(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0110149
(43) 공개일자 2017년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7025286
(22) 출원일자(국제) 2016년02월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년09월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/017207
(87) 국제공개번호 WO 2016/130589
국제공개일자 2016년08월18일
(30) 우선권주장
62/114,578 2015년02월10일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국, 메사추세츠주 02142, 캠브리지, 500 켄돌 스트리트
(72) 발명자
스타넥, 리사, 엠.
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
팔레르모, 아담
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 심미성

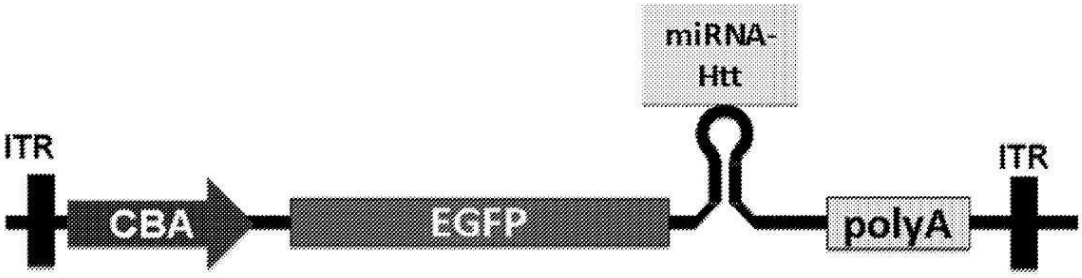
전체 청구항 수 : 총 246 항

(54) 발명의 명칭 **변이형 RNAi**

(57) 요 약

본 명세서에는 가이드 서열을 함유하는 제1 가닥 및 비-가이드 서열을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi 분자가 제공되며, 여기서 비-가이드 서열은 가이드 서열의 시드(seed) 영역의 반대쪽에, 예를 들어 절단 서열의 반대쪽에 벌지(bulge)를 함유한다. 일부 양태에서, 본 발명은 헌팅톤병을 치료하기 위한 RNAi를 제공한다. 또한, 본 명세서에는 상기 RNAi를 함유하는 발현 카세트, 벡터(예를 들어, rAAV 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 및 재조합 HSV 벡터), 세포, 바이러스 입자 및 약제학적 조성물이 제공된다. 추가로 본 명세서에는, 예를 들어 헌팅톤병을 치료하기 위한, 상기 RNAi의 용도와 관련된 방법 및 키트가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/533 (2013.01)
C12N 2710/10041 (2013.01)
C12N 2740/15041 (2013.01)

(72) 발명자
리차드, 브렌다
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
사르디, 세르지오, 파블로
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
오리어던, 캐서린
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
송, 안토니우스
미국 94568 캘리포니아주 더블린 코튼 우드 서클 6584 에이피티. 에프

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서,

a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체(duplex)를 형성하고;

b) 제1 가닥은 적어도 19개의 염기인 가이드(guide) 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드(seed) 영역을 포함하고;

c) 제2 가닥은 적어도 19개의 염기인 비-가이드(non-guide) 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+2) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지(bulge) 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 2

제1항에 있어서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 3

제1항에 있어서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N+2의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 5

제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서,

a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고;

b) 제1 가닥은 적어도 19개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고;

c) 제2 가닥은 적어도 19개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+1) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 6

제5항에 있어서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 7

제5항에 있어서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N+1의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 9

제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서,

a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고;

b) 제1 가닥은 적어도 19개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-

N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고;

c) 제2 가닥은 적어도 19개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-N 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 10

제9항에 있어서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 11

제9항에 있어서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1의 반대쪽에 있는, RNAi.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 가이드 영역 상에 상보적인 염기가 결여되어 있는 이중체의 비-가이드 가닥의 하나 이상의 염기에 의해 형성되며, 여기서 벌지는 가이드 가닥과 염기쌍을 형성하는 염기들에 의해 플랭킹(flanking)되어 있는, RNAi.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 1개 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 벌지는 1개 내지 3개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 제2 벌지를 포함하며, 여기서 제2 벌지는 제1 가닥 상에서 시드 영역의 3'에 위치한 가이드 영역에 위치하는, RNAi.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 이중체는 길이가 19개 내지 25개의 염기쌍 또는 19개 내지 23개의 염기쌍인, RNAi.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행(overhang) 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함하는, RNAi.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되어 있는, RNAi.

청구항 21

제20항에 있어서, RNA 링커는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 루프 구조는 4개 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 5'에서 3'로 제2 가닥, RNA 링커 및 제1 가닥을 포함하는, RNAi.

청구항 24

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 5'에서 3'로 제1 가닥, RNA 링커 및 제2 가닥을 포함하는, RNAi.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 오프-타겟(off-target) 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된, RNAi.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, RNAi.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, RNAi.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)인, RNAi.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 장애와 관련된 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, RNAi.

청구항 30

제29항에 있어서, 장애는 CNS 장애인, RNAi.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 장애는 리소좀 축적병(LSD), 헌팅톤병, 간질, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 피질기저핵 변성(CBD), 피질기저핵 신경절 변성(CBGD), 전두측두엽 치매(FTD), 다계통 위축증(MSA), 진행성 핵상 마비(PSP) 또는 뇌암인, RNAi.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 장애가 헌팅톤병인, RNAi.

청구항 33

제32항에 있어서, 폴리펩티드는 헌팅틴(huntingtin)인, RNAi.

청구항 34

제33항에 있어서, 헌팅틴은 헌팅톤병과 관련된 돌연변이를 포함하는, RNAi.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 영역은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는, RNAi.

청구항 36

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 영역은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는, RNAi.

청구항 37

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 영역은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는, RNAi.

청구항 38

RNAi의 비-가이드 영역에 벌지를 도입하여 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi를 생성시키는 단계를 포함하여 RNAi의 독성을 감소시키는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 작제물.

청구항 40

제39항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드(scaffold)를 포함하는, 발현 작제물.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는, 발현 작제물.

청구항 42

제41항에 있어서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터, 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터 및 13-액틴 프로모터로부터 선택되는, 발현 작제물.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 발현 작제물.

청구항 44

제43항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호 또는 HSV TK pA인, 발현 작제물.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 46

제45항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터인, 벡터.

청구항 47

제46항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 48

제47항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래되는, 벡터.

청구항 49

제47항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래되는, 벡터.

청구항 50

제46항에 있어서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 51

제50항에 있어서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크(Marburg) 바이러스, 모칼라(Mokala) 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된(pseudotyped), 렌티바이러스로부터 유래되는, 벡터.

청구항 52

제46항에 있어서, 벡터는 rHSV 벡터인, 벡터.

청구항 53

제52항에 있어서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래되는, 벡터.

청구항 54

제46항에 있어서, 벡터는 rAAV 벡터인, 벡터.

청구항 55

제54항에 있어서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(inverted terminal repeat, ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있는, rAAV 벡터.

청구항 56

제55항에 있어서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있는, rAAV 벡터.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, AAV ITR은 AAV2 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 59

제54항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 스터퍼(stuffer) 핵산을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 60

제59항에 있어서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치하는, rAAV 벡터.

청구항 61

제54항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 자기 상보성 rAAV 벡터인, rAAV 벡터.

청구항 62

제61항에 있어서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있는, rAAV 벡터.

청구항 63

제62항에 있어서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열(terminal resolution sequence)의 돌연변이를 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 64

제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 세포.

청구항 65

제45항의 벡터를 포함하는 바이러스 입자로서, 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는(encapsidating) AAV 입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자인, 바이러스 입자.

청구항 66

제65항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자인, 바이러스 입자.

청구항 67

제66항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 68

제66항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 69

제66항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자인, 바이러스 입자.

청구항 70

제69항에 있어서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 71

제66항에 있어서, 바이러스 입자는 HSV 입자인, 바이러스 입자.

청구항 72

제71항에 있어서, HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자인, 바이러스 입자.

청구항 73

제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자.

청구항 74

제73항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 76

제73항 또는 제74항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 77

제76항에 있어서, ITR은 AAV2로부터 유래되고, rAAV 입자의 캡시드는 AAV1으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 78

제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자 또는 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 80

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제54항 중 어느 한 항의 벡터; 제55항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여, 포유동물 질병에서 폴리펩티드의 발현을 저해하거나 감소시키는 방법으로서, RNAi는 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 방법.

청구항 81

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터; 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여, 포유동물의 세포에서 폴리펩티드의 축적을 저해하는 방법으로서, RNAi는 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 방법.

청구항 82

제80항 또는 제81항에 있어서, 포유동물은 인간인, 방법.

청구항 83

제80항 내지 제82항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터; 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지

제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물의 용도.

청구항 84

제80항 내지 제82항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터; 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물.

청구항 85

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터; 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물을 포함하는, 포유동물에서 RNA 간섭을 유도하기 위한 키트.

청구항 86

제85항에서, 포유동물은 인간인, 키트.

청구항 87

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 RNAi; 제39항 내지 제44항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제45항 내지 제53항 중 어느 한 항의 벡터; 제54항 내지 제63항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제65항 내지 제72항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제73항 내지 제77항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제78항 또는 제79항의 조성물을 포함하는, 제80항 내지 제82항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 키트.

청구항 88

서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서, 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성하는, RNAi.

청구항 89

제88항에 있어서, 가이드 영역은 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 90

제88항에 있어서, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된, RNAi.

청구항 92

제88항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, RNAi.

청구항 93

제88항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 서열은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, RNAi.

청구항 94

서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서, 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성하는, RNAi.

청구항 95

서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서, 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성하는, RNAi.

청구항 96

제 항에 있어서, 가이드 영역은 SEQ ID NO:15와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하고, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:16과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, SEQ ID NO:17과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열 및 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:18과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 97

제88항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 영역의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 가이드 영역에서 벌지를 형성하는, RNAi.

청구항 98

제88항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 이중체는 길이가 19개 내지 25개의 염기쌍 또는 19개 내지 23개의 염기쌍인, RNAi.

청구항 99

제88항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함하는, RNAi.

청구항 100

제88항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되어 있는, RNAi.

청구항 101

제100항에 있어서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 13개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 104

제88항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 105

제88항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNAi.

청구항 106

제88항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)인, RNAi.

청구항 107

제88항 내지 제106항 중 어느 한 항의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 작제물.

청구항 108

제107항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함하는, 발현 작제물.

청구항 109

제108항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miR-155 스캐폴드를 포함하는, 발현 작제물.

청구항 110

제107항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는, 발현 작제물.

청구항 111

제110항에 있어서, 프로모터는 포유동물의 뇌에서 RNAi를 발현시킬 수 있는, 발현 작제물.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터, 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터 및 13-액틴 프로모터로부터 선택되는, 발현 작제물.

청구항 113

제110항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴 프로모터인, 발현 작제물.

청구항 114

제110항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 발현 작제물.

청구항 115

제114항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 발현 작제물.

청구항 116

제107항 내지 제115항 중 어느 한 항의 발현 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 117

제116항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터인, 벡터.

청구항 118

제117항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 119

제118항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4,

AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래되는, 벡터.

청구항 120

제119항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래되는, 벡터.

청구항 121

제117항에 있어서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 122

제121항에 있어서, 재조합 렌티바이러스 벡터는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 렌티바이러스로부터 유래되는, 벡터.

청구항 123

제117항에 있어서, 벡터는 rHSV 벡터인, 벡터.

청구항 124

제123항에 있어서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래되는, 벡터.

청구항 125

제117항에 있어서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터인, 벡터.

청구항 126

제125항에 있어서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있는, rAAV 벡터.

청구항 127

제126항에 있어서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있는, rAAV 벡터.

청구항 128

제126항 또는 제127항에 있어서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 129

제125항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, AAV ITR은 AAV2 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 130

제129항에 있어서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 131

제130항에 있어서, 프로모터는 CBA 프로모터인, rAAV 벡터.

청구항 132

제130항 또는 제131항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, rAAV 벡터.

청구항 133

제130항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, CBA 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 134

제133항에 있어서, 벡터는 스터퍼 핵산을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 135

제133항에 있어서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 핵산을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 136

제134항 또는 제135항에 있어서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치하는, rAAV 벡터.

청구항 137

제125항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 138

제125항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 139

제125항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 자기 상보성 벡터인, rAAV 벡터.

청구항 140

제139항에 있어서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있는, rAAV 벡터.

청구항 141

제140항에 있어서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 142

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 세포.

청구항 143

제142항에 있어서, 세포는 중추 신경계(CNS) 세포인, 세포.

청구항 144

제116항의 벡터를 포함하는 바이러스 입자로서, 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는 AAV 입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자인, 바이러스 입자.

청구항 145

제144항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자인, 바이

러스 입자.

청구항 146

제145항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 147

제146항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 148

제144항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자인, 바이러스 입자.

청구항 149

제148항에 있어서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 150

제144항에 있어서, 바이러스 입자는 HSV 입자인, 바이러스 입자.

청구항 151

제150항에 있어서, HSV 입자는, rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자인, 바이러스 입자.

청구항 152

제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자.

청구항 153

제141항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV2 V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV 또는 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 154

제152항 또는 제153항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 155

제152항 또는 제153항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 156

제152항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 157

제156항에 있어서, rAAV 바이러스 입자는 AAV1 캡시드를 포함하고, 벡터는 AAV2 ITR을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 158

제144항 내지 제151항 중 어느 한 항의 바이러스 입자 또는 제152항 내지 제157항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는 조성물.

청구항 159

제158항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 160

제158항 또는 제159항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법.

청구항 161

제158항 또는 제159항의 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법.

청구항 162

제158항 또는 제159항의 약제학적 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법.

청구항 163

서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법.

청구항 164

서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법.

청구항 165

서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법.

청구항 166

제163항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 167

제163항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 168

제163항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산은 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된, 방법.

청구항 169

제163항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, 방법.

청구항 170

제163항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는, 방법.

청구항 171

서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법.

청구항 172

서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법.

청구항 173

서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법.

청구항 174

제171항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:15와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지하는, 방법.

청구항 175

제171항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:16와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지하는, 방법.

청구항 176

서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법.

청구항 177

서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법.

청구항 178

서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법.

청구항 179

제176항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:17과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지하는, 방법.

청구항 180

제176항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:18과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지하는, 방법.

청구항 181

제163항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는, 방법.

청구항 182

제163항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 이중체는 길이가 18개 내지 25개의 염기쌍인, 방법.

청구항 183

제163항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 184

제163항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA에 의해 연결되어 있는, 방법.

청구항 185

제163항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드 또는 4개 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 186

제163항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 13개의 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 187

제163항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 188

제163항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 189

제163항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi의 제1 가닥은 제2 가닥의 5'에 있는, 방법.

청구항 190

제163항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi의 제2 가닥은 제1 가닥의 5'에 있는, 방법.

청구항 191

제163항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 발현 작제물 상에서 인코딩되는, 방법.

청구항 192

제163항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함하는, 방법.

청구항 193

제192항에 있어서, miRNA 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드인, 방법.

청구항 194

제163항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는, 방법.

청구항 195

제194항에 있어서, 프로모터는 포유동물의 뇌에서 RNAi를 발현시킬 수 있는, 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터 및 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터로부터 선택되는, 방법.

청구항 197

제194항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴 프로모터인, 방법.

청구항 198

제167항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 199

제174항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 방법.

청구항 200

제191항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 작제물은 벡터에 의해 인코딩되는, 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터인, 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터인, 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래되는, 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래되는, 방법.

청구항 205

제201항에 있어서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터인, 방법.

청구항 206

제205항에 있어서, 재조합 렌티바이러스 벡터는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 렌티바이러스로부터 유래되는, 방법.

청구항 207

제201항에 있어서, 벡터는 rHSV 벡터인, 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래되는, 방법.

청구항 209

제201항에 있어서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터인, 방법.

청구항 210

제209항에 있어서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있는, 방법.

청구항 211

제210항에 있어서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있는, 방법.

청구항 212

제210항 또는 제211항에 있어서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR인, 방법.

청구항 213

제210항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, AAV ITR은 AAV2 ITR인, 방법.

청구항 214

제213항에 있어서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함하는, 방법.

청구항 215

제214항에 있어서, 프로모터는 CBA 프로모터인, 방법.

청구항 216

제214항 또는 제215항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 방법.

청구항 217

제213항에 있어서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, CBA 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함하는, 방법.

청구항 218

제217항에 있어서, 벡터는 스터퍼 핵산을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 219

제218항에 있어서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 220

제218항 또는 제219항에 있어서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치하는, 방법.

청구항 221

제214항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 222

제214항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 223

제209항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 자기 상보성 벡터인, 방법.

청구항 224

제223항에 있어서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있는, 방법.

청구항 225

제224항에 있어서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함하는, 방법.

청구항 226

제200항 또는 제201항에 있어서, 벡터는 rAAV 입자에 캡시드화되거나, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자에 캡시드화되거나, 재조합 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자에 캡시드화되거나, 재조합 HSV 벡터는 HSV에 캡시드화되는, 방법.

청구항 227

제226항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자인, 방법.

청구항 228

제227항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 229

제228항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함하는, 방법.

청구항 230

제226항에 있어서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자인, 방법.

청구항 231

제230항에 있어서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 232

제226항에 있어서, 바이러스 입자는 HSV 입자인, 방법.

청구항 233

제232항에 있어서, HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자인, 방법.

청구항 234

제209항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터는 재조합 AAV 입자에 캡시드화되는, 방법.

청구항 235

제234항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV2 V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV 또는 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 236

제234항 또는 제235항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

청구항 237

제234항 또는 제235항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

청구항 238

제234항 또는 제235항에 있어서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 239

제237항에 있어서, rAAV 바이러스 입자는 AAV1 캡시드를 포함하고, 벡터는 AAV2 ITR을 포함하는, 방법.

청구항 240

제2226항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 제226항 내지 제233항 중 어느 한 항의 바이러스 입자 또는 제234항 내지 제239항 중 어느 한 항의 rAAV 입자가 조성물로 존재하는, 방법.

청구항 241

제240항에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 242

제160항 내지 제241항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 제86항 내지 제106항 중 어느 한 항의 RNAi; 제96항 내지 제104항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제116항 내지 제124항 중 어느 한 항의 벡터; 제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제144항 내지 제151항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제152항 내지 제157항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제158항 또는 제159항의 조성물의 용도.

청구항 243

제160항 내지 제241항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한, 제86항 내지 제106항 중 어느 한 항의 RNAi; 제107항 내지 제115항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제116항 내지 제124항 중 어느 한 항의 벡터; 제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제144항 내지 제151항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제152항 내지 제157항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제158항 또는 제159항의 조성물.

청구항 244

제86항 내지 제106항 중 어느 한 항의 RNAi; 제107항 내지 제115항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제116항 내지

제124항 중 어느 한 항의 벡터; 제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제144항 내지 제151항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제152항 내지 제157항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제158항 또는 제159항의 조성물을 포함하는, 헌팅톤병에 걸린 포유동물에서 RNA 간섭을 유도하기 위한 키트.

청구항 245

제244항에 있어서, 포유동물은 인간인, 키트.

청구항 246

제160항 내지 제241항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 제86항 내지 제106항 중 어느 한 항의 RNAi; 제107항 내지 제115항 중 어느 한 항의 발현 작제물; 제116항 내지 제124항 중 어느 한 항의 벡터; 제125항 내지 제141항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 제144항 내지 제151항 중 어느 한 항의 바이러스 입자; 제152항 내지 제157항 중 어느 한 항의 rAAV 입자; 또는 제158항 또는 제159항의 조성물을 포함하는, 제160항 내지 제241항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 2월 10일자로 출원된 미국 가출원 제62/114,578호에 대해 우선권을 주장하며, 이 가출원의 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일 형식의 서열 목록의 제출

[0004] ASCII 텍스트 파일 형식의 하기 제출물의 내용은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다: 컴퓨터 판독 가능한 형태(CRF)의 서열 목록(파일명: 159792010140SEQLIST.txt, 기록일: 2016년 2월 14일, 크기: 11 KB).

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명의 변이형 RNAi 분자에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 헌팅톤병을 치료하는 변이형 RNAi에 관한 것이다.

[0007] 발명의 간단한 개요

[0008] RNA 간섭(RNAi)은 유전자 기능의 기초 연구에서 유전자 침묵에 유용한 도구로 밝혀졌으며, 다수의 질병의 발병과 관련된 유전자를 억제하는 치료제로서 큰 가능성을 나타낸다. 자연 상태에서, RNAi에 의한 유전자 조절은 마이크로RNA(miRNA)로 알려진 작은 RNA를 통해 일어난다(문헌[Ambros, (2004) *Nature* 431:350-355]; 문헌[Krol *et al.*, (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:597-610]). 마이크로RNA는 다양한 세포 작용의 강력한 조절인자로 등장했으며, 바이러스 벡터에 의해 전달된 경우 인공 miRNA가 계속 발현되어 표적 유전자의 강력하고 지속적인 억제를 일으킨다. miRNA 프로세싱에 관여하는 메커니즘의 해명은 과학자들로 하여금 내인성 세포 RNAi 기구(machinery)를 끌어들여 인공 miRNA의 사용에 의한 표적 유전자 생성물의 분해를 유도할 수 있게 하였다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2014/0163214호 및 문헌[Davidson *et al.*, (2012) *Cell* 150:873-875] 참조).

[0009] RNAi의 임상적 개발의 장애물은, RNAi의 시드(seed) 영역(전형적으로 뉴클레오티드 1-7 또는 1-8)이 3' 비번역 영역(UTR)에 있는 비-표적 mRNA의 서열과 쌍을 형성하여 전사체 불안정화를 일으키는 오프-타겟(off-target) 침묵의 가능성이다. 오프-타겟 침묵을 감소시키려는 시도는, 오프-타겟 가능성은 최소이면서 표적 mRNA에 대해 높은 특이성을 갖는 후보 시드 서열을 확인하기 위해 알고리즘을 이용하는 것(문헌[Boudreau RL *et al.*, (2012) *Nucl. Acids Res.* 41(1):e9]) 및 RNAi의 가이드(guide) 영역에 내부 벌지(bulge)를 위치시키는 것(문헌[Terasawa *et al.*, (2011) *Journal of nucleic acids* 2011:131579])을 포함한다.

[0010] RNAi는 헌팅톤병(HD)을 치료하는 치료제로서 연구되어 왔다. HD는 헌팅틴(huntingtin) 유전자(HTT)의 엑손 1에서의 CAG 반복부의 확장에 의해 야기되는 유전성 신경변성 질병이다. 결과적인 N-말단 영역에서의 폴리글루타민 지대(polyglutamine tract)의 확대는 돌연변이 헌팅틴 단백질(mHtt)에 독성 기능획득을 부여한다. HD에 대한 치료 전략으로서 mHtt 발현을 침묵시키는 것의 가능성은 질병의 조건부 마우스 모델에서 처음 입증되었다(문헌[Yamamoto *et al.*, (2000) *Cell* 101:57-66]). 이러한 마우스에서 mHtt의 발현이 유도된 경우, 병리학적 및 행동 비정상이 명백해졌다. mHtt 트랜스진(transgene)의 후속 테트라사이클린 매개 억제는 이러한 비정상을 역전

시켰는데, 이는 mHtt 수준이 감소되면 신경세포 내의 단백질 제거 메커니즘이 mHtt 유도 변화를 정상화시킬 수 있음을 나타낸다. 따라서, mHtt 수준을 감소시키는 치료 전략은 잠재적으로 질병 진행을 중단시키고 HD 증상을 경감시킬 수 있었다.

[0011] 일부 양태에서, 본 발명은 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체(duplex)를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 19개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(N=7 또는 N=8)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기(예를 들어, 적어도 19개의 염기)인 비-가이드(non-guide) 영역을 포함하며, 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+2) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 반대쪽에 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N+2의 반대쪽에 있다.

[0012] 일부 양태에서, 본 발명은 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 11개의 염기(예를 들어, 적어도 19개의 염기)인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(N=7 또는 N=8)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기(예를 들어, 적어도 19개의 염기)인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+1) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9의 반대쪽에 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N+1의 반대쪽에 있다.

[0013] 일부 양태에서, 본 발명은 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 11개의 염기(예를 들어, 적어도 19개의 염기)인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(N=7 또는 N=8)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기(예를 들어, 적어도 19개의 염기)인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-N 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 N의 반대쪽에 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역의 염기 1의 반대쪽에 있다.

[0014] 상기 양태와 구현예의 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역 상에 상보적인 염기가 결여되어 있는 이중체의 비-가이드 가닥의 하나 이상의 염기에 의해 형성되며, 여기서 벌지는 가이드 가닥과 염기쌍을 형성하는 염기들에 의해 플랭킹(flanking)되어 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 1개 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 벌지는 1개 내지 3개의 뉴클레오티드를 포함한다. 추가의 구현예에서, RNAi는 제2 벌지를 포함하며, 여기서 제2 벌지는 제1 가닥 상에서 시드 영역의 3'에 위치한 가이드 영역에 위치한다.

[0015] 상기 양태과 구현예의 일부 구현예에서, 이중체는 길이가 19개 내지 25개의 염기쌍 또는 19개 내지 23개의 염기쌍이다. 일부 구현예에서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행(overhang) 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되어 있다. 일부 구현예에서, RNA 링커는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조는 4개 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 5'에서 3'로 제2 가닥, RNA 링커 및 제1 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 5'에서 3'로 제1 가닥, RNA 링커 및 제2 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다.

[0016] 상기 양태의 일부 구현예에서, RNAi의 뉴클레오티드 서열은 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다(예를 들어, 시드 영역이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 불안정화를 유도하는 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다). 일부 구현예에서, 핵산 서열은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다.

[0017] 상기 양태와 구현예의 일부 구현예에서, RNAi는 장애와 관련된 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 구현예에서, 장애는 CNS 장애이다. 일부 구현예에서, 장애는 리소좀 축적병(LSD), 헌팅톤병, 간질, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 피질기저핵 변성(CBD), 피질기저핵 신경절 변성(CBGD), 전두측두엽 치매

(FTD), 다계통 위축증(MSA), 진행성 핵상 마비(PSP) 또는 뇌암이다. 일부 구현예에서, 장애는 헌팅톤병이다. 추가의 구현예에서, 폴리퀍티드는 헌팅틴이다. 다른 추가의 구현예에서, 헌팅틴은 헌팅톤병과 관련된 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 본 발명은 벌지를 RNAi의 비-가이드 영역에 도입하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 생성시키는 단계를 포함하여 RNAi의 독성을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0019] 일부 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 작제물을 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드(scaffold)를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터, 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터 및 13-액틴 프로모터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호 또는 HSV TK pA이다.

[0020] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 작제물을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크(Marburg) 바이러스, 모칼라(Mokala) 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된(pseudotyped), 렌티바이러스로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 구현예에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.

[0021] 상기 양태와 구현예의 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 발현 작제물을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(inverted terminal repeat, ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 구현예에서, 벡터는 스터퍼(stuffer) 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 벡터는 자기 상보성 rAAV 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열(terminal resolution sequence)의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터(예를 들어, rAAV 벡터)를 포함하는 세포를 제공한다.

[0022] 상기 양태와 구현예의 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 제공하며, 여기서 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는(encapsidating) AAV

입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다. 다른 구체예에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함한다. 다른 구현예에서, 바이러스 입자는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자이다.

[0023] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, ITR은 AAV2로부터 유래되고, rAAV 입자의 캡시드는 AAV1로부터 유래된다.

[0024] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0025] 일부 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물 질병에서 폴리펩티드의 발현을 저해하거나 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 RNAi는 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 세포에서 폴리펩티드의 축적을 저해하는 방법을 제공하며, 여기서 RNAi는 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다.

[0026] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 포함하는, 포유동물에서 RNA 간섭을 유도하기 위한 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 포유동물을 인간이다. 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위한 것이다.

[0027] 일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역은 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 가이드 영역에서 벌지를 형성한다. 일부 구현예에서, 이중체는 길이가 19개 내지 25개의 염기쌍 또는 19개 내지 23개의 염기쌍이다. 일부 구현예에서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 20개의

뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다.

[0028] 상기 양태의 일부 구현예에서, RNAi의 핵산 서열은 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다. 일부 구현예에서, 서열은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, 서열은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성한다. 일부 구현예에서, RNAi는 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 가이드 영역을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 비-가이드 영역에서 벌지를 형성한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역은 SEQ ID NO:15와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하고, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:16과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, SEQ ID NO:17과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열 및 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:18과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 작제물을 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miR-155 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유동물의 뇌에서 RNAi를 발현시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터, 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터 및 13-액틴 프로모터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴 프로모터이다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서,

[0030] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 발현 작제물을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 구현예에서는, 재조합 아데노바이러스 벡터. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 렌티바이러스로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 구현예에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.

[0031] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CBA 프로모터이다. 일부 구현

예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, CBA 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 스터퍼 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 자기 상보성 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터 또는 rAAV 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 중추 신경계(CNS) 세포이다.

[0033] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 제공하며, 여기서 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는 AAV 입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다. 다른 구체예에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함한다. 다른 구현예에서, 바이러스 입자는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자이다.

[0034] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV1 캡시드를 포함하고, 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 바이러스 입자 또는 rAAV 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다.

[0036] 일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다.

일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다.

[0037] 상기 방법의 일부 구현예에서, 가이드 영역은 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 영역의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 가이드 영역에서 벌지를 형성한다. 일부 구현예에서, 이중체는 길이가 19개 내지 25개의 염기쌍 또는 19개 내지 23개의 염기쌍이다. 일부 구현예에서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 4개 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다.

[0038] 상기 방법의 일부 구현예에서, 핵산은 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다. 일부 구현예에서, 핵산은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다.

[0039] 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:15와 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:16과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다.

[0040] 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:17과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:18과 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서

열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다.

[0041] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 작제물. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 miR-155 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 포유동물의 뇌에서 RNAi를 발현시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터, 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 닭 β-액틴(CBA) 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터 및 13-액틴 프로모터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 하이브리드 닭 β-액틴 프로모터이다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서,

[0042] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 발현 작제물을 포함하는 벡터. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 렌티바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 구현예에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.

[0043] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 발현 작제물을 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 벡터. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, 발현 작제물은 2개의 AAV ITR에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CBA 프로모터이다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 5'에서 3'로 AAV2 ITR, CBA 프로모터, RNAi를 인코딩하는 핵산, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호 및 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 스터퍼 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:3의 뉴클레오티드 서열과 약 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 자기 상보성 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 RNAi를 인코딩하는 제1 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되어 있으며, 여기서 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함한다.

[0044] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자, 여기서 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는 AAV 입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14,

16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 또는 돼지 Ad 3형으로부터의 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다. 다른 구체예에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들 안에서의 변이체와 슈도타입화된, 캡시드를 포함한다. 다른 구현예에서, 바이러스 입자는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 입자이다.

[0045] 상기 방법의 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 동일한 AAV 혈청으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR과 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV2 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 AAV1 캡시드를 포함하고, 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0046] 상기 방법의 일부 구현예에서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자는 조성물로 존재한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 헌팅톤병을 치료하는 임의의 방법에서 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 헌팅톤병을 치료하는 임의의 방법에서 사용하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi, 발현 작제물, 벡터, rAAV 벡터, 바이러스 입자, rAAV 입자 또는 조성물을 포함하는, RNA 간섭을 유도하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 포유동물을 인간이다. 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위한 것이다.

[0048] 특허 출원 및 간행물을 비롯한 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0049] **도 1a 및 도 1b**는 시험관내에서의 Htt 수준의 AAV2/1-miRNA-Htt 매개 감소를 도시한다. (**도 1a**) AAV2/1-miRNA-Htt를 생성시키는데 사용된 프리바이러스(previral) 작제물의 개략도. 플라스미드는 닭 β-액틴(CBA) 프로모터의 전사 제어 하에 Htt에 대한 miRNA 서열과 GFP를 발현하도록 설계되었다. ITR, 역위 말단 반복부. eGFP, 강화 녹색 형광 단백질. PolyA, 소 성장 호르몬 polyA. (**도 1b**) AAV-2/1-miRNA-Htt 처리 후 48시간째에 HEK293 세포에서 Htt mRNA 수준을 평가한 정량 PCR 분석. PPIA는 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 2a 내지 도 2d는 AAV2/1-eGFP-miRNA-Htt 벡터에 의한 HEK293 세포 감염 후 형광 활성 세포 분류(FACS)를 나타낸다. (**도 2a**) eGFP를 이용한 HEK293 세포의 유세포분석 산란 프로파일. 전방 광 산란 A(FSC-A)는 상대적인 세포 크기(면적)를 나타내고, SSC-A는 상대적인 세포 복잡성(면적)을 나타내며, 각각은 점은 하나의 세포를 나타낸다. (**도 2b**) 세포의 eGFP 형광 강도의 형광 플롯으로서, 각 색상은 각각 GFP-, GFP+, GFP++ 또는 GFP+++로 분류된 세포의 경계를 표시한다. (**도 2c**) eGFP를 발현하는 HEK293 세포의 FACS 히스토그램. (**도 2d**) FACS 분류 후의 세포 카운트의 표.

도 3a 내지 도 3e는 YAC128 마우스에서 AAV2/1-miRNA-Htt 주입물의 선조체내 주입 후 광범위한 선조체 형질도입 및 Htt 감소를 도시한다. (**도 3a**) eGFP를 이용한 선조체 세포의 유세포분석 산란 프로파일. 전방 광 산란 A(FSC-A)는 상대적인 세포 크기(면적)를 나타내고, SSC-A는 상대적인 세포 복잡성(면적)을 나타내며, 각각은 점은 하나의 세포를 나타낸다. (**도 3b**) FSC-A 대 FITC-A 분석을 이용한 도트 플롯(dot plot). 사멸 세포가 구분되었고, eGFP+ 및 eGFP - 세포를 선택하였다. 이러한 세포로부터의 GFP 발현을 평가하고, 정량화하고, **도 3c**에 나타내었다. (**도 3c**) 530/30BP 필터 505LP로 수집된 eGFP 형광 강도의 형광 플롯. (**도 3d**) AAV2/1-eGFP-miRNA-

Htt의 두개내 투여 후 선조체 전반에 걸친 광범위한 eGFP 발현을 나타내는 형광 현미경검사. (**도 3e**) AAV2/1-miRNA-Htt 또는 AAV2/1-null 대조 벡터의 주입 후 1개월 및 5개월째에 선조체에서 Htt mRNA 수준을 평가한 정량 PCR 분석. PPIA는 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *p<0.05. AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC128 마우스(N=8)는 처리 후 1개월 및 5개월째에 AAV2/1-Null 주입 마우스(시점당 N=8)와 비교된 경우 선조체에서 Htt mRNA 수준의 대략 50% 감소를 나타내었다.

도 4는 YAC128 마우스에서 AAV2/1-miRNA-Htt 주입물의 선조체내 주입 후 마우스 Htt mRNA 감소를 도시한다. AAV2/1-miRNA-Htt 또는 AAV2/1-null 대조 벡터의 주입 후 1개월 및 5개월째에 선조체에서 내인성 마우스 Htt mRNA 수준을 평가한 정량 PCR 분석. PPIA는 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *p<0.05.

도 5a 내지 도 5i는 AAV2/1-miRNA-Htt에 의한 YAC128 마우스에서의 지속적인 Htt 수준 감소가 명백한 신경염증을 야기하지 않았음을 나타낸다. (**도 5a 내지 도 5c**) AAV2/1-Null 벡터(**도 5a**)를 이용하여 처리된 YAC128 마우스와 비교한, AAV-miRNA-Htt 주입 후 1개월(**도 5b**) 또는 5개월(**도 5c**)째에 AAV2/1-miRNA-Htt를 이용하여 처리된 YAC128 마우스로부터의 선조체 조직 절편의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색. (**도 5d 내지 도 5f**) AAV2/1-Null 벡터(**도 5d**)를 이용하여 처리된 YAC18 마우스와 비교한, AAV-miRNA-Htt 주입 후 1개월(**도 5e**) 또는 5개월(**도 5f**)째에 AAV2/1-miRNA-Htt를 이용하여 처리된 YAC128 마우스로부터의 선조체 조직 절편의 GFAP 면역조직화학적 염색. (**도 5g 내지 도 5i**) AAV2/1-Null 벡터(**도 5g**)를 이용하여 처리된 YAC18 마우스와 비교한, AAV-miRNA-Htt 주입 후 1개월(**도 5h**) 또는 5개월(**도 5i**)째에 AAV2/1-miRNA-Htt를 이용하여 처리된 YAC128 마우스로부터의 선조체 조직 절편의 Iba-면역조직화학적 염색. 정확한 비교를 위해 모든 사진의 노출을 일치시켰다. 스케일 바(scale bar): 0.25mm.

도 5j 내지 도 5k는 AAV2/1-miRNA-Htt에 의한 YAC128 마우스에서의 지속적인 Htt 수준 감소가 명백한 신경염증을 야기하지 않았음을 나타낸다. (**도 5j**) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 후 1개월 또는 5개월째의 QPCR에 의한 GFAP mRNA 수준의 선조체 수준. (**도 5k**) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 후 1개월 또는 5개월째의 QPCR에 의한 Iba1 mRNA 수준. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *AAV2/1-Null 마우스와 유의하게 상이함, p<0.05; ANOVA.

도 6a 내지 도 6d는 행동 결함에 대한 YAC128에서의 AAV2/1-miRNA-Htt의 선조체 투여의 효과를 시험하기 위한 실험 설계를 도시한다. (**도 6a**) 실험 스케줄의 예시. 2개월령 YAC128과 야생형 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt(N=8 YAC 및 N=8 WT) 또는 AAV2/1-Null 대조군(N=8 YAC 및 N=8 WT)을 양측 선조체 주입에 의해 투여하고, 각각 4개월령 및 5개월령째에 로타로드(rotarod) 시험 및 포르솔트(Porsolt) 수영 시험을 받게 하였다. 모든 마우스를 5개월령째에 희생시킨 후, 생화학적 분석과 조직학적 분석을 위해 조직을 수집하였다. (**도 6b**) 처리 후 3개월째의 선조체에서의 eGFP 발현을 나타내는 형광 현미경검사. AAV2/1-miRNA-Htt 처리 후 3개월째의 웨스턴 블롯에 의한 마우스(**도 6c**) 및 인간(**도 6d**) Htt 단백질 수준.

도 6e 및 도 6f는 AAV2/1-miRNA-Htt의 선조체 투여가 YAC128 마우스의 행동 결함을 감소시켰음을 나타낸다. (**도 6e**) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 후 2개월째의 가속화 로타로드 시험. (**도 6f**) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 후 3개월째의 포르솔트 수영 시험에서 부동 상태로 소비된 시간. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *AAV2/1-Null 마우스와 유의하게 상이함, p<0.05; ANOVA, 이어서 투키(Tukey)의 사후 시험.

도 7a 및 도 7b는 AAV2/1-miRNA-Htt를 사용한 처리가 YAC128 마우스에서의 DARPP-32 및 D1 수용체의 전사 조절 이상을 부분적으로 교정했음을 도시한다. AAV2/1-miRNA-Htt(N=8 YAC 및 N=8 WT) 또는 AAV2/1-Null 대조군(N=8 YAC 및 N=8 WT)의 주입 후 3개월째에 QPCR에 의해 평가된 YAC128 마우스 및 야생형 마우스의 선조체에서의 DARPP-32 및 D1 수용체 mRNA 수준. (**도 7a**) AAV2/1-Null 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 후 YAC128 마우스 및 FVB 야생형 한배 새끼 마우스에서의 선조체 DARPP-32 mRNA 수준. (**도 7b**) AAV2/1-Null 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 후 YAC128 마우스 및 FVB 야생형 한배 새끼 마우스에서의 선조체 D1 수용체 mRNA 수준. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *AAV2/1-Null 샘플과 유의하게 상이함, p<0.05; ANOVA, 이어서 투키의 사후 시험.

도 8a 내지 도 8d는 AAV2/1-miRNA-Htt의 두개내 투여가 운동 결함을 개선시키고 노화 YAC128 마우스의 선조체에서 돌연변이 Htt 응집체를 감소시켰음을 도시한다. (**도 8a**) 선조체 내의 돌연변이 Htt 응집체를 나타내는 YAC128 마우스 뇌 절편의 면역조직화학적 염색. 응집체는 6개월령, 9개월령, 12개월령(도시되지 않음) 및 24개월령 YAC128 마우스에서 관찰되었다. 야생형 마우스는 시험된 모든 월령에서 응집체를 나타내지 않았다. (**도 8b**) 노화 YAC128 마우스 및 야생형 마우스에서의 AAV2/1-miRNA-HTT를 시험하기 위한 실험 스케줄의 예시. 7개월령 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt(N=6 YAC 및 N=4 WT) 또는 AAV2/1-GFP 대조군(N=6 YAC 및 N=4 WT)을 양측 선조체내 주입에 의해 투여한 후, 10개월령째에 행동 시험을 받게 하였다. 주입 후 5개월째에(마우스가 12개월령이 되

었을 때) 뇌를 수거하였다. (**도 8c**) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 후 3개월째의 로타로드 시험에 대한 노화 YAC128 마우스의 수행능력. (**도 8d**) 처리 후 5개월째의 AAV2/1-miRNA-Htt 또는 AAV2/1-eGFO 처리 YAC128 마우스의 뇌 절편의 EM-48 면역조직화학적 분석.

도 9a 및 도 9b는 본 명세서에 기재된 실험에 사용된 shRNA의 스템 서열(stem sequence)의 내부 벌지를 도시한다. **도 9a**에 도시된 완벽하게 매칭되는 서열(SEQ ID NO:23)과 비교하여, 상기 실험에 사용된 서열은 시드 서열의 3' 말단에 추가의 아데닌 뉴클레오티드(A)를 함유하였으며(화살표로 강조됨), 이는 가이드 가닥(SEQ ID NO:24)에 상응하는 티민 뉴클레오티드(T)를 갖지 않았다. (**도 9b**) 표적 서열에 상보적인 서열이 강조되어 있다.

도 10은 본래의 PS170XA miRNA 서열(SEQ ID NO:19) 및 2개의 변형된 낮은 오프 타겟팅(off targeting) 변형체인 PS170XAL1(SEQ ID NO:25)과 PS170XAL2(SEQ ID NO:26)를 도시한다.

도 11은 시험관내에서 Htt 감소를 매개하는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2의 AAV 능력의 능력을 도시한다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다.

도 12a 내지 도 12d는 YAC128 마우스의 선조체에서 Htt 발현을 침묵시키는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2의 AAV 능력의 능력을 도시한다. 인간 Htt는 **도 12a** 및 **도 12c**에 도시되어 있다. 마우스 Htt는 **도 12b** 및 **도 12d**에 도시되어 있다. 베타-튜불린은 모든 웨스턴 블롯에 대한 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. *미처리된 대조 마우스와 유의하게 상이함, $p<0.05$; ANOVA, 이어서 투키의 사후 시험.

도 13a는 선조체의 GFAP mRNA 수준을 도시하고, **도 13b**는 선조체의 Iba1 mRNA 수준을 도시한다. 인간 PPIA는 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *미처리된 대조 마우스와 유의하게 상이함, $p<0.05$; ANOVA, 이어서 투키의 사후 시험.

도 14는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2로 처리된 YAC128 마우스로부터의 선조체 조직 절편의 GFAP 및 Iba1 면역조직화학적 염색을 도시한다. 스케일 바 = 50 μM

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 상세한 설명

[0051] 일부 양태에서, 본 발명은 개선된 RNAi; 예를 들어, 치료적 사용을 위한 개선된 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 11개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+2) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, b) 제1 가닥은 적어도 10개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고, c) 제2 가닥은 적어도 10개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+1) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, b) 제1 가닥은 적어도 9개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 2-7 또는 염기 2-8을 포함하는 시드 영역을 포함하고, c) 제2 가닥은 적어도 9개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 9의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, b) 제1 가닥은 적어도 9개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 2-7 또는 염기 2-8을 포함하는 시드 영역을 포함하고, c) 제2 가닥은 적어도 9개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 인공 RNAi이다.

[0052] 일부 양태에서, 본 발명은 발현 카세트, 벡터(예를 들어, 재조합 AAV, 아데노바이러스, 렌티바이러스 또는 HSV 벡터), 세포, 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자 또는 HSV 바이러스 입자) 및 본 발명의 RNAi를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포함하는 약제학적 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포함하는 키트를 제공한다.

[0053] 일부 양태에서, 본 발명은 헌팅톤병을 치료하기 위한 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 서열 5'-

UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포함하는, 발현 카세트, 벡터(예를 들어, 재조합 AAV, 아데노바이러스, 렌티바이러스 또는 HSV 벡터), 세포, 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자 또는 HSV 바이러스 입자) 및 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포함하는 약제학적 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하고, 포유동물에서 htt의 발현을 저해하고, 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 다른 추가의 양태에서, 본 발명은 포유동물의 헌팅톤병을 치료(예를 들어, 헌팅톤병의 증상을 개선)하거나, 헌팅톤병에 걸린 포유동물에서 htt의 발현을 저해하거나, 헌팅톤병에 걸린 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하기 위한, 본 발명의 RNAi를 포함하는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 또 다른 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포함하는, 포유동물의 헌팅톤병을 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0054] **I. 일반 기법**

[0055] 본 명세서에 기재되거나 언급된 기법 및 절차는 당업자에게 의해 일반적으로 잘 이해되어 있고, 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 널리 이용되는 방법과 같은 종래의 방법을 사용하여 통상적으로 이용된다: 문헌[*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)]; 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003)]; 문헌[the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)]; 문헌[*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995)]; 문헌[*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988)]; 문헌[*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010)]; 문헌[*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984)]; 문헌[*Methods in Molecular Biology*, Humana Press]; 문헌[*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998)]; 문헌[*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)]; 문헌[*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8)]; 문헌[*Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996)]; 문헌[*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)]; 문헌[*PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994)]; 문헌[*Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991)]; 문헌[*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002)]; 문헌[*Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004)]; 문헌[*Antibodies* (P. Finch, 1997)]; 문헌[*Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; 문헌[*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; 문헌[*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; 문헌[*The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 문헌[*Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011)].

[0056] **II. 정의**

[0057] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "벡터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포 내로 전달될 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0058] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드인 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드를 지칭한다. 따라서, 이러한 용어는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 다중 가닥 DNA 또는 RNA, 유전체 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 염기와 피리미딘 염기, 다른 천연 뉴클레오티드 염기, 화학적 또는 생화학적으로 변형된 뉴클레오티드 염기, 비천연 뉴클레오티드 염기 또는 유도체화 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 폴리뉴클레오티드의 백본(backbone)은 당 및 포스페이트기(RNA 또는 DNA에서 전형적으로 발견될 수 있는 바와 같음), 또는 변형되거나 치환된 당 또는 포스페이트기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 백본은 포스포라미데이트와 같은 합성 서브유닛의 중합체를 포함할 수 있고, 이에 따라 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이

트($P-NH_2$) 또는 혼합형 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 또한, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는, 상보적 가닥을 합성하고 적절한 조건 하에서 가닥을 어닐링하거나, 적절한 프라이머와 함께 DNA 중합효소를 이용하여 상보적 가닥을 새로 합성함으로써 화학적 합성의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 생성물로부터 얻을 수 있다.

[0059] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되며, 최소 길이로 한정되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있으며, 아미노산 잔기의 펩티드, 올리고펩티드, 이합체, 삼합체 및 다합체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편 둘 모두가 정의에 포함된다. 이러한 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예를 들어, 당화, 시알화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 요망되는 활성을 유지하는 한 천연 서열에 대한 변형, 예를 들어 결실, 첨가 및 치환(일반적으로 사실상 보존성 치환)을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위 특이적 돌연변이유발을 통해 이루어지는 것과 같이 계획적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해 이루어지는 것과 같이 우발적일 수 있다.

[0060] "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 재조합 AAV 벡터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나의, 그리고 구현예에서는 2개의, 역위 말단 반복부 서열(ITR)에 의해 플랭킹되어 있다.

[0061] "재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 적어도 하나의, 그리고 구현예에서는 2개의, AAV 역위 말단 반복부 서열(ITR)에 의해 플랭킹되어 있는 하나 이상의 이종성 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 rAAV 벡터는, 적합한 헬퍼 바이러스로 감염되었고(또는 적합한 헬퍼 기능을 발현하고) AAV rep 및 cap 유전자 생성물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는, 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되어 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 또는 또 다른 벡터, 예를 들어, 클로닝 또는 트랜스펙션에 사용되는 플라스미드에) 혼입되는 경우, rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적합한 헬퍼 기능의 존재 하에 복제 및 캡시드화에 의해 "구제(rescue)"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 벡터는 플라스미드, 선형 인공 염색체, 지질과 복합체화된 형태, 리포솜 내에 캡슐화된 형태, 및 바이러스 입자, 예를 들어 AAV 입자에 캡시드화된 형태를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 형태 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "재조합 아데노 관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성시킬 수 있다.

[0062] "재조합 아데노바이러스 벡터"는 적어도 하나의 아데노바이러스 역위 말단 반복부 서열(ITR)에 의해 플랭킹되어 있는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 아데노바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 2개의 역위 말단 반복부 서열(ITR)에 의해 플랭킹되어 있다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 재조합 바이러스 유전체로부터 결실된 필수 아데노바이러스 유전자(예를 들어, E1 유전자, E2 유전자, E4 유전자 등)를 발현하는 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되어 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 또는 또 다른 벡터, 예를 들어, 클로닝 또는 트랜스펙션에 사용되는 플라스미드에) 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 패키징 기능의 존재 하에 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 플라스미드, 선형 인공 염색체, 지질과 복합체화된 형태, 리포솜 내에 캡슐화된 형태, 및 바이러스 입자, 예를 들어 아데노바이러스 입자에 캡시드화된 형태를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 형태 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "재조합 아데노바이러스 입자"를 생성시킬 수 있다.

[0063] "재조합 렌티바이러스 벡터"는 적어도 하나의 렌티바이러스 말단 반복부 서열(LTR)에 의해 플랭킹되어 있는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 렌티바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 2개의 렌티바이러스 말단 반복부 서열(LTR)에 의해 플랭킹되어 있다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 적합한 헬퍼 기능으로 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되어 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "재조합 렌티바이러스 입자"를 생성시킬 수 있다.

[0064] "재조합 단순 헤르페스 벡터(재조합 HSV 벡터)"는 HSV 말단 반복부 서열에 의해 플랭킹되어 있는 하나 이상의 이종성 서열(즉, HSV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 적합한 헬퍼 기능으로 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되어 감염성 바이러스 입자 내로

패키징될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 또는 또 다른 벡터, 예를 들어, 클로닝 또는 트랜스펙션에 사용되는 플라스미드에) 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 HSV 패키징 기능의 존재 하에 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 플라스미드, 선형 인공 염색체, 지질과 복합체화된 형태, 리포솜 내에 캡슐화된 형태, 및 바이러스 입자, 예를 들어 HSV 입자에 캡시드화된 형태를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 형태 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 HSV 캡시드 내로 패키징되어 "재조합 단순 헤르페스 바이러스 입자"를 생성시킬 수 있다.

[0065] "이종성"은 비교되거나, 또는 도입되거나 혼입되는 나머지 엔티티(entity)와 유전자형적으로 별개인 엔티티로부터 유래됨을 의미한다. 예를 들어, 상이한 세포 유형 내로 유전 공학 기법에 의해 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종성 폴리뉴클레오티드이다(그리고, 발현된 경우, 이종성 폴리펩티드를 인코딩할 수 있음). 유사하게, 바이러스 벡터 내로 혼입된 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 일부)은 벡터에 대하여 이종성 뉴클레오티드 서열이다.

[0066] 용어 "트랜스진"은 세포 내로 도입되어 RNA로 전사될 수 있고, 선택적으로, 적절한 조건 하에서 번역되고/되거나 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 양태에서, 이는 그것이 도입된 세포에 요망되는 특성을 부여하거나, 그렇지 않은 경우 요망되는 치료 또는 진단 결과를 생성시킨다. 또 다른 양태에서, 이는 RNA 간섭을 매개하는 분자, 예를 들어 miRNA, siRNA, 또는 shRNA로 전사될 수 있다.

[0067] "닭 β-액틴(CBA) 프로모터"는 닭 β-액틴 유전자(예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 396526으로 표시되는 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*) 베타 액틴)로부터 유래된 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "닭 β-액틴 프로모터"는 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소, 닭 β-액틴 유전자의 프로모터 및 제1 엑손과 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체를 함유하는 프로모터, 예를 들어 문헌[Miyazaki, J., *et al.* (1989) *Gene* 79(2):269-77]에 기재된 서열을 지칭할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CAG 프로모터"가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터"가 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0068] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "유전체 입자(gp)", "유전체 당량" 또는 "유전체 카피"는 감염성 또는 기능성과 무관하게 재조합 AAV DNA 유전체를 함유하는 비리온의 개수를 지칭한다. 특정 벡터 제조물 내의 유전체 입자의 개수는 본 명세서의 실시예, 또는 예를 들어, 문헌[Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039]; 문헌[Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278]에 기재된 바와 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "벡터 유전체(vg)"는 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터의 일련의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 벡터 유전체는 바이러스 입자에 캡시드화될 수 있다. 특정 바이러스 벡터에 따라, 벡터 유전체는 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 DNA, 또는 단일 가닥 RNA, 또는 이중 가닥 RNA를 포함할 수 있다. 벡터 유전체는 특정 바이러스 벡터와 관련된 내인성 서열 및/또는 재조합 기법을 통해 특정 바이러스 벡터 내로 삽입되는 임의의 이종성 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터 유전체는 프로모터를 플랭킹하는 적어도 하나의 ITR 서열, 스터퍼, 관심 서열(예를 들어, RNAi) 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 완전한 벡터 유전체는 벡터의 완전한 세트의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터의 핵산 역가는 vg/㎖로 측정될 수 있다. 이러한 역가를 측정하기에 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 정량 PCR).

[0070] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "저해"는 특정 표적을 차단하거나, 감소시키거나, 제거하거나, 그의 존재 또는 활성을 다른 방식으로 길항하는 행위를 지칭할 수 있다. 저해는 부분적 저해 또는 완전한 저해를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 유전자의 발현을 저해한다는 것은 mRNA 존재비(abundance)의 감소(예를 들어, mRNA 전사를 침묵시킴), mRNA의 분해, mRNA 번역의 저해 등을 포함하는, 유전자 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항작용을 일으키는 임의의 행위를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, HTT의 발현을 저해한다는 것은 *HTT* mRNA 존재비의 감소(예를 들어, *HTT* mRNA 전사를 침묵시킴), *HTT* mRNA의 분해, *HTT* mRNA 번역의 저해 등을 포함하는, HTT 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항작용을 일으키는 임의의 행위를 지칭할 수 있다. 또 다른 예로서, 세포에서 단백질의 축적을 저해한다는 것은 mRNA 존재비의 감소(예를 들어, mRNA 전사를 침묵시킴), mRNA의 분해, mRNA 번역의 저해, 단백질의 분해 등을 포함하는, 단백질 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항작용을 일으키는 임의의 행위를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포에서 HTT 단백질의 축적을 저해한다는 것은 *HTT* mRNA 존재비의 감소(예를 들어, *HTT* mRNA 전사를 침묵시킴), *HTT* mRNA의 분해,

HTT mRNA 번역의 저해, HTT 단백질의 분해 등을 포함하는, 세포에서의 HTT 단백질 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항작용을 지칭한다.

[0071] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자" 또는 "복제 단위"는, 예를 들어, 문헌[McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973]에 기재된 바와 같이 복제 중심 검정으로도 알려진 감염성 중심 검정에 의해 측정되는 바와 같은 감염성 및 복제 능력이 있는 재조합 AAV 벡터 입자의 개수를 지칭한다.

[0072] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 바와 같은 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본 명세서의 실시예 또는 예를 들어, 문헌[Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124]; 또는 문헌[Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU assay)]에 기재된 바와 같은 기능 검정에서 측정되는 바와 같은 기능성 트랜스진 생성물을 생성시키는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 개수를 지칭한다.

[0073] "역위 말단 반복부" 또는 "ITR" 서열은 당업계에서 잘 이해되어 있는 용어로서, 반대 배향으로 존재하는 바이러스 유전체의 말단에서 발견되는 비교적 짧은 서열을 지칭한다.

[0074] 당업계에서 잘 이해되어 있는 용어인 "AAV 역위 말단 반복부(ITR)" 서열은 천연 단일 가닥 AAV 유전체의 양 말단에 존재하는 대략 145개의 뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 2가지의 택일적 배향 중 어느 하나로 존재하여 다양한 AAV 유전체 사이에 그리고 단일 AAV 유전체의 2개의 말단 사이에 이질성을 가져올 수 있다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 또한 여러 개의 더 짧은 자기 상보성 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 표시됨)을 함유하여, ITR의 이러한 부분 내에서 가닥내 염기쌍 형성이 일어날 수 있게 한다.

[0075] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 동안 AAV rep 단백질에 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역에 있는 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단이 어렵다.

[0076] "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있게 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은, AAV 복제 및 패키징을 돕는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 형태 중 임의의 형태로 제공될 수 있다. 유전독성인자(genotoxic agent)와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능이 당업계에 알려져 있다.

[0077] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 AAV(결손 파보바이러스임)가 숙주 세포에서 복제되고 패키징될 수 있게 하는 바이러스를 지칭한다. 헬퍼 바이러스는 AAV의 복제를 가능하게 하는 "헬퍼 기능"을 제공한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예를 들어, 백시니아 및 바큘로바이러스를 비롯한 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 다수의 상이한 서브그룹을 포함하지만, 서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 통상적으로 사용된다. 인간, 비-인간 포유동물 및 조류 기원의 많은 아데노바이러스가 공지되어 있으며, ATCC와 같은 기탁기관으로부터 이용 가능하다. ATCC와 같은 기탁기관으로부터 또한 이용 가능한 헤르페스과의 바이러스는, 예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 가성광견병 바이러스(PRV)를 포함한다. AAV의 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능의 예는 E1A 기능, E1B 기능, E2A 기능, VA 기능 및 E4orf6 기능을 포함한다. 기탁기관으로부터 이용 가능한 바큘로바이러스는 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병 바이러스(nuclear polyhedrosis virus)를 포함한다.

[0078] rAAV의 제조물은, 감염성 AAV 입자 대 감염성 헬퍼 바이러스 입자의 비가 적어도 약 10^2:1; 적어도 약 10^4:1, 적어도 약 10^6:1; 또는 적어도 약 10^8:1 또는 그 이상인 경우 헬퍼 바이러스가 "실질적으로 없다"고 한다. 일부 구현예에서, 제조물은 등가량의 헬퍼 바이러스 단백질(즉, 상기 언급된 헬퍼 바이러스 입자 불순물이 붕괴된 형태로 존재하는 경우 그러한 수준의 헬퍼 바이러스의 결과로서 존재할 것인 단백질)이 또한 없다. 바이러스 및/또는 세포 단백질 오염은 일반적으로 SDS 겔 상의 쿠마시 염색 밴드의 존재(예를 들어, AAV 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3에 상응하는 밴드가 아닌 밴드의 출현)로서 관찰될 수 있다.

[0079] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열에 대한 "서열 동일성 퍼센트(%)"는, 서열들을 정렬시키고, 필요에 따라, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해 갭을 도입하고, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 치환을 고려하지 않은 후의, 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 정의된다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그

램, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 비롯해 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1]에 기재된 것을 이용하여 달성될 수 있다. 정렬 프로그램의 바람직한 예는 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, Pennsylvania)이다. 당업자는 비교되는 서열들의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본 발명의 목적상, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 또는 이와의, 또는 이에 비한, 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %(이는 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 또는 이와, 또는 이에 비해 특정한 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다: 100 × 분율 X/Y, 여기서 X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 기록된 아미노산 잔기의 개수이고, Y는 B 의 총 아미노산 잔기 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 인식될 것이다. 본 발명의 목적상, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 또는 이와의, 또는 이에 비한, 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성 %(이는 주어진 핵산 서열 D에 대해, 또는 이와, 또는 이에 비해 특정한 핵산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C로 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다: 100 × 분율 W/Z, 여기서 W는 C 및 D의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 기록된 뉴클레오티드의 개수이고, Z는 D의 총 뉴클레오티드 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 인식될 것이다.

[0080] "단리된" 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 이것이 확인되고, 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되고/되거나 회수된 것을 의미한다.

[0081] "유효량"은 임상 결과(예를 들어, 증상의 개선, 임상 종점의 달성 등)를 포함하는 유익하거나 요망되는 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질병 상태의 측면에서, 유효량은 질병을 개선하거나, 안정시키거나, 질병의 발달을 지연시키기에 충분한 양이다.

[0082] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예를 들어 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "치료"는 유익하거나 요망되는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적상, 유익하거나 요망되는 임상 결과는 검출 가능하거나 검출 가능하지 않건 간에 증상의 경감, 질병 정도의 감소, 질병의 안정된(예를 들어, 악화되지 않은) 상태, 질병 확산(예를 들어, 전이)의 예방, 질병 진행의 지연 또는 둔화, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(remission)(부분적 또는 전체적)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우의 예상 생존기간에 비해 생존기간을 연장시킴을 의미할 수 있다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방적 치료"는 치료를 지칭하며, 여기서 개체는 장애를 갖거나 장애에 걸릴 위험이 있는 것으로 알려져 있거나 의심되지만, 장애의 증상을 나타내지 않거나 최소의 증상을 나타내는 개체이다. 예방적 치료를 받는 개체는 증상의 발생 전에 치료될 수 있다.

[0085] "헌팅톤병(HD)"은 *HTT* 유전자(aka 헌팅틴, *HD* 또는 *IT15*)의 돌연변이에 의해 전형적으로 야기되는 진행성 뇌 장애를 지칭한다. 이는 비정상적인 움직임(무도병으로 일컬어짐), 운동 기능의 점진적 상실, 정서 또는 정신 질환, 및 점진적 인지력 손상을 포함하는 증상을 특징으로 할 수 있다. 대부분의 증상은 30대 및 40대에서 나타나지만, 질병의 소아(juvenile) 형태가 또한 관찰되었다. HD의 추가의 설명에 대해서는, 문헌[OMIM Entry No. 143100]을 참조한다.

[0086] "헌팅틴(*HTT*)"은 대부분의 헌팅톤병 사례와 관련된 유전자 또는 이의 폴리펩티드 생성물을 지칭할 수 있다. 헌팅틴의 정상적인 기능은 완전히 이해되어 있지 않다. 그러나, 헌팅틴 유전자의 돌연변이가 HD를 야기하는 것으로 알려져 있다. 이러한 돌연변이는 전형적으로 상염색체 우성 방식으로 유전되며, *HTT* 유전자에서 트리뉴클레오티드(trinucleotide) CAG 반복부의 확장을 수반하여 Htt 단백질에서 폴리글루타민(polyQ) 지대를 생성시킨다.

[0087] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "RNAi"는 세포에서 RNA 간섭을 유도하는 임의의 RNA 분자를 지칭할 수 있다. RNAi의 예는 제한 없이 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함한다.

[0088] "miRNA 스캐폴드"는 (i) RNAi에 의한 녹다운(knockdown)을 위한 관심 유전자를 표적화하는 이중 가닥 서열 및

(ii) 내인성 miRNA와 유사한 스템-루프(stem-loop) 구조를 형성하는 추가의 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. RNAi를 위한 관심 유전자를 표적화하는 서열(예를 들어, 짧은 약 20-nt의 서열)은 miRNA 유사 스템-루프를 생성시키는 서열, 및 폴리뉴클레오티드가 miRNA 유사 2차 구조로 조립될 때 관심 서열과 염기쌍을 형성하여 이중체를 형성하는 서열에 리게이션될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 이러한 이중체는 불완전하게 하이브리드화될 수 있는데, 예를 들어 이는 쌍을 형성하지 않거나 쌍 형성 오류가 일어난 하나 이상의 염기를 함유할 수 있다. 다이서(Dicer)에 의한 이러한 폴리뉴클레오티드의 절단 시, 관심 유전자를 표적화하는 서열을 함유하는 이러한 이중체는 풀려서 RISC 복합체 내로 혼입될 수 있다. miRNA 스캐폴드는 miRNA 그 자체 또는 miRNA를 인코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. miRNA 스캐폴드의 예는 miR-155 서열이다(문헌[Lagos-Quintana, M. *et al*. (2002) *Curr. Biol*. 12:735-9]). miRNA 스캐폴드 내로 서열을 클로닝하기 위한 상업적으로 이용 가능한 키트는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA로부터의 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트)

[0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "벌지"는 이중체 핵산 내의 반대쪽에 있는 핵산과 상보적이지 않은 핵산의 영역을 지칭한다. 예를 들어, 벌지는 이중체 핵산 내의 반대쪽에 있는 핵산에 비상보적인 핵산 서열을 지칭할 수 있으며, 여기서 벌지는 이중체 핵산 내의 반대쪽에 있는 핵산에 상보적인 핵산의 영역에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 예에서, 벌지는 길이가 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과의 염기 중 임의의 것일 수 있다. 일부 예에서, 벌지는 쌍 형성오류(mispairing)(예를 들어, 반대쪽 가닥은 비상보적인 염기를 함유함)의 결과일 수 있거나 벌지는 쌍 미형성(nonpairing)(예를 들어, 반대쪽 가닥은 벌지를 플랭킹하는 핵산에 상보적인 핵산을 포함하지만 반대쪽 가닥은 벌지의 반대쪽에 있는 핵산을 함유하지 않음)의 결과일 수 있다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "센스" 핵산은 트랜스진의 전부 또는 일부를 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산이다. 일부 예에서, 트랜스진에 대한 mRNA는 센스 핵산이다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "안티센스" 핵산은 "센스" 핵산에 상보적인 핵산의 서열이다. 예를 들어, 안티센스 핵산은 트랜스진을 인코딩하는 mRNA에 상보적일 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, RNAi의 "가이드 영역"은 전형적으로 상보성을 기초로 하여 표적 mRNA와 결합하는 RNAi의 가닥이다. 상보성 영역은 가이드 영역의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 전형적으로, 상보성 영역은 적어도 시드 영역을 포함한다. 많은 경우, RNAi의 안티센스 영역은 가이드 영역이다.

[0093] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되는 RNAi의 "패신저(paggenger) 영역" 또는 "비-가이드 영역"은 가이드 영역에 상보적인 RNAi의 영역이다. 많은 경우, RNAi의 센스 영역은 패신저 영역이다.

[0094] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, RNAi(예를 들어, miRNA)의 "시드 영역"은 길이가 약 1개 내지 8개의 뉴클레오티드인 마이크로RNA의 영역이다. 일부 예에서, 이의 표적 mRNA의 시드 영역과 3'-UTR은 RNAi 인식에서 주요 결정인자일 수 있다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "오프-타겟 유전자 침묵"은 RNAi의 시드 영역이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 불안정화를 유도하는 것(예를 들어, 의도하지 않은 mRNA의 발현을 감소시킴)을 지칭한다.

[0096] 본 명세서에서 값 또는 파라미터 앞의 "약"에 대한 언급은 그러한 값 또는 파라미터 자체에 관한 구현예를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "약 X"와 관련된 설명은 "X"의 설명을 포함한다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.

[0098] 본 명세서에 기재된 본 발명의 양태 및 구현예는 양태 및 구현예를 "포함하고/하거나", 이로 "구성되고/되거나", "이를 필수적으로 포함하는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

[0099] **III. RNAi**

[0100] 일부 양태에서, 본 발명은 개선된 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 작은 저해성 또는 간섭성 RNA(siRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 길이가 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍인 이중 가닥 RNA 분자로 당업계에 알려져 있다. 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 짧은 루프(예를 들어, 약 4개 내지 약 11개

의 뉴클레오티드)에 의해 연결된 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍의 이중 가닥 RNA를 포함하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다.

[0101] 마이크로RNA(miRNA)는 루프에 의해 연결된 짧은(예를 들어, 19개 내지 25개의 염기쌍) 이중 가닥 RNA 서열을 포함하고, 하나 이상의 벌지(예를 들어, 쌍 형성오류가 일어나거나 쌍을 형성하지 않은 염기쌍)를 포함하는 하나 이상의 추가의 이중 가닥 RNA 서열을 함유하는, 세포에서 RNAi를 유도하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "miRNA"는 내인성 miRNA뿐만 아니라 외인성 또는 이종성 miRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, "miRNA"는 pri-miRNA 또는 pre-miRNA를 지칭할 수 있다. miRNA 프로세싱 동안, pri-miRNA 전사체가 생성된다. pri-miRNA는 드로샤(Drosha)-DGCR8에 의해 프로세싱되는데, 하나 이상의 서열을 절제하여, 5'플랭킹 영역, 가이드 가닥, 루프 영역, 비-가이드 가닥 및 3'플랭킹 영역; 또는 5'플랭킹 영역, 비-가이드 가닥, 루프 영역, 가이드 가닥 및 3'플랭킹 영역을 갖는 pre-miRNA를 남김으로써 pre-miRNA를 생성시킨다. 그 후, pre-miRNA는 세포질로 내보내지고, 다이서에 의해 프로세싱되어 가이드 가닥과 비-가이드(또는 패신저) 가닥을 갖는 siRNA를 생성시킨다. 그 후, 가이드 가닥은 RISC 복합체에 의해 이용되어, 예를 들어 가이드 가닥에 상보적인 표적 RNA 서열을 인식함으로써, 유전자 침묵을 촉매한다. miRNA의 추가 설명은, 예를 들어 WO 2008/150897호에서 찾아볼 수 있다. miRNA에 의한 표적 서열의 인식은 표적과, miRNA 시드 서열, 예를 들어 가이드 가닥의 뉴클레오티드 1-8(5'에서 3'로) 사이의 쌍 형성에 의해 주로 결정된다(예를 들어, 문헌[Boudreau, R.L. *et al.* (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:e9] 참조).

[0102] pri/pre-miRNA 구조에서, 이중체의 가이드 가닥:비-가이드 가닥 계면은 상보적인 염기쌍 형성(예를 들어, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성)을 통해 부분적으로 형성된다. 그러나, 일부 구현예에서, 이러한 상보적 염기쌍 형성은 전체 이중체를 통해 확대되지 않는다. 일부 구현예에서, 계면의 벌지는 하나 이상의 뉴클레오티드 위치에 존재할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벌지"는 이중체 내의 이와 반대쪽에 있는 핵산에 비상보적인 핵산의 영역을 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 벌지는 상보적인 핵산들의 영역은 서로 결합하는 반면 중심의 비상보적인 영역의 영역들은 결합하지 않는 경우에 형성된다. 일부 구현예에서, 벌지는 두 상보적인 영역 사이에 위치한 두 가닥의 핵산이 상이한 길이를 갖는 경우에 형성된다. 하기 설명되는 바와 같이, 벌지는 1개 이상의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0103] miRNA 프로세싱 동안, miRNA는 가이드 가닥:비-가이드 가닥 계면에 인접한 절단 부위에서 절단되며, 이에 따라 가이드 가닥과 비-가이드 가닥의 siRNA 이중체를 방출시킨다. 일부 구현예에서, miRNA는 절단 부위에 인접한 센스 또는 안티센스 가닥에 벌지를 포함한다. 또 다른 방식으로 설명하자면, 일부 구현예에서, miRNA는 시드 서열에 인접한 가이드 또는 비-가이드 가닥에 벌지를 포함한다. 이러한 위치에 있는 벌지는 **도 9b**에 도시된 예시적인 구현예에서 화살표로 표시되어 있다.

[0104] 일부 구현예에서, miRNA는 성숙한 비-가이드 가닥의 5' 절단 부위의 반대쪽에 있는 가이드 가닥에 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 비-가이드 가닥의 5' 뉴클레오티드의 반대쪽에 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 성숙한 가이드 가닥의 3' 절단 부위의 반대쪽에 있는 센스 가닥에 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 가이드 가닥의 3' 뉴클레오티드의 반대쪽에 벌지를 포함한다.

[0105] 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 11개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+2) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 반대쪽에 있다.

[0106] 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 10개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(여기서, N=7 또는 N=8임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 10개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+1) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 반대쪽 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9이다.

[0107] 일부 구현예에서, 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-N 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌

지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, N=7이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7의 반대쪽에 있다. 다른 구현예에서, N=8이고, 벌지는 가이드 영역의 염기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 반대쪽에 있다.

[0108] 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, b) 제1 가닥은 적어도 9개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 2-7 또는 염기 2-8을 포함하는 시드 영역을 포함하고, c) 제2 가닥은 적어도 9개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1 또는 염기 9의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다.

[0109] 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, b) 제1 가닥은 적어도 9개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 2-7 또는 염기 2-8을 포함하는 시드 영역을 포함하고, c) 제2 가닥은 적어도 9개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다.

[0110] 일부 구현예에서, 벌지는 가이드 영역 상에 상보적인 염기가 결여되어 있는 이중체의 비-가이드 가닥의 하나 이상의 염기에 의해 형성되며, 여기서 벌지는 가이드 가닥과 염기쌍을 형성하는 염기들에 의해 플랭킹되어 있다. 일부 구현예에서, 벌지 서열은 1개 내지 10개의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 벌지 서열은 약 2개 내지 15개의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 벌지 서열은 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개 또는 약 15개의 뉴클레오티드를 갖는다.

[0111] RNAi 기반 치료법의 안전성은 오프-타겟 유전자 침묵으로 알려져 있는 효과인 의도하지 않은 mRNA와 결합하여 이의 발현을 감소시키는 작은 저해성 RNA(siRNA)의 능력에 의해 방해받을 수 있다. 오프-타겟팅은 시드 영역(작은 RNA의 뉴클레오티드 2-8)이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 불안정화를 유도하는 경우에 주로 발생한다. 감소된 오프-타겟팅 RNAi는 가이드 및 비가이드 서열 내의 염기를 치환함으로써, 예를 들어 CpG 모티프를 생성시킴으로써 설계될 수 있다. 유의하게 더 낮은 오프-타겟 스코어를 생성시킬 수 있는 잠재적인 치환은 최소의 오프-타겟팅 가능성 및 강력한 침묵 능력을 갖는 후보 서열을 확인하는 특이성 중심의(specificity-focused) siRNA 설계 알고리즘인 SiSPOTR 알고리즘을 이용하여 평가될 수 있다(문헌[Boudreau *et al, Nucleic Acids Res*. 2013 Jan; 41(1) e9]). 감소된 SiSPOTR 스코어는 모(parent) RNAi 분자에 비해 더 적은 수의 잠재적인 인간 오프 타겟을 갖는 서열을 예측해준다. 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다. 일부 구현예에서, RNAi는 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다.

[0112] 일부 구현예에서, 제1가닥과 제2가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA(예를 들어, RNA 링커)에 의해 연결되어 있다. 당업계에 통상적으로 알려져 있는 바와 같이, RNA 루프 구조(예를 들어, 스템-루프 또는 헤어핀)는 RNA 분자가 염기쌍을 함께 형성하지 않는 RNA 서열에 의해 분리된 염기쌍을 함께 형성하는 2개의 RNA 서열을 포함하는 경우에 형성된다. 예를 들어, 루프 구조는, 서열 A와 서열 C는 함께 염기쌍을 형성하도록 상보적이거나 부분적으로 상보적이지만 서열 B의 염기들은 함께 염기쌍을 형성하지 않는 경우에, RNA 분자 A-B-C에서 형성될 수 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프를 형성할 수 있는 RNA의 뉴클레오티드 개수는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드 또는 그 사이의 임의의 정수 개의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 루프의 0 내지 50%가 루프의 또 다른 부분에 상보적일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "루프 구조"는 2개의 상보적인 핵산 가닥을 결합시키는 서열이다. 일부 구현예에서, 루프 구조의 1개 내지 3개의 뉴클레오티드는 상보적인 핵산 가닥들에 연속해 있으며, 루프 구조의 원위 부분의 1개 내지 3개의 뉴클레오티드에 상보적일 수 있다. 예를 들어, 루프 구조의 5' 말단의 3개의 뉴클레오티드는 루프 구조의 3' 말단의 3개의 뉴클레오티드에 상보적일 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산은 이종성 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종성 miRNA 스캐폴드의 사용은 miRNA 발현을 조절하기 위해, 예를 들어 miRNA 발현을 증가시키거나 miRNA 발현을 감소시키기 위해 이용된다. 당업계에 알려진 임의의 miRNA 스캐폴드가 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드로부터 유래된다(예를 들어, 문헌[Lagos-Quintana, M. *et al.* (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9] 및 Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA로부터의 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트 참조).

[0115] **IV. 헌팅톤병 및 이의 실험적 모델**

[0116] 헌팅톤병(HD)은 헌팅틴 유전자(HTT)의 엑손 1에서의 CAG 반복부의 확장에 의해 야기되는 유전성 신경변성 질병이다. 결과적인 N-말단 영역에서의 폴리글루타민 지대의 확대는 돌연변이 헌팅틴 단백질(mHtt)에 독성 기능획득을 부여한다. mHtt 독성은 불용성 mHtt 함유 응집체의 형성, 전사 조절이상 및 단백질 항상성의 교란(perturbation)으로부터 발생할 수 있으며, 이들 모두는 신경세포 치사를 일으킬 수 있다(문헌[Saudou *et al.* (1998) *Cell*, 95:55-66]; 문헌[Zuccato *et al.* (2003) *Nat. Genet.* 35:76-83]; 문헌[Schaffar *et al.* (2004) *Mol.Cell.* 15:95-105]; 문헌[Benn *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28:10720-10733]). HD에 걸린 환자의 병리학적 소견은 피질 두께감소(cortical thinning) 및 현저한 진행성 선조체 신경세포 손실을 포함한다(문헌[Rosas *et al.*, (2002) *Neurology* 58:695-701]). 질병 발병은 전형적으로 생애의 30대 내지 40대 동안 일어나며; 증상은 무도형(choreiform) 움직임, 조정력 손상, 진행성 치매 및 다른 정신 장애를 포함한다(문헌[Vonsattel *et al.*, (1985) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:559-577]). 대부분의 경우, 증상은 운동 기능, 인지력 및 성격에서의 미묘한 붕괴와 함께 30세와 40세 사이에 나타나기 시작한다. 시간이 지남에 따라, 이러한 증상은 갑작스럽고 통제할 수 없는 움직임과 근육 통제 상실, 치매, 및 정신 질환, 예를 들어 우울증, 공격성, 불안 및 강박충동적 행동으로 진행된다. 사망은 전형적으로 증상 발생 후 10년 내지 15년째에 일어난다. HD 사례의 10% 미만은 더 빠른 질병 진행을 특징으로 하는 질병의 소아 발병형을 포함한다. 10,000명의 미국인 중 대략 1명이 HD에 걸리는 것으로 여겨진다.

[0117] HD의 유전적 기초는 거의 20년 동안 알려져 있었지만, 현재의 치료법은 대체로 완화적이며, 질병의 근본 원인을 다루지 않고 있다. 이는 부분적으로는 이 질병의 병인이 복잡하며 유해 효과가 매우 다양한 세포 작용에서 관찰된다는 사실에 기인할 가능성이 높다. 따라서, 약물 개발의 초점은 1차적인 문제가 되는 촉발인자, 즉, 돌연변이 HTT 유전자 그 자체에 맞추어져 왔다.

[0118] 대부분의 HD 사례는 *HTT* 유전자에서의 트리뉴클레오티드 CAG 반복부의 확장과 관련되어 있다. *HTT* 유전자 내의 CAG 반복부의 개수는 HD의 발현과 강하게 상호 관련되어 있다. 예를 들어, 35개 이하의 반복부를 갖는 개체는 전형적으로 HD를 발병하지 않지만, 27개 내지 35개의 반복부를 갖는 개체는 HD에 걸릴 자손을 가질 위험이 더 크다. 36개에서 40개 내지 42개의 반복부를 갖는 개체는 불완전한 HD 침투율(penetrance)을 갖는 반면, 40개 내지 42개를 초과하는 반복부를 갖는 개체는 완전한 침투율을 나타낸다. 소아 발병 HD의 사례는 60개 이상의 CAG 반복부 크기와 관련될 수 있다.

[0119] 이러한 CAG 반복부 확장으로부터 생성된 polyQ 확장 Htt 단백질은 세포 응집체 또는 봉입체, 단백질 항상성의 교란, 및 전사 조절이상과 관련된다. 이러한 독성 표현형은 신체의 여러 부분과 관련될 수 있지만, 가장 전형적으로는 신경세포 치사와 관련된다. HD 환자는 흔히 피질 두께감소 및 현저한 진행성 선조체 신경세포 손실을 나타낸다. 선조체는 HD에 대한 뇌의 가장 취약한 영역(특히, 선조체 중형 가시 신경세포(medium spiny neuron))인 것으로 나타나며, 초기 영향은 피각(putamen) 및 꼬리핵(caudate nucleus)에서 관찰된다. 선조체 가시 신경세포에서의 세포 치사, 별아교세포 수의 증가, 및 미세아교세포의 활성화가 HD 환자의 뇌에서 관찰된다. HD는 또한 해마, 대뇌 피질, 시상, 시상 하부 및 소뇌의 특정 영역에 영향을 줄 수 있다.

[0120] Htt 발현을 차단하기 위한 제안된 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)뿐만 아니라 이중체 RNA(dsRNA) 또는 화학적으로 변형된 단일 가닥 RNA(ssRNA)를 이용하는 RNA 간섭(RNAi)의 사용을 포함한다(문헌[Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825]; 문헌[DiFiglia *et al.*, (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:17204-17209]; 문헌[Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063]; 문헌[Drouet *et al.*, (2009) *Ann. Neurol.*65:276-285]; 문헌[Sah *et al.*, (2011) *J. Clin. Invest.* 121:500-507]; 문헌[Matsui *et al.*, (2012) *Drug Discov. Today* 17:443-450]; 문헌[Yu *et al.*, (2012) *Cell* 150:895-908]). 그러나, ASO 접근법을 임상으로 옮기는 데에 있어서의 장애물은 CNS 내로의 ASO의 반복적이고 장기적인(chronic) 주입을 용이하게 하는 장치를 포함시킬 필요성, 및 약물을 넓은 뇌의 표적 영역에 적절하게 분포시킬 필요성을 포함할 수 있다.

[0121] ASO를 이용하여 이러한 잠재적인 문제를 회피하기 위해, 증가된 안전성, 증가된 효율 및 더 오래 지속되는 효능의 가능성을 제공하는, RNAi(예를 들어,siRNA)의 AAV 매개 발현을 이용하는 것이 유리할 수 있다. HD 환자가 돌연변이 Htt 대립형질과 야생형 Htt 대립형질 둘 모두를 발현하기 때문에, 대다수의 siRNA 표적화 서열은 두 대립형질 모두를 분해시킬 가능성이 높을 것이다. 그러나, HD 마우스에서의 비-대립형질 특이적 Htt 침묵은 잘 견뎌지는(well tolerated) 것으로 밝혀졌고, 돌연변이 Htt만을 감소시키는 것과 동일한 이익을 제공할 수 있다(문헌[Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063]; 문헌[Drouet *et al.*, (2009) *Ann. Neurol.* 65:276-

285]; 문헌[Kordasiewicz *et al.*, (2012) *Neuron* 74(6):1031-1044]). 더욱이, AAV 매개 RNAi 후의 비인간 영장류의 피각에서의 야생형 Htt의 부분적이고 지속적인 억제는 보고서에 따르면 어떠한 부작용도 없었는데, 이는 성체 뇌가 감소된 수준의 야생형 Htt를 견딜 수 있음을 암시한다(문헌[McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162]; 문헌[Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209]).

[0122] HD의 동물 모델은 잠재적인 치료 전략, 예를 들어 본 발명의 조성물 및 방법을 시험하는데 이용될 수 있다. HD의 마우스 모델은 당업계에 알려져 있다. 이는 돌연변이 *HTT*의 단편을 갖는 마우스 모델, 예를 들어 R6/1 및 N171-82Q HD 마우스를 포함한다(문헌[Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825], 문헌[Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633], 문헌[Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197]). 본 명세서에 기재된 마우스 HD 모델의 또 다른 예는 YAC128 마우스 모델이다. 이 모델은 128개의 CAG 반복부를 갖는 돌연변이 인간 *HTT* 유전자를 발현하는 효모 인공 염색체(YAC)를 지니며, YAC128 마우스는 12개월령까지 선조체에서 Htt 응집체의 유의하고 광범위한 축적을 나타낸다(문헌[Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567], 문헌[Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232]).

[0123] HD의 다른 동물 모델이 또한 이용될 수 있다. 예를 들어, 트랜스제닉(transgenic) 래트(문헌[von Horsten, S. *et al.* (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:617-24]) 및 붉은털 원숭이(문헌[Yang, S.H. *et al.* (2008) *Nature* 453:921-4]) 모델이 기술되었다. 비유전적 모델이 또한 알려져 있다. 이는 설치류 또는 비인간 영장류에서 선조체 신경세포 세포 치사를 유도하기 위한 흥분독성(excitotoxic) 화합물(예를 들어, 퀴놀린산 또는 카인산) 또는 미토콘드리아 독소(예를 들어, 3-니트로프로피온산 및 말론산)의 이용을 가장 많이 포함한다(추가의 설명 및 참고문헌에 대해서는 문헌[Ramaswamy, S. *et al.* (2007) *ILAR J.* 48:356-73]을 참조함).

[0124] **V.헌팅톤병의 치료 방법**

[0125] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물(예를 들어, 본 발명의 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물)을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물(예를 들어, 본 발명의 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물)을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물(예를 들어, 본 발명의 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물)을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0126] 일부 양태에서, 본 발명은 유효량의, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 재조합 바이러스 입자를, 포유동물의 뇌에 투여하는 단계를 포함하여 HD의 증상을 개선시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, HD의 증상은 무도병, 경직, 통제할 수 없는 신체 움직임, 근육 통제 상실, 조정력 결여, 초조(restlessness), 느려진 안구 움직임, 비정상적인 자세, 불안정, 실조성 보행, 비정상적인 안면 표정, 언어능력 문제, 저작 및/또는 삼키기의 어려움, 수면 장애, 발작, 치매, 인지력 결손(예를 들어, 계획, 추상적 사고, 유연성, 규칙 습득, 대인 민감성(interpersonal sensitivity), 자기 통제, 주의력, 학습 및 기억과 관련된 능력 저하), 우울증, 불안, 성격 변화, 공격성, 충동적 행동, 강박충동적 행동, 성욕과다증, 정신병 증상, 무감동(apathy), 과민성, 자살 생각, 체중 감소, 근육 위축, 심장 마비, 내당력 저하, 고환 위축 및 골다공증을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0127] 일부 양태에서, 본 발명은 HD를 예방하거나 이의 진행을 지연시키는 방법을 제공한다. 상염색체 우성 HD는 유전자형이 판별될 수 있는 유전병이다. 예를 들어, *HTT* 내의 CAG 반복부의 개수는 PCR 기반 반복부 크기결정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 유형의 진단은 (예를 들어, 임상 증상의 제시와 함께) 소아 또는 성인의 직접 검사, (예를 들어, 융모막 융모 샘플링 또는 양수천자에 의한) 태아 스크리닝 또는 태아 배제 검사, 또는 착상전 배아 스크리닝을 통해 생애의 어떠한 단계에서도 수행될 수 있다. 이와 같이, 증상 발생 전에 진단이 이루어질 수 있기 때문에 본 명세서에 기재된 방법은 HD의 예방적 치료법으로서 이용될 수 있다. 예를 들어, HD는 증상 발생(예를 들어, CNS 세포 손실) 전에 유전자 검사(산전 검사, 출생시 검사 등)에 의해 진단되고 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 rAAV 입자를 사용하여) 예방적으로 치료되어, HD 증상 발생 및/또는 진행을 예방할 수 있다. 추가로, HD는 뇌 영상화에 의해 꼬리핵 및/또는 피각 및/또는 확장된 뇌실의 수축을 찾아냄으로써 진단될 수 있다. 이러한 증상은 HD의 가족력 및/또는 임상적 증상과 조합되어 HD를 나타낼 수 있다.

[0128] HD의 증상의 개선을 결정하는 수단은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 통합형 헌팅톤병 평가 척도(Unified Huntington's Disease Rating Scale, UHDRS)를 이용하여 운동 기능, 인지 기능, 행동 비정상 및 기능적 능력

(functional capacity)을 평가할 수 있다(예를 들어, 문헌[Huntington Study Group (1996) *Movement Disorders* 11:136-42] 참조). 이러한 평가 척도는 HD 활동 및 일상 생활 척도(HD Activities and Daily Living Scale), Marsden과 Quinn의 무도병 중증도 척도, 신체 장애 및 독립성 척도(Physical Disability and Independence scale), HD 운동 평가 척도(HDMRS), HD 기능적 능력 척도(HDFCS) 및 정량화 신경학적 검사(quantitated neurological exam, QNE)와 같은 시험으로부터의 요소를 포함하는, 질병 병리의 다수의 양상에 대한 균일하고 포괄적인 시험을 제공하도록 개발되었다. HD 증상의 개선을 결정하는데 유용한 다른 시험은 제한 없이 몬트리올 인지력 평가(Montreal Cognitive Assessment), 뇌 영상화(예를 들어, MRI), 범주 유창성 시험(Category Fluency Test), 선로 잇기 시험(Trail Making Test), 지도 찾기(Map Search), 스트룹 단어 읽기 시험(Stroop Word Reading Test), 빨리 두드리기 작업(Speeded Tapping Task), 및 기호 숫자 양식 시험(Symbol Digit Modalities Test)을 포함할 수 있다.

[0129] 본 발명의 일부 양태에서, 방법 및 조성물은 HD에 걸린 인간의 치료에 이용된다. 상기 기재된 바와 같이, HD는 상염색체 우성 방식으로 유전되며, *HTT* 유전자 내의 CAG 반복부 확장에 의해 야기된다. 소아 발병 HD는 부계로부터 가장 많이 유전된다. 헌팅톤병 유사 표현형은 또한 다른 유전자좌, 예를 들어, *HDL1, PRNP, HDL2, HDL3* 및 *HDL4*와 상호 관련되어 있다. *GRIN2A, GRIN2B, MSX1, GRIK2,* 및 *APOE* 유전자에서의 돌연변이를 비롯한 다른 유전자좌가 HD 증상의 발현을 변형시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

[0130] 일부 양태에서, 본 발명은 헌팅톤병에 걸린 포유동물에서 htt mRNA를 표적화하는 개선된 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 본 명세서에 기재된 RNAi는 (예를 들어, rAAV 벡터의 일부로서) 특히 헌팅톤병을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0131] 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 오프-타겟 유전자 침묵을 감소시키도록 개선된다. 일부 구현예에서, RNAi는 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 시드 영역에 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다.

[0132] 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:15)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3'(SEQ ID NO:16)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:15와 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과 또는 약 99% 초과의 동일성 중 임의의 동일성 %를 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:16과 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과 또는 약 99% 초과의 동일성 중 임의의 동일성 %를 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다.

[0133] 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공

한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:17)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3'(SEQ ID NO:18)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:17과 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과 또는 약 99% 초과의 동일성 중 임의의 동일성 %를 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 SEQ ID NO:18과 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과 또는 약 99% 초과의 동일성 중 임의의 동일성 %를 갖는 핵산 서열을 포함하지만 CpG 모티프를 유지한다.

[0134] 일부 구현예에서, RNAi는 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 작은 저해성 또는 간섭성 RNA(siRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 길이가 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍인 이중 가닥 RNA 분자로 당업계에 알려져 있다. 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 짧은 루프(예를 들어, 약 4개 내지 약 11개의 뉴클레오티드)에 의해 연결된 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍의 이중 가닥 RNA를 포함하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다.

[0135] 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일한 가이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일하거나, 약 91% 동일하거나, 약 92% 동일하거나, 약 93% 동일하거나, 약 94% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 96% 동일하거나, 약 97% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하거나, 약 100% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 가이드 서열을 포함한다.

[0136] 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일한 비-가이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일하거나, 약 91% 동일하거나, 약 92% 동일하거나, 약 93% 동일하거나, 약 94% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 96% 동일하거나, 약 97% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하거나, 약 100% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 비-가이드 서열을 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, 제1 핵산의 SEQ ID NO:1의 잔기 11 및 잔기 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, 이중체는 길이가 18개 내지 25개 염기쌍이다. 일부 구현예에서, 제1 가닥 및/또는 제2 가닥은 3' 오버행 영역, 5' 오버행 영역, 또는 3' 오버행 영역과 5' 오버행 영역 둘 모두를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi뿐만 아니라 이를 사용하기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 여기서 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않으며, 제1 가닥의 SEQ ID NO:1의 잔기 11 또는 잔기 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0138] 일부 구현예에서, 제1가닥과 제2가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA에 의해 연결되어 있다. 당업계에 통상적으로 알려져 있는 바와 같이, RNA 루프 구조(예를 들어, 스템-루프 또는 헤어핀)는 RNA 분자가 염기쌍을 함께 형성하지 않는 RNA 서열에 의해 분리된 염기쌍을 함께 형성하는 2개의 RNA 서열을 포함하는 경우에 형성된다. 예를 들어, 루프 구조는, 서열 A와 서열 C는 함께 염기쌍을 형성하도록 상보적이거나 부분적으로 상보적이지만 서열 B의 염기들은 함께 염기쌍을 형성하지 않는 경우에, RNA 분자 A-B-C에서 형성될 수 있다.

[0139] 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 SEQ ID NO:7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터 유전체는 SEQ ID NO:13의 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0140] 일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi(여기서, 제2 가닥의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않음)를 포유동물(예를 들어, HD에 걸린 포유동물)에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥의 SEQ ID NO:1의 위치 11과 위치 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을

형성하지 않고, 제1 핵산의 SEQ ID NO:1의 위치 11과 위치 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 RNAi를 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는 AAV 입자, 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 아데노바이러스 입자, 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 렌티바이러스 입자 또는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 HSV 입자이며, 여기서 rAAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 HSV 벡터는 RNAi를 인코딩한다.

[0141] 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자의 전달은 뇌로의 바이러스 입자의 주입에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자의 전달은 선조체로의 바이러스 입자의 주입에 의해 이루어진다. 선조체내 투여는 재조합 바이러스 입자를 HD에 의해 크게 영향을 받는 뇌의 영역인 선조체(피각 및 꼬리핵을 포함함)에 전달한다. 추가로 그리고 이론에 구속하고자 함이 없이, 선조체 내로 주입된 재조합 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)는 제한 없이 투사 영역(projection area)(예를 들어, 피질)을 포함하는 뇌의 다른 영역으로 (예를 들어, 역행(retrograde) 수송을 통해) 또한 분산될 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 대류 강화 전달(convection enhanced delivery)(예를 들어, 선조체로의 대류 강화 전달)에 의해 전달된다.

[0142] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 포유동물의 헌팅톤병을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물의 세포에서 htt의 축적을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 조성물을 헌팅톤병에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 그 포유동물에서 htt의 발현을 저해하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, htt는 돌연변이 htt(예를 들어, 35개 초과, 36개 초과, 37개 초과, 38개 초과, 39개 초과, 40개 초과, 41개 초과 또는 42개 초과의 CAG 반복부를 포함하는 htt)이다. 일부 구현예에서, 야생형 htt의 발현 및/또는 축적이 또한 저해된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 그리고 이론에 구속하고자 함이 없이, HD에 걸린 포유동물에서의 돌연변이 htt의 발현 및/또는 축적의 저해는 매우 유익하지만, (예를 들어, 본 발명의 RNAi의) 부작용으로서 동일한 포유동물에서의 야생형 htt의 발현 및/또는 축적의 저해는 잘 견뎌질 수 있는 것으로(예를 들어, 의도하지 않은 부작용을 거의 생성시키지 않거나 전혀 생성시키지 않음) 여겨진다.

[0143] 일부 구현예에서, 세포는 벡터(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 발현 작제물을 포함하는 벡터)를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 rAAV 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 세포는 중추 신경계(CNS) 세포이다.

[0144] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 유효량의 재조합 바이러스 입자의 투여는 투여 부위 또는 그 근처에 있는 신경세포(예를 들어, 가시 신경세포과 같은 선조체 신경세포)를 형질도입시킨다. 일부 구현예에서, 신경세포의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과 또는 약 100% 중 임의의 %가 형질도입된다. 일부 구현예에서, 신경세포의 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 25% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 50%, 또는 약 30% 내지 약 50%가 형질도입된다. miRNA를 발현하는 재조합 바이러스 입자에 의해 형질도입된 신경세포를 확인하는 방법은 당업계에 알려져 있으며; 예를 들어, 면역조직화학, RNA 검출(예를 들어, qPCR, 노던 블롯팅, RNA-seq, 원위치 하이브리드화(in situ hybridization) 등) 또는 강화 녹색 형광 단백질과 같은 공동 발현되는 마커의 사용을 이용하여 발현을 검출할 수 있다.

[0145] 본 발명의 일부 구현예에서, 방법은 HD에 걸린 포유동물, 예를 들어 인간을 치료하기 위한 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 유효량의 재조합 바이러스 입자의 포유동물의 뇌로의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 뇌의 하나 이상의 위치에 주입되어 적어도 신경세포에서 본 발명의 RNAi의 발현을 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 조성물은 뇌의 1개 위치, 2개 위치, 3개 위치, 4개 위치, 5개 위치, 6개 위치, 7개 위치, 8개 위치, 9개 위치, 10개 위치 또는 10개 초과의 위치 중 어느 하나 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물은 선조체 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물은 등쪽 선조체 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물은 피각 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물은 꼬리핵 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물은 피각 및 꼬리핵 내로 주입된다.

[0146] 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 뇌의 한쪽 반구에 투여된다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 뇌의 양쪽 반구에 투여된다.

[0147] 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 1개 초과의 위치에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자의 다중 주입은 1시간 이하, 2시간 이하, 3시간 이하, 4시간 이하, 5시간 이하, 6시간 이하, 9시간 이하, 12시간 이하 또는 24시간 이하의 간격이다.

[0148] 일부 구현예에서, 본 발명은 돌연변이 *HTT*의 활성을 억제하는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 유효량의 약제학적 조성물을 투여함으로써 HD에 걸린 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0149] 일부 구현예에서, 방법은 돌연변이 *HTT*의 활성을 억제하는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{12}개, 적어도 약 6×10^{12}개, 적어도 약 7×10^{12}개, 적어도 약 8×10^{12}개, 적어도 약 9×10^{12}개, 적어도 약 10×10^{12}개, 적어도 약 11×10^{12}개, 적어도 약 15×10^{12}개, 적어도 약 20×10^{12}개, 적어도 약 25×10^{12}개, 적어도 약 30×10^{12}개, 또는 적어도 약 50×10^{12}개의 유전체 카피/㎖ 중 임의의 개수의 유전체 카피/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{12}개 내지 약 6×10^{12}개, 약 6×10^{12}개 내지 약 7×10^{12}개, 약 7×10^{12}개 내지 약 8×10^{12}개, 약 8×10^{12}개 내지 약 9×10^{12}개, 약 9×10^{12}개 내지 약 10×10^{12}개, 약 10×10^{12}개 내지 약 11×10^{12}개, 약 11×10^{12}개 내지 약 15×10^{12}개, 약 15×10^{12}개 내지 약 20×10^{12}개, 약 20×10^{12}개 내지 약 25×10^{12}개, 약 25×10^{12}개 내지 약 30×10^{12}개, 약 30×10^{12}개 내지 약 50×10^{12}개, 또는 약 50×10^{12}개 내지 약 100×10^{12}개의 유전체 카피/㎖ 중 임의의 개수의 유전체 카피/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{12}개 내지 약 10×10^{12}개, 약 10×10^{12}개 내지 약 25×10^{12}개, 또는 약 25×10^{12}개 내지 약 50×10^{12}개의 유전체 카피/㎖ 중 임의의 개수의 유전체 카피/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{9}개, 적어도 약 6×10^{9}개, 적어도 약 7×10^{9}개, 적어도 약 8×10^{9}개, 적어도 약 9×10^{9}개, 적어도 약 10×10^{9}개, 적어도 약 11×10^{9}개, 적어도 약 15×10^{9}개, 적어도 약 20×10^{9}개, 적어도 약 25×10^{9}개, 적어도 약 30×10^{9}개, 또는 적어도 약 50×10^{9}개의 형질도입 단위/㎖ 중 임의의 개수의 형질도입 단위/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{9}개 내지 약 6×10^{9}개, 약 6×10^{9}개 내지 약 7×10^{9}개, 약 7×10^{9}개 내지 약 8×10^{9}개, 약 8×10^{9}개 내지 약 9×10^{9}개, 약 9×10^{9}개 내지 약 10×10^{9}개, 약 10×10^{9}개 내지 약 11×10^{9}개, 약 11×10^{9}개 내지 약 15×10^{9}개, 약 15×10^{9}개 내지 약 20×10^{9}개, 약 20×10^{9}개 내지 약 25×10^{9}개, 약 25×10^{9}개 내지 약 30×10^{9}개, 약 30×10^{9}개 내지 약 50×10^{9}개, 또는 약 50×10^{9}개 내지 약 100×10^{9}개의 형질도입 단위/㎖ 중 임의의 개수의 형질도입 단위/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{9}개 내지 약 10×10^{9}개, 약 10×10^{9}개 내지 약 15×10^{9}개, 약 15×10^{9}개 내지 약 25×10^{9}개, 또는 약 25×10^{9}개 내지 약 50×10^{9}개의 형질도입 단위/㎖ 중 임의의 개수의 형질도입 단위/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10}개, 적어도 약 6×10^{10}개, 적어도 약 7×10^{10}개, 적어도 약 8×10^{10}개, 적어도 약 9×10^{10}개, 적어도 약 10×10^{10}개, 적어도 약 11×10^{10}개, 적어도 약 15×10^{10}개, 적어도 약 20×10^{10}개, 적어도 약 25×10^{10}개, 적어도 약 30×10^{10}개, 적어도 약 40×10^{10}개, 또는 적어도 약 50×10^{10}개의 감염 단위/㎖ 중 임의의 개수의 감염 단위/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10}개 내지 적어도 약 6×10^{10}개, 적어도 약 6×10^{10}개 내지 적어도 약 7×10^{10}개, 적어도 약 7×10^{10}개 내지 적어도 약 8×10^{10}개, 적어도 약 8×10^{10}개 내지 적어도 약 9×10^{10}개, 적어도 약 9×10^{10}개 내지 적어도 약 10×10^{10}개, 적어도 약 10×10^{10}개 내지 적어도 약 11×10^{10}개, 적어도 약 11×10^{10}개 내지 적어도 약 15×10^{10}개, 적어도 약 15×10^{10}개 내지 적어도 약 20×10^{10}개, 적어도 약 20×10^{10}개 내지 적어도

약 25 × 10^{10}개, 적어도 약 25 × 10^{10}개 내지 적어도 약 30 × 10^{10}개, 적어도 약 30 × 10^{10}개 내지 적어도 약 40 × 10^{10}개, 적어도 약 40 × 10^{10}개 내지 적어도 약 50 × 10^{10}개, 또는 적어도 약 50 × 10^{10}개 내지 적어도 약 100 × 10^{10}개의 감염 단위/㎖ 중 임의의 개수의 감염 단위/㎖이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5 × 10^{10}개 내지 적어도 약 10 × 10^{10}개, 적어도 약 10 × 10^{10}개 내지 적어도 약 15 × 10^{10}개, 적어도 약 15 × 10^{10}개 내지 적어도 약 25 × 10^{10}개, 또는 적어도 약 25 × 10^{10}개 내지 적어도 약 50 × 10^{10}개의 감염 단위/㎖ 중 임의의 개수의 감염 단위/㎖이다.

[0150] 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 체중 kg당 적어도 약 1 × 10^{8}개 내지 적어도 약 1 × 10^{13}개의 유전체 카피 중 임의의 개수의 유전체 카피이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 체중 kg당 약 1 × 10^{8}개 내지 약 1 × 10^{13}개의 유전체 카피 중 임의의 개수의 유전체 카피이다.

[0151] 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 총량은 적어도 약 1 × 10^{9} 내지 적어도 약 1 × 10^{14}개의 유전체 카피 중 임의의 개수의 유전체 카피이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 총량은 약 1 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{14}개의 유전체 카피 중 임의의 개수의 유전체 카피이다.

[0152] 본 발명의 일부 구현예에서, 선조체에 주입되는 조성물의 부피는 약 1 ㎕ 초과, 약 2 ㎕ 초과, 약 3 ㎕ 초과, 약 4 ㎕ 초과, 약 5 ㎕ 초과, 약 6 ㎕ 초과, 약 7 ㎕ 초과, 약 8 ㎕ 초과, 약 9 ㎕ 초과, 약 10 ㎕ 초과, 약 15 ㎕ 초과, 약 20 ㎕ 초과, 약 25 ㎕ 초과, 약 50 ㎕ 초과, 약 75 ㎕ 초과, 약 100 ㎕ 초과, 약 200 ㎕ 초과, 약 300 ㎕ 초과, 약 400 ㎕ 초과, 약 500 ㎕ 초과, 약 600 ㎕ 초과, 약 700 ㎕ 초과, 약 800 ㎕ 초과, 약 900 ㎕ 또는 약 1 ㎖ 초과, 또는 그 사이의 임의의 양 중 어느 하나의 양이다.

[0153] 일부 구현예에서, 조성물의 제1 부피가 뇌의 제1 영역 내로 주입되고, 조성물의 제2 부피가 뇌의 제2 영역 내로 주입된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조성물의 제1 부피가 꼬리핵 내로 주입되고, 조성물의 제2 부피가 피각 내로 주입된다. 일부 구현예에서, 조성물의 1X 부피가 꼬리핵 내로 주입되고, 조성물의 1.5X, 2X, 2.5X, 3X, 3.5X 또는 4X 부피가 피각 내로 주입되며, 여기서 X는 약 1 ㎕ 초과, 2 ㎕, 약 3 ㎕ 초과, 약 4 ㎕ 초과, 약 5 ㎕ 초과, 약 6 ㎕ 초과, 약 7 ㎕ 초과, 약 8 ㎕ 초과, 약 9 ㎕ 초과, 약 10 ㎕ 초과, 약 15 ㎕ 초과, 약 20 ㎕ 초과, 약 25 ㎕ 초과, 약 50 ㎕ 초과, 약 75 ㎕ 초과, 약 100 ㎕ 초과, 약 200 ㎕ 초과, 약 300 ㎕ 초과, 약 400 ㎕ 초과, 약 500 ㎕ 초과, 약 600 ㎕ 초과, 약 700 ㎕ 초과, 약 800 ㎕ 초과, 약 900 ㎕ 또는 약 1 ㎖ 초과, 또는 그 사이의 임의의 양 중 어느 하나의 부피이다.

[0154] 본 발명의 조성물(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 재조합 바이러스 입자)은 단독으로 사용되거나 HD를 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다. 순차적 투여 사이의 간격은 적어도 수 분, 수 시간 또는 수 일(또는 대안적으로 그 미만) 단위일 수 있다.

[0155] **V. RNAi 발현 작제물 및 벡터**

[0156] 본 발명은 본 명세서에 기재된 RNAi의 발현을 위한 발현 작제물, 벡터 및 바이러스 입자를 제공한다.

[0157] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산은 이종성 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종성 miRNA 스캐폴드의 사용은 miRNA 발현을 조절하기 위해, 예를 들어 miRNA 발현을 증가시키거나 miRNA 발현을 감소시키기 위해 이용된다. 당업계에 알려진 임의의 miRNA 스캐폴드가 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드로부터 유래된다(예를 들어, 문헌[Lagos-Quintana, M. *et al.* (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9] 및 Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA로부터의 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트 참조). 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 SEQ ID NO:14에 의해 제공된다.

[0158] 일부 구현예에서, RNAi는 장애와 관련된 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 구현예에서, 장애는 CNS 장애이다. 이론에 구속하고자 함이 없이, RNAi를 이용하여 기능획득이 장애와 관련된 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 감소시키거나 제거할 수 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 CNS 장애의 비제한적인 예(표적화되거나 공급될 수 있는 예시적인 유전자는 각각의 장애에 대하여 괄호 안에 제공됨)는 뇌졸중(예를 들어, *카스파제-3*, *Beclin1*, *Ask1*, *PAR1*, *HIF1α*, *PUMA*, 및/또는 문헌[Fukuda, A.M. and Badaut, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456]에 기재된 임의의 유전자), 헌팅

톤병(돌연변이 *HTT*), 간질(예를 들어, *SCN1A, NMDAR, ADK*, 및/또는 문헌[Boison, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668]에 기재된 임의의 유전자), 파킨슨병(알파-시뉴클레인(alpha-synuclein)), 루게릭병(근위축성 측삭 경화증으로도 알려져 있음; *SOD1*), 알츠하이머병(tau, 아밀로이드 전구체 단백질), 피질기저핵 변성 또는 CBD(tau), 피질기저핵 신경절 변성 또는 CBGD(tau), 전두측두엽 치매 또는 FTD(tau), 진행성 핵상 마비 또는 PSP(tau), 다계통 위축증 또는 MSA(알파-시뉴클레인), 뇌암(예를 들어, 뇌암과 관련된 돌연변이 또는 과발현 종양유전자) 및 리소좀 축적병(LSD)을 포함한다. 본 발명의 장애는 피질의 넓은 영역, 예를 들어 피질의 1개 초과의 기능적 영역, 피질의 1개 초과의 엽 및/또는 전체 피질을 포함하는 장애를 포함할 수 있다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 장애의 다른 비제한적인 예는 외상성 뇌 손상, 효소 기능이상 장애, 정신 장애(외상후 스트레스 증후군을 포함함), 신경변성 질병 및 인지 장애(치매, 자폐증 및 우울증을 포함함)를 포함한다. 효소 기능이상 장애는 제한 없이 백혈구감소증(카나반병(Canavan's disease)을 포함함) 및 하기 기재된 임의의 리소좀 축적병을 포함한다.

[0159] 일부 구현예에서, 트랜스진(예를 들어, 본 발명의 RNAi)은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시형 초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈(CAG) 프로모터(CAG 프로모터; 문헌[Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9]) 및 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터(문헌[Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23] 및 문헌[Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10])를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터, 또는 닭 β-액틴(CBA) 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함한다. 프로모터는 항시적, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은 CBA 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 이종성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 예시적인 프로모터 및 설명은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제20140335054호에서 찾아볼 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CBA 프로모터, 최소 CBA 프로모터, CMV 프로모터 또는 GUSB 프로모터이다.

[0160] 항시적 프로모터의 예는 제한 없이 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로 RSV 인핸서를 가짐), 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로 CMV 인핸서를 가짐)[예를 들어, 문헌[Boshart *et al, Cell*, 41:521-530 (1985)] 참조], SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 환원효소 프로모터, 13-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터 및 EF1a 프로모터[Invitrogen]를 포함한다.

[0161] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하며, 외인적으로 공급된 화합물, 환경 요인, 예를 들어 온도, 또는 특정 생리학적 상태의 존재, 예를 들어, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제하는 세포에서만 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 제한 없이 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 포함하는 다양한 상업적 공급처로부터 구입 가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되어 있으며, 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인적으로 공급된 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연 유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex) 유도성 마우스 유암 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088호); 탈피호르몬 곤충 프로모터(문헌[No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,93:3346-3351 (1996)]), 테트라사이클린 억제성 시스템(문헌[Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)]), 테트라사이클린 유도성 시스템(문헌[Gossen *et al.*, *Science*, 268:1766-1769 (1995)], 또한 문헌[Harvey *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)]을 참조함), RU486 유도성 시스템(문헌[Wang *et al.*, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997)] 및 문헌[Wang *et al.*, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)]) 및 라파마이신 유도성 시스템(Magari *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997))을 포함한다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 유도성 프로모터의 또 다른 유형은 특정 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제하는 세포에서만 조절되는 프로모터이다.

[0162] 또 다른 구현예에서, 트랜스진에 대한 천연 프로모터 또는 이의 단편이 사용될 것이다. 천연 프로모터는 트랜스진의 발현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요망되는 경우에 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 트랜스진의 발현이 일시적 또는 발달적으로, 또는 조직 특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 사용될 수 있다. 추가의 구현예에서, 다른 천연 발현 제어 요소, 예를 들어, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작(Kozak) 컨센서스 서열을 또한 사용하여 천연 발현을 모방할 수 있다.

[0163] 일부 구현예에서, 조절 서열은 조직 특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에, 조직 특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직 특이적 전사 인자와 결합한다. 이러한 조직 특이적 조절 서열

(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등)은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예시적 조직 특이적 조절 서열은 다음과 같은 조직 특이적 프로모터를 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 신경세포성, 예를 들어, 신경세포 특이적 에놀라제(NSE) 프로모터(문헌[Andersen *et al., Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)]), 신경미세섬유 경쇄 유전자 프로모터(문헌[Piccioli *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)]), 및 신경세포 특이적 vgf 유전자 프로모터(문헌[Piccioli *et al., Neuron*, 15:373-84 (1995)]). 일부 구현예에서, 조직 특이적 프로모터는 신경세포 핵(NeuN), 아교 섬유 산성 단백질(GFAP), 선종성 결장폴립증(APC), 및 이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1(Iba-1)로부터 선택된 유전자의 프로모터이다. 다른 적절한 조직 특이적 프로모터는 당업자에게 명백할 것이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 닭 베타-액틴 프로모터이다.

[0164] 일부 구현예에서, 프로모터는 CNS의 세포에서 이종성 핵산을 발현시킨다. 이와 같이, 일부 구현예에서, 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산은 CNS 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 뇌 세포에서 이종성 핵산을 발현시킨다. 뇌 세포는 제한 없이 신경세포(예를 들어, 감각 신경세포, 운동 신경세포, 사이신경세포(interneuron), 도파민성 신경세포, 중형 가시 신경세포, 콜린성 신경세포, GABA성(GABAergic) 신경세포, 피라미드 신경세포 등), 신경아교세포(예를 들어, 미세아교세포, 큰아교세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막세포, 방사 아교세포(radial glia) 등), 뇌 실질 세포(brain parenchyma cell), 미세아교세포, 뇌실막세포, 및/또는 푸르킨예(Purkinje) 세포를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 뇌세포를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 신경세포 및/또는 신경아교세포에서 이종성 핵산을 발현시킨다. 일부 구현예에서, 신경세포는 꼬리핵의 중형 가시 신경세포, 피각의 중형 가시 신경세포, 피질 IV층의 신경세포 및/또는 피질층 V의 신경세포이다.

[0165] CNS 세포, 뇌 세포, 신경세포 및 신경아교세포에서 전사체(예를 들어, 이종성 트랜스진)를 발현시키는 다양한 프로모터가 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에 기재되어 있다. 이러한 프로모터는 선택된 유전자와 통상적으로 관련된 제어 서열 또는 이종성 제어 서열을 포함할 수 있다. 흔히, 유용한 이종성 제어 서열은 포유동물 또는 바이러스 유전자를 인코딩하는 서열로부터 유래된 것을 포함한다. 예는 제한 없이 SV40 초기 프로모터, 마우스 유암 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(Ad MLP), 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 예를 들어 CMV 즉시형 초기 프로모터 영역(CMVIE), 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 합성 프로모터, 하이브리드 프로모터 등을 포함한다. 또한, 뮤린 메탈로티오네인 유전자와 같은 비바이러스 유전자로부터 유래된 서열이 또한 사용될 수 있다. 이러한 프로모터 서열은, 예를 들어 Stratagene(San Diego, CA)으로부터 상업적으로 구입 가능하다. CNS 특이적 프로모터 및 유도성 프로모터가 사용될 수 있다. CNS 특이적 프로모터의 예는 제한 없이 CNS 특이적 유전자, 예를 들어 미엘린 염기성 단백질(MBP), 아교 섬유 산 단백질(GFAP) 및 신경세포 특이적 에놀라제(NSE)로부터 단리된 것을 포함한다. 유도성 프로모터의 예는, 특히 탈피호르몬, 테트라사이클린, 메탈로티오네인 및 저산소증에 대한 DNA 반응성 요소를 포함한다.

[0166] 본 발명은 AAV 바이러스 입자 내로의 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열의 도입 또는 패키징을 위한 재조합 바이러스 유전체의 사용을 고려한다. 재조합 바이러스 유전체는 RNAi의 발현을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, 이종성 핵산, ITR, 리보솜 결합 요소, 종결인자, 인핸서, 선택 마커, 인트론, polyA 신호 및/또는 복제 원점을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 인핸서, 스플라이스 공여체/스플라이스 수용체 쌍, 매트릭스 부착 부위 또는 폴리아데닐화 신호 중 하나 이상을 포함한다.

[0167] 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 벡터를 포함하는 유효량의 rAAV 입자의 투여는 투여 부위(예를 들어, 선조체 및/또는 피질) 또는 그 근처에 있거나 투여 부위로부터 더 멀리 떨어져 있는 세포(예를 들어, CNS 세포, 뇌 세포, 신경세포 및/또는 신경아교세포)를 형질도입시킨다. 일부 구현예에서, 신경세포의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과 또는 약 100% 중 임의의 %가 형질도입된다. 일부 구현예에서, 신경세포의 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 25% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 50%, 또는 약 30% 내지 약 50%가 형질도입된다. miRNA를 발현하는 재조합 바이러스 입자에 의해 형질도입된 신경세포를 확인하는 방법은 당업계에 알려져 있으며; 예를 들어, 면역조직화학, RNA 검출(예를 들어, qPCR, 노던 블롯팅, RNA-seq, 원위치 하이브리드화 등) 또는 강화 녹색 형광 단백질과 같은 공동 발현되는 마커의 사용을 이용하여 발현을 검출할 수 있다.

[0168] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자기 보완성(self-complementing) 유전체(예를 들어, 자기 상보성 rAAV 벡터)를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 자기 보완성 벡터 유전체를 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자기 보완성

AAV 유전체의 사용 방법은 미국 특허 제6,596,535호; 미국 특허 제7,125,717호; 미국 특허 제7,465,583호; 미국 특허 제7,785,888호; 미국 특허 제7,790,154호; 미국 특허 제7,846,729호; 미국 특허 제8,093,054호; 및 미국 특허 제8,361,457호; 및 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 자기 보완성 유전체를 포함하는 rAAV는 이의 부분적으로 보완성인 서열(예를 들어, 이종성 핵산의 코딩 및 비코딩 가닥을 보완함)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 벡터는 이종성 핵산을 인코딩하는 제1 핵산 서열 및 그 핵산의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다.

[0169] 일부 구현예에서, RNAi를 인코딩하는 제1 이종성 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 인코딩하는 제2 이종성 핵산 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결되어 있다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:12)를 포함한다. 돌연변이된 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 유전체의 복제 시에, rep 단백질은 돌연변이된 ITR에서 바이러스 유전체를 절단하지 않을 것이며, 따라서 5'에서 3' 순서로 하기를 포함하는 재조합 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이된 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드에 대해 역배향인 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR.

[0170] **VI. 바이러스 입자 및 바이러스 입자를 생성시키는 방법**

[0171] 본 발명은, 특히 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 입자뿐만 아니라 포유동물의 질병 또는 장애, 예를 들어 헌팅톤병을 치료하기 위한 이의 사용 방법을 제공한다.

[0172] *바이러스 입자*

[0173] 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 RNAi를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 본 발명의 RNAi를 전달하기 위한 바이러스 입자를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 재조합 바이러스 입자를 사용하여 RNA를 전달하여 포유동물의 질병 또는 장애를 치료하는 방법, 예를 들어 RNAi를 포함하는 rAAV 입자를 사용하여 HD를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 재조합 AAV 입자이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 1개 또는 2개의 ITR에 의해 플랭킹된 본 발명의 RNAi의 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV 입자이다. 핵산은 AAV 입자에 캡시드화된다. AAV 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 관심 코딩 서열(들)(예를 들어, 본 발명의 RNAi의 핵산)과 전사 방향으로 작동적으로 연결된 성분, 전사 개시 서열과 전사 종결 서열을 포함하는 제어 서열을 포함하여 발현 카세트를 형성한다. 발현 카세트는 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열에 의해 5' 및 3' 말단에서 플랭킹되어 있다. "기능적 AAV ITR 서열"이란 ITR 서열이 AAV 비리온의 구제, 복제 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 문헌[Davidson *et al., PNAS*, 2000, 97(7)3428-32]; 문헌[Passini *et al., J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40]; 및 문헌[Pechan *et al., Gene Ther.*, 2009, 16:10-16]을 참조하며, 이들 문헌은 모두 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 본 발명의 일부 양태를 실시하기 위해, 재조합 벡터는 캡시드화에 필수적인 AAV의 모든 서열 및 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조를 적어도 포함한다. 본 발명의 벡터에 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 문헌[Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801]에 기재된 바와 같음)를 가질 필요가 없고, 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나 AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 현재 40가지가 넘는 AAV 혈청이 알려져 있고, 새로운 혈청 및 기존 혈청형의 변이형이 계속 확인되고 있다. 문헌[Gao *et al., PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6]; 문헌[Gao *et al., PNAS*, 2003, 100(10):6081-6]; 및 문헌[Bossis *et al., J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810]을 참조한다. 임의의 AAV 혈청형의 사용이 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터이고, 이 AAV 혈청형은 제한 없이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등인 AAV ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 본 명세서에 기재된 바와 같은 RNAi를 추가로 인코딩한다. 예를 들어, AAV의 핵산은 본 명세서에서 고려되는 임의의 AAV 혈청형의 적어도 하나의 ITR을 포함할 수 있고, 제1 가닥과 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 추가로 인코딩할 수 있으며, 여기서 a) 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 적어도 11개의 염기인 가이드 영역을 포함하며, 여기서 가이드 영역은 가이드 가닥의 염기 1-N(N=7 또는 N=8

임)을 포함하는 시드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 적어도 11개의 염기인 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서 비-가이드 영역은 이중체에서 가이드 영역의 염기 1-(N+2) 중 어느 하나 이상의 반대쪽에 있는 벌지 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV는 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 하기를 인코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 프로모터, 본 명세서에 개시된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 하기를 인코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 프로모터, 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 하기를 인코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), CBA 프로모터, 본 명세서에 개시된 바와 같은 RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 polyA) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 하기를 인코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), CBA 프로모터, 서열 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)를 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3'(SEQ ID NO:2)를 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 인코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 polyA) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, 제1 가닥과 제2 가닥은 이중체를 형성하고, 제2 가닥의 SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, 제1 가닥의 SEQ ID NO:1의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥과 염기쌍을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, 제2 가닥의 SEQ ID NO:2의 잔기 18 또는 잔기 19에 있는 A 잔기는 제1 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성하지 않으며, 제1 가닥의 SEQ ID NO:의 잔기 11과 잔기 12에 있는 U 잔기는 제2 가닥과 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0174] 일부 구현예에서, 벡터는 스터퍼 핵산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질을 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, RNAi를 인코딩하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열 또는 C16 P1 염색체 16 P1 클론(인간 C16) 스터퍼 서열일 수 있다.

[0175] 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 SEQ ID NO:13의 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 SEQ ID NO:13과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 동일한 핵산을 포함한다. 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11, AAV12의 캡시드 단백질, 또는 이러한 캡시드 단백질의 돌연변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV5 티로신 돌연변이 캡시드를 포함한다(문헌[Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832]). 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 클레이드(Clade) A 내지 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다(문헌[Gao, *et al., J. Virol.* 2004, 78(12):6381)].

[0176] 다양한 AAV 혈청을 사용하여 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화한다. rAAV 입자는 동일한 혈청형 또는 혼합 혈청형의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1 캡시드 단백질과 적어도 하나의 AAV2 ITR을 포함할 수 있거나 AAV2 캡시드 단백질과 적어도 하나의 AAV1 ITR을 포함할 수 있다. rAAV 입자의 생성을 위한 AAV 혈청형의 임의의 조합은 각각의 조합이 본 명세서에 명확히 언급되어 있기라도 한 것처럼 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 AAV2 ITR에 의해 플랭킹된 본 발명의 rAAV 벡터(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트) 및 AAV1 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 AAV2 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다.

[0177] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자기 보완성 유전체를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 자기 보완성 유전체를 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자기 보완성 AAV 유전자의 사용 방법은 미국 특허 제6,596,535호; 미국 특허 제7,125,717호; 미국 특허 제7,465,583호; 미국 특허 제7,785,888호; 미국 특허 제7,790,154호; 미국 특허 제7,846,729호; 미국 특허 제8,093,054호; 및 미국 특허 제8,361,457호; 및 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 자기 보완성 유전체를 포함하는 rAAV는 이의 부분적으로 보완성인 서열(예를 들어, 트랜스진의 코딩 및 비코딩 가닥을 보

완함)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 AAV 유전체를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공하고, 여기서 rAAV 유전체는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 발명의 RNAi)와 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 발명의 RNAi의 안티센스 가닥)을 포함하며, 여기서 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 그 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열과 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 가닥내 염기쌍형성, 예를 들어 헤어핀 DNA 구조를 용이하게 하는 서열에 의해 연결되어 있다. 헤어핀 구조는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 miRNA 또는 siRNA 분자에 존재한다. 일부 구현예에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열과 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결되어 있다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:12)를 포함한다. 돌연변이된 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 유전체의 복제 시에, rep 단백질은 돌연변이된 ITR에서 바이러스 유전체를 절단하지 않을 것이며, 따라서 5'에서 3' 순서로 하기를 포함하는 재조합 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이된 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드에 대해 역배향인 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR. 일부 구현예에서, 본 발명은 기능적 AAV2 ITR, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열, D 영역의 결실을 포함하며 기능적 말단 분해 서열이 결여되어 있는 돌연변이된 AAV2 ITR, 제1 폴리뉴클레오티드 서열인 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 서열에 대한 상보적 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열 및 기능적 AAV2 ITR을 포함하는, 재조합 바이러스 유전체를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공한다.

[0178] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 입자, 예를 들어 2개의 ITR 사이에 본 발명의 RNAi를 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는, 아데노바이러스가 복제 결함성이 되게 하는 하나 이상의 E1 유전자의 결함이 있는 카피(defective copy)가 결여되어 있거나 이를 함유한다. 아데노바이러스는 커다란(약 950 Å) 비외피형 20면체 캡시드 내에 선형 이중 가닥 DNA 유전체를 포함한다. 아데노바이러스는 (예를 들어, E1 및/또는 E3 영역 대신) 30 kb 초과의 이종성 서열을 포함할 수 있는 커다란 유전체를 가져서, 이를 더 큰 이종성 유전자와의 사용을 위해 특별히 적합하게 한다. 또한, 아데노바이러스는 분열 중인 그리고 분열 중이 아닌 세포를 감염시키는 것으로 알려져 있으며, 숙주 유전체 내로 자연적으로 통합되지 않는다(그렇지만, 하이브리드 변이체는 이러한 능력을 가질 수 있음). 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 대신 이종성 서열을 갖는 1세대 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 E2A, E2B 및/또는 E4에서 추가의 돌연변이 또는 결실을 갖는 2세대 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 모든 바이러스 코딩 유전자가 결여되어 있고 ITR과 패키징 신호만을 보유하여 복제 및 패키징을 위해 헬퍼 아데노바이러스를 트랜스로(in trans) 필요로 하는, 3세대 또는 내용물이 제거된(gutted) 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 아데노바이러스 입자는 포유동물 세포의 일시적 트랜스펙션을 위한 벡터뿐만 아니라 유전자 치료용 벡터로서 사용하기 위해 연구되어 왔다. 추가의 설명에 대해서는, 예를 들어 문헌[Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther*. 7:1707-14] 및 문헌[Tatsis, N. and Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther*. 10:616-29]을 참조한다.

[0179] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 임의의 아데노바이러스 혈청형의 사용이 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 일부 구현예에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 제한 없이 AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu5, AdHu7, AdHu11, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad 및 돼지 Ad 3형을 포함하는 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된 벡터이다. 아데노바이러스 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 아데노바이러스 입자를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 슈도타입화 재조합 아데노바이러스 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 슈도타입화 재조합 아데노바이러스 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스 또는 또 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 제한 없이 레오바이러스(reovirus) 3형을 포함하는 혈청형으로부터 유래된다. 슈도타입화 아데노바이러스 입자에서 사용되는 벡터와 캡시드 단백질 조합의 예는 하기 참고 문헌에서 찾아볼 수 있다(문헌[Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629] 및 문헌[Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320]). 다양한 아데노바이러스 혈청형을 사용하여 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화할 수 있다. 특정 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화되는 조직 또는 세포는 제한 없이 폐(예를 들어, HuAd3), 비장 및 간(예를 들어, HuAd37), 평활근, 윤활막세포, 수지상 세

포, 심혈관 세포, 종양 세포주(예를 들어, HuAd11) 및 수지상 세포(예를 들어, *레오바이러스 3형, HuAd30* 또는 *HuAd35*와 슈도타입화된 HuAd5)를 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320], 문헌[Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40] 및 문헌[Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629]을 참조한다. 아데노바이러스 벡터는 선조체내 투여에 의해 투여되어 왔다(예를 들어, 문헌[Mittoux, V. *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:4478-86] 참조).

[0180] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 입자, 예를 들어 2개의 LTR 사이에 있는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 벡터이다. 렌티바이러스는 대략 10 kb의 유전체를 갖는 포지티브 센스(positive-sense) ssRNA 레트로바이러스이다. 렌티바이러스는 분열 중인 세포 및 분열 중이 아닌 세포의 유전체 내로 통합되는 것으로 알려져 있다. 렌티바이러스 입자는, 예를 들어 다수의 플라스미드(전형적으로 렌티바이러스 유전체와 복제 및/또는 패키징에 필요한 유전자가 분리되어 바이러스 복제를 방지함)를 패키징 세포주 내로 트랜스펙션시켜, 이 세포주가 변형된 렌티바이러스 유전체를 렌티바이러스 입자 내로 패키징하게 함으로써 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 외피 단백질이 결여되어 있는 1세대 벡터를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 gag/pol 및 tat/rev 영역을 제외한 모든 유전자가 결여되어 있는 2세대 벡터를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 내인성 rev, gag 및 pol 유전자만을 함유하며 tat 유전자 없이 형질도입을 위해 키메라 LTR을 갖는 3세대 벡터를 지칭할 수 있다(문헌[Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Durand, S. and Cimarelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59]을 참조한다.

[0181] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 임의의 렌티바이러스 벡터의 사용이 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 제한 없이 인간 면역결핍 바이러스-1(HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스-2(HIV-2), 시미안 면역결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 소 면역결핍 바이러스, 젬브라나병 바이러스(JDV), 비스나 바이러스(VV) 및 산양 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)를 포함하는 렌티바이러스로부터 유래된다. 렌티바이러스 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 렌티바이러스 벡터를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 슈도타입화 재조합 아데노바이러스 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 편재하는(ubiquitous) 세포 수용체와 상호작용하여, 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자에 대한 광범위한 조직 향성(tropism)을 제공한다. 또한, VSV-GP는 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 여겨진다. 다른 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 제한 없이 챤디푸라 바이러스(Chandipura virus), 광견병 바이러스, 모콜라 바이러스(Mokola virus), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 신드비스 바이러스(Sindbis virus), 셈리키 포레스트 바이러스(SFV), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 에볼라 바이러스 레스톤(Ebola virus Reston), 에볼라 바이러스 자이르(Ebola virus Zaire), 마르부르크 바이러스, 라사 바이러스(Lassa virus), 조류 백혈증 바이러스(ALV), 야그지크테 양 레트로바이러스(JSRV), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALV), 고양이 내인성 레트로바이러스(RD114), 인간 T-림프영양성 바이러스 1(HTLV-1), 인간 포미 바이러스(Human foamy virus), 메디-비스나 바이러스(MVV), SARS-CoV, 센다이 바이러스(Sendai virus), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인간 파라인플루엔자 바이러스(Human parainfluenza virus) 3형, C형 간염 바이러스(HCV), 인플루엔자 바이러스, 가금 흑사병 바이러스(FPV) 또는 아우토그라파 칼리포르니카 다중 핵다각체병 바이러스(AcMNPV)을 포함하는 바이러스로부터 유래된다. 슈도타입화 렌티바이러스 입자에 사용되는 벡터와 캡시드 단백질 조합의 예는, 예를 들어 문헌[Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398]에서 찾아볼 수 있다. 다양한 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자를 사용하여 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화할 수 있다. 예를 들어, 특정 슈도타입화 재조합 렌티바이러스 입자에 의해 표적화되는 조직은 제한 없이 간(예를 들어, VSV-G, LCMV, RRV 또는 SeV F 단백질과 슈도타입화됨), 폐(예를 들어, 에볼라, 마르부르크, SeV F와 HN, 또는 JSRV 단백질과 슈도타입화됨), 췌장 섬세포(예를 들어, LCMV 단백질과 슈도타입화됨), 중추 신경계(예를 들어, VSV-G, LCMV, 광견병 또는 모콜라 단백질과 슈도타입화됨), 망막(예를 들어, VSV-G 또는 모콜라 단백질과 슈도타입화됨), 단핵구 또는 근육(예를 들어, 모콜라 또는 에볼라 단백질과 슈도타입화됨), 조혈계(예를 들어, RD114 또는 GALV 단백질과 슈도타입화됨) 또는 암세포(예를 들어, GALV 또는 LCMV 단백질과 슈도타입화됨). 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398] 및 문헌[Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40]을 참조한다.

[0182] 일부 양태에서, 바이러스 입자는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자이다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 rHSV 입자, 예를 들어 2개의 TR 사이에 있는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 벡터이다. HSV는 대략 152 kb의 유전체를 갖는 외피형 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 유리하게는, 이의 유전자의 대략 절반은 비필수적이어서, 결실되어 이종성 서열을 수용할 수 있다. HSV 입자는 분열 중이 아닌 세포를 감염시킨다. 또한, 이는 자연적으로 신경세포에서 잠복기를 설정하고, 역행 수송에 의해 이동하고, 시냅스를 가로 질러 전달될 수 있어서, 이를 신경세포의 트랜스펙션 및/또는 신경계를 포함하는 유전자 치료 접근법에 유리하게 만들어 준다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 복제 결함성이거나 복제 능력이 있을 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 후기 유전자의 비활성화를 통한 단일 복제 주기에 대해 복제 능력이 있음). 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol.* J. 4:123-56]을 참조한다.

[0183] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 rHSV 입자이다. 임의의 HSV 벡터의 사용이 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 일부 구현예에서, HSV 벡터는 제한 없이 HSV-1 및 HSV-2를 포함하는 HSV 혈청형으로부터 유래된다. HSV 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 HSV 벡터를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 슈도타입화 rHSV 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 슈도타입화 rHSV 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스 또는 또 다른 HSV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 슈도타입화 rHSV 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 편재하는 세포 수용체와 상호작용하여, 슈도타입화 rHSV 입자에 대한 광범위한 조직 향성을 제공한다. 또한, VSV-GP는 슈도타입화 rHSV 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 여겨진다. 다른 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 상이한 HSV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, HSV-1 벡터는 하나 이상의 HSV-2 캡시드 단백질을 함유할 수 있다. 다양한 HSV 혈청형을 사용하여 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화할 수 있다. 특정 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화되는 조직 또는 세포는 제한 없이 중추 신경계 및 신경세포(예를 들어, HSV-1)를 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol J* 4:123-156], 문헌[Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40] 및 문헌[Meignier, B. *et al.* (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930]을 참조한다.

[0184] *바이러스 입자의 생성*

[0185] rAAV 입자는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,566,118호; 미국 특허 제6,989,264호; 및 미국 특허 제6,995,006호를 참조한다. 본 발명을 실시함에 있어서, rAAV 입자를 생성하기 위한 숙주 세포는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 미생물 및 효모를 포함한다. 또한, 숙주 세포는 AAV rep 및 cap 유전자가 숙주 세포에서 안정하게 유지되는 패키징 세포이거나 AAV 벡터 유전체가 안정하게 유지되는 생산 세포일 수 있다. 예시적인 패키징 세포 및 생산 세포는 293 세포, A549 세포 또는 HeLa 세포로부터 유래된다. AAV 벡터는 당업계에 공지된 표준 기법을 사용하여 정제되고 제형화된다.

[0186] rAAV 벡터의 생성을 위해 당업계에 공지된 방법은 트랜스펙션, 안정한 세포주 생성, 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드(문헌[Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789]) 및 바큘로바이러스-AAV 하이브리드를 포함하는 감염성 하이브리드 바이러스 생성 시스템을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. rAAV 바이러스 입자의 생성을 위한 rAAV 생성 배양물은 모두 1) 예를 들어, 인간 유래 세포주, 예컨대 HeLa, A549 또는 293 세포, 또는 바큘러바이러스 생성 시스템의 경우에는 곤충 유래 세포주, 예컨대 SF-9를 포함하는 적합한 숙주 세포; 2) 야생형 또는 돌연변이 아데노바이러스(예를 들어, 온도 민감성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스, 바큘로바이러스, 또는 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 작제물에 의해 제공되는, 적합한 헬퍼 바이러스 기능; 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 생성물; 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열에 의해 플랭킹된 핵산(예를 들어, 치료용 핵산); 및 5) rAAV 생성을 지지하기 위한 적합한 배지 및 배지 성분을 필요로 한다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자 생성물은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 일반적으로, AAV rep 유전자 생성물은 rep 유전자 생성물이 복제하여 rAAV 유전체를 패키징하도록 기능할 수 있는 한 rAAV 벡터 유전체의 ITR과 동일한 혈청형을 갖지만, 반드시 그러한 것은 아니다. 당업계에 공지된 적합한 배지가 rAAV 벡터의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 배지는 제한 없이, 변형 이글 배지(MEM), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 미국 특허 제6,566,118호에 기재된 것과 같은 맞춤형 제형(custom formulation) 및 미국 특허 제6,723,551호에 기재된 바와 같은 Sf-900 II SFM 배지를 비롯한 Hyclone Laboratories 및 JRH에 의해 생산되는 배지를 포함하고, 이들 미국 특허는 각각 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함되며, 특히 재조합 AAV 벡터의 생성에 사용하기 위한 맞춤형 배지 제형에 관하여 그러하다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 바큘로바이러스에 의해 제공되며, 숙주 세

포는 곤충 세포(예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9) 세포)이다.

[0187] 일부 구현예에서, rAAV 입자는 삼중 트랜스펙션법, 예를 들어 하기 제공되는 예시적인 삼중 트랜스펙션법에 의해 생성될 수 있다. 간략하게 말하면, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드과 함께 rep 유전자 및 캡시드 유전자를 함유하는 플라스미드를 (예를 들어, 칼슘 포스페이트법을 사용하여) 세포주(예를 들어, HEK-293 세포) 내로 트랜스펙션시킬 수 있고, 바이러스를 수집하고 선택적으로 정제할 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 숙주 세포 내로의, rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap를 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산의 삼중 트랜스펙션에 의해 생성되었으며, 여기서 숙주 세포로의 핵산의 트랜스펙션은 rAAV 입자를 생성할 수 있는 숙주 세포를 발생시킨다.

[0188] 일부 구현예에서, rAAV 입자는 생산 세포주 방법, 예를 들어 하기 제공되는 예시적인 생산 세포주 방법(또한, 문헌[Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269]에서 언급된 방법 참조)에 의해 생성될 수 있다. 간략하게 말하면, 세포주(예를 들어, HeLa 세포주)를 rep 유전자, 캡시드 유전자 및 프로모터 이종성 핵산 서열을 함유하는 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션시킬 수 있다. 세포주를 스크리닝하여 rAAV 생성을 위한 선도 클론(lead clone)을 선택할 수 있고, 이어서 이를 생산용 생물반응기로 증식시키고, 헬퍼로서 아데노바이러스(예를 들어, 야생형 아데노바이러스)로 감염시켜 rAAV 생성을 개시할 수 있다. 후속하여 바이러스를 수거할 수 있고, 아데노바이러스를 (예를 들어, 열에 의해) 비활성화시키고/시키거나 제거할 수 있고, rAAV 입자를 정제할 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 생산 세포주에 의해 rAAV 입자를 생성하였다.

[0189] 일부 양태에서, (a) rAAV 입자가 생성되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 숙주 세포는 (i) 하나 이상의 AAV 패키지 유전자(여기서, 상기 각각의 AAV 패키징 유전자는 AAV 복제 및/또는 캡시드화 단백질을 인코딩함); (ii) 적어도 하나의 AAV ITR에 의해 플랭킹된 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 프로-벡터, 및 (iii) AAV 헬퍼 기능을 포함하는, 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생성된 rAAV 입자를 회수하는 단계를 포함하여 본 발명에 개시된 바와 같은 임의의 rAAV 입자를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등의 AAV ITR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 캡시드화 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 미국 특허 출원 공개 제2012/0164106호에 기재된 바와 같은, ShH10과 같은 변이체 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 미국 특허 출원 공개 제2013/0323226호에 기재된 바와 같은 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 미국 특허 출원 공개 제2012/0066783호에 기재된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 제8,283,151호 또는 국제특허 공개 WO/2003/042397호에 기재된 AAV 캡시드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, 캡시드화 단백질은 AAV5 티로신 돌연변이 캡시드 단백질이다. 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 클레이드 A 내지 클레이드 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1 캡시드, 및 AAV2 ITR, 돌연변이 AA2 ITR 및 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 유전체를 포함한다. 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 정제된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "정제된"은 rAAV 입자가 자연적으로 발생하거나 처음 제조되는 경우에 또한 존재할 수 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 없는 rAAV 입자의 제조물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 rAAV 입자는 공급원 혼합물, 예를 들어, 배양물 용해질 또는 생성 배양물 상층액으로부터 이를 농축시키는 정제 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 농축은 다양한 방식, 예를 들어, 용액에 존재하는 DNase 내성 입자(DRP) 또는 유전체 카피(gc)의 비율, 또는 감염도에 의해 측정될 수 있거나, 이는 공급원 혼합물에 존재하는 제2의 잠재적 방해 물질, 예를 들어, 생성 배양물 오염물질 또는 헬퍼 바이러스를 포함하는 공정내(in-process) 오염물질을 포함하는 오염물질, 배지 성분 등과 관련하여 측정될 수 있다.

[0190] 아데노바이러스 벡터 입자의 생성을 위한 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 내용물이 제거된 아데노바이러스 벡터의 경우, 아데노바이러스 벡터 유전체 및 헬퍼 아데노바이러스 유전체가 패키징 세포주(예를

들어, 293 세포주) 내로 트랜스펙션될 수 있다. 일부 구현예에서, 헬퍼 아데노바이러스 유전체는 이의 패키징 신호를 플랭킹하는 재조합 부위들을 함유할 수 있으며, 둘 모두의 유유전체가 재조합효소(예를 들어, Cre/loxP 시스템이 사용될 수 있음)를 발현하는 패키징 세포주 내로 트랜스펙션되어 관심 아데노바이러스 벡터가 헬퍼 아데노바이러스보다 더 효율적으로 패키징되게 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Alba, R. *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27] 참조). 아데노바이러스 벡터는 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법과 같은 표준 방법을 사용하여 수거되고 정제될 수 있다.

[0191] 렌티바이러스 벡터 입자의 생성을 위한 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 3세대 렌티바이러스 벡터의 경우, gag 및 pol 유전자와 함께 관심 렌티바이러스 유전체를 함유하는 벡터가, rev 유전자를 함유하는 벡터와 함께 패키징 세포주(예를 들어, 293 세포주) 내로 공동 트랜스펙션될 수 있다. 관심 렌티바이러스 유전체는 Tat의 부재 하에 전사를 촉진하는 키메라 LTR을 또한 함유한다(문헌[Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 렌티바이러스 벡터는 본 명세서에 기재된 방법(예를 들어, 문헌[Segura MM, *et al.*, (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011])을 사용하여 수거되고 정제될 수 있다.

[0192] HSV 입자의 생성을 위한 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. HSV 벡터는 본 명세서에 기재된 방법과 같은 표준 방법을 사용하여 수거되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 복제 결함성 HSV 벡터의 경우, 즉시형 초기(IE) 유전자의 전부가 결여되어 있는 관심 HSV 유전체가 바이러스 생성에 필요한 유전자, 예를 들어 ICP4, ICP27 및 ICP0를 제공하는 보완성 세포주 내로 트랜스펙션될 수 있다(예를 들어, 문헌[Samaniego, L.A. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:3307-20] 참조). HSV 벡터는 기재된 방법(예를 들어, 문헌[Goins, WF *et al.*, (2014) Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144:63-79])을 사용하여 수거되고 정제될 수 있다.

[0193] 또한, 본 명세서에는 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 트랜스진을 포함하는 재조합 바이러스 입자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 임의의 투여 방식에 적합할 수 있다. 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 입자의 약제학적 조성물은 뇌에 도입될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 입자는 선조체내로 투여될 수 있다. rAAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자 및 HSV 입자를 포함하는 임의의 본 발명의 재조합 바이러스 입자가 사용될 수 있다.

[0194] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 트랜스진을 포함하는 재조합 바이러스 입자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 인간으로의 투여에 적합하다. 이러한 담체는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 rAAV과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 포유동물의 뇌 내로의 주입(예를 들어, 선조체내 투여)에 적합하다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 재조합 렌티바이러스 입자와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 포유동물의 뇌 내로의 주입(예를 들어, 선조체내 투여)에 적합하다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 재조합 아데노바이러스 입자와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 포유동물의 뇌 내로의 주입(예를 들어, 선조체내 투여)에 적합하다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 재조합 HSV 입자와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 포유동물의 뇌 내로의 주입(예를 들어, 선조체내 투여)에 적합하다.

[0195] 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 액체, 예를 들어 물 및 오일, 예컨대 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유 등일 수 있다. 식염수 용액 및 수성 덱스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체, 특히 주사용 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 약제학적 조성물은 추가 성분, 예를 들어 보존제, 완충제, 장성(tonicity) 작용제, 항산화제 및 안정제, 비이온성 습윤제 또는 정화제, 점도 증가제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 단일 단위 투여량 또는 다회투여량 형태로 패키징될 수 있다. 일반적으로 조성물은 멸균성이고 실질적으로 등장성인 용액으로 제형화된다.

[0196] **VII. 제조 물품 및 키트**

[0197] 또한, 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기 위한 키트 또는 제조 물품이 제공된다. 양태에서, 키트는 적합한 패키징 내에 본 명세서에 기재된 조성물(예를 들어, 본 발명의 재조합 바이러스 입자, 예를 들어 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 입자)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물(예를 들어, 선조체내용 조성물)을 위한 적합한 패키징은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 바이알(예를 들어, 밀봉 바이알), 용기(vessel), 앰풀, 병, 자아(jar), 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함한다. 이러

한 제조 물품은 추가로 멸균되고/되거나 밀봉될 수 있다.

[0198] 본 발명은 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 키트를 또한 제공하며, 이는 본 명세서에 기재된 용도와 같은 조성물을 사용하는 방법에 관한 설명서(들)을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 키트는, 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 설명서가 함유된 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 포유동물(예를 들어, 선조체내 투여를 통함) 내지 영장류의 뇌 내로의 적어도 1 × 10^9개의 유전체 카피의 전달을 위한 본 발명의 RNAi를 인코딩하는 트랜스진을 포함하는 재조합 바이러스 입자의 조성물, 영장류의 뇌 내로의 주입에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체, 및 하기 중 하나 이상을 포함한다: 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 영장류의 뇌 내로의 주입(예를 들어, 선조체내 투여)을 수행하기 위한 설명서가 함유된 패키지 삽입물. 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 재조합 바이러스 입자를 사용하여 헌팅톤병을 치료하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 방법 중 어느 하나에 따라 본 명세서에 기재된 재조합 바이러스 입자를 사용하기 위한 설명서를 포함한다.

[0199] 실시예

[0200] 본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 더욱 충분히 이해될 것이다. 그러나, 이러한 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본 명세서에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시 목적을 위한 것으로, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 암시될 것이고, 이는 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구항의 범주 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0201] **실시예 1: AAV2/1-miRNA-Htt는 시험관내에서 Htt 발현을 감소시킨다.**

[0202] 헌팅톤병(HD)은 헌팅틴(Htt) 단백질 내의 폴리글루타민 잔기 수의 증가에 의해 야기되는 치명적인 상염색체 우성 신경변성 질병이다. HD의 근본적인 기초가 확인됨에 따라, 원인이 되는 돌연변이 Htt의 발현을 감소시키는 치료법이 개발되고 있다. 이러한 질병 유발 인자의 발현을 선택적으로 감소시키려는 RNA 간섭(RNAi)이 이러한 장애 및 유사한 장애에 대한 잠재적인 치료 전략으로 등장하고 있다. HD의 마우스 모델에서 RNAi 치료법의 이점을 조사하기 위해, 마우스 및 인간 Htt mRNA를 효과적으로 표적화하는 것으로 이전에 밝혀진 표적화 서열(문헌[McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873])을 인공 miRNA 백본 내로 끼워 넣고(embedded), 프리바이러스 벡터 내로 클로닝하였다.

[0203] 방법

[0204] **동물**

[0205] 모든 절차는 Sanofi 회사 Genzyme에서 미국 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 프로토콜(Department of Health and Human Services, NIH Publication 86-23)을 이용하여 수행하였다. 이용된 마우스는 YAC128 마우스(순수한 FVB/NJ 백그라운드에 128개의 CAG 반복부를 갖는 전장 인간 돌연변이 *HTT* 트랜스진을 지닌 효모 인공 염색체) 및 FVB/NJ 한배 새끼 마우스를 포함하였다(문헌[Slow *et al.* (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567]; 문헌[Van Raamsdonk *et al.* (2005) *Hum. Mol. Genet.* 14:3823-3835]). YAC128 마우스와 FVB/NJ 한배 새끼 둘 모두는 Charles River Laboratories에 보관된 Genzyme 콜로니(colony)로부터 얻었다. 마우스는 먹이와 물을 자유롭게 이용할 수 있게 하면서 12시간 명/암 주기로 유지시켰다. 모든 행동 시험을 동물의 명 주기(오전 8시 내지 오후 4시의 시간 사이) 동안 수행하였다.

[0206] **플라스미드 및 바이러스 벡터**

[0207] 헌팅틴 유전자에 대한 miRNA 기반 헤어핀을 인코딩하는 재조합 AAV2/1 혈청형 벡터(AAV2/1-miRNA-Htt)를 생성시키기 위해, 인간 *HTT*에 대한 miRNA를, AAV2 역위 말단 반복부(ITR), 소 성장 호르몬 polyA 및 1.6-kb 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β-액틴(CBA) 프로모터를 함유하는 셔틀 플라스미드 내로 클로닝하였다. miRNA에 대한 스캐폴드는 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA)로부터 유래되었다. 대조 벡터는 비어 있는 벡터 백본을 함유하거나(AAV2/1-Null) 동일한 프로모터의 제어 하에 강화 녹색 형광 단백질을 발현하였다(AAV2/1-eGFP). 모든 바이러스 벡터는 이전에 기재된 바와 같이 인간 293 세포의 삼중 플라스미드 공동 트랜스펙션에 의해 생성하였고(문헌[Xiao *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232]), 재조합 비리온은 이전에 기재된 바와 같이 컬럼 정제하였다(문헌[Passini *et al.*, (2001) *J. Virol.* 75:12382-12392]). 결과적인 AAV2/1-miRNA-Htt의 역가는 4.5 x 10^{12} vg/mℓ인 것으로

결정되었고, AAV2/1-Null의 역가는 정량 PCR을 이용하여 2.3 x 10^{12} vg/㎖였다.

[0208] **수술 절차**

[0209] 3% 이소플루오란을 이용하여 동물을 마취시키고, 입체공간적 프레임(stereotaxic frame)에 넣었다. 두개내 주입을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(문헌[Treleaven, C.M. *et al*. (2012) *Mol. Ther.* 20:1713-1723]). 간략하게 말하면, 2 ㎕의 재조합 바이러스 벡터(AAV2/1-eGFP 또는 AAV2/1-miRNA-Htt)를 0.5 ㎕/분의 속도로 10 ㎕ 해밀턴(Hamilton) 주사기를 이용하여 선조체 내로 주입하였다(AP, +0.50; ML, ±2.00; DV, 정수리점(bregma) 및 경질막(dura)으로부터 -2.5; 인사이서 바(incisor bar), 0.0). 주입 완료 후 1분 동안 바늘을 제자리에 두었다. 수술 1시간 전 그리고 수술 후 24시간 동안, 진통을 위해 마우스에 케토프로펜(5 mg/kg)을 피하 투여하였다.

[0210] **동물 관류 및 조직 수집**

[0211] 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 이용하여 심장을 통해 마우스를 관류하여 모든 혈액을 분리하였다. 뇌를 정중선을 따라 시상 절단하고, 4% 파라포름알데하이드에 이어 30% 수크로스에서 좌반구를 후고정시킨 후, 냉동미세절단기(cryostat)를 이용하여 20-㎛ 절편으로 절편화하였다. 우반구를 마우스 뇌 매트릭스(Harvard Apparatus, Holliston, MA)를 이용하여 관상축을 따라 2-mm 슬랩(slab)으로 절단한 후, 액체 질소에서 급속 냉동시키고, 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. Htt 응집체의 분석을 위해, 뇌를 48시간 동안 4% 파라포름알데하이드에서 후고정시키고, PBS로 세척한 후, 비브라톰(vibratome)을 이용하여 40-㎛ 관상 절편으로 절편화하였다.

[0212] **세포 배양 및 트랜스펙션**

[0213] HEK293 세포를 5 x 10^{9} vg의 AAV2/1-eGFP 또는 AAV2/1-miRNA-Htt로 감염시키고, 3일 후 수거하였다. 정량 실시간 RT-PCR에 의해 RNA 수준을 측정하였다. 총 RNA는 TaqMan® Cells-to-CT™ 키트(Ambion)를 이용하여 단리하였다. 이전에 기재된 바와 같이 ABI Prism 7500 서열 검출기(Applied Biosystems)로 Q-PCR 반응을 수행하고 분석하였다(문헌[Kordasiewicz, H.B. *et al*. (2012) *Neuron* 74:1031-1044]). 발현 수준을 PPIA(펩티딜프롤릴 이소머라제) 수준에 대해 표준화시켰다.

[0214] **정량 실시간 PCR(TaqMan)**

[0215] RNA 수준을 정량 실시간 RT-PCR에 의해 측정하였다. 모든 RT-PCR 분석을 위해 뇌 슬랩 2로부터의 뇌 조직 샘플을 이용하였다. 제조업체의 지시에 따라 QIAGEN RNEasy 미니 키트를 이용하여 총 RNA를 추출한 후, 역전사시키고, TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Kit(Applied Biosystems)를 이용하여 증폭시켰다. 마우스 Htt mRNA를 검출하기 위해, 하기 프로브 세트를 이용하였다: Mm01213820_m1(Life Technologies Cat. No. 4331182). 인간 Htt mRNA를 검출하기 위해, 하기 올리고(oligo)를 이용하였다: 5'-ctccgtccggtagacatgct-3'(정방향 프라이머, SEQ ID NO:9); 5'-ggaaatcagaaccctcaaatgg-3'(역방향 프라이머, SEQ ID NO:10); 및 5'-tgagcactgttcaactgtgtgtatcggga-3'(프로브, SEQ ID NO:11). ABI PRISM® 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems)으로 정량 RT-PCR 반응을 수행하고 분석하였다. HTT mRNA의 발현 수준을 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 1(Hprt1) mRNA 수준에 대해 표준화시켰다. 마우스 뇌 cDNA의 5배 연속 희석을 이용하여 표준 곡선을 생성시켰다. 각각의 샘플을 이중으로 실행시켰다. 상대 유전자 발현은 표준 곡선 또는 ΔΔCT 방법을 이용하고 Hprt1 mRNA 수준에 대해 표준화시킴으로써 결정하였다.

[0216] **웨스턴 블롯팅**

[0217] 완전한 프로테아제 저해제 칵테일(Roche)을 함유하는 T-Per 용해 완충액(Pierce) 중에서 50 mg/㎖의 최종 농도로 조직을 균질화시켰다. 균질액을 4C에서 6분 동안 10,000×g에서의 원심분리에 의해 투명화시켰다. 단백질 농도를 BSA 검정(Pierce)을 이용하여 측정하였다. 20 내지 30 마이크로그램의 균질액을 3 내지 8% Novex 트리스-아세테이트 겔 상에서 분리시킨 후, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 마우스 항-헌팅틴 모노클로날 항체(Mab2166; 1:2,000 희석, Millipore) 및 토끼 폴리클로날 항-β-튜불린 항체(1:750 희석, Santa Cruz Biotechnology)로 프로빙하였다. 그 후, 막을 적외선 2차 항체(1:20,000 희석, Rockland)와 함께 인큐베이션하고, 단백질을 Odyssey(LI-COR Biosciences)를 이용하여 정량 형광에 의해 가시화하였다. 로딩 변동(loading variance)을 제어하기 위해, Htt 단백질을 β-튜불린에 대해 표준화시키고, 미처리된 동물 또는 식염수 처리된 동물의 백분율로 표현하였다. 분자량 마커를 이용하여 단백질의 정체를 확인하였다.

[0218] **유세포 분석 및 세포 분류(FCM 세포 분류)**

[0219] Genzyme Flow Cytometry Core Facility(Sanofi 회사)에서 100 ㎛ 노즐을 갖춘 FACS Aria II 세포 분류기(BD Biosciences San Jose, CA)를 이용하여 단일 세포 현탁액을 분석하고 분리하였다. 전방 산란(FWD-Sc)과 측방 산란(SSC)에서의 게이팅(gating)에 의해 생존 단일 세포를 파편과 구별함으로써 세포의 분석을 수행하였다. 530/30 BP 필터 505LP를 갖춘 검출기 E를 이용하여 EGFP 양성 세포를 수집하였다. EGFP 형광 데이터 프로파일을 단일 파라미터 히스토그램으로 디스플레이하고, 분류 결정은 $EGFP^-$ 및 $EGFP^+$를 기초로 하였다. 분류된 세포를 5% 소 태아 혈청을 함유하는 조직 배양 배지에 수집하고, 50 000개 세포/웰의 농도로 4 웰-챔버 슬라이드(LabTek, Nalge Nunc International, Naperville, Ill) 상으로 플레이팅하였다.

[0220] **면역조직화학**

[0221] 비브라톰 절편을 응집된 헌팅틴을 우선적으로 인식하는 항체인 EM48에 의한 면역염색을 위해 처리하였다(문헌[Gutekunst *et al.*, (1999) *J. Neurosci.* 19:2522-2534]). 자유 부유성(free floating) 절편을 먼저 Dual Endogenous Enzyme Block(Dako)으로 30분 동안 처리하여 내인성 퍼옥시다제 활성을 차단시켰다. 그 후, 이를 0.01 M PBS(3분)로 세척한 후, PBS 중의 0.5% Triton X-100으로 10분씩 3회 세척하였다. 절편을 실온에서 1시간 동안 Rodent Block M 중에서 인큐베이션함으로써 비특이적 부위를 차단시켰다. 약한 로커(rocker) 상에서 4℃ 저온실에서 밤새 인큐베이션함으로써 절편을 EM48 항체(Millipore, PBS 중의 1:25 희석)로 프로빙하였다. 다음 날, 절편을 로커 상에서 2차 항체(MM HRP 중합체, Biocare Medical)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS 중에서 15분씩 3회 세척한 후, DAB Peroxidase Substrate Kit(Vector)를 이용하여 신호를 검출하였다. 세척 후, 절편을 수퍼프로스트 플러스(superfrost plus) 슬라이드 상에 올려 놓고, 밤새 건조시키고, Acrytol 마운팅 배지와 함께 커버슬립을 덮었다.

[0222] **행동 분석**

[0223] *가속화 로타로드 시험*: 운동 조정력 및 운동 학습력을 가속화 로타로드 장치(AccuScan Instruments)에서 평가하였다. 마우스를 연속 3일 동안 하루에 3회 시험으로 로타로드에서 훈련시켰다. 훈련 첫째 날에, 로타로드를 300초에 걸쳐 0에서 5 RPM까지 가속되도록 설정하였다. 300초 기간의 완료 전에 로드에서 떨어진 마우스를, 전체 300초 기간이 만료될 때까지 다시 로드 상에 위치시켰다. 훈련 둘째 날과 셋째 날에, 로타로드를 300초에 걸쳐 0에서 40 RPM까지 가속되도록 설정하고, 다시 모든 마우스가 로드 상에서 전체 300초를 완료하게 하였다. 넷째 날(시험일)에, 300초에 걸쳐 0에서 40 RPM까지 가속되도록 설정된 로타로드 상에 마우스를 위치시켰다. 동물이 떨어진 후 다시 위치시키지 않았고, 떨어지기까지 걸린 시간을 3회 시험에 걸쳐 기록하였다. 떨어지기까지 걸린 시간은 동물이 로타로드로부터 떨어질 때까지 경과한 시간으로 정의되었다.

[0224] *포르솔트 수영 시험*: 포르솔트 수영 시험에서의 부동자세(immobility)를 설치류의 우울증 척도로 이용하였다(문헌[Porsolt *et al.*, (1977) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229:327-336], 문헌[Cryan *et al.*, (2002a) *Trends Pharmacol. Sci.* 23:238-245], 문헌[Cryan *et al.*, (2002b) *Eur. J. Pharmacol.* 436:197-205]). 높이 15 cm까지 23℃의 물로 채워진 개별 유리 실린더(높이 20 cm x 직경 10 cm)에 마우스를 넣음으로써 시험을 수행하였다. 마우스를 7분의 기간 동안 실린더에 넣었다. 이 기간 중 처음 3분은 적응 기간으로 간주되었는데, 이 시간 동안에는 데이터를 수집하지 않았다. 시험 기간의 마지막 4분 동안, 맹검 관찰자가 시간 표집 기법을 이용하여 10초 간격으로 우세한 행동을 평가함으로써 마우스의 수행능력에 점수를 매겼다. 수영 및 부동자세 행동을 측정하여 매 10초의 종료 시에 기록하였고, 이는 시험 당 24개의 데이터 포인트를 생성시켰다. 부동 상태로 소비된 시간의 비율을 각 마우스에 대해 계산하였다.

[0225] **통계**

[0226] 통계 분석을 위해 평균 값을 이용하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표현한다. 2개의 그룹을 이용한 연구의 경우, 통계 비교를 위해 스튜던트 t-시험(Student's t-test)을 이용하였다. 2개가 넘는 그룹의 비교의 경우, 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 이어 투키의 다중 비교 사후 시험(Tukey's multiple comparison post-hoc test)(Prism GraphPad)을 이용하였다. $p<0.05$를 통계적으로 유의한 차이로 간주하였다.

[0227] 결과

[0228] **도 1a**에 도시된 바와 같이 닭 베타-액틴(CBA) 프로모터의 전사 제어 하에 Htt를 표적화하는 miRNA와 강화 GFP(eGFP) 리포터 유전자를 발현시키도록(pSP70-CBA-EGFP) 플라스미드를 유전자 조작하였다. Htt 코딩 영역으로부터 선택된 후보 표적화 서열은 5'-TAGACAATGATTCACACGGT-3'(SEQ ID NO: 4)이었다. 표적화 서열을 인코딩하는 고역가 재조합 AAV2/1-혈청형 벡터(AAV2/1-miRNA-Htt)와 대조 벡터(AAV2/1-eGFP 및 AAV2/1-Null)를 생성하고,

인간 배아 신장(HEK) 293 세포를 감염시킴으로써 이들의 유전자 침묵 활성을 시험하였다. 5 × 10^9 vg의 AAV 벡터로 세포를 감염시켰다. 형광 활성 세포 분류(fluorescent activated cell sorting, FACS) 분석을 이용하여, 이 용량이 AAV-eGFP-miRNA-HTT에 의한 감염 후 HEK293 세포에서 90% 초과의 감염 효율을 가져왔음이 확인되었다(**도 2a 내지 도 2d**). AAV2/1-eGFP로 감염된 세포는 감염 후 3일째에 실시간 PCR에 의해 분석한 경우 어떠한 내인성 Htt 수준의 감소도 나타내지 않았지만; AAV2/1-miRNA-Htt로 감염된 세포는 Htt mRNA 수준의 대략 40% 감소를 나타내었다(**도 1b**).

[0229] **실시예 2: YAC128 마우스 내로의 AAV2/1-miRNA-Htt 주입은 광범위한 선조체 형질도입 및 Htt mRNA의 감소를 일으킨다.**

[0230] 시험관내에서 Htt mRNA 수준을 억제하는 AAV2/1-miRNA-Htt의 능력의 확인 후, YAC128 마우스의 선조체에서 Htt 발현을 침묵시키는 이러한 벡터의 능력을 평가하였다. AAV2/1-miRNA-Htt의 선조체내 주입 후 선조체 내에서의 세포의 형질도입 퍼센트를 결정하기 위해, 실시예 1에 기재된 방법에 따라 형광 활성 세포 분류(FACS)를 이용하였다.

[0231] 결과

[0232] 성체 YAC128 마우스에 AAV2/1-eGFP-miRNA-Htt(4.5 × 10^{12} vg/㎖) 또는 대조 벡터인 AAV2/1-eGFP(5.6 × 10^{12} vg/㎖)를 양측 선조체내 주입에 의해 투여하였다. 주입 후 1개월째에 각 동물의 선조체 영역을 미세 절개하고, FACS 분석에 의해 eGFP 함유 세포 대 eGFP 비함유 세포를 분류하고 정량화하였다(**도 3a 및 도 3b**). 대다수의 분류된 선조체 세포 내의 eGFP의 존재에 의해 입증되는 바와 같이 데이터는 선조체의 80% 초과 부분이 벡터에 의해 형질도입되었음을 나타내었다(**도 3c**).

[0233] 생체내에서 Htt를 감소시키는 벡터의 능력을 평가하고 반응의 지속성을 모니터링하기 위해, 성체 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt(4.5E12 vg/㎖)(시점당 N=16, N=8+8) 또는 AAV2/1-Null 대조 벡터(2.3E12 vg/㎖)(N=8)를 양측 선조체내 주입에 의해 투여하고, 처리 후 1개월 또는 5개월째에 뇌를 분석하였다. 둘 모두의 시점에서 AAV2/1-miRNA-Htt로 처리된 마우스로부터의 뇌 절편의 형광 현미경 분석은, 거의 완전한 선조체 형질도입을 암시하는 FACS 분석과 일치하게 전체 선조체 및 주변 뇌 영역 전반에 걸쳐 광범위한 eGFP 형광을 나타내었다(**도 3d**). 처리 후 1개월째에 얻은 마우스의 뇌에서의 eGFP 발현의 수준은 5개월 시점에서 감소하지 않은 것으로 나타났다(**도 3d**). 돌연변이 인간 Htt mRNA의 선조체 수준은 AAV2/1-Null 처리 대조군과 비교한 경우 AAV2/1-miRNA-Htt 주입 마우스에서 유의하게 감소하였고, 동등한 정도의 감소(대략 45%, $p<0.01$)가 두 시점 모두에서 주목되었다(**도 3e**). 내인성 마우스 Htt mRNA의 선조체 수준은 AAV2/1-Null 처리 대조군과 비교한 경우 AAV2/1-miRNA-Htt에 따라 유의하게 감소하였다. 동등한 정도의 감소(대략 45%, $p<0.01$)가 두 시점 모두에서 주목되었다(**도 4**).

[0234] **실시예 3: YAC128 마우스 내로의 AAV2/1-miRNA-Htt 주입은 뇌에서 명백한 독성을 야기하지 않는다.**

[0235] AAV2/1-miRNA-Htt의 주입 및 이에 따른 Htt의 감소가 신경독성과 염증을 부여하는지의 여부를 결정하기 위해, 실시예 1에 기재된 방법에 따라 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색에 의해 선조체 절편의 세포 형태 및 완전성을 조사하였다. 신경염증 마커인 아교 섬유 산성 단백질(GFAP, 별아교세포의 마커)과 Iba-1(미세아교세포의 마커)의 수준을 또한 처리 후 1개월 및 5개월째에 조사하였다.

[0236] 결과

[0237] H&E에 의한 분석은 주입된 뇌 영역에서 현저한 조직병리학적 변화를 나타내지 않았다(**도 5a 내지 도 5c**). AAV2/1-Null 처리 마우스와 비교한 경우 주입 후 1개월 또는 5개월째에 주입 영역에서 GFAP 양성 별아교세포의 개수(면역조직화학에 의해 가시화됨) 또는 GFAP mRNA의 수준(QPCR에 의해 정량화됨) 어느 것에서도 주목할 만한 증가는 관찰되지 않았다(**도 5d 내지 도 5f; 도 5j**). 그러나, 선조체에서의 Iba-1 면역염색(**도 5h**) 및 Iba-1 mRNA 수준의 증가에 의해 입증되는 바와 같이 활성화된 미세아교세포 수의 증가가 주입 후 1개월째에 주목되었다(**도 5k**). 흥미롭게도, 주입 후 5개월째에, 미세아교세포 활성화가 대조 수준으로 복귀하였는데(**도 5i 및 도 5k**), 이는 반응이 일시적임을 암시한다. 이론에 구속하고자 함이 없이, 본 연구에 이용된 AAV2/1-Null 대조 벡터가 eGFP 유전자를 지니지 않음에 따라, AAV2/1-miRNA-Htt로부터의 eGFP의 발현이 일시적인 미세아교세포 활성화의 원인일 가능성이 높을 것으로 여겨진다.

[0238] 종합해보면, 이러한 결과는 AAV2/1-miRNA-Htt가 시험관내에서뿐만 아니라 YAC128 마우스의 선조체에서도 지속적인 Htt 침묵을 매개할 수 있다는 발견을 확증하고 확장시킨다. 더욱이, 5개월 이하 동안 Htt 수준의 부분적

억제는 마우스 뇌에서 명백한 독성 또는 신경염증을 초래하지 않았다.

[0239] **실시예 4: AAV2/1-miRNA-Htt의 선조체 전달은 YAC128 마우스의 비정상적인 행동 및 신경화학적 프로파일을 교정한다.**

[0240] HD의 YAC128 마우스 모델에 존재하는 잘 특성규명된 표현형 결손에 대한 돌연변이 Htt 수준의 AAV 매개 감소의 영향을 또한 실시예 1에 기재된 방법에 따라 조사하였다. YAC128 마우스는 3개월령에서 시작하여 운동 조정력 결손(이는 로타로드 시험을 이용하여 나타낼 수 있음) 및 우울증 표현형(포르솔트 수영 시험을 이용함)을 나타내는 것으로 보고되었다(문헌[Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567]; 문헌[Van Raamsdonk *et al.*, (2007) *Neurobiol Dis* 26:189-200]).

[0241] 결과

[0242] 연령 매칭된(2개월령) YAC128 마우스 및 야생형 한배 새끼 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt 벡터 또는 AAV2/1-Null 벡터를 양측 선조체내 주입에 의해 투여한 후, 처리 후 3개월째에 희생시켰다(**도 6a**). 예상된 바와 같이, 뇌 절편의 분석은 앞서 관찰된 바와 같이 전체 선조체와 주변 영역 전반에 걸쳐 eGFP 발현을 나타내었다(**도 6b**). 뇌 균질물의 웨스턴 블롯 분석은 AAV2/1-Null 처리 대조군과 비교한 경우 AAV2/1-miRNA-Htt 주입 YAC128 마우스와 야생형 마우스의 선조체에서 돌연변이 인간 Htt 단백질과 내인성 마우스 Htt 단백질 둘 모두의 수준이 유의하게 감소함(대략 55% 감소, $p<0.01$)을 나타내었다(**도 6c 및 도 6d**). 실시간 정량 PCR 분석은 mRNA 수준의 상응하는 감소가 또한 달성되었음을 나타내었다.

[0243] 주입 후 2개월째의 AAV2/1-Null 처리 YAC128 마우스의 로타로드 시험은 AAV2/1-Null 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 야생형 한배 새끼와 비교한 경우 유의한 운동 조정력 결손(ANOVA, $p<0.01$)을 나타내었다(**도 6e**). 그러나, AAV2/1-miRNA-Htt로 처리된 YAC128 마우스는 야생형 마우스와 구별할 수 없는 수행능력 수준을 나타내었다(ANOVA, 투키의 사후 시험; WT Htt 대 YAC128 Htt, p=NS; WT Null 대 YAC128 Null, $p<0.05$). 따라서, 돌연변이 Htt 수준의 부분적 감소가 YAC128 마우스의 운동 결손을 교정하는데 충분하였다. AAV2/1-miRNA-Htt가 투여된 야생형 마우스와 AAV2/1-Null이 투여된 야생형 마우스 사이에 로타로드 수행능력의 유의한 차이는 없었다.

[0244] 이전의 보고서는 YAC128 마우스가 (3개월령에서 시작하여) 포르솔트 수영 시험을 이용하여 검출될 수 있는 우울증 표현형을 나타냄을 지적하였다(문헌[Pouladi *et al.*, (2009) *Brain* 132:919-932]). 동물은 물이 담긴 용기에 넣어진 경우 장시간 동안 부동 상태로 있다면 우울증 상태를 나타내는 것으로 간주된다. 기본적인 수영 속도 시험(여기서, 수영하여 플랫폼에 도달하기까지의 시간이 측정됨)을 이용하여, 연구자들은 포르솔트 수영 시험에서의 이러한 우울증 표현형이 YAC128 마우스의 수영 능력과 무관하며 이러한 모델에서 관찰되는 잘 입증된 운동 조정력 결손과는 독립적인 것임을 입증하였다(문헌[Pouladi *et al.*, (2009) *Brain* 132:919-932]). 2개월령의 YAC128 마우스와 WT 한배 새끼 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt 벡터 또는 AAV2/1-Null 벡터를 주입하고, 3개월 후에 포르솔트 수영 시험으로 시험하였다. 미처리된 YAC128 마우스는 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC 마우스 또는 AAV2/1-Null 처리 야생형 동물과 비교한 경우 부동 상태로 있는 시간의 증가를 나타내었다(**도 6f**; ANOVA $p<0.05$). 또한, AAV2/1-miRNA-Htt 또는 AAV2/1-Null이 투여된 야생형 마우스의 수행능력에서 유의한 차이는 없었다. AAV2/1-miRNA-Htt가 주입된 마우스는 AAV2/1-Null 처리 대조군보다 부동 상태로 있는 시간이 유의하게 짧았다. 실제로, AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC128 마우스의 수행능력은 이의 야생형 한배 새끼와 유사하였는데, 이는 이러한 비정상적 표현형의 거의 완전한 교정을 암시한다(ANOVA, 투키의 사후 시험; YAC Htt 대 YAC Null, $p<0.05$)(**도 6f**).

[0245] **실시예 5: AAV2/1-miRNA-Htt를 이용한 처리는 YAC128 마우스에서 DARPP-32 및 D1 수용체의 전사 조절이상을 부분적으로 교정한다.**

[0246] 선조체에서 풍부화된 다수의 유전자의 전사 조절이상이 HD 뇌에서 관찰되었다(문헌[Richfiel *et al.*, (1995) *Ann. Neurol.* 37:335-343]; 문헌[Augood *et al.*, (1997) *Ann. Neurol.* 42:215-221]; 문헌[Sugars *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:4988-4999]; 문헌[Desplats *et al.*, (2006) *J. Neurochem.* 96:743-757]). 이러한 비정상은, 특히 야생형 동물과 비교하여 DARPP-32 및 D1 도파민 수용체의 유의하게 더 낮은 선조체 수준에 의해 나타나는 바와 같이, YAC128 마우스에서 또한 분명하다(문헌[Pouladi *et al.*, (2012) *Mol. Genet.* 21:2219-2232]). YAC128 마우스에서의 Htt 수준의 억제가 이러한 변경된 전사 프로파일을 교정하는지의 여부를 조사하기 위해, 실시예 1에 기재된 방법에 따라 2개월령째에 AAV2/1-miRNA-Htt로 처리된 YAC128 마우스의 선조체 조직에 대해 실시간 정량 PCR 분석을 수행하고 3개월 후에 분석하였다.

[0247] 결과

[0248] AAV2/1-Null 처리 YAC128 마우스의 뇌 추출물의 분석은 연령 매칭된 야생형 대조군과 비교한 경우 DARPP-32 및 D1 도파민 수용체(D1R)의 mRNA 수준이 유의하게 더 낮음을 나타내었다(ANOVA, 투키의 사후 시험; WT Null 대 YAC128 Null, $p<0.05$)(**도 7a 및 도 7b**). AAV2/1-miRNA-Htt가 투여된 YAC128 마우스는 AAV2/1-Null 벡터로 처리된 것보다 높은 수준의 DARPP-32 및 D1R mRNA를 나타내었지만; 이러한 수준은 야생형 대조군에서 관찰된 수준보다 여전히 낮았다(ANOVA, 투키의 사후 시험; WT Null 대 YAC Htt, p=NS). 따라서, YAC128 마우스에서의 Htt 수준의 AAV2/1-miRNA-Htt 매개 감소는 비정상적인 선조체 전사 프로파일의 부분적 교정을 부여하였다. 더 이후 시점(처리 후 5개월 초과)에서의 조사는 이러한 비정상적 프로파일의 더 완전한 교정을 나타낼 수 있는 것이 가능하다.

[0249] 종합해보면, 이러한 결과는 AAV2/1-miRNA-Htt가 Htt 수준의 지속적인 감소를 매개할 수 있다는 앞선 시험관내 및 생체내 발견을 확증한다. 중요하게는, YAC128 마우스에서의 선조체 Htt 수준의 이러한 감소가 운동 기능과 행동의 측정 가능한 개선뿐만 아니라 선조체에서의 잘 특성규명된 전사 조절이상의 부분적 교정을 가져온다는 것이 입증되었다.

[0250] **실시예 6: AAV2/1-miRNA-Htt의 선조체 전달은 YAC128 마우스의 뇌에서 Htt 응집체를 감소시킨다.**

[0251] CNS에서의 Htt 응집체와 봉입체의 출현은 HD의 신경병리학적 특징이다. HD 마우스에서의 이러한 응집체 수준의 감소는 병증의 주목할 만한 개선과 상호 관련되어 왔다(문헌[Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825]; 문헌[Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633]). YAC128 마우스 모델은 보고서에 따르면 12개월령까지 선조체에서 Htt 응집체의 유의하고 광범위한 축적을 나타낸다(문헌[Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567], 문헌[Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232]). 실시예 1에 기재된 방법에 따라 YAC128 마우스에서의 Htt 응집체에 대한 AAV2/1-miRNA-Htt 전달의 영향을 조사하였다.

[0252] 결과

[0253] 항-Htt 항체 EM48을 이용한 6개월령, 9개월령 및 24개월령 YAC128 마우스의 뇌 절편의 면역조직화학적 염색은 6개월령에서 이르게 선조체와 피질 둘 모두에서 응집체의 증거를 나타내었고, 이는 시간이 지남에 따라 진전되었다(**도 8a**). 12개월령 조직(16 마이크로미터의 동결 절편)을 또한 분석하였고, 이는 24개월령 코호트(cohort)와 유사한 정도의 응집체를 갖는 것으로 나타났지만; 동결 절편에서의 비특이적 백그라운드 염색은 비브라톰 절편에서보다 유의하게 높았다(데이터는 제시되지 않음).

[0254] 돌연변이 Htt 수준의 AAV 매개 감소가 증상후(post-symptomatic) YAC128 마우스(7개월령)의 뇌에서 Htt 응집체의 축적 정도를 감소시켜서 결과적으로 운동 및 행동 결손을 교정하는지의 여부를 조사하기 위해, 마우스에 AAV2/1-miRNA-Htt 또는 AAV2/1-GFP를 양측 선조체내 주입하였다. 주입 후 3개월째에 동물을 로타로드 시험에 적용하고(동물은 10개월령이었음), 주입 후 5개월째에 희생시켰다(이 때, 마우스는 12개월령이었음)(**도 8b**). AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC128 마우스는 로타로드 상에서 이의 야생형 한배 새끼에 필적하는 수행능력의 수준을 나타내었다(**도 8c**; ANOVA, 투키의 사후 시험; p=NS). 그러나, 이러한 결과는 연구에 이용된 마우스의 수가 적음으로 인해 통계적 유의성에 도달하지 못했다(N=4 WT; N=6 YAC128). EM48 항체를 이용한 선조체 절편의 면역조직화학적 염색은 AAV2/1-GFP 처리 YAC128 마우스에서보다 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC128 마우스에서 유의하게 적은 Htt 응집체의 존재를 나타내었다(**도 8d**). AAV2/1-miRNA-Htt 처리 YAC128 마우스의 뇌는 본질적으로 야생형 마우스와 구별할 수 없었다.

[0255] AAV2/1-miRNA-Htt를 이용한 응집체의 관찰된 감소가 신경세포 손실 또는 잠재적인 신경독성으로 인한 것이 아님을 확인하기 위해, 인접한 시상 뇌 절편에 대해 H&E 염색뿐만 아니라 NeuN(신경세포 마커), GFAP(별아교세포 마커) 및 Iba1(미세아교세포 마커)에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. AAV-2/1-Null 주입 대조군과 비교하여, AAV2/1-miRNA-Htt 주입 동물은 형광 현미경검사에 의해 선조체에서 동일한 존재비의 NeuN 양성 신경세포를 나타내었다. 광학 현미경검사를 이용하여, 인접 관상 뇌 절편의 H&M 염색은 또한 정상인 것으로 나타났고 이렇게 신경세포 손실이 없음을 뒷받침하는 증거를 제공하였지만; 입체해석학(stereology)이 수행되지 않았기 때문에 이러한 결과를 정량화할 수 없었다. 추가로, 앞서의 연구에서 관찰된 바와 같이, 주입 후 5개월째에 AAV2/1-miRNA-Htt 처리 마우스에서의 GFAP 또는 Iba-1 염색의 증가는 검출되지 않았다.

[0256] 결론

[0257] 본 연구는 돌연변이 Htt 수준을 감소시키는 것이 HD에 대한 치료 전략임을 보여주고, 선조체에서의 돌연변이 Htt의 부분적 감소가 HD의 전장 트랜스제닉 마우스 모델인 YAC128 마우스 모델에서 행동, 생화학적 및 신경병리

학적 개선을 가져왔음을 입증하였다. 이러한 치료 전략을 평가하는데 있어 이전의 노력은 돌연변이 *HTT* 유전자의 단편을 지닌 마우스 모델, 예를 들어 R6/1 및 N171-82Q HD 마우스에서 수행되었다(문헌[Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825], 문헌[Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633], 문헌[Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197]). 돌연변이 Htt 수준의 부분적 감소는 N171-82Q HD 마우스 모델과 같은 더 중증인 모델의 일부에서 보통 정도의 생존 이익을 부여하였지만 다른 모델(예를 들어, R6/1 마우스 모델)에서는 그렇지 않았다(문헌[Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825], 문헌[Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633], 문헌[Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197]). 운동 개선이 로타로드 및 보폭 시험을 이용하는 이러한 연구에서 또한 주목되었지만; 이러한 모델의 중증도는 행동, 신경병리학적 및 생화학적 비정상에 대한 처리의 장기적인 평가를 불가능하게 하였다.

[0258] 본 연구는 YAC128 마우스 모델(이 모델은 128개의 CAG 반복부를 함유하는 돌연변이 인간 *HTT* 유전자를 지님)을 이용하였고, 이는 진행성 운동 비정상 및 연령 의존성 신경병증을 발생시킨다. 다른 HD 마우스 모델과 비교하여, YAC128 마우스는 치료 효능을 시험하기에 아주 적합한데, 이는 이것이 인간 질병의 핵심적인 유전적 및 임상적 특징을 되풀이하기 때문이다. YAC128 마우스에서의 질병 관련 변화의 자연적 내력은 잘 규정되어 있고, 동물들은 표현형적으로 동물간 변동성이 적은 균일한 질병 특성을 나타낸다. YAC128 마우스는 BAC HD 마우스와 같은 다른 유사한 마우스 모델에서 관찰되지 않는 특성인 변경된 선조체 전사 프로파일을 발생시키고(문헌[Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232]), 연령 의존성 선조체 신경변성을 나타낸다. 따라서, 이러한 모델에서의 치료적 개입의 시험 및 결과의 측정은 임상으로 옮겨가기 위한 더 큰 예측 가치를 가질 수 있다(문헌[Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567]).

[0259] YAC128 마우스를 이용하여, 이러한 연구는 돌연변이 인간 Htt를 표적화하는 miRNA의 AAV2/1 매개 발현이 Htt mRNA 및 단백질의 선조체 수준의 유의한 감소를 가져옴을 입증하였다. 처리 후 5개월째에 로타로드 및 포르솔트 수영 시험을 이용하여 평가된 바와 같은 기능의 유의한 개선뿐만 아니라 선조체 내에서의 Htt 응집체의 유의한 감소가 이러한 문제가 되는 엔티티의 감소와 관련된다. 이러한 연구에서 관찰된 Htt 감소 수준이 대조군의 대략 40%일 뿐이라는 것이 주목할 만한데, 이는 돌연변이 Htt의 부분적 감소가 이러한 마우스 모델에서 유의한 치료 이익을 가져오기에 충분하였음을 나타낸다. 더욱이, AAV 벡터에 의한 선조체의 80% 형질도입은 부분적 Htt 감소만을 가져왔다. 유사한 현상이 대략 90% 내지 95% 형질도입 효율이 내인성 Htt 수준의 결과적인 40% 내지 50% 감소만을 가져온 배양 중인 HEK293 세포에서 관찰되었다(**도 2a 내지 도 2d**). 이러한 발견은 miRNA 기반 침묵의 필적할 만한 전략을 이용하여 Htt 수준의 부분적 감소만을 나타낸 설치류 및 영장류에서의 이전의 연구와 일치한다(문헌[McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873]; 문헌[Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063]; 문헌[McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162]; 문헌[Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209]). 이론에 구속하고자 함이 없이, 형질도입된 영역에서 miRNA가 단지 부분적 표적 녹다운을 가져오는 이유에 관한 다수의 잠재적인 가설이 존재한다. Htt 침묵을 매개하는데 이용된 miRNA 스템-루프 포맷은 기능적인 작은 간섭 RNA를 생성시키기 전에 세포에 의한 프로세싱을 필요로 한다. 따라서, 이러한 세포 프로세싱에 대한 요건은 miRNA 기반 헤어핀에 의해 부여되는 RNA 침묵의 정도에 대해 자연적 한계를 설정할 수 있다. Boudreau 등에 의한 보고서(문헌[Boudreau *et al.*, (2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175])는 포유동물 뇌에서의 치료용 침묵을 위한 miRNA 기반 플랫폼의 개선된 안전성을 기술하였고, 전통적인 짧은 헤어핀 구조와 비교하여 miRNA의 개선된 독성 프로파일을 강조하였다. 이러한 안전성의 개선은 내인성 세포 프로세싱 메커니즘에 대한 miRNA의 의존으로 인한 것일 수 있다(문헌[Boudreau *et al.*, (2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175]). 이러한 제안된 가설에도 불구하고, 뇌에서의 miRNA 기반 Htt 침묵 이면의 정확한 메커니즘에 관해서는 아직 알려져 있지 않지만; 본 명세서에 제시된 데이터는 부분적 Htt 감소가 적어도 HD의 마우스 모델에서 치료 이익을 달성할 수 있음을 입증한다.

[0260] Htt의 기능적 역할이 불명확하게 남아있기 때문에, 대립형질 비특이적 침묵을 부여하는 치료 전략을 적용하는 것과 관련하여 명백한 우려가 존재한다. 본 명세서에 개시된 연구는 야생형 마우스뿐만 아니라 질병에 걸린 YAC128 마우스의 CNS에서의 내인성 마우스 Htt의 부분적 감소가 5개월 이하 동안 잘 견뎌졌음을 나타내었다. AAV-miRNA-Htt의 투여가 야생형 마우스 및 돌연변이 인간 Htt를 대략 40% 감소시켰으며, 이에 따라 야생형 Htt 수준의 적어도 60%의 보존을 가능하게 하면서 돌연변이 독성 Htt를 침묵시키는 치료 이익을 여전히 유지시킨다. 명백한 독성 또는 비정상적인 행동은 관찰되지 않았다. 현재의 데이터는 처리 후 9개월 이하 동안 HD 마우스 및 야생형 마우스에서 대립형질 비특이적 Htt 침묵 후에 유사한 독성 결여를 나타내는 이전의 연구와 일치한다(문헌[Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063]). 야생형 Htt의 부분적 억제의 안전성은 또한 비-인간 영장류에서 보고되었으며(문헌[McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162]; 문헌[Grondin *et al.*,

(2012) *Brain* 135:1197-1209]), 이는 정상 Htt 수준의 부분적 감소가 유의한 유해 결과를 초래할 수 없다는 추가의 확신을 제공한다. 이러한 연구는 다양한 행동 시험에서의 수행능력에 의해 입증되는 바와 같이 YAC128 마우스에서의 돌연변이 Htt와 야생형 Htt 둘 모두의 부분적 억제(약 40%)가 치료적이었으며, 어떠한 명백한 부정적인 문제와도 관련되지 않았음을 추가로 나타낸다. 이전의 보고서는 배아발생과 출생후 신경발생에서의 Htt의 역할을 제안하였다(문헌[Bhide *et al.*, (1996) *J. Neurosci.* 16:5523-5535]; 문헌[Reiner *et al.*, (2003) *Mol. Neurobiol.* 28:259-276]; 문헌[Cattaneo *et al.*, (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* 6:919-930]). 그러나, 현재까지의 여러 전임상 연구는 성체 뇌에서 야생형 Htt 수준을 부분적으로 감소시키는 것이 마우스 및 비-인간 영장류에서 잘 견뎌지는 것으로 나타남을 보여준다(문헌[Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063]; 문헌[McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162]; 문헌[Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209]).

[0261] 마우스 모델과 인간 환자 둘 모두에서 HD 병증의 주목할 만한 특징은 돌연변이 Htt 면역반응성(IR) 응집체의 존재이다(문헌[DiFiglia *et al.*, (1997) *Science* 277:1990-1993]; 문헌[Scherzinger *et al.*, (1997) *Cell* 90:549-558]). HD의 일련의 병태생리학적 이벤트(event) 내에서의 응집체의 정확한 역할은 계속 논의될 문제이며(문헌[Lansbury *et al.*, (2006) *Nature* 443:774-779]), 돌연변이 Htt 응집체와 질병 사이의 인과 관계의 제안은 논란의 여지가 있다(문헌[Bates, (2003) *Lancet* 361:1642-1644]; 문헌[Arrasate *et al.*, (2004) *Nature* 431:805-810]). 그러나, 불용성 단백질 응집체의 형성이 세포 분해 작용에 증가된 부담을 부여한다는 것에는 합의가 존재한다(문헌[Yamamoto *et al.*, (2000) *Cell* 101:57-66]). 본 명세서에 개시된 연구는 YAC128 마우스가 6개월령에서 이르게(이전에 보고된 것보다 이르게) 광범위한 선조체 응집체를 나타내었고, 7개월령째에서의(응집체가 이미 형성된 후) AAV2/1-miRNA-Htt의 주입이 선조체 내의 EM48 양성 Htt 응집체의 수를 거의 야생형 수준으로 유의하게 감소시켰음을 입증하였다. 이러한 데이터는, 이론에 구속하고자 함이 없이, AAV2/1-miRNA-Htt 처리가 이용 가능한 Htt의 풀(pool)을 감소시켜, 돌연변이 Htt 응집체의 부담을 유의하게 경감시키고 이에 따라 이러한 마우스 모델에서 주목된 기능 개선에 잠재적으로 기여할 수 있음을 암시한다.

[0262] AAV2/1-miRNA-Htt 처리는 Htt 응집체의 실질적인 제거 이외에 YAC128 마우스에서 행동 이익을 또한 부여하였다. YAC128 마우스는 3개월령째에서 시작하여 로타로드에서 결손을 나타내기 시작하고, 7개월령까지 심각한 손상을 나타낸다(문헌[Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567]). 7개월령째에(이 때, 운동 조정력이 유의하게 손상되어 있을 것임) AAV2/1-miRNA-Htt로 처리된 YAC128 마우스는 로타로드 시험에서 개선을 나타내었고, 이는 확립된 운동 결손의 반전이 달성되었음을 암시한다. Htt 응집체의 감소가 이전에 보고되었지만(N171 및 R6/2 단편 모델)(문헌[Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633]; 문헌[Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197]), 본 연구는 HD의 전장 마우스 모델에서 응집체의 개선 및 수반되는 행동 개선을 나타낸다. 선조체 내로의 AAV-miRNA-Htt 주입 후 포르솔트 수영 시험에서의 유의한 개선이 또한 관찰되었다. 이는 AAV-RNAi에 따른 이러한 우울증 표현형의 개선을 나타낸 최초의 보고서이며, 중요하게는 이러한 결과는 이론에 구속하고자 함이 없이 선조체에서의 Htt 수준의 감소가 YAC128 모델에서 나타난 우울증 표현형을 개선시키기에 충분하였음을 암시한다. 마지막으로, 7개월령 YAC128 마우스가 AAV-miRNA-Htt로 처리된 경우(증상후 처리), 선조체에서의 Htt 응집체의 유의한 감소 및 이러한 모델에 의해 나타나는 운동 조정력 결손의 잠재적인 역전이 관찰되었다. 이론에 구속하고자 함이 없이, 이러한 데이터는 AAV2/1-miRNA-Htt를 이용한 증상후 처리가 세포 내에서의 mHtt 부담을 경감시키고, 심지어 mHtt 응집체가 형성된 후에도 치료 이익을 제공할 수 있음을 나타낸다.

[0263] 선조체 Htt의 억제는 또한 YAC128 마우스 및 인간 HD 환자에서 연령에 따라 점진적으로 감소하는 2개의 전사체인 DARPP-32 및 D1 수용체의 mRNA 수준의 보통 정도의 교정을 가져왔다. 돌연변이 Htt는 다수의 세포 작용을 교란시켜 신경세포 기능이상 및 전사 조절이상을 초래하는 것으로 알려져 있다(문헌[Cha, (2000) *Trends Neurosci.* 23:387-392]).

[0264] 요약하면, 이러한 연구는 AAV 매개 RNAi가 HD의 YAC128 마우스 모델에서 HD 관련 행동 비정상을 유의하게 개선시킴을 나타낸다. 더욱이, 이는 Htt를 표적화하는 miRNA의 AAV 매개 전달이 명백한 독성 없이 HD의 트랜스제닉 마우스 모델에서 Htt 수준의 지속적인 억제, 세포 및 신경병리학적 비정상의 교정, 및 운동 및 행동 결손의 개선을 가져올 수 있음을 또한 나타낸다.

[0265] *shRNA 염기쌍 형성의 변형에 의한 개선된 RNAi*

[0266] 본 연구는 재조합 AAV2/1 벡터를 이용하여, miRNA 스캐폴드(miR-155)에 끼워 넣어진 Htt 유전자에 대한 짧은 헤어핀을 인코딩하였다. 이용된 shRNA 서열은 마우스 및 인간 htt 전사체의 엑손 2를 표적화하는 이전에 공개된 서열 mirR2.4로부터 변형시켰다(문헌[McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873]).

짧은 헤어핀 RNA의 변형을 이용하여 안정성 및 생물학적 활성을 증가시키고, 오프-타겟 효과를 최소화시키고, 선천성 면역 반응을 감소시켰다(문헌[Castanotto *et al.*, (2009) *Nature* 457:426-433]; 문헌[Jackson *et al.*, (2010) *Nature Rev. Drug Disc.* 9:57-67]). 본 연구에 이용된 변형된 서열은 miR2.4와 동일한 가이드 가닥 서열을 함유하였지만(**도 9a**); 작제물을 유전자 조작하여 시드 서열의 3' 말단에 추가의 아데닌 뉴클레오티드(A)를 갖게 하였으며, 이는 가이드 가닥에 상응하는 티민 뉴클레오티드(T)를 갖지 않았다(**도 9b**). 이론에 구속하고자 함이 없이, 열역학적 모델링은 가이드 가닥 상의 시드 서열의 반대쪽에 있는 비-가이드 가닥에서의 벌지 서열의 추가가 RNAi 성능의 양상을 개선시킬 수 있음을 암시한다. 따라서, 본 발명자들은 다양한 장애를 치료하기 위한 신규한 변형적 핵산 치료법을 생성시키는데 이용될 수 있는 진보를 또한 이루었다.

[0267] **실시예 7. 오프-타겟 유전자 침묵의 감소**

[0268] RNA 간섭(RNAi)은 많은 인간 질병의 치료를 위한 접근법을 제공한다. 그러나, RNAi 기반 치료법의 안전성은 오프-타겟 유전자 침묵으로 알려져 있는 효과인, 의도하지 않은 mRNA에 결합하여 이의 발현을 감소시키는 작은 저해성 RNA(siRNA)의 능력에 의해 방해받을 수 있다. 오프-타겟팅은 시드 영역(작은 RNA의 뉴클레오티드 2-8)이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 불안정화를 유도하는 경우에 주로 발생한다. 현재까지, 대부분의 치료용 RNAi 서열은 주로 유전자 침묵 효능에 대해 선택되고, 나중에 안전성에 대해 평가된다. 본 명세서에서는, 우성 신경변성 장애인 헌팅톤병(HD)을 치료하는 siRNA를 설계함에 있어서, 마우스 뇌에서 강력한 침묵을 나타내며 낮은 가상(*in silico*) 오프-타겟 프로파일을 가지는, 최소의 오프-타겟팅 가능성을 갖는 2개의 신규 서열(즉, 모든 공지된 인간 및 붉은털원숭이 3'-UTR 내에 부족한 시드 상보체를 갖는 서열)을 생성시켰다.

표 1

[0269]

miRNA 서열

miRNA ID	miRNA 서열 (안티센스 , 5'→3')	#siSPOTR 오프-타겟 (인간)	제한 부위 오버행(밑줄 그어짐)을 포함하는, 실제의 miRNA 서열을 함유하는 스템루프를 클로닝(5'→3') 하기 위한 상단 서열
본래의 설계			
170XA	UAGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:1)	6001	TGCTGTAGACAATGATTCACACGGT**GTTTTGGCCACTGACTGAC**ACCGT GTGTCATTGTCTAA (SEQ ID NO:20)
낮은 오프-타겟팅이 되도록 변형됨:			
170XA L1	U**C**GACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:15)	786	TGCTGT**C**GACAATGATTCACACGGT**GTTTTGGCCACTGACTGAC**ACCG TGTGTCATTGTG**G**AA (SEQ ID NO:21)
170XA L2	UAGAC**G**AUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:17)	1223	TGCTGTAGAC**G**ATGATTCACACGGT**GTTTTGGCCACTGACTGAC**ACCG TGTGTCAT**C**GTCTAA (SEQ ID NO:21)

[0270] **표 1**에는 본래의 PS170XA miRNA 서열 및 이 서열의 2개의 변형된 낮은 오프 타겟팅 변형체인 170XAL1과 170XAL2를 나타낸다. PS170XA의 2개의 낮은 오프-타겟팅 변형체는 염기 2-8의 7량체 내의 염기를 치환하여 CpG 모티프를 생성시킴으로써 설계하였다(문헌[Boudreau *et al*, 2012]). 170XAL1(5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3')(SEQ ID NO:15)에서는 위치 2의 'A'를 C로 변화시켰고, 170XAL2(5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3')(SEQ ID NO:17)에서는 위치 6의 'A'를 'G'로 변화시켰다. 이러한 치환은 최소의 오프-타겟팅 가능성과 강력한 침묵 능력을 갖는 후보 서열을 확인하는 특이성 중심 siRNA 설계 알고리즘인 SiSPOTR 알고리즘을 이용하여 유의하게 더 낮은 오프 타겟 스코어를 생성시켰다(문헌[Boudreau *et al*, *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41(1) e9]). 감소된 SiSPOTR 스코어는 신규 서열이 본래의 170XA 서열과 비교하여 더 낮은 수의 잠재적인 인간 오프 타겟을 가짐을 예측해줄 것이다.

[0271] 본래의 PS170XA miRNA 서열은 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3'(SEQ ID NO:1)이다. 가이드 가닥, 변형된 mir-155 내부 루프(뮤린) 및 패신저 가닥을 포함하는 하기 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하였다: 5'TAGACAATGATTCACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTGTCATTGTCTAA-3'(SEQ ID NO:19). 추가의 'A'가 3' 말단에 포함되어 있다. 가이드 및 패신저 가닥은 진하게 표시되어 있고, 가이드 가닥의 염기 11 및 12는 패신저 가닥에서 역보완되지(reverse-complemented) 않아서 성숙한 프로세싱된 이중체에서 작은 내부 루프를 생성시킨다. 170XAL1에서는 위치 2의 'A'를 C로 변화시키고, 170XAL2에서는 위치 6의 'A'를 'G'로 변화시켰는데, 그렇지 않았다면 170XAL1과 170XAL2는 본래의 PS170XA와 동일한 구조를 가진다. 구조는 **도 10**에 도시되어 있다.

[0272] 인간 배아 신장(HEK293) 세포에서 시험관내 Htt 감소를 매개하는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 170XAL2의 능력을 시험하였다. AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 170XAL2 발현 플라스미드뿐만 아니라 비코딩 miRNA 서열을 함유

하는 대조 플라스미드(CTL3)로 HEK293 세포를 트랙스펙션시켰다(처리당 8개의 복제물). Fugene 트랜스펙션 시약을 이용하여 세포를 트랜스펙션시키고, 48시간 후에 수거하였다. TaqMan® Cells-to-CT™ Kit(Ambion)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 정량 실시간 RT-PCR(ABI Prism 7500 Sequence Detector(Applied Biosystems)으로 수행하고 분석함)에 의해 RNA 수준을 측정하였다. 발현 수준을 인간 PPIA(펩티딜프롤릴 이소머라제)에 대해 표준화시켰다. 인간 Htt mRNA 수준은 CTL3 및 미처리된 대조군과 비교하여 170XAL2 플라스미드와 170XAL2 플라스미드 둘 모두를 이용한 트랜스펙션 후에 감소되었지만, 이러한 감소는 통계적 유의성에 도달하지 못했다(도 11).

[0273] YAC128 마우스의 선조체에서 Htt 발현을 침묵시키는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 170XAL2의 능력을 평가하였다. AAV2/1-miRNA-Htt 170XA(2E10 vg/부위), AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1(2E10 vg/부위) 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2(3E10 vg/부위)를 양측 선조체내 주입에 의해 성체 YAC128 마우스에 투여하였다. 본래의AAV2/1-miRNA-Htt 170XA는 양성 대조군으로서의 역할을 하는 한편, 미처리된(주입 없음) 또 다른 그룹은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. 주입 후 1개월째에, 동물을 희생시키고, PBS를 이용하여 관류하였다. 조직학 및 생화학적 분석을 위해 뇌를 수집하였다. 생화학적 분석을 위해, 한쪽 반구의 선조체 영역을 미세 절개하고, 액체 질소에서 스냅 동결(snap frozen)시켰다. 돌연변이 인간 및 마우스 Htt mRNA 및 단백질의 선조체 수준을 각각 QPCR 및 웨스턴 블롯에 의해 평가하였다. 돌연변이 인간 Htt 및 마우스 Htt mRNA는 미처리된 대조 동물과 비교한 경우 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 및 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2 주입 마우스에서 유의하게 감소하였다(**도 12a 및 도 12b**). PPIA는 모든 QPCR 검정에 대해 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 돌연변이 인간 및 마우스 Htt 단백질은 미처리된 대조 동물과 비교한 경우 모든 AAV2/1-miRNA-Htt 주입 마우스에서 유의하게 감소하였고, 동등한 정도의 감소(대략 50%, $p<0.05$)가 모든 처리에 걸쳐 주목되었다(**도 12c 및 도 12d**).

[0274] 이러한 염증 마커 유전자가 본 발명의 AAV-miRNA-Htt 벡터의 주입 후에 상향 조절되는지의 여부를 결정하기 위한 QPCR에 의한 선조체 내의 GFAP 및 Iba1 mRNA 수준을 평가하였다. GFAP는 성상교세포증(astrogliosis)의 마커이고, Iba1은 미세아교세포 활성화에 대한 마커로서의 역할을 한다. 본 발명자들은 AAV2/1-miRNA-Htt 170XA의 선조체내 주입이 주입 1개월째에 선조체에서 GFAP mRNA(**도 13a**) 및 Iba1 mRNA(**도 13b**) 수준의 유의한 증가를 가져온다는 것을 입증한다. AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2의 주입 후에 GFAP 또는 Iba1의 증가는 관찰되지 않았고, GFAP 및 Iba1 mRNA 수준은 미처리된 대조군과 동등하였다. 인간 PPIA는 표준화 대조 유전자로서의 역할을 하였다. 값은 평균 ± SEM으로 나타낸다. *미처리된 대조 마우스와 유의하게 상이함, $p<0.05$; ANOVA, 이어서 투키의 사후 시험.

[0275] 주입 후 1개월째에서의 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2로 처리된 YAC128 마우스로부터의 선조체 조직 절편의 GFAP 및 Iba1 면역조직화학적 염색은 GFAP 및 Iba1 단백질 수준이 주입 후 선조체에서 상승하지 않았음을 확인해주었다(**도 14**). 형광 현미경검사를 이용하여 뇌에서의 GFAP 및 Iba1 면역염색의 수준을 평가하였다. AAV2/1-miRNA-Htt 170XA의 선조체내 주입은 형광 현미경검사에 의해 나타난 바와 같이 GFAP 및 Iba-1 면역반응성의 증가를 가져왔지만, 본 발명자들은 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL1 또는 AAV2/1-miRNA-Htt 170XAL2의 주입 후에 GFAP 또는 Iba1 면역염색의 어떠한 증가도 관찰하지 못했으며, 여기서 염색의 수준은 미처리된 대조 뇌와 동등하였다. 스케일 바 = 50 μM.

[0276] 서열

[0277] 모든 폴리펩티드 서열은 달리 지시되지 않은 한 N-말단에서 C-말단으로 제시된다. 모든 핵산 서열은 달리 지시되지 않는 한 5'에서 3'로 제시된다.

[0278] <u>miRNA htt 안티센스 가닥</u>

[0279] UAGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:1)

[0280] <u>miRNA 패신저 가닥 상보체</u>

[0281] ACCGUGUGUCAUUGUCUAA (SEQ ID NO:2)

[0282] <u>센스 표적 서열</u>

[0283] ACCGUGUGAAUCAUUGUCUAA (SEQ ID NO:3)

[0284] <u>miRNA htt 안티센스 가닥 DNA 서열</u>

[0285] TAGACAATGATTCACACGGT (SEQ ID NO:4)

[0286] <u>miRNA 패신저 가닥 상보체</u>

[0287] ACCGTGTGTCATTGTCTAA (SEQ ID NO:5)

[0288] 센스 표적 서열

[0289] ACCGTGTGAATCATTGTCUTAA (SEQ ID NO:6)

[0290] 3A170 RNA 서열

[0291] UGCUGUAGACAAUGAUUCACACGGUGUUUUGGCCACUGACUGACACCGUGUCAUUGUCUAACAGG (SEQ ID NO:7)

[0292] 3A170 DNA 서열

[0293] TGCTGTAGACAATGATTCACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTCATTGTCTAACAGG (SEQ ID NO:8)

[0294] 인간 Htt mRNA 정방향 프라이머

[0295] Ctccgtccggtagacatgct (SEQ ID NO:9)

[0296] 인간 Htt mRNA 역방향 프라이머

[0297] Ggaaatcagaaccctcaaatgg (SEQ ID NO:10)

[0298] 인간 Htt mRNA 프로브

[0299] Tgagcactgttcaactgtgtgtatcggga (SEQ ID NO:11)

[0300] scAAV 벡터용 변이체 AAV ITR

[0301] CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG (SEQ ID NO:12).

[0302] 전체 AAV 벡터 유전체 DNA 서열

[0303] tccgaagggcgaattgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcg
ctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa

[0304] (SEQ ID NO:13)

[0305] miRNA 스캐폴드 DNA 서열

[0306] ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgttagacaatgattcacacggtgttttggccactgactgacaccgtgtgtcattgtctaacaggacacaaggcct
gttactagcactcacatggaacaaatggcc (SEQ ID NO:14)

[0307] 170XAL1 가이드(안티센스)

[0308] UCGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:15)

[0309] 170XAL1 비-가이드

[0310] ACCGUGUGUCAUUGUCGAA (SEQ ID NO:16).

[0311] 170XAL2 가이드(안티센스)

[0312] UAGACGAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:17)

[0313] 170XAL1 비-가이드

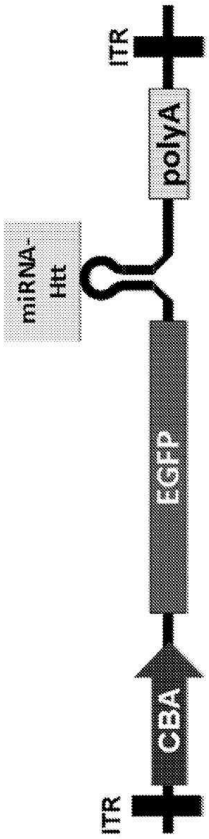
[0314] ACCGUGUGUCAUCGUCUAA (SEQ ID NO:18)

[0315] 170XA

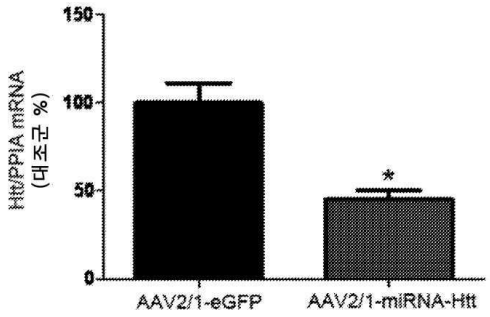
[0316] TAGACAATGATTCACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTGTCATTGTCTAA (SEQ ID NO:19)

도면

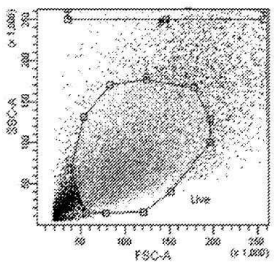
도면1a



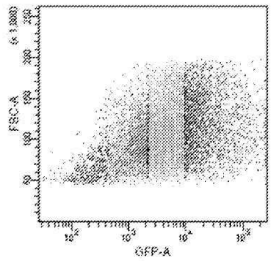
도면1b



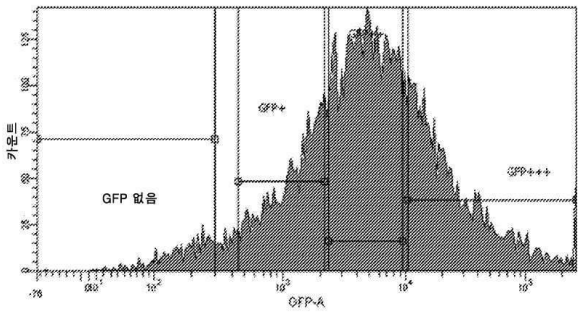
도면2a



도면2b

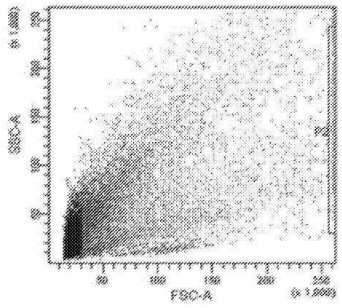


도면2c

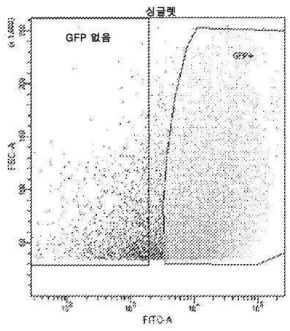


도면2d

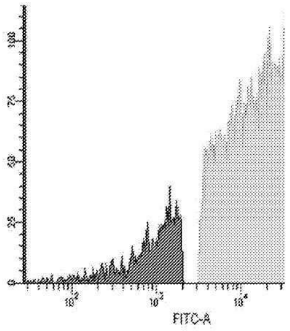
도면3a



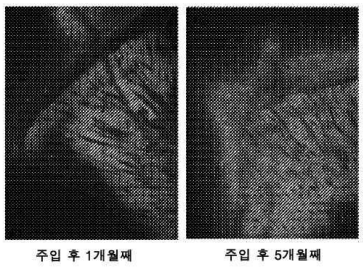
도면3b



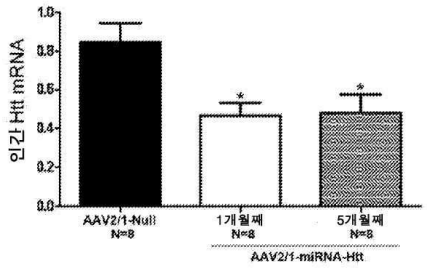
도면3c



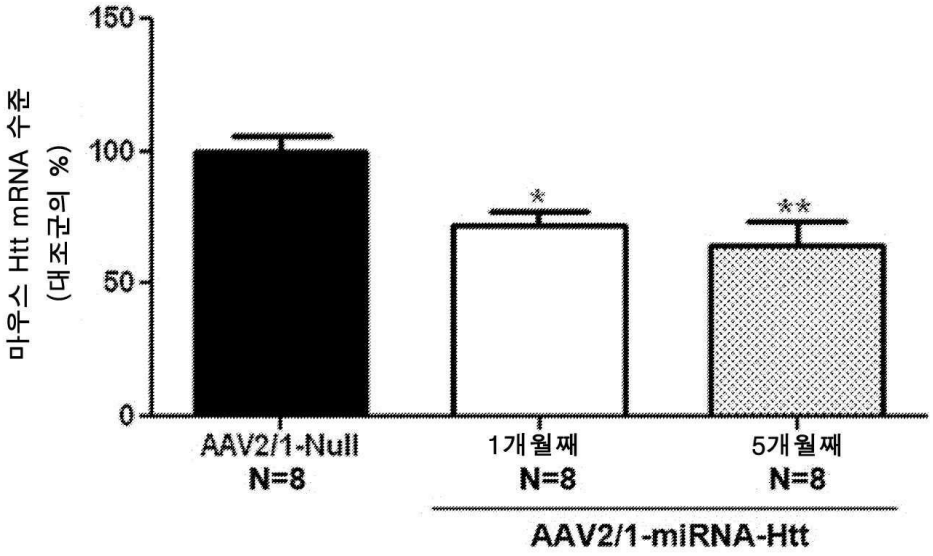
도면3d



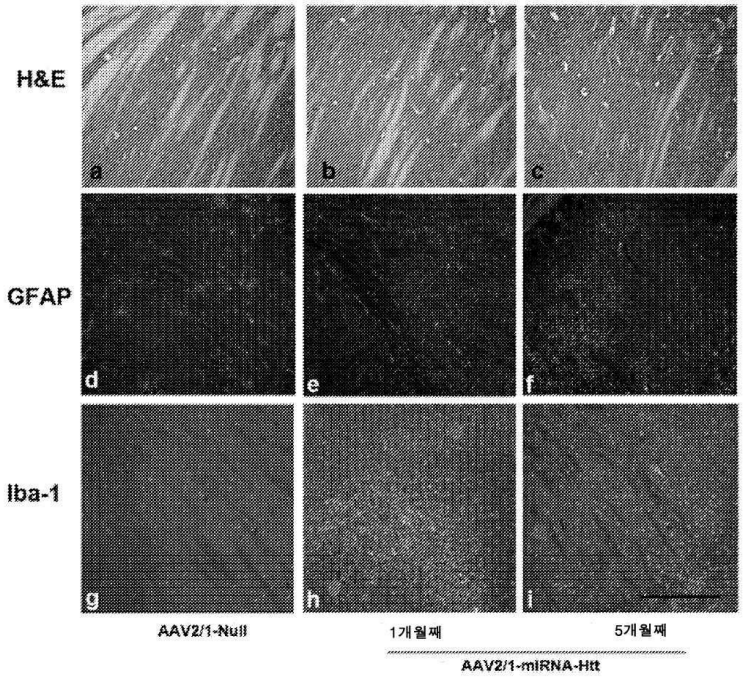
도면3e



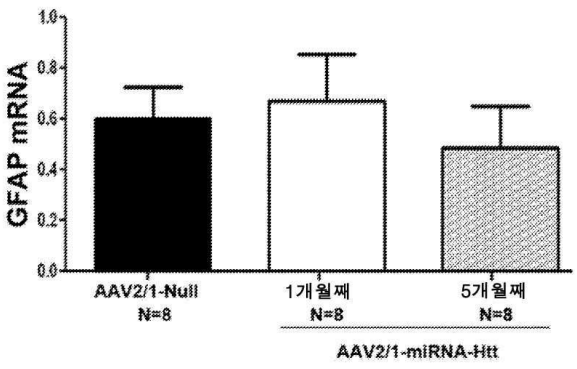
도면4



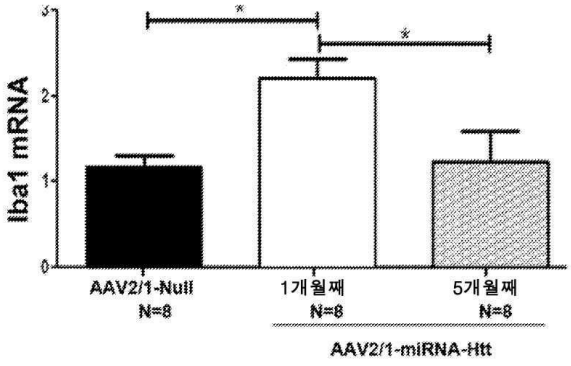
도면5ai



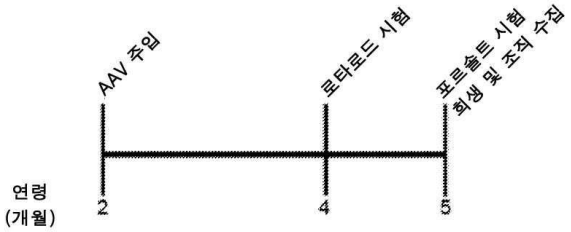
도면5j



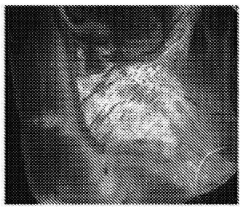
도면5k



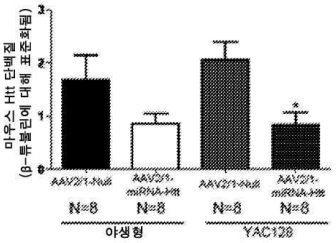
도면6a



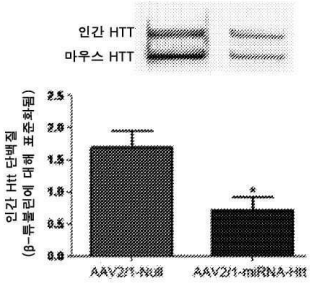
도면6b



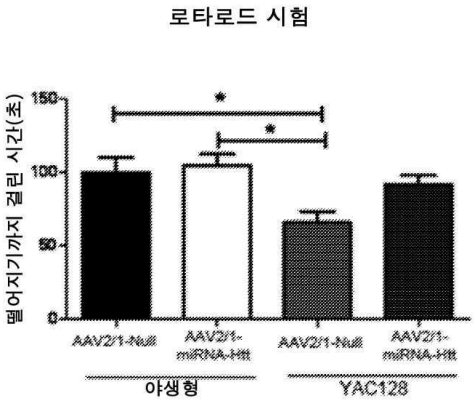
도면6c



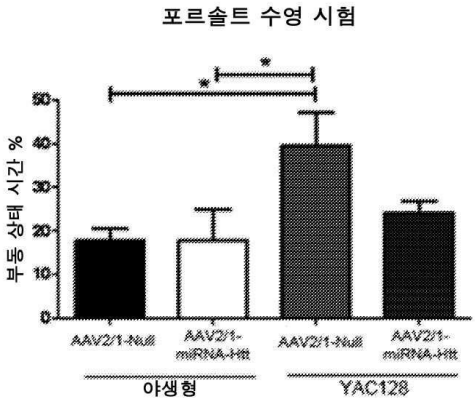
도면6d



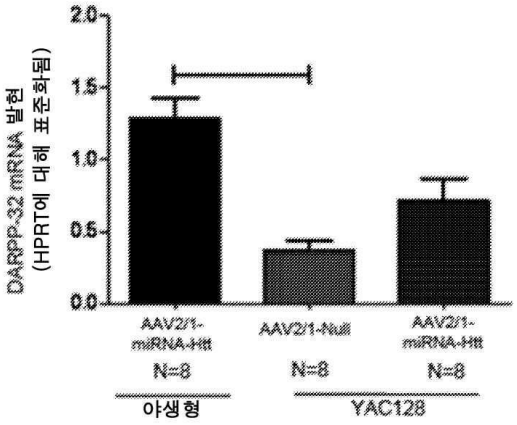
도면6e



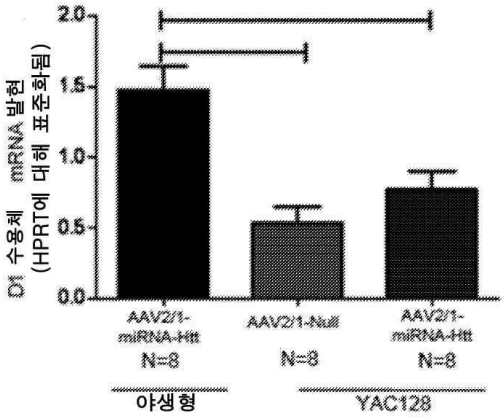
도면6f



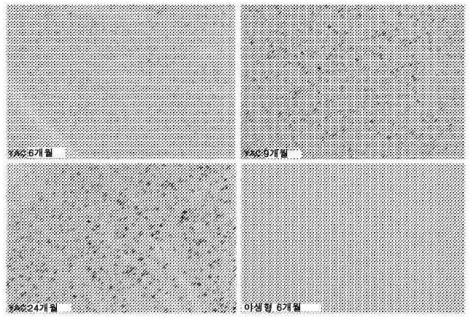
도면7a



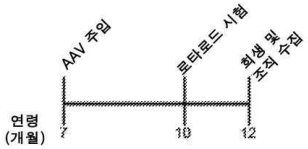
도면7b



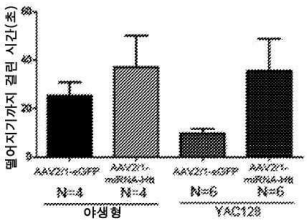
도면8a



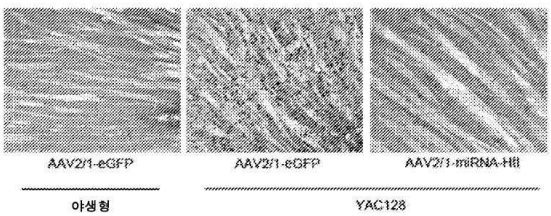
도면8b



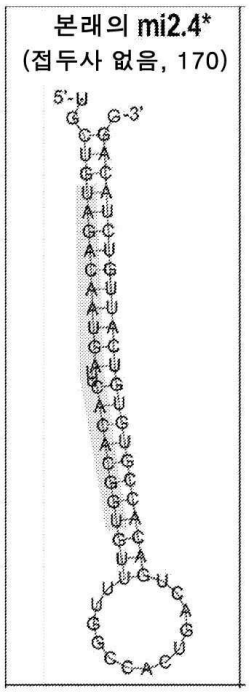
도면8c



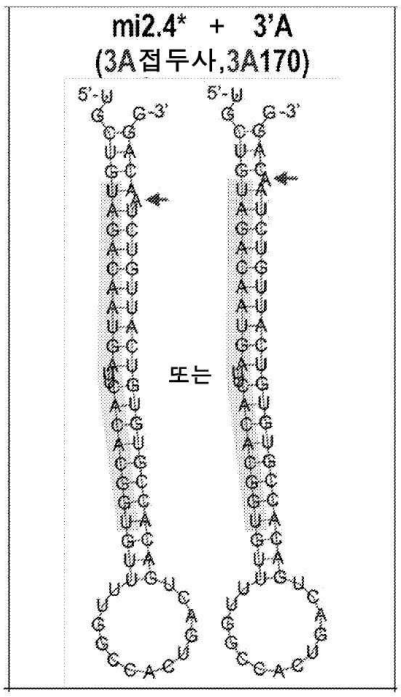
도면8d



도면9a



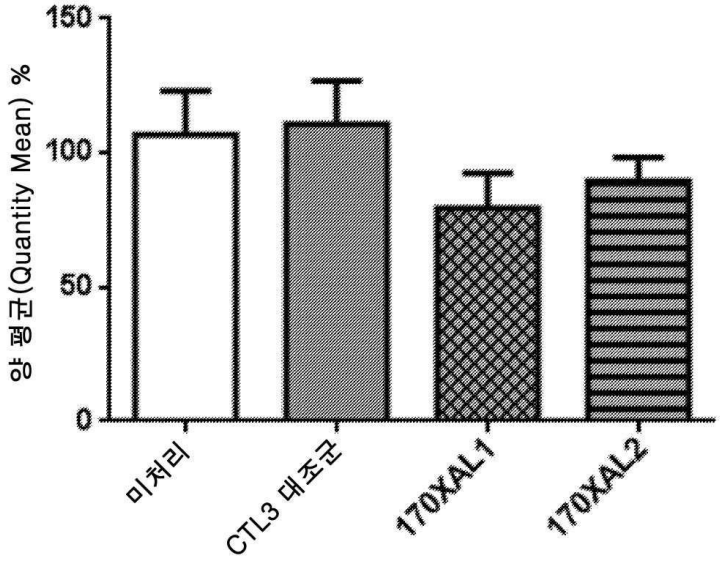
도면9b



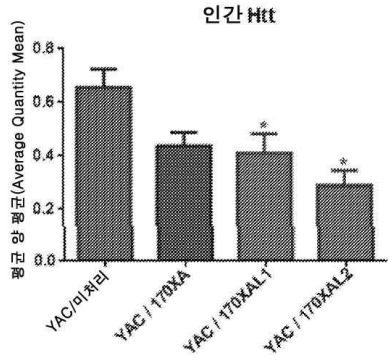
도면10

T = 실제 RNA에서는 U
170XA
170XAL1
170XAL2

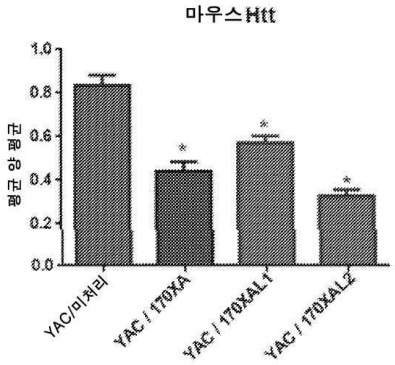
도면11


양 평균(Quantity Mean) %
150
100
50
0
미처리
CTL3 대조군
170XAL1
170XAL2

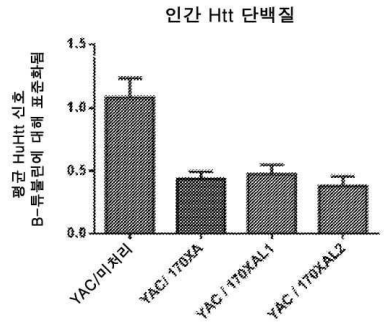
도면12a



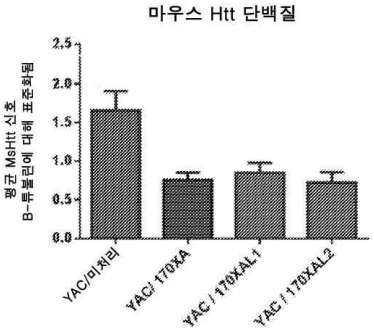
도면12b



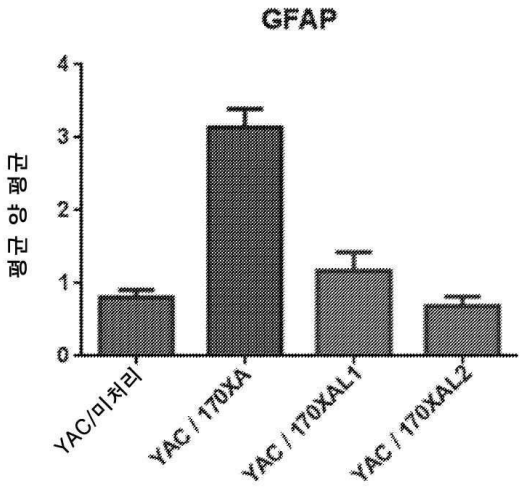
도면12c



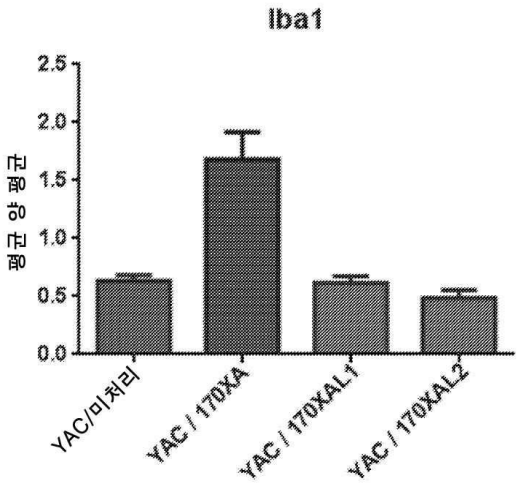
도면12d



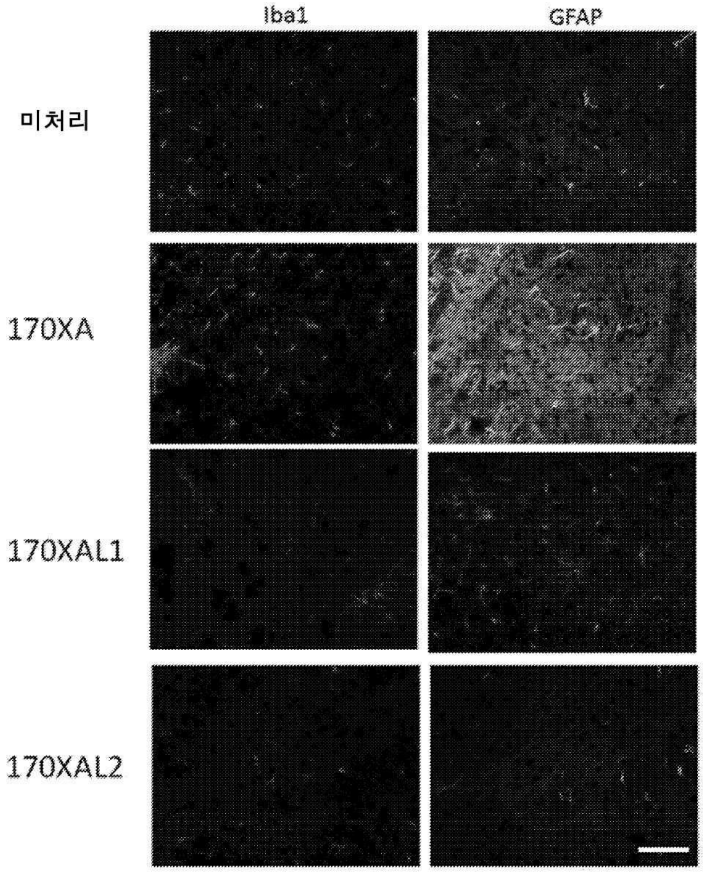
도면13a


GFAP
평균 양 평균
4
3
2
1
0
YAC/미처리
YAC / 170XA
YAC / 170XAL1
YAC / 170XAL2

도면13b


Iba1
평균 양 평균
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
YAC/미처리
YAC / 170XA
YAC / 170XAL1
YAC / 170XAL2

도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> STANEK, Lisa M.
PALERMO, Adam
RICHARDS, Brenda
SARDI, Sergio Pablo
O'RIORDAN, Catherine
SONG, Antonius

<120> VARIANT RNAi

<130> 159792010140

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/114,578

<151> 2015-02-10

<160> 26

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

uagacaauga uucacacggu 20

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

accgugugc auugucuaa 19

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

accgugugaa ucauugucua a 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Synthetic Construct

<400> 4

tagacaatga ttcacacggt 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

accgtgtgtc attgtctaa 19

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

accgtgtgaa tcattgtcut aa 22

<210> 7

<211> 65

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ucauugucua 60

acagg 65

<210> 8

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

tgctgtagac aatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tcattgtcta 60

acagg 65

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Synthetic Construct

<400> 9

ctccgtccgg tagacatgct 20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

ggaaatcaga accctcaaat gg 22

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

tgagcactgt tcaactgtgt gtatcggga 29

<210> 12

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60

ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 13

<211> 4297

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcctggagg ggtggagtcg tgacaattcg cccttgggcc 180

taggcaattg gatcccggac cgtcgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa 240

ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 300

atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 360

ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 420

aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 480

tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccttа tgggactttc 540

ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 600

cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 660

ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 720

gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 780

agagcggcgc gctccgaaag tttccтttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 840

aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 900

ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttactc ccacaggtga 960

gcgggcggga cggcccttct cctccgggct gtaattagcg cttggtttaa tgacggcttg 1020

tttcttttct gtggctgcgt gaaagccttg aggggctccg ggagggccct ttgtgcgggg 1080

ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg tgtgcgtggg gagcgccgcg tgcggctccg 1140

cgctgcccgg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg gctttgtgcg ctccgcagtg 1200

tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg ccccgcggtg cgggggggggc tgcgagggga 1260

acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg gggggtgagc agggggtgtg ggcgcgtcgg 1320

tcgggctgca acccccccctg cacccccctc cccgagttgc tgagcacggc ccggcttcgg 1380

gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcgg ggctcgccgt gccgggcggg gggtggcggc 1440

aggtgggggt gccgggcggg gcggggccgc ctcgggccgg ggagggctcg ggggaggggc 1500

gcggcggccc ccggagcgcc ggcggctgtc gaggcgcggc gagccgcagc cattgccttt 1560

tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac ttcctttgtc ccaaatctgt gcggagccga 1620

aatctgggag gcgccgccgc acccccctcta gcgggcgcgg ggcgaagcgg tgcggcgccg 1680

gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc 1740

ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg acggctgcct tcgggggggga cggggcaggg 1800

cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc ctctgctaac catgttcatg 1860

ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca acgtgctggt tattgtgctg tctcatcatt 1920

ttggcaaaga attcttcgaa agatctgcta gcttaattaa cccggtcgcc accatggtga 1980

gcaagggcga ggagctgttc accggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg 2040

taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc 2100

tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga 2160

ccaccctgac ctacggcgtg cagtgcttca gccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg 2220

acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg 2280

acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc 2340

gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg 2400

agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca 2460

aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact 2520

accagcagaa cacccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga 2580

gcacccagtc cgccctgagc aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg 2640

agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtaccct ggaggcttgc 2700

tgaaggctgt atgctgttag acaatgattc acacggtgtt ttggccactg actgacaccg 2760

tgtgtcattg tctaacagga cacaaggcct gttactagca ctcacatgga acaaatggcc 2820

atgcatctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc 2880

tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg 2940

accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat 3000

tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caaggggggag 3060

gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gagctagagt cgaccggacc ggtggaagtc 3120

ctcttcctcg gtgtccttga cttcaaaggg tctctcccat ttgcctggag agaggggaag 3180

gtgggcatca ccaggggtga gtgaaggttt ggaagagtgt agcagaataa gaaaccatga 3240

gtcccctccc tgagaagccc tgagcccccct tgacgacaca catccctcga ggctcagctt 3300

catcatctgt aaaaggtgct gaaactgacc atccaagctg ccgaaaaaga ttgtgtgggg 3360

ataattcaaa actagaggaa gatgcagaat ttctacatcg tggcgatgtc aggctaagag 3420

atgccatcgt ggctgtgcat ttttattgga atcatatgtt tatttgaggg tgtcttggat 3480

attacaaata aaatgttgga gcatcaggca tatttggtac cttctgtcta aggctccctg 3540

ccccttgtta attggcagct cagttattca tccagggcaa acattctgct tactattcct 3600

gagagctttc ctcatcctct agattggcag gggaaatgca gatgcctgag cagcctcccc 3660

tctgccatac caacagagct tcaccatcga ggcatgcaga gtggacaggg gcctcaggga 3720

cccctgatcc cagctttctc attggacaga aggaggagac tggggctgga gagggacctg 3780

ggcccccact aaggccacag cagagccagg actttagctg tgctgactgc agcctggctt 3840

gcctccactg ccctcctttg cctcaagagc aagggagcct cagagtggag gaagcagccc 3900

ctggccttgc ctcccacctc ccctccccta tgctgttttc ctgggacagt gggagctggc 3960

ttagaatgcc ctggggcccc caggaccctg gcattttaac ccctcagggg caggaaggca 4020

gcctgagata cagaagagtc catcacctgc tgtatgccac acaccatccc cacagttacg 4080

tactagttcg aagccacgcg tccgaagggc gaattgtaga taagtagcat ggcgggttaa 4140

tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 4200

cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 4260

cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaa 4297

<210> 14

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgtt agacaatgat tcacacggtg ttttggccac 60

tgactgacac cgtgtgtcat tgtctaacag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120

gaacaaatgg cc 132

<210> 15

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

ucgacaauga uucacacggu 20

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

accguguguc auugucgaa 19

<210> 17

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

uagacgauga uucacacggu 20

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

accguguguc aucgucuaa 19

<210> 19

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

tagacaatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca ttgtctaa 58

<210> 20

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

tgctgtagac aatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcattgtc 60

taa 63

<210> 21

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

tgctgtcgac aatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcattgtc 60

gaa 63

<210> 22

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

tgctgtagac gatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcatcgtc 60

taa 63

<210> 23

<211> 66

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ugucauuguc 60

uacagg 66

<210> 24

<211> 67

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ugucauuguc 60

uaacagg 67

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

tcgacaatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca ttgtcgaa 58

<210> 26

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400

> 26

tagacgatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca tcgtctaa 58