된 치료제, 예방제, 또는 진단제를 비강으로 또는 폐로 투여하는 것이다.

[0110] 치료제, 예방제, 또는 진단제 유도체의 주사용 조성물은 원하는 최종 생성물을 제공하기에 적절한 성분들을 용해시키고 혼합하는 것을 수반하는 약학 산업의 통상적인 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 따라서, 한 절차에 따르면, 치료제, 예방제, 또는 진단제 유도체는 제조되는 조성물의 최종 부피보다 약간 더 작은 양의 물에 용해될 수 있다. 등장화제, 보존제 및 완충액이 필요에 따라 추가될 수 있고 용액의 pH 값은 필요에 따라 산, 예를 들어, 염산, 또는 염기, 예를 들어, 수성 나트륨 하이드록시드를 사용하여 - 필요한 경우 - 조정될 수 있다. 마지막으로, 용액의 부피는 원하는 농도의 성분을 제공하기 위해 물로 조정될 수 있다.

[0111] 일부 구체예에서, 완충액은 나트륨 아세테이트, 나트륨 카보네이트, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 나트륨 디하이드로겐 포스페이트, 인산 수소 이나트륨, 나트륨 포스페이트, 및 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 이것들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이들 특이적 완충액 중 각각의 하나 및 그 조합은 대안의 구체예를 구성한다.

[0112] 본 발명의 실시를 용이하게 하기 위해 다음 재료 및 방법이 제공된다.

[0113] **마우스 모델의 생성**

[0114] 이형접합성 *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부 (CRISPR) - Cas-9 기술을 사용하

여 *Tubb4a* 유전자의 엑손 4에 p.Asp249Asn (c.745G>A) 돌연변이를 삽입함으로써 생성되었다. 마우스 *Tubb4a* 유전자는 4개의 엑손을 포함하는 염색체 17 상에 위치한다. Cas9 mRNA, gRNA 및 올리고뉴클레오타이드 (표적화 서열을 가짐, 양 측면에 조합된 120bp 상동체에 의해 플랭킹됨(flanked))가 접합체로 동시-주사되었다. 결과의 CRISPR 넉인 마우스 모델은 *Tubb4a* 유전자의 하나의 대립유전자에서 c.745G>A의 이형접합성 점 돌연변이 (*Tubb4a*^{D249N})를 갖는다. 이들 이형접합성 마우스는 이형접합성 *Tubb4a*^{D249N} 동물에 더하여 taeip 래트 모델 (Li *et al.*, 2003)에서 볼 수 있는 동형접합성 돌연변이에 따르는 동형접합성 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스를 생산하기 위해 교배되었다. 야생형 (WT), *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 모든 분석에 포함되었다. 동물은 모든 실험 단계에서 유전자형 분석되었다. 마우스는 깨끗한 시설에서 12h 광:12h 암 주기 하에 유지되었고 음식과 물에 자유로운 접근이 제공되었다. 방법 및 연구 프로토콜은 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아(Children's hospital of Philadelphia)의 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 전부 승인되었고 개정된 미국 국립 보건원의 실험 동물 복지 정책(National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare Policy)에 따른다.

[0115] **행동 기능 분석**

[0116] 보행 각도, 보행, 매달리기 그립 강도, 정향 반사 (Feather-Schussler and Ferguson, 2016) 및 로타로드 (Shiotsuki *et al.*, 2010)가 정의된 발달 간격으로 평가되었다 (도 1). 조건 당 적어도 10마리 동물의 코호트가 행동 기능 테스트에 포함되었다.

[0117] **조직 처리**

[0118] 마우스는 90-150mg/kg의 케타민 및 7.5-16mg/kg의 자일라진의 혼합물로 중량 기준으로 깊게 마취되었고 1X PBS로 초기 씻어내림(flush) 이후 1X 포스페이트 완충액 식염수 (PBS) (Thermo fisher Scientific, USA) 중의 4% 파라포름알데하이드 (PFA)로 경심관류로 관류되었다. 뇌가 수집되고 밤새도록 1X PBS 중의 4% PFA로 사후 고정된 다음 조직은 1X PBS 중의 30% 수크로스에서 탈수되었다. 뇌는 최적의 절삭 온도 화합물 (O.C.T. 화합물, SAKURA, 4583, USA)에서 임베딩된 다음 크라이오스탯 마이크로톰(cryostat microtome) (CM 3050 S, Leica biosystems, USA) 상에서 관상 절편 또는 시상 절편 (50㎛)으로 잘라내었다.

[0119] **면역조직화학 및 이미지 습득:**

[0120] 미엘린 정량화 및 신경사상체 염색이 이전에 공개된 프로토콜 (Sahinkaya *et al.*, 2014)에 따라 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 염색에 의해 수행되었다. 니슬 염색을 위해서, 냉동된 절편은 0.1% 크레실 바이올렛으로 15min 동안 염색되고, PBS로 헹궈지고, 등급별 알콜 (70-100 %)로 탈수된 후 이어서, 자일렌 처리되고 퍼마운트와 함께 장착되었다. 면역형광 염색을 위해서, 막연한 절편은 2% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.1% Triton (Tx)-100로 실온에서 1h 동안 블로킹한 다음 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새도록 그리고 형광 2차 항체와 함께 실온에서 1h 동안 순차적으로 인큐베이션되었다. 1차 항체는 래트 항-단백지질 단백질 (PLP) (IDDRC hybridoma, courtesy Dr. Judith Grinspan), 토끼 항-미엘린 염기성 단백질 (MBP) (1:250, Abcam, Cat: ab40389), 토끼 항-NG2 (1:250, US 생물학적, Cat: C5067-70D), 마우스 항-Olig2 (1:100, Millipore, MABN50), 마우스 항-Neuronal Nuclei (NeuN) (1:1000, Millipore, Cat: MAB377); 토끼 항-아스파르토아실라제 (ASPA) (1:1000, Millipore, Cat: GTX110699), 토끼 항-절단된 카스파제 (1:200, cell signaling; Cat: #9579); 토끼 항-칼빈딘 (1:250, Swant, Cat: CB38)을 포함한다. 사용된 2차 항체는 토끼, 마우스 또는 래트에 대한 AlexaFluor-488- 또는 AlexaFluor-647-컨쥬게이션된 2차 항체 (1:1000; Invitrogen)였다. 핵은 DAPI로 대비염색되었다.

[0121] **면역블롯팅:**

[0122] P14, P21 및 말기에 소뇌 및 전뇌에서 핵심 미엘린 단백질, PLP 및 MBP 수준에 대한 단백질 수준을 결정하기 위해서, 각각의 뇌 조직은 프로테아제 및 포스파타제 억제자 (Sigma-Aldrich, USA)의 존재 하에 RIPA 완충액 (Thermo Fischer Scientific, USA)에 용해되었다. 샘플은 Laemmli 완충액에서 끓여지고 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 겔 (4-15% mini-PROTEAN 사전 형성 겔, Biorad, USA) 상에서 전기영동법이 수행되었다. 단백질은 전기 블롯팅에 의해 니트로셀룰로스 막 (Trans-blot Turbo transfer system, Biorad, USA)으로 옮겨졌다. 막은 Tris 완충된 식염수 (TBST) 중의 0.05% tween 20에서 제조된 블로킹 완충액 (1% 탈지유, Biorad)에 의해 블로킹되었고 그 이후 블로킹 완충액에 희석된 래트 항-PLP (1:1000, IDDRC hybridooma, courtesy Dr. Judith Grinspan) 및 토끼 항-MBP (1:2000, Abcam, Cat: ab40389)에 대한 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새도록 인큐베이션되었다. 막은 TBST로 5회 세척되고, 블로킹 완충액에서 1h 동안 2차 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-토끼 (1:5000, Santa

Cruz, Catalogue #sc2357) 또는 염소 항-래트 항체 (1:5000, ThermoFisher Scientific, Catalogue # 31470)에서 인큐베이션되고, TBST에서 세척되고 제조사의 지침 (Pierce ECL, ThermoFisher Scientific)에 따라 표준 ECL 프로토콜을 사용하여 현상되었다. 이미지가 스캔되고 Image J 소프트웨어에 의해 분석되었다. 로딩 대조군과의 표준화를 위해, 제조사의 지침 (One-minute Western Blot Stripping Buffer, GM Biosciences)에 따라 스트리핑(stripping)한 후 마우스 항-액틴 (company, 1:4000) 및 마우스 항-빈쿨린 (Company, 1:2000)이 사용되었다.

[0123] **전자 현미경법:**

[0124] 미엘린 형성은 전자 현미경법 (EM)을 사용한 구조 분석을 위해 매우 얇은 절편에 의해 추가로 평가되었다. 마우스의 별개의 코호트가 말기에 (~ 제35 일) 식염수에 이어서 0.1M PB (PB; pH 7.4) 중의 2 % PFA 및 2% 글루타르알데하이드로 경심관류로 관류되었다 (n=3/군) (Lancaster *et al.*, 2018). 각각의 마우스가 절개되어 그것들의 시신경, 경부 척수 및 소뇌 (충부(vermis))가 분리되었다. 조직은 24시간 동안 사후 고정되었고, 0.1M PB로 헹궈지고, 1시간 동안 0.1M PB 중의 2% OsO_4로 옮겨진 다음, 에폰(Epon)에 임베딩하도록 처리되었다 (Lancaster *et al.*, 2018). 반초박 절편이 잘라졌고 알칼리성 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색되고 광학 현미경 (Lecia DMR) 상호작용 소프트웨어 (Leica Application Suite)를 사용하여 가시화되었다. 매우 얇은 절편(70nm)이 잘라졌고, 납 시트레이트 및 우라닐 아세테이트로 염색되고 Jeol-1010 투과 전자 현미경 (TEM)을 사용하여 이미지화되었다. 100X에서 시신경으로부터 채취된 EM 절편으로부터의 이미지는 Image J 소프트웨어를 사용하여 평가되었고 g-비율 분석을 위해 내부 및 외부 축삭돌기 면적이 측정되었고 이전에 공개된 바와 같이 군 당 n=3으로 동물 당 50개의 축삭돌기에서 정량화되었다 (Lancaster *et al.*, 2018).

[0125] **희돌기교세포 배양:**

[0126] 돌연변이의 세포 자발적 효과는 배양 중인 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 희돌기교세포를 단리시킴으로써 평가되었다. 1차 희돌기교세포 전구 세포 (OPC)는 보충적인 방법에서 기재된 바와 같이 Miltenyl Anti-O4 마이크로비드를 사용하여 출생 후 제P4-P7 일에 피질로부터 단리되었다. O4+ 세포는 24웰 플레이트의 웰 당 20,000개 OPC의 밀도로 평판배양되었다. 세포는 5-7일 동안 증식되었고 그 이후 PDGF 및 bFGF 없이 그리고 Thyroxine T4 (20 μg/ml; Sigma T0397)와 함께 추가로 5일 동안 배지에서 분화되었다. 세포는 4% PFA로 고정되었고 표준 면역화학 프로토콜을 사용하여 염색되었다. 간략히 말하면, 커버슬립은 1X PBS로 2회 세척되고, 0.2% Tx-100으로 투과된 다음 10% 정상 염소 혈청 (NGS) 용액에서 1시간 동안 블로킹되었다. 1차 항체가 5% NGS에서 제조되었고 4℃에서 밤새도록 인큐베이션되었다. 사용된 1차 항체는 희돌기교세포 마커 토끼 Olig2 (1:800; EMD Millipore AB9610), 성숙한 미엘린 마커 Rat PLP (1:1) 및 래트 MBP (1:1) (IDDRC hybridoma, courtesy Dr. Judith Grinspan)였고, 다음 날 PBS에서 3회 세척하고 적절한 2차 형광 항체 (1: 500; 항-래트 IgG Alexa Fluor 488, 항-토끼 IgG Alexa Fluor 647)와 함께 인큐베이션하였다. 세포는 Prolong 금 변색 방지제 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 장착되고 Nikon 현미경을 사용하여 이미지화되며 이미지는 세포 수의 분석을 위해 20X 또는 40X 대물렌즈에서 촬영되었다.

[0127] **피질 뉴런 배양:**

[0128] 돌연변이의 세포 자발적 효과는 배양 중인 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 뉴런을 단리시킴으로써 평가되었다. 1차 피질 뉴런은 이전에 기재된 바와 같이 E15.5 배아로부터 단리되었다 (Guedes-Dias *et al.*, 2019). 간략히 말하면, 피질은 각각의 배아로부터 절개되고 HBSS로 세척된 다음 2.5% 트립신이 각 샘플에 추가되고 37℃에서 7 min 동안 인큐베이션되었다. 트립신이 제거되고 신선하고 따뜻한 HBSS로 4회 세척된 다음 부착 배지 (MEM 배지, 1%나트륨 피루베이트, 1% 말 혈청, 글루코스 및 나트륨 클로라이드)에 재현탁되었다. 세포는 균질한 단일 세포 용액이 될 때까지 피펫을 사용하여 분쇄하였다. 세포는 계수되고 24웰 플레이트의 150,000개 세포/플레이트 및 100,000개 세포/웰의 밀도로 PLL 코팅된 MaTeK 플레이트 (중심에만) 상에 평판배양하였다. 배지는 4시간 후 사전-평형화된 유지 배지 (Neurobasal 배지, 1% 글루타맥스, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 글루코스, 나트륨 클로라이드 및 2% B27 용액)로 교환되었다. 3일 후, 배지 중 20-30%가 제거되고 유사분열 억제자 AraC가 들어있는 신선한 배지가 뉴런에 공급되었다. 24웰 플레이트에 평판배양된 뉴런은 세포 생존 분석, 축삭돌기 및 수상돌기 길이 측정을 위해 평가되었다. 뉴런은 수상돌기 및 세포체/축삭돌기를 각각 라벨링하기 위해 MAP2 (1:200) 및 TuJ1 (1:200)으로 염색되었고 세포 계수 및 축삭돌기 및 수상돌기 길이 측정을 위해 20 X 또는 40 X 대물렌즈로 이미지화되었다. 축삭돌기 및 수상돌기 길이는 FiJi 소프트웨어에서 신경돌기 추적자 플러그인을 사용하여 측정되었다.

[0129] **EB3 역학의 실시간 이미지화**

[0130] 미세관 역학은 EB3-mCherry의 실시간 세포 이미지화에 의해 평가되었으며, 단부-결합 단백질 3 (EB3)은 미세관의 성장하는 양성 단부에 태그된다. 시험관 내 제6 일 (DIV)에, 피질 뉴런은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 EB3-mCherry로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 20-24 h 후, 유지 배지는 2 % B27 및 2 mM GlutaMAX로 보충된 저형광 Hibernate E 이미지화 배지 (BrainBits)로 교환되었다. 뉴런은 Plan Apochromat 60x 1.40 NA 유침용 대물렌즈를 사용하는 Nikon Eclipse Ti 도립 현미경이 구비된 PerkinElmer UltraView Vox Spinning Disk Confocal 시스템에서 37℃에서 환경 챔버에서 이미지화되었다. 이미지는 600초 동안 프레임 당 2초의 프레임 속도로 Volocity 소프트웨어 (PerkinElmer)에 의해 구동되는 Hamamatsu EMCCD C9100-50 카메라로 습득되었다. EB3 역학의 정량화는 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다 (Guedes-Dias *et al.*, 2019). ImageJ 매크로 도구모음 KymoClear가 운동기록기를 생성하는데 사용되었다 (Mangeol *et al.*, 2016). KymoClear 도구모음은 전방, 역행 또는 정지 상태의 구성요소의 자동화된 차별을 허용하는 원래의 운동기록기 상의 Fourier 필터를 거치고 데이터의 정량 분석에 영향을 미치지 않으면서 EB3 코멧의 신호 대 잡음 비(signal-to-noise ratio)를 개선한다. 개개의 EB3 코멧의 트랙(track)은 맞춤형 MATLAB GUI (Kymograph Suite)를 사용하여 수동으로 추적되었고 각각의 코멧의 실행 길이, 실행 시간 및 속도를 결정하는데 사용되었다. 조사자는 이미지 습득 및 운동기록기 분석 동안에 뉴런의 유전자형에 대해서 맹검되었다.

[0131] **통계 분석**

[0132] 모든 그래프 데이터는 평균 ± 표준 오차 평균 (SEM)으로 제공된다. 문맥상 'n'은 달리 지시되지 않는 한 실험당 사용된 마우스의 수를 나타낸다. 걸음걸이 비정상, 정향 반사, 로타로드, 및 중량 측정은 반복된 측정으로 이원 ANOVA에 의해 분석된 후 이어서 사후 투키 테스트로 분석되었다. 그립 강도 및 보행에 대해서, 일원 ANOVA가 사후 투키 테스트와 함께 수행되었다. 생존률은 카플란-메이어 방법에 의해 분석되었고, 군 간의 차이는 게한-브레슬로-윌콕슨 테스트에 의해 추정되었다. 미엘린 정량화, NeuN, ASPA, NG2, Olig2 및 절단된 카스파제 3 수 및 형광 강도의 비교는 다중 비교 사후 투키 테스트와 함께 보통의 이원 ANOVA에 의해 분석되었다. 시험관 내에서 검사된 뉴런 생존, 축삭돌기와 수상돌기 길이 및 OL 마커의 평가는 사후 투키 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 비교되었다. 뉴런의 EB3 역학은 반복된 측정으로 일원 ANOVA 또는 이원 ANOVA를 사용하여 분석되었다. 모든 통계 분석은 Prism 7.0 (GraphPad Software)을 사용하여 수행되었으며 $p<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0133] **마우스 유전자형 분석:**

[0134] 이전에 공개된 HotSHOT 방법을 사용하여 꼬리로부터 DNA 추출을 수행하였다 (Truett *et al.*, 2000). 정방향 프라이머 5'CCGAGAGGAGTTTCCAGACAGACAGGATC3' (서열 번호: 3) 및 역방향 프라이머 5'GCTCTGCACACTTAACATCTGCTCG3' (서열 번호: 4)를 사용하여 541 bp의 PCR 생성물을 증폭시키기 위해 taq-takara 시스템이 사용되었다. 증폭 생성물은 시퀀싱되어 마우스의 유전자형을 확인하였다.

[0135] **행동 기능 테스트:**

[0136] **보행 각도:** 걸음걸이 비정상은 보행/뒷발 각도를 측정함으로써 결정되었다. 보행 각도는 약간의 변형으로 수행되었다 (Feather-Schussler and Ferguson, 2016). 보행 각도는 매주 P7, P14, P21, P28 및 P35에 측정되었다. 새끼가 양발을 바닥에 평평하게 한채로 직선으로 완전한 걸음을 수행할 때만의 데이터를 사용하여 3회의 측정을 수행하였다.

[0137] **보행:** 보행 결함은 약간의 변형과 함께 이전에 기재된 바와 같이 검출되었다 (Feather-Schussler and Ferguson, 2016). 보행 행동 기능은 P7, 10 및 14에 평가되었다. 기어가기 및 걷기의 이들 전략을 기반으로, 발명자들은 트랜스제닉 마우스가 WT 한 배 새끼보다 나중에 기어가기/걷기 기술에 이르는지를 검사하였다. 마우스는 직선으로 걷는 동안 기어가기, 걸음걸이 대칭 및 사지-발 움직임에 대한 단일 시험을 사용하여 점수가 매겨졌다 (도 1 및 표 3).

표 3

[0138]

표 3: 보행 점수	
보행 기술	**점수**
반응 없음	0
비대칭 기어가기	1
대칭 기어가기	2
걷기	3

[0139] **도 1E**에서 예시된 바와 같이, 기어가기 전반에 걸쳐, 전체 뒷발은 (#)로 지정된 땅에 닿고 꼬리는 낮거나 땅에 닿고 있다. 기어가기에서 걷기로 전환될 때, 머리가 올라가기 시작한다. 걷기는 뒷발가락이 땅에 닿고 뒤꿈치가 올라갈 때에만 보이며, [##]로 지정된다 (Feather-Schussler and Ferguson, 2016). 대칭 사지 움직임은 각 단계 중에 두시발이 앞발과 만나고, 각 단계가 다음 단계로 부드럽게 전환되는 것으로 기재되었다. 비대칭 사지 움직임을 나타내는 마우스는 발 위치가 일정하지 않고 한 단계에서 다음 단계로의 전환이 부드럽지 않다.

[0140] **매달리기 그립 강도:** 앞발과 뒷발의 움켜쥐는 능력은 매달리기 그립 강도를 수행함으로써 결정되었다. 매달리기 그립 강도는 Feather-Schussler and Ferguson, 2016, 상기에서 기재된 바와 같이 수행되었다. 시험은 3회 반복되고 평균 각도가 계산되었다. 13" x 9.5" 금속 스크린 철망이 P14에서 매달리기 그립 강도를 수행하는데 사용되었다. 각도기는 새끼가 떨어지는 각도를 측정하기 위해 철망에 평행하게 배치되었다. 마우스는 스크린 위에 배치되고 ~10 sec 동안 이 신규한 환경에 적응시켰다. 스크린은 서서히 180도로 반전되고 새끼가 떨어질 때의 스크린의 대략적인 각도가 기록되었다. 시험은 3회 반복하였고 평균 각도가 계산되었다.

[0141] **정향 반사:** 정향 반사는 마우스 몸통 제어 및 운동 협응을 테스트한다. 정향 반사는 Feather-Schussler and Ferguson, 2016, 상기에서 기재된 바와 같이 수행되었다. 정향 반사 테스트는 매주 P7, P14, P21, P28, P35로부터 수행된 다음 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 운동 장애를 입증했을 때 매일 수행되었다. 3회 시험이 수행되었고 필요한 경우 각 시험에 대해 총 1 min이 주어졌다. 정향 반사 테스트는 매주 P7, 14, 21, 28, 35로부터 수행된 다음 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 운동 장애를 입증했을 때 매일 수행되었다. 마우스는 벤치 패드(bench pad)에 등을 대고 배치되었고 그 위치에 5 sec 동안 유지되었다. 마우스를 풀어주었고 마우스가 평평한 위치까지 되돌아오는데 걸린 시간이 기록되었다. 3회의 시험이 수행되었고 필요한 경우 각 시험에 대해 총 1 min이 주어졌다.

[0142] **로타로드:** 운동 협응, 강도 및 균형이 로타로드 (UGO BASILE S.R.L, Gemonio, Italy)를 사용하여 평가되었다. 훈련 기간 (P21) 이후 3회의 테스트 시험에 대해 회전하는 막대로부터의 낙하 대기 시간이 각 시험에서 기록되었고 평균이 분석에 사용되었다. 진행성 운동 상실을 평가하기 위해서, 로타로드 테스트가 P28 및 P35에 수행되었고, 마우스 연령 간 낙하 대기 시간의 평균이 통계 분석에 사용되었다. 장치에 적응하도록, 제1 일에, 마우스는 5rpm의 일정한 속도로 회전하는 원통형 막대 위에 100sec 동안 배치되었다. 그 다음 날, 마우스는 대략 20분의 시험간 간격으로 3회 시험/일 동안 5에서 30 rpm으로 가속화되는 속도에서 300 초 동안 배치되었다. 제3 일에, 3회의 테스트 시험이 5-30rpm의 가속화 속도에서 300sec 동안 수행되었다.

[0143] **면역조직화학법, 이미지 분석 및 정량화**

[0144] **미엘린 정량화 및 신경사상체 염색:**

[0145] 막연한 절편은 20 min 동안 메탄올 중의 10% 하이드로겐 퍼옥시드로 처리되고 블로킹 완충액 (0.1% Triton-x(Tx)-100이 들어있는 1 x PBS 중의 4% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 1h 동안 블로킹된 다음 동일한 블로킹 완충액 중의 1:500 닭 항-NF (1:500, Aves, cat: NFH)로 4℃에서 밤새도록 처리되었다. 1차 항체 인큐베이션 후, 절편은 비오티닐화된 항-닭 2차 항체 (1:1000, Aves, cat: B-1005)와 함께 1 h 동안 인큐베이션되었고 Elite Avidin Biotin Conjugate (Vector)에 의해 현상되고 DAB 기질로 가시화되었다. 슬라이드는 수돗물로 헹궈지고, 아세톤이 처리되고, 수돗물로 헹군 다음 에리오크롬 시아닌 (Eri-C) 용액에 30 min 동안 함침되었다. 절편은 5% Iron Alum에서 분별되었고, 수돗물로 헹궈지고 보락스 페리시아니드에서 분별되었다. 절편은 탈수되고, 정화되고, 퍼마운트 (Fischer Scientific, USA)와 함께 장착되고 커버슬립이 덮어졌다. 뇌량 및 소뇌에서 미엘린 정량화를 위해서 (마우스 당 3-4개의 절편, PND 14, P21 및 말기에 대해 n= 적어도 3), Keyence BZ-X-700 디지털

현미경에서 명시야 방식으로 이미지가 캡처되었다. 10X 배율에서 캡처된 이미지는 Keyence BZ-X 소프트웨어로 타일링되었다(tiled). 염색된 면적은 Image J 소프트웨어를 이용하여 측정된 다음 전체 백질과 관련이 있었다.

[0146] **NeuN 및 카스파제 계수:** 선조 및 소뇌 절편에 대해 (마우스 당 3-4개의 절편, P14, P21 및 말기에 대해 n=3-4), 이미지는 각각 20X 및 63X에서 캡처되었으며, Leica DM6000B 형광 현미경을 사용하여 1-2 μm 간격으로 z-광학 절편을 사용하였다. Image J 소프트웨어가 DAPI로 염색된 NeuN+ 세포를 계수하는데 사용되었다. 분석은 맹검으로 수행되었고 개수는 프로파일/mm^2로 보고된다.

[0147] **ASPA 및 Olig2/NG2 계수:** 프로토콜은 약간 변형된 이전에 공개된 바에 따른다 (Lee *et al.*, 1985). ASPA 및 NG2+/Olig2+에 대해 라벨링되고 DAPI로 대비염색된 절편이 뇌량에서 ASPA 및 NG2+/Olig2+ 세포의 총 수를 정량화하는데 사용되었다. 모든 이미지는 0.5-1μm 광학 간격으로 z-스택(stack)을 사용함으로써 Olympus 레이저 스캐닝 공초점 현미경에서 40X 유침 렌즈로 캡처되었다. Image J 소프트웨어가 사용되었고 표준화된 샘플 상자 (0.01 mm^2)가 관심있는 영역에 배치되었다. 양성으로 라벨링된 세포는 DAPI 핵과 겹쳐진 ASPA+ 또는 NG2+/Olig2+ 또는 Olig2+ 세포로 확인되었다. 최종 개수는 프로파일/mm^2로 보고된다.

[0148] **형광 밀도 및 면적 정량화:** 형광 양성 면적 및 밀도를 정량화하기 위해서, 이미지는 Leica DM6000B 형광 현미경을 사용하여 10X 배율에서 캡처되었다. Image J 소프트웨어가 사용되었고, 관심있는 면적이 선택되었고, 통합된 영역 밀도 및 명암도가 계산되었다. 다음 공식이 형광도를 계산하는데 사용되었다.

[0149] 수정된 전체 형광도 = 통합 밀도 - (선택된 세포의 면적 X 백그라운드 판독값의 평균 형광도).

[0150] **희돌기교세포 단리:**

[0151] 간략히 말하면, 피질이 미세절개되어 각각의 마우스의 뇌로부터 단리되고 뇌막은 배양물을 오염시키는 것을 방지하기 위해 제거되었다. 피질은 더 작은 조각으로 잘라지고 Neural Dissociation kit (Miltenyl Biotec (P), 130-092-628)를 사용하여 분리되었고, 프로토콜에 따라, 각각의 샘플은 37℃에서 15 min 동안 효소 혼합물 1 (Enzyme P 및 Buffer X)와 함께 인큐베이션되었다. 그 다음에, 효소 혼합물 2가 추가되고 조직은 불-폴리싱된 (fire-polished) Pasteur 피펫을 사용하여 기계적으로 분리되었고 37℃에서 10 min 동안 인큐베이션되었다. 이 과정은 단일 세포 용액을 얻기 위해 2회 반복되었으며 이것은 70 μm 거르개(strainer)에 적용되고 300xg에서 10 min 동안 원심분리되었다. 세포 펠릿은 0.5% 소 혈청 알부민을 함유하는 PBS 완충액 (pH 7.2) 90 μl에서 재현탁되었다. 항-O4 마이크로비드 10 μl가 세포 펠릿에 추가되었고, 혼합되고 냉장고에서 15 min 동안 인큐베이션되었다. 세포는 완충액 1-2 ml로 세척되고 300xg에서 10 min 동안 원심분리되었다. 상층액이 빨아내어지고, 세포는 완충액 500 μl에서 재현탁되었다. MS MACS 컬럼은 자기장에 배치되고 완충액 500 μl로 헹군 다음 세포 현탁액이 자기 컬럼에 적용되었다. 라벨링되지 않은 세포를 함유하는 통과액(flow-through)이 수거되고 컬럼은 완충액 500 μl로 3회 헹궈졌다. 컬럼은 분리기로부터 제거되고 적합한 수거 튜브에 배치되며, 적절한 양의 배지가 적용되고 플런저(plunger)를 컬럼으로 밀어넣음으로써 즉시 씻어내려진다. 이 분획은 $O4^+$ 세포이며 2% B27, 1% 페니실린 스트렙토마이신, 1% 글루타민 및 성장 인자 인간 bFGF (100 μg/ml; R&D 233-FB/CF), 인간 PDGF-AA (100 μg/ml; Peprotech 100-13A) 및 인간 NT3 (100 μg/ml; Peprotech 450-03)와 함께 신경 기초 배지를 함유하는 배지에서 현탁되었다.

[0152] **안티센스 올리고뉴클레오타이드 합성**

[0153] 11개의 ASO가 통합 DNA 기술에 의해 합성되었다. 발명자들은 최고의 ASO 디자인을 확인하기 위해 이들 ASO의 시험관 내 스크리닝을 수행하였다. 마우스 Oli-neu 세포는 NEPA21 전기천공 시스템 (NEPA GENE, USA)에서 100,000개 세포/웰을 갖는 100 μL 배지에서 150 V에서 1μM, 5μM 및 10μM의 ASO 농도로 전기천공되었다. 전기천공법 이후, 세포는 폴리-L-오르니틴 코팅된 플레이트로 옮겨지고 인큐베이터 내에 배치되었다. 처리 48시간 후, 세포는 PBS로 세척된 다음 RNA 추출은 제조사의 지시에 따라 PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Cat: 12183018A)를 사용하여 수행되었다. DNAase (Invitrogen)로 처리 후, RNA 200ng이 SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific, Cat: 18091200)을 이용하여 cDNA에 사용되었다. *Tubb4a*, 및 참조로서 스팔라이싱 인자, 아르기닌/세린-풍부 9 (*sfrs9*)를 암호화하는 내인성 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)의 mRNA 발현 수준은 Applied Biosystems Quanta Flex 7 (ThermoFisher Scientific, USA)에서 실시간 PCR 분석 (Taqman chemistry)을 사용하여 정량화되었다. 결과는 ΔΔCT 방법을 사용하여 분석되었다.

[0154] 다음 실시예는 본 발명의 특정 구체예를 예시하기 위해 제공된다. 그것들은 어떠한 방법으로도 본 발명을 제한하려는 의도가 없다.

[0155] **실시예 I**

[0156] **H-ABC 질환의 마우스 모델**

[0157] 본 실시예에서, 발명자들은 H-ABC의 모델로서 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 돌연변이를 가진 넉인 마우스의 생성을 기재하며, 이것은 이긴장증, 운동 기능 상실 및 걸음걸이 비정상을 포함한 인간 질환의 특징을 개괄한다. 마우스 모델의 조직병리학적 특징은 환자 조직에서 관찰된 바와 같이 뇌 및 척수에서의 저미엘린 형성과 함께 선조체 및 소뇌에서의 뉴런 상실을 포함한다 (Curiel *et al.*, 2017b). 발명자들은 또한 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스를 사용하여 뉴런 및 희돌기교세포에서 *Tubb4a* 돌연변이의 미세관 폴리머화 및 세포-자발적 역할에 대한 돌연변이 튜불린의 기능적 중요성을 탐구하였다. 이 연구는 가장 빈번하게 발생하는 돌연변이를 사용하여, 이 파괴적인 질환 및 발달하는 요법의 기저를 이루는 메커니즘을 이해하는데 있어서 핵심적인, H-ABC에 대한 유망한 최초 모델을 제공한다.

[0158] ***Tubb4a***^{D249N} **CRISPR 넉인 마우스의 생성**

[0159] p.Asp249Asn (p.745G>A) 돌연변이를 가진 고전적인 H-ABC의 분자적 메커니즘 및 질환의 과정을 이해하기 위해서, CRISPR을 사용하여 넉인 마우스 모델 *Tubb4a*^{D249N}을 생성하였다. 또한, 이들 *Tubb4a*^{D249N} 마우스를 교배하여 동형접합성 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 콜로니를 얻었다 (**도 1A**). H-ABC로 영향을 받은 개체에서 이형접합성 돌연변이에도 불구하고 *Tubb4a* 돌연변이 (13)의 설치류 모델에서 표현형의 초기 발현을 위해 이전에 요구된 동형접합성 발현과 유사하게, 동형접합성 마우스를 *Tubb4a*^{D249N} 마우스와 병행하여 연구하였다.

[0160] ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 초기 질환 발생 및 감소된 생존을 입증한다**

[0161] *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 표현형을 결정하기 위해서, 마우스를 출생 후 매일 검사하였다. 출생에서부터, 출생일 후 (P) 8일까지, WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 발달에 관하여 유사한 것으로 보인다. 하지만, ~P9까지, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 떨리는 행동 기능을 나타내기 시작한다. 이 표현형은 나이에 따라 진행성으로 악화되고 마우스는 시간이 흐름에 따라 극심하게 실조성 및 근긴장이상성이 된다. ~P35-P40까지 마우스는 스스로 음식을 섭취할 수 없으며, 느린 정향 능력(righting ability)을 나타내고 이 시점을 "말기" (특별 종점(compassionate end-point))라고 기재한다 ($p<0.001$, **도 1B 및 1C**). 추가적으로, 체중 측정은 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 P35에서부터 점진적인 체중 감소를 나타내기 시작한다는 것을 나타내며 *Tubb4a*^{D249N} (18.57 ± 0.38) 및 WT (17.44 ± 0.43) 마우스와 비교하여 ~P37에서 유의하게 감소하였다 (15.02 ± 0.67) ($p<0.001$, **도 1L**).

[0162] *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 정상적인 것으로 보이고 어떠한 분명한 행동 기능 표현형을 나타내지 않는다. *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 WT 한 배 새끼와 비교하여 유사한 생존을 나타내고 주로 고령으로 인해 사망한다 (카플란-메이어 생존 곡선, **도 2A**).

[0163] ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 걸음걸이 비정상을 나타낸다**

[0164] H-ABC에 의해 영향을 받은 개체가 지연된 보행, 운동 실조, 걸음걸이 비정상 및 진행성 운동 기능 장애를 나타낸다는 것을 고려하면, 발명자들은 마우스가 H-ABC 행동 기능 표현형을 유사하게 요약하는지 여부를 알기 위해 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에 대한 포괄적인 행동 기능 분석을 수행하기로 결정하였다 (**도 1D**) (1, 10, 20).

[0165] *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 비정상적인 걸음걸이를 나타내는지 여부를 조사하기 위해서, 보행 각도 또는 뒷발 각도를 결정하였다. P14에서 시작하여, *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 보행 각도의 결손 없이 걷는 한편 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 WT 한 배 새끼와 비교하여 훨씬 더 넓은 보행 각도를 나타낸다 ($p<0.001$, **도 1G 및 1H**; P14 - 71.82 ± 4.26 vs 43.16 ± 2.46, P21- 84.00 ± 7.56 vs 61.96 ± 2.93 및 P35 - 81.03 ± 5.37 vs

52.66 ± 1.87). *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 넓은 보행 각도는 이들 연령에서 볼 수 있는 걸음걸이 불안정과 일치하며, 걸음걸이를 안정화시키고 균형 및 조정을 지원하도록 새끼 및 성체가 뒷발 각도를 증가시킬 필요가 있기 때문이다 (14).

[0166] WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서, 마우스가 기어가기에서 걷기로 전환될 때, 초기 발달 시점에서 보행을 평가하였다 (보행 점수에 대해서 표 3 참조). P7에서, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 WT 대조군과 유사한 비대칭 기어가기를 나타낸다 (**도 1E**). P10까지, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 더 어린 새끼에서 볼 수 있는 바와 같이 여전히 기어가는 걸음걸이와 함께 비대칭 사지 움직임을 나타내고, 추가적으로 WT 한 배 새끼 대조군에 비해 떨림을 나타내지만 (P10 - 1.20 ± 0.13 vs 2.20 ± 0.25) ($p<0.05$, **도 1E 및 1F**) *Tubb4a*^{D249N}은 기어가기/걷기 걸음걸이와 함께 더 대칭인 사지 움직임을 나타낸다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스를 포함한 모든 마우스는 P14까지 걷기 기술을 성취하지만, 동형접합성 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 여전히 계속해서 떨림을 나타낸다.

[0167] ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 진행성 운동 기능 장애를 나타낸다**

[0168] *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스가 운동 발달의 추가적인 결손을 나타내는지 여부를 평가하기 위해서, 그것들의 움켜쥐는 능력을 P14에서 매달리기 그립 강도를 수행하여 결정하였다. 4개의 발 모두를 이용하여 움켜쥐는 것은 마우스가 고르지 않은 표면을 기어오르고 달리기 위해 필수적이며 (14) 움켜쥠 강도의 불량한 수행 능력은 마우스가 손상된 운동 능력을 가진다는 것을 나타낸다. *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 WT 한 배 새끼와 비교하여 유사한 움켜쥠 강도를 나타내는 한편, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 WT보다 훨씬 더 작은 각도로 떨어진다 (86.40 ± 2.51 vs 103.9 ± 1.84; $p<0.001$, **도 1I 및 1J**).

[0169] 질환이 진행성인지 및 어린 마우스에서 *Tubb4a*의 돌연변이가 협응 및 균형에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해서, 발명자들은 P21, P28 및 P35에서 로타로드에 대한 이들 마우스의 수행 능력을 평가하였다. WT 한 배 새끼와 비교하여 이형접합성 *Tubb4a*^{D249N} 마우스의 수행 능력 (초 단위의 낙하 대기 시간에 의해 측정됨) 간에 유의한 차이가 없었지만, 동형접합성 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 P21 (107.1 ± 7.58 vs 213.8 ± 15.16 secs), P28 (101.0 ± 10.30 vs 239.0 ± 10.76 secs) 및 P35 (20.69 ± 6.71 vs 257.9 ± 11.40 secs)에서 가속화 로타로드 상에서 더 짧은 기간의 낙하 대기 시간을 나타내며 시간이 흐름에 따라 진행성으로 악화된다 ($p<0.001$, **도 1K**).

[0170] *Tubb4a*^{D249N} 마우스가 말기에 행동 기능 결손을 발달시키는지 여부를 테스트하기 위해서, 로타로드 테스트를 9개월령 및 1연령에 수행하였고 WT 마우스에 비해 어떠한 변화도 나타나지 않았다 (**도 2B**).

[0171] 마지막으로, 정향 반사를 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 P7부터 P35까지 매주 평가한 후 이어서, P35부터 말기까지 매일 평가하였다. 표면 정향 능력은 마우스 몸통 제어 및 협응 능력을 테스트한다 (14). 추가적으로, 스스로를 바로잡는 능력은 자가 관리 및 영양 공급에 필요하고 이 연구에서 윤리적 종점으로 사용된다 (21, 22). P14까지, 모든 마우스는 스스로를 즉시 교정할 수 있었지만, 제38 일 이후, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 WT 한 배 새끼와 비교하여 상당한 손상된 정향 능력을 나타낸다 ($p<0.001$, **도 1L**).

[0172] ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 미엘린화의 극심한 발달적 지연을 나타내고** ***Tubb4a***^{D249N} **및** ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 둘 다 궁극적으로 미엘린화의 손실을 나타낸다**

[0173] *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 전형적으로 H-ABC에 의해 영향을 받은 개체에서 볼 수 있는 미엘린 비정상을 요약하고 (3, 10) *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 미엘린의 발달적 또는 퇴행성 손실을 나타낸다. 마우스에서 미엘린화는 출생시 척수에서 시작하고 P21까지 거의 성체의 패턴을 갖는다 (23). *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 P14 및 P21에 뇌량 및 소뇌에서 WT 한 배 새끼에 비해 면역조직화학법 (Eri-C)에 의해 측정된 바와 같이 전형적인 미엘린 발달의 극심한 결핍을 나타낸다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 말기까지 이전에 달성된 미엘린화의 손실과 함께 (뇌량 - 0.053 ± 0.004 vs 0.948 ± 0.009 및 소뇌에 대해 - 0.037 ± 0.001 vs 0.854 ± ± 33)

(p<0.001, **도 3C-3F**) 미엘린화의 초기 지연을 나타낸다 (P14 - p<0.001, P21 - p<0.001, **도 6B**). *Tubb4a*^{D249N} 마우스에서 미엘린 표현형의 추후 발생을 평가하기 위해, Eri-C 염색을 1연령에 실행하였으며, 감소된 미엘린 염색을 나타낸다 (p<0.001, **도 3G 및 3H**).

[0174] 추가적으로, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 면역염색에 의해 주요 미엘린 단백질의 부재를 나타낸다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서, P14에 뇌량 및 소뇌에서 MBP 및 PLP 발현은 변하지 않지만 (**도 6C-6G**), 뇌량 (p<0.001, **도 3K-3L 및 도 3S-3T**; PLP - 27.99 ± 3.02 vs 113.46 ± 16.18 및 MBP - 25.73 ± 3.42 vs 92.40 ± 5.76) 및 소뇌 (p<0.001, **도 3O-3P 및 도 3W-3X**; PLP - 11.11 ± 1.17 vs 58.90 ± 8.19 및 MBP - 12.65 ± 2.98 vs 69.79 ± 1.20)의 말기 및 P21 (p<0.001, 도 **8C-8G**)까지 크게 감소된다. *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 P21 및 말기에 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 뇌량 및 소뇌에서 WT와 비슷한 MBP 및 PLP 발현을 나타낸다. 하지만, 1년까지, *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 WT와 비교하여 감소된 수준의 PLP (p<0.05, **도 2C-2D**) 및 MBP (p<0.05, **도 3I-3J**)를 나타낸다.

[0175] P21 (p<0.05) 및 말기 (p<0.001)에 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 전뇌 (PLP - 0.286 ± 0.08 vs 1.101 ± 0.01, **도 3M-3N** 및 MBP -0.605 ± 0.06 vs 2.615 ± 0.09, **도 3U-3V**) 및 소뇌 (PLP - 0.123 ± 0.03 vs 0.860 ± 0.12, **도 3Q-3R** 및 MBP - 1.307 ± 0.178 vs 2.306 ± 0.14, **도 3Y-3Z**)에서의 웨스턴 블롯을 사용하여 PLP 및 MBP 수준의 유사한 감소가 검출된다.

[0176] **_Tubb4a_$^{D249N/D249N}$ 마우스는 희돌기교세포의 극심한 손실을 나타낸다**

[0177] *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$에서 미엘린 형성의 발달적 및 퇴행성 비정상 둘 다를 고려하여, 발명자들은 희돌기교세포 (OL) 및 희돌기교세포 전구 세포 (OPC) 수를 둘 다 평가하였다 (23). OL을 P14, P21 및 말기에 뇌량에서 OL의 마커인 ASPA를 사용하여 면역염색 수로 검사하였다.

[0178] P14, P21 및 말기에 (**도 7C-D**), ASPA 양성 OL의 수는 뇌량에서 WT 한 배 새끼와 비교하여 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 크게 감소하였다 (p<0.001, 166 ± 32.34 vs 681 ± 38.45). OPC의 수의 변화가 있는지 여부를 평가하기 위해서, 발명자들은 뇌량에서 이중 양성 NG2+ Olig2+ (팬(pan) OL 계통 마커) 세포를 계수하였다. NG2+ Olig2+ 수는 P14, P21 (**도 12A-B**) 및 말기 (**도 7E-F**)에 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 변하지 않았다. 추가적으로, Olig2+ 세포 수는 P14, P21 및 말기 시점에 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 비슷하며 (**도 12C-E**) 모든 OL 계통 세포의 수의 변화가 없음을 시사한다.

[0179] OL 계통 세포가 세포 아폽토시스를 거치는 중인지 여부를 검사하기 위해, 이중 면역염색을 세포 아폽토시스 마커인 카스파제 및 OL 계통 마커인 Olig2로 수행하였다. 발명자들은 P14, P21 (**도 15A-D**) 및 말기 (p<0.001, **도 7G-H**)에 *Tubb4A*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 뇌량에서 이중 양성 카스파제 및 OL (ASPA) 세포 수의 상당한 진행성 증가를 발견하였다. OPC 및 Olig2 세포 수는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 해를 입지 않기 때문에, 발명자들은 Tubb4a의 돌연변이가 성숙한 IL에 대해 독성 효과를 유발하여 성숙한 OL의 손실을 발생시킬 가능성이 가장 클 것으로 추측할 수 있다.

[0180] **초미세구조 분석은 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 미엘린화 결손과 연관성이 있다**

[0181] 시신경 절편의 전자 현미경 시험은 WT 대조군 마우스와 비교하여 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 미엘린화되지 않은 축삭돌기 및 저미엘린 형성된 축삭돌기에 대한 증거를 나타내며 P21에 시작하여 (데이터 미도시) 말기까지 악화되고 (**도 5A-3C 및 5H-5J**) 별표로 나타난 바와 같이 특히 더 높은 배율에서 분명하였다 (**도 5J**). 이에 더하여, 대식 세포에 의해 삼켜진 소포성(vacuolated) 및 퇴행성 축삭돌기 (파란색 별표)를 말기에서 Tubb*4a*$^{D249N/D249N}$ 조직에서 관찰하였다 (**도 5D**). 흥미롭게도, 축삭돌기의 미엘린 두께를 측정하는 g-비율은 WT 마우스 (**도 5E**, 0.802 ± 0.005)와 비교하여 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (p<0.001; 0.914 ± 0.004), 뿐만 아니라 *Tubb4a*^{D249N} 시신경 (p<0.001; 0.859 ± 0.006)에서도 상당히 상이하다. 축삭돌기 직경의 함수로서 g-비율을 플롯팅함으로써 측정된 미엘린 두께의 정량화 (**도 5F**)는 수초 발달이 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 정지된다는 것을 나타낸다. 또한, 대조군 마우스 (0.945 ± 0.024)와 비교하여, 축삭돌기 직경(caliber)의 상당한 감소가

Tubb4a$^{D249N/D249N}$ 시신경 조직 (**도 5G**, p<0.05; 0.87 ± 0.034)에서 나타나며 말기에 Tubb*4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 더 큰 축삭돌기의 손실을 나타낸다. 척수의 TEM 절편은 또한 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (**도 4A-4F**)에서 복측 백질에서 미엘린의 극적인 손실을 나타내며 축삭돌기가 대식 세포에 의해 계속해서 삼켜진다 (**도 4F**). 하지만, 상이한 군 사이에서 척수의 전각(ventral horn)에서 큰 운동 뉴런의 손실이 검사되지 않았다 (데이터 미도시).

[0182] ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$ **마우스는 말기에 선조체 및 소뇌에서 신경 손실을 입증한다.**

[0183] H-ABC에 의해 영향을 받은 개체로부터의 병리학적 표본은 기저핵 및 소뇌 과립 세포층에서 신경 손실을 입증한다 (4, 10). *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 P14 (**도 14A**), P21 및 말기 (**도 9C**)에 선조체 및 소뇌에서 NeuN으로의 면역 염색 및 니슬 염색에 의해 신경 손실의 징후를 나타낸다.

[0184] P14 및 P21 시점에 (**도 14D**), *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$에 대한 선조체에서 NeuN 수는 WT 대조군과 비슷하지만, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 말기에 유의한 선조 신경 손실 (p<0.01, **도 9J**; 183 ± 8.44 vs 246 ± 28.51)을 입증한다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 소뇌 절편 상에서 니슬 염색은 P21에서 말기까지 과립 뉴런층의 극심한 진행성 손실 및 소뇌 부피의 현저한 감소를 나타낸다 (**도 9C**). *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 P14에서 WT 마우스와 비교하여 비슷한 과립 뉴런 수를 나타내지만 (**도 14B**), 극적이고 진행성인 과립 뉴런 손실이 P21 (212 ± 6.71 vs 312 ± 4.30) 및 말기 (p<0.001, **도 9D-E**; 57 ± 4.7 vs 262 ± 14.85)에 관찰된다. 이에 더하여, NeuN과 공존하는 카스파제 3 양성 세포의 수의 유의한 증가가 P21 (11 ± 3.99 vs 0.3 ± 0.16) 및 말기 (13.5 ± 0.38 vs 0.75 ± 0.38)에 일어나며, 세포 아폽토시스를 시사한다 (p<0.001, **도 9F-G**). 또한, 소뇌에서 다른 뉴런 집단의 손실이 있는지 여부를 평가하기 위해서, 발명자들은 칼빈딘 면역염색에 의해 푸르키네 뉴런을 평가하였지만, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 및 WT 마우스 (**도 14C 및 14D**)는 유사하였다.

[0185] **희돌기교세포에서 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 돌연변이의 세포-자발적 효과**

[0186] 발명자들은 WT 대조군, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 유래된 시험관 내 배양물을 사용하여 OL에서 *Tubb4a* 돌연변이의 세포 자발적 효과를 연구하였다. O4+ (사전 미엘린화 마커) OPC를 이들 마우스로부터 단리시킨 다음 OL 운명에 대해 분화시켰다. 세포를 Olig2, 팬 OL 계통 마커와 공존하는 성숙한 OL에 대한 마커로서 PLP에 대해 검사하였다. 성숙한 PLP+ OL의 수의 유의한 감소를 WT 마우스로부터 유래된 성숙한 OL (**도 11E**)과 비교하여 *Tubb4a*^{D249N} 마우스 (p<0.05, 72.12 % ± 8.99) 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (p<0.01, 55.23 % ± 4.97)에서 검사하였다 (**도 11A-C**). 하지만, Olig2+ 세포의 총수는 모든 군에서 유사하며 (**도 11D**), WT 마우스 (p<0.05, 90.5 % ± 14.18)와 비교하여 *Tubb4a*^{D249N} (p<0.05, 55.34 % ± 6.83) 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 (p<0.05, 56.04 % ± 5.39)에서 OL 계통 (PLP+/Olig2 세포, **도 11F**)에 할당된 모든 세포로부터 성숙한 OL의 비율의 유의한 감소를 초래한다. 이들 결과는 종합적으로 마우스 조직에서 생체 내에서 볼 수 있는 바와 유사한 변화를 반영하고 OL 계통 세포의 발달에 있어서 *Tubb4a*^{D249N} 돌연변이의 세포 자발적 기여를 지지한다.

[0187] **뉴런에서 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 돌연변이의 세포-자발적 효과**

[0188] 발명자들은 또한 WT 대조군, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 유래된 시험관 내 배양물을 사용하여 피질 뉴런에서 *Tubb4a* 돌연변이의 세포 자발적 효과를 검사하였다. 발명자들은 생존 분석을 위해 평판배양 후 1주에 Tuj1 및 MAP2 염색으로 라벨링된 뉴런의 수를 분석하고 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런이 WT 뉴런에 비해 생존의 유의한 감소를 나타낸다는 것을 관찰하였다 (**도 11G, 6H, 6I**, p<0.01; 69.53 % ± 4.8). *Tubb4a*^{D249N} 뉴런은 WT 뉴런과 비교하여 뉴런 생존의 차이를 나타내지 않았다. 그 다음에, 뉴런의 건강 및 형태가 축삭돌기 파생물 및 수상돌기 분기에 대한 튜불린 돌연변이의 영향으로 인해 변화되는지를 평가하였다. *Tubb4a*^{D249N} 마우스의 뉴런에서 축삭돌기의 길이는 WT 뉴런과 비교하여 더 짧고 (**도 11J**, 155.8 ± 24.42 μm 대 187.5 ± 23.29 μm) WT 신경 돌기 길이보다 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런에서 훨씬 더 짧다 (p<0.05, 117.7 ± 10.18 μm). 유사하게, 발명자들은 뉴런에서 수상돌기 분기를 조사하였고 (**도 11K**) *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런에서 전체 수상돌기 길이가 WT 뉴런과 비교하여

훨씬 더 짧다는 것을 관찰하였으며 ($p<0.001$, 27.43 ± 1.53 μm 대 41.26 ± 4.01 μm) *Tubb4a*^{D249N} 뉴런에서 유의한 변화가 없다 (31.31 ± 3.81 μm). 이들 형태학 연구는 H-ABC 관련된 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$이 뉴런 구조 및 형성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0189] ***Tubb4a***^{D249N} **및** ***Tubb4a***$^{D249N/D249N}$**은 뉴런에서 불안정한 미세관 역학으로 이어진다**

[0190] 형태학 연구에 더하여, 발명자들은 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 유래된 피질 뉴런에서 *Tubb4a* 돌연변이가 미세관 (MT) 역학에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해 기능 연구를 실행하였다. 뉴런을 MT 플러스 단부 결합 단백질 EB3-mCherry로 트랜스펙션하여 평판배양 후 1주에 MT의 성장 단부를 이미지화하였다. 운동기록기를 저속 촬영 비디오로부터 생성하여 원위의 축삭돌기에서 EB3 코멧을 평가하였다 (**도 13A**). EB3 코멧의 수는 WT, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 뉴런에서 유의하게 상이하지 않지만 (**도 13B**), 흥미롭게도 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런은 EB3 코멧의 발현 수가 높고 낮은 별개의 집단을 나타낸다 (**도 13C**). 뉴런에서 EB3 코멧의 전체적인 속도는 상이한 군 사이에서 상당히 유사하며 (**도 13D**; WT-0.25 ± 0.049 μm/s, *Tubb4a*^{D249N} -0.241 ± 0.055 μm/s, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ -0.254 ± 0.066 μm/s) 유사한 폴리머화 속도를 나타낸다.

[0191] *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런에서 이들 EB3 코멧에 대한 평균 실행 시간 (**도 13E**)은 WT 뉴런 (29.67 ± 0.79 secs) 및 *Tubb4a*^{D249N} 뉴런 (28.55 ± 0.58 secs)과 비교하여 훨씬 더 짧다 ($p<0.001$, 24.86 ± 0.59 secs). 유사하게, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런 (6.0 ± 0.146 μm) 및 *Tubb4a*^{D249N} 뉴런 (6.7 ± 0.14 μm)에서 EB3 코멧의 평균 실행 길이는 WT 뉴런보다 훨씬 더 짧다 (7.20 ± 0.19 μm, $p<0.001$, **도 13F**). 따라서, MT 역학은 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 뉴런에서 극적이고 유의하게 변화되며 *Tubb4a* 유전자에서 돌연변이의 존재로 인한 뉴런 내 기능적 세포 자발적 효과를 확인한다.

[0192] **논의:**

[0193] 본원에서 기재된 마우스 모델은 H-ABC의 행동 기능 표현형 특징을 요약하고 운동 기능 및 걸음걸이의 결손을 나타낸다. 발명자들은 미엘린의 발달적 손실, 중증 소뇌 위축증 및 선조 신경 손실을 포함한 H-ABC의 홀마크 (hallmark) 병리학을 포함하는 이 모델의 조직학적 표현형을 추가로 검증하였다.

[0194] *TUBB4A* 돌연변이는 2013년에 H-ABC와 연관되었기 때문에 (24), *TUBB4A* 유전자의 많은 다른 돌연변이가 확인되었다 (10, 20). p.Asp249Asn (D249N) 변이체는 H-ABC의 고전적인 특징과 밀접하게 관련이 있으며, 다른 돌연변이와 관련된 더 광범위한 표현형을 갖는다. 불행하게도, 지금까지, 이용 가능한 치료적 접근법이 없다. *taeip* 래트 모델은 *Tubb4a* 돌연변이 (동형접합성 p.Ala302Thr)를 가지고 있는 것으로 보고되었지만, 그 모델은 소뇌 및 선조 위축증이 결여된다 (13, 25). 이 연구에서, 발명자들은 고전적인 돌연변이의 Crispr-Cas9 트랜스제닉 모델 (*Tubb4a*^{D249N})을 발전시켜 완전한 모델 H-ABC를 찾았다. 특히, 이 접근법은 표 1에서 나열된 돌연변이된 *Tubb4A*를 암호화하는 핵산 중 어느 것에도 적용될 수 있다. 동형접합성 마우스는, *taeip* 래트에서와 같이, 초기 발생 표현형을 나타내는데 필요하지만, 인간에 존재하는 것과 같은 이형접합성 돌연변이는 또한 후기 발생 질환을 나타낸다. 종 차이에 대한 하나의 가능성이 있는 설명은 투약량 민감도이며, 표현형의 다른 침투도를 초래한다. 이것은 *taiep* 래트 모델에 대해 보고되었고 (13); 이에 더하여, *GATA3* (26), *TBX1* (27), *GLI3* (28)와 같은 여러 다른 보고된 유전자들이 존재하며, 이형접합성 돌연변이는 인간에 존재하지만 동형접합성 마우스는 인간 질환과 유사한 표현형 발현을 나타낸다.

[0195] *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 ~P9에 시작하여 떨림 행동을 나타내고 운동-발달 기술의 결손 및 소뇌 운동 실조와 일치하는 걸음걸이 및 H-ABC 영향을 받은 개체에서 볼 수 있는 경련을 나타낸다. 시간이 흐름에 따라, 이긴장증의 발생과 일치하게 운동 기능이 극심하게 감소한다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 ~P37에서 체중 및 생존의 유의한 감소를 나타내는데 아마도 극심한 이긴장증 및 뇌성마비성 운동 실조로 인해 스스로 먹을 수 없기 때문일 것이다. 이형접합성 *Tubb4a*^{D249N} 마우스는 동형접합성 대응물에서 보이는 극심한 행동 기능 및 신경병리학적 표현형의 초기 증거를 나타내지 않지만, 1년에 인식 가능한 행동 기능 표현형 없이 미엘린 손실을 나타낸다.

[0196] 신경병리학에서, *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 감소되고 진행성인 미엘린의 발달 손실을 입증하며, 시간이 흐름에 따

라 혼합된 저미엘린 형성 및 미엘린 형성 장애와 일치하고, 이것은 *Shiverer* (29), *Shimild* (30) 및 *Jimpy* 마우스 (31)에서 볼 수 있는 바와 같이 초기 발생 경련에 기여할 수 있다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 P14에 극심한 희돌기교세포 (OL) 손실을 나타낸다. 미엘린 손실은 조직학을 기반으로 하는 OL의 감소된 수로 입증되기 때문에 아마도 OL 사멸에 기인할 것이다. 추가적으로, OL (11) 및 카스파제 염색시 Tubb4a의 높은 발현을 기반으로, 발명자들은 *Tubb4a*의 돌연변이가 OL 사멸에 기여한다는 것을 제안한다. OPC 수는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 보존되는 것으로 보이며 *Tubb4a*의 돌연변이가 또한 OPC로부터 OL의 분화에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다. 종합해보면, 이들 메커니즘 둘 다는 이 모델에서 보이는 조합된 저미엘린 형성 및 미엘린 형성 장애에 기여한다. *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 또한 P21에 소뇌 과립 뉴런의 심각한 손실 및 ~P37 이후 상당한 선조 뉴런 변성의 증거를 나타낸다. 이것은 H-ABC에 의해 영향을 받은 개체에서 보고된 병리학과 일치한다 (9, 32). 하지만, 푸르키네 뉴런은 지극히 온전한 것으로 보인다. 시간이 흐름에 따른 급격한 소뇌 변화는 이 마우스 모델 및 영향을 받은 개체 둘 다에서 보이는 진행성 걸음걸이 비정상, 운동 실조 및 운동 기능 장애의 기초가 될 수 있다. 선조 뉴런에서 약간 가벼운 결함은 Tubb4a의 가변적인 발현과 관련이 있을 수 있으며, Tubb4a 발현은 선조체보다 소뇌에서 비교적 더 높다 (2). 증가된 수의 *TUBB4A* 돌연변이가 보고됨에 따라 (9, 33, 34), 선조체, 미엘린화 세포 및 소뇌의 독립적인 관여와 함께 돌연변이 특이적 세포 효과는 이 병태에서 보이는 광범위한 표현형의 가변성의 원인이 될 수 있다는 것이 인정된다 (4, 9).

[0197] *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스는 H-ABC에서 영향을 받은 관련된 세포 하위유형의 분자적 분석을 충분히 가능하게 하기 위한 제1 모델을 제공한다. 뉴런 및 OL에서 관찰된 세포 효과는 독립적인 기여로서 발생할 수 있거나 이것들은 부가적인 비-세포 자발적 효과일 수 있다. 각각의 세포 집단의 취약성을 검사하는 것은 H-ABC에 걸린 개체에 효과적인 치료 옵션을 개발하는데 중요할 것이다.

[0198] 이것을 분석하기 위해, 발명자들은 환원주의자 세포 배양 모델을 사용하여 세포 자발적 효과를 연구하였다. *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스로부터 단리된 OPC는 WT 대조군 마우스와 반대로 덜 효율적으로 IL로 분화되며, OL에서 *Tubb4a*^{D249N}의 세포 자발적 효과를 확인하고, 생체 내에서 관찰된 저미엘린 형성 및 미엘린 형성 장애에서 반영된다. Olig2 라벨링된 세포의 총 수는 유사하지만 성숙한 OL의 수는 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 감소되기 때문에, 이것은 *Tubb4a* 돌연변이로 인한 성숙한 OL 운명으로의 OPC의 분화의 결손을 나타낸다. *Tubb4a* 돌연변이의 비-세포 자발적 효과의 추가의 서술은 조건부 트랜스제닉 마우스 모델을 사용하여 전체 유전자 탐구를 필요로 할 것이다.

[0199] *TUBB4A* 돌연변이로 인한 미세관 (MT) 기능 장애 및 관련된 OL 성숙화에 대한 일부 증거가 *taeip* 래트 모델에서 실행된 연구로부터 나온다. *taeip* 래트는 PLP, MAG 및 MBP 미엘린 유전자에 대한 RNA의 핵 주위 국소화와 함께 OL에서 미세관 축적을 나타내고 이것은 MBP 트래피킹에 대해 OL에서 운동 단백질 디네인의 증가된 활성에 더 기인하였다 (35). 이들 핵심 미엘린 단백질은 미엘린 합성을 위해 MT를 따라 OL 세포체로부터 주변부로 수송될 필요가 있다. OL 과정 및 수초 발달의 복잡함을 고려하면, MT를 따라 카고(cargo)의 비효율적인 전달이 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ OL의 감소된 성숙화 및 복잡함에 기여하는 것으로 예견될 수 있다.

[0200] 뉴런의 세포 자발적 효과를 분석하기 위해서, 발명자들은 유사하게 *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 배양물에서 피질 뉴런을 연구하였으며, 감소된 생존 및 저해된 축삭돌기 및 수상돌기 분기를 입증한다. 기능적 연구에서는 MT 플러스 단부에서 폴리머화의 더 짧은 거리 및 시간이 나타났으며, *Tubb4a*^{D249N} 및 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 돌연변이를 가지고 있는 뉴런에서 불안정한 MT 역학을 나타낸다. MT는 뉴런 구조, 극성, 성장 원뿔 역학, 세포 내 수송에 기여하는 뉴런 발달 및 기능에 필수적이고 (36) 돌연변이 Tubb4a 단백질은 잠재적으로 이들 핵심 기능에 영향을 미친다. α-튜불린 및 β-튜불린에서 많은 돌연변이는 뉴런 이동, 분화 및 축삭돌기 유도의 결손을 특징으로 하는 광범위한 신경학적 장애에 기인한다 (37-39). 발명자들의 연구와 유사하게, 마우스 피질 뉴런 및 효모에서 *Tubb3* 돌연변이는 변화된 MT 역학을 나타냈고 키네신 운동과의 MT의 상호작용을 방해하였다 (40). 파킨슨 병(Parkinson's disease) (41) 및 ALS (42)에서의 연구는 변화된 MT 역학이 활발한 수송에 중요한 축삭돌기 수송을 손상시키고 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$이 축삭돌기 신장 및 수상돌기 분기에 요구되는 카고의 수송을 방해하는 비효율적인 MT 역학을 초래하는 것이 가능하다. 이들 연구는 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스의 피질 뉴런에서 실행되었지만, 선조 또는 소뇌 과립 뉴런에서는 유사하거나 더 극적인 효과가 예상된다.

[0201] MT 표면 상의 특이적 잔기는 많은 단백질 상호작용을 조절하고 이들 잔기의 변화는 그 기능에 영향을 미쳐 광범위한 신경학적 장애로 이어진다 (39). MT 역학은 MT에 안정성을 부여하는 번역 후 변형 (PTM), 예컨대 티로신화, 아세틸화, 폴리아민화, 글루타밀화, 글리실화 및 글루타티온화 (43)로 인해 변화될 수 있다. TUBB4A의 기능적 도메인에서 p.Asp249Asn 돌연변이의 위치가 조립된 미세관의 안정성에 영향을 미칠 것으로 생각되기 때문에 (4), PTM의 변화가 *Tubb4a*^{D249N} 매개된 MT 비정상에 대한 기여 인자일 수 있다. PTM은 카고의 세포 기관 및 분자적 수송에 중요한 운동 단백질, 예컨대 키네신, 디네인 및 MT-관련된 단백질 (MAP), 예컨대 타우(Tau) 및 더블코르틴의 결합을 더 변화시킬 수 있다. 하지만, *Tubb4a* 돌연변이가 미세관 기능에 영향을 주는 정확한 메커니즘은 알려지지 않았으며 탐구할 필요가 있다.

[0202] *TUBB4A* 이형접합성 돌연변이는 광범위한 뇌 기형을 유발하며, *Tubb4a*가 뉴런 및 신경교 기능에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 하지만, *Tubb4a* 넉아웃 (*KO*) 마우스 모델은 Tubb4a가 뇌 기능에 불필요할 수 있다는 것을 시사한다.

[0203] LacZ 발현을 가진 *Tubb4a KO* 마우스 (44)는.mousephenotype.org/data/genes/MGI:10784#section-associations의 범세계 통신망에서 부분적인 표현형 데이터와 함께 KOMP 저장소에서 이용 가능하다. 동형접합성 *Tubb4a KO* 마우스는 정상적인 배발생을 나타내고 WT에 대해 정상 체중으로 잘 자란다. 표현형 lac Z 발현 데이터는 신경계가 식별 가능한 소뇌 신경 손실 없이 정상적인 것으로 보인다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 뇌 발달 및 기능에 필수적인 것이 아닐 수 있으며, 뉴런 및 희돌기교세포에서 *TUBB4A* 돌연변이의 독성 기능 획득 효과를 나타낸다는 것을 시사한다. 또한, 발명자들의 이전 시험관 내 세포 작업 (45) 및 유도 만능 줄기 세포-유래된 뉴런에서의 최근 연구 (46)에서는 D249N의 돌연변이가 튜불린의 폴리머화 속도의 변화를 유발하며, 따라서, H-ABC 질환 발병에서 우세한 독성 기능 획득 효과를 지지한다는 것이 보고되었다.

[0204] H-ABC는 이용 가능한 치료적 전략이 없는 치명적이고, 진행성이며 불능성인 소아 장애이다. *Tubb4a*$^{D249/D249NN}$ 마우스는 고전적인 H-ABC 질환의 분자적 행동 기능 및 신경변성 특징을 최초로 발달시켰다. 마우스는 뉴런 및 희돌기교세포 결손 둘 다를 나타낸다. 종합하면, 이들 데이터는 변화된 미세관이 질환 발병의 중대한 구동자인 모델을 지지한다. 이들 마우스는 뉴런 및 교세포를 수반하는 이 복합 질환의 분자적 메커니즘을 파악하고 치료 전략의 효능을 테스트하는데 사용될 수 있는 핵심적인 도구를 제공한다.

[0205] **참고문헌:**

1. Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, et al. A de novo mutation in the beta-tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):767-73.

2. Hersheson J, Mencacci NE, Davis M, MacDonald N, Trabzuni D, Ryten M, Pittman A, Paudel R, Kara E, Fawcett K, et al. Mutations in the autoregulatory domain of beta-tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann Neurol.* 2013;73(4):546-53.

3. van der Knaap MS, Linnankivi T, Paetau A, Feigenbaum A, Wakusawa K, Haginoya K, Kohler W, Henneke M, Dinopoulos A, Grattan-Smith P, et al. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: follow-up and pathology. *Neurology.* 2007;69(2):166-71.

4. Curiel J, Rodriguez Bey G, Takanohashi A, Bugiani M, Fu X, Wolf NI, Nmezi B, Schiffmann R, Bugaighis M, Pierson T, et al. TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2017;26(22):4506-18.

5. Blumkin L, Halevy A, Ben-Ami-Raichman D, Dahari D, Haviv A, Sarit C, Lev D, van der Knaap MS, Lerman-Sagie T, and Leshinsky-Silver E. Expansion of the spectrum of TUBB4A-related disorders: a new phenotype associated with a novel mutation in the TUBB4A gene. *Neurogenetics.* 2014;15(2):107-13.

6. Ferreira C, Poretti A, Cohen J, Hamosh A, and Naidu S. Novel TUBB4A mutations and expansion of the neuroimaging phenotype of hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC). *Am J Med Genet A.* 2014;164A(7):1802-7.

7. Purnell SM, Bleyl SB, and Bonkowsky JL. Clinical exome sequencing identifies a novel TUBB4A mutation in a child with static hypomyelinating leukodystrophy. *Pediatr Neurol.* 2014;50(6):608-11.

8. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, et al. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology.* 2014;82(24):2230-7.

9. Pizzino A, Pierson TM, Guo Y, Helman G, Fortini S, Guerrero K, Saitta S, Murphy JL, Padiath Q, Xie Y, et al. TUBB4A de novo mutations cause isolated hypomyelination. *Neurology.* 2014;83(10):898-902.

[0206]

10. Nahhas N CA, Hamilton A, Curiel J, Simons C, van der Knaap MS and Vanderver A. In: Adam MP AH, Pagon RA ed. *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2016.

11. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014;34(36):11929-47.

12. Duncan ID, Bugiani M, Radcliff AB, Moran JJ, Lopez-Anido C, Duong P, August BK, Wolf NI, van der Knaap MS, and Svaren J. A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Ann Neurol.* 2017;81(5):690-702.

13. Li FY, Song J, and Duncan ID. Mapping of taiep rat phenotype to rat Chromosome 9. *Mamm Genome.* 2003;14(10):703-5.

14. Feather-Schussler DN, and Ferguson TS. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *J Vis Exp.* 2016117).

15. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, Takahashi R, Kitazawa S, and Hattori N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods.* 2010;189(2):180-5.

16. Sahinkaya FR, Milich LM, and McTigue DM. Changes in NG2 cells and oligodendrocytes in a new model of intraspinal hemorrhage. *Exp Neurol.* 2014;255(113-26.

17. Lancaster E, Li J, Hanania T, Liem R, Scheideler MA, and Scherer SS. Myelinated axons fail to develop properly in a genetically authentic mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Exp Neurol.* 2018;308(13-25.

18. Guedes-Dias P, Nirschl JJ, Abreu N, Tokito MK, Janke C, Magiera MM, and Holzbaur ELF. Kinesin-3 Responds to Local Microtubule Dynamics to Target Synaptic Cargo Delivery to the Presynapse. *Curr Biol.* 2019;29(2):268-82 e8.

19. Mangeol P, Prevo B, and Peterman EJ. KymographClear and KymographDirect: two tools for the automated quantitative analysis of molecular and cellular dynamics using kymographs. *Mol Biol Cell.* 2016;27(12):1948-57.

20. Hamilton EM, Polder E, Vanderver A, Naidu S, Schiffmann R, Fisher K, Raguz AB, Blumkin L, Group HAR, van Berkel CG, et al. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia

[0207]

and cerebellum: further delineation of the phenotype and genotype-phenotype correlation. *Brain.* 2014;137(Pt 7):1921-30.

21. Wenzel DG, and Lal H. The relative reliability of the escape reaction and righting-reflex sleeping times in the mouse. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1959;48(2):90-1.

22. Rahn EJ, Iannitti T, Donahue RR, and Taylor BK. Sex differences in a mouse model of multiple sclerosis: neuropathic pain behavior in females but not males and protection from neurological deficits during proestrus. *Biol Sex Differ.* 2014;5(1):4.

23. Baumann N, and Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81(2):871-927.

24. Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, et al. A de novo mutation in the beta-tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *American journal of human genetics.* 2013;92(5):767-73.

25. Duncan ID, Bugiani M, Radcliff AB, Moran JJ, Lopez-Anido C, Duong P, August BK, Wolf NI, van der Knaap MS, and Svaren J. A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Annals of neurology.* 2017;81(5):690-702.

26. Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F, and Engel JD. Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet.* 2000;25(2):209-12.

27. Jerome LA, and Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet.* 2001;27(3):286-91.

28. Bose J, Grotewold L, and Ruther U. Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum Mol Genet.* 2002;11(9):1129-35.

29. Biddle F, March E, and Miller J. Research news. *Mouse News Lett.* 1973;48(24).

30. Readhead C, and Hood L. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld). *Behav Genet.* 1990;20(2):213-34.

31. Nave KA, Lai C, Bloom FE, and Milner RJ. Jimpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(23):9264-8.

[0208]

32. van der Knaap MS, Naidu S, Pouwels PJ, Bonavita S, van Coster R, Lagae L, Sperner J, Surtees R, Schiffmann R, and Valk J. New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23(9):1466-74.

33. Lu Y, Ondo Y, Shimojima K, Osaka H, and Yamamoto T. A novel TUBB4A mutation G96R identified in a patient with hypomyelinating leukodystrophy onset beyond adolescence. *Human Genome Variation.* 2017;4(17035.

34. Tonduti D, Aiello C, Renaldo F, Dorboz I, Saaman S, Rodriguez D, Fettah H, Elmaleh M, Biancheri R, Barresi S, et al. TUBB4A-related hypomyelinating leukodystrophy: New insights from a series of 12 patients. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society.* 2016;20(2):323-30.

35. Song J, Carson JH, Barbarese E, Li FY, and Duncan ID. RNA transport in oligodendrocytes from the taiep mutant rat. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(4):926-38.

36. Clark JA, Yeaman EJ, Blizzard CA, Chuckowree JA, and Dickson TC. A Case for Microtubule Vulnerability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Altered Dynamics During Disease. *Front Cell Neurosci.* 2016;10(204.

37. Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, Oliver PL, Fray M, Harvey RJ, Molnar Z, et al. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell.* 2007;128(1):45-57.

38. Tischfield MA, Cederquist GY, Gupta ML, Jr., and Engle EC. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(3):286-94.

39. Chakraborti S, Natarajan K, Curiel J, Janke C, and Liu J. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2016;73(10):521-50.

40. Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, Chan WM, Andrews C, Demer JL, Robertson RL, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell.* 2010;140(1):74-87.

41. Cartelli D, Ronchi C, Maggioni MG, Rodighiero S, Giavini E, and Cappelletti G. Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration. *J Neurochem.* 2010;115(1):247-58.

[0209]

42. Fanara P, Banerjee J, Hueck RV, Harper MR, Awada M, Turner H, Husted KH, Brandt R, and Hellerstein MK. Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23465-72.

43. Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol.* 2014;206(4):461-72.

44. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* 2011;474(7351):337-42.

45. Curiel J, Rodriguez Bey G, Takanohashi A, Bugiani M, Fu X, Wolf NI, Nmezi B, Schiffmann R, Bugaighis M, Pierson T, et al. TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Human molecular genetics.* 2017;26(22):4506-18.

46. Vulinovic F, Krajka V, Hausrat TJ, Seibler P, Alvarez-Fischer D, Madoev H, Park JS, Kumar KR, Sue CM, Lohmann K, et al. Motor protein binding and mitochondrial transport are altered by pathogenic TUBB4A variants. *Human mutation.* 2018;39(12):1901-15.

47. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, and Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques.* 2000;29(1):52, 4.

48. Lee YW, Mirocha CJ, Shroeder DJ, and Walser MM. TDP-1, a toxic component causing tibial dyschondroplasia in broiler chickens, and trichothecenes from Fusarium roseum 'Graminearum'. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50(1):102-7.

[0210]

[0211] 다음 재료 및 방법은 실시예 II의 실시를 용이하게 하도록 제공된다.

[0212] **iPS 배양 방법:**

[0213] *TUBB4A* 돌연변이를 가진 개체 및 영향을 받지 않은 개체 (대조군)로부터 단리된 말초 혈액 단핵구 (PBMC)를 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)로 재프로그래밍하였다. iPSC 라인의 유전자 온전성을 확인하기 위해 모든 iPSC 라인을 유동세포분석법 및 DNA 핑거 프린팅(finger printing)을 사용하여 만능성의 마커에 대해 확인하였다 (Maguire et.al 2019). iPSC 클론은 일련의 계대배양에 걸쳐 정상적인 핵형을 나타냈고 실행된 마이코플라즘 테스트는 모든 라인에 대해 음성이었다.

[0214] **iPSC의 뉴런 분화:**

[0215] 선조 중간 가시 뉴런 (MSN) 운명으로의 신경 유도를 이전에 공개된 이중 SMAD 억제 프로토콜을 사용하여 실행하였다 (Telezhkin 2016). 간략히 말하면, iPSC를 70% 밀집도에 도달할 때까지 TGF-β 및 bFGF가 들어있는 필수 8 배지에서 키웠다. 세포를 PBS 및 레티노산 (RA)이 없는 신경 기저 배지 중의 10 μM SB431542, 1.5 μM LDN 193189, 1.5 μM IWR1을 함유하는 신경 유도 SLI 배지로 세척하였다. 제4 일에, 밀집한 배양물을 신선한 마트리겔(Matrigel) 코팅된 플레이트로 계대배양하였으며 분할비는 1:2였다. 제8 일에, 배양물을 1:2로 계대배양하였고 신경 기저 배지 중의 RA가 없이 200nM LDN193189, 1.5 μM IWR1을 함유하는 L1 배지에서 배양하였고 배지를 매일 교환하였다. D16 iPSC 유래된 신경 전구 세포 (NPCS)를 뉴런 분화에 직접 사용하거나 추후 분화를 위해 냉동시켰다. 유동세포분석법을 NPC에서 실행하여 SOX2, Pax6, FOXG1 및 Nestin과 같은 초기 분화 마커를 찾았다.

[0216] 뉴런 분화를 위해서, NPC를 아큐타제를 사용하여 해리시키고 마트리겔 및 100 μg/ml 폴리-L-리신 (PLL)으로 코팅된 24웰 플레이트에서 웰 당 100,000개의 세포로 평판배양하였다. d16 NPC를 처음 7일 동안 Advanced DMEMF12, 2 μM PD0332991, 10 μM DAPT, 0.6 mM $CaCl_2$, 200 μM 아스코르브산, 10 μM 포스콜린, 3 μM CHIR99021 및 300 μM GABA를 함유하는 SCM1 배지에서 평판배양하였다.

[0217] NPC의 평판배양 제8 일 (또는 총 제23 일) 후, NPC를 RA, 2 μM PD0332991, 3 μM CHIR99021, 0.3 mM $CaCl_2$, 200 μM 아스코르브산, 10ng/ml BDNF와 함께 1:1 Advanced DMEM/F-12: Neurobasal A를 함유하는 SCM2 배지에서 배양하였다. 배지를 제38 일에 도달할 때까지 3일마다 교환하였으며, 그 후 세포는 실험을 위한 준비가 되었다.

[0218] **뉴런 세포 생존 및 분석:**

[0219] 커버슬립에서 성장한 뉴런을 4% PFA로 20 min 동안 고정하고 Tuj1 (뉴런 마커), MAP2 (수상돌기 마커) 및 MSN에

특이적인 마커, 예컨대 DARPP32, CTIP2, GABA 및 FOXP1에 대해 염색하였다. 세포를 성숙화 이후 상이한 시점(제38 일, 제45 일, 제52 일)에 고정하여 염색하고 Leica 현미경으로 커버슬립을 이미지화함으로써 생존 분석 및 신경병리학을 실행하였다. 데이터를 맹검 방식으로 분석하고 그래프패드 프리즘(graphpad prism)을 사용하여 통계 분석을 실행하였다. 모든 분석을 일원 또는 이원 ANOVA에 이어서 투키 사후 테스트를 사용하여 실행하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01.

[0220] **실시예 II**

[0221] **TUBB4A 인간 iPS 세포**

[0222] 이전 실시예에서 논의된 바와 같이, 기저핵 및 소뇌의 저미엘린화 위축증 (H-ABC)은 희귀성 대뇌백질이영양증이며, 이것은 발명자들이 *TUBB4A* 유전자에서 산발적인 데 노보 이형접합성 돌연변이에 의해 유발되는 것으로 확인하였다 (Simons et al. 2013). *TUBB4A*에서 단일대립유전자성 돌연변이는 초기 발생 뇌병증에서 성인-발생 이긴장증 4형 (속삭임형 음성장애)까지의 범위의 광범위한 신경학적 장애를 초래할 수 있다. H-ABC에 영향을 받은 개체는 이 범위 내에 있으며, 전형적으로 유아기에 이긴장증 (Hersheson et al. 2013), 진행성 걸음걸이 장애, 언어 및 인지 결함을 나타낸다. 그것들은 특징적인 신경 영상 특징에 의해 *TUBB4A*에서 돌연변이를 가진 다른 개체로부터 더 구분된다: 저미엘린 형성 및 소뇌 위축증을 동반한 미상 및 내과피의 위축증 (van der Knaap et al. 2007). 병리학적 표본, 등에서, 선조체 영역 및 소뇌의 과립층은 축삭돌기 팽윤 및 미엘린의 확산 부족과 함께 신경 손실을 나타낸다 (Curiel et al. 2017; Simons et al. 2013). H-ABC에 걸린 개체는 공개된 *TUBB4A* 돌연변이의 약 65%를 나타내고 단일 공통 돌연변이, p. Asp249Asn (이후 D249N으로 불림)에 의해 영향을 받을 가능성이 불균형적으로 크다.

[0223] 본 실시예에서, 발명자들은 H-ABC 및 CHOP 줄기 세포 코어에서 다른 TUBB4A 돌연변이를 가진 개체로부터 단리된 말초 혈액 단핵구 (PBMC)의 재프로그래밍된 유도 만능 줄기 세포주 (iPSC)를 기재한다 (표 1 참조). H-ABC의 맥락에서, 발명자들은 선조체 중간 가시 뉴런 운명으로 분화시키고 그것들의 병리학을 검사하기 위한 $TUBB4A^{D249N}$ 라인 중 특이적으로 재프로그래밍된 3개의 라인을 갖는다. 데이터로부터 얻어진 데이터는 대조군 환자로부터 유래된 뉴런 (검은색 막대)과 비교하여 $TUBB4A^{D249N}$ iPSC (빨간색 막대)로부터 분화된 중간 가시 뉴런에서 감소된 생존 (**도 16A-D**, **p<0.01, *** p<0.001) 및 분명한 신경병리학 (**도 16E**, *p<0.05)을 나타낸다. TUBB4A 관련된 병리학이 기능 상실 또는 기능 획득을 통한 것인지 여부를 테스트하기 위해서, 발명자들은 대조군 환자 iPSC 라인에서 CRISPR을 사용하여 *TUBB4A*를 결실시켜 넉아웃 (TUBB4A KO) 라인이 발달적으로 정상이고 선조 뉴런으로 효율적으로 분화되는지 여부를 테스트하였다. 실제로, 발명자들은 대조군 대 대조군 TUBB4A KO iPSC의 분화가 비슷하다는 것을 관찰하였으며 **(도 16F, G)** TUBB4A가 선조 뉴런의 생성에서 발달적인 역할을 하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0224] TUBB4A 결실이 기능 상실을 초래하지 않기 때문에, 발명자들은 그 다음에 $TUBB4A^{D249N}$ 환자의 iPSC에서 TUBB4A의 결실이 환자 iPSC ($TUBB4A^{D249N}$ KO)에서 TUBB4AKO를 생성함으로써 병리학의 구제 및 뉴런 사멸로 이어질 수 있는지 여부를 테스트하였다 (**도 16**에서 알 수 있는 바와 같다). 발명자들은 $TUBB4A^{D249N}$ KO iPSC를 뉴런 운명으로 더 분화시켰고 $TUBB4A^{D249N}$ 뉴런과 비교하여 $TUBB4A^{D249N}$ KO에서 총 뉴런 수 (**도 17**; *p<0.05, 67.10 ± 4.76 대 41.55 ± 5.82) 및 또한 CTIP2+ MSN (**도 16B;****p<0.01, 43.14 ± 3.38 대 17.38 ± 2.01)에서 유의한 구제가 있음을 관찰하였다.

[0225] 이들 결과는 돌연변이의 발현을 하향조절하거나 또는 야생형 *TUBB4A*를 증가시키기 위한 수단으로 H-ABC 및 관련된 *TUBB4A*-관련된 대뇌백질이영양증의 치료를 위한 원리 검증(proof-of-principal)을 제공한다. 이 접근법을 이용하는 치료적 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNA 침묵 접근법 또는 야생형 *TUBB4A*의 과발현에 의한 돌연변이 *TUBB4A*에 대한 경쟁을 포함할 수 있다.

[0226] **실시예 III**

[0227] **표적 *TUBB4A* 유전자의 하향조절을 위한 안티센스 분자**

[0228] 발명자들은 TUBB4A 유전자 발현의 전체적인 수준을 하향조절하는데 효과적인 일련의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 개발하였다. 하기 기재된 접근법은 관심있는 표적 세포에서 야생형 및 돌연변이 *TUBB4-A* 발현의 하향조절을 가능하게 한다.

[0229] 11개의 ASO를 통합 DNA 기술에 의해 합성하였다. 발명자들은 최고의 ASO 디자인을 확인하기 위해 이들 ASO의 시험관 내 스크리닝을 수행하였다. 마우스 Oli-neu 세포를 NEPA21 전기천공 시스템 (NEPA GENE, USA)에서 150 V에서 100,000개의 세포/웰이 들어있는 100 μL 배지 중의 1μM, 5μM 및 10μM의 ASO 농도로 전기천공시켰다. 전기천공법 후, 세포를 폴리-L-오르니틴 코팅된 플레이트로 옮기고 인큐베이터에 배치하였다. 처리 후 48시간에, 세포를 PBS로 세척한 다음 RNA 추출을 PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Cat: 12183018A)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. DNAase (Invitrogen)로 처리한 후, RNA 200ng을 cDNA를 위해 SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific, Cat: 18091200)과 함께 사용하였다. *Tubb4a*, 및 참조로서 내인성 하우스키핑 유전자 암호화 스플라이싱 인자, 아르기닌/세린-풍부 9 (*sfrs9*)의 mRNA 발현 수준을 Applied Biosystems Quanta Flex 7 (ThermoFisher Scientific, USA)에서 실시간 PCR 분석 (Taqman chemistry)을 사용하여 정량화하였다. ΔΔCT 방법을 사용하여 결과를 분석하였다.

[0230] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 서열: 전기천공법 후, 다음 ASO 서열은 10μM에서 Tubb4a의 최대 하향조절을 나타냈다. **도 18 및 21A** 참조.

[0231] ASO 1316: 서열: 5'+A*+C*+A*T*A*C*G*G*C*T*G*T*C*+T*+T*+G 3'

[0232] (서열 번호: 1)

[0233] ASO 1851: 서열: 5'+G*+A*+T*C*T*A*A*G*A*A*G*G*T*+G*+G*+A 3'

[0234] (서열 번호: 2)

[0235] *용융 Tm은 Mg2+ 또는 dNTP 농도를 사용하여 평가되지 않는다.

[0236] + LNA 변형

[0237] 상기 나열된 서열 각각은 선택적으로 하나 이상의 변형된 백본 연결 및/또는 변형된 당을 포함할 수 있다. 이들 ASO는 Tubb4A의 하향조절을 위한 실행가능한 치료적 표적이다. **(도 21)** 이들 ASO는 0.5μM, 1μM, 2μM, 5μM, 10μM, 및 25μM에서 최소한의 독성과 함께 Tubb4a를 효과적으로 하향조절하는 것으로 나타났다. **(도 21A)** 실제로, ASO로 처리될 때, 대상체는 증가된 생존 **(도 21B)**, 감소된 발작 **(도 21C)**, 및 유의하게 개선된 운동 기능 **(도 21D)**을 갖는 것으로 나타났다.

[0238] **도 19**는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 생체 내 전체 동물 치료의 개략도를 나타낸다.

[0239] **도 20**은 확립된 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스 모델에서 그것을 살아있고 정상인 것으로 보이는 *Tubb4a* 넉아웃 (KO) 마우스와 교배시킴으로써 TUBB4A를 하향조절하는 것의 치료적 효능을 나타낸다. 결과로 생성된 *Tubb4a*$^{D249N/KO}$ 마우스는 개선된 운동 기능, 증가되고 연장된 생존 **(도 20B)** 및 개선된 운동 기능 **(도 20C)**을 나타낸다.

[0240] **실시예 IV**

[0241] **WT *TUBB4A*의 과발현**

[0242] 상기 본원의 정보는 야생형 튜불린의 과발현에 의한 튜불린 돌연변이와 관련된 표현형을 구조해는데 적용될 수 있다.

[0243] α 및 β-튜불린은 상이한 튜불린 아이소폼과 다이머화 및 교차-다이머화한다. 튜불린 돌연변이가 발달적 뇌 결함을 유발할 수 있지만, 야생형 (WT) 튜불린의 과발현은 돌연변이 β-튜불린보다 우월하고 초파리 및 씨. 엘레간스(C. elegans)에서 관련된 표현형을 구제한다.

[0244] 바람직한 구체예에서 발명자들은 WT TUBB4A를 과발현시키는 것이 OL-세포주에서 미엘린 유전자의 발현을 증가시킨다는 것을 보여준다 **(도 22)**. 따라서, 발현 벡터 (예를 들어, 아데노-관련 바이러스 (AAV))를 사용한 WT TUBB4A의 과발현은 기능 획득(gain-of-function) TUBB4A 돌연변이의 독성을 극복하고 *Tubb4a*$^{D249N/D249N}$ 마우스에서 표현형을 구제할 것이다. AAV 전달은 관심있는 핵산을 세포에 전달하기 위한 단 하나의 수단이다. 전달에 필요한 여러 추가적인 접근법 및 시약은 상기 기재되어 있다.

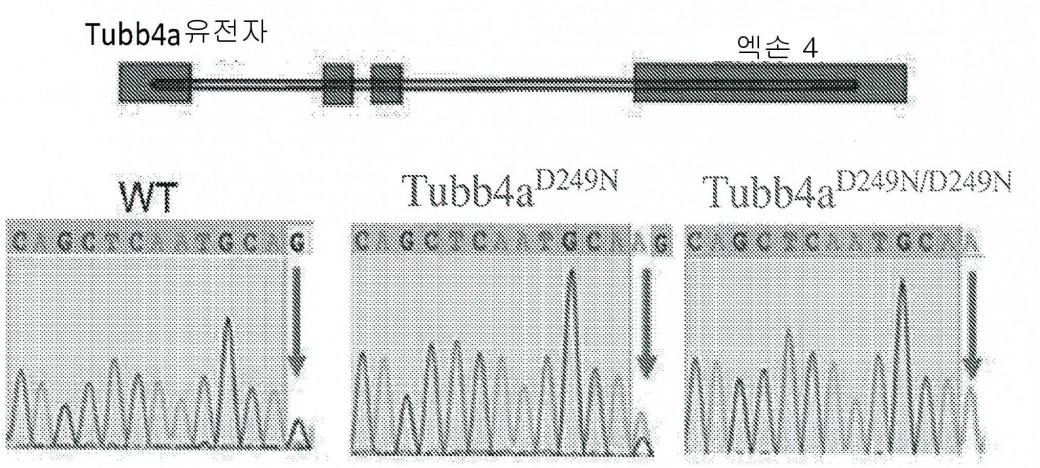
[0245] WT 튜불린 과발현은 돌연변이 튜불린 모델을 구제할 수 있다. 따라서, 영향을 받은 세포에서 돌연변이된 TUBB4A에 비해 WT를 증가시키킴으로써 튜불린의 화학량론을 변화시키는 것은 H-ABC에서 신경변성을 정지시킬 것이다. 바람직한 구체예에서, 전용(proprietary) 캡시드는 영장류 모델에서 발명자들의 관심있는 세포를 효과적으로 표

적화할 것이다. 대안의 구체예에서, 신규한 바이러스 벡터는 SN, CGC 및/또는 OL을 표적화하여 시험관 내에서 WT TUBB4A를 과발현하고 표현형을 구제할 것이다. 이들 벡터를 표적화하는 것은 관련된 세포 유형 (OL, 선조 뉴런 및 소뇌 과립 뉴런)에 표적화되는 치료적 접근법을 개선할 것이다.

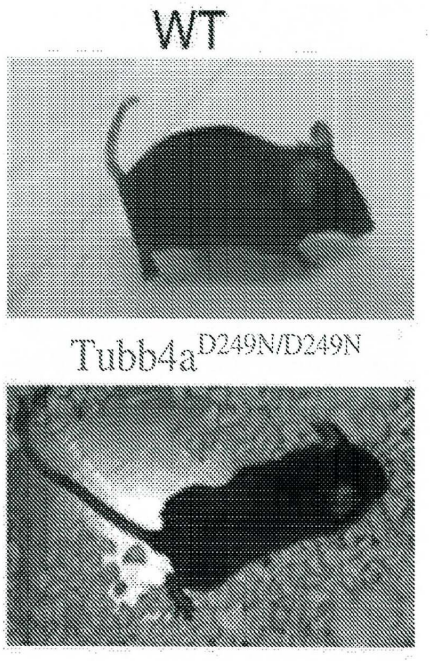
[0246] 본 발명의 어떤 특징이 본원에서 기재되어 있지만, 많은 변형, 치환, 변화, 및 동등물이 이제 당업자에게 발생할 수 있다. 그러므로, 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 사상 내에 있는 이러한 모든 변형 및 변화를 포함하도록 의도된다는 것을 이해해야 한다.

도면

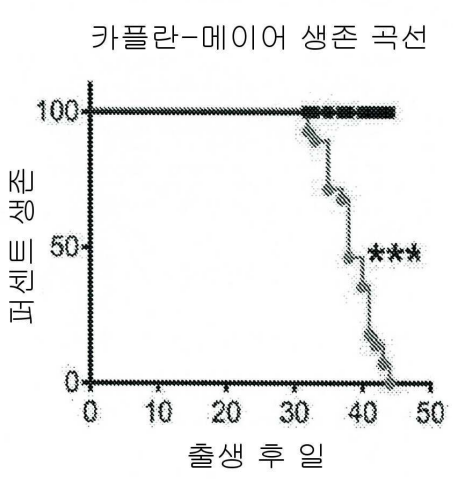
도면1a



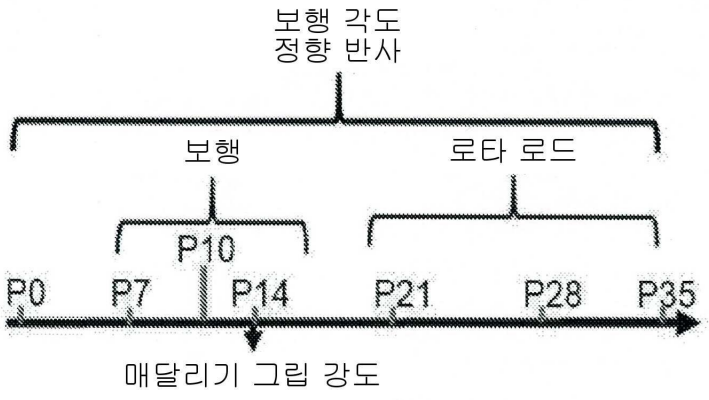
도면1b



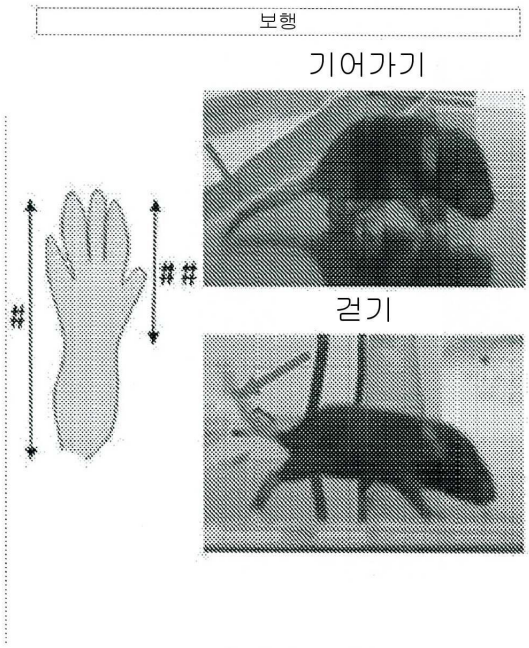
도면1c


카플란-메이어 생존 곡선
퍼센트 생존
100
50
0
***
0
10
20
30
40
50
출생 후 일

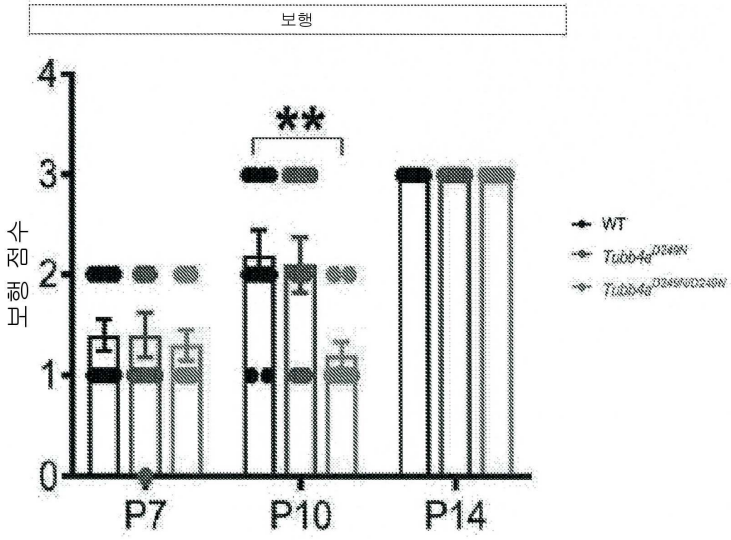
도면1d


보행 각도
정향 반사
보행
로타 로드
P10
P0
P7
P14
P21
P28
P35
매달리기 그립 강도

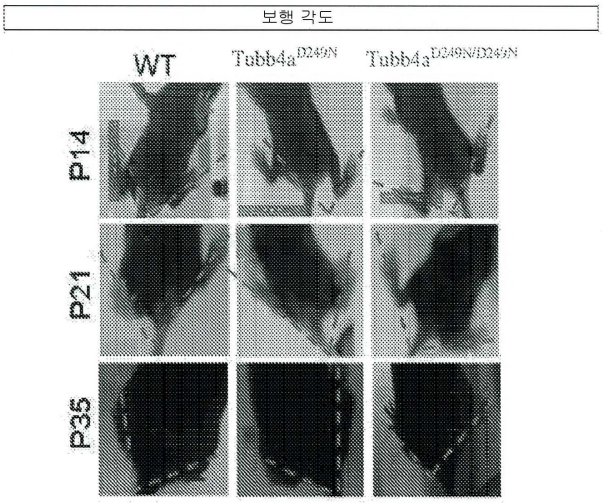
도면1e



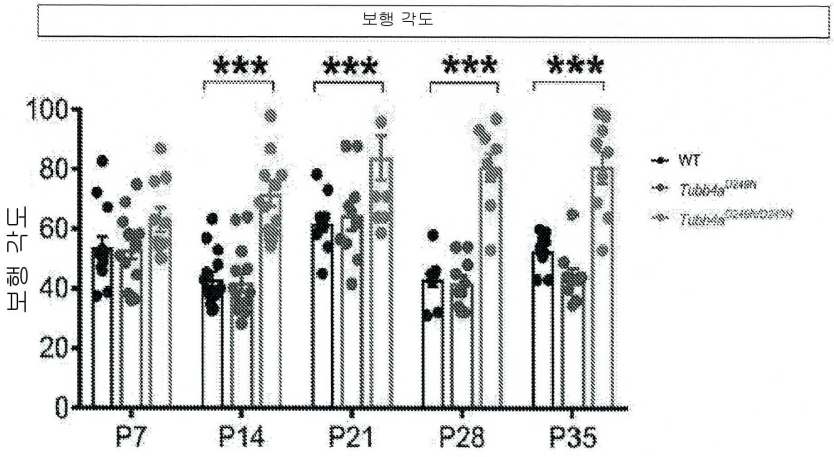
도면1f



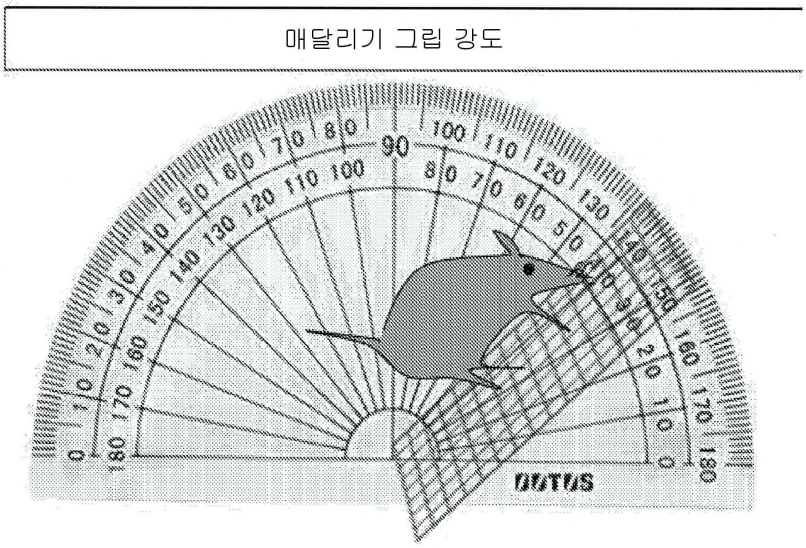
도면1g



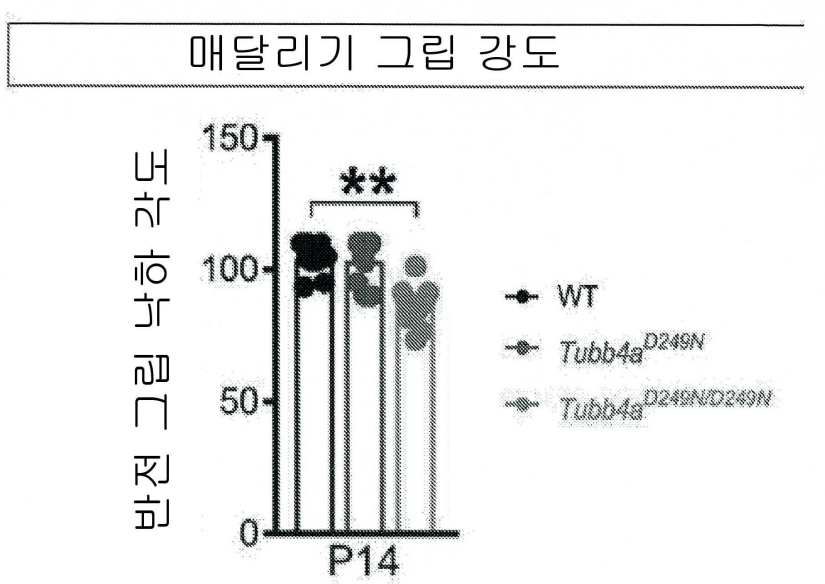
도면1h



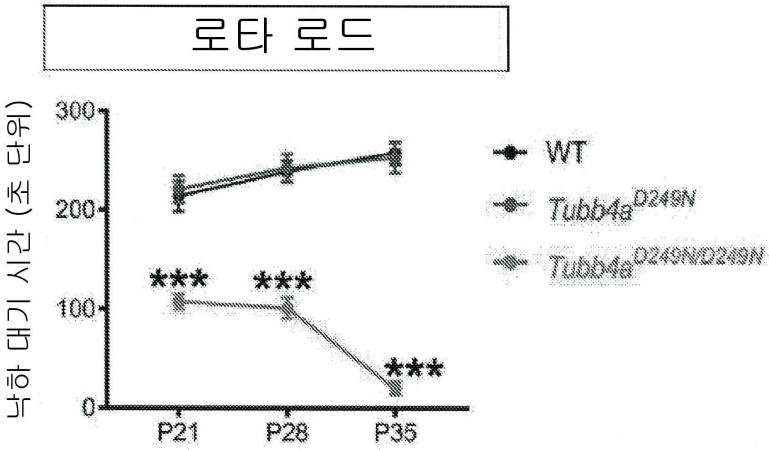
도면1i



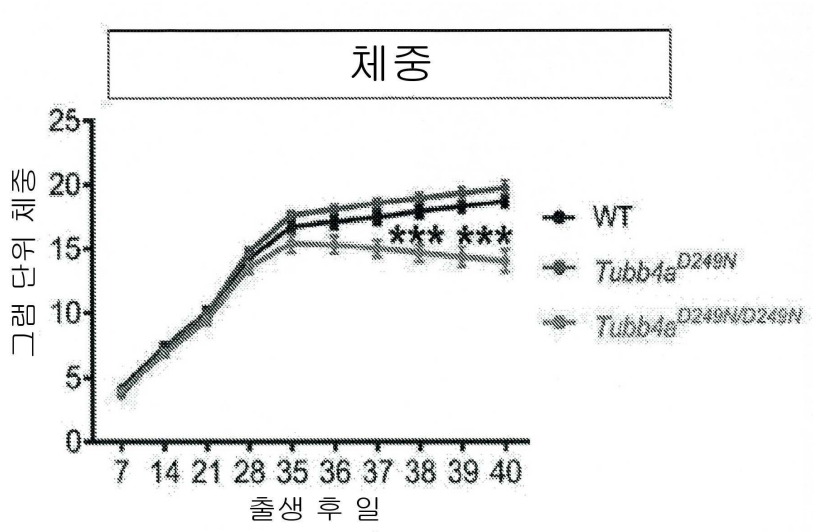
도면1j


매달리기 그립 강도
반전 그립 낙하 각도
150
100
50
0
**
P14
WT
Tubb4a D249N
Tubb4a D249N/D249N

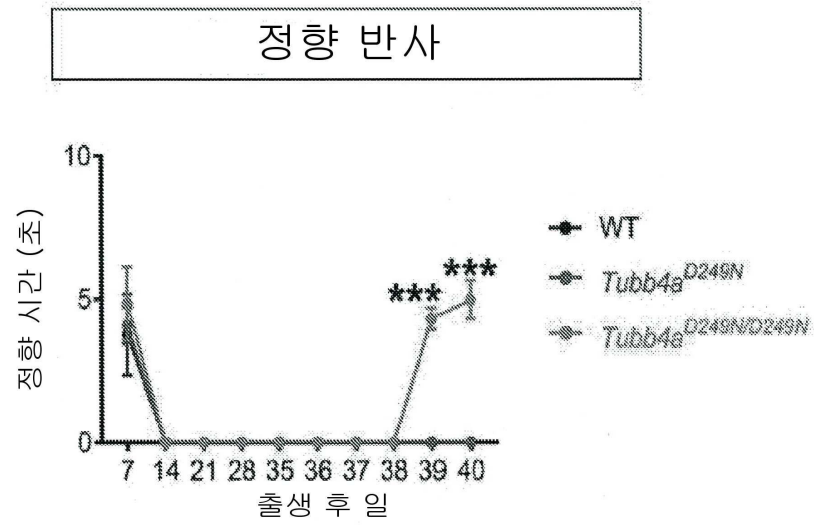
도면1k


로타 로드
낙하 대기 시간 (초 단위)
300
200
100
0
***
***
***
P21
P28
P35
WT
Tubb4a D249N
Tubb4a D249N/D249N

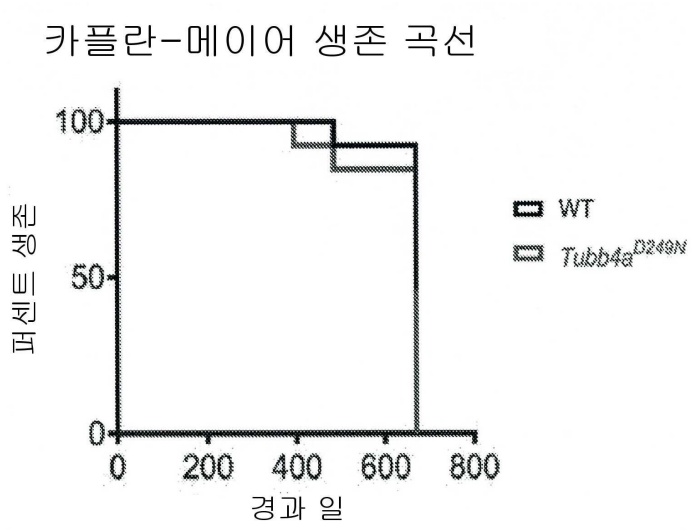
도면1l


체중
그램 단위 체중
25
20
15
10
5
0
7 14 21 28 35 36 37 38 39 40
출생 후 일
*** ***
WT
Tubb4a D249N
Tubb4a D249N/D249N

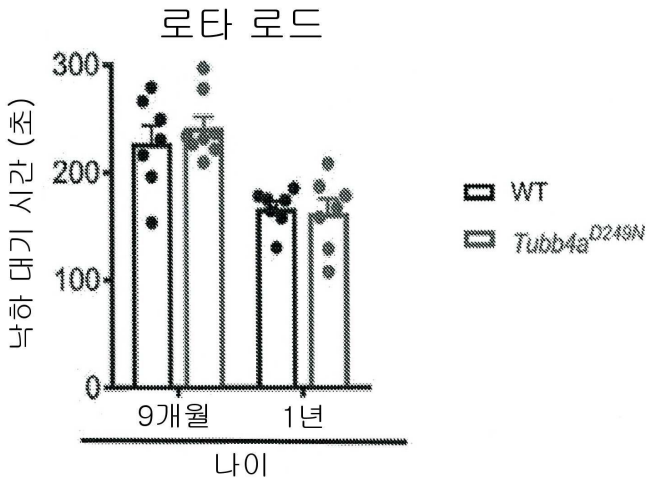
도면1m


정향 반사
정향 시간 (초)
10
5
0
7 14 21 28 35 36 37 38 39 40
출생 후 일
*** ***
WT
Tubb4a D249N
Tubb4a D249N/D249N

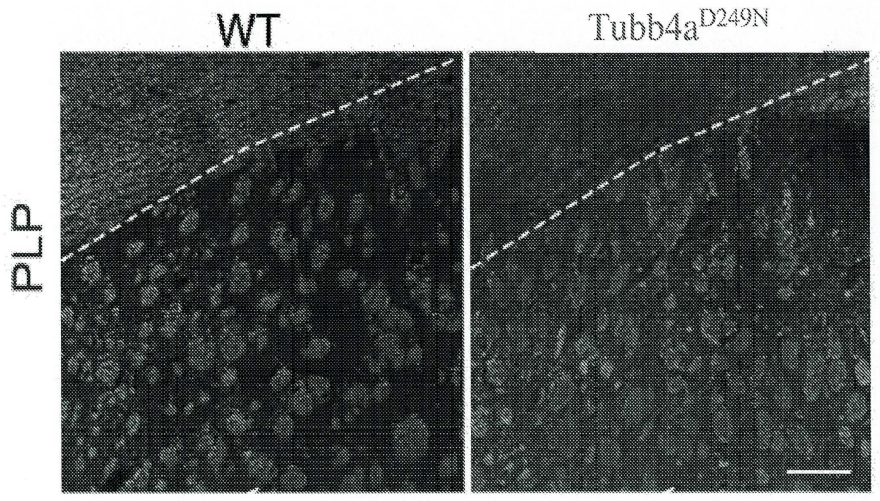
도면2a



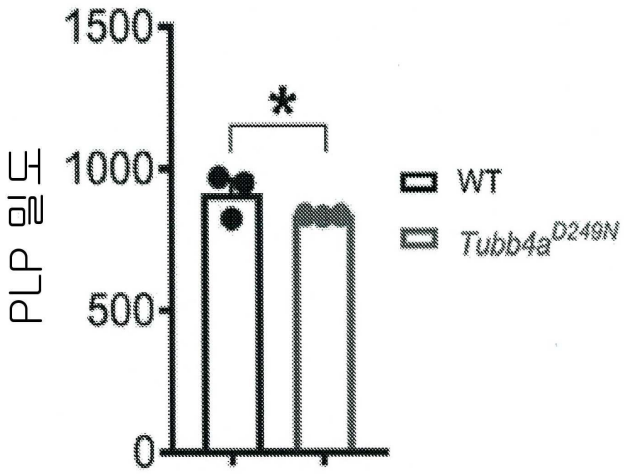
도면2b



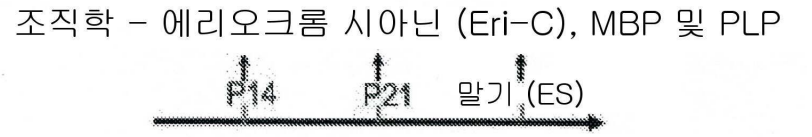
도면2c



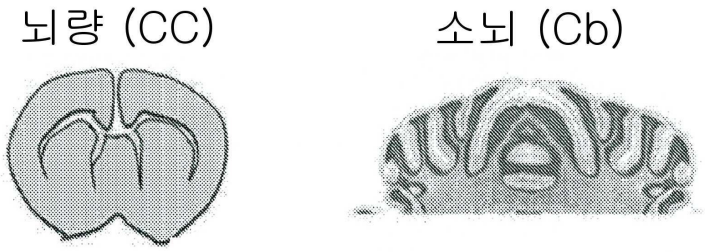
도면2d



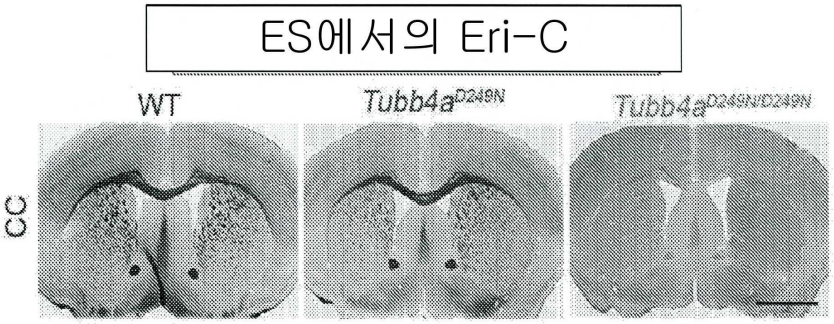
도면3a



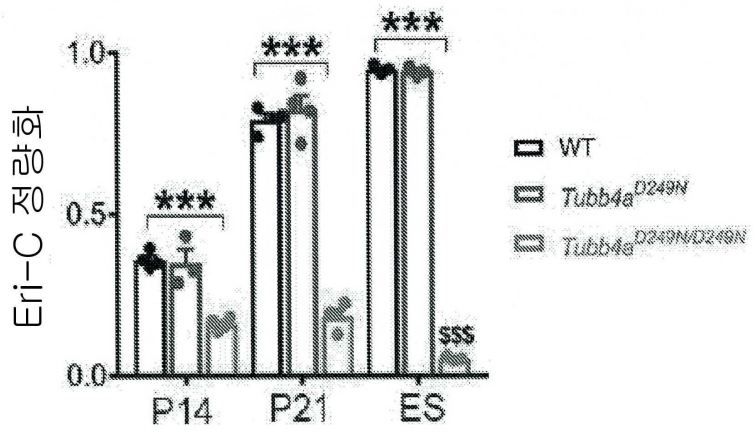
도면3b



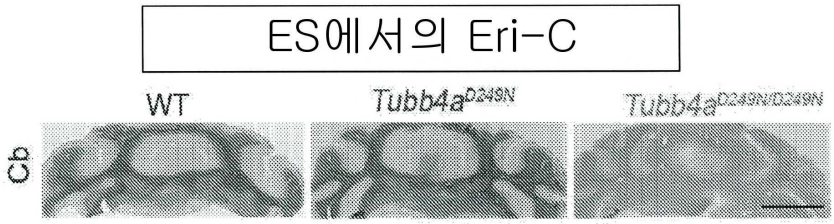
도면3c



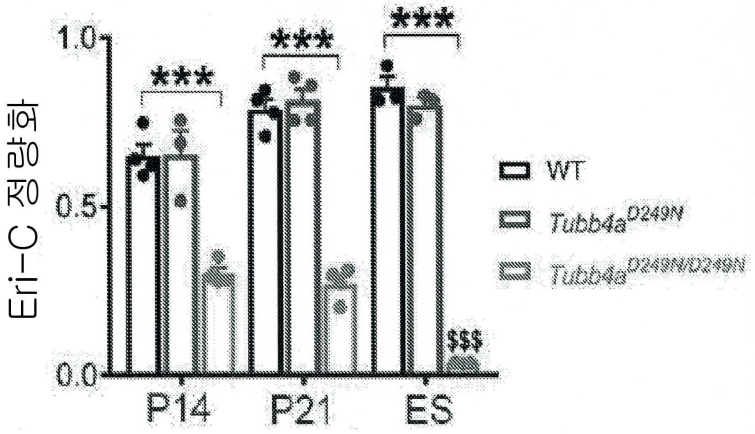
도면3d



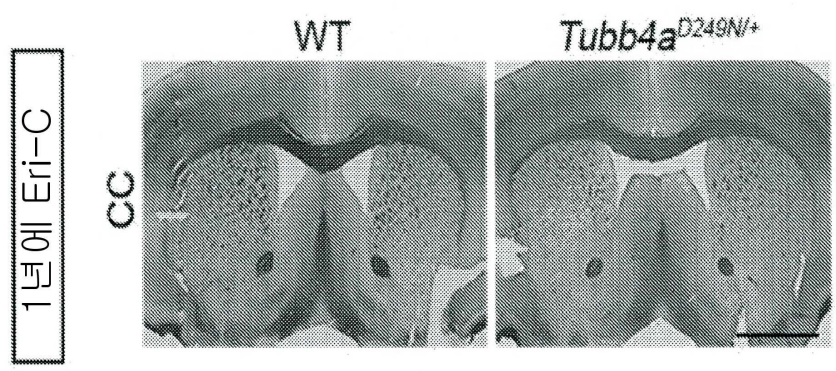
도면3e



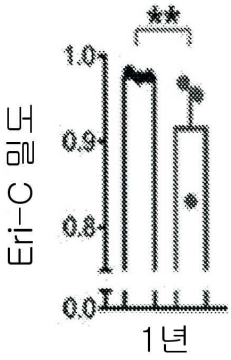
도면3f



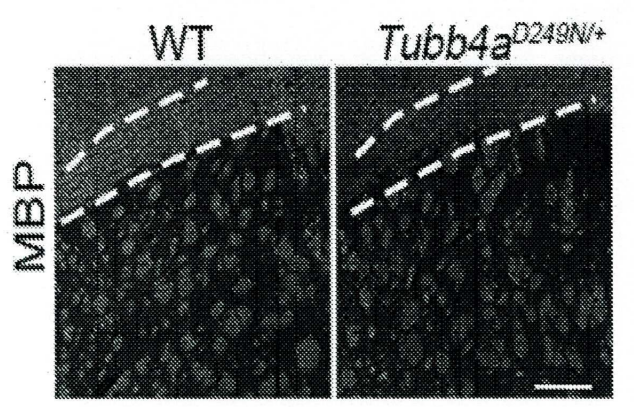
도면3g



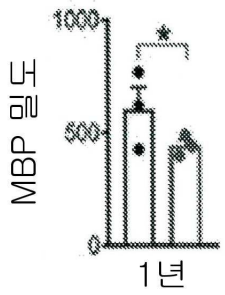
도면3h



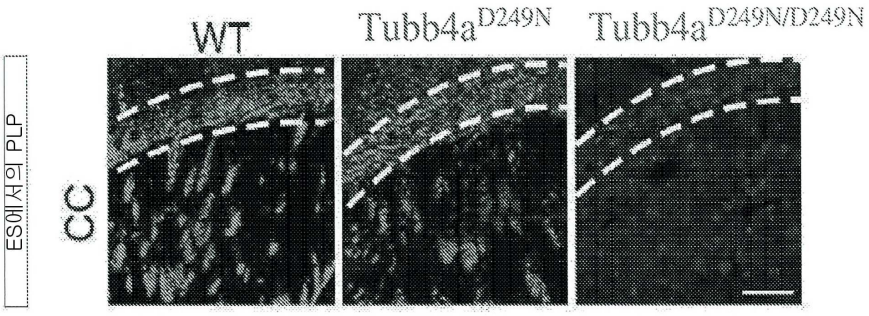
도면3i



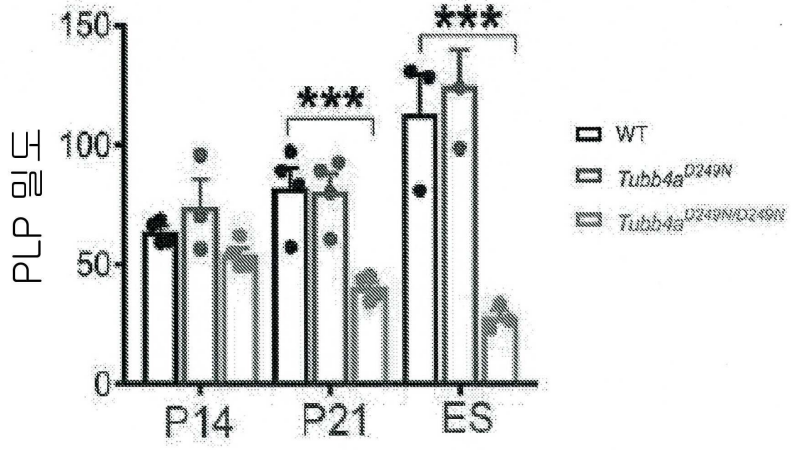
도면3j



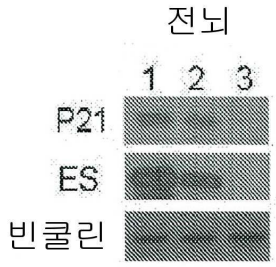
도면3k



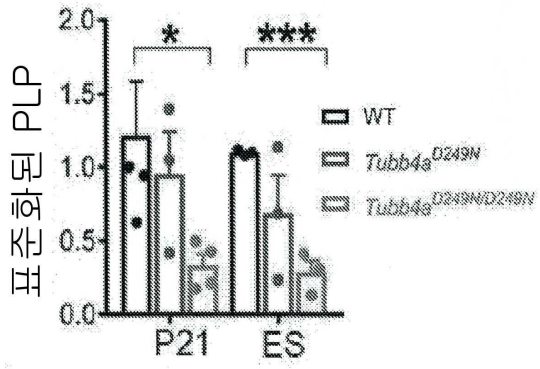
도면3l



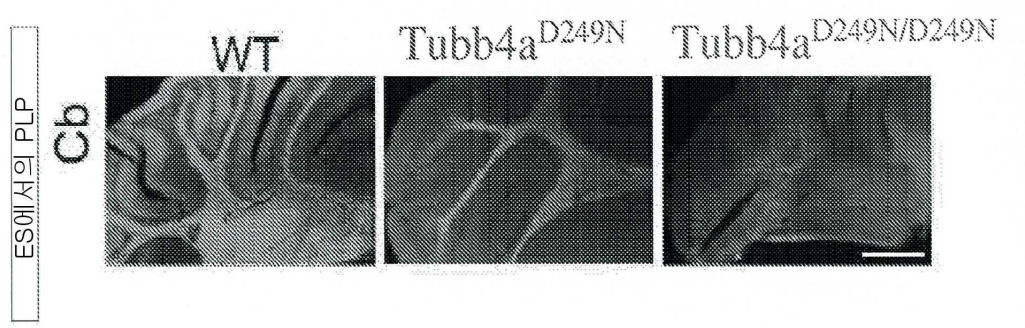
도면3m



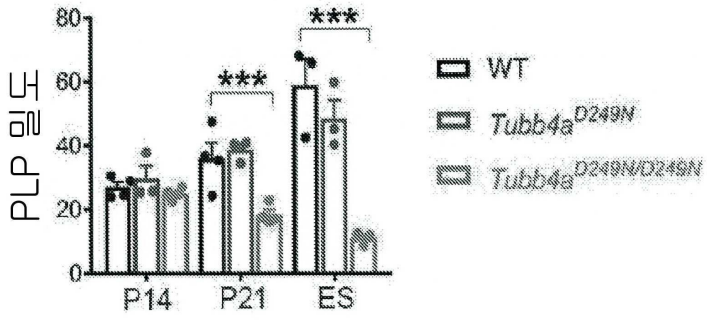
도면3n



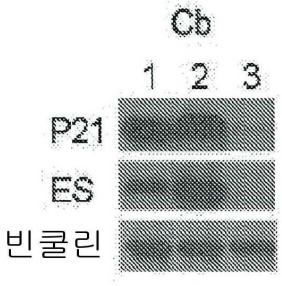
도면3o



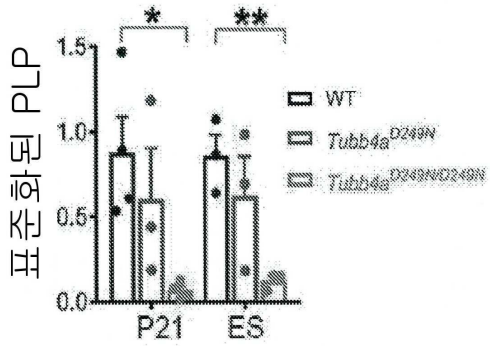
도면3p



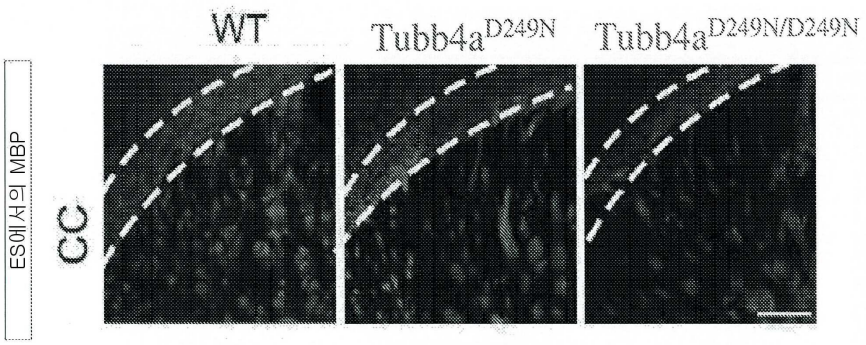
도면3q



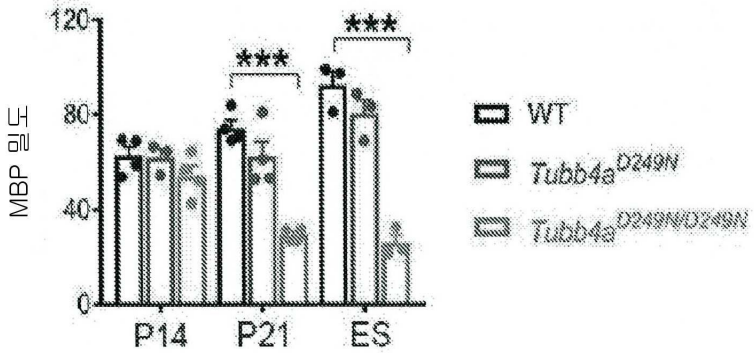
도면3r



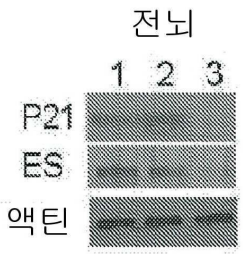
도면3s



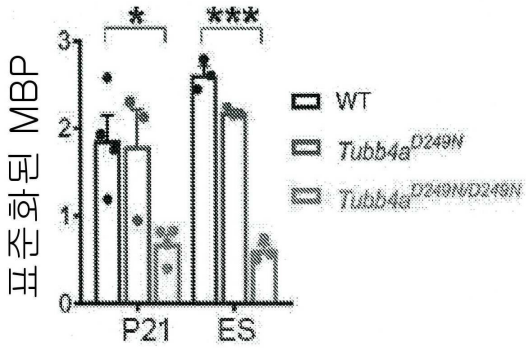
도면3t



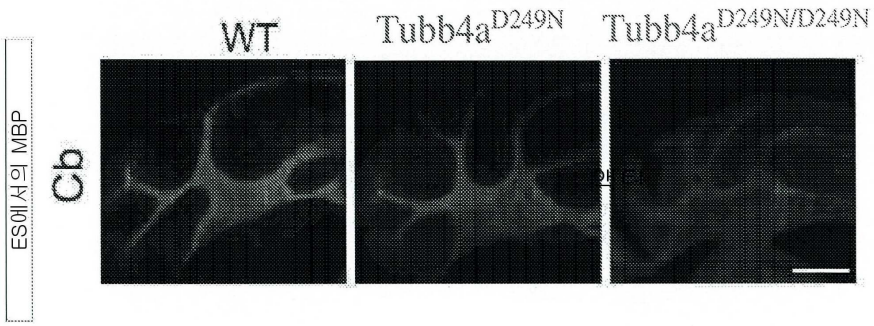
도면3u



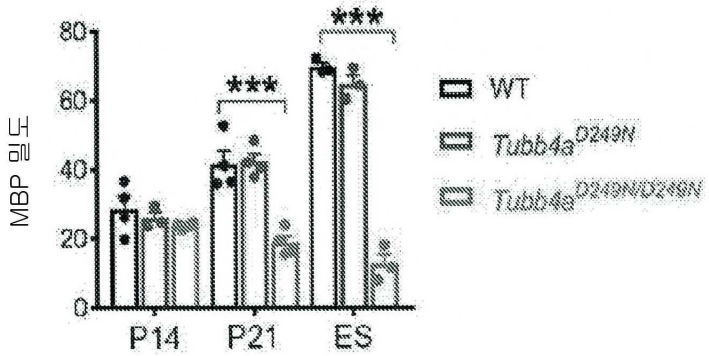
도면3v



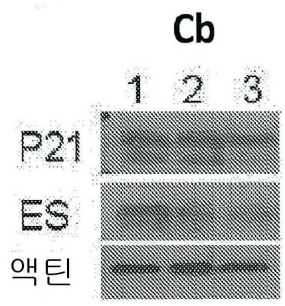
도면3w



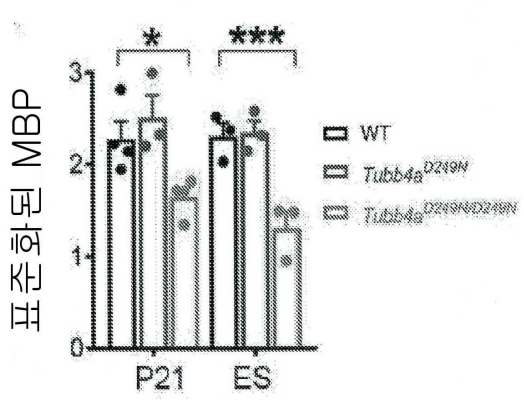
도면3x



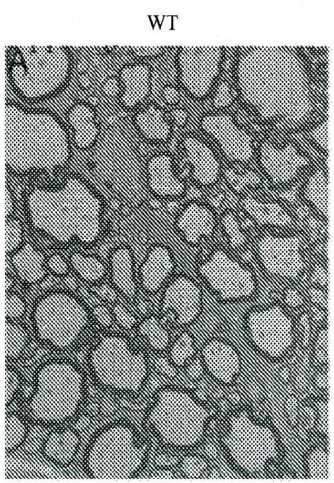
도면3y



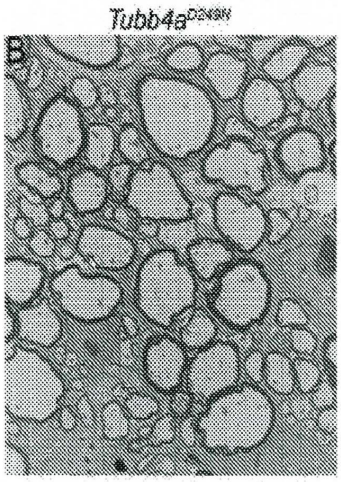
도면3z



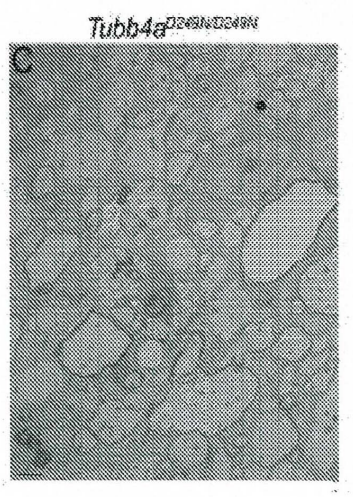
도면4a



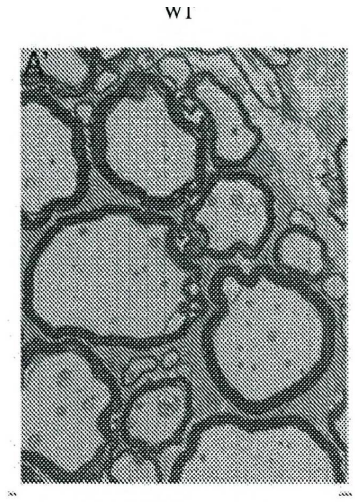
도면4b



도면4c



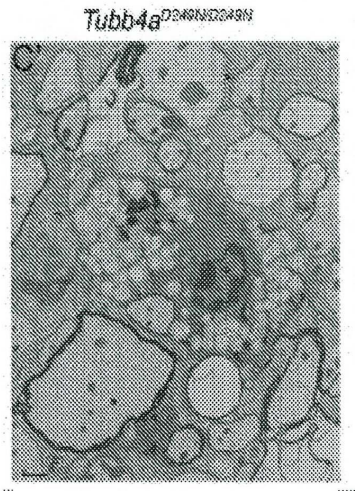
도면4d



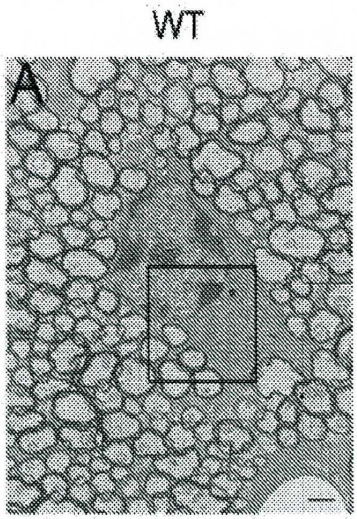
도면4e



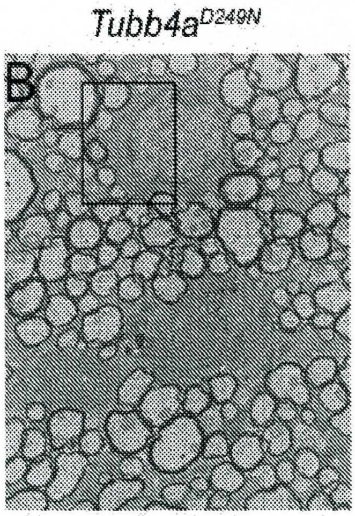
도면4f



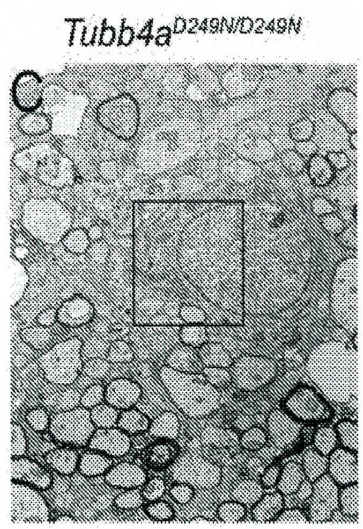
도면5a



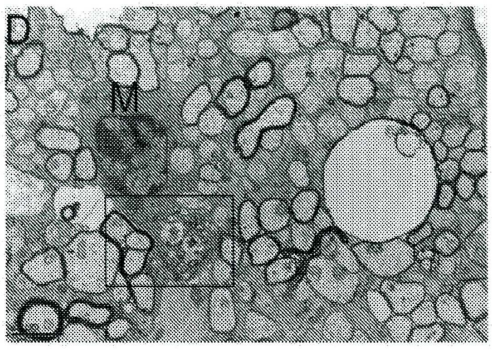
도면5b



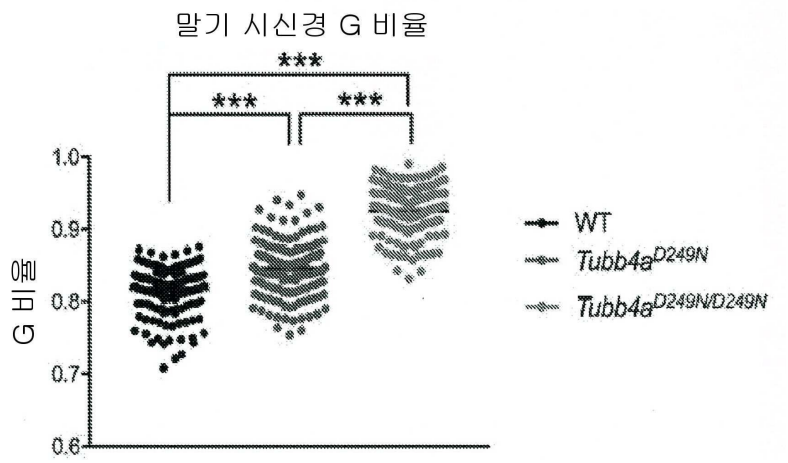
도면5c



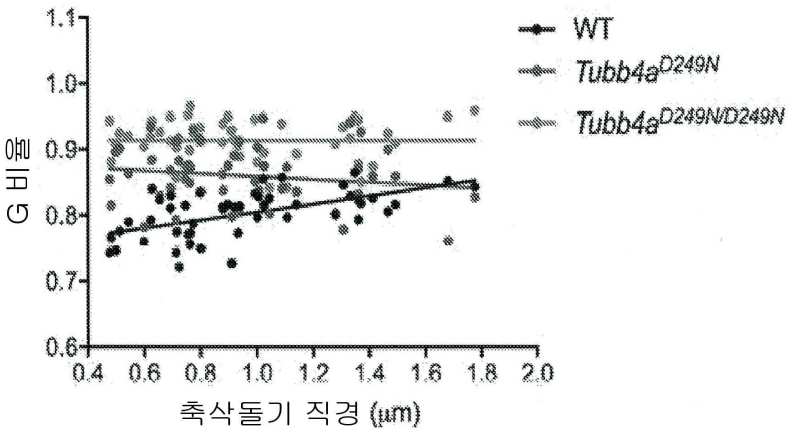
도면5d



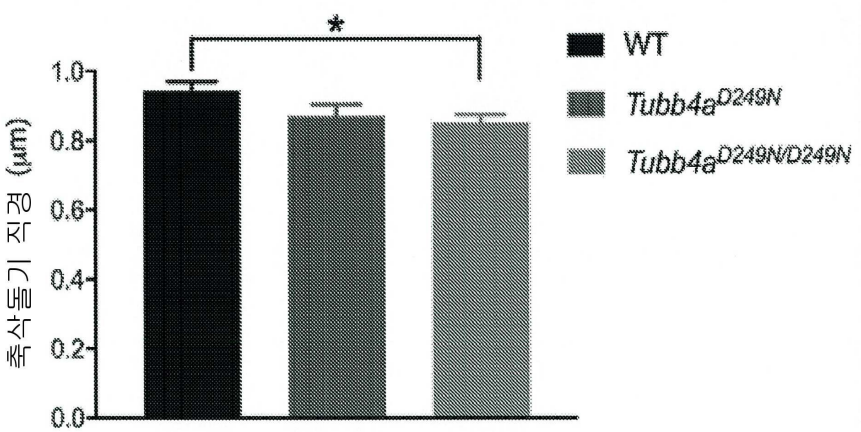
도면5e



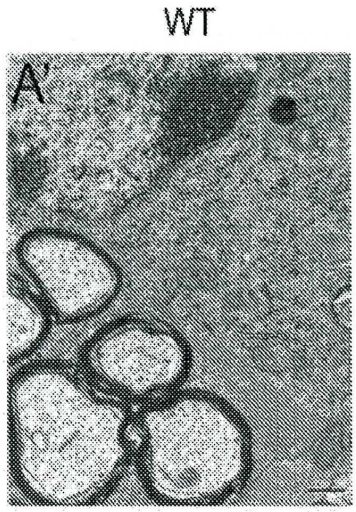
도면5f



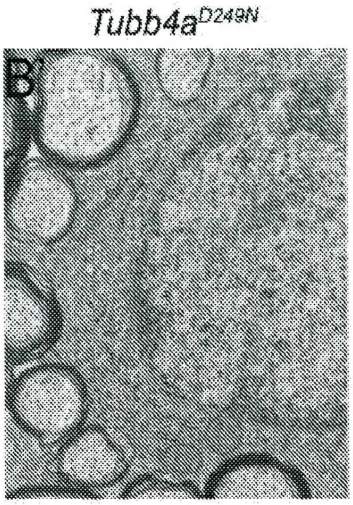
도면5g



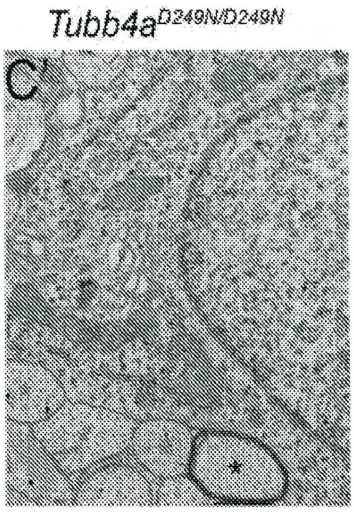
도면5h



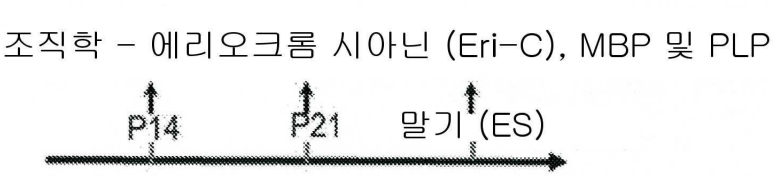
도면5i



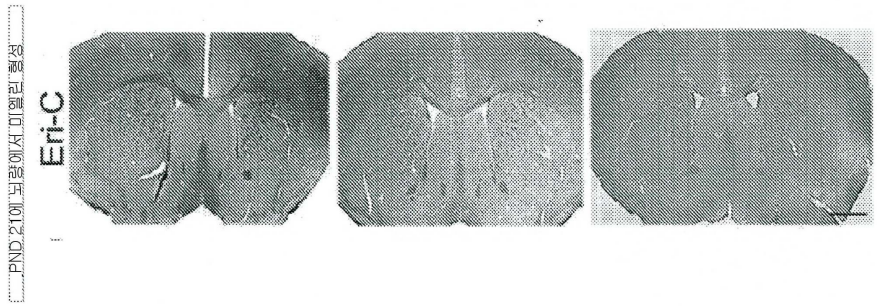
도면5j



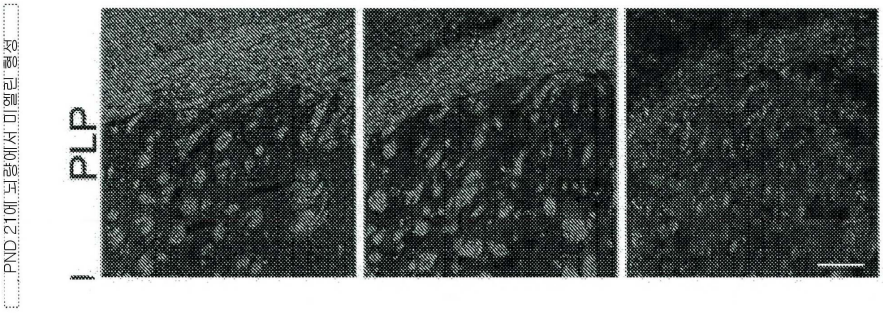
도면6a



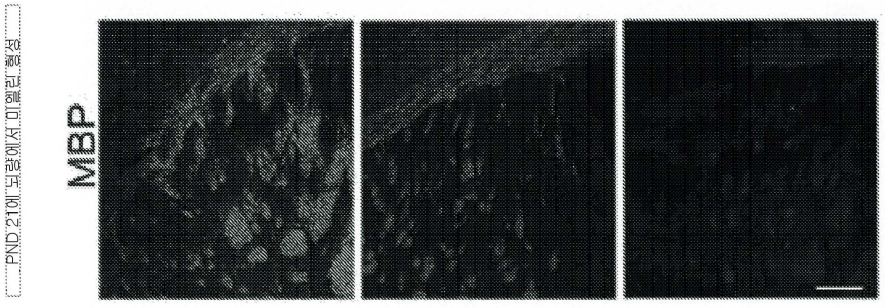
도면6b



도면6c



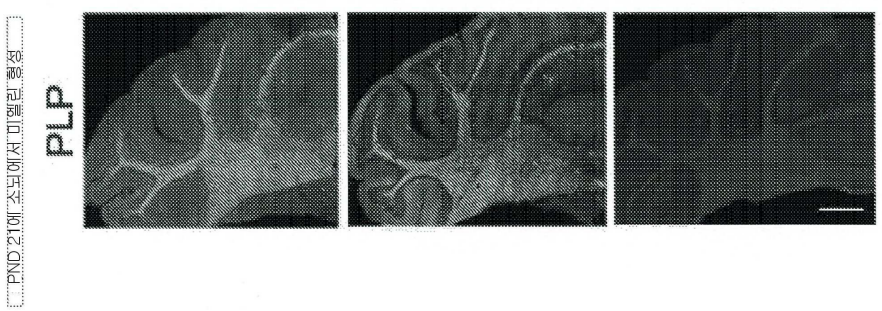
도면6d



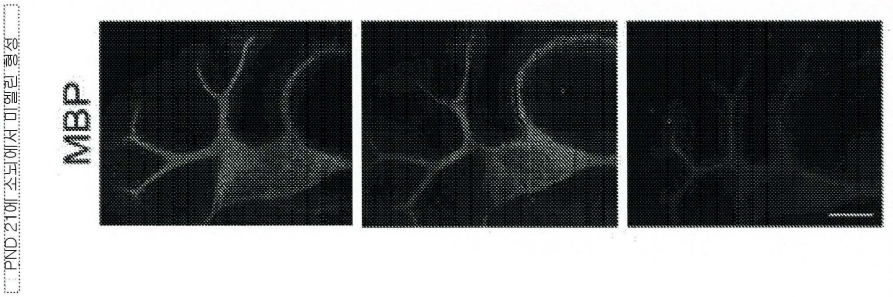
도면6e



도면6f



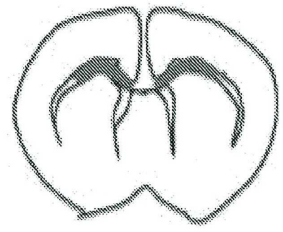
도면6g



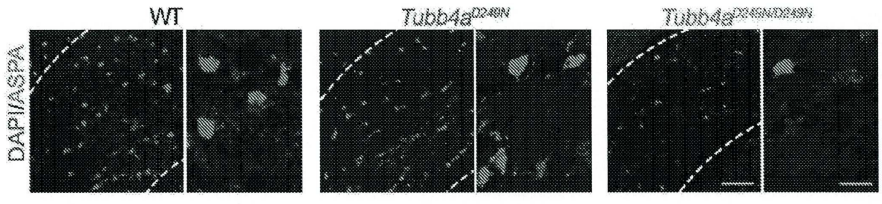
도면7a



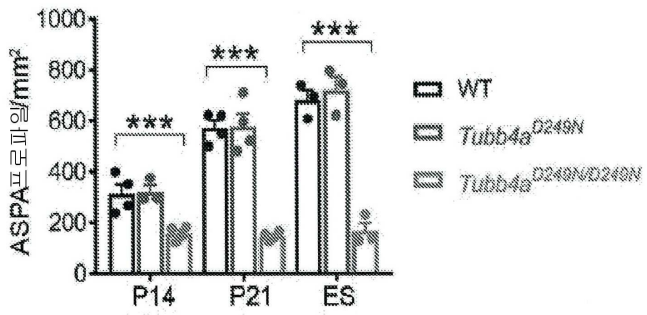
도면7b



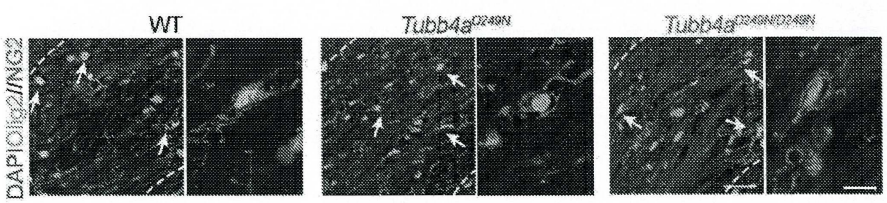
도면7c



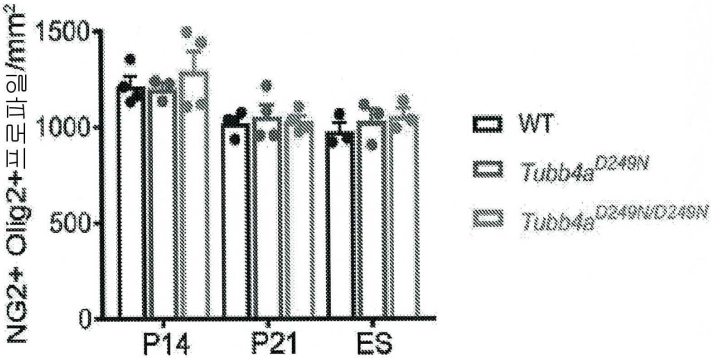
도면7d



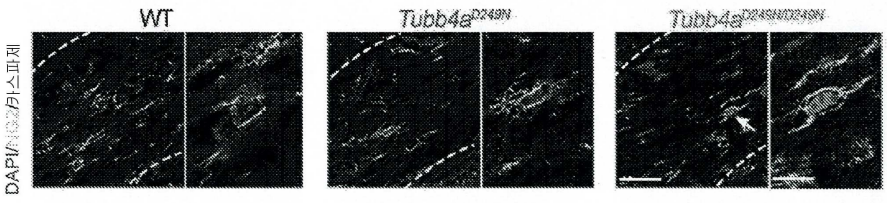
도면7e



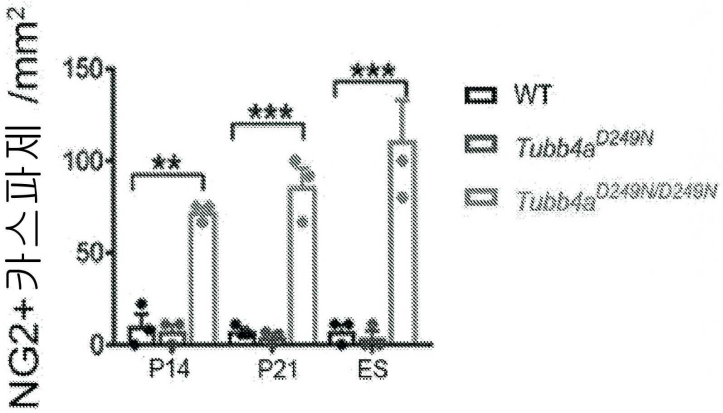
도면7f



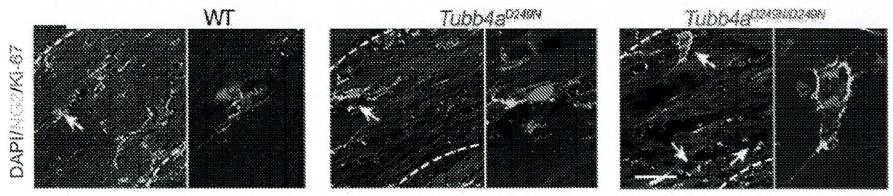
도면7g



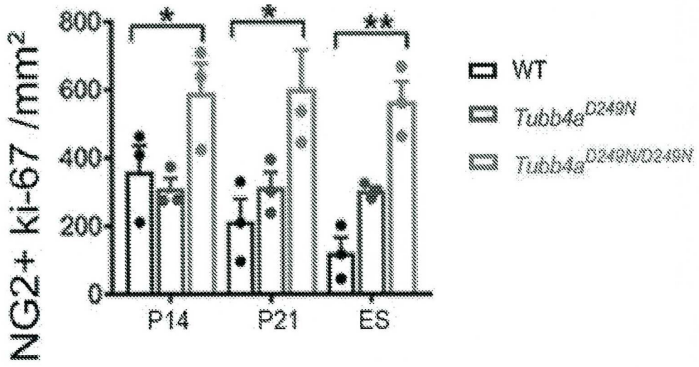
도면7h



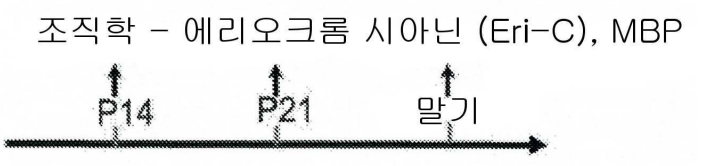
도면7i



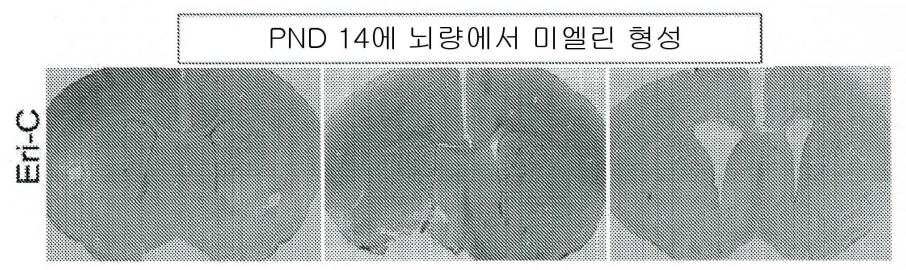
도면7j



도면8a



도면8b



도면8c

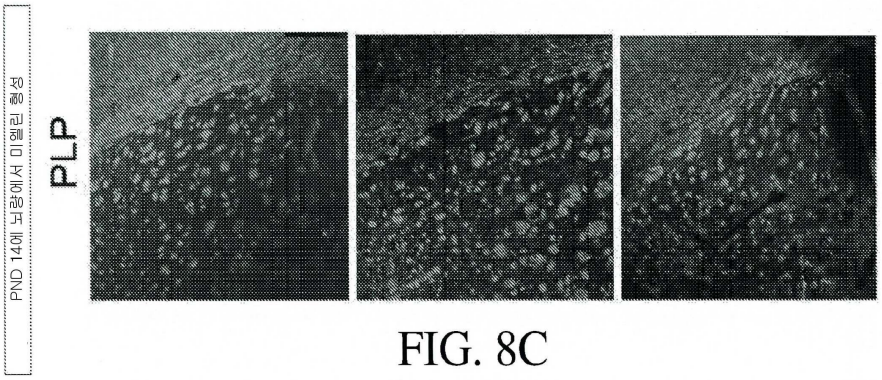
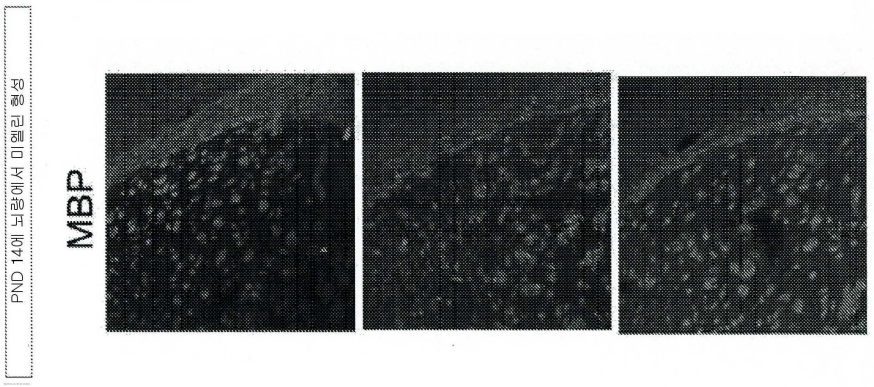


FIG. 8C

도면8d



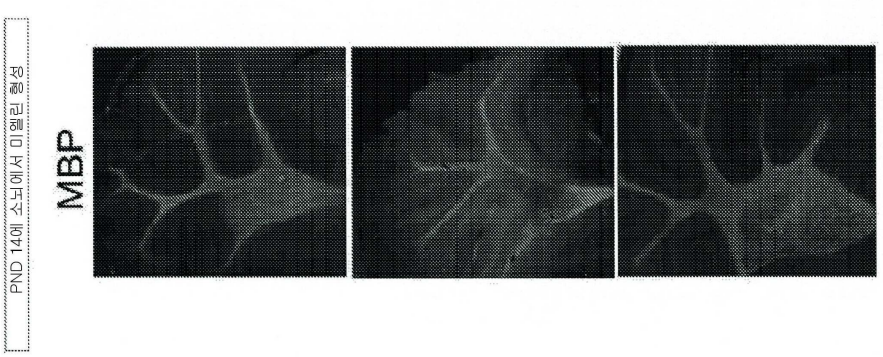
도면8e



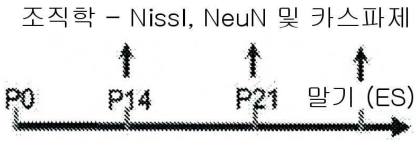
도면8f



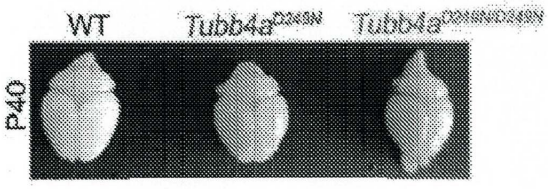
도면8g



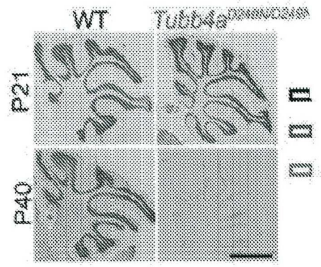
도면9a



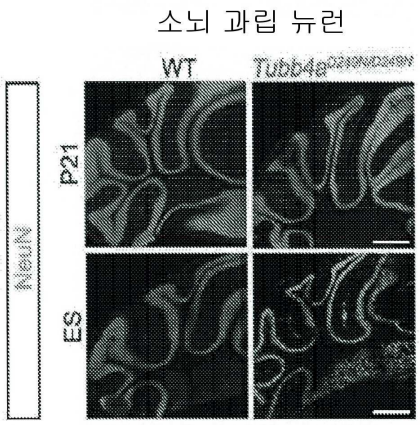
도면9b



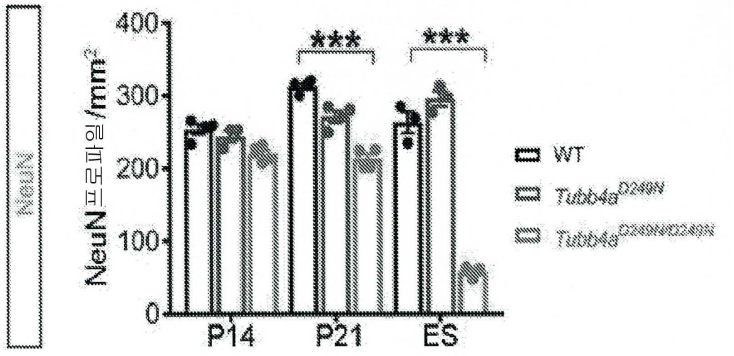
도면9c



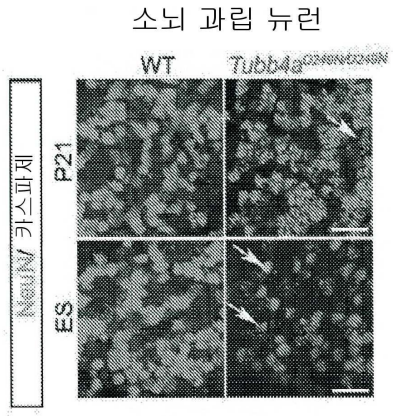
도면9d



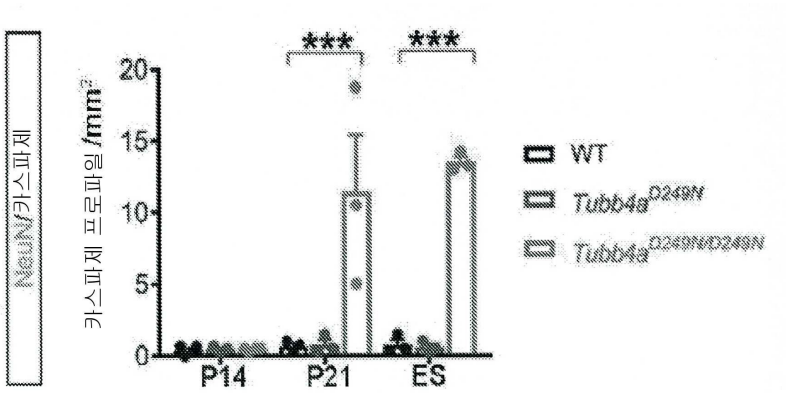
도면9e



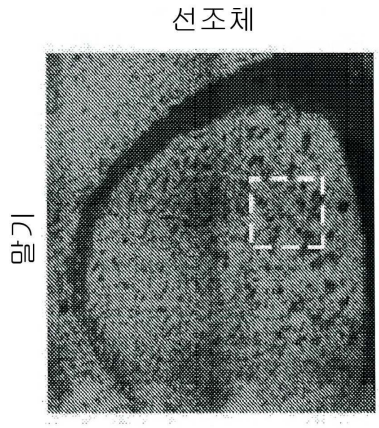
도면9f



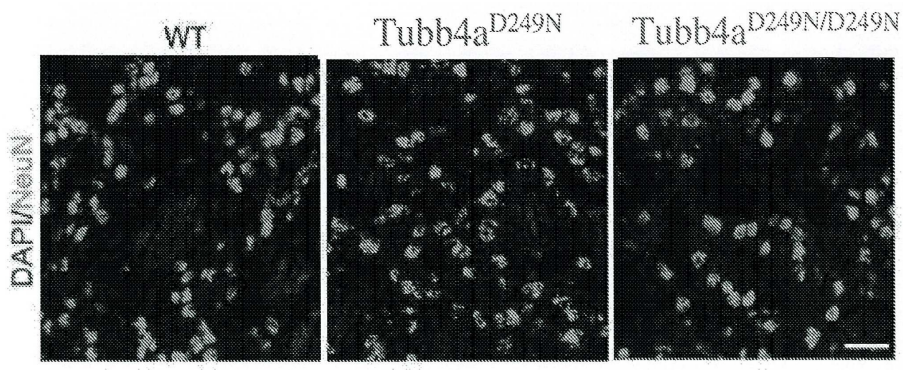
도면9g



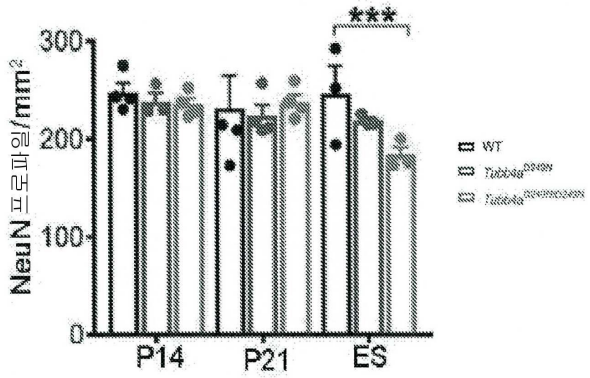
도면9h



도면9i



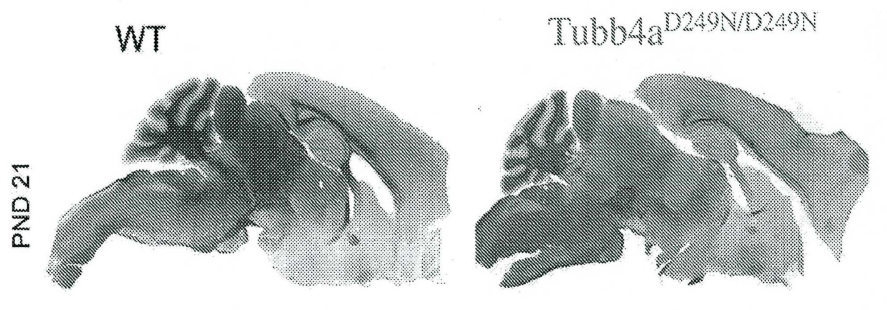
도면9j



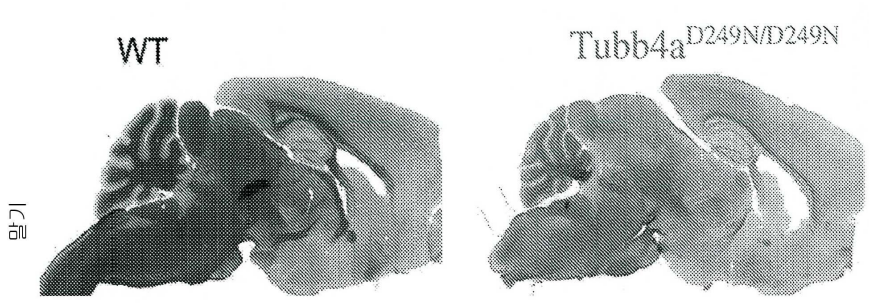
도면10a



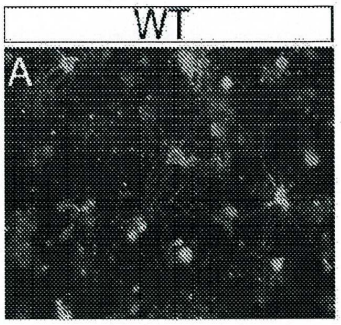
도면10b



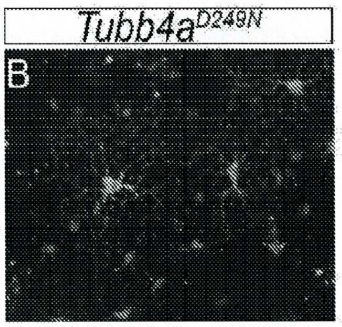
도면10c



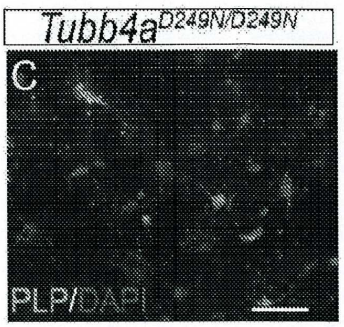
도면11a



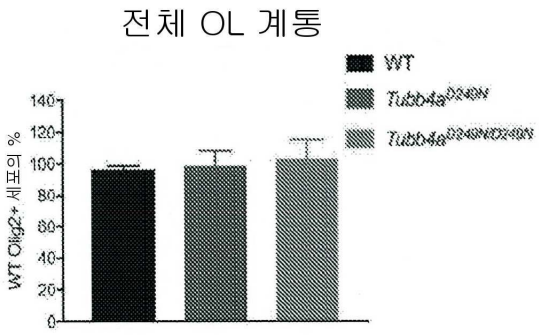
도면11b



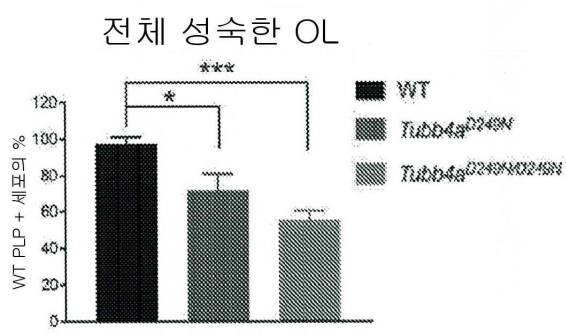
도면11c



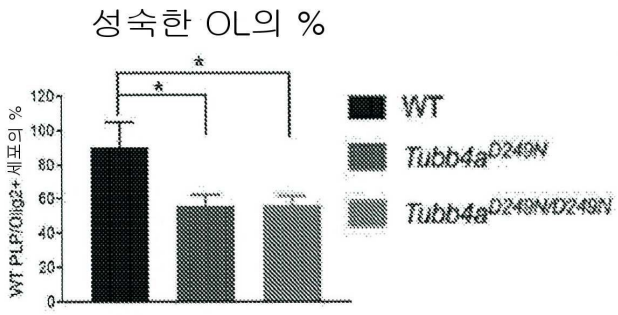
도면11d



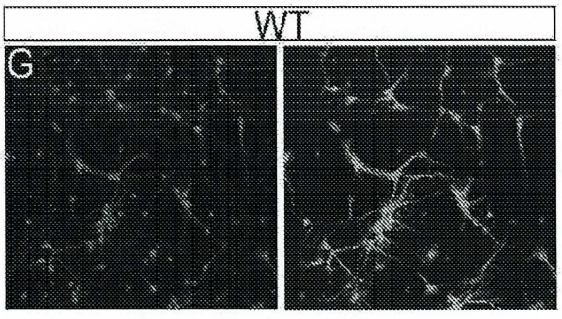
도면11e



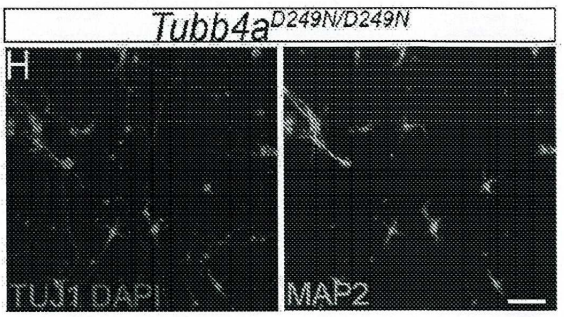
도면11f



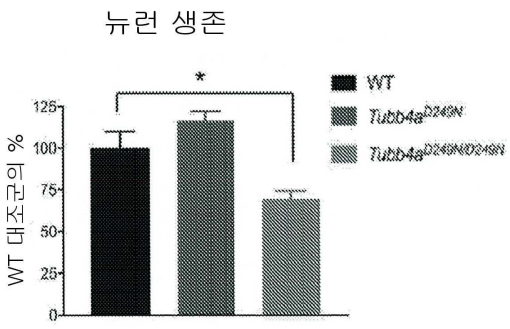
도면11g



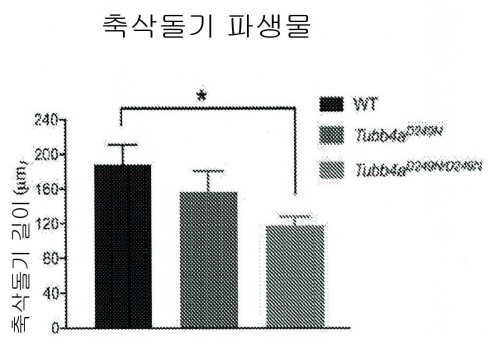
도면11h



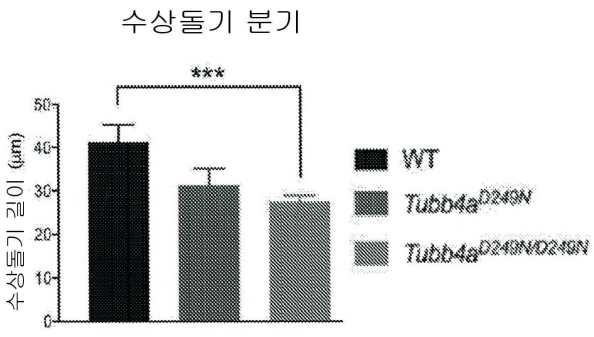
도면11i



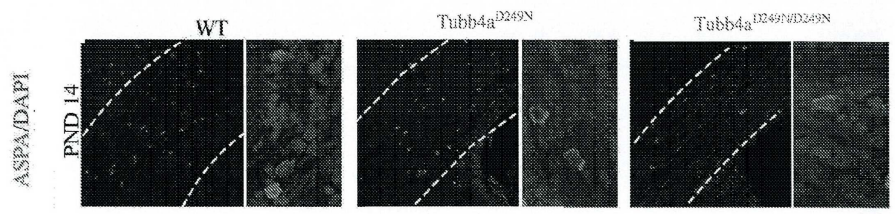
도면11j



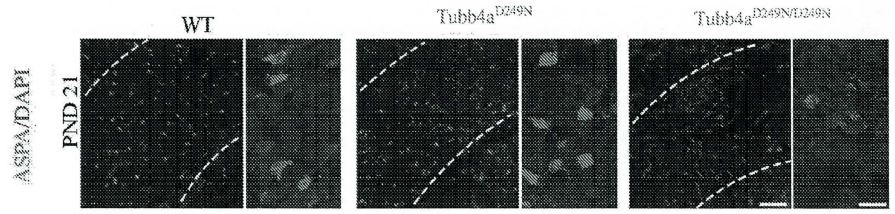
도면11k



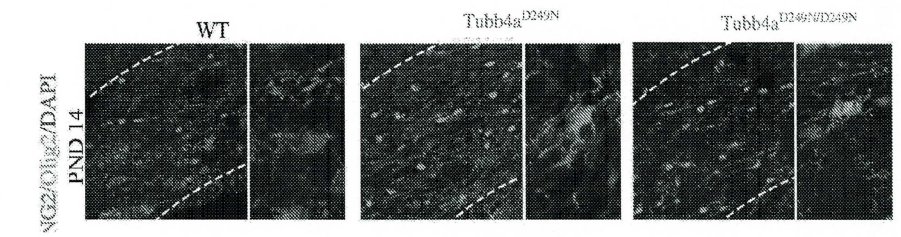
도면12a



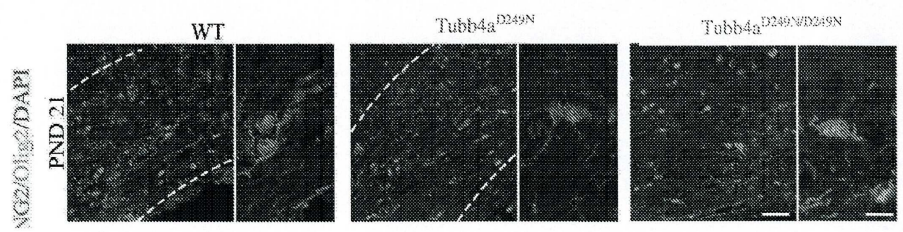
도면12b



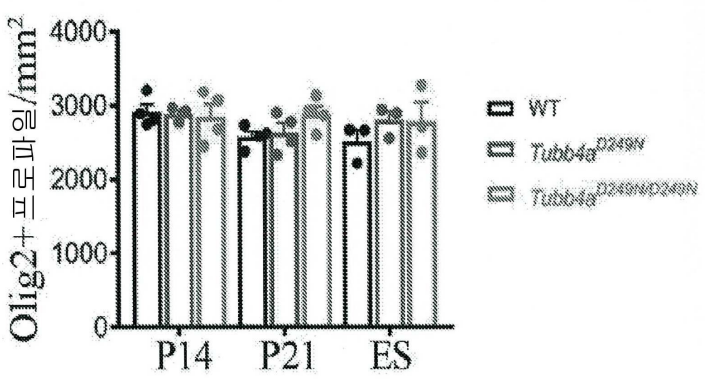
도면12c



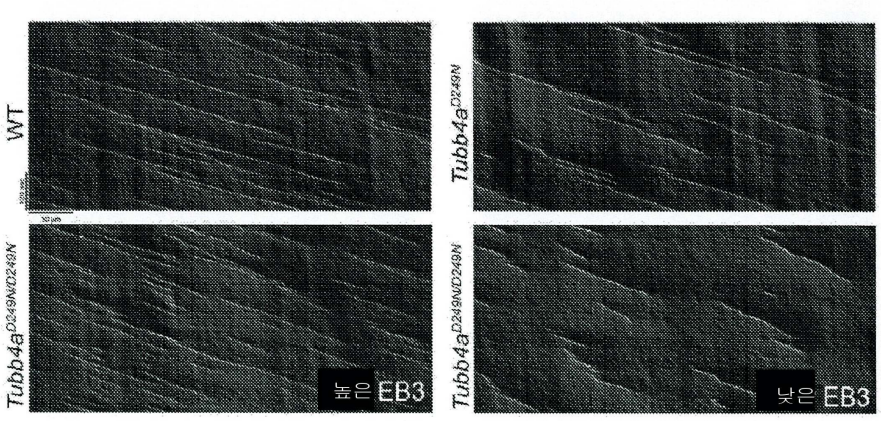
도면12d



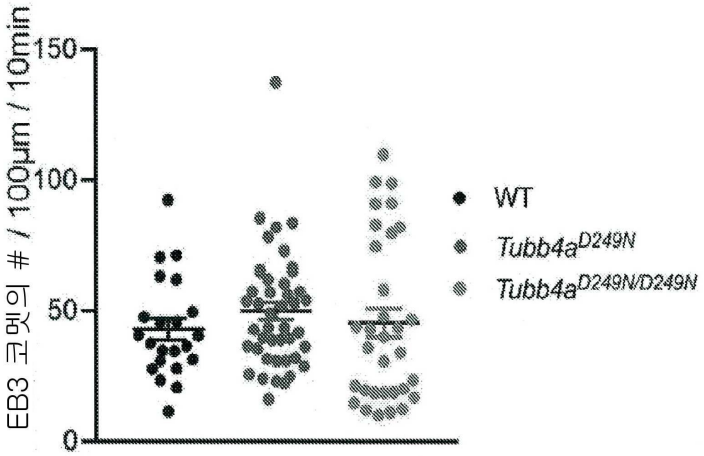
도면12e



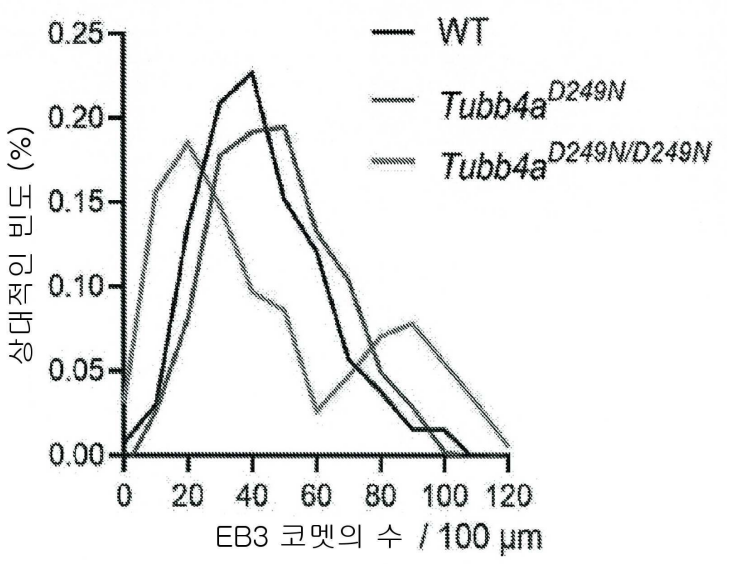
도면13a



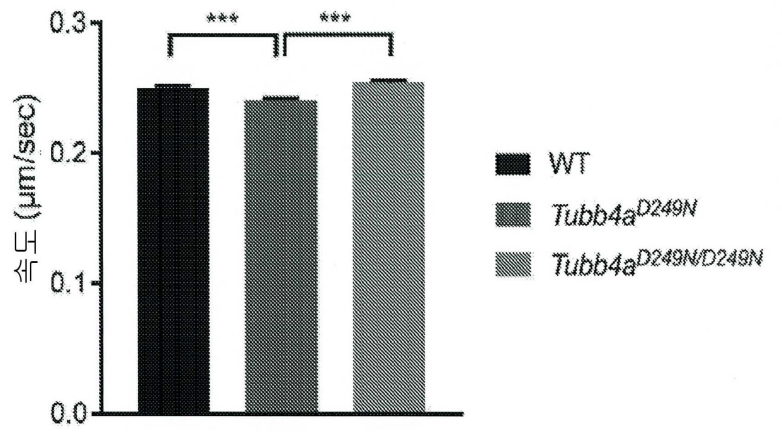
도면13b



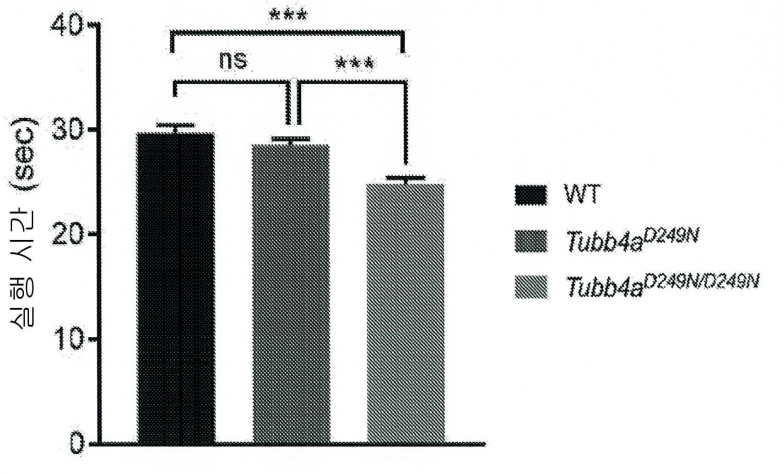
도면13c



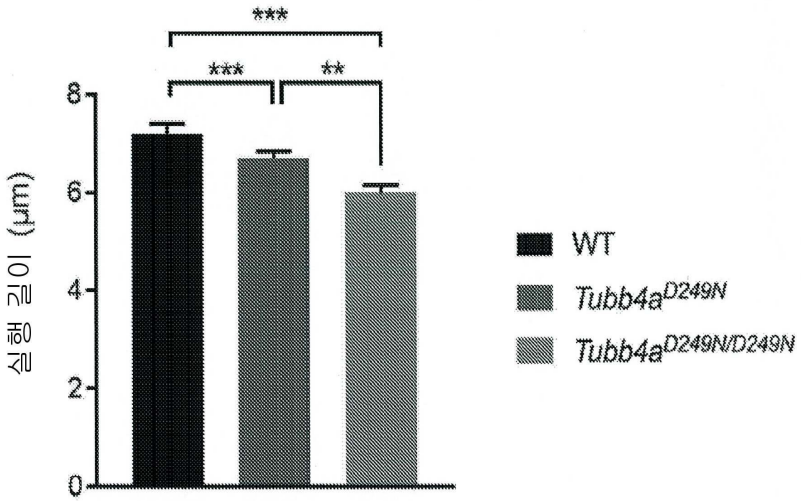
도면13d



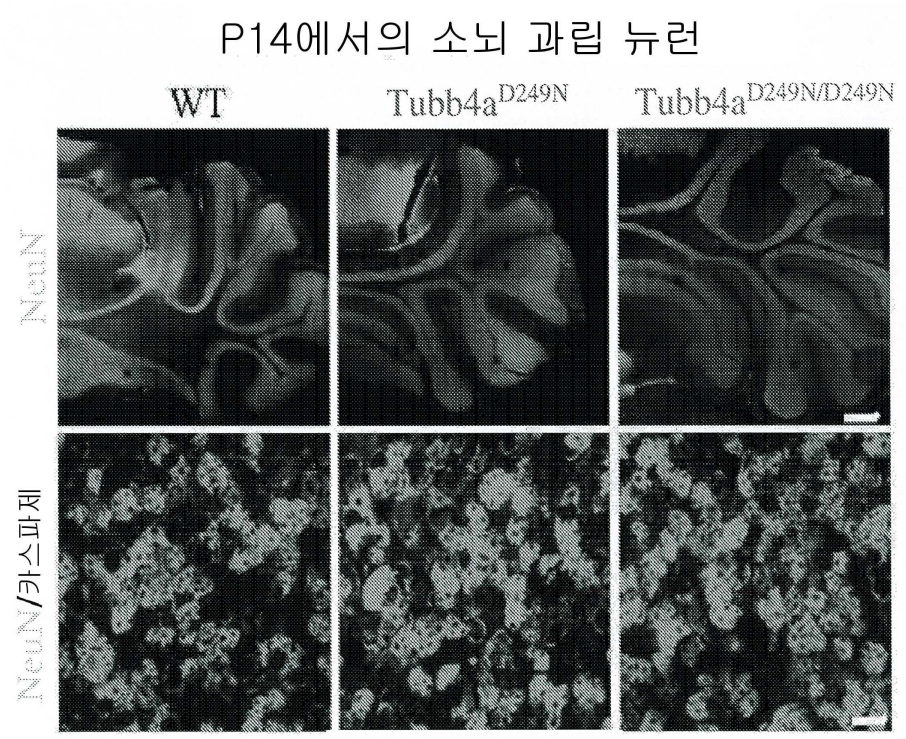
도면13e



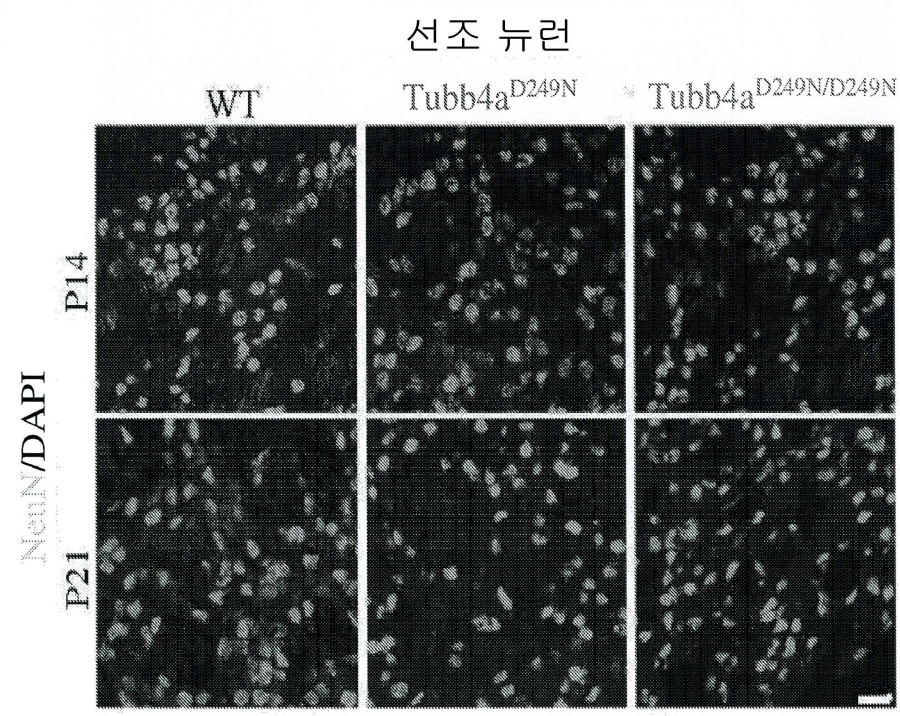
도면13f



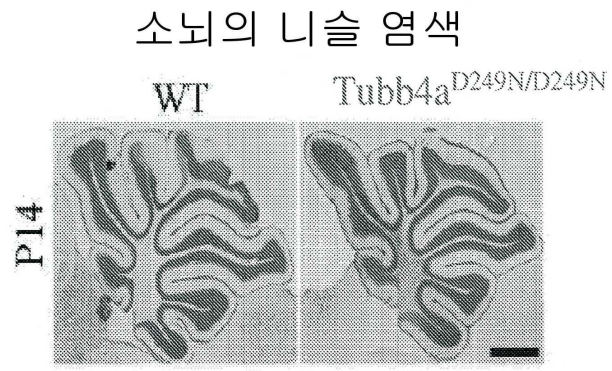
도면14a


P14에서의 소뇌 과립 뉴런
WT
Tubb4a^{D249N}
Tubb4a$^{D249N/D249N}$
NeuN
NeuN/카스파제

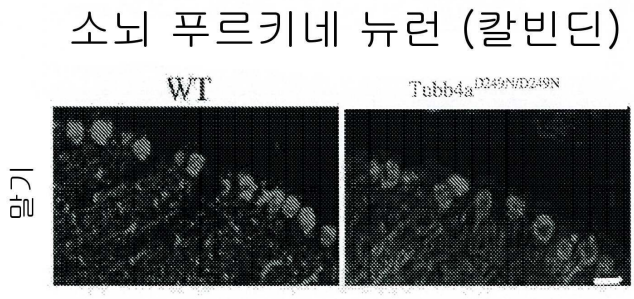
도면14b


선조 뉴런
WT
Tubb4a^{D249N}
Tubb4a$^{D249N/D249N}$
P14
P21
NeuN/DAPI

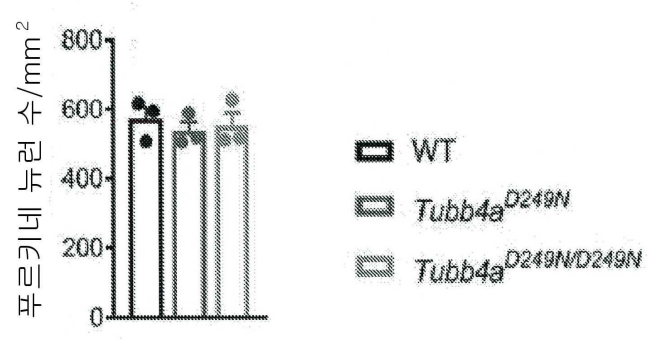
도면14c



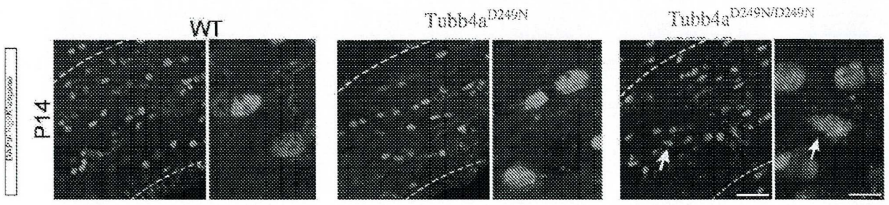
도면14d



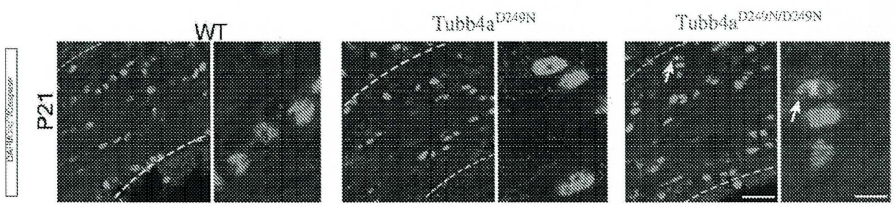
도면14e



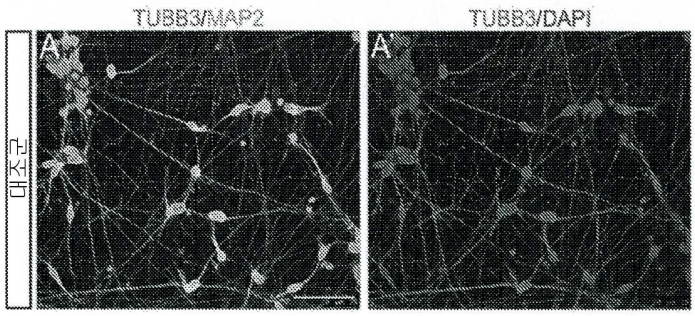
도면15a



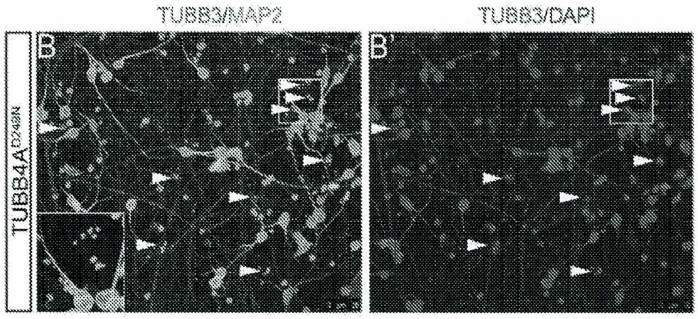
도면15b



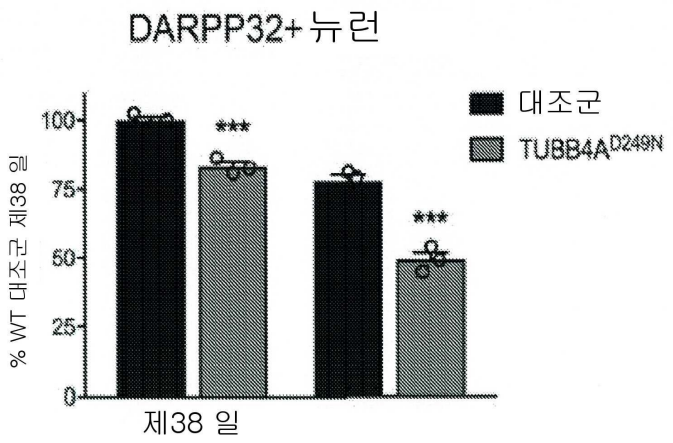
도면16a



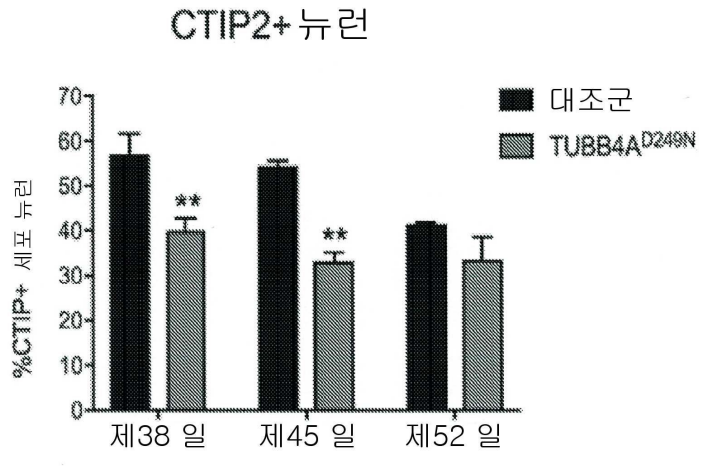
도면16b



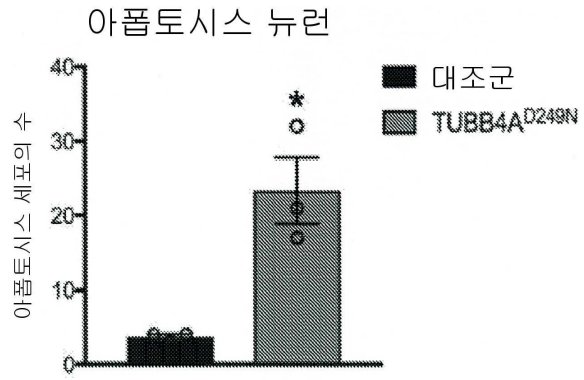
도면16c



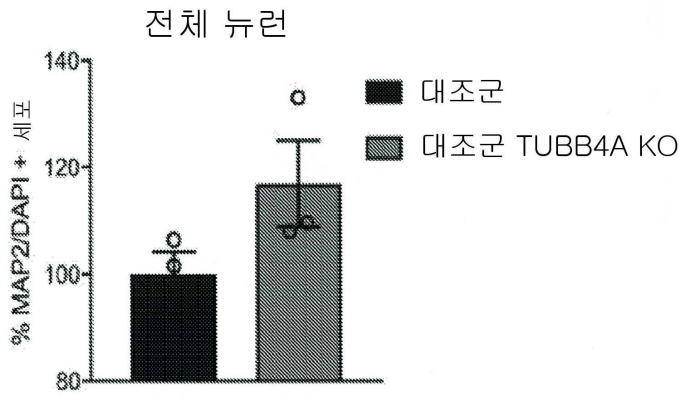
도면16d



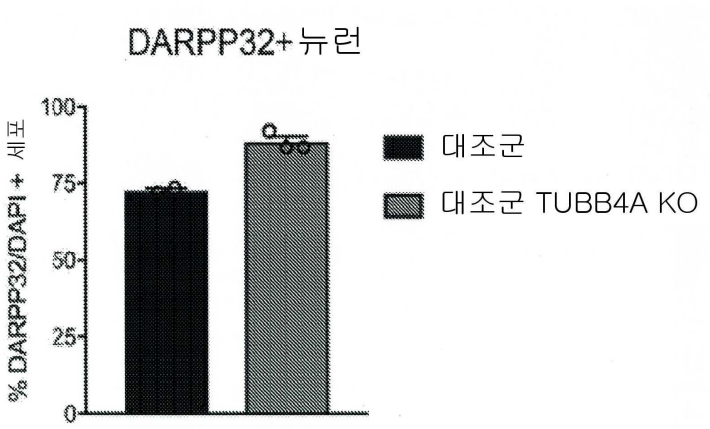
도면16e



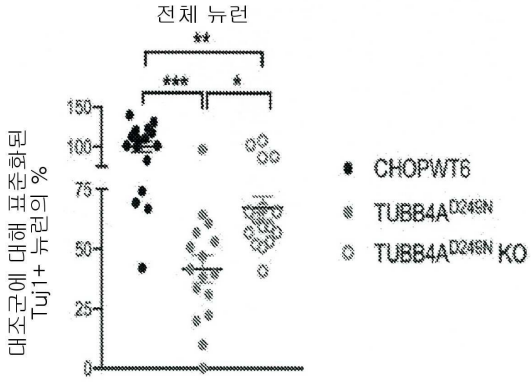
도면16f



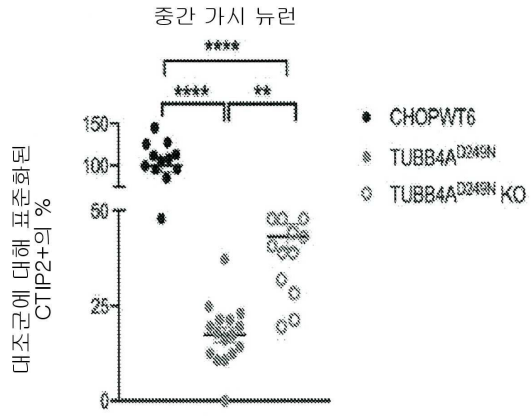
도면16g



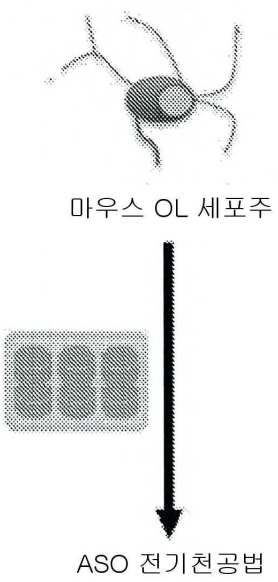
도면17a



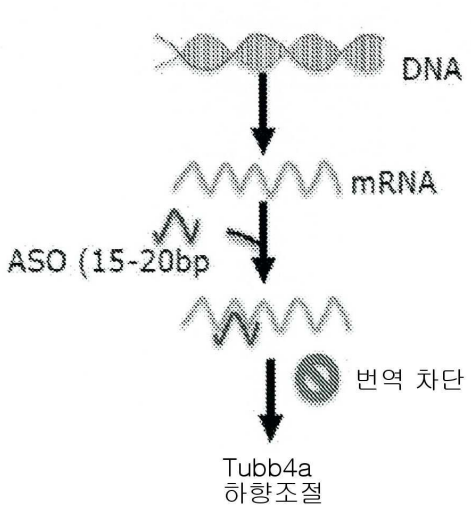
도면17b



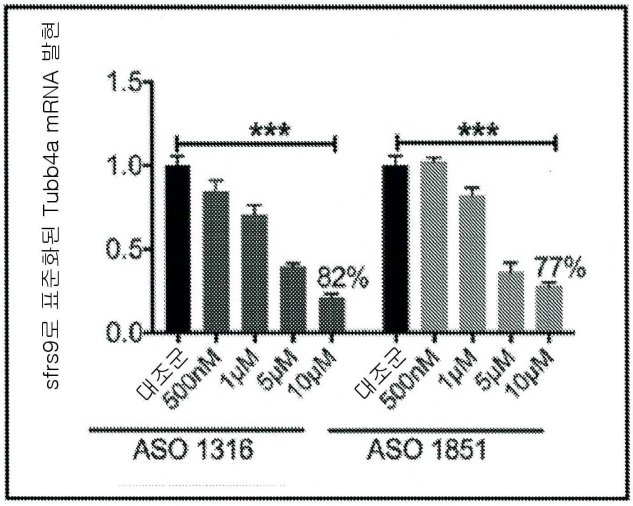
도면18a



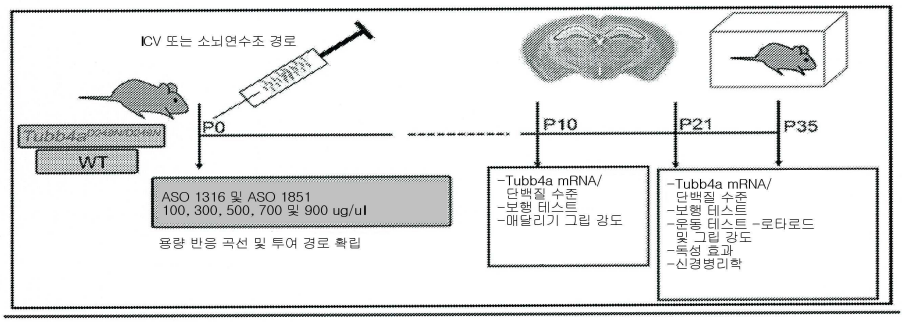
도면18b



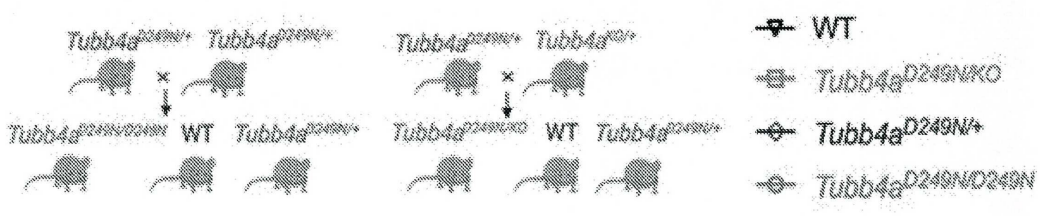
도면18c



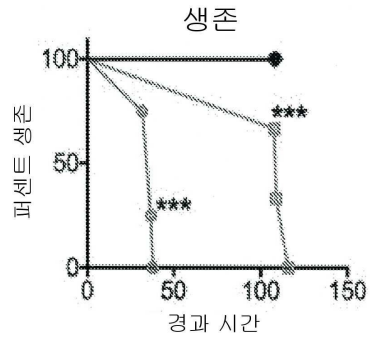
도면19



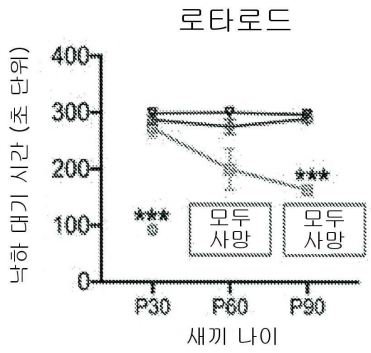
도면20a



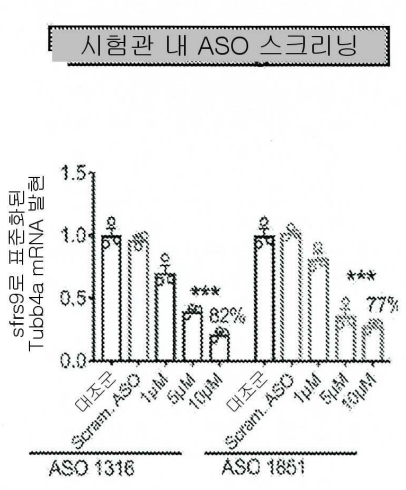
도면20b



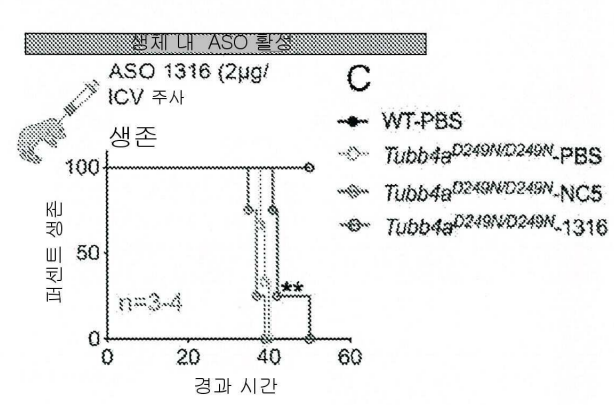
도면20c



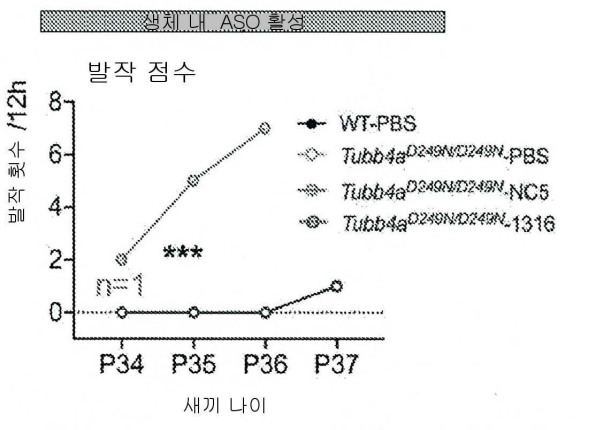
도면21a



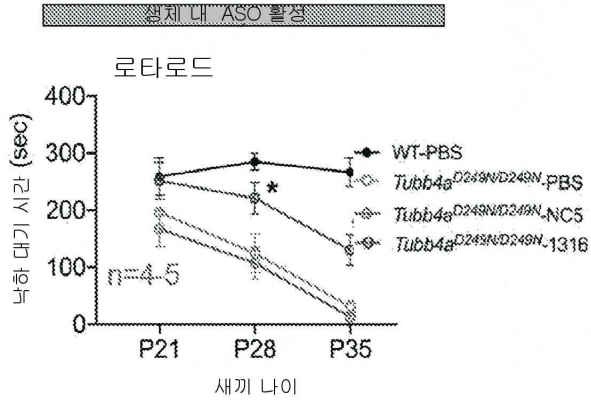
도면21b



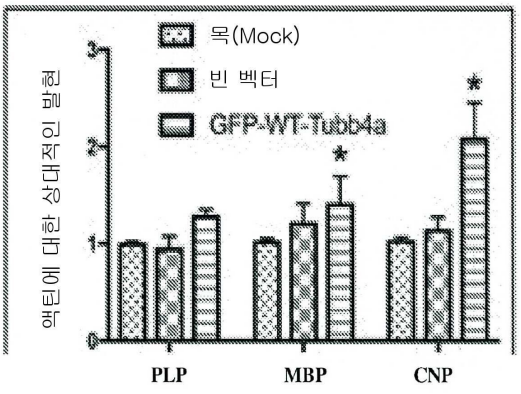
도면21c



도면21d



도면22



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Children's Hospital of Philadelphia

<120> Compositionsand Methods for the Treatment of Leukodystrophy and

Whole Animal and Cellular Models for the Identifying Efficacious Agents for Treatment of the Same

<130> CHOP-106.PCT

<150> US 62/845,637

<151> 2019-05-09

<150> US 62/924,910

<151> 2019-10-23

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASO 1316

<400> 1

acatacggct gtcttg 16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASO 1851

<400> 2

gatctaagaa ggtgga 16

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer

<400> 3

ccgagaggag tttccagaca gacaggatc 29

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer

<400> 4

gctctgcaca cttaacatct gctcg 25