(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월08일
(11) 등록번호 10-2803519
(24) 등록일자 2025년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7009994
(22) 출원일자(국제) 2016년09월23일
심사청구일자 2021년09월17일
(85) 번역문제출일자 2018년04월09일
(65) 공개번호 10-2018-0054672
(43) 공개일자 2018년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/053374
(87) 국제공개번호 WO 2017/053753
국제공개일자 2017년03월30일
(30) 우선권주장
62/222,588 2015년09월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2013130824 A1
WO2011016840 A2
US20130336947 A1

(73) 특허권자
상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94804 리치먼드 스위트 에이 100 501 카날 불러바드
(72) 발명자
프륄리히 스티븐
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
밀러 제프리 씨.
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

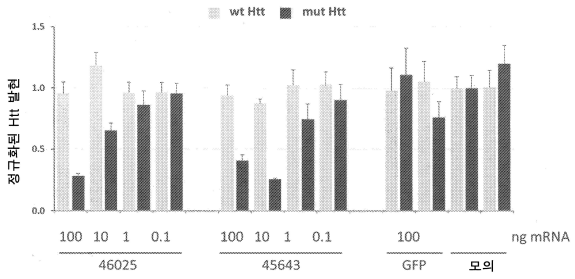
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 **HTT 리프레서 및 이의 용도**

(57) 요 약

Htt 리프레서 그리고 이들 Htt 리프레서의 사용을 위한 방법 및 조성물이 본 명세서에서 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61P 25/14 (2018.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 2319/81 (2013.01)
C12N 2750/14141 (2013.01)

(72) 발명자
파션 데이비드
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
레바 에드워드 제이.
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
자이틀러 브라이언
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
장 에이치. 스티브
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501 상가모 테라퓨틱스 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

돌연변이체 Htt 유전자의 발현을 억제하는 융합 단백질로서,

(i) (1) 서열 식별 번호:1의 F1,

서열 식별 번호:1의 F2,

서열 식별 번호:1의 F3,

서열 식별 번호:2의 F4, 및

서열 식별 번호:3의 F5; 또는

(2) 서열 식별 번호:4의 F1,

서열 식별 번호:1의 F2,

서열 식별 번호:2의 F3,

서열 식별 번호:3의 F4, 및

서열 식별 번호:5의 F5

로 이루어진 5개의 징크 핑거 도메인을 포함하는 비-자연 발생 징크 핑거 단백질, 및

(ii) 전사 억제 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 2

제1 항에 있어서, 징크 핑거 도메인은 F1 내지 F5 순으로 정렬된 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 3

제1 항에 있어서, 전사 억제 도메인은 KRAB 억제 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4

제1 항에 있어서, 돌연변이체 Htt 유전자는 CAG45, CAG38, 또는 CAG48 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 5

제1 항의 1종 이상의 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제5 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 AAV 벡터.

청구항 7

제1 항의 1종 이상의 융합 단백질, 제5 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제6 항의 AAV 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 8

헌팅턴 병을 치료하거나 예방하기 위한 약제학적 조성물로서, 제5 항의 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 제6 항의 1종 이상의 AAV 벡터를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 9

단리된 세포에서 돌연변이체 Htt 유전자의 발현을 억제시키는 방법으로서, 제5 항의 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 제6 항의 1종 이상의 AAV 벡터를 상기 세포에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9 항에 있어서, 세포는 뉴런 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10 항에 있어서, 뉴런 세포는 뇌에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11 항에 있어서, 뉴런 세포는 뇌의 선조체에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

인간을 제외한, 필요로 하는 대상체에서 헌팅턴병의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 방법은 제8 항의 1종 이상의 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2015년 9월 23일 출원된 미국 가출원 번호 62/222,588의 이익을 주장하고, 이의 개시내용은 이로써 이의 전체가 참고로 편입된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 개시내용은 헌팅턴병 진단제 및 치료제의 분야이다.

배 경 기 술

[0005] 헌팅턴 무도병으로서 또한 공지된, 헌팅턴병 (HD)은 운동, 인지 및 정신 이상의 진행성 장애이다. 이러한 질환에 대하여 평균 개시 연령은 35-44세 연령이고, 사례의 약 10%에서, 개시가 21세 연령에 앞서 발생하여도, 질환의 진단후 평균 수명은 15-18 년이다. 유병률은 서유럽 혈통의 100,000명 중에 약 3 내지 7명이다.

[0006] 헌팅턴병은 1990년대 초기에 최초 특성규명된 트리뉴클레오타이드 반복부 팽창 장애의 한 예이다 (*참고* Di Prospero and Fischbeck (2005) *Nature Reviews Genetics* 6: 756-765). 이들 장애는 3 뉴클레오타이드의 세트의 불안정한 반복부의 국재화된 팽창을 포함하고 팽창된 반복부가 거주하는 유전자의 기능의 손실, 독성 기능의 이득, 또는 둘 모두를 초래할 수 있다. 트리뉴클레오타이드 반복부는, 비-코딩 및 코딩 유전자 영역을 포함하는, 유전자의 임의의 일부에서 위치할 수 있다. 코딩 영역 이내 위치한 반복부는 전형적으로 반복된 글루타민 인코딩 삼중항 (CAG) 또는 알라닌 인코딩 삼중항 (CGA)을 포함한다. 비-코딩 서열 이내 팽창된 반복부 영역은 유전자의 비정상적인 발현으로 이어질 수 있는 한편 (또한 코돈 반복 장애로서 공지된) 코딩 영역 이내 팽창된 반복부는 미스-폴딩 및 단백질 응집을 유발시킬 수 있다. 비정상적 단백질과 관련된 병리생리학의 정확한 원인은 종종 공지되지 않는다. 전형적으로, 트리뉴클레오타이드 팽창에 적용되는 야생형 유전자에서, 이들 영역은 정상 집단에서 반복부 서열의 다양한 수를 함유하지만, 괴로운 집단에서, 반복부의 수는 반복부의 수에서 배가 내지 대수 정도 증가로 증가할 수 있다. HD에서, 반복부는 큰 세포질 단백질 헌팅틴 (Htt)의 N 말단 코딩 영

역 이내 삽입된다. 정상 Htt 대립형질은 15-20 CAG 반복부를 함유하고, 한편 35 이상 반복부를 함유하는 대립형질은 잠재적으로 HD 유발 대립형질로 고려될 수 있고 질환 발생에 위험을 부여할 수 있다. 36-39 반복부를 함유하는 대립형질은 불완전히 침투제로 고려되고, 그들 대립형질을 포함하는 개체는 질환을 발생시킬 수 있거나 그렇지 않을 수 있고 (또는 사는 동안 나중에 증상을 발생시킬 수 있고) 한편 40 반복부 이상을 함유하는 대립형질은 완전히 침투제로서 고려된다. 사실상, 이런 많은 반복부를 가진 HD 대립형질을 함유하는 무증상 사람은 보고되지 않았다. 유년 발병형 HD (<21 세)를 가진 개체는 60 이상 CAG 반복부를 갖는 것으로 종종 밝혀진다. CAG 반복부의 증가에 더하여, HD가 반복부 서열 이내 +1 및 +2 프레임시프트 포함할 수 있어 이로써 영역이 폴리-글루타민 보다는 (+1 프레임시프트의 경우에서 AGC 반복부에 의해 인코딩된) 폴리-세린 폴리펩타이드 트랙을 인코딩할 것이 또한 나타났다 (Davies and Rubinsztein(2006) *Journal of Medical Genetics* 43: 893-896).

[0007] HD에서, 돌연변이체 Htt 대립형질은 우성 특성으로서 하나의 모체로부터 일반적으로 선천적이다. HD 환자로 태어난 임의의 아동은 다른 모체가 장애로 괴롭지 않으면 질환 발생의 50% 기회를 갖는다. 일부 경우에서, 모체는 중간 HD 대립형질을 가질 수 있고 무증상일 수 있는 한편, 반복부 팽창 때문에, 아동은 질환을 나타낸다. 게다가, HD 대립형질은 중증도 증가 또는 개시 연령 감소가 정자발생 동안 반복부 영역의 불안정한 성질 때문에 몇 개의 생성에 대해 관측되는 예상으로서 공지된 현상을 또한 표시할 수 있다.

[0008] 더욱이, Htt에서 트리뉴클레오타이드 팽창은, 뉴런 손실 신피질에서 또한 발생하면서, 선조체에서 중간 돌기 감마-아미노부티르산 (GABA) 투사 뉴런내 뉴런 손실을 유발시킨다. 엔케팔린을 함유하고 외부 담창구로 돌출하는 중간 돌출 뉴런은 서브스턴스 P를 함유하고 내부 담창구로 돌출하는 뉴런보다 더욱 관여된다. 헌팅턴병을 가진 사람에서 크게 감염된 다른 뇌 영역은 하기를 포함한다: 흑질, 피질 층 3, 5, 및 6, 해마의 CA1 영역, 두정엽에서 모난 뇌이랑, 소뇌의 푸르키네 세포, 시상하부의 측면 융기 핵, 및 시상의 정중중심핵속방핵 복합체 (Walker (2007) *Lancet* 369:218-228).

[0009] 정상 Htt 단백질의 역할은 저조하게 이해되지만, 신경발생, 세포자멸적 세포 사망, 및 소포 이동조절에서 관여될 수 있다. 게다가, 야생형 Htt가 뇌-유래된 신경친화성 인자 (BDNF), 선조체 뉴런의 예비-생존 인자의 생산을 자극시킨다는 증거가 있다. HD의 진행이 HD의 마우스 모델에서 BDNF 발현의 감소와 상관관계가 있다는 것 (Zuccato 등 (2005) *Pharmacological Research* 52(2): 133-139), 그리고 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터-매개된 유전자 전달을 통해 BDNF 또는 신경교 세포주-유래된 신경친화성 인자 (GDNF)의 전달이 HD의 마우스 모델에서 까다로운 뉴런을 보호할 수 있다는 것이 나타났다 (Kells 등, (2004) *Molecular Therapy* 9(5): 682-688).

[0010] HD용 진단 및 치료 옵션은 현재 매우 제한된다. 진단에 관하여, 변경된 (돌연변이체) Htt (mHTT) 수준은 질환 부하 스코어와 상당히 관련되고, 가용성 mHTT 종은 질환 진행하면서 농도가 증가한다. 그러나, 저-풍부성 mHTT는, *생체내* HD의 신경병리생물학의 모든 연구를 제한하고, HTT-저하 약물의 표적 참여의 시범을 못하게 하는, 환자 CNS에서 정량화하기 어렵다. *참고, 예를 들면,* Wild 등 (2014) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:e4.

[0011] 치료에 대하여, 확장된 폴리-글루타민 트랙을 통해 발생하는 단백질 응집과 관련된 독성을 예방하기 위해 설계된 일부 잠재적인 방법론 예컨대 샤페로닌의 과발현 또는 화합물 젤다나마이신과 열충격 반응의 유도는 *시험관내* 모델에서 이들 독성의 감소를 보여주었다. 다른 치료는 질환의 임상 징후에서 세포자멸사의 역할을 표적한다. 예를 들어, 질환 증상의 둔화는 하나의 모체가 HD 대립형질을 함유하였고 다른 모체가 카스파제 1에 대하여 우세한 음성 대립형질을 갖는 마우스의 짝짓기의 새끼에서 동물 모델내 카스파제 활성의 차단을 통해 나타났다. 추가적으로, 카스파제에 의한 돌연변이체 HD Htt의 절단은 질환의 병원성에서 역할을 할 수 있다. 카스파제-6 저항성 돌연변이체 Htt를 운반하는 유전자도입 마우스는 정상 뉴런 기능을 유지하는 것으로 밝혀졌고 비-카스파제 저항성 돌연변이체 Htt 대립형질을 운반하는 마우스에 비교된 경우 선조체 신경퇴행을 발생시키지 않았다 (참고 Graham 등 (2006) *Cell* 125: 1179-1191). 세포자멸적 경로의 구성원을 표적하는 분자는 징후학에서 둔화 효과를 갖는 것으로 또한 나타났다. 예를 들어, 둘 모두가 카스파제 활성을 억제시키는, 화합물 zVAD-fmk 및 미노사이클린은 마우스내 질환 징후를 둔화시키는 것으로 나타났다. 약물 레마세미드(remacemide)는 또한 작은 HD 인간 실험에서 사용되어 온 것은 상기 화합물이 NDMA 수용체에 돌연변이체 Htt의 결합을 예방하여 신경세포에서 독성 효과의 격심한 활동을 예방하는 것으로 생각되었기 때문이다. 그러나, 통계적으로 상당한 개선은 이들 실험의 뉴런 기능에서 관측되지 않았다. 게다가, 헌팅턴 연구 그룹은 조효소 Q를 이용하여 무작위화된, 이중맹검 연구를 수행하였다. 조효소 Q10으로 치료되었던 환자 중에서 더욱 느린 질환 진행에 대한 추세가 관측되었어도, 총 기능성 수용력의 쇠퇴의 속도에서 유의미한 변화는 없었다. (Di Prospero and Fischbeck, *상기 참조*).

[0012] 징크 핑거 단백질 ("ZFPs")로부터 DNA 결합 도메인, TAL-효과기 도메인 ("TALEs") 및 (Cas 및/또는 Cfp1 시스

템을 포함하는) CRISPR/Cas 전사 인자 시스템을 포함하는 뉴클레아제 및 재조합 전사 인자는 내인성 유전자의 유전자 발현을 조절하는 능력을 갖는다. *참고, 예를 들면,* 미국 특허 번호 9,045,763; 9,005,973; 8,956,828; 8,945,868; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 미국 특허 공개 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983 및 20130177960 및 20150056705 및 미국 출원 번호 14/706,747; Perez-Pinera 등 (2013) *Nature Methods* 10:973-976; Platek 등 (2014) *Plant Biotechnology J.* doi: 10.1111/pbi.12284), 이의 개시내용은 모든 목적을 위해 그들 전체가 참고로 편입된다. 또한, 표적화된 뉴클레아제는, 또한 게놈 편집 및 유전자 요법에서 사용을 위하여 잠재력을 가질 수 있는, 하기에 기반하여 개발 중이다: 아르고노트 시스템 (*예를 들면,* 'TtAgo'로서 공지된, *T. 테모필러스*로부터, 참고 Swarts 등 (2014) *Nature* 507(7491): 258-261). 징크 핑거 단백질을 함유하는 이들 조작된 전사 인자를 이용한 임상시험은 이들 신규한 전사 인자가 다양한 병태를 치료할 수 있다는 것을 보여주었다. (참고, *예를 들면,* Yu등 (2006) *FASEB J.* 20:479-481). 뉴클레아제-매개된 절단은 표적 DNA 서열에서 이중 가닥 절단 (DSB) 또는 흠을 유도하기 위해 조작된 뉴클레아제의 이용을 포함하여 이로써 오류 태생 공정 예컨대 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)에 의한 파괴의 치유 또는 치유 템플레이트를 이용하는 치유 (상동성 지향된 치유 또는 HDR)은 유전자의 녹아웃 또는 관심 서열의 삽입 (표적화된 통합)을 초래할 수 있다. 외부로 공급된 치유 템플레이트 (*예를 들면* "공여체" 또는 "이식유전자")의 부재하에 이중 가닥 파괴의 도입은 세포 NHEJ 경로에 의해 도입된 돌연변이 ("인델(indels)"로서 공지된 삽입 및/또는 결실)을 통해 표적화된 유전자의 불활성화에 통상적으로 사용된다. 예를 들면, 미국 특허 공개 20110082093은 Htt에 표적화된 특이적 징크 핑거 단백질을 개시하고 미국 특허 공개 번호 20130253040은 HD 대립형질 예컨대 Htt의 발현을 조절하는 DNA-결합 단백질에 관한 것이다. 미국 공개 번호 20150335708은 중간 돌기 뉴런의 변형 방법에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 그러나, 뇌에 널리 퍼진 전달을 나타내는 양식에 대하여 포함하는, 헌팅턴병의 진단, 연구, 치료 및/또는 예방 방법에 대한 요구가 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 요약

[0015] 헌팅턴병의 진단, 예방 및/또는 치료 방법 및 조성물이 본 명세서에서 개시된다. 특히, (Htt 발현을 억제하는) Htt 리프레서를 포함하는, 헌팅턴 질환을 치료하기 위해 HD Htt 대립형질의 변형 (*예를 들면,* 발현 조절) 방법 및 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 본 명세서에서 기재된 조성물 (Htt 리프레서)는, 예를 들어 세포 사망 감소, 세포자멸사 감소, 세포 기능 (대사) 증가 및/또는 대상체에서 운동 결핍 감소에 의해 대상체에서 치료 이점을 제공한다. 영장류 뇌에서 2방향성 축삭 운반을 허용하는 방법 및 조성물이 또한 제공된다. 놀랍게도 및 예상외로, 본 발명자들은, 사용된 다른 AAV 혈청형과 달리, AAV9가, AAV9 투여의 부위에서 먼 뇌 영역까지 전행성 및 역행성 축삭 운반을 포함하는, 뇌 전반에 걸쳐 널리 퍼진 전달을 나타내는 것을 발견하였다. 따라서, Htt 유전자에 결합하는 비-자연 발생 징크 핑거 단백질, F1 내지 F5 정렬된5 징크 핑거 도메인을 포함하는 징크 핑거 단백질이 본 명세서에서 기재되고, 여기서 상기 징크 핑거 도메인은 표 1의 단일 열로 보여진 인식 나선 영역 서열을 포함한다.

[0016] 따라서, 일 측면에서, 조작된 (비-자연 발생) Htt 리프레서가 제공된다. 리프레서는 HD 대립형질 (예를 들면, Htt)의 발현을 조절하는 시스템 (예를 들면, 징크 핑거 단백질, TAL 효과기 (TALE) 단백질 또는 CRISPR/dCas-TF)를 포함할 수 있다. 조작된 징크 핑거 단백질 또는 TALEs는 DNA 결합 도메인 (*예를 들면,* 인식 나선 또는 RVDs)가 사전-선택된 표적 부위에 결합하기 위해 (*예를 들면,* 선택 및/또는 합리적인 디자인에 의해) 변경된 비-자연 발생 징크 핑거 또는 TALE 단백질이다. 본 명세서에서 기재된 임의의 징크 핑거 단백질은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 초과 징크 핑거를 포함할 수 있고, 각각의 징크 핑거는 선택된 서열(들) (*예를 들면,* 유전자(들))에서 표적 하위부위에 결합하는 인식 나선을 갖는다. 유사하게, 본 명세서에서 기재된 임의의 TALE 단백질은 TALE RVDs의 임의의 수를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 RVD는 비-특이적 DNA 결합을 갖는다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인식 나선 (또는 RVD)는 비-자연 발생이다. 특정 구현예에서, 징크 핑거 단백질은 45643 또는 46025 (표 1) 지정된 단백질에서 인식 나선을 갖는다. 특정 구현예에서, 리프레서는 전사 억제

도메인에 작동가능하게 연결된 DNA-결합 도메인 (ZFP, TALE, 단일 가이드 RNA)를 포함한다. 일부 구현예에서 이들 ZFP-TFs, CRISPR/dCas-TFs 또는 TALE-TFs는 DNA에 결합된 경우 다량체화를 허용하는 단백질 상호작용 도메인 (또는 "이량체화 도메인")을 포함한다.

[0017] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 징크 핑거 단백질 (ZFPs), CRISPR/Cas 시스템의 Cas 단백질 또는 TALE 단백질은 융합 단백질의 일부로서 조절 도메인 (또는 기능성 도메인)과 작동가능한 연결로 배치될 수 있다. 기능성 도메인은, 예를 들어, 전사 활성화 도메인, 전사 억제 도메인 및/또는 뉴클레아제 (절단) 도메인일 수 있다. DNA-결합 도메인과 함께 사용을 위하여 어느 한쪽 활성화 도메인 또는 억제 도메인 선택에 의해, 상기 분자는 유전자 발현을 활성화 또는 억제시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이체 Htt 발현을 하향-조절하는데 사용될 수 있는 전사 억제 도메인에 융합된 본 명세서에서 기재된 바와 같이 돌연변이체 Htt에 표적화된 ZFP, dCas 또는 TALE를 포함하는 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 야생형 Htt 대립형질을 상향-조절할 수 있는 전사 활성화 도메인에 융합된 야생형 Htt 대립형질에 표적화된 ZFP, CRISPR/Cas 또는 TALE를 포함하는 융합 단백질이 제공된다. 특정 구현예에서, 조절 도메인의 활성은 외인성 작은 분자 또는 리간드에 의해 조절되어 이로써 세포의 전사 장치와 상호작용은 외인성 리간드의 부재하에 발생하지 않을 것이고, 한편 다른 구현예에서, 외인성 작은 분자 또는 리간드는 상호작용을 예방한다. 상기 외부 리간드는 전사 장치와 ZFP-TF, CRISPR/Cas-TF 또는 TALE-TF의 상호작용의 정도를 제어한다. 조절 도메인(들)은, 1종 이상의 ZFPs 사이, dCas 또는 TALEs, 1종 이상의 ZFPs에 관계없이, dCas 또는 TALEs 및 이들의 임의의 조합을 포함하는, 1종 이상의 ZFPs. dCas 또는 TALEs의 임의의 부분(들)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본 명세서에서 기재된 임의의 융합 단백질은 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0018] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 조작된 DNA 결합 도메인은 융합 단백질의 일부로서 뉴클레아제 (절단) 도메인과 작동가능한 연결로 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제는 Ttago 뉴클레아제를 포함한다. 다른 구현예에서, 뉴클레아제 시스템 예컨대 CRISPR/Cas 시스템은 DNA에서 표적 위치에 뉴클레아제를 표적하기 위해 특이적 단일 가이드 RNA와 함께 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 뉴클레아제 및 뉴클레아제 융합은 줄기 세포 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 인간 배아 줄기 세포 (hESC), 간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 뉴런 줄기 세포내 돌연변이체 Htt 대립형질 표적화에 이용될 수 있고 여기서 뉴클레아제 융합의 상기 활성은 CAG 반복부의 야생형 수를 함유하는 Htt 대립형질을 초래할 것이다. 따라서, 본 명세서에서 기재된 임의의 Htt 리프레서는 이량체화 도메인 및/또는 기능성 도메인 (*예를 들면,* 전사 활성화 도메인, 전사 억제 도메인 또는 뉴클레아제 도메인)을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 세포 (*예를 들면,* 줄기 세포)를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0019] 더욱 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 1종 이상의 DNA 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 (*예를 들면,* AAV 또는 Ad) 벡터 및/또는 비-바이러스 (*예를 들면,* 플라스미드 또는 mRNA 벡터)에서 운반된다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이 이들 폴리뉴클레오타이드 (*예를 들면,* AAV 벡터)를 포함하는 숙주 세포 및/또는 폴리뉴클레오타이드, 단백질 및/또는 숙주 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다.

[0020] 다른 측면에서, 본 발명은 표적 세포에 공여체 핵산의 전달을 포함한다. 공여체는 뉴클레아제(들)을 인코딩하는 핵산에 앞서, 이후, 또는 상기와 함께 전달될 수 있다. 공여체 핵산은 세포의 게놈, 예를 들어, 내인성 유전자좌에 통합되는 외인성 서열 (이식유전자)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공여체는 표적화된 절단 부위와 상동성의 영역에 의해 측접된 전장 유전자 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공여체는 상동성 영역이 부족하고 상동성 독립적인 기전 (즉 NHEJ)를 통해 표적 유전자좌에 통합된다. 공여체는 임의의 핵산 서열, 예를 들어, 뉴클레아제-유도된 이중-가닥 절단의 상동성-관련된 치유의 기질로서 사용될 때, 내인성 염색체 유전자좌 또는, 대안적으로 (또는 게다가), 창출되는 (*예를 들면,* 전사 인자 결합 부위를 제거하는 점 돌연변이) 내인성 유전자좌의 신규한 대립유전자에서 공여체-지정된 결실이 생성되도록 하는 핵산을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 공여체 핵산은 통합이 유전자 정정 이벤트, 또는 표적화된 결실을 유발시키는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0021] 일부 구현예에서, DNA 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 mRNA이다. 일부 측면에서, mRNA는 화학적으로 변형될 수 있다 (*참고 예를 들면* Kormann 등, (2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-157). 다른 측면에서, mRNA는 ARCA 캡을 포함할 수 있다 (참고 미국 특허 7,074,596 및 8,153,773). 추가 구현예에서, mRNA는 비변형된 및 변형된 뉴클레오타이드의 혼합물을 포함할 수 있다 (참고 미국 특허 공개 2012-0195936).

[0022] 더욱 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 전달 벡터가 제공

된다. 특정 구현예에서, 벡터는 아데노바이러스 벡터 (*예를 들면*, Ad5/F35 벡터), 통합 능숙한 또는 통합-불량성 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 (LV), 또는 아데노바이러스 관련된 바이러스 벡터 (AAV)이다. 특정 구현예에서, AAV 벡터는 AAV6 또는 AAV9 벡터이다. 따라서, 아데노바이러스 (Ad) 벡터, LV 또는 적어도 하나의 뉴클레아제 (ZFN 또는 TALEN)을 인코딩하는 서열 및/또는 표적 유전자에 표적화된 통합용 공여체 서열을 포함하는 아데노바이러스 관련 바이러스 벡터 (AAV)가 또한 본 명세서에서 제공된다. 특정 구현예에서, Ad 벡터는 키메라성 Ad 벡터, 예를 들어 Ad5/F35 벡터이다. 특정 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 인테그라제-불량성 렌티바이러스 벡터 (IDLV) 또는 통합 능숙한 렌티바이러스 벡터이다. 특정 구현예에서 벡터는 VSV-G 엔빌로프, 또는 다른 엔빌로프로 위형화된다.

[0023] 추가적으로, 핵산 및/또는 단백질 (*예를 들면*, ZFPs, Cas 또는 TALEs 또는 ZFPs, Cas 또는 TALEs를 포함하는 융합 단백질)을 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다. 예를 들어, 특정 조성물은, 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 희석제와 조합된, 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 명세서에서 기재된 ZFPs, Cas 또는 TALEs 중 하나를 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 여기서 상기 조절 서열은 세포에서 핵산의 발현을 허용한다. 특정 구현예에서, 인코딩된 ZFPs, CRISPR/Cas 또는 TALEs는 HD Htt 대립형질에 특이적이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 HD Htt 대립형질을 조절하는 ZFPs, CRISPR/Cas 또는 TALEs 그리고 신경친화성 인자를 조절하는 ZFPs, CRISPR/Cas 또는 TALEs를 포함한다. 단백질 기반 조성물은 더 많은 ZFPs 중 하나를 포함한다. 본 명세서에서 개시된 바와 같은 CRISPR/Cas 또는 TALEs 그리고 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 희석제.

[0024] 더욱 또 다른 측면에서 본 명세서에서 기재된 바와 같이 임의의 단백질, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 조성물을 포함하는 단리된 세포가 또한 제공된다.

[0025] 또 다른 측면에서, 세포 (예를 들면, 대상체의 뇌, 예를 들면, 선조체에서 시험관내 또는 생체내 뉴런 세포)에서 Htt 유전자의 발현의 변형 방법으로서, 세포에 본 명세서에서 기재된 바와 같이 1종 이상의 단백질, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 명세서에서 기재된다. Htt 유전자는 적어도 하나의 야생형 및/또는 돌연변이체 Htt 대립형질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, Htt 발현은 억제된다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 방법 및 조성물 (단백질, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 세포)를 이용하는 헌팅턴병의 치료 및/또는 예방 방법이 본 명세서에서 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질이 바이러스 벡터, 비-바이러스 벡터 (*예를 들면*, 플라스미드) 및/또는 이들의 조합을 이용하여 전달될 수 있는 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 ZFP 또는 TALE를 포함하는, 또는 본 발명의 ZFNs, TALENs, Ttago 또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템으로 변경된 줄기 세포 집단을 포함하는 조성물을 포함한다. 대상체는 적어도 하나의 돌연변이체 및/또는 야생형 Htt 대립형질을 포함할 수 있다.

[0027] 더욱 추가 측면에서, AAV (*예를 들면*, AAV9) 벡터를 이용하는 대상체의 뇌에 Htt의 리프레서의 전달 방법이 여기에서 기재된다. 캐뉼라의 이용을 통해 포함하는 임의의 적당한 수단에 의해 임의의 뇌 영역, 예를 들어, 선조체 (*예를 들면*, 조가비핵)에 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 전달은 척추강내 공간에 직접적인 주사를 통한다. 추가 구현예에서, 정맥내 주사를 통한 전달. AAV9 벡터는, 직접적으로 투여되지 않은 벡터에 전행성 및 역행성 축삭 운반을 통해 포함하는, 대상체의 뇌에 리프레서의 널리 퍼진 전달을 제공한다 (*예를 들면*, 조가비핵에 전달은 다른 구조 예컨대 피질, 흑질, 시상, 등에 전달을 초래한다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간이고 다른 구현예에서, 대상체는 비-인간 영장류이다.

[0028] 따라서, 다른 측면에서, 대상체에서 HD의 예방 및/또는 치료 방법으로서, 대상체에 돌연변이체 Htt 대립형질의 리프레서 투여를 포함하는 방법이 본 명세서에서 기재된다. 리프레서는 (*예를 들면*, 바이러스 (*예를 들면*, AAV) 및/또는 비-바이러스 벡터 (*예를 들면*, 플라스미드 및/또는 mRNA)를 이용하여 폴리뉴클레오타이드 형태로, 단백질 형태로 및/또는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 (*예를 들면*, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 폴리뉴클레오타이드, AAV 벡터, 단백질 및/또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)을 통해 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 리프레서는 대상체의 CNS (*예를 들면*, 조가비핵)에 투여된다. 리프레서는, 비제한적으로, HD를 가진 대상체의 HD 뉴런내 Htt 응집물의 형성 감소; 뉴런 또는 뉴런의 집단 (*예를 들면*, HD 뉴런 또는 HD 뉴런의 집단)에서 세포 사망 감소; 및/또는 HD 대상체에서 운동 결손 (*예를 들면*, 클라스핑) 감소를 포함하는, 치료 이점을 제공할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법에서, 돌연변이체 Htt 대립형질의 리프레서는 ZFP-TF, 예를 들어 돌연변이체 Htt 대립형질 및 전사 억제 도메인 (*예를 들면*, KOX, KRAB, 등)에 특이적으로 결합하는 ZFP를 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 다른 구현예에서, 돌연변이체 Htt 대립형질의 리프레서는 TALE-TF, 예를 들어 돌연변이체 Htt

대립형질 및 전사 억제 도메인 (*예를 들면,* KOX, KRAB, 등)에 특이적으로 결합하는 TALE 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이체 Htt 대립형질 리프레서는 Cas 단백질에서 뉴클레아제 도메인이 불활성화되어 이로써 단백질이 더 이상 DNA를 절단시키지 않는 CRISPR/Cas-TF이다. 수득한 Cas RNA-유도된 DNA 결합 도메인은 전사 리프레서 (*예를 들면* KOX, KRAB 등)에 융합되어 돌연변이체 Htt 대립형질을 억제시킨다. 더욱 추가 구현예에서, 리프레서는 절단 및 이로써 돌연변이체 Htt 대립형질 불활성화에 의해 돌연변이체 Htt 대립형질을 억제시키는 뉴클레아제 (*예를 들면,* ZFN, TALEN 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 뉴클레아제는 뉴클레아제에 의한 절단 이후 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)을 통해 삽입 및/또는 결실 ("인델")을 도입한다. 다른 구현예에서, 뉴클레아제는 (상동성 또는 비-상동성 관련된 방법에 의해) 공여체 서열을 도입하고, 여기에서 공여체 통합은 돌연변이체 Htt 대립형질을 불활성화시킨다.

[0030] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법에서, 리프레서는 대상체 (*예를 들면,* 뇌)에 단백질, 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질 및 폴리뉴클레오타이드의 임의의 조합으로서 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 리프레서(들)은 AAV (*예를 들면,* AAV9) 벡터를 이용하여 전달된다. 다른 구현예에서, 리프레서의 적어도 하나의 성분 (*예를 들면, CRISPR/Cas 시스템의* sgRNA)는 RNA 형태로 전달된다. 다른 구현예에서, 리프레서(들)은 본 명세서에서 기재된 발현 작제물의 임의의 조합, 예를 들어 하나의 발현 작제물 (*예를 들면,* AAV 예컨대 AAV9)에서 하나의 리프레서 (또는 이의 부분) 그리고 별도의 발현 작제물 (AAV 또는 다른 바이러스 또는 비-바이러스 작제물)에서 하나의 리프레서 (또는 이의 부분)을 이용하여 전달된다.

[0031] 더욱이, 본 명세서에서 기재된 임의의 방법에서, 리프레서는 요망된 효과를 제공하는 임의의 농도 (용량)으로 전달될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 리프레서는 10,000 - 500,000 벡터 게놈/세포 (또는 그사이 임의의 값)에서 아데노-관련 바이러스 벡터를 이용하여 전달된다. 특정 구현예에서, 리프레서는 250 내지 1,000 (또는 그사이 임의의 값) MOI에서 렌티바이러스 벡터를 이용하여 전달된다. 다른 구현예에서, 리프레서는 150-1,500 ng/100,000 세포 (또는 그사이 임의의 값)에서 플라스미드 벡터를 이용하여 전달된다. 다른 구현예에서, 리프레서는 150-1,500 ng/100,000 세포 (또는 그사이 임의의 값)에서 mRNA로서 전달된다.

[0032] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법에서, 방법은 대상체의 1종 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립형질의 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 또는 약 95% 이상 억제를 산출할 수 있다.

[0033] 추가 측면에서, 본 명세서에서 기재된 본 발명은 1종 이상의 Htt-조절 전사 인자, 예컨대 1종 이상의 징크 핑거 단백질 (ZFP TFs), TALEs (TALE-TF), 및 CRISPR/Cas-TFs 예를 들어, ZFP-TFs, TALE-TFs 또는 CRISPR/Cas-TFs를 포함하는 Htt-조절 전사 인자를 포함한다. 특정 구현예에서, Htt-조절 전사 인자는 대상체의 1종 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립형질의 발현을 억제시킬 수 있다. 억제는 대상체의 미치료된 (야생형) 뉴런과 비교된 경우 대상체의 1종 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립형질의 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 또는 약 95% 이상 억제일 수 있다. 특정 구현예에서, Htt-조절 전사 인자는 본 명세서에서 기재된 1종 이상의 방법을 달성하는데 사용될 수 있다.

[0034] 일부 구현예에서, 치료 효능은 명백한 임상 증상의 분석을 위하여 통일된 헌팅턴병 평가 척도 (UHDRS) (헌팅턴 연구 그룹 (1996) *Mov Disord* 11(2):136-142)를 이용하여 측정된다. 다른 구현예에서, 환자내 효능은 PET 및 MRI 이미지형성을 이용하여 측정된다. 일부 구현예에서, 돌연변이체 Htt 조절 전사 인자로 치료는 명백한 임상 증상의 임의의 추가 발생을 예방하고 뉴런 기능성의 임의의 추가 손실을 예방한다. 다른 구현예에서, 돌연변이체 Htt 조절 전사 인자로 치료는 임상 증상을 개선하고 뉴런 기능을 개선한다.

[0035] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 1종 이상의 AAV9 Htt-조절물질 (*예를 들면,* 리프레서) 및/또는 Htt-조절물질 (또는 이의 성분)을 인코딩하는 및/또는 상기의 성분을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 키트는 세포 (*예를 들면,* 뉴런), 시약 (*예를 들면,* CSF에서, 예를 들어 mHtt 단백질 검출 및/또는 정량화용) 및/또는, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 방법을 포함하는, 사용 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 따라서, 본 개시내용은, 비제한적으로, 하기 넘버링된 구현예를 포함한다:

[0037] 1. Htt 유전자에 결합하는 비-자연 발생 징크 핑거 단백질에 있어서, F1 내지 F5 정렬된 5 징크 핑거 도메인을 포함하는 상기 징크 핑거 단백질로서, 상기 징크 핑거 도메인이 표 1의 단일 열에서 보여진 상기 인식 나선 영역 서열을 포함하는, 징크 핑거 단백질.

[0038] 2. DNA에 결합된 경우 징크 핑거 단백질의 다량체화를 허용하는 이량체화 도메인을 추가로 포함하는, 1의 Htt 리프레서.

[0039] 3. 1 또는 2의 징크 핑거 단백질 및 기능성 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

[0040] 4. 3에 있어서, 상기 기능성 도메인이 전사 활성화 도메인, 전사 억제 도메인, 및 뉴클레아제 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는, 융합 단백질.

[0041] 5. 1 내지 2의 1종 이상의 징크 핑거 단백질 또는 3 또는 4의 1종 이상의 융합 단백질을 인코딩하는, 폴리뉴클레오타이드.

[0042] 6. 5의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, AAV 벡터.

[0043] 7. 6에 있어서, 상기 벡터가 AAV9 벡터인, AAV 벡터.

[0044] 8. 1 내지 2의 1종 이상의 징크 핑거 단백질 또는 3 또는 4의 1종 이상의 융합 단백질, 5에 따른 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 6 또는 7에 따른 1종 이상의 AAV 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

[0045] 9. 1 내지 2의 1종 이상의 징크 핑거 단백질 또는 3 또는 4의 1종 이상의 융합 단백질, 청구항 5에 따른 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 6 또는 7에 따른 1종 이상의 AAV 벡터를 포함하는, 약제학적 조성물.

[0046] 10. 세포에서 Htt 유전자의 발현의 변형 방법으로서, 5에 따른 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 6 또는 7에 따른 1종 이상의 AAV 벡터를 세포에 투여하는 것을 포함하는, 방법.

[0047] 11. 10에 있어서, 상기 Htt 유전자가 적어도 하나의 돌연변이체 대립형질을 포함하는, 방법.

[0048] 12. 10에 있어서, 상기 Htt 유전자가 야생형인, 방법.

[0049] 13. 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질이 억제 도메인을 포함하고 Htt 유전자의 발현이 억제되는, 방법.

[0050] 14. 10 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 뉴런 세포인, 방법.

[0051] 15. 14에 있어서, 상기 뉴런 세포가 뇌에 있는, 방법.

[0052] 16. 15에 있어서, 상기 뉴런 세포가 상기 뇌의 상기 선조체에 있는, 방법.

[0053] 17. 필요로 하는 대상체에서 헌팅턴병의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 5에 따른 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 6 또는 7에 따른 1종 이상의 AAV 벡터를 필요로 하는 상기 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 방법.

[0054] 18. 세포에서 Htt 유전자의 발현의 변형 방법으로서, 상기 방법이 1종 이상의 AAV9 벡터를 세포에 투여하는 것을 포함하고, 상기 AAV9 벡터가 1종 이상의 Htt 리프레서를 인코딩하는, 방법.

[0055] 19. 18에 있어서, 상기 Htt 유전자가 적어도 하나의 돌연변이체 대립형질을 포함하는, 방법.

[0056] 20. 18에 있어서, 상기 Htt 유전자가 야생형인, 방법.

[0057] 21. 18 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질이 억제 도메인을 포함하고 Htt 유전자의 발현이 억제되는, 방법.

[0058] 22. 18 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 뉴런 세포인, 방법.

[0059] 23. 22에 있어서, 상기 뉴런 세포가 뇌에 있는, 방법.

[0060] 24. 23에 있어서, 상기 뉴런 세포가 상기 뇌의 상기 선조체에 있는, 방법.

[0061] 25. 필요로 하는 대상체에서 헌팅턴병의 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 방법이 1종 이상의 AAV9 벡터를 필요로 하는 상기 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 상기 AAV9 벡터가 1종 이상의 Htt 리프레서를 인코딩하는, 방법.

[0062] 이들 및 다른 측면은 전체적으로 개시내용의 면에서 숙련가에 쉽게 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0063] **도 1A 내지 1J**는 NHP 조가비핵에 AAV9 벡터의 주입 이후 결과를 도시하는 이미지이다. 2 정상 비인간 영장류(지정된 NHP-1 및 NHP-2)의 양측 조가비핵에 AAV9-GFP (100 μL)의 MRI-유도된 주입용 비교 패널은 도 1A 및 1B에서 보여지고 각각의 대상체의 3차원 재작제물은 도 1C 및 1D에서 보여진다. NHP-1에 대하여 대략 850 μL 및 NHP-2의 625 μL 측정된 청색으로 표지된, 각각의 조가비핵 (n=4)에 대하여 재작제된 용적. 각각의 주입에

대하여 대략 350 μL로 분포된, 오렌지으로 표지된, AAV9-GFT 입자 및 킬레이트화된 가돌리늄 이미지형성 시약을 함유하는 주입액. 도 1E, 1F 및 1G는 NHP-1의 캐늘라 탄도 경로의 관상, 시상 좌측 및 시상 우측 도 (각각)을 보여주고 도 1H, 1I 및 1J는 NHP-2에 대하여 캐늘라 탄도 경로의 관상, 시상 좌측 및 시상 우측 도 (각각)을 보여준다.

도 2A 내지 2H는 NHPs의 조가비핵에서 AAV9-매개된 GFP 발현 및 타고난 면역 상태를 보여준다. 도 2A 및 2B는 조가비핵 이내 GFP 염색을 보여준다. 박스표시된 영역의 고 배율 이미지는 아래 보여지고 벡터의 어느 한쪽 고용량 ("HD", 좌측 반구 1.5 x 10^{13} vg/mL) 또는 저용량 ("LD", 우측 반구, 1.5 및 10^{12} vg/mL) 투여된 조가비핵 내 NeuN-양성 세포를 묘사한다. 도 2C 및 2D는 백색으로 보여진 형질도입의 기본 영역 (PAT)을 도시하는 그래프이고 GFP-양성 신호 "외부" 조가비핵 이내 영역은 "oPAT"이고 회색으로 보여진다. 조가비핵 이내 원상태 대조군 NHPs와 함께 수행된, PAT 및 oPAT에서 3 관상 식물내 NeuN-양성 세포의 카운트는 저 및 고 용량 반구가 비교된 경우 NeuN 신호에서 검출가능한 차이를 보여주지 않았다. 공-국재화된 GFP-양성/NeuN-양성 세포의 카운트는 형질도입이 oPAT에서 저 내지 무 효율과 함께 PAT에서 약 74% 효율적인 것을 드러냈다. 데이터는 세포의 평균 수 ±SD로서 표시된다. PAT 및 oPAT 내에 형질도입된 세포에 대하여 <0.01의 P-값 (*), Wilcoxon 징후-등급화된 S 시험. 도 2A 내지 2D용 기준자: 50 μM. 도 2E, 2F, 2G 및 2H는 타고난 면역 상태의 원위 (도 2E 및 2F) 및 근위 (도 2G 및 2H) 비교를 보여준다. 양성으로 염색된 MHCII (도 2E 및 2G, 50 ㎛의 기준자) 및 Iba1 활성화 (도 2F 및 2H, 200 ㎛의 기준자)의 상향조절은 원위 부위와 비교에서 주입의 부위에 근위로 보여진다.

지시된 표적 (NeuN, GFAP, Iba1 적색), GFP (녹색) 및 이중-표지된 면역형광 (황색)의 조가비핵내 주입의 부위에서 AAV9 벡터의 세포 굴성을 보여주는 **도 3A 내지 3F**는 이미지화된다. 도 3A, 3B 및 3C는 NHP-1에서 결과를 보여주고 도 3D, 3E 및 3F는 NHP-2에서 결과를 보여준다. 이중-표지 면역형광은 양쪽 NeuN-양성 및 GFAP-양성 세포 바디에서 GFP 발현을 드러냈다. 그에 반해서, 캡시드는 Iba1-양성 세포 바디를 형질도입하지 않았고, AAV9가 미세아교를 형질도입한 것처럼 보이지 않는 것을 나타낸다. 기준자: 50 ㎛.

도 4A 및 4B는 조가비핵부터 피질까지 AAV9의 역행성 축삭 운반을 보여준다. 캐늘라 트랙에 NHP-1 (도 4A) 및 NHP-2 (도 4B) 전측 (i 및 ii) 및 후측 (iii 및 iv)로부터 가공된 관상 뇌 부문은 피질-선조체 투사를 따라 AAV9-GFP의 강력한 축삭 운반을 보여주었다. 흑색 제곱 표지된 "i" "ii" "iii" 및 "iv" 내에 영역의 고 배율 이미지는 반대측에 대해 용량 효과를 나타내는 고-용량 벡터를 수용하는 반구 이내 섬유 및 피질 세포 바디에서 증가된 GFP 발현을 보여준다. 기준자: 200 ㎛.

도 5A 및 5B는 원위 영역에 축삭 운반을 묘사한다. 도 5A는 NHP-1로부터 결과를 보여주고 도 5B는 NHP-2로부터 결과를 보여준다. 조가비핵에 AAV9의 주입은 조가비핵으로부터 효과를 수용하도록 공지된 많은 원위 영역에서 GFP-양성 세포를 초래하였다. 캐늘라 트랙 12 ㎜ 후측에 각각의 관상 부문의 근사 위치로 항-GFP 면역조직화학이 보여진다. 아래 고 배율 이미지는 담창구 ("GP"), 시상, 시상하 뉴클레아제 ("STN"), 내측 전뇌 다발 ("MFB") 및 흑질 ("SN")의 좌측 및 우측 반구에 대응한다. 기준자: 500 μM.

도 6A 및 6B는 흑질 그물부 및 치밀부에 AAV의 축삭 운반을 묘사한다. 도 6A는 NHP-1에서 결과를 도시하고 도 6B는 NHP-2에서 결과를 도시한다. 이중-표지 면역형광 (황색)은 흑질 치밀부 ("Snc")의 GFP-양성 (녹색) 및 티로신 하이드록실라제-양성 (적색) 세포 코디 및 섬유에 대하여 그리고 그물부(parts reticulata) ("SNr")의 섬유에서 가시적이다. 티로신 하이드록실라제 ("TH") 염색은 도파민작용성 뉴런을 확인한다. SNr 및 SNc에서 세포 바디의 형질도입은 양쪽 전행성 및 역행성 축삭 운반 각각을 입증한다. GFP의 증가된 발현은 동측 (고-용량) 반구 및 반대측 (저-용량) 반구 사이 관측되었다. 기준자: 500 ㎛.

도 7은 영장류 뇌에서 뉴런 연결 경로를 도시하는 도식이다. 고용량 (좌) 및 저용량 (우) NHP 뇌 반구 사이 설명된 전행성 및 역행성 수송 시스템 및 용량 효과. 회색으로 그늘진, 선조체 주사 부위 ("Str")에서 AAV9-GFP 바이러스 입자는 피질 ("Ctx"), 시상 ("Th") 및 흑질 치밀부(parts compacta) ("SNc")를 포함하는 2차 뇌 영역에 역행성으로 수송되었다. 바이러스 입자의 전행성 수송은 그물부(parts reticulate) ("SNr")를 표적화하였다. 시상하 핵 ("STN")에 축삭 운반으로 차례로 이어진 담창구 ("GP")에 말초혈관 확산 또는 전행성 축색돌기 수단에 의한 수송. 뉴런 GFP-양성 섬유의 존재는 회색 획에 의해 표시되고 GFP-양성 세포 바디는 흑색 점에 의해 표시된다. 형질도입된 세포 바디의 부재는 비어있는 원에 의해 표시된다.

도 8 은 어느 한쪽 ZFP 46025, ZFP 45643 또는 GFP 대조군으로 치료된 HD 환자로부터 섬유아세포에서 어느 한쪽 야생형 Htt 유전자 (회색 막대, CAG18) 또는 돌연변이체 Htt 유전자 (흑색 막대, CAG45)의 발현 프로파일을 보여주는 그래프이다. 데이터는 야생형 Htt 대립형질의 발현이 모든 샘플에서 상당히 일정한 한편, 돌연변이체 Htt-특이적 ZFPs로 치료된 세포가 ZFP mRNA의 더 많은 용량에서 돌연변이체 Htt의 발현을 감소시켰다는 것을 입

증한다

도 9 는 어느 한쪽 ZFP 46025, ZFP 45643 또는 GFP 대조군으로 치료된 HD 환자로부터 섬유아세포에서 어느 한쪽 야생형 Htt 유전자 (회색 막대, CAG21) 또는 돌연변이체 Htt 유전자 (흑색 막대, CAG38)의 발현 프로파일을 보여주는 그래프이다. 데이터는 야생형 Htt 대립형질의 발현이 모든 샘플에서 상당히 일정한 한편, 돌연변이체 Htt-특이적 ZFPs로 치료된 세포가 ZFP mRNA의 더 많은 용량에서 돌연변이체 Htt의 발현을 감소시켰다는 것을 입증한다

도 10 은 HD 배아 줄기 세포로부터 분화된 뉴런에서 어느 한쪽 야생형 Htt 유전자 (회색 막대, CAG17) 또는 돌연변이체 Htt 유전자 (흑색 막대, CAG48)의 발현 프로파일을 보여주는 그래프이다. 데이터는 ZFPs를 인코딩하는 mRNA의 더 많은 용량에서 돌연변이체 Htt 유전자가 억제되었고 반면에 야생형 Htt 대립형질은 억제되지 않았다는 것을 입증한다.

도 11A 및 11B 는 이용하는 ZFPs가 어느 한쪽 AAV6 또는 AAV9 바이러스 벡터를 이용하여 전달된 CAG17/48 분화된 뉴런에서 Htt 억제를 보여주는 그래프이다. ZFP 46025, 45643 또는 GFP 대조군을 인코딩하는 AAV6 벡터 (도 11A) 또는 AAV9 벡터 (도 11B)는 반복하여 HD 배아 줄기 세포 (ESC) GENEA020 (GENEA/CHDI)로부터 분화된 뉴런을 감염시키는데 사용되었다. 데이터는 돌연변이체 Htt 대립형질이 모의 감염 프로토콜을 통해 투입된 것 또는 GFP 대조군으로 치료된 세포와 비교된 경우 AAV6 또는 AAV9에 의해 어느 한쪽으로 전달된 경우 ZFPs에 의해 억제되었던 것을 입증한다.

도 12A 및 12B 는 HD 뉴런의 표현형 특징에서 ZFPs로 치료의 효과를 도시하는 그래프이다. 도 12A는 뉴런에서 ATP 수준이 VENUS 대조군으로 치료된 세포 또는 모의 치료된 세포에서 보다 ZFPs로 치료된 HD 뉴런에서 더 높다는 것을 입증한다. 비교하자면, 야생형 뉴런은 ZFP 치료로부터 임의의 효과를 보여주지 않는다. 도 12B는 TUNEL 양성 (세포자멸사용 마커)인 세포의 퍼센트를 보여주고, ZFPs로 치료된 HD 뉴런이 대조군 샘플보다 TUNEL 양성 세포의 더 적은 수를 갖는다는 것을 입증한다. 비교하기 위해, 그래프는 야생형 뉴런으로부터 데이터를 또한 도시한다.

도 13A 내지 13C 는 ZFP 46025, ZFP 45643 또는 GFP 대조군을 인코딩하는 AAV9 벡터의 선조체내 주사에 의해 HdhQ50/Hdh+ (Q50) 이종접합성 마우스에서 시험된 ZFPs의 *생체내* 활성을 도시하는 그래프이다. Q50 마우스는 내인성 마우스 Hdh 유전자의 엑손 1이 48 CAGs를 가진 인간 Htt 유전자의 엑손 1로 대체되었던 녹-인 대립형질을 함유한다. 주사 이후 5 주에, 치료된 선조체의 대립형질-특이적 qRT-PCR 분석은 ZFP 45643 및 ZFP 46025가 비히클 주사된 대조군에 비하여 돌연변이체 Htt 대립형질 (Q50)을 79% 및 74%, 각각 만큼 억제시켰고; 야생형 대립형질 (Q7)이 어느 한쪽 ZFP에 의해 조절되지 않았다는 것을 보여주었다 (도 13A 및 13B). ZFP 45643의 활성은 주사 이후 12 주에 또한 시험되었고 (도 13C), 돌연변이체 Htt (Q50)의 상당한 억제 (70%)는 야생형 대립형질 (Q7)의 억제 없이 관측되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 헌팅턴병 (HD) 검출, 질환 진행 모니터링, 치료 및/또는 예방용 조성물의 널리 퍼진 CNS 전달 조성물 및 방법이 본 명세서에서 개시된다. 특히, 본 명세서에서 기재된 조성물 및 방법은, 전달의 부위를 넘어서 기능성 Htt 리프레서의 확산을 제공하는, Htt 리프레서의 전달용 AAV9 벡터를 이용한다. Htt 리프레서 (*예를 들면,* Htt-조절 전사 인자, 예컨대 징크 핑거 단백질 (ZFP TFs), TALEs (TALE-TF), 또는 CRISPR/Cas-TFs 예를 들어, 돌연변이체 Htt 대립형질의 발현을 억제시키는 ZFP-TFs, TALE-TFs 또는 CRISPR/Cas-TFs를 포함하는 Htt-조절 전사 인자)는 CNS를 변형시켜 이로써 HD의 효과 및/또는 증상이, 예를 들어 HD 뉴런에서 Htt의 응집 감소에 의해, HD 뉴런 에너지학 증가 (*예를 들면,* ATP 수준 증가)에 의해, HD 뉴런에서 세포자멸사 감소에 의해 및/또는 HD 대상체에서 운동 결손 감소에 의해 감소 또는 제거된다.

[0065] **일반**

[0066] 방법의 실시, 뿐만 아니라 본 명세서에서 개시된 조성물의 제조 및 용도는, 달리 나타내지 않는 한, 당해 분야의 기술 이내인 바와 같이 분자 생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 컴퓨터 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 및 관련된 분야에서 종래의 기술을 이용한다. 이들 기술은 문헌에서 완전히 설명된다. *참고,* 예를 들어, Sambrook 등 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN

ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; and METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) HumanaPress, Totowa, 1999.

[0067] **정의**

[0068] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드", 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고 선형 또는 원형 형태로, 그리고 단일- 또는 이중-가닥 형태로 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 폴리머를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위하여, 이들 용어들은 폴리머의 길에 대해 제한으로서 해석되지 않는다. 상기 용어는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체, 뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티 (*예를 들면*, 포스포로티오에이트 골격)에서 변형되는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일반적으로, 특정한 뉴클레오타이드의 유사체는 동일한 염기 짝짓기 특이성을 갖는다; *즉*, A의 유사체는 T와 염기 짝짓기할 것이다.

[0069] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 1종 이상의 아미노산이 대응하는 자연 발생 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유도체인 아미노산 폴리머에 또한 적용한다.

[0070] "결합"은 거대분자 사이 (*예를 들면*, 단백질과 핵산 사이) 서열-특이적, 비-공유 상호작용을 지칭한다. 결합 상호작용의 모든 성분은, 상호작용이 전체적으로 서열-특이적인 한, 서열-특이적일 필요가 없다 (*예를 들면*, DNA 골격에서 포스페이트 잔기와 접촉하지 않는다). 상기 상호작용은 일반적으로 10^{-6} M^{-1} 이하의 해리 상수 (K_d)를 특징으로 한다. "친화성"은 결합의 강도를 지칭한다: 증가된 결합 친화성은 더 낮은 K_d와 상관됨.

[0071] "결합 단백질"은 또 다른 분자에 비-공유적으로 결합할 수 있는 단백질이다. 결합 단백질은, 예를 들어, DNA 분자 (DNA-결합 단백질), RNA 분자 (RNA-결합 단백질) 및/또는 단백질 분자 (단백질-결합 단백질)에 결합할 수 있다. 단백질-결합 단백질의 경우에서, (호모다이머, 호모트리머, *등*을 형성하기 위해) 자체에 결합할 수 있고/있거나 상이한 단백질 또는 단백질들의 1종 이상의 분자에 결합할 수 있다. 결합 단백질은 결합 활성의 1 초과 유형을 가질 수 있다. 예를 들어, 징크 핑거 단백질은 DNA-결합, RNA-결합 및 단백질-결합 활성을 갖는다.

[0072] "징크 핑거 DNA 결합 단백질" (또는 결합 도메인)은, 구조가 아연 이온의 배위를 통해 안정화되는 결합 도메인 이내 아미노산 서열의 영역인, 1종 이상의 징크 핑거를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA를 결합시키는, 단백질, 또는 더 큰 단백질 이내 도메인이다. 용어 징크 핑거 DNA 결합 단백질은 종종 징크 핑거 단백질 또는 ZFP로 약칭된다.

[0073] "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"는 1종 이상의 TALE 반복부 도메인/유닛을 포함하는 폴리펩타이드이다. 반복부 도메인은 이의 동족 표적 DNA 서열에 TALE의 결합에 관여된다. (또한 "반복부"로 지칭된) 단일 "반복부 유닛"은 전형적으로 33-35 아미노산 길이이고 자연 발생 TALE 단백질 이내 다른 TALE 반복부 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. *참고, 예를 들면,* 미국 특허 번호 8,586,526.

[0074] "TtAgo"는 유전자 침묵화에 관여된다고 여겨진 원핵 아르고노트 단백질이다. TtAgo는 박테리아 *테르무스 테모필러스*로부터 유래된다. 참고, *예를 들면*, Swarts *등* (2014) *Nature* 507(7491):258-261, G. Sheng *등*, (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652). "TtAgo 시스템"은, 예를 들어, TtAgo 효소에 의한 절단용 가이드 DNAs 포함 요구된 모든 성분이다. "재조합"은, 비제한적으로, 비-상동성 말단 연결 (NHEJ) 및 상동성 재조합에 의한 공여체 포착을 포함하는, 2개 폴리뉴클레오타이드 사이 유전적 정보의 교환 공정을 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위하여, "상동성 재조합 (HR)"은, 예를 들어, 상동성-지향된 치유 기전을 통해 세포내 이중-가닥 절단의 치유 동안 발생하는 상기 교환의 특화된 형태를 지칭한다. 상기 공정은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 요구하고, "표적" 분자 (즉 이중-가닥 파괴를 경험한 것)의 템플레이트 치유에 "공여체" 분자를 이용하고, 공여체부터 표적까지 유전적 정보의 전달을 유발시키기 때문에, "비-교차 유전자 전환" 또는 "쇼트 트랙 유전자 전환"으로서 다양하게 공지된다. 임의의 특정한 이론에 의해 구속됨의 바램 없이, 상기 전달은 파괴된 표적과 공여체 사이 형성하는 헤테로이중나선 DNA의 미스매치 정정, 및/또는 "합성-의존적 가닥 어닐링"을 포함할 수 있고, 여기에서 공여체는 표적의 일부, 및/또는 관련된 공정이 될 유전적 정보를 재합성하는데 사용된다. 상기 특화된 HR은 표적 분자의 서열의 변경을 종종 초래하여 이로써 공여체 폴리뉴클레오타이드의 일부 또는 모든 서열이 상기 표적 폴리뉴클레오타이드에 편입된다.

[0075] 징크 핑거 결합 도메인 또는 TALE DNA 결합 도메인은, 예를 들어 자연 발생 징크 핑거 단백질의 인식 나선 영역의 (1종 이상의 아미노산을 변경하는) 공학기술을 통해 또는 TALE 단백질의 RVDs 조작에 의해 예정된 뉴클레오

타이드 서열에 결합시키기 위해 "조작"될 수 있다. 따라서, 조작된 징크 핑거 단백질 또는 TALEs는 비-자연 발생하는 단백질이다. 징크 핑거 단백질 또는 TALEs 조작 방법의 비-제한적인 예는 설계 및 선택이다. "설계된" 징크 핑거 단백질 또는 TALE는 설계/조성물이 주요하게 합리적인 기준에서 비롯하는 자연에서 발생하지 않는 단백질이다. 설계용 합리적인 기준은 현존하는 ZFP 설계 및 결합 데이터의 데이터베이스 저장 정보에서 정보 프로세싱용 컴퓨터화된 알고리즘 및 치환 규칙의 적용을 포함한다. "선택된" 징크 핑거 단백질 또는 TALE는 생산이 주로 경험적 공정 예컨대 파아지 디스플레이, 상호작용 트랩 또는 하이브리드 선택에서 비롯하는 자연에서 발견되지 않은 단백질이다. 참고, 예를 들어, 미국 특허 8,586,526; 6,140,081; 6,453,242; 6,746,838; 7,241,573; 6,866,997; 7,241,574 및 6,534,261; 참고 또한 WO 03/016496.

[0076] 용어 "서열"은, DNA 또는 RNA일 수 있는, 임의의 길이의 뉴클레오타이드 서열을 지칭하고; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있고 어느 한쪽 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 용어 "공여체 서열"은 게놈에 삽입되는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 공여체 서열은 임의의 길이, 예를 들어 2 내지 10,000 뉴클레오타이드 길이 (또는 그 사이 또는 그초과 임의의 정수 값), 바람직하게는 약 100 내지 1,000 뉴클레오타이드 길이 (또는 그사이 임의의 정수), 더 바람직하게는 약 200 내지 500 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0077] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은, 충분한 결합용 조건이 존재하면, 결합 분자가 결합할 핵산의 한 부분을 한정하는 핵산 서열이다.

[0078] "외인성" 분자는 세포에서 정상적으로 존재하지 않지만, 1종 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포에 도입될 수 있는 분자이다. "세포에서 정상 존재"는 세포의 환경 조건 및 특정한 발달성 시기에 대해 결정된다. 따라서, 예를 들어, 근육의 배아 발생 동안에만 존재하는 분자는 성인 근육 세포에 대해 외인성 분자이다. 유사하게, 열충격에 의해 유도된 분자는 비-열-충격된 세포에 대해 외인성 분자이다. 외인성 분자는, 예를 들어, 기능부전 내인성 분자의 기능화 버전 또는 정상적으로-기능화 내인성 분자의 기능부전 버전을 포함할 수 있다.

[0079] 외인성 분자는, 다른 것들 중에서, 작은 분자, 예컨대 조합 화학 공정에 의해 생성되거나, 또는 거대분자 예컨대 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지질단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체, 또는 1종 이상의 상기 분자를 포함하는 임의의 복합체일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하고, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있고; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있고; 임의의 길이일 수 있다. 핵산은 이중부위, 뿐만 아니라 삼중부위-형성 핵산을 형성할 수 있는 것을 포함한다. 참고, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,176,996 및 5,422,251. 단백질은, 비제한적으로, DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 폴리머라제, 메틸화효소, 탈메틸효소, 아세틸화효소, 탈아세틸화효소, 키나제, 포스파타제, 인테그라제, 재조합효소, 리가제, 토포이소머라제, 자이라제 및 헬리카제를 포함한다.

[0080] 외인성 분자는 내인성 분자와 분자의 동일한 유형, *예를 들면*, 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 세포, 또는 세포에서 정상적으로 존재하지 않는 염색체에 도입된 바이러스 게놈, 플라스미드 또는 에피솜 감염을 포함할 수 있다. 세포에 외인성 분자의 도입 방법은 당해 분야의 숙련가에 공지되고, 비제한적으로, 지질-매개된 전달 (즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는, 리포좀), 전기천공, 직접적인 주사, 세포 융합, 입자 폭격, 인산칼슘 공동침전, DEAE-덱스트란-매개된 전달 및 바이러스 벡터-매개된 전달을 포함한다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 분자의 동일한 유형일 수 있지만 세포가 유래되는 것보다 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 인간 핵산 서열은 마우스 또는 햄스터로부터 본래 유래된 세포주에 도입될 수 있다.

[0081] 반대로, "내인성" 분자는 특정한 환경 조건 하에 특정한 발달성 시기에 특정한 세포에서 정상적으로 존재하는 것이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아의 게놈, 엽록체 또는 다른 소기관, 또는 자연 발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가의 내인성 분자는 단백질, 예를 들어, 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.

[0082] "융합" 분자는 2 이상의 서브유닛 분자가, 바람직하게는 공유적으로 연결되는 분자이다. 서브유닛 분자는 분자의 동일한 화학적 유형일 수 있거나, 분자의 상이한 화학적 유형일 수 있다. 융합 분자의 제1 유형의 예는, 비제한적으로, 융합 단백질 (예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인과 1종 이상의 활성화 도메인 사이 융합물) 및 융합 핵산 (예를 들어, *상동* 기재된 융합 단백질을 인코딩하는 핵산)을 포함한다. 융합 분자의 제2 유형의 예는, 비제한적으로, 삼중부위-형성 핵산과 폴리펩타이드 사이 융합물, 및 좁은 홈 결합제와 핵산 사이 융합물을 포함한다. 상기 용어는 폴리뉴클레오타이드 성분이 폴리펩타이드 성분과 회합하여 기능성 분자를 형성하는 시스템 (*예를 들면,* 단일 가이드 RNA가 기능성 도메인과 회합하여 유전자 발현을 조절하는 CRISPR/Cas 시스템)을 또한 포함한다.

[0083] 세포에서 융합 단백질의 발현은 세포에 융합 단백질의 전달에서 또는 세포에 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 전달에 의해 비롯할 수 있고, 여기서 상기 폴리뉴클레오타이드는 전사되고, 상기 전사체는 번역되어, 융합 단백질을 생성한다. 트랜스-스플라이싱, 폴리펩타이드 절단 및 폴리펩타이드 결찰은 또한 세포에서 단백질의 발현에 관여될 수 있다. 세포에 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 전달 방법은 본 개시내용내 다른 곳에 나타난다.

[0084] (또한 "이량체화 도메인" 또는 "단백질 상호작용 도메인"으로 지칭된) "다량체화 도메인"은 ZFP TF 또는 TALE TF의 아미노, 카복시 또는 아미노 및 카복시 말단 영역에서 편입된 도메인이다. 이들 도메인은 다중 ZFP TF 또는 TALE TF 유닛의 다량체화를 허용하여 트리뉴클레오타이드 반복부 도메인의 더 큰 트랙이 길이의 야생형 수를 가진 더 짧은 트랙에 비하여 다량체화된 ZFP TFs 또는 TALE TFs에 의해 우선적으로 결합된다. 다량체화 도메인의 예는 류신 지퍼를 포함한다. 다량체화 도메인은 작은 분자에 의해 또한 조절될 수 있고 여기서 상기 다량체화 도메인은 작은 분자 또는 외부 리간드의 존재하에서만 또 다른 다량체화 도메인과 상호작용을 허용하도록 적절한 형태를 추정한다. 이런 식으로, 외인성 리간드는 이들 도메인의 활성을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0085] 본 개시내용의 목적을 위하여, "유전자"는 유전자 생성물을 인코딩하는 DNA 영역 (참고 *아래*), 뿐만 아니라 상기 조절 서열이 코딩한 및/또는 전사된 서열에 인접하든 아니든, 유전자 생성물의 생산을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는, 필연적으로 비제한적으로, 프로모터 서열, 종결자, 번역 조절 서열 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 유입 부위, 인핸서, 사일런서, 절연체, 경계 요소, 복제 기원, 매트릭스 부착 부위 및 유전자좌 대조군 영역을 포함한다.

[0086] "유전자 발현"은 유전자 생성물에, 유전자에서 함유된, 정보의 전환을 지칭한다. 유전자 생성물은 유전자의 직접적인 전사 생성물 (*예를 들면*, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 RNA의 임의의 다른 유형) 또는 mRNA의 번역에 의해 생산된 단백질일 수 있다. 유전자 생성물은 또한, 공정 예컨대 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화, 및 교정에 의해, 변형되는 RNAs 및, 예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 당화에 의해 변형된 단백질을 포함한다.

[0087] 유전자 발현의 "조절"은 유전자의 활성에서 변화를 지칭한다. 발현의 조절은, 비제한적으로, 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있다. 게놈 교정 (*예를 들면,* 절단, 변경, 불활성화, 랜덤 돌연변이)는 발현을 조절하는데 사용될 수 있다. 유전자 불활성화는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 ZFP 또는 TALE 단백질을 포함하지 않는 세포와 비교된 경우 유전자 발현에서 임의의 감소를 지칭한다. 따라서, 유전자 불활성화는 부분적 또는 완전할 수 있다.

[0088] "관심 영역"은 세포 염색질, 예컨대, 예를 들어, 외인성 분자를 결합시키는 것이 바람직한, 유전자 이내 또는 이에 인접한 비-코딩 서열 또는 유전자의 임의의 영역이다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합의 목적을 위한 것일 수 있다. 관심 영역은, 예를 들어 염색체, 에피솜, 소기관 게놈 (*예를 들면*, 미토콘드리아, 엽록체), 또는 감염 바이러스 게놈에서 존재할 수 있다. 관심 영역은 유전자의 코딩 영역 이내, 전사된 비-코딩 영역 예컨대, 예를 들어, 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론 이내, 또는 코딩 영역의 어느 한쪽 업스트림 또는 다운스트림인, 비-전사된 영역 이내일 수 있다. 관심 영역은 단일 뉴클레오타이드 쌍 또는 최대 2,000 뉴클레오타이드 쌍 길이, 또는 뉴클레오타이드 쌍의 임의의 적분 값만큼 작을 수 있다.

[0089] "진핵" 세포는, 비제한적으로, 진균 세포 (예컨대 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포 (*예를 들면,* T-세포)를 포함한다.

[0090] 용어 "작동가능한 연결" 및 "작동가능하게 연결된" (또는 "작동하게 연결된")은 2 이상의 성분 (예컨대 서열 요소)의 병렬배치와 관련하여 상호교환적으로 사용되고, 여기에서 상기 성분은 양쪽 성분이 정상적으로 기능하도록 그리고 적어도 하나의 성분이 적어도 하나의 다른 성분에서 발휘되는 기능을 매개할 수 있다는 가능성을 허용하도록 배열된다. 예시로서, 전사 조절 서열이 1종 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 코딩 서열의 전사의 수준을 제어한다면 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열은 코딩 서열과 *시스*로 일반적으로 작동가능하게 연결되지만, 이것에 직접적으로 인접할 필요는 없다. 예를 들어, 인핸서는, 심지어 이들이 인접하지 않아도, 코딩 서열에 작동가능하게 연결되는 전사 조절 서열이다.

[0091] 융합 폴리펩타이드에 대해, 용어 "작동가능하게 연결된"은 각각의 성분이 그렇게 연결되지 않았던 것처럼 다른 성분에 연결하여 동일한 기능을 수행한다는 사실을 지칭할 수 있다. 예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인이 활성화 도메인에 융합되는 융합 폴리펩타이드에 대해, 융합 폴리펩타이드에서, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메

인 부분이 이의 표적 부위 및/또는 이의 결합 부위를 결합시킬 수 있다면, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 및 활성화 도메인은 작동가능한 연결이고, 한편 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향조절시킬 수 있다. 유전자 발현을 조절할 수 있는 도메인에 융합된 ZFPs는 집합적으로 "ZFP-TFs" 또는 "징크 핑거 전사 인자"로 지칭되고, 한편 유전자 발현을 조절할 수 있는 도메인에 융합된 TALEs는 집합적으로 "TALE-TFs" 또는 "TALE 전사 인자"로 지칭된다. ZFP DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합되는 융합 폴리펩타이드 ("ZFN" 또는 "징크 핑거 뉴클레아제") 경우, 융합 폴리펩타이드에서, ZFP DNA-결합 도메인 부분이 이의 표적 부위 및/또는 이의 결합 부위를 결합시킬 수 있다면 ZFP DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은 작동가능한 연결이고, 한편 절단 도메인은 표적 부위의 부근에서 DNA를 절단시킬 수 있다. TALE DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합되는 융합 폴리펩타이드 ("TALEN" 또는 "TALE 뉴클레아제") 경우, 융합 폴리펩타이드에서, TALE DNA-결합 도메인 부분이 이의 표적 부위 및/또는 이의 결합 부위를 결합시킬 수 있다면 TALE DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은 작동가능한 연결이고, 한편 절단 도메인은 표적 부위의 부근에서 DNA를 절단시킬 수 있다. Cas DNA-결합 도메인이 활성화 도메인에 융합되는 융합 폴리펩타이드에 대해, 융합 폴리펩타이드에서, Cas DNA-결합 도메인 부분이 이의 표적 부위 및/또는 이의 결합 부위를 결합시킬 수 있다면 Cas DNA-결합 도메인 및 활성화 도메인은 작동가능한 연결이고, 한편 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향조절시킬 수 있다. Cas DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합되는 융합 폴리펩타이드 경우, 융합 폴리펩타이드에서, Cas DNA-결합 도메인 부분이 이의 표적 부위 및/또는 이의 결합 부위를 결합시킬 수 있다면 Cas DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은 작동가능한 연결이고, 한편 절단 도메인은 표적 부위의 부근에서 DNA를 절단시킬 수 있다.

[0092] 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산의 "기능성 단편"은 서열이 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일하지 않지만, 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일한 기능을 보유하는 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산이다. 기능성 단편은 대응하는 원상태 분자보다 더 많은 더 적은, 또는 이와 동일한 수의 잔기를 보유할 수 있고/있거나, 1종 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 치환을 함유할 수 있다. 핵산의 기능 (*예를 들면*, 코딩 기능, 또 다른 핵산에 하이브리드화하는 능력) 결정 방법은 당해 분야에서 공지된다. 유사하게, 단백질 기능 결정 방법은 공지된다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 DNA-결합 기능은, 예를 들어, 필터-결합, 전기영동 이동도-시프트, 또는 면역침강 검정에 의해 결정될 수 있다. DNA 절단은 겔 전기영동에 의해 분석될 수 있다. 참고 Ausubel *등*, *상동*. 또 다른 단백질과 상호작용하는 단백질의 능력은, 예를 들어, 양쪽 유전적 및 생화학적으로 공-면역침강, 2-하이브리드 검정 또는 상보성에 의해 결정될 수 있다. 참고, 예를 들어, 분야 *등* (1989) *Nature* **340**:245-246; 미국 특허 번호 5,585,245 및 PCT WO 98/44350.

[0093] "벡터"는 표적 세포에 유전자 서열을 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 작제물", "발현 벡터", 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 유전자의 발현을 유도할 수 있는 그리고 표적 세포에 유전자 서열을 전달할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 의미한다. 따라서, 상기 용어는 클로닝, 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다.

[0094] "리포터 유전자" 또는 "리포터 서열"은, 바람직하게는 일상적인 검정에서 필연적이지 않아도, 쉽게 측정되는 단백질 생성물을 생산하는 임의의 서열을 지칭한다. 적당한 리포터 유전자는, 비제한적으로, 항생제 내성 (예를 들면, 암피실린 저항, 네오마이신 저항, G418 저항, 퓨로마이신 저항)을 매개하는 서열 인코딩 단백질, 서열 인코딩 착색된 또는 형광 또는 발광성 단백질 (예를 들면, 녹색 형광 단백질, 향상된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시퍼라아제), 및 향상된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질 (예를 들면, 디하이드로폴레이트 환원효소)를 포함한다. 에피토프 태그는, 예를 들어, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출가능한 아미노산 서열의 1종 이상의 카피를 포함한다. "발현 태그"는 관심 유전자의 발현을 모니터링하기 위해 요망된 유전자 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는 리포터를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0095] **DNA-결합 도메인**

[0096] 본 명세서에서 기재된 방법은, Htt 유전자에서 표적 서열에 특이적으로 결합하는, 특히 복수의 트리뉴클레오타이드 반복부를 포함하는 돌연변이체 Htt 대립형질에 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함하는, 조성물, 예를 들어 Htt-조절 전사 인자를 이용한다. 임의의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 DNA-결합 도메인은 본 명세서에서 개시된 조성물 및 방법, 예를 들어 DNA-결합 단백질 (*예를 들면*, ZFPs 또는 TALEs) 또는 DNA-결합 폴리뉴클레오타이드 (*예를 들면*, 단일 가이드 RNAs)에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, DNA-결합 도메인은 서열 식별 번호:6의 9 내지 28 (또는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27을 포함하는 그사이 임의의 값) 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위에 결합한다.

[0097] 특정 구현예에서, 그안에 Htt-조절 전사 인자, 또는 DNA 결합 도메인은 징크 핑거 단백질을 포함한다. 표적 부위의 선택; 융합 단백질 (및 동종을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드)의 설계 및 작제 방법은 당해 분야의 숙련

가에 공지되고 하기에서 상세히 기재된다: 미국 특허 번호 6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496.

[0098] 특정 구현예에서, ZFPs는 어느 한쪽 돌연변이체 Htt 대립형질 또는 야생형 Htt 서열에 선택적으로 결합할 수 있다. Htt 표적 부위는 전형적으로 적어도 하나의 징크 핑거를 포함하지만 복수의 징크 핑거 (*예를 들면*, 2, 3, 4, 5, 6 또는 초과 핑거)를 포함할 수 있다. 일반적으로, ZFPs는 적어도 3 핑거를 포함한다. 특정한 ZFPs는 4, 5 또는 6 핑거를 포함하고, 한편 일부 ZFPs는 8, 9, 10, 11 또는 12 핑거를 포함한다. 3 핑거를 포함하는 ZFPs는 전형적으로9 또는 10 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위를 인식하고; 4 핑거를 포함하는 ZFPs는 전형적으로 12 내지 14 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위를 인식하고; 한편 6 핑거를 갖는 ZFPs는 18 내지 21 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위를 인식할 수 있다. ZFPs는 또한. 도메인이 전사 활성화 또는 억제 도메인일 수 있는, 1종 이상의 조절 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 함께 연결된 2 ZFP DNA 결합 도메인을 포함한다. 이들 징크 핑거 단백질은 따라서 8, 9, 10, 11, 12 또는 초과 핑거를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 2 DNA 결합 도메인은 확장가능한 가요성 링커를 통해 연결되어 이로써 하나의 DNA 결합 도메인은 4, 5, 또는 6 징크 핑거를 포함하고 제2 DNA 결합 도메인은 추가의 4, 5, 또는 5 징크 핑거를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 표준 인터-핑거 링커이어서 이로써 핑거 배열은 8, 9, 10, 11 또는 12 또는 초과 핑거를 포함하는 하나의 DNA 결합 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 링커는 비정형 링커 예컨대 가요성 링커이다. DNA 결합 도메인은 적어도 하나의 조절 도메인에 융합되고 'ZFP-ZFP-TF' 구조로서 여겨질 수 있다. 이들 구현예의 구체적인 예는 가요성 링커로 연결된 및 KOX 리프레서에 융합된 2 DNA 결합 도메인을 포함하는 "ZFP-ZFP-KOX" 그리고 2 ZFP-KOX 융합 단백질이 링커를 통해 함께 융합되는 "ZFP-KOX-ZFP-KOX"로서 지칭될 수 있다.

[0099] 대안적으로, DNA-결합 도메인은 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 인식 서열 예컨대 I-*Sce*I, I-*Ceu*I, PI-*Psp*I, PI-*Sce*, I-*Sce*IV, I-*Csm*I, I-*Pan*I, I-*Sce*II, I-*Ppo*I, I-*Sce*III, I-*Cre*I, I-*Tev*I, I-*Tev*II 및 I-*Tev*III은 공지되어 있다. *참고* 또한 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; Belfort *등* (1997) *NucleicAcids Res.* 25:3379-3388; Dujon등 (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *등* (1994) NucleicAcids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *등* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *등* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 and the New England Biolabs catalogue. 게다가, 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비-천연 표적 부위를 결합시키기 위해 조작될 수 있다. *참고*, 예를 들어, Chevalier *등* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat *등* (2003) *NucleicAcids Res.* 31:2952-2962; Ashworth *등* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques *등* (2007) *CurrentGene Therapy* 7:49-66; 미국 특허 공개 번호 20070117128.

[0100] "양손" 징크 핑거 단백질은 2 징크 핑거 도메인이 2 불연속 표적 부위에 결합하도록 징크 핑거 DNA 결합 도메인의 2 클러스터가 개입 아미노산에 의해 분리되는 단백질이다. 징크 핑거 결합 단백질의 양손 유형의 예는 SIP1이고, 여기에서 4 징크 핑거의 클러스터는 단백질의 아미노 말단에서 위치하고 3 핑거의 클러스터는 카복실 말단에서 위치한다 (*참고* Remacle 등, (1999) *EMBO Journal* 18 (18): 5073-5084). 이들 단백질내 징크 핑거의 각각의 클러스터는 특유의 표적 서열에 결합할 수 있고 2 표적 서열 사이 간격은 많은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 2-손 ZFPs는, 예를 들어 ZFPs의 한쪽 또는 양쪽에 융합된, 기능성 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 기능성 도메인이 한쪽 또는 양쪽 ZFPs의 외부에 부착될 수 있거나 (참고, 도 1C) 또는 ZFPs 사이에 배치 (양쪽 ZFPs에 부착)될 수 있다는 것 (참고, 도 4)이 분명할 것이다

[0101] Htt-표적화된 ZFPs의 구체적인 예는, 본 명세서에서 이 전체가 모든 목적을 위해 참고로 편입되는, 미국 특허 공개 번호 20130253040, 뿐만 아니라 아래 표 1에서 개시된다. 상기 표에서 제1 칼럼은 ZFP에 대한 내부 참조 명칭 (숫자)이고 표 2의 칼럼 1에서 동일한 명칭에 대응한다. "F"는 핑거를 지칭하고 "F" 다음 숫자는 징크 핑거를 참조한다 (*예를 들면*, "F1"은 핑거 1을 지칭한다).

표 1: Htt-표적화된 징크 핑거 단백질

SBS #	설계					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
45643	QSGDLTR (서열 식별 번호:1)	QSGDLTR (서열 식별 번호:1)	QSGDLTR (서열 식별 번호:1)	KHGNLSE (서열 식별 번호:2)	KRCNLRC (서열 식별 번호:3)	
46025	CPSHLTR (서열 식별 번호:4)	QSGDLTR (서열 식별 번호:1)	KHGNLSE (서열 식별 번호:2)	KRCNLRC (서열 식별 번호:3)	RQFNRHQ (서열 식별 번호:5)	

[0102]

[0103] 이들 단백질의 표적 부위에 대한 서열 및 위치는 표 2에서 개시된다. ZFP 인식 나선에 의해 접촉되는 표적 부위에서 뉴클레오타이드는 대문자로 표시되고; 비-접촉된 뉴클레오타이드는 소문자로 표시된다.

표 2: 인간 및 마우스 Htt 에서 표적 부위

SBS #	표적 부위
45643	agCAGCAGcaGCAGCAGCAgcagcagca (서열 식별 번호:6)
46025	agCAGCAGCAGcaGCAGCAgcagcagca (서열 식별 번호:6)

[0104]

[0105] 특정 구현예에서, DNA-결합 도메인은 자연 발생 또는 조작된 (비-자연 발생) TAL 효과기 (TALE) DNA 결합 도메인을 포함한다. *참고, 예를 들면, 본 명세서에서 이 전체가 참고로 편입된,* 미국 특허 번호 8,586,526.

[0106] 속 *크산토모나스*의 식물 병원성 박테리아는 중요한 농작물에서 많은 질병을 유발시킨다고 공지된다. *크산토모나스*의 병원성은 식물 세포에 25 초과 상이한 효과기 단백질을 주사하는 보존된 유형 III 분비 (T3S) 시스템에 좌우된다. 이들 중에서 주사된 단백질은 식물 전사 활성제를 모방하고 식물 전사체를 조종하는 전사 활성제-유사 효과기 (TALE)이다 (참고 Kay *등* (2007) *Science* 318:648-651). 이들 단백질은 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 함유한다. 가장 양호하게 특성규명된 TALEs 중 하나는 하기로부터 AvrBs3이다: *크산토모나스 캄페스트그리스* 피브이. *베시카토리아* (참고 Bonas *등* (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 및 WO2010079430). TALEs는, 이들 단백질의 DNA 결합 특이성에 핵심인, 각각의 반복부가 대략 34 아미노산을 함유하는, 연쇄 반복부의 중심화된 도메인을 함유한다. 게다가, 이들은 핵 국재화 서열 및 산성 전사 활성화 도메인을 함유한다 (검토를 위하여 참고 Schornack S, *등* (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). 게다가, 식물병원성 박테리아 *랄스토니아 솔라나세아룸*에서, brg11 및 hpx17로 지정된, 2 유전자는 R. 솔라나세아룸 비아오바르 1 균주 GMI1000에서 그리고 비아오바르 4 균주 RS1000에서 크산토모나스의 AvrBs3 계열과 상동성인 것으로 밝혀졌다 (참고 Heuer *등* (2007) *Appl 및 Envir Micro* 73(13): 4379-4384). 이들 유전자는 서로에 대해서 뉴클레오타이드 서열내 98.9% 동일하고 hpx17의 반복부 도메인에서 1,575 bp의 결실만큼 상이하다. 그러나, 양쪽 유전자 생성물은 *크산토모나스*의 AvrBs3 계열 단백질과 40% 미만 서열 동일성을 갖는다.

[0107] 이들 TALEs의 특이성은 연쇄 반복부에서 발견된 서열에 좌우된다. 반복된 서열은 대략 102 bp를 포함하고 반복부는 서로 전형적으로 91-100% 상동성이다 (Bonas *등, 상기 참조*). 반복부의 다형성은 위치 12 및 13에서 일반적으로 위치하고 TALE의 표적 서열에서 인접 뉴클레오타이드의 동일성과 위치 12 및 13에서 초가변성 2잔기의 동일성 사이 일대일 대응인 것처럼 보인다 (참고 Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501 및 Boch *등* (2009) *Science* 326:1509-1512). 실험적으로, 이들 TALEs의 DNA 인식용 코드는 위치 12 및 13에서 HD 서열이 시토신 (C)에 결합을 유발시키고, NG가 T에 결합하고, NI가 A, C, G 또는 T에, NN이 A 또는 G에 결합하고, NG가 T에 결합하도록 결정되어졌다. 이들 DNA 결합 반복부는 신규한 조합 및 다수의 반복부로 단백질에 조립되어져, 신규한 서열과 상호작용할 수 있는 인공 전사 인자를 만들었다. 게다가, 본 명세서에서 그 전체가 참고로 편입된, 미국 특허 번호 8,586,526 및 미국 공개 번호 20130196373은 N-캡 폴리펩타이드, C-캡 폴리펩타이드 (*예를 들면,* +63, +231 또는 +278) 및/또는 신규한 (비정형) RVDs를 가진 TALEs를 기재한다.

[0108] 예시적인 TALE는, 이 전체가 참고로 편입된, 미국 특허 공개 번호 20130253040에서 기재된다.

[0109] 특정 구현예에서, DNA 결합 도메인은 이량체화 및/또는 다량체화 도메인, 예를 들어 이중나선 (CC) 및 이량화 징크 핑거 (DZ)를 포함한다. *참고,* 미국 특허 공개 번호 20130253040.

[0110] 더욱 추가 구현예에서, DNA-결합 도메인은 CRISPR/Cas 시스템의 단일-가이드 RNA, 예를 들어20150056705에서 개

시된 바와 같이 sgRNAs를 포함한다.

[0111] 설득력있는 증거는 진핵 RNAi 경로를 평행하게 하도록 가정된 고세균 및 많은 박테리아에서 RNA-매개된 게놈 방어 경로의 존재에 대하여 최근에 부각되었다 (검토를 위하여, 참고 Godde and Bickerton, 2006. *J. Mol. Evol.* 62: 718-729; Lillestol 등, 2006. *Archaea* 2: 59-72; Makarova 등, 2006. *Biol. Direct* 1: 7.; Sorek 등, 2008. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 181-186). CRISPR-Cas 시스템 또는 원핵 RNAi (pRNAi)로서 공지되면, 경로는 하기에서 발생하도록 제안된다: 2 진화론적으로 및 종종 물리적으로 연결된 유전자 유전자좌: 시스템의 RNA 성분을 인코딩하는, CRISPR (군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복부) 유전자좌, 및 단백질을 인코딩하는, cas (CRISPR-관련) 유전자좌 (Jansen 등, 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova 등, 2002. *NucleicAcids Res.* 30: 482-496; Makarova 등, 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft 등, 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60). 미생물 호스트에서 CRISPR 유전자좌는 CRISPR-매개된 핵산 절단의 특이성을 프로그래밍할 수 있는 비-코딩 RNA 요소 뿐만 아니라 CRISPR-관련 (Cas) 유전자의 조합을 함유한다. 개별 Cas 단백질은 진핵 RNAi 장치의 단백질 성분과 상당한 서열 유사성을 공유하지 않지만, 하기를 갖는다: 유사한 예상된 기능 (*예를 들면*, RNA 결합, 뉴클레아제, 헬리카제, 등) (Makarova 등, 2006. *Biol. Direct* 1: 7). CRISPR-관련 (*cas*) 유전자는 CRISPR 반복부-스페이서 어레이와 종종 관련된다. 40 초과 상이한 Cas 단백질 계열은 기재되어 왔다. 이들 단백질 계열 중, Cas1은 상이한 CRISPR/Cas 시스템 중에서 도처에 존재하는 것처럼 보인다. *cas* 유전자 및 반복부 구조의 특별한 조합은 8 CRISPR 하위유형 (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Apern, 및 Mtube)를 정의하는데 사용되어 왔고, 이들 중 일부는 반복부-관련 미지 단백질 (RAMPs)을 인코딩하는 추가의 유전자 모듈과 관련된다. 1 초과 CRISPR 하위유형은 단일 게놈에서 발생할 수 있다. CRISPR/Cas 하위유형의 산발적 분포는 시스템이 미생물 진화 동안 수평 유전자 전달에 적용되는 것을 시사한다.

[0112] *S. 파이오제네스*에서 초기에 기재된, 유형 II CRISPR은 가장 양호하게 특성규명된 시스템 중 하나이고 4 순차적인 단계로 표적화된 DNA 이중-가닥 파괴를 실행한다. 첫째, 2개의 비-코딩 RNA, 전-crRNA 어레이 및 tracrRNA는 CRISPR 유전자좌로부터 전사된다. 둘째, tracrRNA는 전-crRNA의 반복부 영역에 하이브리드화하고 Cas9 단백질의 존재 하에 이중 가닥-특이적 RNase III에 의해 프로세싱이 발생하는 개별 스페이서 서열을 함유하는 성숙한 crRNAs로 전-crRNA의 프로세싱을 매개한다. 셋째, 성숙한 crRNA:tracrRNA 복합체는 표적 인식용 추가의 요건인, 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 옆에 상기 표적 DNA에서 프로토스페이서와 crRNA에서 스페이서 사이 왓슨-크릭 염기 짝짓기를 통해 상기 표적 DNA에 Cas9를 유도한다. 게다가, tracrRNA는 또한 이의 3' 말단에서 crRNA와 염기 짝짓기함에 따라 존재해야 하고, 상기 회합은 Cas9 활성을 유발시킨다. 마지막으로, Cas9는 표적 DNA의 절단을 매개하여 프로토스페이서 이내 이중-가닥 절단을 창출한다. CRISPR/Cas 시스템의 활성은 3 단계로 포함한다: (i) '적응'으로 불리는 공정에서, 미래의 공격을 예방하기 위해 CRISPR 어레이에 외계 DNA 서열의 삽입, (ii) 관련된 단백질의 발현, 뿐만 아니라 어레이의 발현 및 가공, 그 다음 (iii) 외계 핵산으로 RNA-매개된 간섭. 따라서, 박테리아 세포에서, 몇 개의 소위 'Cas' 단백질은 CRISPR/Cas 시스템의 천연 기능으로 관여된다.

[0113] 유형 II CRISPR 시스템은 많은 상이한 박테리아에서 밝혀졌다. Fonfara 등 ((2013) *NucAcid Res* 42(4):2377-2590)에 의한 공공으로 이용가능한 게놈에 관한 BLAST 조사는 347 종의 박테리아에서 Cas9 오쏘로그를 발견하였다. 추가적으로, 상기 그룹은 S. 파이오제네스, S. 뮤탄스, S. 테로필루스, C. 제주니, N. 메닝자이티데스, P. 멀토시다 및 F. 노비시다로부터 Cas9 오쏘로그를 이용하여 DNA 표적의 시험관내 CRISPR/Cas 절단을 실증하였다. 따라서, 용어 "Cas9"는 1 DNA 결합 도메인 및 2 뉴클레아제 도메인을 포함하는 RNA 유도된 DNA 뉴클레아제를 지칭하고, 여기에서 Cas9를 인코딩하는 유전자는 임의의 적당한 박테리아로부터 유래될 수 있다.

[0114] Cas9 단백질은 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인을 갖는다: 하나의 뉴클레아제 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 유사하고, 한편 다른 것은 Ruv 엔도뉴클레아제 도메인을 닮는다. HNH-유형 도메인은 crRNA에 상보적인 DNA 가닥 절단을 책임지는 것처럼 보이고 한편 Ruv 도메인은 비-상보적 가닥을 절단한다. Cas 9 뉴클레아제는 단 하나의 뉴클레아제 도메인이 기능성이어서, Cas 니카제를 창출하도록 조작될 수 있다 (참고 Jinek 등, *상기 참조*). 니카제는 효소의 촉매적 도메인에서 아미노산의 특이적 돌연변이에 의해, 또는 더 이상 기능성이 없도록 일부 또는 모든 도메인의 절단에 의해 생성될 수 있다. Cas 9가 2개의 뉴클레아제 도메인을 포함하기 때문에, 상기 접근법은 어느 한쪽 도메인에서 취득될 수 있다. 이중 가닥 절단은 2개의 상기 Cas 9 니카제의 이용에 의해 상기 표적 DNA에서 달성될 수 있다. 니카제는 각각 DNA의 하나의 가닥을 절단할 것이고 2개의 이용은 이중 가닥 절단을 창출할 것이다.

[0115] crRNA-tracrRNA 복합체의 요건은 crRNA 및 tracrRNA의 어닐링에 의해 정상적으로 형성된 헤어핀을 포함하는 조작된 "단일-가이드 RNA" (sgRNA)의 이용에 의해 회피될 수 있다 (*참고* Jinek 등 (2012) *Science* 337:816 및 Cong 등 (2013) *Sciencexpress*/10.1126/science.1231143). *S. 파이로게네스*에서, 조작된 tracrRNA:crRNA 융합

물, 또는 sgRNA는, 이중 가닥 RNA:DNA 이종이량체가 Cas 관련된 RNAs와 상기 표적 DNA 사이 형성하는 경우 상기 표적 DNA를 절단시키기 위해 Cas9를 가이드한다. PAM 서열을 함유하는 조작된 sgRNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 상기 시스템은 RNA 유도된 게놈 교정에 사용되었고 (참고 Ramalingam, *상기 참조*) ZFNs 및 TALENs에 유사한 효율성 교정과 함께 *생체내* 제브라피쉬 배아 게놈 교정에 유용하였다 (참고 Hwang *등* (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227).

[0116] CRISPR 유전자좌의 1차 생성물은 침입자 표적화 서열을 함유하는, 그리고 경로에서 그것의 가정된 역할에 기반된 일명 가이드 RNAs 또는 원핵 침묵화 RNAs (psiRNAs)인 짧은 RNAs인 것처럼 보인다 (Makarova *등*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Hale *등*, 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). RNA 분석은 CRISPR 유전자좌 전사체가 개별 침입자 표적화 서열 및 측접 반복부 단편을 함유하는 쪛60- 내지 70-nt RNA 중간체를 방출시키기 위해 반복부 서열 이내 절단되는 것을 표시한다 (Tang *등* 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 99: 7536-7541; Tang *등*, 2005. *Mol. Microbiol*. 55: 469-481; Lillestol *등* 2006. *Archaea* 2: 59-72; Brouns *등* 2008. *Science* 321: 960-964; Hale *등*, 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). 아르카에온 *파이로코쿠스 푸리오서스*에서, 이들 중간체 RNAs는 풍부한, 안정적인 쪛35- 내지 45-nt 성숙한 psiRNAs로 추가로 가공된다 (Hale *등*. 2008. *RNA*, 14: 2572-2579).

[0117] crRNA-tracrRNA 복합체의 요건은 crRNA 및 tracrRNA의 어닐링에 의해 정상적으로 형성된 헤어핀을 포함하는 조작된 "단일-가이드 RNA" (sgRNA)의 이용에 의해 회피될 수 있다 (*참고* Jinek *등* (2012) *Science* 337:816 및 Cong *등* (2013) *Sciencexpress*/10.1126/science.1231143). *S. 파이로게네스*에서, 조작된 tracrRNA:crRNA 융합물, 또는 sgRNA는, 이중 가닥 RNA:DNA 이종이량체가 Cas 관련된 RNAs와 상기 표적 DNA 사이 형성하는 경우 상기 표적 DNA를 절단시키기 위해 Cas9를 가이드한다. PAM 서열을 함유하는 조작된 sgRNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 상기 시스템은 RNA 유도된 게놈 교정에 사용되었고 (참고 Ramalingam *상기 참조*) ZFNs 및 TALENs에 유사한 효율성 교정과 함께 *생체내* 제브라피쉬 배아 게놈 교정에 유용하였다 (참고 Hwang *등* (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227).

[0118] 키메라성 또는 sgRNAs는 임의의 요망된 표적에 상보적인 서열을 포함하기 위해 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 또는 초과 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 또는 초과 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 또는 더 적은 뉴클레오타이드 길이 미만이다. 일부 구현예에서, RNAs는 *S. 파이오제네스* CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하기 위해 표적에 상보성의 및 형태 G[n19]의 22 염기, 그 다음 형태 NGG 또는 NAG의 프로토스페이서-인접한 모티프 (PAM)를 포함한다. 따라서, 하나의 방법에서, sgRNAs는 (i) 관련된 게놈의 (인간, 마우스, 또는 특정한 식물 종의) 참조 서열과 ZFN 이종이량체의 인식 서열의 정렬; (ii) ZFN 절반-부위 사이 스페이서 영역의 확인; (iii) 스페이서 영역에 가장 가까운 모티프 G[N20]GG의 위치의 확인 (1 초과 상기 모티프가 스페이서를 중첩하는 경우, 스페이서에 비해 중심에 있는 모티프는 선택된다); (iv) sgRNA의 코어로서 그 모티프의 이용에 의해 관심 유전자에서 공지된 ZFN 표적의 이용에 의해 설계될 수 있다. 상기 방법은 유익하게는 증명된 뉴클레아제 표적에 의존한다. 대안적으로, sgRNAs는 단순히 G[n20]GG 식에 순응하는 적당한 표적 서열 확인에 의해 임의의 관심 영역을 표적하기 위해 설계될 수 있다. 상보성 영역과 함께, sgRNA는 sgRNA의 tracrRNA 부분의 꼬리 영역까지 확장하기 위해 추가의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다 (참고 Hsu *등* (2013) *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt.2647). 꼬리는 +67 내지 +85 뉴클레오타이드, 또는 +85 뉴클레오타이드의 바람직한 길이로 그사이 임의의 숫자일 수 있다. 절단된 sgRNAs, "tru-gRNAs"는 또한 사용될 수 있다 (*참고* Fu *등*, (2014) *Nature Biotech* 32(3): 279). tru-gRNAs에서, 상보성 영역은 17 또는 18 뉴클레오타이드 길이로 줄어든다.

[0119] 또한, 대안적인 PAM 서열은 또한 이용될 수 있고, 여기에서 PAM 서열은 S. 파이오제네스 Cas9를 이용하는 NGG (Hsu 2014, 상기 참조)에 대안으로서 NAG일 수 있다. 추가의 PAM 서열은 또한 초기 G가 부족한 것을 포함할 수 있다 (Sander 및 Joung (2014) *Nature Biotech* 32(4):347). *S. 파이오제네스* 인코딩된 Cas9 PAM 서열에 더하여, 다른 박테리아 공급원으로부터 Cas9 단백질에 특이적인 다른 PAM 서열은 사용될 수 있다. 예를 들어, (Sander 및 Joung, *상기 참조*, 및 Esvelt *등*, (2013) *Nat Meth* 10(11):1116으로부터 적응된) 아래 보여진 PAM 서열은 이들 Cas9 단백질에 특이적이다:

종	PAM
S. 파이오제네스	NGG
S. 파이오제네스	NAG
S. 뮤탄스	NGG
S. 써모필리우스	NGGNG
S. 써모필리우스	NNAAAW
S. 써모필리우스	NNAGAA
S. 써모필리우스	NNNGATT
C. 제주니	NNNNACA
N. 메닝자이티데스	NNNNGATT
P. 멀토시다	GNNNCNNA
F. 노비시다	NG

[0120]

[0121] 따라서, *S. 파이오제네스* CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하기 위한 적당한 표적 서열은 하기 지침: [n17, n18, n19, 또는 n20](G/A)G에 따라 선택될 수 있다. 대안적으로 PAM 서열은 지침 G[n17, n18, n19, n20](G/A)G를 따를 수 있다. 비-*S. 파이오제네스* 박테리아로부터 유래된 Cas9 단백질에 대하여, 동일한 지침은 대체 PAMs가 *S. 파이오제네스* PAM 서열에 대하여 치환되는 경우 사용될 수 있다.

[0122] 가장 바람직한 것은 잠재적인 부정확한 서열을 회피하는 특이성의 최고 가능성을 가진 표적 서열을 선택하는 것이다. 이들 요망되지 않는 부정확한 서열은 하기 속성을 고려하여 확인될 수 있다: i) 이용되는 Cas9 단백질로 기능하도록 공지된 PAM 서열이 뒤따르는 상기 표적 서열에서 유사성; ii) 요망된 표적 서열로부터 3 미만 미스매치를 가진 유사한 표적 서열; iii) ii)에서와 유사한 표적 서열, 여기에서 미스매치는 모두 PAM 근위 영역보다 PAM 원위 영역에서 위치한다 (때때로 '종자' 영역 (Wu 등 (2014) *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt2889)으로서 지칭된, PAM에 바로 인접한 또는 근위인 뉴클레오타이드 1-5가 인식에 가장 핵심이라는 일부 증거가 있어서, 종자 영역에서 위치한 미스매치를 가진 추정하는 벗어난 표적 부위가 sg RNA에 의해 최소한 유사하게 인식될 수 있다); 및 iv) 미스매치가 연속적으로 이격되지 않거나 4 뉴클레오타이드 떨어진 것보다 더 크게 이격되는 유사한 표적 서열 (Hsu 2014, *상기 참조*). 따라서, CRIPSR/Cas 시스템이 이용되고 있는 게놈에서 잠재적인 벗어난 표적 부위의 수의 분석을 수행함으로써, 상기 이들 기준을 이용하여, sgRNA용 적당한 표적 서열은 확인될 수 있다.

[0123] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 자연 발생 Cas 단백질의 "기능성 유도체"일 수 있다. 원상태 서열 폴리펩타이드의 "기능성 유도체"는 원상태 서열 폴리펩타이드와 공동으로 정성적 생물학적 특성을 갖는 화합물이다. "기능성 유도체"는, 비제한적으로, 원상태 서열의 단편 및 원상태 서열 폴리펩타이드의 유도체 및 이의 단편을 포함하고, 단, 이들은 대응하는 원상태 서열 폴리펩타이드와 공동으로 생물학적 활성을 갖는다. 본 명세서에서 고려된 생물학적 활성은 단편에 DNA 기질을 가수분해하기 위한 기능성 유도체의 능력이다. 용어 "유도체"는 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체, 공유 변형, 및 이의 융합물 모두를 포함한다. 일부 측면에서, 기능성 유도체는 자연 발생 Cas 단백질의 단일 생물학적 특성을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 기능 유도체는 자연 발생 Cas 단백질의 생물학적 특성의 서브셋을 포함할 수 있다. Cas 폴리펩타이드의 적당한 유도체 또는 이의 단편은 비제한적으로 Cas 단백질의 돌연변이체, 융합물, 공유 변형 또는 이의 단편을 포함한다. Cas 단백질 또는 이의 단편, 뿐만 아니라 Cas 단백질 또는 이의 단편의 유도체를 포함하는, Cas 단백질은 세포로부터 수득될 수 있거나 화학적으로 합성될 수 있거나 이들 2 절차의 조합에 의해 합성될 수 있다. 상기 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생산하는 세포, 또는 Cas 단백질을 자연적으로 생산하고 더 높은 발현 수준에서 내인성 Cas 단백질을 생산하기 위해 또는 외인성으로 도입된 핵산으로부터 Cas 단백질을 생산하기 위해 유전적으로 조작되는 세포일 수 있고, 여기에서 핵산은 내인성 Cas와 동일한 또는 상이한 Cas를 인코딩한다. 일부 경우에, 상기 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생산하지 않고 Cas 단백질을 생산하기 위해 유전적으로 조작된다.

[0124] 특이적인 유전자에 표적화된 예시적인 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 예를 들어 미국 공개 번호 20150056705에서 개시된다.

[0125] 따라서, 뉴클레아제는 DNA를 절단하는 뉴클레아제 도메인과 조합으로 공여체 (이식유전자)를 삽입하도록 요망되는 임의의 유전자내 표적 부위에 특이적으로 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함한다.

[0126] **융합 분자**

[0127] DNA-결합 도메인은 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용을 위하여 임의의 추가의 분자 (*예를 들면,* 폴리펩타이드)에 융합될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 DNA-결합 분자 (*예를 들면,* ZFP, TALE 또는 단일 가이드 RNA) 및 이종성 조절 (기능성) 도메인 (또는 이의 기능성 단편)을 포함하는 융합 분자를 사용한다.

[0128] 특정 구현예에서, 기능성 도메인은 전사 조절 도메인을 포함한다. 공통 도메인은 하기를 포함한다: *예를 들면,* 전사 인자 도메인 (활성제, 리프레서, 공-활성제, 공-리프레서), 사일런서, 종양유전자 (*예를 들면*, myc, jun,fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos 패밀리 구성원 등); DNA 치유 효소 및 그것의 관련된 인자 및 변형제; DNA 재배열 효소 및 그것의 관련된 인자 및 변형제; 염색질 관련된 단백질 및 그것의 변형제 (*예를 들면* 키나제, 아세틸화효소 및 탈아세틸화효소); 및 DNA 변형시키는 효소 (*예를 들면*, 메틸전달효소, 토포이소머라제, 헬리카제, 리가제, 키나제, 포스파타제, 폴리머라제, 엔도뉴클레아제) 및 그것의 관련된 인자 및 변형제. *참고, 예를 들면,* 미국 공개 번호 20130253040, 본 명세서에서 이 전체가 참고로 편입됨.

[0129] 활성화 달성을 위한 적당한 도메인은 하기를 포함한다: HSV VP16 활성화 도메인 (*참고, 예를 들면*, Hagmann *등*, *J. Virol*. 71, 5952-5962 (1997)) 핵 호르몬 수용체 (*참고, 예를 들면*, Torchia *등*, *Curr.Opin. Cell. Biol*. 10:373-383 (1998)); 핵 인자 카파 B의 p65 서브유닛 (Bitko & Barik, *J. Virol*. 72:5610-5618 (1998) 및 Doyle & Hunt,*Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu 등, *Cancer Gene Ther*. 5:3-28 (1998)), 또는 인공 키메라성 기능성 도메인 예컨대 VP64 (Beerli *등*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33), 및 데그론 (Molinari *등*, (1999) *EMBO J*. 18, 6439-6447). 추가의 예시적인 활성화 도메인은 하기를 포함한다: Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2, 및 CTF1 (Seipel *등, EMBO J*. 11, 4961-4968 (1992) 뿐만 아니라 p300, CBP, PCAF, SRC1 PvALF, AtHD2A 및 ERF-2. *참고*, 예를 들어, Robyr *등* (2000) *Mol. Endocrinol*. 14:329-347; Collingwood *등* (1999) *J. Mol. Endocrinol*. 23:255-275; Leo *등* (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol*. 46:77-89; McKenna *등* (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 69:3-12; Malik *등* (2000) *Trends Biochem. Sci*. 25:277-283; 및 Lemon *등* (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev*. 9:499-504. 추가의 예시적인 활성화 도메인은, 비제한적으로, OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5,-6,-7, 및 -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, 및 TRAB1을 포함한다. *참고*, 예를 들어, Ogawa *등* (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami *등* (1996) *Gene Cells* 1:87-99; Goff *등* (1991) *Gene Dev*. 5:298-309; Cho *등* (1999) *Plant Mol. Biol*. 40:419-429; Ulmason *등* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels *등* (2000) *Plant J*. 22:1-8; Gong *등* (1999) *Plant Mol. Biol*. 41:33-44; 및 Hobo *등* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353.

[0130] 예시적인 억제 도메인은, 비제한적으로, KRAB A/B, KOX, TGF-베타-유도성 초기 유전자 (TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, DNMT 계열의 구성원 (*예를 들면*, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb, 및 MeCP2를 포함한다. *참고*, 예를 들어, Bird *등* (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler *등* (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler *등* (1999) *Cell* 99:447-450; 및 Robertson *등* (2000) *Nature Genet*. 25:338-342. 추가의 예시적인 억제 도메인은, 비제한적으로, ROM2 및 AtHD2A를 포함한다. *참고*, 예를 들어, Chem *등* (1996) *Plant Cell* 8:305-321; 및 Wu *등* (2000) *Plant J*. 22:19-27.

[0131] 융합 분자는 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진 생화학적 콘주게이션 및 클로닝의 방법에 의해 작제된다. 융합 분자는 하기를 포함한다: DNA-결합 도메인 및 기능성 도메인 (*예를 들면*, 전사 활성화 또는 억제 도메인). 융합 분자는 또한 선택적으로 하기를 포함한다: 핵 국재화 신호 (예컨대, 예를 들어, SV40 배지 T-항원으로부터의 것) 및 에피토프 태그 (예컨대, 예를 들어, FLAG 및 혈구응집소). 융합 단백질 (및 이들을 인코딩하는 핵산)은 번역 해독틀이 융합물의 성분 중에서 보존되도록 설계된다.

[0132] 한편으로 기능성 도메인의 폴리펩타이드 성분 (또는 이의 기능성 단편)과, 다른 한편으로 비-단백질 DNA-결합 도메인 (*예를 들면,* 항생제, 삽입제, 좁은 홈 결합제, 핵산) 사이 융합물은 당해 분야의 숙련가에 공지된 생화학적 콘주게이션의 방법에 의해 작제된다. *참고*, 예를 들어, Pierce Chemical Company (Rockford, IL) Catalogue. 좁은 홈 결합제와 폴리펩타이드 사이 융합물 제조 방법 및 조성물은 기재되어 있다. Mapp *등* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3930-3935.

[0133] 융합 분자는, 당해 분야의 숙련가에 공지된 바와 같이, 약제학적으로 허용가능한 캐리어로 제형화될 수 있다.

참고, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985; 및 공유의 WO 00/42219.

[0134] 융합 분자의 기능성 성분/도메인은 일단 상기 융합 분자가 이의 DNA 결합 도메인을 통해 표적 서열에 결합하면 유전자의 전사에 영향을 미칠 수 있는 임의의 다양한 상이한 성분으로부터 선택될 수 있다. 그러므로, 기능성 성분은, 비제한적으로, 다양한 전사 인자 도메인, 예컨대 활성제, 리프레서, 공-활성제, 공-리프레서, 및 사일런서를 포함할 수 있다.

[0135] 특정 구현예에서, 융합 단백질은 뉴클레아제 활성을 통해 DNA 결합 부위 근처에서 DNA를 절단되게 하는 뉴클레아제 (*예를 들면,* 징크 핑거 뉴클레아제 또는 TALE 뉴클레아제)를 창출 및 그들의 조작된 (ZFP 또는 TALE) DNA 결합 도메인을 통해 그들의 의도된 핵산을 인식할 수 있는 기능성 독립체를 창출하기 위해 DNA-결합 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 포함한다.

[0136] 따라서, 본 명세서에서 기재된 방법 및 조성물은 광범위하게 적용가능하고 임의의 관심 뉴클레아제를 포함할 수 있다. 뉴클레아제의 비-제한적인 예는 메가뉴클레아제, TALENs 및 징크 핑거 뉴클레아제를 포함한다. 뉴클레아제는 이종성 DNA-결합 및 절단 도메인 (*예를 들면*, 징크 핑거 뉴클레아제; TALENs; 이종성 절단 도메인을 가진 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인)을 포함할 수 있거나, 대안적으로, 자연 발생 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 선택된 표적 부위 (*예를 들면,* 동족 결합 부위보다 상이한 부위에 결합하도록 조작된 메가뉴클레아제)에 결합하도록 변경될 수 있다.

[0137] 뉴클레아제 도메인은 임의의 뉴클레아제, 예를 들어 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이 Htt DNA-결합 도메인에 융합될 수 있는 적당한 뉴클레아제 (절단) 도메인의 비-제한적인 예는 임의의 제한 효소, 예를 들어 유형 IIS 제한 효소 (*예를 들면,* FokI)로부터 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 절단 도메인은 절단 활성용 이량체화를 요구하는 절단 절반-도메인이다. *참고, 예를 들면,* 미국 특허 번호 8,586,526; 8,409,861 및 7,888,121, 그 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨. 일반적으로, 2 융합 단백질은 상기 융합 단백질이 절단 절반-도메인을 포함하면 절단에 요구된다. 대안적으로, 2 절단 절반-도메인을 포함하는 단일 단백질은 사용될 수 있다. 2 절단 절반-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 기능성 단편)으로부터 유래될 수 있거나, 각각의 절단 절반-도메인은 상이한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 기능성 단편)으로부터 유래될 수 있다. 게다가, 2 융합 단백질용 표적 부위는, 서로에 대해서, 바람직하게는 배치되어, 이로써 그들의 각각의 표적 부위에 2 융합 단백질의 결합이, *예를 들면*, 이량체화에 의해, 절단 절반-도메인이 기능성 절단 도메인을 형성하도록 하는 서로에 대해서 공간적 배향으로 절단 절반-도메인을 배치시킨다.

[0138] 뉴클레아제 도메인은 또한 절단 활성을 가진 임의의 메가뉴클레아제 (귀소 엔도뉴클레아제) 도메인으로 유래될 수 있고 또한, 하기를 포함하는, 본 명세서에서 기재된 뉴클레아제와 함께 사용될 수 있다: 비제한적으로 I-*Sce*I, I-*Ceu*I, PI-*Psp*I, PI-*Sce*, I-*Sce*IV, I-*Csm*I, I-*Pan*I, I-*Sce*II, I-*Ppo*I, I-*Sce*III, I-*Cre*I, I-*Tev*I, I-*Tev*II 및 I-*Tev*III.

[0139] 특정 구현예에서, 뉴클레아제는 치밀 TALEN (cTALEN)을 포함한다. 이들은 TevI 뉴클레아제 도메인에 TALE DNA 결합 도메인을 연결하는 단일 사슬 융합 단백질이다. 융합 단백질은 TALE 영역에 의해 국재화된 니카제로서 작용할 수 있거나, TALE DNA 결합 도메인이 메가뉴클레아제 (*예를 들면, TevI*) 뉴클레아제 도메인에 대해 어디에 위치하는지에 따라, 이중 가닥 절단을 창출할 수 있다 (참고 Beurdeley 등 (2013) *Nat Comm*: 1-8 DOI: 10.1038/ncomms2782).

[0140] 다른 구현예에서, TALE-뉴클레아제는 메가 TAL이다. 이들 메가 TAL 뉴클레아제는 TALE DNA 결합 도메인 및 메가뉴클레아제 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 메가뉴클레아제 절단 도메인은 모노머로서 활성이고 활성을 위하여 이량체화를 요구하지 않는다. (참고 Boissel 등, (2013) *NuclAcid Res*: 1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224).

[0141] 게다가, 메가뉴클레아제의 뉴클레아제 도메인은 또한 DNA-결합 기능성을 나타낼 수 있다. 임의의 TALENs는 추가의 TALENs (*예를 들면, 1종 이상의 메가-TALs와* 1종 이상의 TALENs (cTALENs 또는 FokI-TALENs)) 및/또는 ZFNs와 함께 사용될 수 있다.

[0142] 게다가, 절단 도메인은, 예를 들어 부정확한 절단 효과를 감소 또는 제거하는 절대 이종이량체의 형성을 위하여, 야생형과 비교된 경우 1종 이상의 변경을 포함할 수 있다. *참고, 예를 들면,* 미국 특허 번호 7,914,796; 8,034,598; 및 8,623,618, 그들 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨.

[0143] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 뉴클레아제는 이중-가닥 표적 (*예를 들면,* 유전자)에서 이중- 또는 단일가닥

절단을 생성할 수 있다. 단일가닥 절단 ("닉")의 생성은, 뉴클레아제 도메인 중 하나의 촉매적 도메인의 돌연변이가 니카제를 초래하는 방법을 기재하는 참고로 본 명세서에서 편입된, 예를 들어 미국 특허 번호 8,703,489에서 기재된다.

[0144] 따라서, 뉴클레아제 (절단) 도메인 또는 절단 절반-도메인은 기능성 절단 도메인을 형성하기 위해 다량체화하는 (*예를 들면*, 이량체화하는) 능력을 보유하는, 또는 절단 활성을 보유하는 단백질의 임의의 부분일 수 있다.

[0145] 대안적으로, 뉴클레아제는 소위 "분할-효소" 기술을 이용하여 핵산 표적 부위에서 *생체내* 조립될 수 있다 (*참고 예를 들면* 미국 특허 공개 번호 20090068164). 상기 분리 효소의 성분은 별도의 발현 작제물에서 표현될 수 있거나, 개별 성분이, 예를 들어, 자가-절단 2A 펩타이드 또는 IRES 서열에 의해 분리되는 하나의 열린 해독틀에서 연결될 수 있다. 성분은 개별 징크 핑거 결합 도메인 또는 메가뉴클레아제 핵산 결합 도메인의 도메인일 수 있다.

[0146] 뉴클레아제는, 예를 들어 미국 공개 번호 20090111119에서 기재된 바와 같이 효모계 염색체 시스템에서, 사용에 앞서 활성으로 선별될 수 있다. 뉴클레아제 발현 작제물은 당해 분야에서 공지된 방법을 이용하여 쉽게 설계될 수 있다.

[0147] 융합 단백질의 발현은 항시성 프로모터 또는 유도성 프로모터, 예를 들어 라피노오스 및/또는 갈락토오스의 존재 하에 활성화되는 (탈-억제되는) 그리고 글루코스의 존재 하에 억제되는 갈락토키나제 프로모터의 제어 하일 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터는, 예를 들어 고친화도 결합 부위의 봉입체를 통해, 융합 단백질의 발현을 자기-조절한다. *참고, 예를 들면,* 미국 출원 번호 61,955,002, 2014년 3월 18일 출원.

[0148] **전달**

[0149] 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드 (*예를 들면*, Htt 리프레서) 및 본 명세서에서 기재된 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물은, 예를 들어, 단백질의 주사로, mRNA를 통해 및/또는 발현 작제물 (*예를 들면,* 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, AAV 벡터, Ad 벡터, 등)을 이용하는 것을 포함하는 임의의 적당한 수단에 의해 표적 세포에 전달될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 리프레서는 AAV9를 이용하여 전달된다.

[0150] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 징크 핑거 단백질을 포함하는 단백질 전달 방법은, 예를 들어, 하기에서 기재된다: 미국 특허 번호 6,453,242; 6,503,717; 6,534,261; 6,599,692; 6,607,882; 6,689,558; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824, 이들 모두의 개시내용은 그들 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨.

[0151] 비제한적으로, 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터, 등을 포함하는 임의의 벡터 시스템은 사용될 수 있다 *참고, 또한,* 미국 특허 번호 8,586,526; 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824, 그들 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨. 더욱이, 임의의 이들 벡터가 1종 이상의 DNA-결합 단백질-인코딩 서열을 포함할 수 있다는 것이 분명할 것이다. 따라서, 1종 이상의 Htt 리프레서가 세포에 도입되는 경우, 단백질 성분 및/또는 폴리뉴클레오타이드 성분을 인코딩하는 서열은 동일한 벡터 또는 상이한 벡터에서 운반될 수 있다. 다중 벡터가 사용되는 경우, 각각의 벡터는 하나 또는 다중 Htt 리프레서 또는 이의 성분을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다.

[0152] 종래의 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법은 세포 (*예를 들면*, 포유동물 세포) 및 표적 조직에서 조작된 Htt 리프레서를 인코딩하는 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 또한 *시험관내* 세포에 상기 리프레서 (또는 이의 성분)을 인코딩하는 핵산을 투여하는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 리프레서를 인코딩하는 핵산은 *생체내* 또는 *생체외* 유전자 요법 용도로 투여된다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 네이키드 핵산, 및 전달 비히클 예컨대 리포좀 또는 폴록사머로 복합체화된 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은, 세포에 전달 이후 어느 한쪽 에피솜 또는 통합된 게놈을 갖는, DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다. 유전자 요법 절차의 검토를 위하여, 참고 Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet,*British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada *등*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Bϕhm (eds.) (1995); 및 Yu *등*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

[0153] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 전기천공, 리포펙션, 미세주입, 바이오리스틱, 바이로좀, 리포좀, 면역리포좀,

다중양이온 또는 지질:핵산 콘주게이트, 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제-향상된 흡수를 포함한다. *예를 들면*, Sonitron 2000 시스템 (Rich-Mar)을 이용하는 초음파천공은 또한 핵산의 전달에 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 1종 이상의 핵산은 mRNA로서 전달된다. 또한 바람직한 것은 번역 효율 및/또는 mRNA 안정성을 증가시키기 위한 캡핑된 mRNAs의 용도이다. 특히 바람직한 것은 ARCA (항-가역적 캡 유사체) 캡 또는 이의 변이체이다. 참고 US 특허 US7074596 및 US8153773, 본 명세서에서 참고로 편입됨.

[0154] 추가의 예시적인 핵산 전달 시스템은 하기에 의해 제공된 것을 포함한다: Amaxa Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) 및 Copernicus Therapeutics Inc, (*참고* 예를 들어 US6008336). 리포펙션은 *예를 들면*, 미국 특허 번호 5,049,386; 4,946,787; 및 4,897,355)에서 기재되고 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다 (*예를 들면*, Transfectam™ 및 Lipofectin™ 및 Lipofectamine™ RNAiMAX). 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적당한 양이온성 및 중성 지질은 하기의 것을 포함한다: Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. 전달은 세포 (*생체외* 투여) 또는 표적 조직 (*생체내* 투여)에 대한 것일 수 있다.

[0155] 표적화된 리포좀 예컨대 면역지질 복합체를 포함하는, 지질:핵산 복합체의 제조는 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진다 (*참고, 예를 들면*, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese *등*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr *등*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy *등*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao *등*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad *등*, *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); 미국 특허 번호 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 및 4,946,787).

[0156] 추가의 전달 방법은 EnGeneIC 전달 비히클 (EDVs)에 전달되는 핵산 패키징의 사용을 포함한다. 이들 EDVs는 항체의 하나의 아암이 상기 표적 조직에 대하여 특이성을 갖고 다른 것이 EDV에 대하여 특이성을 갖는 이중특이적 항체를 이용하여 표적 조직에 구체적으로 전달된다. 항체는 EDVs를 표적 세포 표면에 제공하고 그 다음 EDV는 세포내이입에 의해 세포에 제공된다. 세포에서 일회, 내용물은 방출된다 (*참고* MacDiarmid *등* (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

[0157] 조작된 ZFPs, TALEs 또는 CRISPR/Cas 시스템을 인코딩하는 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 바디에서 특이적인 세포에 바이러스 표적화 그리고 핵에 바이러스 적재물 이동조절을 위한 고도로 방출된 공정을 이용한다 바이러스 벡터는 환자 (*생체내*) 직접적으로 투여될 수 있거나 이들은 *시험관내* 세포를 치료하기 위해 사용될 수 있고 변형된 세포는 환자에 (*생체외*) 투여된다. ZFPs, TALEs 또는 CRISPR/Cas 시스템의 전달을 위한 종래의 바이러스 기반 시스템은 유전자 전달을 위하여, 비제한적으로, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련, 백시니아 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함한다. 숙주 게놈에서 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-관련 바이러스 유전자 전달 방법으로 가능하고, 종종 삽입된 이식유전자의 장기간 발현을 초래한다. 추가적으로, 높은 형질도입 효율성은 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관측되었다.

[0158] 레트로바이러스의 굴성은, 표적 세포의 잠재 표적 집단을 팽창시키는, 외래 엔빌로프 단백질 편입에 의해 변경될 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분할 세포를 형질도입 또는 감염 그리고 전형적으로 고 바이러스 역가를 생산할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 상기 표적 조직에 좌우된다. 레트로바이러스 벡터는 외래 서열의 최대 6-10 kb에 대하여 패키징 수용력을 가진 *시스*-작용 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 *시스*-작용 LTRs는 벡터의 복제 및 패키징에 충분하고, 이들은 그 다음 영구적 이식유전자 발현을 제공하기 위해 표적 세포에 치료 유전자를 통합하는데 사용된다. 널리 사용된 레트로바이러스 벡터는 마우스 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이들의 조합에 기반된 것을 포함한다 (*참고, 예를 들면,* Buchscher *등*, *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann *등*, *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt *등*, *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson *등*, *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller *등*, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

[0159] 일시적 발현이 바람직한 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템은 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 초고 형질도입 효율이 가능하고 세포 분할을 요구하지 않는다. 상기 벡터로, 고역가 및 높은 수준의 발현은 수득되었다. 상기 벡터는 상대적으로 단순한 시스템에서 대량으로 생산될 수 있다. 아데노-관련 바이러스 ("AAV") 벡터는, *예를 들면*, 핵산 및 펩타이드의 *시험관내* 생산에서, 그리고 *생체내* 및 *생체외* 유전자 요법 절차를 위하여, 표적 핵산으로 세포를 형질도입하는데 또한 사용된다 (*참고, 예를 들면*, West *등*, *Virology* 160:38-47 (1987); 미국 특허 번호 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, *HumanGene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka,*J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). 재조합 AAV 벡터의 작제는, 하기를 포함하는, 수많은 공

보에서 기재된다: 미국 특허 번호 5,173,414; Tratschin 등, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, 등, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka,*PNAS* 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski 등, *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989).

[0160] 적어도 6 바이러스 벡터 접근법은, 형질도입 제제를 생성하기 위해 헬퍼 세포주에 삽입된 유전자에 의해 불량성 벡터의 상보성을 포함하는 접근법을 이용하는, 임상시험에서 유전자 전달에 현재 이용가능하다.

[0161] pLASN 및 MFG-S는 하기에서 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다: 임상시험 (Dunbar 등, *Blood* 85:3048-305 (1995); Kohn 등, *Nat. Med.* 1:1017-102 (1995); Malech 등, *PNAS* 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN은 유전자 요법 실험에서 사용된 제1 치료 벡터이었다. (Blaese 등, *Science* 270:475-480 (1995)). 50% 이상의 형질도입 효율성은 MFG-S 패키징된 벡터에 대하여 관측되었다. (Ellem 등, *Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997); Dranoff 등, *Hum.Gene Ther.* 1:111-2 (1997).

[0162] 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터 (rAAV)는 불량성 및 비병원성 파보바이러스 아데노-관련 유형 2 바이러스에 기반된 유망한 대안적인 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 이식유전자 발현 카세트를 측접하는 AAV 145 bp 역전된 말단 반복부만을 보유하는 플라스미드로부터 유래된다. 형질도입된 세포의 게놈 속에 통합 때문에 효율적인 유전자 전달 및 안정적인 이식유전자 전달은 이러한 벡터 시스템에 핵심 특징이다. (Wagner 등, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998), Kearns 등, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)). AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8AAV 8.2, AAV9, 및 AAV rh10 및 모조타이핑된 AAV 예컨대 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6을 포함하는, 다른 AAV 혈청형은 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, AAV9는 사용된다.

[0163] 복제-결핍된 재조합 아데노바이러스 벡터 (Ad)는 고역가로 생산될 수 있고 수많은 상이한 세포 유형을 쉽게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 이식유전자가 Ad E1a, E1b, 및/또는 E3 유전자를 대체하고; 그 뒤에 복제 불량성 벡터가 *트랜스*로 결실된 유전자 기능을 공급하는 인간 293 세포에서 번식되도록 조작된다. Ad 벡터는, 비분할, 분화된 세포 예컨대 간, 신장 및 근육에서 발견된 것을 포함하는, *생체내* 조직의 다중 유형을 형질도입할 수 있다. 종래의 Ad 벡터는 큰 운반 수용력을 갖는다. 임상시험에서 Ad 벡터의 사용의 예는 근육내 주사로 항종양 면역화를 위하여 폴리뉴클레오타이드 요법을 관여시켰다 (Sterman 등, *Hum.Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). 임상시험에서 유전자 전달용 아데노바이러스 벡터의 이용의 추가의 예는 하기를 포함한다: Rosenecker 등, *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sterman 등, *Hum.Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); Welsh 등, *Hum.Gene Ther.* 2:205-18 (1995); Alvarez 등, *Hum.Gene Ther.* 5:597-613 (1997); Topf 등, *Gene Ther.* 5:507-513 (1998); Sterman 등, *Hum.Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998).

[0164] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 상기 세포는, 아데노바이러스를 패키징하는, 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는, ψ2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에서 사용된 바이러스 벡터는 핵산 벡터를 바이러스 입자에 패키징하는 생산자 세포주에 의해 일반적으로 생성된다. 벡터는 (적용가능하면) 숙주에 차후의 통합 및 패키징을 위하여 요구된 최소 바이러스 서열을 전형적으로 함유하고, 다른 바이러스 서열은 발현되는 단백질을 인코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 누락 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 *트랜스* 로 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에서 사용된 AAV 벡터는 전형적으로 숙주 게놈에 패키징 및 통합을 위하여 요구되는 AAV 게놈으로부터 역전된 말단 반복 (ITR) 서열을 보유할 뿐이다. 바이러스 DNA는, 다른 AAV 유전자, 즉 *rep* 및 *cap*을 인코딩하는 헬퍼 플라스미드를 함유하는 세포주에서 패키징되지만, ITR 서열이 부족하다. 세포주는 헬퍼로서 아데노바이러스로 또한 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 유전자의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부족 때문에 상당한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로 오염은, *예를 들면*, 아데노바이러스가 AAV보다 더욱 감수성인 열 치료에 의해, 감소될 수 있다.

[0165] 많은 유전자 요법 적용에서, 유전자 요법 벡터가 고도의 특이성으로 특정한 조직 유형에 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스의 외면에서 바이러스 코트 단백질과 융합 단백질로서 리간드 발현에 의해 제공된 세포 유형에 대하여 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 관심 세포 유형에서 존재하도록 공지된 수용체에 대하여 친화성을 갖도록 선택된다. 예를 들어, Han 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995)는, 하기를 보고하였다: 몰로니 마우스 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린을 발현시키도록 변형될 수 있고, 재조합 바이러스가 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현시키는 특정 인간 유방암 세포를 감염시킨다. 상기 원리는 다른 바이러스-표적 세포 쌍까지 확장될 수 있고, 여기에서 표적 세포는 수용체를 발현시키고 바이러스는 세포-표면 수용체용 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현시킨다. 예를 들어, 섬유상 파아지는 사실상 임의의 선택된 세포 수용체에 대하여 특이적 결합 친화성을 갖는 항체 단편 (*예를 들면*, FAB 또

는 Fv)를 표시하도록 조작될 수 있다. 상기 설명이 주로 바이러스 벡터에 적용하여도, 동일한 원리는 비바이러스 벡터에 적용될 수 있다. 상기 벡터는 특이적인 표적 세포에 의한 흡수를 선호하는 특이적 흡수 서열을 함유하도록 조작될 수 있다.

[0166] 유전자 요법 벡터는, 아래에 기재된 바와 같이, 전형적으로 전신 투여 (예를 들면, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 또는, 뇌에 직접적인 주사를 포함하는, 두개내 주입) 또는 국소 도포에 의해, 개별 환자에 투여에 의해 생체내 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 *생체외* 세포, 예컨대 개별 환자로부터 외식편된 세포 (*예를 들면*, 림프구, 골수 천자, 조직 생검) 또는 보편적인 공여체 조혈 줄기 세포에 전달될 수 있고, 그 다음, 일반적으로 벡터를 편입한 세포에 대한 선택 이후, 환자에 세포를 재이식할 수 있다.

[0167] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 조성물 (*예를 들면,* 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질)은 직접적으로 *생체내 전달된다.* 조성물 (세포, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질)은, 뇌 또는 척수에 비제한적으로 직접적인 주사를 포함하는, 중추신경 시스템 (CNS)에 직접적으로 투여될 수 있다. 비제한적으로, 해마, 흑질, 마이너트 기저핵 (NBM), 선조체 및/또는 피질을 포함하는, 뇌의 1종 이상의 영역은 표적화될 수 있다. CNS 전달에 더하여 또는 대안적으로, 조성물은 전신으로 투여될 수 있다 (*예를 들면*, 정맥내, 복강내, 심장내, 근육내, 척추강내, 피하, 및/또는 두개내 주입). (직접적으로 CNS에 포함하는) 대상체에 직접적으로 본 명세서에서 기재된 바와 같이 조성물의 전달 방법 및 조성물은 비제한적으로 바늘 어셈블리를 통한 직접적인 주사 (*예를 들면,* 뇌정위적 주사)를 포함한다. 상기 방법은, 예를 들어, 뇌에 (발현 벡터를 포함하는) 조성물의 전달에 관련하는, 미국 특허 번호 7,837,668; 8,092,429 및 미국 특허 공개 번호 20060239966에서 기재되고, 그들 전체가 본 명세서에서 참고로 편입된다.

[0168] 투여되는 효과적인 양은 환자별로 그리고 투여 방식 및 투여 부위에 따라 다양할 것이다. 따라서, 효과적인 양은 조성물을 투여하는 의사에 의해 최상으로 결정되고 적절한 복용량은 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 통합 및 발현에 대하여 충분한 시간 (전형적으로 4-15 일, 예를 들어)을 허용한 이후, 혈청 또는 치료 폴리펩타이드의 다른 조직 수준의 분석 그리고 투여에 앞서 초기 수준과 비교는 투여된 양이 너무 적은지, 올바른 범위 내인지 또는 너무 많은지를 결정할 것이다. 초기 및 차후의 투여에 대하여 적당한 레짐은 또한 가변성이지만, 초기 투여 그 다음 필요하면 차후의 투여에 의해 유형화된다. 차후의 투여는, 매일 내지 연간 내지 매수년 범위의, 가변성 간격으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 바이러스 벡터 예컨대 AAV를 이용하는 경우, 투여된 용량은 1 x 10^{10} 내지 5 x 10^{15} vg/ml (또는 그들사이 임의의 값), 더욱더 바람직하게는 1 x 10^{11} 내지 1 x 10^{14} vg/ml (또는 그들사이 임의의 값), 더욱더 바람직하게는 1 x 10^{12} 내지 1 x 10^{13} vg/ml (또는 그들사이 임의의 값)이다.

[0169] 인간 뇌에 직접적으로 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터를 이용하여 ZFPs를 전달하기 위해, 선조체당 1x10^{10}-5x10^{15} (또는 예를 들어 1 x 10^{11} 내지 1 x 10^{14} vg/ml 또는 1 x 10^{12} 내지 1 x 10^{13} vg/ml를 포함하는, 그들사이 임의의 값) 벡터 게놈의 용량 범위는 적용될 수 있다. 지적된 바와 같이, 복용량은 다른 뇌 구조에 대하여 그리고 상이한 전달 프로토콜에 대하여 다양해질 수 있다. 뇌에 직접적으로 AAV 벡터의 전달 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. *참고, 예를 들면,* 미국 특허 번호 9,089,667; 9,050,299; 8,337,458; 8,309,355; 7,182,944; 6,953,575; 및 6,309,634.

[0170] 진단, 연구, 또는 (예를 들면, 숙주 유기체에 형질감염된 세포의 재주입을 통한) 유전자 요법용 *생체외* 세포 형질감염은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진다. 바람직한 구현예에서, 세포는 대상체 유기체로부터 단리되고, 적어도 하나의 Htt 리프레서 또는 이의 성분으로 형질감염되고 대상체 유기체 (*예를 들면*, 환자)에 재-주입된다. 바람직한 구현예에서, Htt 리프레서의 1종 이상의 핵산은 AAV9를 이용하여 전달된다. 다른 구현예에서, Htt 리프레서의 1종 이상의 핵산은 mRNA로서 전달된다. 또한 바람직한 것은 번역 효율 및/또는 mRNA 안정성을 증가시키기 위한 캡핑된 mRNAs의 용도이다. 특히 바람직한 것은 ARCA (항-가역적 캡 유사체) 캡 또는 이의 변이체이다. 참고 미국 특허 7,074,596 및 8,153,773, 그들 전체가 본 명세서에서 참고로 편입됨. *생체외* 형질감염에 적당한 다양한 세포 유형은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진다 (*참고, 예를 들면*, Freshney *등*, *Cultureof Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)) 및 환자로부터 세포의 단리 및 배양 방법의 논의에 대하여 본 명세서에서 인용된 참조문헌).

[0171] 일 구현예에서, 줄기 세포는 세포 형질감염 및 유전자 요법에 대하여 *생체외* 절차에서 사용된다. 줄기 세포의 이용의 이점은 이들이 *시험관내* 다른 세포 유형으로 분화될 수 있거나, 이들이 골수에서 합체할 포유동물 (예컨대 세포의 공여체)에 도입될 수 있다는 것이다. 사이토카인 그와 같은 GM-CSF, IFN-γ 및 TNF-α를 이용하는 임

상적으로 중요한 면역 세포 유형으로 *시험관내* CD34+ 세포의 분화 방법은 공지된다 (*참고* Inaba *등*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

[0172] 줄기 세포는 공지된 방법을 이용하여 형질도입 및 분화를 위해 단리된다. 예를 들어, 줄기 세포는 하기를 결합시키는 항체로 골수 세포 패닝에 의해 골수 세포로부터 단리된다: 원치않는 세포, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ (T 세포), CD45+ (panB 세포), GR-1 (과립구), 및 Iad (분화된 항원 제시 세포) (*참고* Inaba *등*, *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

[0173] 변형된 줄기 세포는 또한 일부 구현예에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포자멸사에 저항성이게 만들어진 뉴런 줄기 세포는 줄기 세포가 또한 본 발명의 ZFP TFs를 함유하는 치료 조성물로서 사용될 수 있다. 세포자멸사에 대한 저항은, 예를 들어, 줄기 세포에서 BAX 및/또는 BAK using BAX- 또는 BAK-특이적 TALENs 또는 ZFNs (참고, 미국 특허 번호 8,597,912), 또는, 예를 들어 카스파제-6 특이적 ZFNs를 재차 이용하는, 카스파제에서 파괴되는 것의 녹아웃을 발생시킬 수 있다. 이들 세포는 돌연변이체 또는 야생형 Htt를 조절하도록 공지되는 ZFP TFs 또는 TALE TFs로 형질감염될 수 있다.

[0174] 치료 ZFP 핵산을 함유하는 벡터 (*예를 들면*, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 리포좀, 등)은 또한 *생체내* 세포의 형질도입을 위하여 유기체에 직접적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 DNA는 투여될 수 있다. 투여는, 비제한적으로, 주사, 주입, 국소 도포 및 전기천공을 포함하는 혈액 또는 조직 세포와 최종적인 접촉에 분자를 도입하기 위하여 정상적으로 사용된 임의의 경로에 의한 것이다. 상기 핵산의 적당한 투여 방법은 이용가능하고 당해 분야의 숙련가에 잘 알려지고, 1 초과 경로가 특정한 조성물을 투여하는데 사용될 수 있어도, 특정한 경로는 종종 또 다른 경로보다 더욱 즉각적인 및 더욱 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0175] 조혈 줄기 세포에 DNA의 도입 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,928,638에서 개시된다. 조혈 줄기 세포, *예를 들면*, $CD34^+$ 세포 속에 이식유전자의 도입에 유용한 벡터는 아데노바이러스 유형 35를 포함한다.

[0176] 면역 세포 (*예를 들면*, T-세포) 속에 이식유전자의 도입에 적당한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터를 포함한다. *참고*, 예를 들어, Naldini *등* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11382-11388; Dull*등* (1998) *J. Virol.* **72**:8463-8471; Zuffery*등* (1998) *J. Virol.* **72**:9873-9880; Follenzi *등* (2000) *Nature Genetics* **25**:217-222.

[0177] 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 투여된 특정한 조성물에 의해, 뿐만 아니라 조성물을 투여하는데 사용된 특정한 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 아래 기재된 바와 같이, 이용가능한 약제학적 조성물의 다양한 적당한 제형이 있다 (*참고, 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., 1989).

[0178] 전술한 바와 같이, 개시된 방법 및 조성물은, 비제한적으로, 원핵 세포, 진균 세포, 고세균 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 척추동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포를 포함하는 세포의 임의의 유형에서 사용될 수 있다. 단백질 발현을 위하여 적당한 세포주는 당해 분야의 숙련가에 공지되고, 비제한적으로 하기를 포함한다: COS, CHO (*예를 들면*, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (*예를 들면*, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), perC6, 곤충 세포 예컨대 *스포도프테라 푸기페르다* (Sf), 및 진균 세포 예컨대 *사카로마이세스*, *피스키아* 및 *쉬조사카로마이세스*. 이들 세포주의 자손, 변이체 및 유도체는 또한 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 방법 및 조성물은, 예를 들어 선조체에서, 뇌 세포에 직접적으로 전달된다.

[0179] **적용**

[0180] 본 명세서에서 기재된 바와 같이 Htt-결합 분자 (*예를 들면*, ZFPs, TALEs, CRISPR/Cas 시스템, Ttago, 등), 및 이들을 인코딩하는 핵산은 다양한 적용을 위하여 사용될 수 있다. 이들 적용은 (DNA-결합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는) Htt-결합 분자가 대상체 (*예를 들면*, AAV 예컨대 AAV9)에 투여되는 그리고 대상체 이내 표적 유전자의 발현을 조절하는데 사용되는 치료 방법을 포함한다. 조절은, 억제, 예를 들어, HD 질환 상태에 기여하는 mHtt의 억제의 형태일 수 있다. 대안적으로, 조절은 내인성 세포 유전자의 발현 또는 증가된 발현의 활성화가 이환 상태를 완화시킬 수 있는 경우 활성화의 형태일 수 있다. 더욱 추가 구현예에서, 조절은, 예를 들어, 돌연변이체 Htt 유전자의 불활성화를 위하여 (*예를 들면*, 1종 이상의 뉴클레아제에 의한) 절단일 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 적용을 위하여, Htt-결합 분자, 또는 더욱 전형적으로, 이들을 인코딩하는 핵산은 약제학적 조성물로서 약제학적으로 허용가능한 캐리어와 함께 제형화된다.

[0181] Htt-결합 분자, 또는 이들을 인코딩하는 벡터는, 다른 적당한 성분 (*예를 들면* 리포좀, 나노입자 또는 당해 분

야에서 공지된 다른 성분)과 조합으로 또는 단독으로, 흡입을 통해 투여되도록 에어로졸 제형으로 만들어질 수 있다 (즉, 이들은 "분무"될 수 있다). 에어로졸 제형은 가압된 허용가능한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소, 및 동종에 배치될 수 있다. 예컨대, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 진피내, 및 피하 경로에 의한, 비경구 투여에 적당한 제형은, 산화방지제, 완충제, 정균제, 및 의도된 수령체의 혈액으로 제형을 등장으로 만드는 용질을 함유할 수 있는, 수성 및 비-수성, 등장 멸균된 주사 용액, 그리고 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균된 현탁액을 포함한다. 조성물은, 예를 들어, 정맥내 주입에 의해, 경구로, 국소적으로, 복강내로, 방광내로, 두개내로 또는 척추강내로 투여될 수 있다. 화합물의 제형은 유닛-용량 또는 다중-용량 밀봉된 컨테이너, 예컨대 앰풀 및 바이알로 존재할 수 있다. 주사 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 from 멸균된 분말, 과립, 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0182] 환자에 투여된 용량은 경시적으로 환자에서 유익한 치료 반응을 유효화하는데 충분해야 한다. 용량은 이용된 특정한 Htt-결합 분자의 효능 및 K_d, 표적 세포, 그리고 환자의 병태, 뿐만 아니라 치료받는 환자의 체중 또는 표면적에 의해 결정된다. 용량의 크기는 또한 특정한 환자에서 특정한 화합물 또는 벡터의 투여를 수반하는 임의의 부정적인 부작용의 존재, 성질, 및 정도에 의해 결정된다.

[0183] 유익한 치료 반응은 수많은 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 헌팅턴 관련 운동 장애 예컨대 비자발적인 떨림 또는 몸부림 운동, 근육 문제, 예컨대 강성/경직성 또는 근육 구축 (긴장이상), 느린 또는 비정상 눈 운동, 손상된 보행, 자세 및 밸런스, 말하기 또는 저작의 물리적 생산의 어려움 그리고 자발적인 운동의 손상에서 개선은 측정될 수 있다. 다른 손상, 예컨대 인지 및 정신과 장애는 치료와 관련된 개선의 징후에 대하여 또한 모니터링될 수 있다. UHDRS 척도는 질환의 임상 특징을 정량화하는데 사용될 수 있다.

[0184] 사전증상인 환자에 대하여, 치료는 HD에서 발생하는 광범위한 신경퇴행에 앞서 질환을 치료하기 위한 기회를 제공하기 때문에 특히 중요할 수 있다. 이러한 손상은 상기 기재된 명백한 증상의 발생에 앞서 개시한다. HD 병리학은 선조체 중간 돌기 뉴런에서 돌연변이체 Htt의 독성 효과를 주로 포함한다. 이들 중간 돌기 뉴런은 유전자 전사 인자, 신경전달물질 수용체 및 전압 개폐 채널에서 관여되는 cAMP 및 cGMP 신호전달 캐스케이드를 조절하는 포스포디에스테라제 10A (PDE10A)의 높은 수준을 발현시키고 (Niccolini 등 (2015) *Brain* 138:3016-3029), PDE10A의 발현이 HD 마우스에서 감소되는 것으로 나타났고 인간내 사후 연구가 동일한 것을 발견하였다. 최근에, PDE10A 효소 (*예를 들면* ^{11}C-IMA107, (Niccolini 등, *상기 참조*; ^{18}FMNI-659 (Russell 등 (2014) *JAMA Neurol* 71(12):1520-1528)용 리간드인 양전자 방출 단층촬영 (PET) 리간드는 개발되었고, 이들 분자는 사전증상 HD 환자를 평가하는데 사용되었다. 연구는 심지어 증상이 발생하기 전에 PDE10A 수준이 HD 환자에서 변경되는 것으로 나타났다. 따라서, PET에 의한 PDE10A 수준의 평가는 본 발명의 조성물의 치료 효능을 측정하기 위해 치료 이전, 동안 및 이후 실시될 수 있다. "치료 효능"은 임상 및 분자 측정의 개선을 의미할 수 있고, 또한 중간 돌기 뉴런 기능에서 임의의 추가 감소 또는 돌기 뉴런 손실에서 증가, 또는 HD와 관련된 명백한 임상 설명의 추가 발생으로부터 환자 보호를 의미할 수 있다.

[0185] 하기 실시예는 Htt-조절물질이 징크 핑거 단백질을 포함하는 본 개시내용의 예시적인 구현예에 관한 것이다. 이것이 단지 실례의 목적을 위한 것이고, 비제한적으로, TALE-TFs, CRISPR/Cas 시스템, 추가의 ZFPs, ZFNs, TALENs, 추가의 CRISPR/Cas 시스템 (예를 들면, Cfp 시스템), 조작된 DNA-결합 도메인을 가진 귀소 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제)를 포함하는, 다른 Htt-조절물질 (예를 들면, 리프레서)가 사용될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

[0186] 실시예

[0187] **실시예 1: Htt 리프레서**

[0188] Htt에 표적화된 징크 핑거 단백질 45643 및 46025 (참고 표 1)은 하기에서 기재된 바와 같이 본질적으로 조작되었다: 미국 특허 번호 6,534,261; 미국 특허 공개 번호 20150056705; 20110082093; 20130253040; 및 미국 출원 번호 14/706,747. 표 1은 이들 ZFPs의 DNA 결합 도메인의 인식 나선을 보여주고, 한편 표 2는 이들 ZFPs의 상기 표적 서열을 보여준다. ZFPs는 평가되었고 그것의 표적 부위에 결합되는 것으로 나타났다.

[0189] ZFPs 45643 및 46025는 KRAB 억제 도메인에 작동가능하게 연결되어 Htt를 억제시키는 ZFP-TF를 형성하였다. ZFP TFs는 인간 세포 (*예를 들면,* HD 환자로부터 유래된 세포)에 형질감염되었고 Htt의 발현은 실시간 RT-PCR을 이용하여 모니터링되었다. 양쪽 ZFP-TFs는 돌연변이체 Htt 발현을 선택적으로 억제에서 효과적인 것으로 밝혀졌다. ZFP-TFs는 mRNA 형태로, Ad 벡터, 렌티바이러스 벡터로 및/또는 AAV 벡터 (*예를 들면,* AAV9)로 플라스미드로서 제형화된 경우 기능성 리프레서이다.

[0190] **실시예 2: 물질 및 방법**

[0191] *동물*. 2마리 붉은털원숭이 (*붉은털원숭이*, 4-15 연령, >4kg)은 이 연구에 포함되었다. 실험은 Institutional Animal Care and Use Committee at University of California San Francisco에 의해 승인된 프로토콜 및 국립 건강 연구소 지침에 따라 수행되었다.

[0192] *벡터 제조*. 사이토메갈로바이러스 프로모터의 제어하에 AAV9-함유 녹색 형광 단백질 (GFP)은 하기에서 이전에 기재된 바와 같이 HEK-293 세포의 삼중 형질감염에 의해 생성되었다: Matsushita 등 (1998) *Gene Ther* 5: 938-945. AAV9-GFP는 포스페이트-완충 식염수 및 0.001% (vol/vol) 플루론산 F-68내 1.4 x 10^{13} vg/ml (고용량) 또는 1.4 x 10^{12} vg/ml (저용량)의 농도로 사용 직전 희석되었다.

[0193] *수술 및 벡터 주입*. 각각의 NHP는 두개골-실장된, MR-양립가능한 일시적 플라스틱 플러그의 뇌정위적 배치를 경험하였다. 동물은 그 다음 MRI-양립가능한 뇌정위적 프레임에서 반듯이 누운채 배치되었다. 두개골절제 이후, 캐뉼라-가이드는 양쪽 반구 위에 두개골에 고정되었다. 플러그의 배치 이후, 관삽입된 동물은 MRI 스위트에서 플랫폼 테이블로 이동되었고 흡입된 이소플루란 (1-3%)상에 배치되었다. 멸균된 조건하에 가이드는 MR 이미지에서 플러그를 국재화하기 위해 MR-가시적인 추적자 (Prohance, Singem, Germany)로 충전되어 뇌 내부에서 표적 구조에 대한 탄도를 계산하였다. 그 다음, NHP는 MR 자석에 이동되었고 고-해상도 해부상의 MR 스캔은 표적 확인 및 수술 계획을 위하여 획득되었다. 상기 표적이 선택된 이후, 3-mm 계단형 팁을 가진 통상-설계된, 세라믹, 융합된 실리카 환류-저항성 캐뉼라는 하기에서 이전에 기재된 바와 같이 벡터 주입을 위하여 사용되었다: Richardson 등. (2011) *Mol Ther* 19: 1048-1057; Krauze 등 (2005) *J Neurosurg* 103: 923-929; and Fiandaca 등 (2008). *Neurotherapeutics* 5: 123-127.

[0194] 캐뉼라는 MRI-양립가능한 주입 펌프 (Harvard Apparatus, Boston, MA)에 실장된 1-ml 주사기에 부착되었다. 주입은 1 ㎕/min에서 개시하였고, 캐뉼라 팁에서 주입액 시각화 이후, 캐뉼라는 뇌에 가이드-스템을 통해 도입되었다. 깊이 조절장치가 가이드-스템의 최상부를 마주친 경우, 잠금 스크류로 고정되었다. 주입 속도는 초기 1 ㎕/min에서 최종 5 ㎕/min까지 급격상승되었다. 각각의 NHP는 각각의 조가비핵 (양측)에서 사전- 및 사후-교련 조가비핵을 동시에 커버하는 주입을 받았다. 반구당 총 주입 용적은 양쪽 반구에서 100 ml이었다. 일단 주입이 종료되면, 가이드-디바이스는 두개골에서 제거되었고, 동물은 그것의 집우리로 복귀되었고 마취에서 회복 동안 모니터링되었다.

[0195] *MRI 취득*. 동물은 Siemens Verio Magnetom 3.0T MRI (Siemens, Malvern, PA)에서 스캐닝되었다. 제1 스캔에서 4° 플립 각으로 수득된 T1-계량된 빠른 저각도 샷 (플래시) 취득은 캐뉼라 팁 (8 ms TE, 28 ms TR, 3 여기, 256 x 3 x 192 매트릭스, 14 x 14 mm 시야, 1 mm 슬라이스)에서 가돌리늄을 추적하기 위해 양성자-밀도 계량된 이미지를 생산하였다. 모든 차후의 스캔은 40° 플립 각에서 연속으로 획득되어 T1-칭량을 증가시키고 Gd 신호 향상을 집중하였다.

[0196] *조직 가공*. AAV9로 주입된 동물은 차가운 염수 그 다음 4% 파라포름알데하이드로 AAV-GFP 주입 이후 대략 3 주에서 경심관류로 살포되었다. 뇌는 수확되었고 이전에 확립된 방법을 이용하여 조직학적으로 분석되었다. 요약하면, 6mm 관상 블록은 뇌 매트릭스를 통해 수집되었고 파라포름알데하이드에서 밤새 사후-고정된 다음, 다음 날 30% (w/v) 수크로오스에서 동결보호되었다. 슬라이딩 마이크로톰은 40-㎛ 연속 섹션을 절단하는데 사용되었다. 크로마제닉 염색은 우리가 이전에 확립한 방법에 의해 GFP 발현을 시각화하기 위해 자유-부유 섹션에서 수행되었다.

[0197] *면역조직화학*. 각각의 혈청형에 대하여, 섹션은 순서대로 수집되었고, 추가 가공까지 4° C에서 동결보호제 용액 (0.5 M 나트륨 인산염 버퍼, pH 7.4, 30% 글리세롤, 및 30% 에틸렌 글리콜)의 100-웰 컨테이너에서 저장되었다. 면역조직화학은 자유-부유 섹션에서 수행되었다. 간단히, 홀스래디쉬 페록시다아제 (HRP)계 절차를 위하여 PBS로, 또는 형광 염색을 위하여 0.1% Tween 20 (PBST)를 가진 PBS에서 세정은 각각의 면역조직화학 단계 사이 수행되었다. (페록시다아제계 절차를 위하여) 내인성 페록시다아제 활성은 30 분 동안 실온에서 켄칭되었다. 비-특이적 염색의 차단은 60 분 동안 실온에서 PBST내 20% 말 혈청의 섹션의 인큐베이션에 의해 달성되었다. 그 후에, 섹션은 밤새 특이적 1차 항체로 인큐베이션되었다. 면역조직화학 절차에서 사용된 1차 항체는 아래와 같았다: 다클론성 토끼 항-Iba1, PAb, 1:500 (www.biocare.net/); HRP계 염색을 위하여 단클론성 마우스 및 항-GFAP, 1:10,000 그리고 형광을 위하여 다클론성 토끼 및 항-GFAP 1:1000 (www.millipore.com); HRP계 염색을 위하여 단클론성 마우스 항-NeuN, 1:5,000 그리고 형광 염색을 위하여 1:500 (Millipore); 단클론성 및 마우스 항-TH, 1:1000 (Millipore, MAB318); 다클론성 마우스 및 단클론성 토끼 항-GFP, 1:200 및 1:500, 각각, (Life

Technologies; Millipore). 모든 항체는 Da Vinci 희석제 (Biocare)에 용해되었다. PBS에서 5분 동안 실온에서 3 린스 이후, HRP계 염색을 위한 섹션은 어느 한쪽 Mach 2 항-마우스 HRP 폴리머 (Biocare) 또는 March 2 항-토끼 HRP 폴리머 (Biocare)로 1시간 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 결합된 HRP의 활성은 3,3'-디아미노벤지딘 과산화물 기질 (Vectro Labs)을 가진 상업적으로 입수가능한 키트로 시각화되었다. NeuN-염색된 섹션은 Cresyl Violet 염색으로 대조염색되었다. 마지막으로, 면역염색된 섹션은 젤라틴화된 슬라이드상에 실장되었고, 알코올 및 자일렌에서 탈수되었고 Cytoseal쩨 (Fisher Scientific)으로 크로스슬립되었다.

[0198] 상이한 항원 (GFP/GFAP, GFP/NeuN, GFP/TH, 및 GFP/Iba1)의 이중 형광 면역염색을 위하여, 1차 항체의 조합은 4° C에서 밤새 인큐베이션에 의한 1차 항체의 칵테일로서 섹션에 적용되었다. 모든 1차 항체는 DaVinci 희석제 (diliuent) (Biocare)에 용해되었다. PBST에서 3 세정 이후, 단클론성 1차 항체는 암실에서 2시간 동안 적절한 2차 형광색소-접합된 항체로 인큐베이션에 의해 시각화되었다: 염소 항-마우스 DyLight 549 (적색) (Biocare), 염소 항-토끼 DyLight 549, 당나귀 항-토끼 Alexa Fluor 555 (Life Technologies), 염소 항-마우스 DyLight 488 (녹색), 염소 항-토끼 DyLight 488, 및 당나귀 항-토끼 Alexa Fluor 488. 모든 2차 항체는 형광 항체 희석제 (Biocare)의 1:1,000 희석액에서 용해되었다. 섹션은 Vectashield Hard Set, Mounting Medium for Fluorescence (Vector Labs)로 크로스슬립되었다. 대조군 섹션은 1차 항체 없이 가공되었고, 상당한 면역염색은 이들 조건 하에 관측되지 않았다.

[0199] *세미-정량적 분석.* 분포 용적 (Vd) 분석은 Brainlab iPlan Flow Suite(Brainlab, Munich,Germany; www.brainlab.com)으로 수행되었다. 주입 부위, 캐뉼라 트랙 및 캐뉼라 팁은 관상면, 축상면 및 시상면에서 T1-계량된 MR 이미지로 확인되었다. 관심 영역 (ROIs)은 T1 가돌리늄 신호를 개요하기 위해 그리고 조가비핵을 표적하기 위해 기술되었다. 이미지 시리즈 및 ROI의 3차원 용적측정 재작제는 주입의 추정된 Vd 및 주입액 (Vi)의 총 용적에 대해 이의 비를 결정하기 위해 분석되었다.

[0200] *뇌 섹션의 분석.* 모든 가공된 섹션은 검사되었고 CCD 컬러 비디오 카메라 및 이미지 분석 시스템이 구비된 Zeiss Axioskop 현미경 (Zeiss) (Axiovision Software; Zeiss)에서 디지털 방식으로 촬영되었다. 각각의 원숭이에 대하여, GFP-양성 및 NeuN-양성 세포의 수는 조가비핵을 통해 관상 섹션으로부터 양쪽 반구에서 결정되었다. 형광 현미경검사는 섹션에서 이중-표지된 세포의 수를 결정하는데 사용되었다. 이중-표지된 섹션용 현미경 사진은 섹션 또는 초점의 위치 변겨 없이 2개의 별도의 채널 (적색-로다민 및 녹색-플루오레신 이소티오시아네이트; 공-국재화는 황색처럼 보인다) (ApoTome 방식으로 대물렌즈 x 20 및 x 40, Carl Zeiss 현미경검사)로부터 이미지 출현에 의해 수득되었다. 각각의 이중 염색을 위하여, 섹션은 주사의 부위로부터 ~500-㎛ 거리에서 전측 및 후측 선택되었다. GFP/NeuN, GFP/GFAP, GFP/TH 및 GFP/Iba1을 발현하는 세포의 분율을 확인하기 위해, 각각의 섹션은 첫째 표현형-특이적 세포 (TH, GFAP, Iba1, 또는 NeuN)의 존재에 대한 하나의 채널 그리고 둘째 공-염색된 세포의 수에 대한 조합된 채널에 의해 분석되었다.

[0201] NeuN 및 GFP를 위하여 염색된 섹션은 조가비핵 (양측)에서 주사 부위의 3 상이한 수준에서 3 섹션으로부터 카운팅을 위하여 사용되었다. NeuN 양성 및 GFP 양성 세포는 양쪽 형질도입된 면적에서 5 무작위로 획득된 프레임 (350 μm^2)으로부터 200-배 배율로 카운트되었다. 비-형질도입된 면적에서, 5 무작위화된 프레임은 발현의 한정된 경계로부터 350㎛의 거리에서 취득되었다. 이들이 *생체내* 형질도입된 세포의 총 수를 반영하지 않아도, 이들 분석은 벡터의 정량적 비교를 허용하였다. 각각의 샘플링된 영역에서 세포 카운트는 각각의 동물에 대하여 섹션을 거쳐 평균화되었고 최종 데이터는 NeuN 양성 및 GFP 양성의 평균 수로서 나타난다.

[0202] **실시예 3: 주입 및 형질도입 효율**

[0203] 우리는 AAV2가 랫트 및 비-인간 영장류 (NHP) 뇌의 실질에 주입되는 경우 뉴런을 따라 전행성 방향에서 수송되는 신경친화성 벡터인 것을 이전에 보여주었다. *참고, 예를 들면,* Ciesielska 등 (2011). *Mol Ther* 19: 922-927; Kells 등 (2012) *Neurobiol Dis* 48: 228-235. 벡터가 원위 뉴런을 형질도입할 수 있는 돌출 신경 말단으로부터 분명하게 방출되는 온전한 바이러스 입자의 상기 수송은 충분히 강력하다. 따라서, NHP 시상에 AAV2의 주입은 피질 내에 전적으로 함유된 피질 뉴런의 강력한 형질도입을 초래하였다. 그에 반해서, AAV6은 축색돌기를 따라 역행성 방향으로 수송되고 AAV2처럼 거의 신경친화성이다. *참고, 예를 들면,* Salegio 등 (2012) *Gene Ther*. 20(3):348-52; San Sebastian 등 (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183. 예를 들어, NHP 조가비핵의 형질도입은 피질-선조체 뉴런의 이식유전자 발현을 초래한다.

[0204] 상기 연구에서, 2 NHPs는 어느 한쪽 고용량 (HD; 좌 반구; 1.5 x 10^{13} vg/mL) 또는 저용량 (LD; 우 반구; 1.5 x 10^{12} vg/mL)로 AAV9-GFP의 조가비핵성 주입을 받았다. 수술후 생활 상은 하기에서 이전에 기재된 바와 같이 GFP

에 세포-매개된 반응에서 발생하는 잠재적인 혼동을 제한하기 위해 의도적으로 짧게 (3 주) 유지되었다: Ciesielska 등. (2013) *Mol Ther* 21: 158-166; Samaranch 등 (2014) *Mol Ther* 22: 329-337.

[0205] MRI에서 가돌리늄-향상된 신호의 분포는 하기에서 이전에 기재된 바와 같이 용적측정으로 평가되었다: Richardson 등 (2011) *Stereotact FunctNeurosurg* 89:141-151. 결과는 도 1에서 보여진다. 영장류 조가비핵의 근사 형상이 후측 부분을 향하여 협소화하는 전측 단부에서 더 넓은 단면으로 시상 배향에서 어느 정도 원뿔형인 것이 유의되어야 한다. MRI 콘트라스트 시약에 의한 조가비핵의 적용범위는, 그러나, 거의 완전하다. GFP와 가돌리늄 신호 사이 중첩은 주입액이 조가비핵의 전측 및 내측 부분에서 누출이 거의 없이 양호하게 함유되고, MR 이미지 콘트라스트 면적의 3배 면적으로 팽창되는 것을 나타냈다. GFP 발현용 면역조직화학 염색은 주입의 공간적 한계 이내 다양한 관상 수준에서 MR 이미지의 기준선 서열로부터 재작제된 조가비핵의 개요에 대해 겹쳐졌고 설명되었다. 이것은 이식유전자의 발현이 MRI 신호와 거의 정확하게 상관하였던 AAV2로 보여진 것과 상당히 상이하였다 (Fiandaca 등 (2009) *Neuroimage* 47 Suppl2: T27-35).

[0206] 더욱이, 강력한 리포터 발현은 세포 바디 및 뉴런 섬유의 존재도로 HD 및 LD 피각 양쪽에서 분명하였다 (도 2A 내지 2D). 우리는, 이전에 기재된 방법에 기반하여, 캐뉼라 트랙의 면에서 형질도입의 1차 면적 (PAT; mm^2) 전반에 걸쳐 면역형광에 의한 GFP+/NeuN+ 뉴런을 카운팅하였다 (Ciesielska 등 (2013) *Mol Ther* 21:158-166). GFP-양성 뉴런 발현의 강도는, PAT "외부" (oPAT)로서 이후에 기재된 바와 같이, 형질도입된 면적으로부터 구별되는 주변 ≤350를 따라 신속하게 줄어들었다. 연구의 상기 일부에서, 우리는 벡터-의존적 효과를 확인하기 위해 PAT 및 oPAT에서, 뿐만 아니라 2 건강한, 미접촉 원숭이로부터 가공된 조가비핵성 섹션에서 NeuN+ 세포 바디 카운팅을 수행하였다.

[0207] 우리는 추가로 PAT 및 oPAT에서 형질도입의 효율이 뉴런 세포 바디에서 AAV9-매개된 형질도입 및 GFP 발현을 드러내는 것처럼 보이는 NeuN-양성 및 GFP-양성 표지에 관하여 용량에 의존적이었는지를 분석하였다. 비록 우리가 미세아교의 활성화 및 MHC-II 상향조절의 증거를 보았어도, 3 주가 아닌, AAV9-GFP 주입후 6 주 초과에서 분명한 항-GFP 반응의 상대적으로 느린 빌드-업의 우리의 이전의 관찰과 일치하는, AAV9-GFP 형질도입 때문에 임의의 뉴런 손실의 증거를 보지 못했다 (도 2E 내지 2H).

[0208] 뇌, 주로 하기에서 수많은 항원-제시용 기전이 있다: 별아교세포 (Cornet 등 (2000) *J Neuroimmunol* 106:69-77 및 미세아교 (Nelson 등 (2002) *Ann Med* 34:491-500). 주입 부위에서 뉴런 및 신경교 표적용 AAV9의 세포 특이성을 결정하기 위해, 우리는 뉴런용 NeuN 뉴런 마커, 별아교세포용 신경교 원섬유성 산 단백질 (GFAP), 및 Iba1, 마이크로신경교-특이적 마커를 포함하는, 이식유전자 및 세포-특이적 마커용 뇌를 면역염색하였다.

[0209] 도 3에서 나타낸 바와 같이, 각각의 세포 마커 드러난 이식유전자로 GFP에 대한 이중 면역형광 염색은 양쪽 뉴런 및 별아교세포에서 쉽게 발현되었고, 반면에 미세아교는 인접하는 세포 바디 및 뉴런 섬유에서 엄청난 GFP 발현에도 불구하고 형질도입되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 형질도입된 영역에서 미세아교의 활성화는 쉽게 관측가능하였고 (도 2E 내지 2H), 그것의 국부 환경의 타고난 면역 상태를 감지하는 미세아교의 능력을 나타내었다.

[0210] **실시예 4: 축삭 운반**

[0211] 조가비핵에 AAV9-GFP의 주입은 원위 구조에서 형질도입을 만들어냈다. GFP 염색은, 예를 들어, 전전두엽, 정면, 및 두정 피질의 세포 바디에서 관측되었다 (도 4). GFP-양성 세포 바디 및 섬유는 흑질 치밀부 (SNc) 및 그물부 (SNr)를 포함하는, 기저핵의 성분 및 시상, 뿐만 아니라 시상하 핵 (STN)에서 그리고 내측 전뇌 다발 (MFB)의 섬유에서 또한 존재하였다 (도 5). 원위 유전자좌에 축삭 운반의 강한 벡터 용량-의존이 있었다 (도 7). 따라서, AAV9의 낮지 않은 높은 용량은 조가비핵과 STN 사이 직접적인 뉴런 연결이 없다는 사실에도 불구하고 STN에서 세포 바디 표지화를 초래하였다. 우리는 이전에 상기 간접적인 전행성 수송을 AAV2로 기저핵 이내 (Ciesielska 등 (2011) *Mol Ther* 19:922-927, 및 Kells (2012), *상기 참조* 및 하기에서 주목하였다: 시상부터 피질까지 (Kells 등 (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2407-2411). 그러나, AAV9-GFP 수송의 상당한 용량-의존은 먼저 담창구에 그리고 그 다음 STN에 벡터의 2-단계 수송을 암시한다. AAV9의 전행성 수송은 조가비핵으로부터 SNr에 투사하는 섬유 마킹 뉴런의 존재와 흑질 치밀부 (SNr) 이내 GFP-양성 세포 바디의 존재에 의해 추가로 지지되었다 (도 6). 놀랍게도, 흑질 치밀부 (SNc)에서 세포 바디는 또한 GFP-양성이었고, SNc가 고도로 수지상 투사를 보내는 조가비핵으로부터 역행성 수송을 나타내었다. STN과 극적인 차이는 아니어도, 이들 면적에서 형질도입에 관한 AAV9-GFP의 명백한 용량 효과가 있었다.

[0212] 따라서, 우리는 AAV9가 양쪽 방향에서 축색돌기를 따라 수송되는 것을, 적어도 부분적으로 영장류 뇌에서 AAV9

의 현저한 분포를 설명하는 현상으로 결론지었다. AAV9는 축삭 운반 및 세포-유형 특이성에 관하여 AAV2 및 AAV6와 현저하게 상이하였다. AAV9는 미세아교가 아닌 뉴런 및 별아교세포를 형질도입하였다. 벡터는 양쪽 전행성 및 역행성 방향에서 축색돌기로 수송되었다. 이들 데이터는 영장류 뇌에서 AAV9 분포의 우리 이해를 진전시키고 실질적인 피질-선조체 병리학의 신경 질환 예컨대 헌팅턴병의 치료에서 이의 용도에 대한 지지를 제공한다.

[0213] 아데노-관련 바이러스 (AAV)에 기반된 벡터로 신경 유전자 요법의 임상 발달이 더욱 흔하게 되어도, 영장류 뇌에서 AAV의 특이적인 혈청형의 거동은 더욱 중요해지고 있다. 이것은 하기에서 신경수술 개입의 임상 발달을 구동하는 더욱 효율적인 및 진전된 벡터 주입 기술의 문맥에서 특히 사실이다: 질환 예컨대 파킨슨병 (Richardson 등 (2011) *Mol Ther* **19**: 1048-1057) 및 희귀 신경 장애 예컨대 방향족 L-아미노산 탈탄산효소 (AADC) 결핍 (San Sebastian 등 (2014) *Mol Ther Methods Clin Dev* 3). 상기 신규한 임상적으로 적용된 기술은 AAV2의 실질 주입을 시각화하기 위해 수술중 MRI를 사용한다. 이의 유용성은 MRI 콘트라스트 시약의 분포와 최종 이식유전자 발현 사이 현저한 상관관계로부터 유래된다. 그러나, 상기 밀접한 상관관계는 어느 정도 AAV9로 파괴된다. GFP의 발현은 주입의 용적을 넘어 용적이 상당히 (~3-배) 확장되어, 초기 가압된 주입 (CED)의 결과로서 연루된 사이질 또는 말초혈관 수송 과정의 중요한 역할을 강조하였다 (Hadaczek 등 (2006) *Mol Ther* 14: 69-78). AAV2의 경우에서, 우리는 하기를 논의할 것이다: 풍부한 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 대한 벡터의 결합능 (Summerford 등 (1998) *J Virol* 72: 1438-1445) 이 주입 부위로 AAV2를 제한하는데 돕는지 그리고 MRI 콘트라스트 시약의 분포에 밀접하게 이식유전자 발현의 분포를 매치시키는지. 그에 반해서, AAV9용 1차 수용체는 HSPG가 아니고 (Shen 등 (2011) *J Biol Chem* 286:13532-13540) 상기 벡터는 따라서 제공된 주입 용적에 대하여 발현의 훨씬 더 큰 용적을 달성하기 위해 주변맥관구조를 참여시킬 수 있다.

[0214] AAV9는 신경 조직에서 광범위 굴성을 명시한다 (Gray 등 (2011) *Mol Ther* 19:1058-1069; Hinderer 등 (2014) *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 1; Foust 등 (2009) *Nat Biotechnol* 27: 59-65, 양쪽 뉴런 및 별아교세포 뿐만 아니라 아마 다른 세포 유형 형질도입. 뇌에서 항원-제시 세포 (APC)를 형질도입하는 AAV9의 능력은 외래 (비-자기) 단백질의 발현에 대해 관심을 상승시켰다 (Ciesielska 등 (2013) *Mol Ther* 21: 158-166; Samaranch 등 (2014) *Mol Ther* 22: 329-337; Forsayeth and Bankiewicz (2015) *Mol Ther* 23: 612) APC 그리고 신경독성 적응성 면역 반응의 결과적인 참여에서. 이것은, 물론, 자기-단백질이 발현되는 경우 문제가 될 것 같지 않지만, 본 연구에서 우리는, 이전처럼, 별아교세포 및 미세아교에서 Iba1의 활성화 및 MHC-II의 상향조절을 관측하였다. 신경교의 양쪽 유형은 특유의 개별 기능을 갖는 뇌 APC이다. 그러나, 우리는 이들 세포가 GFP 제시에 명확히 반응성이었어도 AAV9-GFP에 의한 미세아교 형질도입의 증거를 보지 못했다. 우리의 결론은 별아교세포가 GFP 발현에 적응성 반응에 대해 핵심 APC라는 것이다.

[0215] 뇌에서 AAV 혈청형의 거동에 대하여 가장 놀라운 발견 중 하나는 축삭 운반의 현상이었다. 긴 거리 동안 온전한 AAV 입자를 수송하는 뉴런의 능력은, 상기 동일한 현상이 하기에 대하여 기재되었어도, AAV2에 대하여 먼저 기재되었다: 단순 포진 (Costantini 등 (1999) *HumGene Ther* 10: 2481-2494; Diefenbach 등 (2008) *Rev Med Virol* 18:35-51; Lilley 등 (2001) *J Virol* 75: 4343-4356; 및 McGraw and Friedman (2009) *J Virol* 83:4791-4799) 및 광견병 바이러스 (Gillet 등 (1986) *J Neuropathol Exp Neurol* 45:619-634; Kelly and Strick (2000) *J Neurosci Methods* 103:63-71; Klingen 등 (2008) *J Virol* 82: 237-245; Larsen 등 (2007) *Front Neural Circuits* 1:5). 상기 바이러스의 주로 역행성 수송과 대조적으로, AAV2는 CNS 뉴런에서 전행성 수송을 경험하고; 즉, AAV2의 입자는 이들이 원위 위치에서 뉴런에 의해 취득되도록 방출되는 시냅스 말단까지 뉴런 세포 바디에서 온전하게 수송된다. *참고,* Ciesielska, 등 (2011) *Mol Ther* 19:922-927; Kells 등 (2012) *Neurobiol Dis* 48: 228-235; Kells 등 (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2407-2411. 상기 현상은 1차 형질도입 위치에서 형질도입 및 매우 효율적인 분포를 요구하고 단지 CED가 실제로 상기 정도의 효율을 달성할 수 있기 때문에 초기에 발견되지 않은 이유를 설명할 수 있다. NHP 시상에 AAV2의 주입은, 피질 라미나 V/VI에서 위치한 주로 피라미드 뉴런인, 이식유전자의 널리 퍼진 피질 발현을 초래한다. 유사하게, AAV2로 NHP 조가비핵 또는 랫트 선조체의 형질도입은, 선조체에 투사하는, SNc가 아닌, 선조체 GABAergic 뉴런으로부터 투사를 수용하는, SNr내에 세포 바디에서 이식유전자 발현을 초래한다. AAV2의 전행성 수송과 대조적으로, AAV6은 배타적으로 역행성 방향으로 수송되고 AAV2만큼 거의 신경친화성이다 (Salegio 등 (2012) *Gene Ther*. 20(3):348-52; San Sebastian 등 (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183).

[0216] AAV9의 축삭 운반은 2방향성이 되는 본 연구에서 발견되었다. 조가비핵에 AAV9-GFP의 주입은 조가비핵에 투사하는 피질-선조체 뉴런에서 이식유전자 발현으로 이어졌고 GFP 발현은 또한 SNc 뉴런에서 발견되었고, 이로써 상기 혈청형의 후행성 수송을 확인하였다. 하기로 보여진 것보다 상당히 더욱 효율적인, 상기 현상: AAV6 (San

Sebastian 등 (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183)은 양쪽 기저 신경절 및 피질-선조체 뉴런의 퇴행이 질환의 신경병리학에 중심인 헌팅턴병 요법 고안에서 귀중하다 (Berardelli 등 (1999) *Mov Disord* 14:398-403). 치료 AAV9와 인간 조가비핵의 효율적인 형질도입은 또한 표적화되는 선조체에 피질 투사를 가능하게 한다.

[0217] 추가적으로, 그러나, 벡터는 SNr 및 STN에 전행성 방향으로 수송되었다. STN 뉴런의 표지화는, SNr에서 보다 더욱, 벡터 용량에 고도로 의존적이어서, 축색돌기 및/또는 말초혈관 수송에 의해, 담창구 (GP)를 통한 간접 경로를 통해 AAV9-GFP의 수송 요건을 반영하였다. 초기 조가비핵성 주입 용적을 넘어서 효율적으로 확산시키는 AAV9의 능력은 강력한 말초혈관 기전을 시사한다. 그럼에도 불구하고, AAV9의 양방향성 축삭 운반의 현상은 벡터의 매우 널리 퍼진 분포가 필수적인 적용에 대한 상기 열정으로 상기 벡터가 고려되는 이유를 부분적으로 설명할 수 있다.

[0218] **실시예 5: Htt 리프레서의 전달**

[0219] 예를 들어 미국 공개 번호 20150056705; 20110082093; 20130253040; 및 20150335708 및 본 명세서에서 기재된 바와 같이, Htt 리프레서 (ZFP-TFs, TALE-TFs, CRISPR/Cas-TFs)는 실시예 1에서 제시된 바와 같이 바이러스 (*예를 들면,* AAV 예컨대 AAV9)를 이용하는 HD 모델 마우스, NHP 또는 인간 대상체의 선조체에 전달된다.

[0220] Htt 리프레서는 널리 퍼진 발현을 나타내고 Htt 발현의 형성, Htt 응집물을 감소; 세포자멸사를 감소; 및/또는 대상체에서 운동 결손 (*예를 들면,* 클라스핑)을 감소시키고 HD의 예방 및/또는 치료에서 효과적이다.

[0221] **실시예 6: HD 환자 섬유아세포에서 그리고 HD 환자 줄기 세포로부터 유래된 뉴런에서 돌연변이체 Htt의 억제**

[0222] ZFP 46025 및 45643은 HD 환자로부터 유래된 CAG18/45 섬유아세포에서 돌연변이체 HTT를 선택적으로 억제시킨다 (도 8). GFP 대조군; ZFP 46025 및 ZFP 45643 (0.1, 1, 10 또는 100 ng / 50,000 세포)를 인코딩하는 mRNA는 Nucleofactor (Lonza)를 이용하여 HD 섬유아세포 GM02151 (Coriell Cell Repository)에 형질감염되었다. 형질감염 이후 24 시간에, HTT 발현 수준은 qRT-PCR에 의해 측정되었다. 각각의 샘플에서 Wt Htt (CAG18) 및 돌연변이체 Htt (CAG45) 수준은 3중으로 SNP rs363099 C/T (엑손 29)에 기반된 통상 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, GAPDH의 수준으로 정규화되었다. ZFP 샘플에 대한 Htt/GAPDH 비는 (1로 설정된) 모의 형질감염된 샘플의 것으로 규모화되었다. 데이터는 평균 ± SD로서 표현된다. 상기 데이터는 양쪽 ZFP 46025 및 ZFP 45643에 의한 돌연변이체 Htt 대립형질 (CAG45)의 선택적 억제를 보여준다.

[0223] ZFP 46025 및 45643은 HD 환자로부터 유래된 CAG21/38 섬유아세포에서 돌연변이체 Htt를 선택적으로 억제시키고 (도 9), GFP 대조군, ZFP 46025 및 45643 (0.1, 1, 10 또는 100 ng / 50,000 세포)용 mRNA는 Nucleofactor (Lonza)를 이용하는 HD 섬유아세포 ND30259 (Coriell Cell Repository)에 형질감염되었다. 형질감염 이후 24 시간에, Htt 발현 수준은 qRT-PCR에 의해 측정되었다. 각각의 샘플에서 Wt Htt (CAG21) 및 돌연변이체 Htt (CAG38) 수준은 3중으로 SNP rs362331 C/T (엑손 50)에 기반된 통상 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, GAPDH의 수준으로 정규화되었다. ZFP 샘플에 대한 Htt/GAPDH 비는 (1로 설정된) 모의 형질감염된 샘플의 것으로 규모화되었다. 데이터는 평균 ± SD로서 표현된다. 상기 데이터는 양쪽 ZFP 46025 및 45643에 의한 돌연변이체 HTT 대립형질 (CAG45)의 선택적 억제를 보여준다.

[0224] 도 8 및 9에서 데이터는 ZFP 46025 및 45643이 양쪽 야생형 및 돌연변이체 Htt 대립형질에서 상이한 CAG 반복부 길이를 함유하는 환자-유래된 세포내 돌연변이체 Htt 대립형질로부터 전사를 선택적으로 억제시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0225] ZFP 46025 및 45643은 일시적 mRNA 형질감염에 의해 CAG17/48 뉴런내 돌연변이체 Htt를 선택적으로 억제시킨다 (도 10). GFP 대조군, ZFP 46025 및 45643 (15, 150, 300 또는 1,500 ng / 150,000 세포)에 대한 mRNA는 Nucleofactor (Lonza)를 이용하는 HD 배아 줄기 세포 (ESC) GENEA020 (GENEA/CHDI)로부터 분화된 뉴런에 형질감염되었다. 형질감염 이후 2일에, Htt 발현 수준은 qRT-PCR에 의해 측정되었다. 각각의 샘플에서 야생형 Htt (CAG17) 및 돌연변이체 Htt (CAG48) 수준은 3중으로 엑손 67 (Applied Biosystems)에서 SNP rs362307에 기반된 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, GAPDH의 수준으로 정규화되었다. ZFP 샘플에 대한 Htt/GAPDH 비는 (1로 설정된) 모의 형질감염된 샘플의 것으로 규모화되었다. 데이터는 평균 ± SD로서 표현된다. 상기 데이터는 HD 뉴런에서 양쪽 ZFP 46025 및 45643에 의한 돌연변이체 Htt 대립형질 (CAG48)의 선택적 억제를 보여준다.

[0226] 실험은 어느 한쪽 AAV6 또는 AAV9 바이러스 벡터를 이용하여 ZFPs 이용이 전달되었던 분화된 CAG17/48 뉴런에서 또한 수행되었다. ZFP 46025, 45643 또는 GFP 대조군을 인코딩하는 AAV6 벡터는 반복하여 HD 배아 줄기 세포 (ESC) GENEA020 (GENEA/CHDI)로부터 분화된 뉴런을 감염시키는데 사용되었다. 사용된 AAV 용량은 ZFPs에 대하여

1E+4, 5E+4, 또는 1E+5 벡터 게놈 (vg) / 세포이었고 GFP에 대하여 1E+5 vg / 세포이었다. 감염 이후 21 일에, HTT 발현 수준은 qRT-PCR에 의해 측정되었다. 각각의 샘플에서 Wt Htt (CAG17) 및 돌연변이체 Htt (CAG48) 수준은 3중으로 엑손 67 (Applied Biosystems)에서 SNP rs362307에 기반된 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, GAPDH의 수준으로 정규화되었다. ZFP 샘플에 대한 Htt/GAPDH 비는 (1로 설정된) 모의 형질감염된 샘플의 것으로 규모화되었다. 데이터는 평균 ± SD로서 표현된다 (도 11A).

[0227] ZFP 46025, 45643 또는 GFP 대조군을 인코딩하는 AAV9 벡터는 반복하여 HD 배아 줄기 세포 (ESC) GENEA020 (GENEA/CHDI)로부터 분화된 뉴런을 감염시키는데 사용되었다. 사용된 AAV 용량은 ZFPs에 대하여 1E+5, 5E+5 또는 5E+6 벡터 게놈 (vg) / 세포이었고 GFP에 대하여 5E+6 vg / 세포이었다. 감염 이후 21 일에, HTT 발현 수준은 qRT-PCR에 의해 측정되었다. 각각의 샘플에서 야생형 Htt (CAG17) 및 돌연변이체 Htt (CAG48) 수준은 3중으로 엑손 67 (Applied Biosystems)에서 SNP rs362307에 기반된 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, GAPDH의 수준으로 정규화되었다. ZFP 샘플에 대한 Htt/GAPDH 비는 (1로 설정된) 모의 형질감염된 샘플의 것으로 규모화되었다. 데이터는 평균 ± SD로서 표현된다 (도 11B).

[0228] **실시예 7: HD에 관련되는 ZFP 46025 및 45643 구조 세포 표현형**

[0229] 이전의 연구는 HD 환자-유래된 세포에서 팽창된 CAG 반복부와 관련된 표현형 변화를 보여주었다 (Jung-il 등, (2012) *Biochemical Journal*, 446(3), 359-371; HD IPSC Consortium, (2012) *Cell Stem Cell*, 11(2), 264-278; An 등, (2012) *Cell Stem Cell,* 11(2), 253-263). 이들 공개된 발견에 따라서, 우리는 CAG17/48 뉴런이 비-HD (정상) 뉴런과 비교된 세포내 ATP 수준에서 상당한 감소를 가졌다는 것을 발견하였다 (도 12A). 21 일 이후 뉴런은 ZFP 46025 또는 ZFP 45643을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터로 감염되었고, 세포내 ATP 수준은 대조군 세포에 비교하여 1.7- 및 1.8-배, 각각 증가되었고, 돌연변이체 Htt 침묵화가 HD 뉴런에서 정력적인 결함을 구조하는 것을 나타냈다. *시험관내* HD 뉴런의 또 다른 표현형은 프로그래밍된 세포 사망에 증가된 감수성이다. 성장 인자 회수로, 세포자멸사를 경험하는 CAG17/48 뉴런의 백분율은 정상 뉴런의 것보다 4-5-배 더 높았다 (도 12B). 렌티바이러스 감염 이후 12 일에, 그 다음 성장 인자 회수의 2 일에, ZFP 46025 및 45643은 야생형 세포에서 보여진 것으로 세포자멸적 세포의 수를 감소시켰다.

[0230] HD 환자 (CAG17/48) 또는 정상 대상체로부터 유래된, 배양된 뉴런의 세포내 ATP 수준은, 각각의 샘플내 세포 수가 ApoLive-Glo® 검정 (Promega)에 의해 결정되었던, CellTiter-Glo® 발광성 검정 (Promega)을 이용하여 측정되었다. 뉴런은 500의 MOI에서 어느 한쪽 YFP-Venus 또는 ZFP-TF (45643 또는 46025-KOX-2A-Venus)를 발현시키는 LV로 3중으로 감염되었다.

[0231] 렌티바이러스 감염 이후 21 일에, 뉴런에서 세포내 [ATP] 수준은 제조자의 지침에 따라 CellTiter-Glo 발광성 검정 (Promega)을 이용하여 측정되었다. 발광 값은 각각의 샘플에서 세포 수로 정규화되었다. 상이한 세포/치료로부터 ATP 수준 / 세포 값은 그 다음 (1로 설정된) 모의-감염된 HD 뉴런의 것으로 정규화되었다. 데이터 (도 12A)는 평균 ± SD로서 표현된다.

[0232] 성장 인자 회수에 의해 유도된 HD 및 비-HD 뉴런의 세포 사망은 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소 dUTP 닉 단부 라벨링 (TUNEL) 검정을 이용하여 측정되었다. 뉴런은 500의 MOI에서 어느 한쪽 YFP-Venus 또는 ZFP-TF (45643 또는 46025-KOX-2A-Venus)를 발현시키는 LV로 3중으로 감염되었다. 세포는 12 일 동안 배양되었고 그 다음 배지는 임의의 첨가제 (성장 인자) 없이 신선한 신경세포배양 배지로 변화되었다. 세포는 상기 성장 인자 회수 배지에서 48시간 동안 유지되었다. TUNEL 검정은 ApoBrdU Red DNA 단편화 키트 (BioVision)을 이용하여 수행되었다. 뉴런은 15분 동안 빙상에서 4% 파라포름알데하이드로 고정되었다. 세포자멸사는 제조자 권고에 따라 TUNEL -양성 세포 정량화에 의해 평가되었다 (ApoBrdU Red DNA 단편화 키트, BioVision). 유세포측정은 항-BrdU-Red 염색에 의해 세포자멸사를 평가하는데 사용되었다. 데이터 (도 12B)는 평균 ± SD로서 표현된다.

[0233] 따라서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 리프레서는, 비제한적으로, 세포 사망 감소, (세포내 ATP 수준에 의해 측정된 경우) 세포 기능 증가 및 미치료된 세포와 비교된 경우 세포자멸사에 세포 감수성 감소를 포함하는, HD-관련된 표현형 구조에 의해 치료 이점을 제공한다.

[0234] **실시예 8: ZFP 46025 및 ZFP 45643은 마우스 선조체에서 돌연변이체 Htt를 억제시킨다**

[0235] ZFPs의 *생체내* 활성은 하기에서 시험되었다: HdhQ50/Hdh+ (Q50) 이종접합성 마우스 (White 등 (1997) *Nature Genetics* 17: 404-410) ZFP 46025, ZFP 45643 또는 GFP 대조군을 인코딩하는 AAV9 벡터의 선조체내 주사에 의해. Q50 마우스는 내인성 마우스 Hdh 유전자의 엑손 1이 48 CAGs를 가진 인간 Htt 유전자의 엑손 1로 대체되었던 녹-인 대립형질을 함유한다. 주사 이후 5 주에, 치료된 선조체의 대립형질-특이적 qRT-PCR 분석은 ZFP 45643

및 ZFP 46025가 비히클 주사된 대조군에 비하여 돌연변이체 Htt 대립형질 (Q50)을 79% 및 74%, 각각 만큼 억제시켰고; 야생형 대립형질 (Q7)이 어느 한쪽 ZFP에 의해 조절되지 않았다는 것을 보여주었다 (도 13A 및 13B). ZFP 45643의 활성은 주사 이후 12 주에 또한 시험되었고 (도 13C), 돌연변이체 Htt (Q50)의 상당한 억제 (70%)는 야생형 대립형질 (Q7)의 억제 없이 관측되었다. 명백한 독성은 연구의 과정에 걸쳐 임의의 동물에서 관측되지 않았다. 거동 연구 (*예를 들면*, 클라스핑 연구)는 또한 수행되고 본 명세서에서 기재된 바와 같이 리프레서가 *생체내* 치료 (임상) 이점을 제공하는 것을 보여준다.

[0236] HdhQ50/Hdh+ (Q50) 이종접합성 마우스 (혼합된 성별)는 10-11 주령에서 AAV9 벡터 (ZFP 46025, 45643 또는 GFP, n=4 / 그룹) 또는 제형 완충액 (비히클, n=3)의 양측 선조체내 주사를 받았다. 2개의 3-㎕ 주사는 (총 6 ㎕ 및 1.1E+10 벡터 게놈 / 선조체로) 각각의 선조체에 배치되었다 전측 주입에 사용된 좌표는 A/P +1.4, M/L +/-1.7, D/V -3.5이었고 후측 주입에 대해서는 A/P +0.2, M/L +/-2.3, D/V -3.2이었다. 주사 이후 5 주 (ZFP 46025 및 45643) 및 12 주 (ZFP 45643)에, 마우스는 희생되었고 각각의 선조체는 RNA 단리 및 qRT-PCR 분석을 위하여 3 (전측, 중간 및 후측) 슬라이스로 해부되었다. 돌연변이체 Htt 대립형질 (Q50) 및 wt 대립형질 (Q7)로부터 발현은 대립형질-특이적 qPCR 검정에 의해 측정되었고, Htt 수준은 ATP5B, RPL38 및 EIF4A2 수준의 기하 평균으로 정규화되었다. (ns: $p>0.05$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$, Sidak 시험을 동반한 일원 변량분석).

[0237] 도 13에서 나타낸 바와 같이, 치료된 선조체의 대립형질-특이적 qRT-PCR 분석은 ZFP 45643 및 ZFP 46025가 비히클 주사된 대조군에 비하여 79% 및 74%, 각각 만큼 돌연변이체 Htt 대립형질 (Q50)을 억제시켰고; 야생형 대립형질 (Q7)은 어느 한쪽 ZFP에 의해 조절되지 않았다는 것을 보여주었다. ZFP 45643의 활성은 주사 이후 12 주에 또한 시험되었고 돌연변이체 Htt (Q50)의 상당한 억제 (70%)는 야생형 대립형질 (Q7)의 억제 없이 관측되었다.

[0238] 따라서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 Htt 리프레서는 널리 퍼진 발현을 나타내고 Htt 발현의 형성, Htt 응집을 감소; 세포자멸사를 감소; 및/또는 대상체에서 운동 결손 (*예를 들면*, 클라스핑)을 감소시키고 HD의 예방 및/또는 치료에서 효과적이다.

[0239] **실시예 9: ZFP 46025 및 ZFP 45643의 치료 효능 측정**

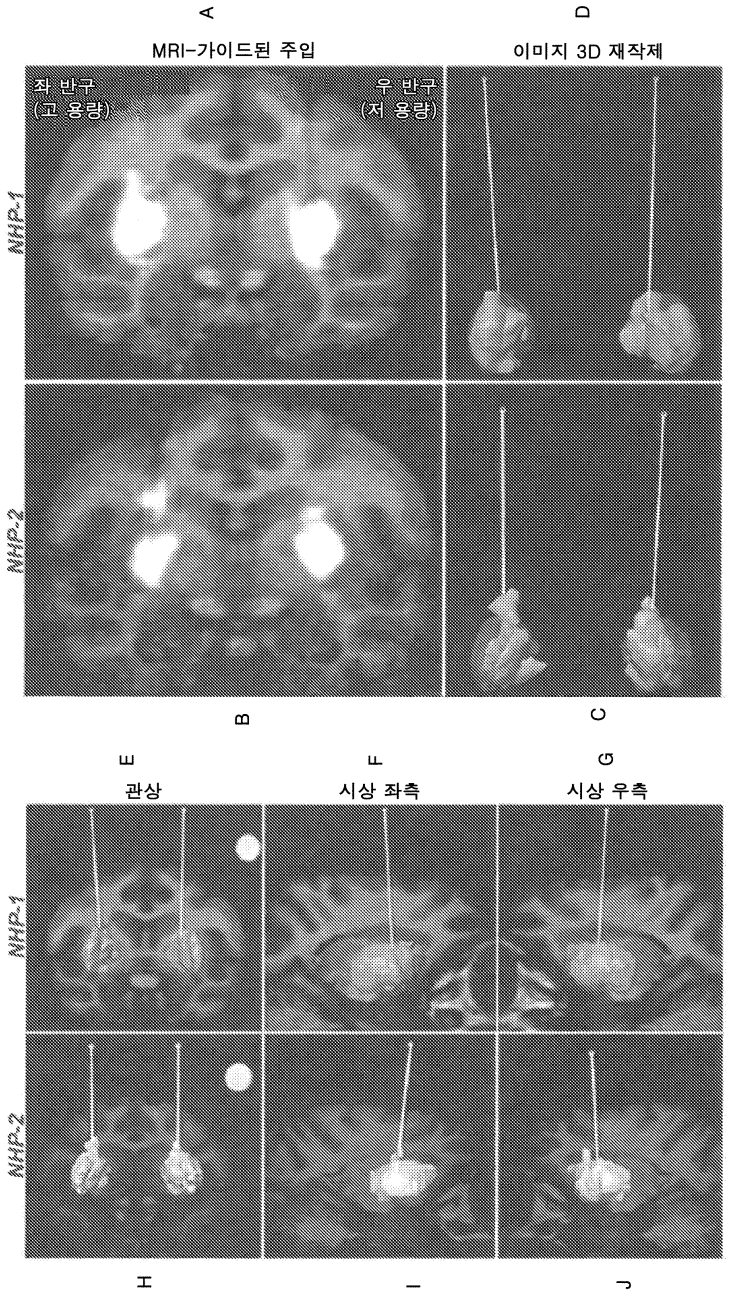
[0240] HD 환자는 가변 용량에서 ZFP 46025 또는 ZFP 45643으로 치료된다. HD 환자는 UHDRS 척도를 이용하여 평가되고 치료 이후 개선을 보여준다. 효능은 또한, PDE10A, 및 MRI용 PET 추적자인, ^{18}FMNI-659를 이용하여 PET 이미지 형성분석에 의해 측정된다. 간단히 말해서, ZFP (예를 들면 ZFP를 인코딩하는 AAV9 벡터)에 노출되는 뇌의 영역 (예를 들면 조가비핵 이내 면적)은 ZFP 제형 및 MRI에 의해 혼합되는 가돌리늄 조영제에 의해 확인되고; 치료 이전 및 이후, 환자는 3 분 주입 기간 동안 약 5 ㎍의 덩어리 용량으로 대략 5 mCi의 ^{18}FMNI-659이 주어진다. 연속 3D PET 이미지는 PET 스캐너를 이용하여 90 분의 기간 동안 획득된다. MRI 이미지는 MRI 스캐너를 이용하여 또한 수득되고, PET 이미지는 MRI 이미지로 정렬되어 해부학-기반 분석용 비주얼을 생성하였다. 표준 흡수값은 (담창구, 꼬리모양, 및 조가비핵 (선조체)를 포함하는) 기저핵 핵에 대하여 계산되고 참조 영역 예컨대 소뇌로 정규화된다 (Russell *등, 상기 참조*). 치료시 MRI에 의해 확인된, ZFP에 노출되는 뇌 영역에서 PDE10A PET 신호는 치료 이후 측정되고 치료 이전 동일한 영역에서 신호 수준과 비교된다. ZFP46025 또는 ZFP45643으로 HD 환자의 치료는 (PDE10A 수준에 의해 측정된) 중간 돌기 뉴런의 임의의 추가의 손실로부터 그리고 명백한 임상 증상의 추가 발생으로부터 환자를 보호한다. 일부 환자에서, ZFPs로 치료는 HD의 증상을 역전시킨다.

[0241] 본 명세서에서 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 공개는 이로써 그 전문이 모든 목적을 위해 참고로 편입된다.

[0242] 개시내용이 이해의 선명성의 목적을 위한 예 그리고 예시로서 일부 상세히 제공되어도, 다양한 변화 및 변형이 본 개시내용의 사상 또는 범위에서 이탈 없이 실시될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 분명할 것이다. 따라서, 전술한 설명 및 예는 제한으로서 해석되지 않아야 한다.

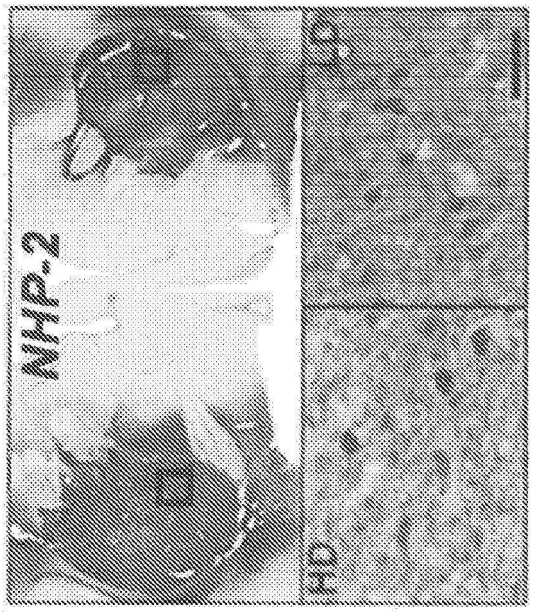
도면

도면1

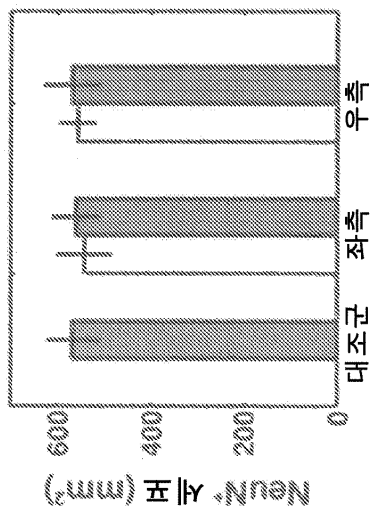

A
MRI-가이드된 주입
D
이미지 3D 재작제
좌 반구
(고 용량)
우 반구
(저 용량)
NHP-1
NHP-2
B
C
E
관상
F
시상 좌측
G
시상 우측
NHP-1
NHP-2
H
I
J

도면2a

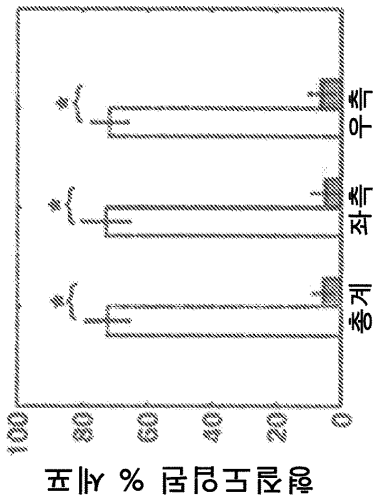
도면2b



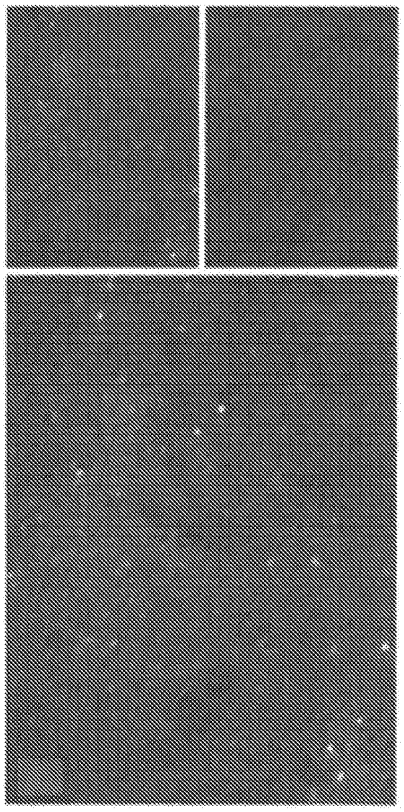
도면2c


NeuN+ 세포 (mm²)
0
200
400
600
대조군
좌측
우측

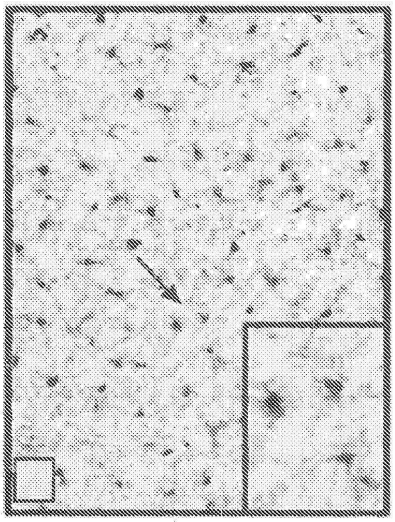
도면2d


형질도입된 % 세포
0
20
40
60
80
100
충계
좌측
우측

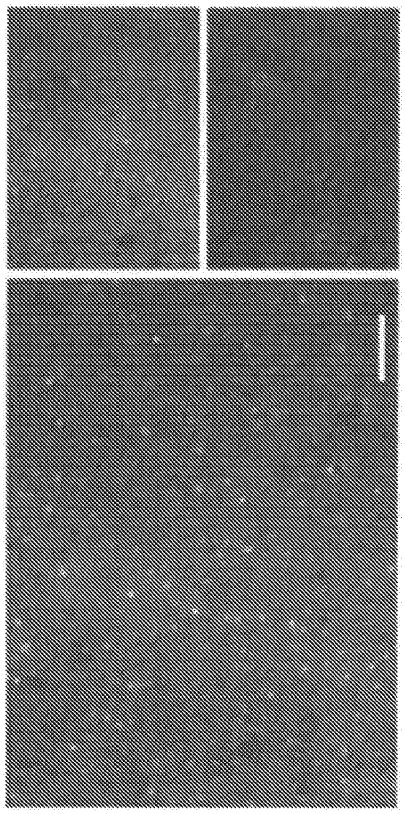
도면2e



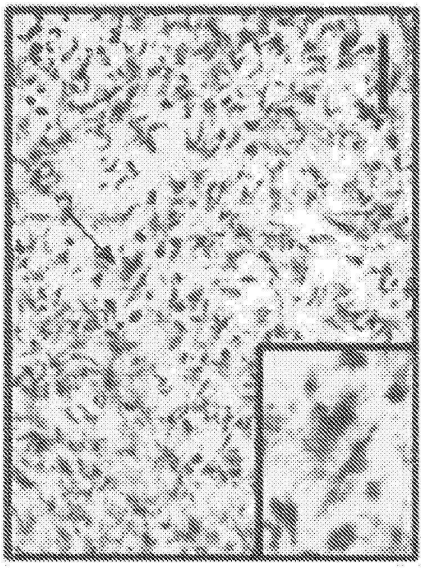
도면2f



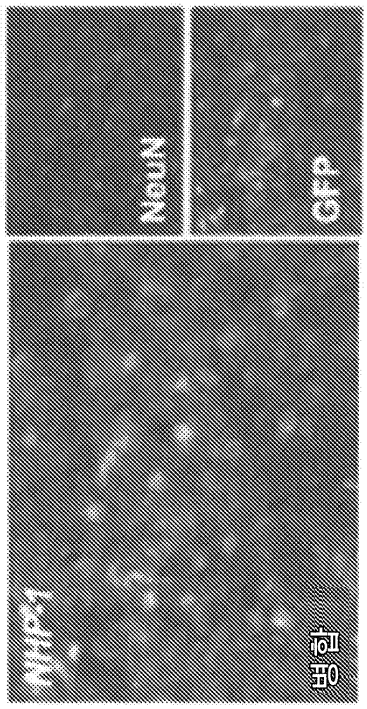
도면2g



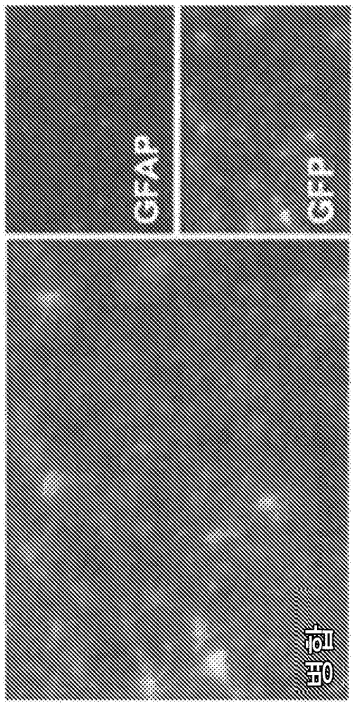
도면2h



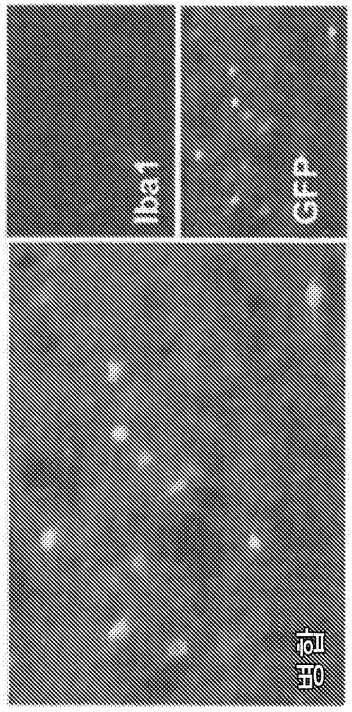
도면3a



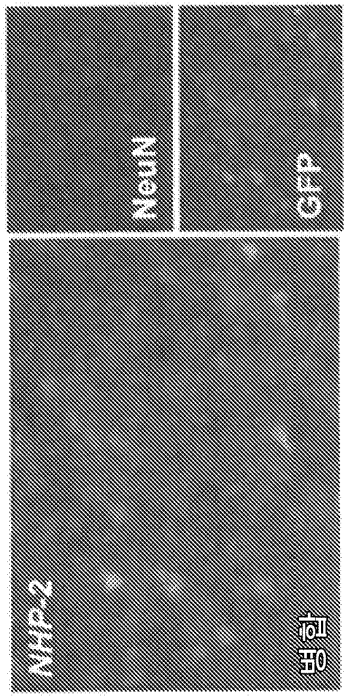
도면3b



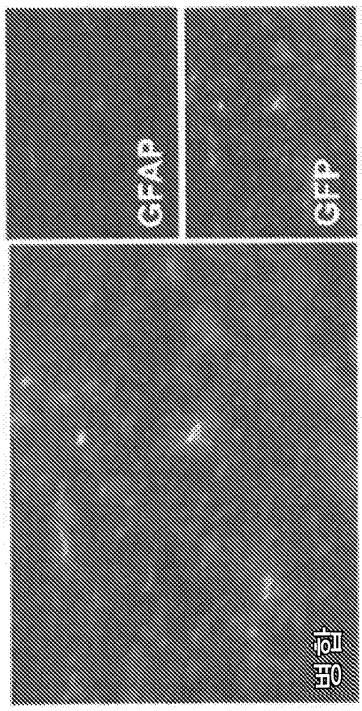
도면3c



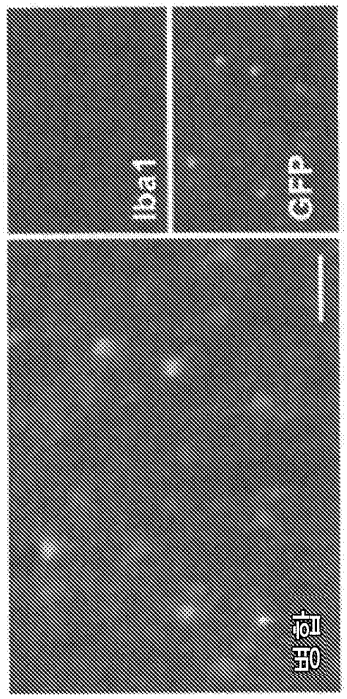
도면3d



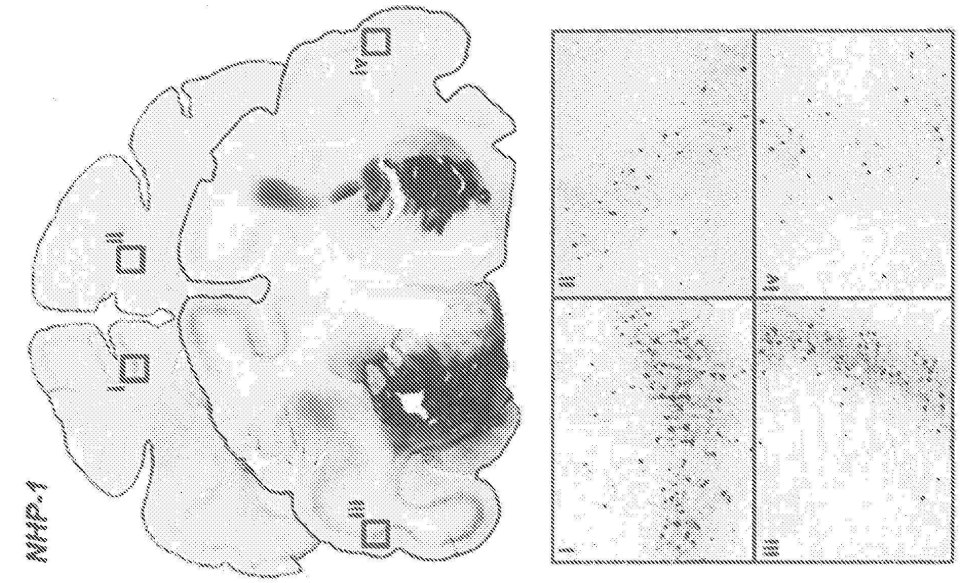
도면3e



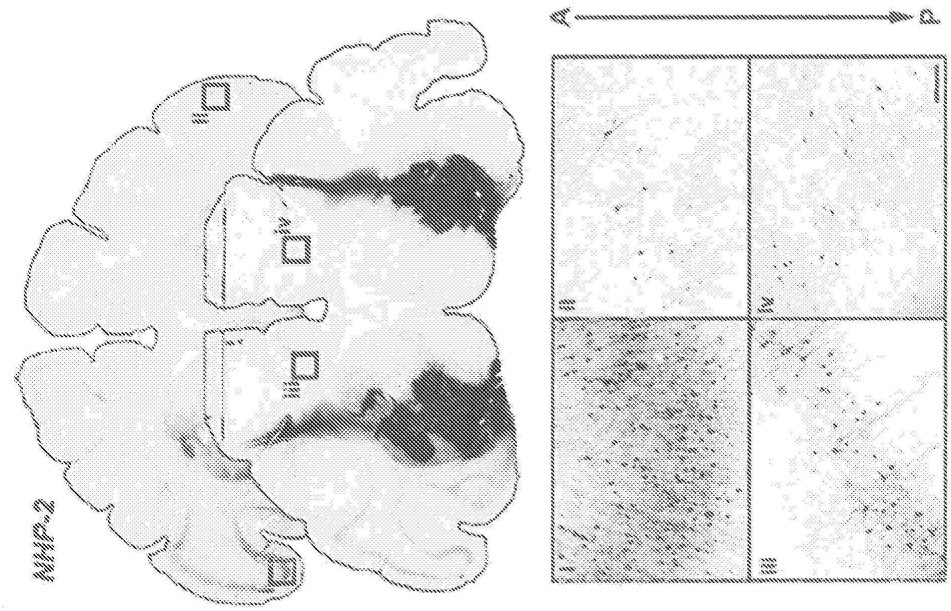
도면3f



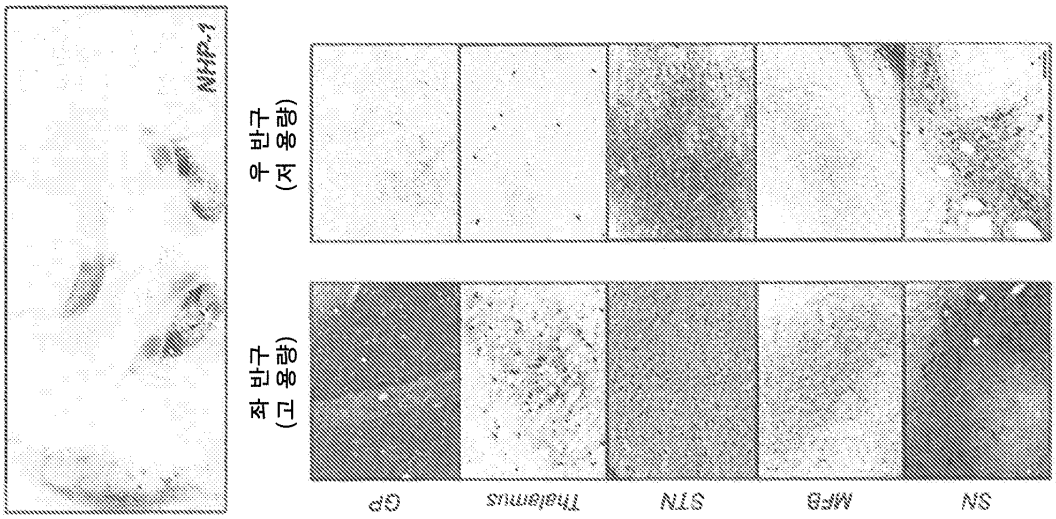
도면4a



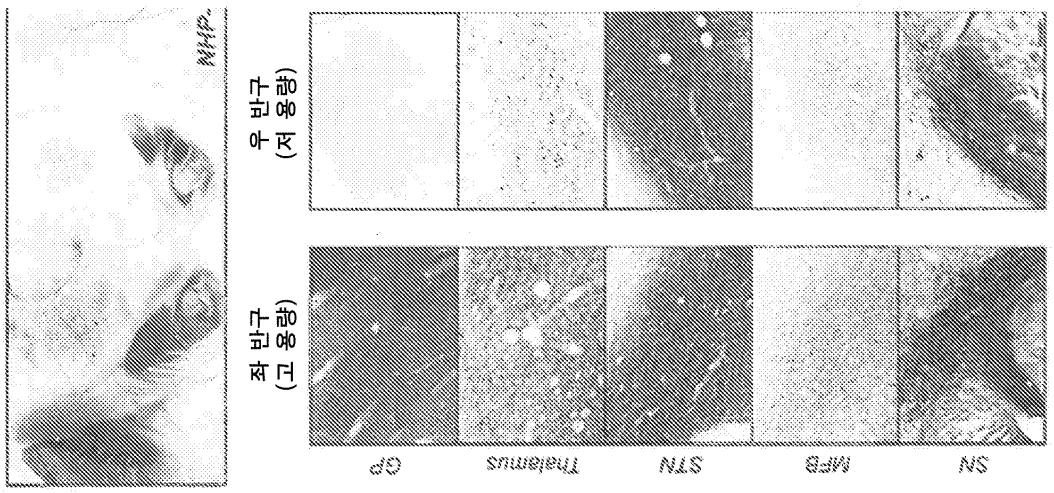
도면4b



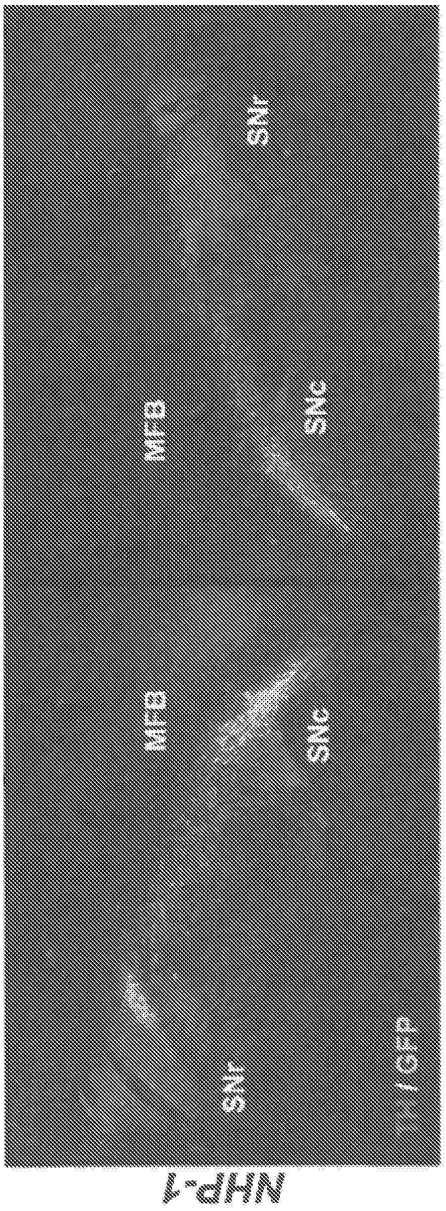
도면5a


NHP-1
우 반구
(저 용량)
좌 반구
(고 용량)
GP
Thalamus
STN
MFB
SN

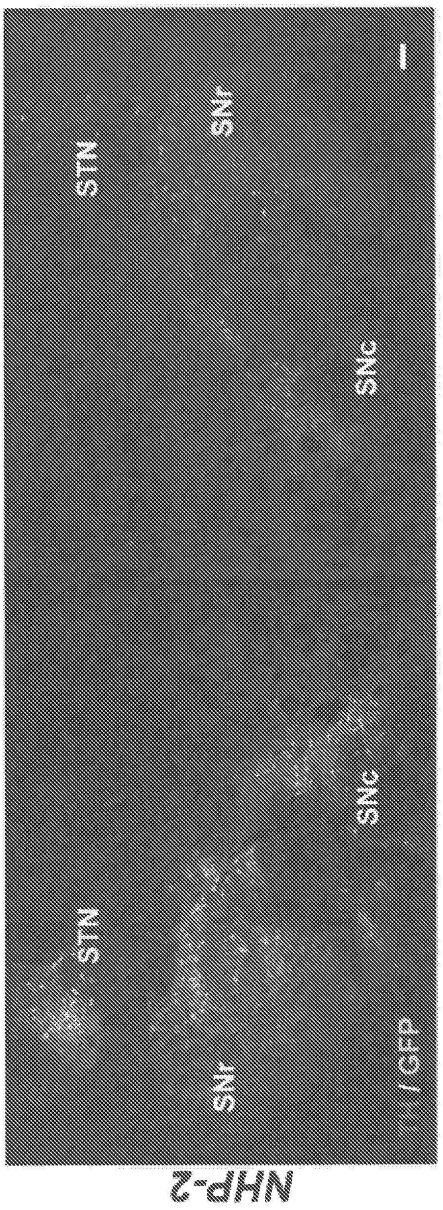
도면5b


NHP-
우 반구
(저 용량)
좌 반구
(고 용량)
GP
Thalamus
STN
MFB
SN

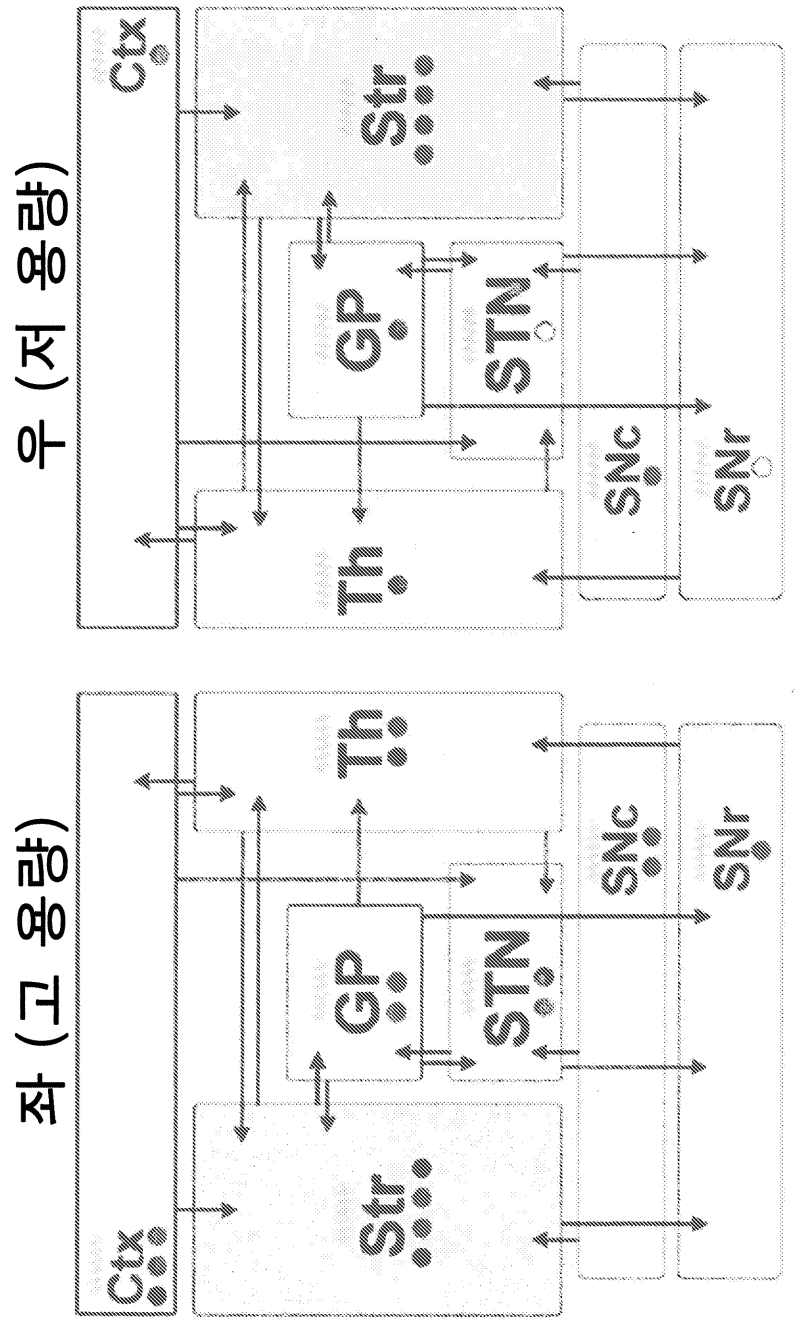
도면6a



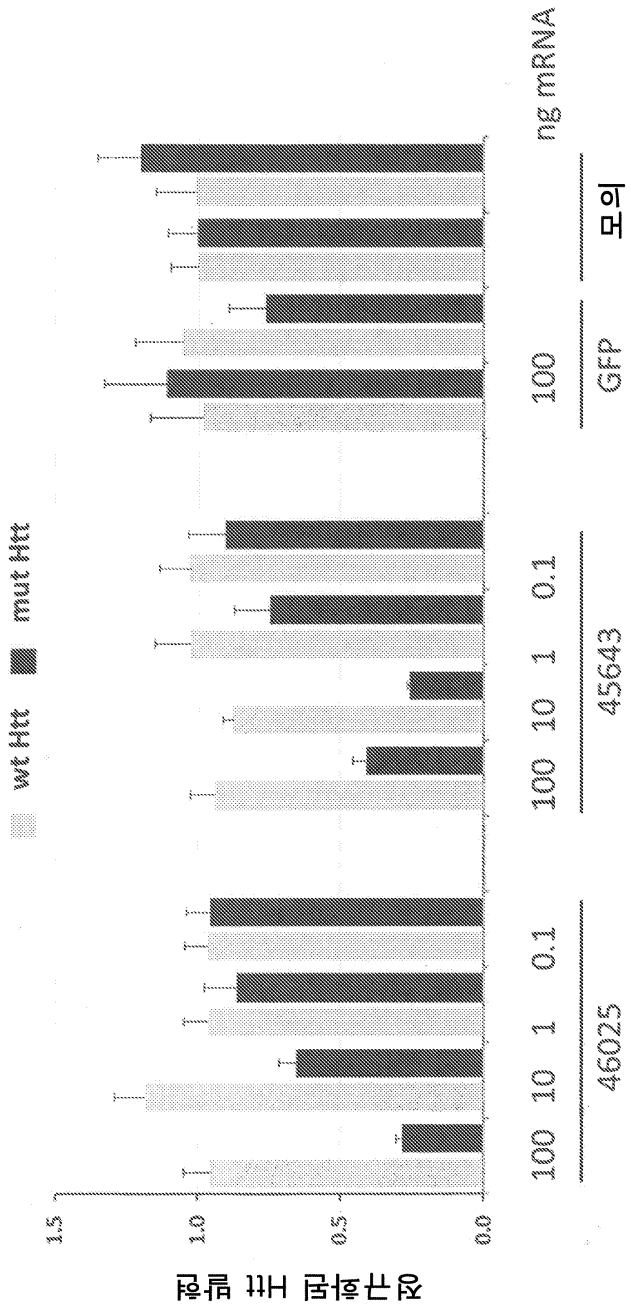
도면6b



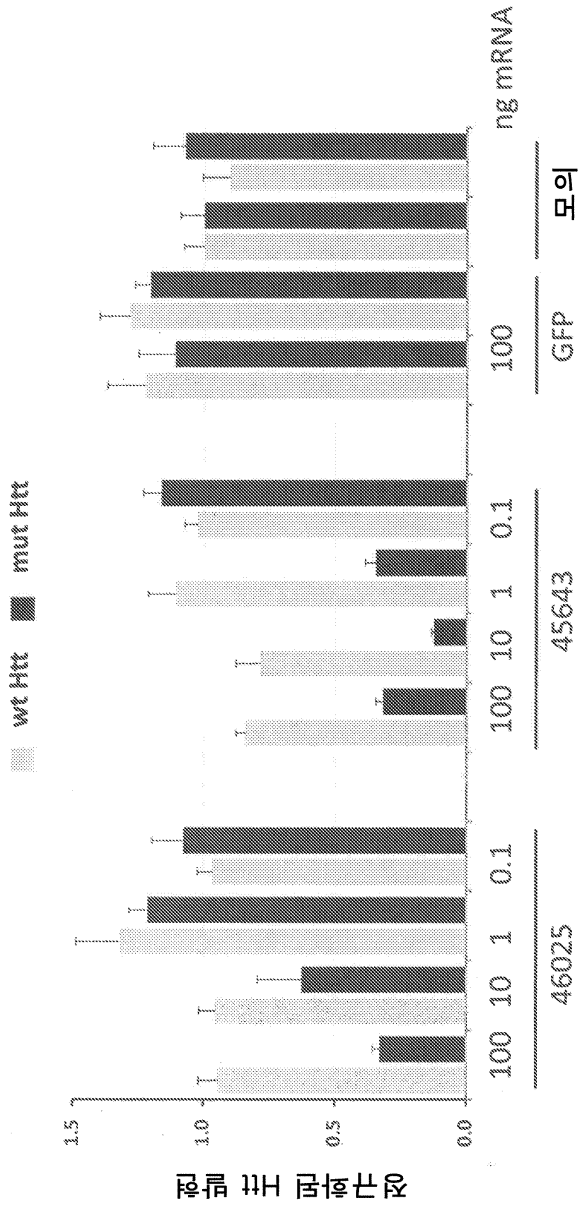
도면7



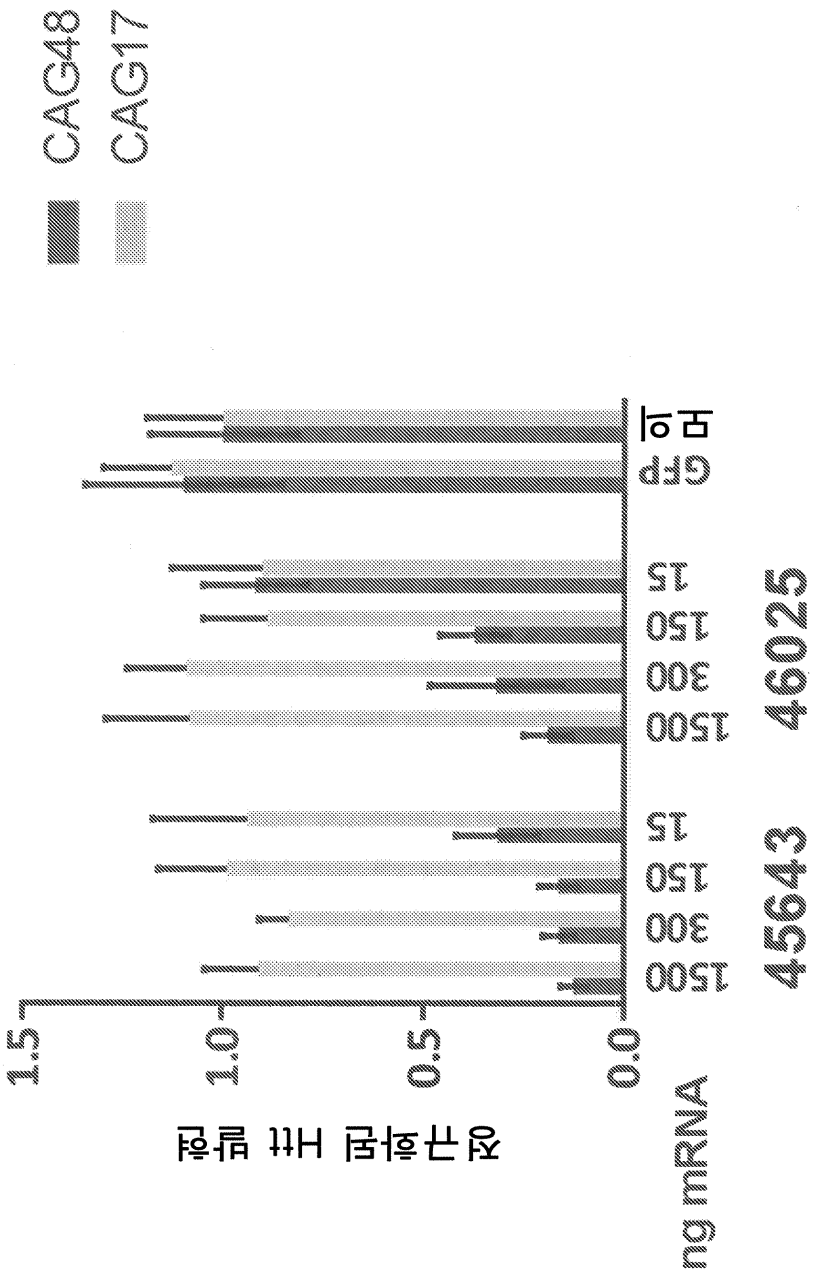
도면8


정규화된 Htt 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
wt Htt
mut Htt
ng mRNA
100
10
1
0.1
46025
100
10
1
0.1
45643
100
GFP
모의

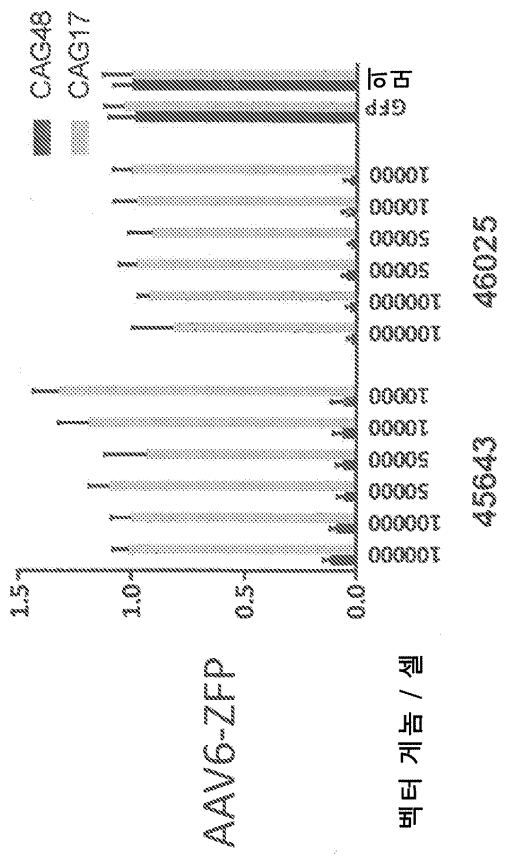
도면9


정규화된 Htt 발현
0.0
0.5
1.0
1.5
wt Htt
mut Htt
ng mRNA
100
10
1
0.1
100
10
1
0.1
100
46025
45643
GFP
모의

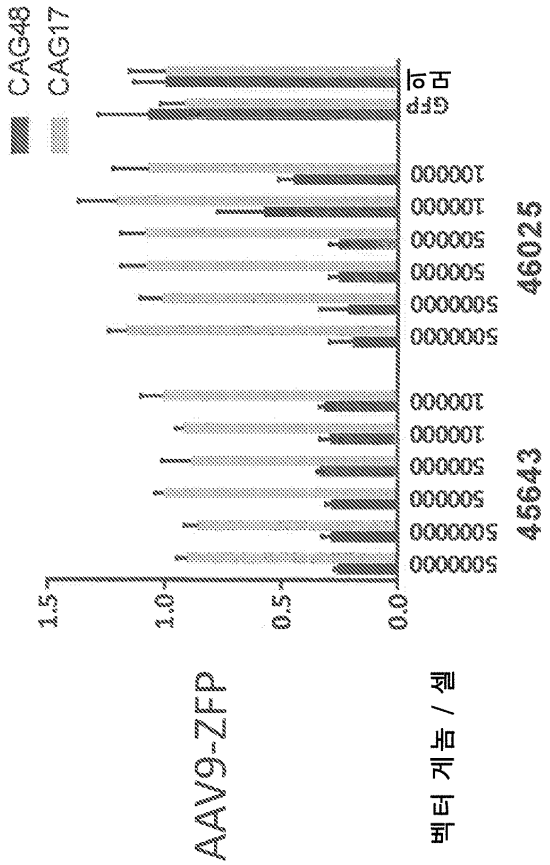
도면10


CAG48
CAG17
정규화된 Htt 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
ng mRNA
4643
4602
15
150
300
1500
15
150
300
1500
GFP
모의

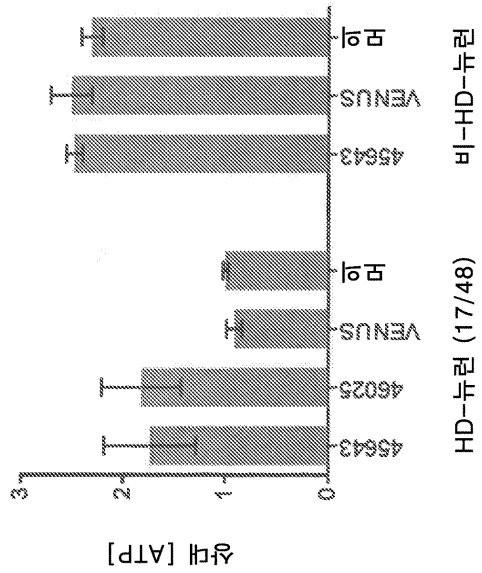
도면11a


CAG48
CAG17
없음
GFP
10000
10000
50000
50000
100000
100000
10000
10000
50000
50000
100000
100000
46025
45643
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV6-ZFP
벡터 게놈 / 셀

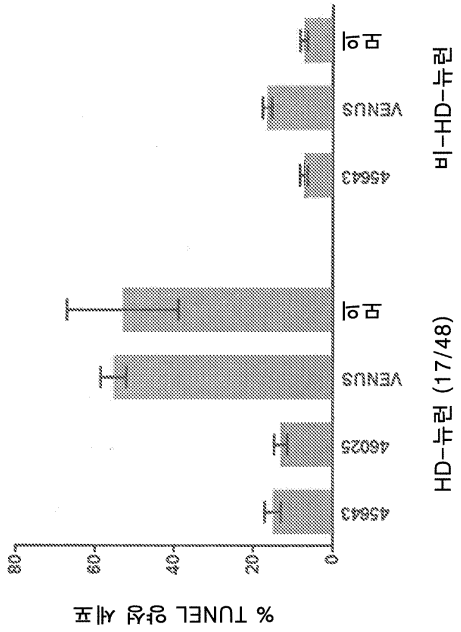
도면11b


CAG48
CAG17
없음
GFP
100000
100000
500000
500000
1000000
1000000
100000
100000
500000
500000
1000000
1000000
46025
45643
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV9-ZFP
벡터 게놈 / 셀

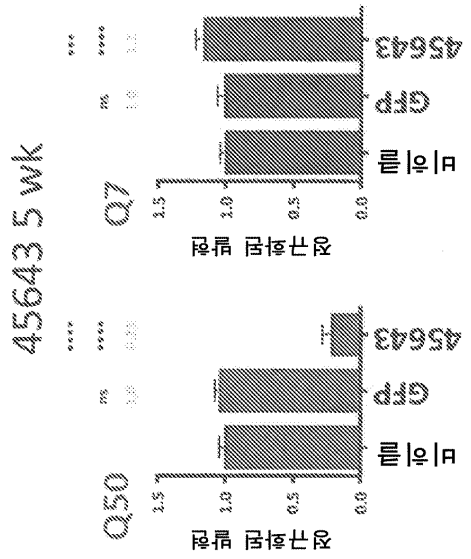
도면12a


상대 [ATP]
0
1
2
3
45643
46025
VENUS
무의
HD-뉴런 (17/48)
45643
VENUS
무의
비-HD-뉴런

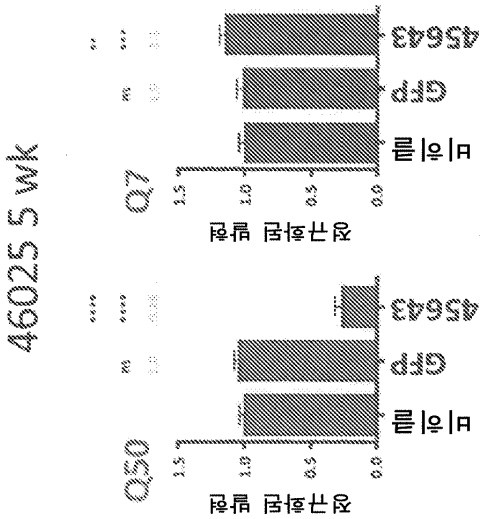
도면12b


% TUNEL 양성 세포
0
20
40
60
80
45643
46025
VENUS
무의
HD-뉴런 (17/48)
45643
VENUS
무의
비-HD-뉴런

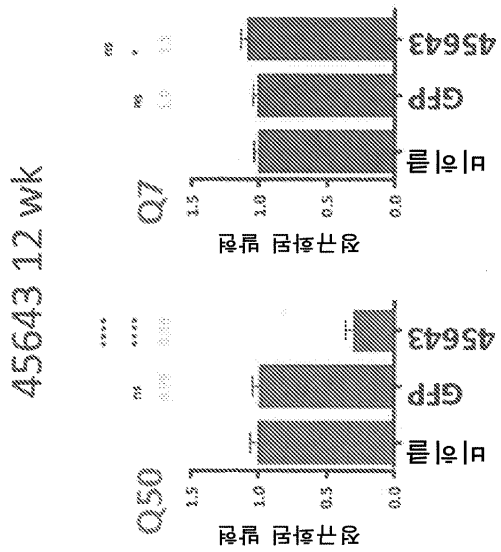
도면13a


45643 5 wk
Q7
Q50
정규화된 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
비히클
GFP
45643

도면13b


46025 5 wk
Q7
Q50
정규화된 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
비히클
GFP
45643

도면13c



서 열 목 록

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.

<120> HTT REPRESSORS AND USES THEREOF

<130> 8325-0139.40

<140> PCT/US2016/053374

<141> 2016-09-23

<150> 62/222,588

<151> 2015-09-23

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

Lys His Gly Asn Leu Ser Glu

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

Cys Pro Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Arg Gln Phe Asn Arg His Gln

1 5

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human or mouse oligonucleotide

<400> 6

agcagcagca gcagcagcag cagcagca 28