(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0169111
(43) 공개일자 2024년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 21/04* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7036731
(22) 출원일자(국제) 2023년04월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065388
(87) 국제공개번호 WO 2023/196862
국제공개일자 2023년10월12일
(30) 우선권주장
63/328,241 2022년04월06일 미국(US)
63/483,075 2023년02월03일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
청, 성
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
야코보, 사라 멜리사
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 임근실

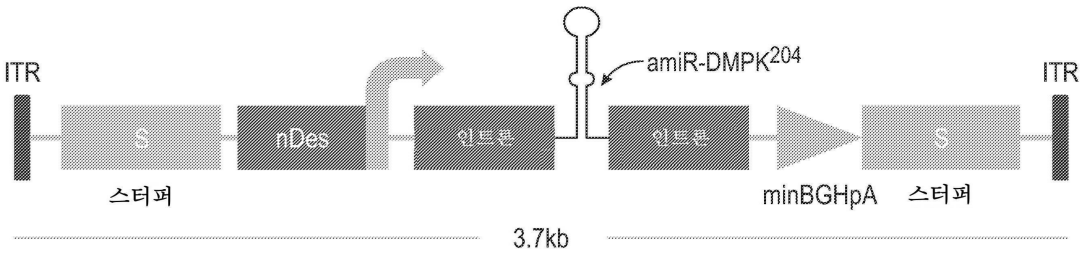
전체 청구항 수 : 총 123 항

(54) 발명의 명칭 **DM-1 근긴장성 이영양증에 대한 표적화된 유전자 요법**

(57) 요 약

본원에서 제1형 근긴장성 이영양증(DM1)을 치료하기 위한 RNAi 분자가 제공된다. 본원에서 발현 카세트, 벡터(예를 들어, rAAV), 바이러스 입자, 및 RNAi를 함유하는 제약 조성물이 추가로 제공된다. 추가로 본원에서 예를 들어 DM1을 치료하기 위한, RNAi의 용도와 관련된 방법 및 키트가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/0058 (2013.01)
A61P 21/04 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12Y 207/11001 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/15 (2013.01)
C12N 2830/42 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자
모리구치, 다카코
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
오리오던, 캐서린
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
루안, 궈샹
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서,

a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고;

b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 가이드 영역은 서열 5'- AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하고;

c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함하는, RNAi.

청구항 2

제1항에 있어서, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:1의 서열을 갖는 핵산을 포함하고, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2의 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되는, RNAi.

청구항 5

제4항에 있어서, RNA 링커는 약 4개 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 루프 구조는 약 4개 내지 약 20개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 루프 구조는 SEQ ID NO:3의 서열 또는 SEQ ID NO:3의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 5'에서 3'으로 제2 가닥, RNA 링커, 및 제1 가닥을 포함하는, RNAi.

청구항 9

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 5'에서 3'으로 제1 가닥, RNA 링커, 및 제2 가닥을 포함하는, RNAi.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 서열 또는 SEQ ID NO:7의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 또는 작은

헤어핀 RNA(shRNA)인, RNAi.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 스캐폴드를 추가로 포함하는, RNAi.

청구항 13

제12항에 있어서, 스캐폴드는 SEQ ID NO:11의 핵산의 전부 또는 일부를 포함하는, RNAi.

청구항 14

제13항에 있어서, miRNA는 스캐폴드 내에 내재되는, RNAi.

청구항 15

제14항에 있어서, 스캐폴드는 5' 아암(여기서, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치함), 및 3' 아암(여기서, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치함)을 갖는, RNAi.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드인, RNAi.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 5'에 위치한 SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:9의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 3'에 위치한 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:10의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함하는, RNAi.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 근긴장성 이영양증-1(DM1)과 관련된 폴리펩티드를 코딩하는 RNA를 표적화하는, RNAi.

청구항 20

제19항에 있어서, 폴리펩티드는 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)인, RNAi.

청구항 21

제20항에 있어서, DMPK는 DM-1과 관련된 돌연변이를 포함하는, RNAi.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, DMPK를 코딩하는 유전자는 5개 이상의 CTG 트리뉴클레오티드 반복부를 포함하는, RNAi.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트.

청구항 24

제23항에 있어서, RNAi를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 발현 카세트.

청구항 25

제24항에 있어서, 프로모터는 근육 특이적 프로모터인, 발현 카세트.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 프로모터는 데스민 프로모터 또는 이의 변이체인, 발현 카세트.

청구항 27

제26항에 있어서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 32

제23항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 33

제32항에 있어서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론인, 발현 카세트.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi를 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재되는, 발현 카세트.

청구항 36

제35항에 있어서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치하는, 발현 카세트.

청구항 37

제36항에 있어서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서

열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 39

제23항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 40

제39항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA인, 발현 카세트.

청구항 41

제40항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 발현 카세트.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 43

제23항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:17의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 44

발현 카세트로서, 발현 카세트는 변형된 데스민 프로모터를 포함하고, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 45

제44항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 47

제44항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 48

제44항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 49

제44항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 인트론을 추가로 포함하는 발현 카세트.

청구항 50

제49항에 있어서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론인, 발현 카세트.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 52

제44항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진을 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재되는, 발현 카세트.

청구항 53

제52항에 있어서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 5' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치하는, 발현 카세트.

청구항 54

제53항에 있어서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 56

제44항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는 발현 카세트.

청구항 57

제56항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA인, 발현 카세트.

청구항 58

제57항에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 발현 카세트.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

청구항 60

제44항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진은 폴리펩티드 또는 핵산을 코딩하는, 발현 카세트.

청구항 61

제44항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진은 RNAi를 코딩하는, 발현 카세트.

청구항 62

제23항 내지 제61항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 63

제62항에 있어서, 발현 카세트는 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열이 측면에 있는, 벡터.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:18의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 벡터.

청구항 67

제63항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

청구항 68

제63항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:19의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 벡터.

청구항 69

제62항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터인, 벡터.

청구항 70

제69항에 있어서, 발현 카세트는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열이 측면에 있는, rAAV 벡터.

청구항 71

제70항에 있어서, 발현 카세트는 2개의 AAV ITR이 측면에 있는, rAAV 벡터.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, AAV ITR은 AAV2 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 74

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터는 SEQ ID NO:20의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:20의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, rAAV 벡터.

청구항 75

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 자가-상보성 rAAV 벡터인, rAAV 벡터.

청구항 76

제23항 내지 제61항 중 어느 한 항의 발현 카세트, 제62항 내지 제68항 중 어느 한 항의 벡터, 또는 제69항 내지 제75항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 세포.

청구항 77

제62항 내지 제68항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 바이러스 입자.

청구항 78

제69항 내지 제75항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자.

청구항 79

제78항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAVrh74 N502I, AAVrh74 W505R, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 81

제78항 또는 제79항에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, rAAV 입자.

청구항 82

제78항, 제79항 또는 제81항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 83

제82항에 있어서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 84

제78항, 제79항 또는 제81항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 85

제83a항에 있어서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 86

rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산:

AAV2 ITR,

인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산,

Byrne 데스민 인핸서 요소,

Paulin 데스민 인핸서 요소,

데스민 프로모터,

토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암,

5' miR155 스캐폴드 서열,

$DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열,

miR155 말단 루프 서열,

$DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열,

3' miR155 스캐폴드 서열,

토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암,

최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열,

인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및

AAV2 ITR을 포함하며;

캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 87

rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산:

SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR,

SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산,

SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소,

SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소,

SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터,

SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암,

SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열,

SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열,

SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열,

SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열,

SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열,

SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암,

SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열,

SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및

SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하며;

캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 88

제86항 또는 제87항에 있어서, AAVrh74 N502I 캡시드는 SEQ ID NO:50의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 89

rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: AAV2 ITR, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, Byrne 데스민 인핸서 요소, Paulin 데스민 인핸서 요소, 데스민 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, 5' miR155 스캐폴드 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, miR155 말단 루프 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, 3' miR155 스캐폴드 서열, 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 90

rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR, SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터, SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열, SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드인, rAAV 입자.

청구항 91

제86a항 또는 제86b항에 있어서, AAVrh74 W505R 캡시드는 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 92

제77항의 바이러스 입자 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는 조성물.

청구항 93

제77항의 바이러스 입자 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물.

청구항 94

제87항 또는 제88항에 있어서, 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 95

인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는 변형된 데스민 프로모터.

청구항 96

제90항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

청구항 97

제90항 또는 제91항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

청구항 98

제90항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

청구항 99

제90항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 변형된 데스민 프로모터.

청구항 100

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 RNAi를 포함하는 키트.

청구항 101

제77항의 바이러스 입자 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 AAV 입자를 포함하는 키트.

청구항 102

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 103

제95항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 사용에 대한 지침을 추가로 포함하는, 키트.

청구항 104

근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 105

근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 106

DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 107

근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 제77항의 바이러스 입자 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 108

근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제77항의 바이러스 입자의 유효량 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 109

DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제77항의 바이러스 입자의 유효량 또는 제78항 내지 제86항 중 어느 한 항의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 110

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 유효량은 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{13}개의 게놈 카피/mL의 용량인, 방법.

청구항 111

제105항에 있어서, 용량은 약 5×10^{12}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

청구항 112

제105항에 있어서, 용량은 약 1 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

청구항 113

제105항에 있어서, 용량은 약 2 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

청구항 114

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 유효량은 체중 1 kg당 약 1 x 10^{8} 내지 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피의 용량인, 방법.

청구항 115

제109항에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 5 x 10^{13}개의 게놈 카피인, 방법.

청구항 116

제109항에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 1 x 10^{14}개의 게놈 카피인, 방법.

청구항 117

제109항에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피인, 방법.

청구항 118

근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 제87항 내지 제89항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 119

근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제87항 내지 제89항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 120

DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 제87항 내지 제89항 중 어느 한 항의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 121

제99항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, RNAi는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 RNAi의 투여 전에, RNAi의 투여와 동시에, 및/또는 RNAi의 투여 후에 투여되는, 방법.

청구항 122

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 전에, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여와 동시에, 및/또는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 후에 투여되는, 방법.

청구항 123

제113항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 조성물의 투여 전에, 조성물의 투여와 동시에, 및/또는 조성물의 투여 후에 투여되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 (e) 하에, 2022년 4월 6일자로 출원된 미국 가출원 제63/328,241호 및 2023년 2월 3일자로 출원된 미국 가출원 제63/483,075호에 대한 우선권을 주장하며, 이들의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 제출

[0004] XML 파일의 다음 제출 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태(CRF)(파일명: 737870_SA9-363PC_ST26.xml, 생성일: 2023년 4월 3일, 크기: 82,900바이트).

[0005] 본 발명은 변이형 RNAi 분자에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 근이영양증을 치료하기 위한 변이형 RNAi에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] RNA 간섭(RNAi)은 유전자 기능의 기초 연구에서 유전자 침묵화에 유용한 도구로 밝혀졌으며, 다수의 질병의 발병과 연관된 유전자를 억제하는 치료제로서 큰 가능성을 나타낸다. 자연에서, RNAi에 의한 유전자 조절은 마이크로RNA(miRNA)로 알려진 소형 RNA를 통해 일어난다(문헌[Ambros, (2004) *Nature* 431:350-355]; 문헌[Krol *et al.*, (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:597-610]). 마이크로RNA는 다양한 세포 공정의 효력있는 조절인자로 등장했으며, 바이러스 벡터에 의해 전달된 경우, 인공 miRNA가 계속 발현되어 표적 유전자의 강력하고 지속적인 억제를 일으킨다. miRNA 프로세싱에 관여되는 기전의 규명은 과학자들로 하여금 내인성 세포 RNAi 기구에 함께 참가하고 인공 miRNA를 사용하여 표적 유전자 산물의 분해를 유도할 수 있도록 하였다(예를 들어, US PG Pub. 2014/0163214 및 문헌[Davidson *et al.*, (2012) *Cell* 150:873-875] 참조).

[0007] 제1형 근긴장성 이영양증(DM1)은 DMPK 유전자좌에서 CTG 반복부(>50)의 확장에 의해 야기되는 단일유전자성, 상염색체 우성, 진행성 질병이다. 반복부를 갖는 DMPK는 mRNA로 전사되며, 이는 헤어핀을 형성하고 RNA 결합 단백질에 결합하여 상기 단백질이 정상적으로 기능하는 것을 차단한다. 이는 핵 초점의 출현, mRNA의 미스-스플라이싱, 및 궁극적으로 근긴장증을 초래한다. DM1은 주로 골격근, 심장 근육 및 평활근에 영향을 미쳐 유의한 신체, 인지 및 행동 손상 및 장애를 초래한다. 현재 DM1에 대한 승인된 요법은 없다. 따라서, DM1을 치료하기 위한 요법에 대한 충족되지 않은 높은 의학적 요구가 있다.

[0008] 특허 출원 및 공보를 포함하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0009] 일부 양태에서, 본 발명은 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서, a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 가이드 영역은 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하고; c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:1의 서열을 갖는 핵산을 포함하고, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2의 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, RNA 링커는 약 4개 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조는 약 4개 내지 약 20개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프 구조는 SEQ ID NO:3의 서열 또는 SEQ ID NO:3의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 5'에서 3'으로 제2 가닥, RNA 링커, 및 제1 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 5'에서 3'으로 제1 가닥, RNA 링커, 및 제2 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 서열 또는 SEQ ID NO:7의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다.

[0010] 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 스캐폴드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 SEQ ID NO:11의 핵산의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 스캐폴드 내에 내재된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 5' 아암(여기서, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치함), 및 3' 아암(여기서, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치함)을 갖는다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드이다. 일부 구현예에서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 5'에 위치한 SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:9의 서열과의 동일

성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 3'에 위치한 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:10의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함한다.

[0011] 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 근긴장성 이영양증-1(DM1)과 관련된 폴리펩티드를 코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(dystrophia myotonica protein kinase; DMPK)이다. 일부 구현예에서, DMPK는 DM1과 관련된 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, DMPK를 코딩하는 유전자는 5개 이상의 CTG 트리뉴클레오티드 반복부를 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 데스민 프로모터 또는 이의 변이체이다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재된다. 일부 구현예에서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 여기서, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA이다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:17의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다.

[0013] 일부 양태에서, 본 발명은 발현 카세트를 제공하며, 여기서, 발현 카세트는 변형된 데스민 프로모터를 포함하고, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스진을 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재된다. 일부 구현예에서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 여기서, 5' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA이다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 폴리펩티드 또는 핵산을 코딩한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 RNAi를 코딩

한다.

[0014] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열이 측면에 있다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:18의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:19의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터이다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열이 측면에 있다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 2개의 AAV ITR이 측면에 있다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 SEQ ID NO:20의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:20의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 자기 상보성 rAAV 벡터이다.

[0016] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 발현 카세트, 본원에 기술된 임의의 벡터, 또는 본원에 기술된 임의의 rAAV 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0017] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAVrh74 N502I, AAVrh74 W505R, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 캡시드 및 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 캡시드 및 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드이다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공하며, 여기서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: AAV2 ITR, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, Byrne 데스민 인핸서 요소, Paulin 데스민 인핸서 요소, 데스민 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, 5' miR155 스캐폴드 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, miR155 말단 루프 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, 3' miR155 스캐폴드 서열, 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공하며, 여기서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR, SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터, SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열, SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하고; 캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드이다. 일부 구현예에서,

AAVrh74 N502I 캡시드는 SEQ ID NO:50의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 본 발명은 rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공하며, 여기서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: AAV2 ITR, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, Byrne 데스민 인핸서 요소, Paulin 데스민 인핸서 요소, 데스민 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, 5' miR155 스캐폴드 서열, DMPK[204] miRNA 가이드 서열, miR155 말단 루프 서열, DMPK[204] miRNA 패신저 서열, 3' miR155 스캐폴드 서열, 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 AAV2 ITR을 포함하고; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공하며, 여기서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR, SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터, SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DMPK[204] miRNA 가이드 서열, SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열, SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DMPK[204] miRNA 패신저 서열, SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하고; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드이다. 일부 구현예에서, AAVrh74 W505R 캡시드는 SEQ ID NO:52의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다.

[0019] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자 또는 rAAV 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자 또는 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0020] 일부 양태에서, 본 발명은 변형된 데스민 프로모터(예를 들어, 근육 세포에서 트랜스진의 발현을 위한 것)를 제공하며, 여기서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 포함한다.

[0021] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 RNAi, 본원에 기술된 바와 같은 바이러스 입자, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 입자, 또는 본원에 기술된 바와 같은 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 키트는 사용 지침을 추가로 포함한다.

[0022] 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 것을 필요로 하는 포유동물에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi를 투여하는 단계를 포함한다.

[0023] 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 임의의 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질

키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 임의의 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 것을 필요로 하는 포유동물에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 임의의 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] 본 발명의 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 유효량은 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{13}개의 게놈 카피/mL의 용량이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 약 5×10^{12}개의 게놈 카피/mL이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 약 1×10^{13}개의 게놈 카피/mL이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 약 2×10^{13}개의 게놈 카피/mL이다.

[0025] 본 발명의 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 유효량은 체중 1 kg당 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{14}개의 게놈 카피의 용량이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 체중 1 kg당 약 5×10^{13}개의 게놈 카피이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 체중 1 kg당 약 1×10^{14}개의 게놈 카피이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 체중 2 kg당 약 1×10^{14}개의 게놈 카피이다.

[0026] 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 임의의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 조성물 중 임의의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 것을 필요로 하는 포유동물에서 DMPK RNA의 축적을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에게 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0027] 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 여기서, 면역억제제는 RNAi의 투여 전에, RNAi의 투여와 동시에, 및/또는 RNAi의 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 여기서, 면역억제제는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 전에, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여와 동시에, 및/또는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 면역억제제와 조합되어 투여되며, 여기서, 면역억제제는 조성물의 투여 전에, 조성물의 투여와 동시에, 및/또는 조성물의 투여 후에 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0028] 본 출원은 첨부된 도면과 함께 취해진 하기 설명을 참조하여 이해될 수 있다.

도 1a는 nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 유전자 카세트의 서열 개략도를 도시한 것이다. 하이브리드 근육 프로모터는 miR155- amiR-DMPK^{204} 서열의 상류에 위치한다. miRNA로부터의 하류에는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열(minBGHpA)이 있다. A1AT 인트론으로부터의 스터퍼 서열은 카세트의 양쪽 측면에 있다. 이들 모두는 3739 bp의 조합된 벡터 게놈 크기를 생성하는 2개의 AAV2 ITR이 측면에 있다.

도 1b는 nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 유전자 카세트의 클로닝에 사용된 ITR 플라스미드를 도시한 것이다. ITR 플라스미드는 AAV2 5' 및 3' ITR이 측면에 있는 A1AT 스터퍼 서열을 함유한다. A1AT 스터퍼 서열은 클로닝을 위한 NcoI 및 SphI 제한효소 부위를 포함한다.

도 1c는 DC969-nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 플라스미드의 패키징을 확인하기 위해 HEK 293 세포에서 소규모 패키징 분석을 수행한 것의 결과를 도시한 것이다. AAV rep/cap 플라스미드를 사용하여 소규모 생성을 수행하였다. y-축은 표준 EGFP 플라스미드 유전자 카세트(CD627-CBA-GFP)와 비교하여 HEK 293 세포당 생성된 벡터의 양을 나타낸다. DRP: DNase 저항성 입자.

도 2a~도 2c는 꼬리 정맥 주사 후 DMSXL 마우스에서 AAV인 nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}(amiR155-204) 발현 카세

트에 의한 DMPK 녹다운의 평가를 도시한 것이다. **도 2a**는 상이한 기관들에서 트랜스진 카피 수를 정량화함으로써 평가된 바와 같은 AAV의 형질도입 효율 및 생체분포를 나타낸다. qPCR 결과는 AAV 카피 수/핵의 평균 비로 표현된다. **도 2b**는 형질도입된 조직에서의 amiR-DMPK^{204}의 수준을 나타낸다. 마이크로RNA 입력 수준을 U6 소형 핵 RNA에 대해 정규화하고 BSS(균형 염 용액(Balance Salt Solution))-처리된 세포에 대해 설정하였다. **도 2c**는 형질도입된 조직에서의 DMPK의 침묵화를 나타낸다. 총 DMPK를 qRT-PCR에 의해 결정하였다. mRNA 입력을 tata-박스-결합 단백질(TBP)에 대해 정규화하고, BSS-처리된 세포에 대해 설정하였다. 점선은 TBP 발현에 대한 50% DMPK 발현을 나타낸다. **도 2a~도 2c**, 데이터를 쌍별 스튜던트(Student) T 검정을 사용하여 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001. n= 13(BSS), n=12(amiR155-204).

도 3a~도 3b는 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}에 의한 인간 DMPK의 억제를 도시한 것이다. DMSXL 마우스에 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}를 용량 의존적 방식으로 전신 주사하였다. 마우스를 8주 후에 안락사시키고, 기관을 수확하고, amiR-DMPK^{204} 및 DMPK 전사체 수준을 측정하였다. **도 3a**는 다양한 조직에서의 U6에 대해 정규화된 amiR-DMPK^{204}의 존재비를 도시한 것이다. **도 3b**는 다양한 조직에서의 mTBP에 대해 정규화된 hDMPK 전사체의 존재비를 도시한 것이다. ANOVA, 다중-비교 검정을 사용하여 데이터를 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001. (n= wt-10, Bss-7, 저용량 5, 중간 용량 13 및 고용량 7).

도 4는 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}를 이용한 전신 처리 후 DMSXL 마우스에서의 스플라이싱 이상의 교정을 도시한 것이다. LDB3에서의 대안적 엑손 11의 스플라이싱은 8주의 처리 후 비복근에서 RT-PCR을 사용하여 평가하였다. ANOVA, 다중-비교 검정을 사용하여 데이터를 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001. (n= wt-10, Bss-7, 저용량 5, 중간 용량 13 및 고용량 7).

도 5a 및 **도 5b**는 용량 의존적 방식으로 AAV nDes- miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리된 암컷 DMSXL 마우스에서의 증가된 생존율 및 체중을 나타낸다. **도 5a**는 저용량 또는 BSS 처리 동물과 비교하여 8주의 처리 후 중간 용량에 의해 개선된 생존율을 나타내는 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. **도 5b**는 BSS 처리되거나 저용량 처리된 동물과 비교하여 AAV nDes- miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리된 DMSXL 동물에서 관찰된 개선된 체중을 나타낸다.

도 6은 용량 의존적 방식의 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}를 이용한 DMSXL DM1 마우스 모델의 전신 치료 시 DM1 질병의 전기생리학적 특징의 역전을 도시한 것이다. ANOVA, 다중-비교 검정을 사용하여 데이터를 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001. (n= wt-10, Bss-7, 저용량 5, 중간 용량 13 및 고용량 7).

도 7a는 실험 프로토콜의 개략도를 나타낸다. 혈액(🩸)을 -1일차에 수집하여 중화 항체를 재확인하였다. 0일차에 1e13vg/kg의 용량의 GFP 리포터 코딩 AAV를 NHP에 투여하고, D21에 부검을 수행하고, 다수의 조직을 수집하여 생체분포를 평가하였다. **도 7b~도 7e**는 AAV9, AAV rh74 및 AAV rh74 N502I(rh74M)를 주사한 동물의 다양한 조직으로부터의 GFP 발현의 정량화를 나타낸다. 막대 그래프는 전경골근(TA; **도 7b**), 대퇴이두근(**도 7c**), 사두근(**도 7d**), 심장(**도 7e**) 및 간(**도 7f**)에서 ELISA에 의해 측정된 GFP 양을 나타낸다. ANOVA, 다중-비교 검정을 사용하여 데이터를 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001.

도 8a 및 도 8b는 AAV rh74 N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}에 의한 인간 DMPK의 억제를 나타낸다. DMSXL 마우스에 AAV rh74 N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}를 용량 의존적 방식으로 전신 주사하였다. 마우스를 8주 후에 안락사시키고, 기관을 수확하고, amiR-DMPK^{204} 및 DMPK 전사체 수준을 측정하였다. **도 8a**는 다양한 조직에서의 U6에 대해 정규화된 amiR-DMPK^{204}의 존재비를 도시한 것이다. **도 8b**는 다양한 조직에서의 mTBP에 대해 정규화된 hDMPK 전사체의 존재비를 도시한 것이다. ANOVA, 다중-비교 검정을 사용하여 데이터를 평가하였다: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 및 ****p < 0.0001.

도 9는 AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}에 의한 내인성 DMPK의 침묵화를 나타낸다. 총 DMPK 수준은 iPSC로부터 분화된 인간 DM1 심근세포로부터 추출된 RNA에서의 qRT-PCR에 의해 결정되었다. 이들 심근세포를 AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}로 형질도입하였다. mRNA 입력 수준을 TBP mRNA에 대해 정규화하였다. miRCTL3은 음성 대조군으로서 작용하였고 1로 설정되었다. 쌍별 스튜던트 T 검정: **p < 0.01.

도 10은 amiR-DMPK^{204} 처리된 HEK293 세포(Benjamini Hochberg FDR< 1%)에서 게놈 전체(genome-wide) 유전자 발현 변화를 나타내는 볼케이노 플롯이다. 표는 상보성 3' UTR 시드를 포함하는 상위 4개의 차별적으로 발현된(DE) 유전자를 나타내며, 이때 FDR<1% 및 FDR<5%이다.

도 11은 다중 서열 중 amiRDMPK^{204} 표적 서열의 보존을 나타낸다. 인간 표적은 SEQ ID NO:28이고, 마카크 표적은 SEQ ID NO:29이고, 마우스 표적은 SEQ ID NO:30이고, 래트 표적은 SEQ ID NO:31이고, 개 표적은 SEQ ID NO:32이다.

도 12는 표시된 처리군에서의 다수의 조직에서의 바이러스 게놈 카피/세포의 생체분포를 예시한다.

도 13은 표시된 처리군에서의 다양한 근육 조직에서의 용량 의존적 amiR-DMPK 발현을 나타낸다.

도 14는 각각의 표시된 처리군에 대한 다양한 근육에서의 처리 후의 DMPK 발현 수준을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 일부 양태에서, 본 발명은 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 제공하며, 여기서, a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 가이드 영역은 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하고; c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 RNAi를 코딩하는 핵산을 발현하기 위한, 예를 들어 포유동물의 근육에서 RNAi를 발현하기 위한 발현 카세트를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트는 rAAV 벡터 내에 있다.

[0030] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 포유동물에 투여함으로써 포유동물에서 근긴장성 이영양증 1(DM-1)을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 투여된 RNAi는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하고; 이에 의해 포유동물에서 DM-1을 개선한다.

[0031] **일반 기술**

[0032] 본원에 기술되거나 언급된 기술 및 절차는 예를 들어, 하기 문헌에 기술된 널리 이용되는 방법과 같이, 당업자에 의해 일반적으로 잘 이해되어 있고 종래의 방법을 사용하여 통상적으로 이용된다: 문헌[*Molecular Cloning*: *A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)]; 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003)]; 시리즈인 문헌[Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995)]; 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane, eds., 1988)]; 문헌[Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010)]; 문헌[*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984)]; 문헌[Methods in Molecular Biology, Humana Press]; 문헌[Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998)]; 문헌[Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)]; 문헌[Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8)]; 문헌[Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996)]; 문헌[Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)]; 문헌[PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)]; 문헌[Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991)]; 문헌[Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002)]; 문헌[Immunobiology (C.A. Janeway et al., 2004)]; 문헌[Antibodies (P. Finch, 1997)]; 문헌[Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; 문헌[Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; 문헌[Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; 문헌[The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 문헌[Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011)].

[0033] **정의**

[0034] 본원에 사용된 "벡터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드(리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드)를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-, 이중-, 또는 여러-가닥의 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 푸린 및 피리미딘 염기를 포함하는 중합체, 또는 기타 천연의, 화학적, 또는 생화학적으로 변형된, 비천연적인, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 폴리뉴클레오티드의 백본은 당 및 포스페이트기(일반적으로 RNA 또는 DNA에서 발견될 수 있음), 또는 변형되거나 치환된 당 또는 포스페이트기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 백본은 포스포르아미데이트와 같은 합성 서브유닛의 중합체를 포함할 수 있고, 따라서 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포르아미데이트($P\text{-}NH_2$) 또는 혼합된 포스포르아미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 또한, 상보적 가닥을 합성하고 적절한 조건에서 가닥을 어닐링함으로써, 또는 적절한 프라이머와 함께 DNA 폴리머라아제를 사용하여 상보적 가닥을 드노보 합성함으로써 화학적 합성의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물로부터 이중 가닥 폴리뉴클레오티드가 수득될 수 있다.

[0036] 용어 "폴리펩티드"와 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체, 및 다량체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편이 모두 상기 정의에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 목적하는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결실, 부가, 및 치환(일반적으로 자연적으로 보존적)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발을 통해서와 같이 의도적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우연적일 수 있다.

[0037] "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이종 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 재조합 AAV 벡터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나의, 그리고 일부 구현예에서는 2개의, 역위 말단 반복부 서열(ITR)이 측면에 있다.

[0038] "재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 적어도 하나의, 그리고 일부 구현예에서는 2개의, AAV 역위 말단 반복부 서열(ITR)이 측면에 있는 하나 이상의 이종 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 나타낸다. 이러한 rAAV 벡터는 적절한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적절한 헬퍼 기능을 발현하고), AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 숙주 세포에 존재할 때 복제될 수 있고, 감염성 바이러스 입자로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 염색체, 또는 클로닝이나 형질감염에 사용되는 플라스미드와 같은 다른 벡터)에 통합될 때, 이러한 rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적절한 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "회수"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 벡터는 비제한적으로 지질과 복합체화되고, 리포좀 내에 캡슐화되고, 바이러스 입자, 특히 AAV 입자에 캡시드화된 선형 인공 염색체, 플라스미드를 포함하는 다수의 형태 중 임의의 형태일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드에 패키징되어 "재조합 아데노-관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성할 수 있다.

[0039] "이종"은 비교 대상이 되거나 내부에 도입 또는 통합되는 개체의 나머지와는 유전자형으로 구분되는 개체로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 다양한 세포 유형에 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종 폴리뉴클레오티드이다(발현되는 경우, 이종 폴리펩티드를 코딩할 수 있음). 마찬가지로, 바이러스 벡터에 통합되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 부분)은 벡터에 대해 이종 뉴클레오티드 서열이다.

[0040] 용어 "트랜스진"은 세포에 도입되어 RNA로 전사될 수 있고, 필요에 따라, 적절한 조건에서 번역 및/또는 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 양태에 따라, 이는 도입된 세포에 요구되는 특성을 제공하거나, 요구되는 치료적 또는 진단적 결과를 유도한다. 또 다른 양태에서, 이는 RNA 간섭을 매개하는 분자, 예를 들어, miRNA, siRNA, 또는 shRNA로 전사될 수 있다.

[0041] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "게놈 입자(gp)", "게놈 당량", 또는 "게놈 카피(gc)"는 감염성 또는 기능성과 무관하게, 재조합 AAV DNA 게놈을 포함하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 제조물 내의 게놈 입자의 수는 본원의 실시예, 또는, 예를 들어, 문헌[Clark *et al*. (1999) Hum. *Gene Ther*., 10:1031-1039]; 문헌[Veldwijk et al. (2002) Mol. *Ther*., 6:272-278]에 기술된 바와 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "벡터 게놈(vg)"은 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 한 세트의 폴리뉴클레오티드 서열을

포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 벡터 게놈은 바이러스 입자에 캡시드화될 수 있다. 특정 바이러스 벡터에 따라, 벡터 게놈은 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 DNA, 또는 단일 가닥 RNA, 또는 이중 가닥 RNA를 포함할 수 있다. 벡터 게놈은 특정 바이러스 벡터와 관련된 내인성 서열 및/또는 재조합 기술을 통해 특정 바이러스 벡터에 삽입되는 임의의 이종 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터 게놈은 프로모터의 측면에 있는 적어도 하나의 ITR 서열, 스터퍼, 관심 서열(예를 들어, RNAi), 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 완전한 벡터 게놈은 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열의 완전한 세트를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터의 핵산 역가는 vg/ml 단위로 측정될 수 있다. 이러한 역가를 측정하는 데 적합한 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 정량적 PCR).

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "억제한다"는 특정 표적을 차단하거나, 감소시키거나, 제거하거나, 그 존재 또는 활성을 다르게 길항하는 행위를 나타낼 수 있다. 억제는 부분적 억제 또는 완전한 억제를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 유전자의 발현을 억제한다는 것은 mRNA 존재비(abundance)의 감소(예를 들어, mRNA 전사 침묵화), mRNA의 분해, mRNA 번역의 억제 등을 포함하는, 유전자 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항을 일으키는 임의의 행위를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, DMPK의 발현을 억제한다는 것은 DMPK mRNA 존재비의 감소(예를 들어, DMPK mRNA 전사 침묵화), DMPK mRNA의 분해, DMPK 번역의 억제 등을 포함하는, DMPK 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 임의의 다른 길항작용을 지칭할 수 있다. 또 다른 예로서, 세포에서 단백질의 축적을 억제한다는 것은 mRNA 존재비의 감소(예를 들어, mRNA 전사 침묵화), mRNA의 분해, mRNA 번역의 억제, 단백질의 분해 등을 포함하는, 단백질 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 다른 길항작용을 일으키는 임의의 행위를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 세포에서 DMPK 단백질의 축적을 억제한다는 것은 DMPK mRNA 존재비의 감소(예를 들어, DMPK mRNA 전사 침묵화), DMPK mRNA의 분해, DMPK mRNA 번역의 억제, DMPK 단백질의 분해 등을 포함하는, 세포에서의 DMPK 단백질 발현의 차단, 감소, 제거, 또는 다른 길항작용을 지칭한다.

[0044] 바이러스 역가와 연관하여 사용된 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자", 또는 "복제 단위"는 예를 들어, 문헌(McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973)에 기술된 바와 같이, 복제 중심 검정으로도 알려져 있는, 감염 중심 검정으로 측정된, 감염성 및 복제 능력이 있는 재조합 AAV 벡터 입자들의 수를 지칭한다.

[0045] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본원의 실시예에 기술되거나, 예를 들어, 문헌[Xiao et al. (1997) Exp. *Neurobiol.*, 144:113-124; 또는 Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532]에 기술된 바와 같은 기능 분석법에서 측정된 바와 같은 기능성 트랜스진 생성물의 생성을 초래하는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0046] "역위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 당업계에서 널리 이해되는 용어로, 반대 방향의 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다.

[0047] 당업계에서 널리 이해되는 용어인 "AAV 역위 말단 반복(ITR)" 서열은 고유한 단일 가닥의 AAV 게놈의 양 말단에 존재하는 대략 145-뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽 125개 뉴클레오티드는 두 가지 대안적인 방향 중 하나로 존재할 수 있어, 상이한 AAV 게놈들 사이에, 그리고 단일 AAV 게놈의 양 말단 사이에 이질성을 초래한다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 또한 자기-상보성의 여러 짧은 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 명명됨)을 포함하며, 이는 가닥내 염기쌍 형성이 ITR의 상기 부분 내에서 발생하는 것을 가능케 한다.

[0048] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 중에 AAV rep 단백질에 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단에 불응한다.

[0049] "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 비제한적으로 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 임의의 여러 형태로 제공될 수 있다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당업계에 알려져 있다.

[0050] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 (결함이 있는 파보바이러스인) AAV가 숙주 세포에 의해 복제되어 패키징될 수 있게 하는 바이러스를 지칭한다. 헬퍼 바이러스는 AAV의 복제를 가능하게 하는 "헬퍼 기능"을 제공한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예를 들어, 백시니아 및 배큘로바이러스를 비롯한 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 많은 상이한 서브그룹을 포함하지만, 서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 흔히 사용된다. 인간, 비인간 포유동물, 및 조류 기원의 여러 아데노바이러스가 알려져 있으며, ATCC와 같은 기탁기관으로부터 입수 가능하다. ATCC와 같은 기탁기관으로부터 또한 입수 가능한 헤르페스 패밀리의 바이러스는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바

이러스(CMV), 및 가성 광견병 바이러스(PRV)를 포함한다. AAV의 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능의 예는 E1A 기능, E1B 기능, E2A 기능, VA 기능, 및 E4orf6 기능을 포함한다. 기탁기관으로부터 입수 가능한 배큘로바이러스는 Autographa californica 핵 다면체형성 바이러스를 포함한다.

[0051] rAAV의 조제물은 감염성 AAV 입자 대 감염성 헬퍼 바이러스 입자의 비가 적어도 약 102:1; 적어도 약 104:1, 적어도 약 106:1; 또는 적어도 약 108:1 이상인 경우, 헬퍼 바이러스가 "실질적으로 없는" 것으로 언급된다. 일부 구현예에서, 조제물은 등가량의 헬퍼 바이러스 단백질(즉, 상기 언급된 헬퍼 바이러스 입자 불순물이 손상된 형태로 존재하는 경우 그러한 수준의 헬퍼 바이러스의 결과로서 존재할 단백질)이 또한 없다. 바이러스 및/또는 세포 단백질 오염은 일반적으로 SDS 겔 상의 쿠마시 염색 밴드의 존재(예를 들어, AAV 캡시드 단백질 VP1, VP2, 및 VP3에 상응하는 밴드가 아닌 밴드의 출현)로서 관찰될 수 있다.

[0052] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열과 관련된 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고, 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요한 경우 갭을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한, 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로서 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부분으로 고려하지 않는다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 백분율 결정의 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1]에 기술된, 그리고 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 포함하는 것을 사용하여 당업계의 기술 범위 내인 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN 플러스(Scientific and Educational Software, Pennsylvania)이다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬 측정을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 본원의 목적상, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 이와, 또는 이에 대하여, 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %(이는 대안적으로는 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 이와, 또는 이에 대하여, 특정 %의 아미노산 서열 동일성을 가지거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라고 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다: 100 x 분율 X/Y(X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램에 의한 프로그램 정렬시, 동일한 매칭으로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B의 총 아미노산 잔기수임). 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A 대 B의 아미노산 서열 동일성%는 B 대 A의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 본원의 목적상, 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이에 의해, 또는 이와 연관하여, 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성%(대안적으로는, 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이에 의해, 또는 이와 연관하여, 특정 핵산 서열 동일성%를 가지거나 이를 포함하는 주어진 핵산 서열 C로서 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다: 100 x 분율 W/Z(W는 C 및 D의 서열 정렬 프로그램에 의한 프로그램 정렬시, 동일한 매칭으로 스코어링된 뉴클레오티드의 수이며, Z는 D의 총 뉴클레오티드 수임). 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우, C 대 D의 핵산 서열 동일성%는 D 대 C의 핵산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

[0053] "단리된" 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 천연 환경 성분으로부터 확인되고, 분리되고/분리되거나 회수되었음을 의미한다.

[0054] "유효량"은 임상 결과를 포함하는, 유익한 또는 요망되는 결과(예를 들어, 증상의 완화, 임상 종결점의 달성 등)를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상 투여로 투여될 수 있다. 질병 상태의 측면에서, 유효량은 질병을 완화하거나, 안정화하거나, 또는 발생을 지연시키기에 충분한 양이다.

[0055] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0056] 본원에서 사용되는 "치료"는 유익하거나 요망되는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 이롭거나 요망되는 임상 결과는 비제한적으로 검출 가능하건 검출 가능하지 않건 간에 증상의 경감, 질병 정도의 감소, 질병의 안정화된(예를 들어, 악화되지 않은) 상태, 질병의 확산(예를 들어, 전이) 방지, 질병 진행의 지연 또는 둔화, 질병 상태의 완화 또는 일시적 억제, 및 관해(부분적이건 전체적이건)을 포함한다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존에 비해 연장되는 생존을 의미할 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "예방적 치료"는 개체가 장애를 갖거나 장애를 가질 위험이 있는 것으로 알려지거나 의심되지만 장애의 증상을 나타내지 않거나 최소 증상을 나타낸 치료를 의미한다. 예방적 치료를 받는 개체는 증상의 발생 전에 치료될 수 있다.

[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제1형 근긴장성 이영양증" 또는 "DM1"은 골격근 및 평활근뿐만 아니라 눈, 심장, 내분비계 및 중추신경계에 영향을 미치는 다중시스템 장애를 지칭한다. 3개의 중첩 범주의 Dm-1이 있다(문헌[Bird, TD, *Myotonic Dystrophy Type 1*. 1999 Sep 17[2021 3월 25일 업데이트]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al*., editors. *GeneReviews*®[인터넷]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022]). 경도 DM1은 백내장 및 경도 근긴장증을 특징으로 하며, 고전형 DM1은 근육 약화 및 소모, 근긴장증, 백내장, 및 종종 심장 전도 이상을 특징으로 하며, 선천성 DM1은 출생 시 근긴장저하 및 중증 전신 쇠약을 특징으로 하는데, 이는 종종 호흡기 부전 및 조기 사망을 동반하고; 지적 장애가 흔하다.

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "근긴장 디스트로피 단백질 키나아제", "DMPK" "마이오토닌-단백질 키나아제", "MT-PK", "근긴장성 이영양증 단백질 키나아제" 또는 "MDPK"는 대부분의 DM1의 사례와 관련된 유전자 또는 이의 폴리펩티드 산물을 지칭할 수 있다. DMPK 유전자의 3' 비번역 영역은 CTG 트리뉴클레오티드 반복부의 5~37개 카피를 함유한다. 이러한 불안정한 모티프를 50~1,000개의 카피까지 확장시키는 것은 제I형 근긴장성 이영양증을 야기하며, 이는 반복 요소 카피 수가 증가함에 따라 중증도를 증가시킨다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, "RNAi"는 세포에서 RNA 간섭을 유도하는 임의의 RNA 분자를 나타낼 수 있다. RNAi의 예는 비제한적으로 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함한다.

[0061] "miRNA"는 (i) RNAi에 의한 녹다운을 위한 관심 유전자를 표적화하는 이중 가닥 서열 및 (ii) 내인성 miRNA와 유사한 스템-루프(stem-loop) 구조를 형성하는 추가의 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA는 스템-루프 구조의 측면에 있는 핵산을 포함한다. 이러한 측면 서열은 "miRNA 스캐폴드"로 알려져 있다. RNAi를 위한 관심 유전자를 표적화하는 서열(예를 들어, 짧은 약 20 nt의 서열)은 miRNA 유사 스템-루프를 생성하는 서열, 및 폴리뉴클레오티드가 miRNA 유사 2차 구조로 조립되는 경우 관심 서열과 염기쌍을 형성하여 이중체를 형성하는 서열에 라이게이션될 수 있다. 본원에 기술되는 바와 같이, 이러한 이중체는 불완전하게 혼성화될 수 있으며, 예를 들어 이것은 을 형성하지 않거나 쌍 형성 오류가 일어난 하나 이상의 염기를 함유할 수 있다. Dicer에 의한 이러한 폴리뉴클레오티드의 절단 시, 관심 유전자를 표적화하는 서열을 함유하는 이러한 이중체는 풀려서 RISC 복합체 내로 혼입될 수 있다. miRNA 스캐폴드는 miRNA 자체 또는 miRNA를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. miRNA 스캐폴드의 예는 miR-155 서열(문헌[Lagos-Quintana, M. *et al*. (2002) Curr. *Biol*. 12:735-9] 및 mirGE 스캐폴드(WO 2014016817A2)를 포함한다. 서열을 miRNA 스캐폴드 내로 클로닝하기 위한 상업적으로 이용 가능한 키트는 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific(미국 매사추세츠주 월섬 소재)으로부터의 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트).

[0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "센스" 핵산은 트랜스진의 전부 또는 일부를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산이다. 일부 예에서, 트랜스진에 대한 mRNA는 센스 핵산이다.

[0063] 본원에서 사용되는 바와 같이, "안티센스" 핵산은 "센스" 핵산과 상보적인 핵산의 서열이다. 예를 들어, 안티센스 핵산은 트랜스진을 코딩하는 mRNA와 상보적일 수 있다.

[0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, RNAi의 "가이드 영역"은 전형적으로 상보성을 기초로 하여 표적 mRNA에 결합하는 RNAi의 가닥이다. 상보성 영역은 가이드 영역의 전부 또는 일부를 포괄할 수 있다. 전형적으로, 상보성 영역은 적어도 시드 영역을 포함한다. 많은 경우, RNAi의 안티센스 영역은 가이드 영역이다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 RNAi의 "패신저 영역" 또는 "비-가이드 영역"은 가이드 영역과 상보적인 RNAi의 영역이다. 많은 경우, RNAi의 센스 영역은 패신저 영역이다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, RNAi(예를 들어, miRNA)의 "시드 영역"은 길이가 약 1개 내지 8개의 뉴클레오티드인 마이크로RNA의 영역이다. 일부 예에서, 이의 표적 mRNA의 3'-UTR과 시드 영역은 RNAi 인식에서 주요 결정 인자일 수 있다.

[0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, "오프-타겟 유전자 침묵화"는 RNAi의 시드 영역이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 불안정화를 유도하는 것(예를 들어, 의도하지 않은 mRNA의 발현을 감소시킴)을 나타낸다.

[0068] 본원에서 값, 또는 파라미터에 대한 "약"의 언급은 해당 값, 또는 파라미터 그 자체에 대한 구현예를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "약 X"에 대한 설명은 "X"의 설명을 포함한다.

[0069] 본원에 사용된 단수형은 달리 표시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0070] 본원에 기술된 본 발명의 양태 및 구현예는, 양태 및 구현예를 "포함하는", 이들로 "이루어지는" 및/또는 이들로 "필수적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

[0071] RNAi

[0072] 일부 양태에서, 본 발명은 제1형 근긴장성 이영양증의 치료를 위해 DMPK RNA를 표적화하는 개선된 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 작은 억제성 또는 간섭성 RNA(siRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 길이가 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍인 이중 가닥 RNA 분자로 당업계에 알려져 있다. miRNA는 전형적으로 siRNA보다 작고, 다수의 표적을 가질 수 있으며, 번역을 억제하고, mRNA를 분해하며, 일부 경우에 mRNA를 엔도뉴클레오라이틱 방식으로 절단하는 기능을 한다. 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 짧은 루프(예를 들어, 약 4개 내지 약 11개의 뉴클레오티드)에 의해 연결된 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍의 이중 가닥 RNA를 포함하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다. 일부 구현예에서, RNAi는 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하며, 여기서, a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 가이드 영역은 핵산 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)을 포함하고; c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵 가이드 영역은 핵산 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)을 포함하고, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)을 포함한다.

[0073] 일부 구현예에서, 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 여기서, 가이드 영역은 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하며, 여기서, 가이드 영역은 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함하지만 적어도 하나의 CpG 모티프를 유지한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서, 비-가이드 영역은 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함하며, 여기서, 비-가이드 영역은 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함하지만 적어도 하나의 CpG 모티프를 유지한다.

[0074] 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함하지만 적어도 하나의 서열(예를 들어, 시드 서열 내)을 유지한다.

[0075] 일부 구현예에서, 본 발명은 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산을 제공하며, 여기서, a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고; c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 코딩하는 핵산은 SEQ ID NO:4의 핵산 서열 및/또는 SEQ ID NO:5의 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi를 코딩하는 핵산은 SEQ ID NO:4와의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열 및/또는 SEQ ID NO:5와의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:8의 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:8과의 동일성이 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 초과인 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0076] 마이크로RNA(miRNA)는 루프에 의해 연결된 짧은(예를 들어, 19개 내지 25개의 염기쌍) 이중 가닥 RNA 서열을 포함하고, 하나 이상의 벌지(예를 들어, 쌍 형성 오류가 일어나거나 쌍을 형성하지 않은 염기쌍)를 포함하는 하나 이상의 추가의 이중 가닥 RNA 서열을 포함하는, 세포에서 RNAi를 유도하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "miRNA"는 내인성 miRNA뿐만 아니라 외인성 또는 이종 miRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, "miRNA"는 pri-miRNA 또는 pre-miRNA를 나타낼 수 있다. miRNA 프로세싱 동안, pri-miRNA 전사체가 생성된다. pri-miRNA는 5' 측면 영역, 가이드 가닥, 루프 영역, 비-가이드 가닥 및 3' 측면 영역; 또는 5' 측면 영역, 비-가이드 가닥, 루프 영역, 가이드 가닥 및 3' 측면 영역을 갖는 pre-miRNA를 남기도록 하나 이상의 서열을 절제함으로써 pre-miRNA를 생성하도록 Drosha-DGCR8에 의해 프로세싱된다. 그 후, pre-miRNA는 세포질로 내보내지고, Dicer에 의해 프로세싱되어 가이드 가닥과 비-가이드(또는 패신저) 가닥을 갖는 siRNA를 생성한다. 그 후, 가이드 가닥은 RISC 복합체에 의해 사용되어, 예를 들어 가이드 가닥과 상보적인 표적 RNA 서열

을 인식함으로써, 유전자 침묵화를 촉매한다. miRNA의 추가 설명은, 예컨대, WO 2008/150897에서 확인될 수 있다. miRNA에 의한 표적 서열의 인식은 표적 및 miRNA 시드 서열, 예를 들어 가이드 가닥의 뉴클레오티드 1~8(5'에서 3'으로) 사이의 쌍 형성에 의해 주로 결정된다(예를 들어, 문헌[Boudreau, R.L. *et al.* (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:e9] 참조).

[0077] pri/pre-miRNA 구조에서, 이중체에서의 가이드 가닥:비-가이드 가닥 계면은 부분적으로 상보적 염기쌍 형성(예를 들어, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성)을 통해 형성된다. 그러나, 일부 구현예에서, 이러한 상보적 염기쌍 형성이 전체 이중체를 통해 확장되지 않는다. 일부 구현예에서, 계면 내의 벌지가 하나 이상의 뉴클레오티드 위치에 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벌지"는 이중체에서 이와 반대쪽에 있는 핵산과 비상보적인 핵산의 영역을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 상보적인 핵산 영역은 서로 결합하는 반면 중심의 비상보적 영역의 영역들은 결합하지 않는 경우에 벌지가 형성된다. 일부 구현예에서, 벌지는 두 상보적인 영역 사이에 위치한 두 가닥의 핵산이 상이한 길이를 갖는 경우에 형성된다. 하기 설명되는 바와 같이, 벌지는 1개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0078] miRNA 프로세싱 동안, miRNA는 가이드 가닥:비-가이드 가닥 계면에 인접한 절단가능 부위에서 절단되며, 이에 따라 가이드 가닥과 비-가이드 가닥의 siRNA 이중체를 방출한다. 일부 구현예에서, miRNA는 절단 부위에 인접한 센스 또는 안티센스 가닥에 벌지를 포함한다. 또 다른 방식으로 설명하자면, 일부 구현예에서, miRNA는 시드 서열에 인접한 가이드 또는 비-가이드 가닥에 벌지를 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, miRNA는 성숙한 비-가이드 가닥의 5' 절단 부위의 반대쪽에 있는 가이드 가닥에 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 비-가이드 가닥의 5' 뉴클레오티드의 반대쪽에 있는 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 성숙 가이드 가닥의 3' 절단 부위의 반대쪽에 있는 센스 가닥에 벌지를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 가이드 가닥의 3' 뉴클레오티드의 반대쪽에 있는 벌지를 포함한다.

[0080] RNAi 기반 요법의 안전성은 오프-타겟 유전자 침묵화로 알려져 있는 효과인 의도하지 않은 mRNA와 결합하여 이의 발현을 감소시키는 작은 억제성 RNA(siRNA)의 능력에 의해 방해받을 수 있다. 오프-타겟팅(off-targeting)은 시드 영역(작은 RNA의 뉴클레오티드 2~8개)이 의도하지 않은 mRNA의 3'-UTR의 서열과 쌍을 형성하여 그러한 전사체의 번역 억제 및 탈안정화를 유도하는 경우에 주로 발생한다. 오프-타겟팅 RNAi의 감소는 가이드 및 비-가이드 서열 내의 염기를 치환함으로써, 예를 들어 CpG 모티프를 생성함으로써 설계될 수 있다. 유의하게 더 낮은 오프-타겟 스코어를 생성시킬 수 있는 잠재적인 치환은 최소의 오프-타겟팅 가능성 및 효력있는 침묵화 능력을 갖는 후보 서열을 확인하는 특이성 중심의(specificity-focused) siRNA 설계 알고리즘인 SiSPOTR 알고리즘을 이용하여 평가될 수 있다(문헌[Boudreau *et al*, *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan; 41(1) e9]). 감소된 SiSPOTR 스코어는 모(parent) RNAi 분자와 비교하여 더 적은 수의 잠재적 인간 오프 타겟을 갖는 서열을 예측해준다. 본 발명의 일부 구현예에서, RNAi는 오프-타겟 유전자 침묵화를 감소시키도록 개선된다.

[0081] 일부 구현예에서, 제1 가닥과 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA(예를 들어, RNA 링커)에 의해 연결된다. 당업계에 통상적으로 알려져 있는 바와 같이, RNA 루프 구조(예를 들어, 스템-루프 또는 헤어핀)는 RNA 분자가 함께 염기쌍을 형성하지 않는 RNA 서열에 의해 분리된 함께 염기쌍을 형성하는 2개의 RNA 서열을 포함하는 경우에 형성된다. 예를 들어, 루프 구조는, 서열 A와 서열 C가 함께 염기쌍을 형성하도록 상보적이거나 부분적으로 상보적이지만 서열 B의 염기는 함께 염기쌍을 형성하지 않는 경우에, RNA 분자 A-B-C에서 형성될 수 있다.

[0082] 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 소정 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 루프를 형성할 수 있는 RNA의 뉴클레오티드 수는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드 또는 그 사이의 임의의 정수 개의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 루프의 0 내지 50%가 루프의 또 다른 부분과 상보적일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "루프 구조"는 2개의 상보적인 핵산 가닥을 결합시키는 서열이다. 일부 구현예에서, 루프 구조의 1개 내지 3개의 뉴클레오티드는 상보적인 핵산 가닥에 연속해 있으며, 루프 구조의 원위 부분의 1개 내지 3개의 뉴클레오티드와 상보적일 수 있다. 예를 들어, 루프 구조의 5' 말단의 3개의 뉴클레오티드는 루프 구조의 3' 말단의 3개의 뉴클레오티드와 상보적일 수 있다.

[0083] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산은 이종 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 miRNA 스캐폴드의 사용은 miRNA 발현을 조절하기 위하여, 예를 들어, miRNA 발현을 증가시키기 위하여 또는 miRNA 발현을 감소시키기 위하여 사용된다. 당업계에 알려진 임의의 miRNA 스캐폴드가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드(예를 들어, 문헌[Lagos-Quintana, M. *et al.* (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9] 참조) 및 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트(Life Technologies,

Thermo Fisher Scientific; 미국 매사추세츠주 월섬 소재) 또는 mirGE 스캐폴드(WO 2014/016817)로부터 유래된다.

[0084] **제1형 근긴장성 이영양증(DM-1)을 치료하는 방법**

[0085] 제1형 근긴장성 이영양증(DM1)은 DMPK 유전자좌(근긴장 디스트로피 단백질 키나아제)에서 CTG 반복부(>50)의 확장에 의해 야기되는 단일유전자성, 상염색체 우성, 진행성 질병이다. 반복부를 갖는 DMPK는 mRNA로 전사되며, 이는 헤어핀을 형성하고 RNA 결합 단백질에 결합하여 상기 단백질이 정상적으로 기능하는 것을 차단한다. 이는 핵 초점의 출현, 미스-스플라이싱, 및 궁극적으로 근긴장증을 초래한다. DM1은 주로 골격근, 심장 근육 및 평활근에 영향을 미쳐 유의한 신체, 인지 및 행동 손상 및 장애를 초래한다.

[0086] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물(예를 들어, 본 발명의 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물)을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 제1형 근긴장성 이영양증(DM1)을 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물(예를 들어, 본 발명의 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물)을 DM-1을 갖는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, DM-1을 갖는 포유동물에서 DMPK의 발현을 억제하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물(예를 들어, 본 발명의 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물)을 DM1을 갖는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, DM1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK의 축적을 억제하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNAi를 코딩하는 벡터를 포함하는 유효량의 rAAV 입자를 포유동물의 근육뇌에 투여하는 단계를 포함하는, DM1의 증상을 개선하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0087] 일부 양태에서, 본 발명은 DM1을 갖는 포유동물에서 DMPK mRNA를 표적화하기 위한 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, RNAi는 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1)을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2)을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함한다. 본원에 기술된 RNAi는 (예를 들어, rAAV 벡터의 일부로서) 특히 DM1을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, RNAi는 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 작은 억제성 또는 간섭성 RNA(siRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 길이가 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍인 이중 가닥 RNA 분자로 당업계에 알려져 있다. miRNA는 전형적으로 siRNA보다 작고, 다수의 표적을 가질 수 있으며, 번역을 억제하고, mRNA를 분해하며, 일부 경우에 mRNA를 엔도뉴클레오라이틱 방식으로 절단하는 기능을 한다. 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는, 세포에서 RNAi를 유도하는, 짧은 루프(예를 들어, 약 4개 내지 약 11개의 뉴클레오티드)에 의해 연결된 대략 19개 내지 25개(예를 들어, 19개 내지 23개) 염기쌍의 이중 가닥 RNA를 포함하는 RNA 분자로서 당업계에 알려져 있다.

[0089] 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일한 가이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:1과 약 90% 동일하거나, 약 91% 동일하거나, 약 92% 동일하거나, 약 93% 동일하거나, 약 94% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 96% 동일하거나, 약 97% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하거나, 약 100% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 가이드 서열을 포함한다.

[0090] 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일한 비-가이드 서열(패신저 가닥)을 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA는 SEQ ID NO:2와 약 90% 동일하거나, 약 91% 동일하거나, 약 92% 동일하거나, 약 93% 동일하거나, 약 94% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 96% 동일하거나, 약 97% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하거나, 약 100% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 비-가이드 서열을 포함한다.

[0091] 일부 구현예에서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA에 의해 연결된다. 당업계에 통상적으로 알려져 있는 바와 같이, RNA 루프 구조(예를 들어, 스템-루프 또는 헤어핀)는 RNA 분자가 함께 염기쌍을 형성하지 않는 RNA 서열에 의해 분리된 함께 염기쌍을 형성하는 2개의 RNA 서열을 포함하는 경우에 형성된다. 예를 들어, 루프 구조는, 서열 A와 서열 C가 함께 염기쌍을 형성하도록 상보적이거나 부분적으로 상보적이지만 서열 B의 염기는 함께 염기쌍을 형성하지 않는 경우에, RNA 분자 A-B-C에서 형성될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 4개 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 소정 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 13개의 뉴클레오티드를 포함한다. 소정 구현예에서, 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA는 뉴클레오티드 서열 GUUUUGGCCACUGACUGAC(SEQ ID NO:3)를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터 게놈은 SEQ ID NO:3의 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 동일한 것 중 임의의 %로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0093] 일부 양태에서, 본 발명은 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU -3'(SEQ ID NO:1)을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2)을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 포유동물(예를 들어, DM1을 갖는 포유동물)에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 RNAi를 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 입자는 rAAV 벡터를 캡시드화하는 AAV 입자이며, 여기서, rAAV 벡터는 RNAi를 코딩한다.

[0094] 일부 구현예에서, rAAV 입자의 전달은 rAAV 입자를 포유동물에 전신 주사함에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 전신 주사는 정맥내 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피내 주사, 또는 피하 주사, CSF내 투여 및 척수강내 투여(IT)이다.

[0095] 일부 양태에서, 본 발명은 포유동물에서 DM1을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 DM1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK의 축적을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 DM1을 갖는 포유동물에서 DMPK의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 포유동물에 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, DMPK는 돌연변이 DMPK(예를 들어, 37개 초과 또는 50개 초과의 CTG 반복부를 포함하는 DMPK)이다.

[0096] 일부 구현예에서, 본 발명은 돌연변이 DMPK의 활성을 억제하도록 본 발명의 RNAi를 코딩하는 rAAV 벡터를 포함하는 유효량의 제약 조성물을 투여함으로써 DM1을 갖는 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 제약 조성물은 제약상 허용가능한 하나 이상의 부형제를 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, 방법은 돌연변이 DMPK의 활성을 억제하도록 본 발명의 RNAi를 코딩하는 rAAV 벡터를 포함하는 유효량의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 10×10^{12}, 11×10^{12}, 15×10^{12}, 20×10^{12}, 25×10^{12}, 30×10^{12}, 또는 50×10^{12}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 약 5×10^{12} 내지 6×10^{12}, 6×10^{12} 내지 7×10^{12}, 7×10^{12} 내지 8×10^{12}, 8×10^{12} 내지 9×10^{12}, 9×10^{12} 내지 10×10^{12}, 10×10^{12} 내지 11×10^{12}, 11×10^{12} 내지 15×10^{12}, 15×10^{12} 내지 20×10^{12}, 20×10^{12} 내지 25×10^{12}, 25×10^{12} 내지 30×10^{12}, 30×10^{12} 내지 50×10^{12} , 또는 50×10^{12} 내지 100×10^{12}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 약 5×10^{12} 내지 10×10^{12}, 10×10^{12} 내지 25×10^{12}, 또는 25×10^{12} 내지 50×10^{12}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 10×10^{9}, 11×10^{9}, 15×10^{9}, 20×10^{9}, 25×10^{9}, 30×10^{9}, 또는 50×10^{9} 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 약 5×10^{9} 내지 6×10^{9}, 6×10^{9} 내지 7×10^{9}, 7×10^{9} 내지 8×10^{9}, 8×10^{9} 내지 9×10^{9}, 9×10^{9} 내지 10×10^{9}, 10×10^{9} 내지 11×10^{9}, 11×10^{9} 내지 15×10^{9}, 15×10^{9} 내지 20×10^{9}, 20×10^{9} 내지 25×10^{9}, 25×10^{9} 내지 30×10^{9}, 30×10^{9} 내지 50×10^{9} 또는 50×10^{9} 내지 100×10^{9} 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 약 5×10^{9} 내지 10×10^{9}, 10×10^{9} 내지 15×10^{9}, 15×10^{9} 내지 25×10^{9}, 또는 25×10^{9} 내지 50×10^{9} 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 10×10^{10}, 11×10^{10}, 15×10^{10}, 20×10^{10}, 25×10^{10}, 30×10^{10}, 40×10^{10}, 또는 50×10^{10} 감염 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10} 내지 6×10^{10}, 6×10^{10} 내지 7×10^{10}, 7×10^{10} 내지 8×10^{10}, 8×10^{10} 내지 9×10^{10}, 9×10^{10} 내지 10×10^{10}, 10×10^{10} 내지 11×10^{10}, 11×10^{10} 내지 15×10^{10}, 15×10^{10} 내지 20×10^{10}, 20×10^{10} 내지 25×10^{10}, 25×10^{10} 내지 30×10^{10}, 30×10^{10} 내지 40×10^{10}, 40×10^{10} 내지 50×10^{10}, 또는 50×10^{10} 내지 100×10^{10} 감염 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10} 내지 10×10^{10}, 10×10^{10} 내지

15×10^{10}, 15×10^{10} 내지 25×10^{10}, 또는 25×10^{10} 내지 50×10^{10} 감염 단위/mL 중 임의의 것이다.

[0098] 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{8} 내지 약 2 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{8} 내지 약 5 x 10^{8}, 약 5 x 10^{8} 내지 약 10 x 10^{8}, 약 10 x 10^{8} 내지 약 20 x 10^{8}, 약 20 x 10^{8} 내지 약 30 x 10^{8}, 약 30 x 10^{8} 내지 약 40 x 10^{8}, 약 40 x 10^{8} 내지 약 50 x 10^{8}, 또는 약 50 x 10^{8} 내지 약 100 x 10^{8}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{9} 내지 약 5 x 10^{9}, 약 5 x 10^{9} 내지 약 10 x 10^{9}, 약 10 x 10^{9} 내지 약 20 x 10^{9}, 약 20 x 10^{9} 내지 약 30 x 10^{9}, 약 30 x 10^{9} 내지 약 40 x 10^{9}, 약 40 x 10^{9} 내지 약 50 x 10^{9}, 또는 약 50 x 10^{9} 내지 약 100 x 10^{9}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{10} 내지 약 5 x 10^{10}, 약 5 x 10^{10} 내지 약 10 x 10^{10}, 약 10 x 10^{10} 내지 약 20 x 10^{10}, 약 20 x 10^{10} 내지 약 30 x 10^{10}, 약 30 x 10^{10} 내지 약 40 x 10^{10}, 약 40 x 10^{10} 내지 약 50 x 10^{10}, 또는 약 50 x 10^{10} 내지 약 100 x 10^{10}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{11} 내지 약 5 x 10^{11}, 약 5 x 10^{11} 내지 약 10 x 10^{11}, 약 10 x 10^{11} 내지 약 20 x 10^{11}, 약 20 x 10^{11} 내지 약 30 x 10^{11}, 약 30 x 10^{11} 내지 약 40 x 10^{11}, 약 40 x 10^{11} 내지 약 50 x 10^{11}, 또는 약 50 x 10^{11} 내지 약 100 x 10^{11}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{12} 내지 약 5 x 10^{12}, 약 5 x 10^{12} 내지 약 10 x 10^{12}, 약 10 x 10^{12} 내지 약 20 x 10^{12}, 약 20 x 10^{12} 내지 약 30 x 10^{12}, 약 30 x 10^{12} 내지 약 40 x 10^{12}, 약 40 x 10^{12} 내지 약 50 x 10^{12}, 또는 약 50 x 10^{12} 내지 약 100 x 10^{12}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{13} 내지 약 2 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{8}, 약 5 x 10^{8}, 약 1 x 10^{9}, 약 5 x 10^{9}, 약 1 x 10^{10}, 약 5 x 10^{10}, 약 1 x 10^{11}, 약 5 x 10^{11}, 약 1 x 10^{12}, 약 5 x 10^{12}, 약 1 x 10^{13}, 또는 약 2 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 5 x 10^{12}개의 게놈 카피/mL이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 1 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량 농도는 약 2 x 10^{13}개의 게놈 카피/mL이다.

[0099] 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 적어도 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{14}개의 게놈 카피 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{14}개의 게놈 카피 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 대략 1×10^{8} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{8} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{9} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{9} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{10} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{10} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{11} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{11} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{12} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{12} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{13} 내지 약 1×10^{14}, 5×10^{13} 내지 약 1×10^{14}, 1×10^{8} 내지 약 5×10^{13}, 5×10^{8} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{9} 내지 약 5×10^{13}, 5×10^{9} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{10} 내지 약 5×10^{13}, 5×10^{10} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{11} 내지 약 5×10^{13}, 5×10^{11} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{12} 내지 약 5×10^{13}, 5×10^{12} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{13} 내지 약 5×10^{13}, 1×10^{8} 내지 약 1×10^{13}, 5×10^{8} 내지 약 1×10^{13}, 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}, 5×10^{9} 내지 약 1×10^{13}, 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13}, 5×10^{10} 내지 약 1×10^{13}, 1×10^{11} 내지 약 1×10^{13}, 5×10^{11} 내지 약 1×10^{13}, 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13}, 5×10^{12} 내지 약 1×10^{13}, 1×10^{8} 내지 약 5×10^{12}, 5×10^{8} 내지 약 5×10^{12}, 1×10^{9} 내지 약 5×10^{12}, 5×10^{9} 내지 약 5×10^{12}, 1×10^{10} 내지 약 5×10^{12}, 5×10^{10} 내지 약 5×10^{12}, 1×10^{11} 내지 약 5×10^{12}, 5×10^{11} 내지 약 5

× 10^{12}, 1 × 10^{12} 내지 약 5 × 10^{12}, 1 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{12}, 5 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{12}, 1 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{12}, 5 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{12}, 1 × 10^{10} 내지 약 1 × 10^{12}, 5 × 10^{10} 내지 약 1 × 10^{12}, 1 × 10^{11} 내지 약 1 × 10^{12}, 5 × 10^{11} 내지 약 1 × 10^{12}, 1 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{11}, 5 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{11}, 1 × 10^{9} 내지 약 5 × 10^{11}, 5 × 10^{9} 내지 약 5 × 10^{11}, 1 × 10^{10} 내지 약 5 × 10^{11}, 5 × 10^{10} 내지 약 5 × 10^{11}, 1 × 10^{11} 내지 약 5 × 10^{11}, 1 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{11}, 5 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{11}, 1 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{11}, 5 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{11}, 1 × 10^{10} 내지 약 1 × 10^{11}, 5 × 10^{10} 내지 약 1 × 10^{11}, 1 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{10}, 5 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{10}, 1 × 10^{9} 내지 약 5 × 10^{10}, 5 × 10^{9} 내지 약 5 × 10^{10}, 1 × 10^{10} 내지 약 5 × 10^{10}, 1 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{10}, 5 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{10}, 1 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{10}, 5 × 10^{9} 내지 약 1 × 10^{10}, 1 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{9}, 5 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{9}, 1 × 10^{9} 내지 약 5 × 10^{9}, 1 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{9}, 5 × 10^{8} 내지 약 1 × 10^{9}, 또는 1 × 10^{8} 내지 약 5 × 10^{8}개의 gc 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 1 x 10^{9}, 약 5 x 10^{9}, 약 1 x 10^{10}, 약 5 x 10^{10}, 약 1 x 10^{11}, 약 5 x 10^{11}, 약 1 x 10^{12}, 약 5 x 10^{12}, 약 1 x 10^{13}, 약 5 x 10^{13}, 약 1 x 10^{14}, 또는 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 5 x 10^{13}개의 게놈 카피이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 1 x 10^{14}개의 게놈 카피이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피이다.

[0100] 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 총량은 체중 1 kg당 적어도 약 1 × 10^{9} 내지 약 2 × 10^{14}개의 게놈 카피 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에 투여되는 rAAV 입자의 총량은 체중 1 kg당 약 1 × 10^{9} 내지 약 2 × 10^{14}개의 게놈 카피 중 임의의 것이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 선조체에 주사되는 조성물의 부피는 약 10 μl, 25 μl, 50 μl, 75 μl, 100 μl, 200 μl, 300 μl, 400 μl, 500 μl, 600 μl, 700 μl, 800 μl, 900 μl, 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 75 mL, 또는 100 mL 초과, 또는 그 사이의 임의의 양 중 어느 하나이다.

[0101] 본 발명의 조성물(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 벡터를 포함하는 rAAV 입자)은 단독으로 사용되거나 DM1을 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 치료제와 조합되어 사용될 수 있다. 순차적 투여의 간격은 수분, 수시간, 또는 수일 이상(또는 대안적으로, 미만)의 단위일 수 있다.

[0102] 일부 구현예에서, DM1을 치료하기 위한 RNAi는 면역억제제와 조합되어; 예를 들어, RNAi에 대한 면역 반응을 억제하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 RNAi의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 RNAi의 투여와 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 RNAi의 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 RNAi의 투여 전, 투여 중 또는 투여 후의 임의의 조합으로 투여된다.

[0103] 일부 구현예에서, DM1을 치료하기 위한 rAAV 입자는 면역억제제와 조합되어; 예를 들어 rAAV 입자 및/또는 rAAV 입자의 트랜스진 산물에 대한 면역 반응을 억제하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 rAAV 입자의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 rAAV 입자의 투여와 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 rAAV 입자의 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제는 rAAV 입자의 투여 전, 투여 중 또는 투여 후의 임의의 조합으로 투여된다.

[0104] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다.

[0105] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은

근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi의 용도를 제공한다.

[0106] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 본원에 기술된 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 본원에 기술된 임의의 RNAi를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 RNAi를 제공한다.

[0107] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다.

[0108] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)의 용도를 제공한다.

[0109] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 본원에 기술된 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 본원에 기술된 임의의 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)를 제공한다.

[0110] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 의약의 제조에 있어서의 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다.

[0111] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물의 용도를 제공한다.

[0112] 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하기 위한 본원에 기술된 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서의 상기 억제를 위한 본원에 기술된 임의의 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DMPK RNA의 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서의 상기 억제를 위한 유효량의 본원에 기술된 임의의 조성물을 제공한다.

[0113] **RNAi 발현 구축물 및 벡터**

[0114] 본 발명은 본원에 기술된 RNAi의 발현을 위한 발현 구축물, 벡터 및 rAAV 입자를 제공한다.

[0115] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산은 이종 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 miRNA 스캐폴드의 사용은 miRNA 발현을 조절하기 위하여, 예를 들어, miRNA 발현을 증가시키기 위하여 또는 miRNA 발현을 감소시키기 위하여 사용된다. 당업계에 알려진 임의의 miRNA 스캐폴드가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드(예를 들어, 문헌[Lagos-Quintana, M. *et al*. (2002) *Curr. Biol*. 12:735-9] 참조) 및 Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi 발현 벡터 키트(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; 미국 매사추세츠주 월섬 소재) 또는 mirGE 스캐폴드(WO 2014/016817)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산은 miRNA 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 SEQ ID NO:11에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, miRNA 스캐폴드는 SEQ ID NO:11의 핵산 서열과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과인 핵산을 포함한다.

[0116] 일부 구현예에서, RNAi는 DM1과 관련된 폴리펩티드(예를 들어, 돌연변이 DMPK)를 코딩하는 RNA를 표적화한다. 이론에 구애받고자 하지 않고, 기능획득이 DM1과 관련된 폴리펩티드(예를 들어, 돌연변이 DMPK)의 발현 및/또는 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 RNAi가 사용될 수 있는 것으로 여겨진다.

[0117] 일부 구현예에서, 트랜스진(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩)은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 극초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나아제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라아제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG 프로모터; 문헌[Niwa *et al*., *Gene*, 1991, 108(2):193-9]) 및 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터(문헌[Kim *et al*., *Gene*, 1990, 91(2):217-23] 및 문헌[Guo *et al*., *Gene Ther*., 1996, 3(9):802-10])를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 β-글루쿠로니다아제 프로모터 또는 사이토메갈로바이러스 인핸서가 닭 β-액틴(CBA) 프로모터에 연결된 것을 포함한다. 프로모터는 항시성, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다.

[0118] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하며, 외인적으로 공급된 화합물, 환경 요인, 예를 들어 온도, 또는 특정 생리학적 상태의 존재, 예를 들어, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제 중인 세포에서만 조절될 수 있다. 외인적으로 공급되는 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(DEX)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터 시스템(WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터(문헌[No *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)]), 테트라사이클린-억제성 시스템(문헌[Gossen *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)]), 테트라사이클린-유도성 시스템(문헌[Gossen *et al*, *Science*, 268:1766-1769 (1995)], 또한 문헌[Harvey *et al*, *Curr. Opin. Chem. Biol*., 2:512-518 (1998)] 참조), RU486-유도성 시스템(문헌[Wang *et al*., *Nat. Biotech*., 15:239-243 (1997)] 및 문헌[Wang *et al*., *Gene Ther*., 4:432-441 (1997)]) 및 라파마이신-유도성 시스템(문헌[Magari *et al*., *J. Clin. Invest*., 100:2865-2872 (1997)])을 포함한다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 유도성 프로모터의 또 다른 유형으로는 특정 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제 중인 세포에서만 조절되는 프로모터가 있다.

[0119] 일부 구현예에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에서, 조직-특이적 조절 서열은 조직-특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 결합한다. 이러한 조직-특이적 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등)은 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 데스민 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 데스민 프로모터(예를 들어, 인간 데스민 유전자의 -228 내지 +75; 예를 들어, SEQ ID NO:23)이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 변형된 데스민 프로모터이다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 근육 세포에서의 높은 수준의 발현에 중요한 데스민 프로모터 요소를 포함한다(문헌[Li and Paulin, *et. al*. 1991. *Journal of Biol Chem*.]). 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 Byrne 데스민 인핸서(예를 들어, SEQ ID NO:21)의 적어도 하나의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 Paulin 데스민 인핸서(-973 내지 -693)(예를 들어, SEQ ID NO:22)의 적어도 하나의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 Byrne 데스민 인핸서의 하나의 카피 또는 Paulin 데스민 인핸서(-973 내지 -693)의 하나의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 Byrne 데스민 인핸서의 하나의 카피 또는 Paulin 데스민 인핸서(-973 내지 -693)의 하나의 카피 및 인간 데스민 유전자의 프로모터(-228 내지 +75)를 포함한다.

[0120] 일부 양태에서, 본 발명은 발현 카세트(예를 들어, 근육 세포에서 트랜스진(예를 들어, 치료적 트랜스진)의 발현을 위한 발현 카세트)를 제공하며, 여기서, 발현 카세트는 변형된 데스민 프로모터를 포함하고, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다.

[0121] 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터를 포함하는 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스진(예를 들어, 치료적 트랜스진)을 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재된다. 일부 구현예에서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 여기서, 5' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 서열을 갖는 핵산을 포함하고, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 서열을 갖는 핵산을 포함하고, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 서열을 갖는 핵산을 포함한다.

[0122] 일부 구현예에서, 변형된 데스민 프로모터를 포함하는 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA이다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호이다. 일부 구현예에서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 서열을 갖는 핵산을 포함한다.

[0123] 일부 구현예에서, 본 발명은 근육 세포에서의 트랜스진(예를 들어, 치료적 트랜스진)의 발현을 위한 변형된 데스민 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 폴리펩티드(예를 들어, 치료적 폴리펩티드)를 코딩한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 핵산(예를 들어, 치료적 핵산)을 코딩한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 RNAi를 코딩한다. 일부 구현예에서, 트랜스진은 siRNA, shRNA, 또는 miRNA를 코딩한다.

[0124] 일부 양태에서, 본 발명은 변형된 데스민 프로모터를 제공하며, 여기서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에

서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 중 임의의 것인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함한다.

[0125] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가 상보성 게놈(예를 들어, 자가-상보성 rAAV 벡터)을 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 자가-상보성 벡터 게놈을 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자가-상보성 AAV 게놈의 사용 방법은 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 그리고 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기술되며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 자가-상보성 게놈을 포함하는 rAAV는 이의 부분적으로 상보성인 서열(예를 들어, 이종 핵산의 상보성 코딩 및 비코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 상기 벡터는 이종 핵산을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 이 핵산의 상보체를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 제1 핵산 서열은 이의 길이 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다.

[0126] 일부 구현예에서, RNAi를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열과 RNAi의 상보체를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA-3(SEQ ID NO:27)을 포함한다. 돌연변이 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 게놈의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 못할 것이고, 따라서, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 게놈이 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이 AAV ITR, 제1 이종 폴리뉴클레오티드에 대해 역방향의 제2 이종 폴리뉴클레오티드, 및 제3 AAV ITR.

[0127] **rAAV 입자 및 rAAV 입자를 생산하는 방법**

[0128] 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 RNAi를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DM1을 치료하기 위해 RNAi를 전달하기 위해 재조합 바이러스 입자를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 1개 또는 2개의 ITR이 측면에 있는 본 발명의 RNAi를 코딩하는 서열을 포함한다. 핵산은 AAV 입자에 캡시드화된다. 또한, AAV 입자는 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 관심 코딩 서열(들)(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산), 전사 방향으로 작동적으로 연결된 구성요소들, 전사 개시 및 종결 서열을 포함하는 제어 서열을 포함하여 발현 카세트를 형성한다. 발현 카세트는 5' 및 3' 말단에서 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열이 측면에 있다. "기능적 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 구제, 복제, 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 문헌[Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32]; 문헌[Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40]; 및 문헌[Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16]을 참조하며, 이들 모두는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 본 발명의 일부 양태를 실시하기 위해, 재조합 벡터는 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조 및 캡시드화에 필수적인 AAV의 적어도 모든 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터에서 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열을 가질 필요가 없으며(예를 들어, 문헌[Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801]에 기술된 바와 같음), 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 현재 40개가 넘는 AAV 혈청형이 알려져 있고, 새로운 혈청형 및 기존 혈청형의 변종이 계속 확인되고 있다. 문헌[Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6]; 및 문헌[Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810]을 참조한다. 임의의 AAV 혈청형의 사용은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터이고, 이 AAV 혈청형은 제한 없이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAVrh74, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등인 AAV ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 내의 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 본원에 기술된 바와 같은 RNAi를 추가로 코딩한다. 예를 들어,

AAV의 핵산은 본원에서 고려되는 임의의 AAV 혈청형 중 적어도 하나의 ITR을 포함할 수 있고, 가이드 영역을 포함하는 하나의 가닥 및 비-가이드 영역을 포함하는 또 다른 가닥을 포함하는 RNAi를 추가로 코딩할 수 있다. 하나의 구현예에서, AAV의 핵산은 임의의 AAV 혈청형의 적어도 하나의 ITR을 포함할 수 있고, 추가로, 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU -3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1과의 동일성이 80%, 85%, 90% 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2와의 동일성이 80%, 85%, 90% 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩할 수 있다.

[0129] 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 프로모터, 본원에 개시된 바와 같은 RNAi를 코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 프로모터, 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU -3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2와의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 데스민 프로모터, 본원에 개시된 바와 같은 RNAi를 코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리A) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR의 전부 또는 기능적 부분(예를 들어, AAV2 ITR), 데스민 프로모터, 인트론(예를 들어, 키메라 인트론), 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 95%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2와의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리A), 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 링커에 의해 제2 가닥에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 SEQ ID NO:3의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO:3과의 동일성이 80%, 85%, 90% 또는 95%인 서열을 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR의 전부 또는 기능적 부분(예를 들어, AAV2 ITR), 스터퍼 서열(예를 들어,인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부), 데스민 프로모터, 인트론(예를 들어, 토끼 β-글로빈 인트론)의 5' 아암, 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2) 또는 서열 2와의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산, 인트론(예를 들어, 토끼 β-글로빈 인트론)의 3' 아암, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리A), 스터퍼 서열(예를 들어,인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR).

[0131] 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR(예를 들어, AAV2 ITR), 데스민 프로모터, 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2와의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리A) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR). 일부 구현예에서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 가닥은 링커에 의해 제2 가닥에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 SEQ ID NO:6의 핵산 서열을 포함한다.

[0132] 일부 구현예에서, AAV의 핵산은 5'에서 3'로 다음을 코딩하는 핵산을 포함한다: ITR의 전부 또는 기능적 부분(예를 들어, AAV2 ITR), 스터퍼 서열(예를 들어,인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부), 데스민 프로모터, 인트론(예를 들어, 토끼 β-글로빈 인트론)의 5' 아암, 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU -3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2와의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제1 핵산을 포함하는 제1 가닥, 및 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 서열 1과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 제2 가닥을 포함하는 RNAi를 코딩하는 핵산, 인트론(예를 들어, 토끼 β-글로빈 인트론)의 3' 아암, 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 소 성장 호르몬 폴리A), 스터퍼 서열(예를 들어,인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부) 및 AAV ITR(예를 들어, AAV2 ITR).

[0133] 일부 구현예에서, 벡터는 (하나 이상의) 스터퍼 핵산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 리포

터 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 스터퍼 핵산은 벡터 내의 다양한 영역에 위치할 수 있고, 벡터 내의 연속 서열(예를 들어, 하나의 위치에서의 단일 스터퍼 핵산) 또는 여러 서열(예컨대 1개를 초과하는 위치(예를 들어, 2개의 위치, 3개의 위치 등)에서의 하나를 초과하는 스터퍼 핵산)로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 RNAi 서열의 하류에 위치할 수 있다. 구현예에서, 스터퍼 핵산은 RNAi 서열의 상류에(예를 들어, 프로모터와 RNAi를 코딩하는 핵산 사이에) 위치할 수 있다. 당업자에 의해 또한 이해되는 바와 같이, 다양한 핵산이 스터퍼 핵산으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 스터퍼 핵산은 인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열 또는 C16 P1 염색체 16 P1 클론(인간 C16) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 스터퍼 서열은 유전자의 전부 또는 일부를 포함한다. 예를 들어, 스터퍼 서열은 인간 AAT 서열의 일부를 포함한다. 당업자는 유전자(예를 들어, 인간 AAT 서열)의 상이한 부분이 스터퍼 단편으로 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 스터퍼 단편은 유전자의 5' 말단, 유전자의 3' 말단, 유전자의 중간, 유전자의 비코딩 부분(예를 들어, 인트론), 유전자의 코딩 영역(예를 들어, 엑손), 또는 유전자의 비코딩 및 코딩 부분의 혼합물로부터 유래될 수 있다. 또한, 당업자는 스터퍼 서열의 전부 또는 일부가 스터퍼 서열로 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 일부 구현예에서, 벡터는 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' 스터퍼 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' 스터퍼 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' 스터퍼 서열을 포함하고, SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 80%, 85%, 95%, 또는 99% 초과인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' 스터퍼 서열을 포함한다.

[0134] 추가 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAVrh74 N502I, AAVrh74 W505R의 캡시드 단백질, 또는 이들 캡시드 단백질의 돌연변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV5 티로신 돌연변이 캡시드를 포함한다(문헌[Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832]). 추가 구현예에서, rAAV 입자는 클레이드 A 내지 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다(문헌[Gao, *et al.*, J. Virol. 2004, 78(12):6381]).

[0135] 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 이환 조직) 내의 특이적 세포 유형을 표적화하기 위해 상이한 AAV 혈청형들이 사용된다. rAAV 입자는 동일 혈청형 또는 혼합 혈청형의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1 캡시드 단백질과 적어도 하나의 AAV2 ITR을 포함할 수 있거나 AAV2 캡시드 단백질과 적어도 하나의 AAV1 ITR을 포함할 수 있다. rAAV 입자의 생성을 위한 AAV 혈청형의 임의의 조합은 각각의 조합이 명시적으로 본 명세서에서 언급된 것처럼 본 명세서에서 제공된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 AAV2 ITR이 측면에 있는, 본 발명의 rAAV 벡터(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트) 및 AAV1 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 AAV2 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다.

[0136] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가-상보성 게놈을 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 자가-상보성 게놈을 갖는 rAAV 입자 및 자가-상보성 AAV 게놈의 사용 방법은 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 그리고 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기술되며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 자가-상보성 게놈을 포함하는 rAAV는 이의 부분적으로 상보성인 서열(예를 들어, 트랜스진의 상보성 코딩 및 비코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 AAV 게놈을 포함하는 rAAV 입자를 제공하고, 여기서, rAAV 게놈은 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 발명의 RNAi)와 제2 이종 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 발명의 RNAi의 안티센스 가닥)을 포함하며, 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 가닥내 염기쌍 형성을 용이하게 하는 서열; 예를 들어 헤어핀 DNA 구조에 의해 연결된다. 헤어핀 구조는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 miRNA 또는 siRNA 분자에 존재한다. 일부 구현예에서, 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA-3(SEQ ID NO:27)을 포함한다. 돌연변이 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 게놈의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 못할

것이고, 따라서, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 게놈이 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이 AAV ITR, 제1 이종 폴리뉴클레오티드에 대해 역방향의 제2 이종 폴리뉴클레오티드, 및 제3 AAV ITR. 일부 구현예에서, 본 발명은 기능적 AAV2 ITR, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열, D 영역의 결실을 포함하며 기능적 말단 분해 서열이 결여되어 있는 돌연변이된 AAV2 ITR, 제1 폴리뉴클레오티드 서열의, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 서열에 대한 상보적 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열 및 기능적 AAV2 ITR을 포함하는, 재조합 바이러스 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공한다.

[0137] rAAV 입자는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,566,118; 6,989,264; 및 6,995,006을 참조한다. 본 발명의 실시에서, rAAV 입자를 생성하기 위한 숙주 세포는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 미생물 및 효모를 포함한다. 숙주 세포는 또한, AAV rep 및 cap 유전자가 숙주 세포에서 안정적으로 유지되는 패키징 세포 또는 AAV 벡터 게놈이 안정적으로 유지되는 생산자 세포일 수 있다. 예시적인 패키징 및 생산자 세포는 293, A549 또는 HeLa 세포로부터 유래된다. AAV 벡터는 당업계에 알려진 표준 기술을 사용하여 정제되고 제형화된다.

[0138] rAAV 벡터의 생성을 위한 당업계에 알려진 방법은 형질감염, 안정적 세포주 생성, 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드(문헌[Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):87808789]) 및 배큘로바이러스-AAV 하이브리드를 포함하는 감염성 하이브리드 바이러스 생성 시스템을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. rAAV 바이러스 입자의 생성을 위한 rAAV 생성 배양은 1) 예를 들어, 인간-유래 세포주, 예를 들어, HeLa, A549, 또는 293 세포, 또는 곤충-유래 세포주, 예를 들어, SF-9(배큘로바이러스 생성 시스템의 경우)를 포함한 적합한 숙주 세포; 2) 야생형 또는 돌연변이 아데노바이러스(예를 들어, 온도 민감성 아데노바이러스), 헤르페르 바이러스, 배큘로바이러스, 또는 플라스미드 구축물(헬퍼 기능을 제공)에 의해 제공되는 적합한 헬퍼 바이러스 기능; 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 산물; 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열이 측면에 있는 핵산(예를 들어, 치료적 핵산); 및 5) rAAV 생성을 지원하는 적합한 배지 및 배지 성분을 모두 필요로 한다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자 산물은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 절대적이진 않지만, 일반적으로 AAV rep 유전자 산물은 rep 유전자 산물이 rAAV 게놈의 복제 및 패키징 기능을 할 수 있는 한, rAAV 벡터 게놈의 ITR과 동일한 혈청형을 갖는다. 당업계에 알려진 적합한 배지를 rAAV 벡터의 생성에 사용할 수 있다. 이들 배지는, 비제한적으로, 변형 이글 배지(Eagle Medium)(MEM), 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Eagle Medium)(DMEM), 주문제조형 제형, 예컨대, 미국 특허 번호 6,566,118에 기술된 것들, 및 미국 특허 번호 6,723,551에 기술된 바와 같은 Sf-900 II SFM 배지(이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)(특히 재조합 AAV 벡터의 생성에서 사용하기 위한 주문제조형 배지 제형에 관해)를 포함하여, Hyclone Laboratories 및 JRH에 의해 생성된 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 배큘로바이러스에 의해 제공되며, 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, *Spodoptera frugiperda*(Sf9) 세포)이다.

[0139] 일부 구현예에서, rAAV 입자는 삼중 형질감염법, 예를 들어 하기 제공되는 예시적인 삼중 형질감염법에 의해 생성될 수 있다. 간략히 말하면, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께, rep 유전자 및 캡시드 유전자를 포함하는 플라스미드가 (예를 들어, 인산칼슘 방법을 사용하여) 세포주(예를 들어, HEK-293 세포)에 형질감염될 수 있고, 바이러스가 수집되고 필요에 따라 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 코딩하는 핵산을 숙주 세포에 삼중 형질감염시켜 생성되었으며, 핵산을 숙주 세포에 형질감염시키면 rAAV 입자를 생성할 수 있는 숙주 세포가 생성된다.

[0140] 일부 구현예에서, rAAV 입자는 생산자 세포주 방법, 예를 들어 하기 제공되는 예시적인 생산자 세포주 방법(또한, 문헌[Martin et al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269]에서 언급된 방법 참조)에 의해 생성될 수 있다. 간략하게 말하면, 세포주(예를 들어, HeLa 세포주)를 rep 유전자, 캡시드 유전자, 및 프로모터 이종 핵산 서열을 함유하는 플라스미드로 안정하게 형질감염시킬 수 있다. 세포주는 rAAV 생성을 위한 선도 클론을 선택하기 위해 스크리닝될 수 있고, 이는 이후 생산용 생물반응기로 확장될 수 있고, rAAV 생성을 개시하도록 헬퍼로서 아데노바이러스(예를 들어, 야생형 아데노바이러스)로 감염될 수 있다. 이후 바이러스를 수확할 수 있고, 아데노바이러스를 (예를 들어, 열에 의해) 불활성화시키고/시키거나 제거할 수 있고, rAAV 입자를 정제할 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 벡터를 코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 생산자 세포주에 의해 rAAV 입자를 생성하였다.

[0141] 일부 양태에서, 본 발명에 개시된 바와 같은 임의의 rAAV 입자를 생성하는 방법이 제공되며, 이는 (a) rAAV 입

자가 생성되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 숙주 세포는 (i) 하나 이상의 AAV 패키지 유전자(여기서, 각각의 상기 AAV 패키징 유전자는 AAV 복제 및/또는 캡시드화 단백질을 코딩함); (ii) 적어도 하나의 AAV ITR이 측면에 있는 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 프로-벡터, 및 (iii) AAV 헬퍼 기능을 포함하는, 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생성된 rAAV 입자를 회수하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAVrh74 N502I, AAVrh74 W505R, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 캡시드화 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2012/0164106호에 기술된 ShH10와 같은 변이체 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2013/0323226호에 기술된 바와 같은 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74(야생형 AAVrh74 캡시드, 예컨대 AAVrh74 N502I 또는 AAVrh74 W505R(전체가 참고로 포함된 WO 2019178412에 기술된 바와 같음), 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2012/0066783호에 기술된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 번호 8,283,151 또는 국제 공개 번호 WO/2003/042397에 기술된 AAV 캡시드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, 캡시드화 단백질은 AAV5 티로신 돌연변이 캡시드 단백질이다. 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 클레이드 A 내지 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAVrh74 N502I 캡시드, 및 AAV2 ITR 및 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 게놈을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAVrh74 W505R 캡시드 및 AAV2 ITR 및 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 게놈을 포함한다. 추가 구현예에서, rAAV 입자는 정제된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "정제"는 rAAV 입자가 자연 발생하는 장소나 최초 제조된 장소에 존재할 수도 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 없는 rAAV 입자의 제조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 rAAV 입자는 배양 용해물 또는 생성 배양 상청액과 같은 공급원 혼합물로부터 입자를 농축시키는 정제 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 농축은 예를 들어, 용액 내에 존재하는 DNase-저항성 입자(DRP) 또는 게놈 카피(gc)의 비율, 또는 감염력에 의해서와 같이 다양한 방법으로 측정될 수 있거나, 생성 배양 오염물 또는, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등을 비롯한 공정 중 오염물을 포함하는 오염물과 같은, 공급원 혼합물에 존재하는 제2의 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다.

[0142] 또한, 본원에서는 본 발명의 RNAi를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 rAAV 입자 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 제약 조성물은 본원에 기술된 임의의 투여 방식에 적합할 수 있다. 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 입자의 제약 조성물은 전신적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 입자는 정맥내, 동맥내, 피하 또는 복강내로 투여될 수 있다.

[0143] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 본 발명의 RNAi를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 재조합 바이러스 입자 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물은 인간에게 투여하기에 적합하다. 이러한 담체는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 및 1570-1580] 참조). 일부 구현예에서, 본원에 기술된 rAAV 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물은 포유동물 내로의 전신 주사에 적합하다.

[0144] 이러한 제약상 허용가능한 담체는 물 그리고, 낙화생유, 대두유, 광유 등과 같은, 석유, 동물, 식물, 또는 합성 유래의 것들을 포함하는 오일과 같은 살균 액체일 수 있다. 식염수 및 수성 덱스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서, 특히 주사 가능한 용액을 위한 액체 담체로서 이용될 수 있다. 제약 조성물은 추가적인 성분, 예를 들어, 보존제, 완충제, 등장화제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤 또는 정화제, 증점제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기술된 제약 조성물은 단일 단위 투여형 또는 다중투여형 형태로 패키징될 수 있다. 조성물은 일반적으로 살균되고 실질적으로 등장성인 용액으로 제형화된다.

[0145] **제조 물품 및 키트**

[0146] 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 키트 또는 제조 물품이 또한 제공된다. 양태에서, 키트는 적합한 패키징에 본원에 기술된 조성물(예를 들어, 본 발명의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 발명의 rAAV 입자)을 포함한다. 본원에 기술된 조성물을 위한 적합한 패키징은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 바이알(예를 들어,

밀봉 바이알), 용기(vessel), 앰풀, 병, 자아(jar), 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함한다. 이들 제조 물품은 추가로 살균되고/되거나 밀봉될 수 있다.

[0147] 본 발명은 또한 본원에 기술된 조성물을 포함하는 키트를 제공하며, 조성물을 사용하는 방법, 예를 들어, 본원에 기술된 용도에 대한 지침(들)을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기술된 키트는 본원에 기술된 임의의 방법을 수행하기 위한 지침과 함께 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입물을 포함하는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 키트는 포유동물에게 유효량의 rAAV 입자를 전달하기 위한 본 발명의 RNAi를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 재조합 바이러스 입자의 조성물, 포유동물 내로의 주사에 적합한 제약상 허용가능한 담체, 및 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 중 하나 이상, 및 포유동물 내로의 주사를 수행하는 것에 대한 지침이 있는 패키지 삽입물을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 rAAV 입자로 DM-1을 치료하는 것에 대한 지침을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 방법들 중 어느 하나에 따라 본원에 기술된 rAAV 입자를 사용하는 것에 대한 지침을 포함한다.

[0148] **예시적인 구현예**

[0149] 본 발명은 하기 열거된 예시적 구현예를 포함한다.

[0150] 1. 제1 가닥 및 제2 가닥을 포함하는 RNAi로서, a) 제1 가닥 및 제2 가닥은 이중체를 형성하고; b) 제1 가닥은 가이드 영역을 포함하고, 가이드 영역은 서열 5'-AGUCGAAGACAGUUCUAGGGU-3'(SEQ ID NO:1) 또는 SEQ ID NO:1의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하고; c) 제2 가닥은 비-가이드 영역을 포함하는, RNAi.

[0151] 2. 구현예 1에 있어서, 비-가이드 영역은 서열 5'-ACCCUAGAUGUCUUCGAUU-3'(SEQ ID NO:2) 또는 SEQ ID NO:2의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

[0152] 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 제1 가닥은 SEQ ID NO:1의 서열을 갖는 핵산을 포함하고, 비-가이드 영역은 SEQ ID NO:2의 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

[0153] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 제1 가닥 및 제2 가닥은 루프 구조를 형성할 수 있는 RNA 링커에 의해 연결되는, RNAi.

[0154] 5. 구현예 4에 있어서, RNA 링커는 약 4개 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

[0155] 6. 구현예 4 또는 5에 있어서, 루프 구조는 약 4개 내지 약 20개의 뉴클레오티드를 포함하는, RNAi.

[0156] 7. 구현예 4 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 루프 구조는 SEQ ID NO:3의 서열 또는 SEQ ID NO:3의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

[0157] 8. 구현예 4 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 5'에서 3'으로 제2 가닥, RNA 링커, 및 제1 가닥을 포함하는, RNAi.

[0158] 9. 구현예 4 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 5'에서 3'으로 제1 가닥, RNA 링커, 및 제2 가닥을 포함하는, RNAi.

[0159] 10. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, RNAi는 SEQ ID NO:7의 서열 또는 SEQ ID NO:7의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 핵산을 포함하는, RNAi.

[0160] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, RNAi는 작은 억제성 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)인, RNAi.

[0161] 12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, RNAi는 스캐폴드를 추가로 포함하는, RNAi.

[0162] 13. 구현예 12에 있어서, 스캐폴드는 SEQ ID NO:11의 핵산의 전부 또는 일부를 포함하는, RNAi.

[0163] 14. 구현예 13에 있어서, miRNA는 스캐폴드 내에 내재되는, RNAi.

[0164] 15. 구현예 14에 있어서, 스캐폴드는 5' 아암(여기서, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치함), 및 3' 아암(여기서, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치함)을 갖는, RNAi.

[0165] 16. 구현예 12 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 스캐폴드는 miR-155 스캐폴드인, RNAi.

[0166] 17. 구현예 12 내지 16 중 어느 하나에 있어서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 5'에 위치한 SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:9의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함하는, RNAi.

[0167] 18. 구현예 12 내지 17 중 어느 하나에 있어서, miR-155 스캐폴드는 RNAi에 대해 3'에 위치한 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:10의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열의 핵산을 포함하는, RNAi.

[0168] 19. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, RNAi는 근긴장성 이영양증-1(DM1)과 관련된 폴리펩티드를 코딩하는 RNA를 표적화하는, RNAi.

[0169] 20. 구현예 19에 있어서, 폴리펩티드는 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)인, RNAi.

[0170] 21. 구현예 20에 있어서, DMPK는 DM 1과 관련된 돌연변이를 포함하는, RNAi.

[0171] 22. 구현예 20 또는 21에 있어서, DMPK를 코딩하는 유전자는 5개 이상의 CTG 트리뉴클레오티드 반복부를 포함하는, RNAi.

[0172] 23. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 RNAi를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트.

[0173] 24. 구현예 23에 있어서, RNAi를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 발현 카세트.

[0174] 25. 구현예 24에 있어서, 프로모터는 근육 특이적 프로모터인, 발현 카세트.

[0175] 26. 구현예 24 또는 25에 있어서, 프로모터는 데스민 프로모터 또는 이의 변이체인, 발현 카세트.

[0176] 27. 구현예 26에 있어서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0177] 28. 구현예 26 또는 27에 있어서, 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0178] 29. 구현예 26 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0179] 30. 구현예 26 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0180] 31. 구현예 26 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0181] 32. 구현예 23 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

[0182] 33. 구현예 32에 있어서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론인, 발현 카세트.

[0183] 34. 구현예 32 또는 33에 있어서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0184] 35. 구현예 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, RNAi를 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재되는, 발현 카세트.

[0185] 36. 구현예 35에 있어서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 5' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 RNAi를 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치하는, 발현 카세트.

[0186] 37. 구현예 36에 있어서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0187] 38. 구현예 36 또는 37에 있어서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0188] 39. 구현예 23 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 발현 카세트.

[0189] 40. 구현예 39에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화

신호, 또는 HSV TK pA인, 발현 카세트.

[0190] 41. 구현예 40에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 발현 카세트.

[0191] 42. 구현예 39 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0192] 43. 구현예 23 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:17의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0193] 44. 발현 카세트로서, 발현 카세트는 변형된 데스민 프로모터를 포함하고, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0194] 45. 구현예 44에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0195] 46. 구현예 44 또는 45에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0196] 47. 구현예 44 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 발현 카세트.

[0197] 48. 구현예 44 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0198] 49. 구현예 44 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

[0199] 50. 구현예 49에 있어서, 인트론은 토끼 β-글로빈 인트론인, 발현 카세트.

[0200] 51. 구현예 49 또는 50에 있어서, 인트론은 SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:13의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0201] 52. 구현예 44 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 트랜스진을 코딩하는 핵산은 인트론 내에 내재되는, 발현 카세트.

[0202] 53. 구현예 52에 있어서, 인트론은 5' 아암 및 3' 아암을 포함하며, 5' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 5'에 위치하며, 3' 아암은 트랜스진을 코딩하는 핵산에 대해 3'에 위치하는, 발현 카세트.

[0203] 54. 구현예 53에 있어서, 인트론의 5' 아암은 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:14의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0204] 55. 구현예 53 또는 54에 있어서, 인트론의 3' 아암은 SEQ ID NO:15의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:15의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0205] 56. 구현예 44 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 발현 카세트.

[0206] 57. 구현예 56에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA인, 발현 카세트.

[0207] 58. 구현예 57에 있어서, 폴리아데닐화 신호는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호인, 발현 카세트.

[0208] 59. 구현예 56 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:16의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 발현 카세트.

[0209] 60. 구현예 44 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 트랜스진은 폴리펩티드 또는 핵산을 코딩하는, 발현 카세트.

[0210] 61. 구현예 44 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 트랜스진은 RNAi를 코딩하는, 발현 카세트.

[0211] 62. 구현예 23 내지 61 중 어느 하나의 발현 카세트를 포함하는 벡터.

[0212] 63. 구현예 62에 있어서, 발현 카세트는 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열이 측면에 있는, 벡터.

[0213] 64. 구현예 63에 있어서, 상기 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

[0214] 65. 구현예 63 또는 64에 있어서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

[0215] 66. 구현예 63 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트에 대해 5'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:18의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:18의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 벡터.

[0216] 67. 구현예 63 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 핵산 서열은 인간 SerpinA1 유전자로부터 유래되는, 벡터.

[0217] 68. 구현예 63 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 발현 카세트에 대해 3'에 위치한 스터퍼 서열은 SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:19의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 벡터.

[0218] 69. 구현예 62 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터인, 벡터.

[0219] 70. 구현예 69에 있어서, 발현 카세트는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복부(ITR) 서열이 측면에 있는, rAAV 벡터.

[0220] 71. 구현예 70에 있어서, 발현 카세트는 2개의 AAV ITR이 측면에 있는, rAAV 벡터.

[0221] 72. 구현예 70 또는 71에 있어서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR인, rAAV 벡터.

[0222] 73. 구현예 70 내지 72 중 어느 하나에 있어서, AAV ITR은 AAV2 ITR인, rAAV 벡터.

[0223] 74. 구현예 69 내지 73 중 어느 하나에 있어서, rAAV 벡터는 SEQ ID NO:20의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:20의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, rAAV 벡터.

[0224] 75. 구현예 69 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 벡터는 자가-상보성 rAAV 벡터인, rAAV 벡터.

[0225] 76. 구현예 23 내지 61 중 어느 하나의 발현 카세트, 구현예 62 내지 68 중 어느 하나의 벡터, 또는 구현예 69 내지 75 중 어느 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 세포.

[0226] 77. 구현예 62 내지 68 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 바이러스 입자.

[0227] 78. 구현예 69 내지 75 중 어느 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 입자.

[0228] 79. 구현예 78에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAVrh74, AAVrh74 N502I, AAVrh74 W505R, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

[0229] 80. 구현예 78 또는 79에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된, rAAV 입자.

[0230] 81. 구현예 78 또는 79에 있어서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된, rAAV 입자.

[0231] 82. 구현예 78, 79 또는 81에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

[0232] 83. 구현예 82에 있어서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 N502I 혈청형 캡시드인, rAAV 입자.

[0233] 84. 구현예 78, 79 또는 81에 있어서, AAV 바이러스 입자는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드를 포함하는, rAAV 입자.

[0234] 85. 구현예 84에 있어서, ITR은 AAV2 ITR이고, rAAV 입자의 캡시드는 AAVrh74 W505R 혈청형 캡시드인, rAAV 입자.

[0235] 86. rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: AAV2 ITR, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, Byrne 데스민 인핸서 요소, Paulin 데스민 인핸서 요소, 데스민 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, 5' miR155 스캐폴드 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, miR155 말단 루프 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, 3' miR155 스캐폴드 서열, 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드인, rAAV 입자. 87. rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR, SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터, SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열, SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 N502I 캡시드인, rAAV 입자.

[0236] 88. 구현예 86 또는 87에 있어서, AAVrh74 N502I 캡시드는 SEQ ID NO:50의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하는, rAAV 입자.

[0237] 89. rAAV 벡터 및 캡시드를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: AAV2 ITR, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, Byrne 데스민 인핸서 요소, Paulin 데스민 인핸서 요소, 데스민 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, 5' miR155 스캐폴드 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, miR155 말단 루프 서열, $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, 3' miR155 스캐폴드 서열, 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드인, rAAV 입자.

[0238] 90. rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자로서, rAAV 벡터는 5'에서 3'으로 하기 핵산: SEQ ID NO:43의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR, SEQ ID NO:18의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, SEQ ID NO:21의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Byrne 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:22의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 Paulin 데스민 인핸서 요소, SEQ ID NO:23의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 데스민 프로모터, SEQ ID NO:14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암, SEQ ID NO:40의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 5' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 가이드 서열, SEQ ID NO:6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 miR155 말단 루프 서열, SEQ ID NO:5의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 $DMPK^{204}$ miRNA 패신저 서열, SEQ ID NO:41의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 3' miR155 스캐폴드 서열, SEQ ID NO:15의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암, SEQ ID NO:16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 최소 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열, SEQ ID NO:19의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 serpinA1 유전자로부터의 스터퍼 핵산 서열을 코딩하는 핵산, 및 SEQ ID NO:49의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 AAV2 ITR을 포함하며; 캡시드는 AAVrh74 W505R 캡시드인, rAAV 입자.

[0239] 91. 구현예 89 또는 90에 있어서, AAVrh74 W505R 캡시드는 SEQ ID NO:52의 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하는, rAAV 입자.

[0240] 92. 구현예 77의 바이러스 입자 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 rAAV 입자를 포함하는 조성물.

[0241] 93. 구현예 77의 바이러스 입자 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 rAAV 입자를 포함하는 제약 조성물.

[0242] 94. 구현예 92 또는 93에 있어서, 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

[0243] 95. 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는 변형된 데스민 프로모터.

[0244] 96. 구현예 95에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 인간 데스민 유전자에 대한 프로모터 및 2개의 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

[0245] 97. 구현예 95 또는 96에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 하나 이상의 Byrne 인핸서 요소 및/또는 하나 이상의 Paulin 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

[0246] 98. 구현예 95 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:21의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:21의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소 및/또는 SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:22의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는 하나 이상의 인핸서 요소를 포함하는, 변형된 데스민 프로모터.

[0247] 99. 구현예 95 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 변형된 데스민 프로모터는 SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO:12의 서열과의 동일성이 약 90%인 서열을 갖는, 변형된 데스민 프로모터.

[0248] 100. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 RNAi를 포함하는 키트.

[0249] 101. 구현예 77의 바이러스 입자 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 AAV 입자를 포함하는 키트.

[0250] 102. 구현예 92 내지 94 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 키트.

[0251] 103. 구현예 100 내지 102 중 어느 하나에 있어서, 사용에 대한 지침을 추가로 포함하는, 키트.

[0252] 104. 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0253] 105. 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0254] 106. DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 RNAi의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0255] 107. 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 77의 바이러스 입자 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0256] 108. 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 77의 바이러스 입자의 유효량 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0257] 109. DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 77의 바이러스 입자의 유효량 또는 구현예 78 내지 91 중 어느 하나의 rAAV 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0258] 110. 구현예 102 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 유효량은 약 1×10^{8} 내지 약 2×10^{13}개의 게놈 카피/mL의 용량인, 방법.

[0259] 111. 구현예 110에 있어서, 용량은 약 5×10^{12}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

[0260] 112. 구현예 110에 있어서, 용량은 약 1×10^{13}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

[0261] 113. 구현예 110에 있어서, 용량은 약 2×10^{13}개의 게놈 카피/mL인, 방법.

[0262] 114. 구현예 107 내지 109 중 어느 하나에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 유효량은 체중 1 kg당

약 1 x 10^{8} 내지 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피의 용량인, 방법.

[0263] 115. 구현예 114에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 5 x 10^{13}개의 게놈 카피인, 방법.

[0264] 116. 구현예 114에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 1 x 10^{14}개의 게놈 카피인, 방법.

[0265] 117. 구현예 114에 있어서, 용량은 체중 1 kg당 약 2 x 10^{14}개의 게놈 카피인, 방법.

[0266] 118. 근긴장성 이영양증-1(DM1)의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 근긴장성 이영양증-1(DM1)을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 92 내지 94 중 어느 하나의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0267] 119. 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물에서 근긴장 디스트로피 단백질 키나아제(DMPK)의 발현을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 92 내지 94 중 어느 하나의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0268] 120. DMPK RNA 축적의 억제를 필요로 하는 DM-1을 갖는 포유동물의 세포에서 DMPK RNA 축적을 억제하는 방법으로서, 포유동물에게 구현예 92 내지 94 중 어느 하나의 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0269] 121. 구현예 104 내지 106 중 어느 하나에 있어서, RNAi는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 RNAi의 투여 전에, RNAi의 투여와 동시에, 및/또는 RNAi의 투여 후에 투여되는, 방법.

[0270] 122. 구현예 107 내지 109 중 어느 하나에 있어서, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자는 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 전에, 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여와 동시에, 및/또는 바이러스 입자 또는 rAAV 입자의 투여 후에 투여되는, 방법.

[0271] 123. 구현예 118 내지 120 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 면역억제제와 조합되어 투여되며, 면역억제제는 조성물의 투여 전에, 조성물의 투여와 동시에, 및/또는 조성물의 투여 후에 투여되는, 방법.

[0272] 실시예

[0273] 현재 개시된 주제는 제한이 아닌 본 발명의 예시로서 제공되는 하기 실시예를 참조함으로써 더 잘 이해될 것이다.

[0274] **실시예 1: amiR-DMPK^{204} 발현 카세트의 생성**

[0275] DMPK 유전자를 표적화하도록 설계된 마이크로RNA(amiR-DMPK^{204})를 코딩하는 단일 가닥 AAV 바이러스 벡터를 생성하였다(**도 1a**). 구축물은 amiR-DMPK^{204} 마이크로RNA가 최적화된 마이크로RNA 백본인 miR155(Block-IT; ThermoFisher 카탈로그 번호 K4935-00, K4936-00, K4937-00, K4938-00)에 내재되도록 설계하였으며, 이하 "miR155 amiR-DMPK^{204}" 또는 "amiR155-DMPK^{204}"이다. miR155 amiR-DMPK^{204}는 토끼 β-글로빈 인트론 서열이 측면에 있으며, 하이브리드 근육 프로모터(nDes)의 조절 하에 배치되었다.

[0276] Byrne 데스민 인핸서, Paulin 데스민 인핸서의 하나의 카피(-973 내지 -693) 및 인간 데스민 유전자의 프로모터(-228 내지 +75)를 포함하는 nDesmin 프로모터를 통상적인 올리고뉴클레오티드 합성(Genscript, 미국 소재)에 의해 합성하였다.

[0277] 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열을 인트론이 측면에 있는 amiR-DMPK^{204} 마이크로RNA(minBGHpA)의 3'에 배치하였다. 필러(filler) 서열("스터퍼")을 포함시켰다. 전체 유전자 카세트는 DNA 구제 및 복제와 AAV 캡시드 내로의 패키징을 위해 야생형 AAV 혈청형 2 역위 말단 반복부(ITR) 서열이 측면에 있다. 서열을 ITR 플라스미드로 조작하였으며, 이를 사용하여 생체 내 효능 연구를 위한 벡터를 생성하였다.

[0278] 5' 및 3' ITR 서열

[0279] ITR 서열은 145bp의 AAV2 야생형 서열이었다. 3' ITR(발현 카세트의 하류)은 플립(Flip) 배향이었다(GenBank: LQ493091.1). 5' ITR(발현 카세트의 상류)은 플롭(Flop) 배향(145bp)이었다(문헌[Miller *et al.*, 2004, *Nature Genetics* 36.7 (2004): 767-773]). 서열의 정확성을 Sanger 서열결정에 의해 확인하였다.

[0280] nDes 프로모터

[0281] nDes 프로모터는 문헌[Li and Paulin, *et. al*. 1991, *J Biol Chem*. 266.10: 6562-6570]에 예시된 데스민 프로모터 요소를 사용하여 구축하였다. nDes 프로모터는 Byrne 데스민 인핸서의 하나의 카피, Paulin 데스민 인핸서의 하나의 카피(-973 내지 -693) 및 인간 데스민 유전자의 프로모터(-228 내지 +75)를 포함한다.

[0282] 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 및 3' 아암

[0283] miRNA의 인트론 발현이 표적 녹다운을 향상시키는 것으로 알려져 있기 때문에 이 인트론을 사용하여 amiR-DMPK^{204} 카세트의 측면에 배치하였다.

[0284] miR155 스캐폴드가 있는 amiR-DMPK^{204}(miR155-amiRDMPK^{204})

[0285] 내인성 miRNA는 많은 1차 RNA 전사체(pri-miRNA)에서 발견되는 헤어핀-유사 2차 구조이다. 핵에서, 마이크로프로세서, Drosha/DGCR8 복합체는 pri-miRNA의 기저 스템에 결합하여 이를 절단하여 스템-루프 전구체 miRNA(pre-miRNA)를 유리시킨다. 그 후, pre-miRNA를 핵으로부터 내보내고, 여기서 루프는 Dicer/TRBP에 의해 절단되어 성숙 RNA 이중체를 형성한다. 표적화 가닥으로도 알려진 가이드 가닥은 패신저 가닥으로부터 분리되어 RNA 유도 침묵화 복합체(RISC)의 아르고넛(argonaute) 단백질 상에 로딩되며, 그 후 이는 분해 또는 번역 억제를 위해 상보적 mRNA 전사체를 표적화한다.

[0286] amiR-DMPK^{204} 서열은 DM1 요법에 대한 표적으로 확인되었다. amiR-DMPK^{204}의 표적 서열은 DMPK 뉴클레오티드 서열의 3' UTR 내의 "CUG" 반복 서열의 상류에 위치한다. 따라서, amiR-DMPK^{204}는 야생형 및 돌연변이 DMPK 전사체 둘 모두를 억제할 수 있다.

[0287] 또한, amiR-DMPK^{204} 표적 영역은 비인간 영장류(NHP-시노몰구스 원숭이) 및 인간에서 보존되어, NHP에서 DMPK 녹다운의 전임상 평가를 가능하게 한다(**도 11**). amiR-DMPK^{204} 마이크로RNA를 평가하였고, miR155 스캐폴드가 최소 패신저 가닥 프로세싱에 의해 효율적인 가이드 프로세싱을 가져서 오프-타겟 효과의 가능성을 감소시키는 것으로 나타났다(하기 실시예 2 참조).

[0288] 개발을 위해 선택된 최종 구축물은 miR155 스캐폴드가 있는 amiR-DMPK^{204}(amiR155-DMPK^{204})였으며, 여기서, 가이드 가닥은 프로세싱되는 경우 분해를 위해 DMPK mRNA를 표적화하였다. 조작된 pre-miRNA 서열 구조는 뮤린 miR-155 서열을 기반으로 한다(문헌[Lagos-Quintana *et al*., 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739]). miR-155 전사체로부터 유래된 5' 및 3' 측면 영역을 벡터에 삽입하여 miR-155 구조를 가능한 한 많이 보존하였다. 스템-루프 구조를 최적화하였고, 2개 뉴클레오티드 내부 루프는 천연 miR-155 분자에서 발견되는 5개 뉴클레오티드/3개 뉴클레오티드 내부 루프보다 더 높은 녹다운 속도를 초래하였다(소스: BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector, (Invitrogen)). AAV 캡시드의 맥락에서 벡터, nDes-miR155-amiR-DMPK^{204}는 DM1의 DMSXL 마우스 모델에서 효력있는 생체 내 활성을 갖는 것으로 나타났다(하기 실시예 3 참조).

[0289] minBGH 폴리A

[0290] 186 bp의 최소 BGH 폴리A 부위를 amiR-DMPK^{204} 서열의 하류에 삽입하여 mRNA의 전사 종결 및 폴리아데닐화를 허용하였다.

[0291] A1AT 인트론으로부터의 스터퍼 서열

[0292] 알파-1 항트립신 유전자 인트론 서열 4로부터의 스터퍼 서열을 사용하여 유전자 카세트를 rAAV 벡터에 대한 패키징 한계로 가져왔다.

[0293] nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 카세트(nDes-miR155- amiR-DMPK^{204})를 포함하는 ITR 플라스미드의 클로닝

[0294] 발현 구축물인 nDes- miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA 카세트의 1938 bp ITR- ITR 서열을 설계하였다. ITR 플라스미드로의 nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}-minBGHpolyA 카세트의 클로닝을 수행하였다. 합성된 nDes-miR155-amiR-DMPK204-minBGHpolyA는 ITR 플라스미드로의 클로닝을 위한 5' Nco1 부위 및 3' Sph1 부위를 포함하였다(**도 1b**). 간략하게는, 합성된 nDes-miR155- amiR-DMPK2^{04}-minBGHpolyA 서열을 함유하는 플라스미드를 NcoI 및

SphI로 절단하고, 1.9 kb 단편을 겔 정제하였다. ITR 플라스미드를 NcoI 및 SphI로 절단하고, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase(New England Biolabs; 카탈로그 번호 M0290)를 사용하여 탈인산화하고, 8.2 kb 벡터 백본 단편을 겔 정제하였다. 발현 카세트 및 절단된 ITR 플라스미드를 함유하는 절단된 1.9 kb 단편을 라이게이션하여 플라스미드 ITR-nDes-miR155- amiR- DMPK^{204}를 생성하였다.

[0295] 소규모 rAAV 벡터 생성

[0296] 소규모 패키징 분석을 HEK 293 세포에서 수행하여 ITR-nDes-miR155-amiR-DMPK^{204} 플라스미드의 패키징을 확인하였다. AAV rep/cap 플라스미드를 사용하여 소규모 생성을 수행하였다. **도 1c는** 표준 EGFP 플라스미드 유전자 카세트와 비교하여 HEK 293 세포당 생성된 벡터의 양을 나타낸다.

[0297] DM1 표현형을 교정하는 amiR-DMPK^{204}의 가능성을 결정하기 위해, 인간 DMPK 전사체를 침묵시키고 DM1 환자로부터의 골격 근모세포 배양에서 스플라이싱 결함을 교정하는 능력을 테스트하였다. DMPK 유전자의 3' UTR에서의 CTG 확장으로 인해, DMPK mRNA 헤어핀 구조는 불용성 리보핵 초점으로서 응집되고 몇몇 RNA-결합 단백질을 격리한다. 필수 스플라이싱 인자, 예컨대 머슬블라인드-유사 1(muscleblind-like 1; MBNL1)의 생성된 재분포는 근육 조직의 분화를 담당하는 하류 이펙터의 미스스플라이싱을 야기한다. amiR-DMPK^{204}를 이용한 DM1 환자 세포의 처리는 MBNL1 엑손 7 포함에 의해 측정된 바와 같이 50% 초과의 DMPK mRNA 침묵화 및 스플라이싱 교정을 야기하였다.

[0298] **실시예 2: miR155 amiR-DMPK^{204}의 프로세싱**

[0299] amiR-DMPK^{204}를 AAV 캡시드로 패키징하고, DMPK 녹다운 효능, 패신저 가닥 활성, 및 프로세싱 패턴을 생체 내 에서 분석하였다. nDes-miR155-amiR-DMPK^{204}를 보유하는 구축물을 AAV로 패키징하였다. 벡터를 DMSXL 성체 인간화 DM1 마우스 모델 내로 정맥내 주사하였으며, 이는 1,000개 초과의 CTG 반복부를 갖는 인간 DMPK를 발현한다. 8주 후, 동물을 안락사시키고, 다수의 조직을 수집하여 DMPK 녹다운 효능을 측정하고, 심장 조직을 선택하여 패신저 가닥 활성 및 프로세싱 패턴을 측정하였다.

[0300] RT-PCR 분석은 다수의 근육 조직에서 amiR-DMPK^{204}의 강력한 발현을 보여 주었으며, 이때 심장에서의 발현이 더 높았다(**도 2b**). amiR-DMPK^{204} 발현과 동시에, RT PCR 분석에 의해 심장에서 강력한 DMPK 억제를 확인하였으며, 이때 상이한 골격근들에서 평균 >70% 및 약 30% DMPK 억제가 있었다(**도 2c**). 심장 조직에서, DMPK 발현은 TBP(TATA 결합 단백질) 발현에 비해 50% 미만이다. 특히, TBP에 비해 낮은 수준의 DMPK(약 50%, **도 2c**에서 점선으로 표시)를 발현하는 DSMXL 마우스는 명백한 DM1 표현형을 갖지 않는다. 흥미롭게도, 간에서 더 높은 형질도입이 관찰되었지만(**도 2a**) nDesmin 프로모터는 심장 조직에서 강한 활성을 나타냈고 골격근에서 유사한 수준을 나타냈다(**도 2b**). 이는 발현이 DM1 병상에 의해 영향을 받는 심장 근육과 골격근에 주로 제한되었음을 시사한다.

[0301] amiR-DMPK^{204}의 프로세싱을 평가하기 위해, 심장 조직을 작은 전사체 분석을 위해 NGS에 의해 가이드 가닥과 패신저 가닥의 서열 조성 및 성숙 amiR-DMPK^{204} 길이에 대해 분석하였다.

[0302] amiR-DMPK^{204}의 프로세싱은 패신저 가닥을 생성하지 않았다. amiR-DMPK^{204}는 마우스 심근세포에서 가이드 가닥(>99%)으로만 프로세싱되었지만, 종종 miRBase 데이터베이스로부터 예측된 것보다 더 긴 가닥을 생성하였다(**표 1**). miR155 프로세싱은 가장 흔히는 22 내지 26 nt 길이의 성숙 길이를 생성하였지만, 5' 말단에서 정확하게 프로세싱되었다(**표 1**). miR155 amiR-DMPK^{204}에 맵핑되는 상이한 가이드 가닥 길이들(nt)의 서열 분포를 백분율(% 판독값)로 계산하였다. 예상되는 amiR-DMPK^{204} 가이드 가닥은 밑줄로 표시되어 있고 시드 서열은 볼드체이다. 별표는 amiR-DMPK^{204} 가이드 가닥의 예측된 길이에 상응하는 판독값을 나타낸다.

[0303] **표 1. miR155 amiR-DMPK^{204}에 맵핑되는 상이한 가이드 가닥 길이들(nt)의 서열 분포를 백분율(% 판독값)로 계산하였다.** 예상되는 amiR-DMPK^{204} 가이드 가닥은 밑줄로 표시되어 있다. 별표는 amiR-DMPK^{204} 가이드 가닥의 예측된 길이에 상응하는 판독값을 나타낸다.

miR-155 판독 서열	길이	% 서열	SEQ ID NO
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGT	23	52	33
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTT	24	24	34
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTT	25	11	35
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT*	22	6	36
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTTT	26	3	37
AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTG	22	4	38

[0304]

[0305] 전반적으로, miR155를 갖는 amiR-DMPK^{204}에 의해서는 패신저 가닥이 검출되지 않았다(가이드 %는 99% 초과임). 따라서, miR155 miRNA 스캐폴드가 RNAi에 대해 잘 검증되었기 때문에, miR155를 전임상 연구를 위한 리드로 선택하였다.

[0306] **실시예 3: 트랜스제닉 마우스에서 miR155-amiRDMPK^{204}를 코딩하는 AAV의 전신 주사에 의한 인간 DMPK의 용량 의존적 억제**

[0307] 가장 효과적인 용량을 결정하기 위해, 3개의 별개의 용량의 근친화성 AAV(WO/2019/207132) 캡시드의 전달을 조사하였다. miR155 스캐폴드를 갖는 amiR-DMPK^{204}(amiR155-DMPK^{204})에 대한 발현 카세트를 코딩하는 AAV를 용량-증량 연구에서 평가하였다. 8주령 DMSXL 마우스에 저용량, 중간 용량 및 고용량에 상응하는 5.0 × 10^{11}개의 벡터 게놈(vg)/kg, 5 × 10^{12}개의 vg/kg 및 1.0 × 10^{13}개의 vg/kg을 정맥내 주사하였다. 마우스를 AAV 주입 후 8주에 체중, 생존율, 근긴장증 및 심장 기능과 같은 임상 증상에 대해 분석하였다. 마우스를 유전자 전달 8주 후에 안락사시키고, DMPK 억제 및 스플라이싱 교정을 측정하였다. miR155-amiRDMPK^{204} 발현 수준을 소형 RNA TaqMan에 의해 측정하고, mRNA 입력 수준을 u6 소형 핵 RNA에 대해 정규화하였다.

[0308] 다수의 조직에서 amiR155-DMPK^{204}의 발현이 용량 의존적 방식으로 관찰되었으며(**도 3a**) 총 DMPK 발현의 용량-의존적 감소를 초래하였다(**도 3b**). 전반적으로, 약 10개의 amiR155-DMPK^{204} 카피/U6이 심장 및 횡경막에서 DMPK를 ≥50% 감소시키기에 충분하였으며, 상기 양은 DM1 환자를 치료하기에 충분할 수 있다.

[0309] 다음으로, 스플라이싱 이상과 같은 특징적인 DM1 표현형에 대한 DMPK 억제의 결과를 조사하였다. Lim 도메인 결합 3(Ldb3)의 비정상적인 스플라이싱(Ldb3 전사체에 엑손 11을 포함시킴)은 CUG 반복 RNA에 의한 RNA 스플라이싱 기구의 격리로부터 생성된 DM1-특이적 표현형으로 입증되었다(문헌[Yamashita *et al.* 2014. *Neurobiol Dis.* 69:200-5]). 비복근에 엑손 11을 포함시킴에 의한 Ldb3 전사체의 유의한 감소가 중간 용량 또는 고용량의 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리된 마우스에서 관찰되었으며, 이는 스플라이싱 결함이 amiR155-DMPK^{204}로 처리된 근육에서 효율적으로 교정되었음을 확인시켜 준다(**도 4**).

[0310] 그 후, 이러한 분자 교정에 더하여, AAV nDes-miR155-amiR-DMPK^{204}의 효능을 상기 질병의 생리학적 및 기능적 징후의 관점에서 측정하였다.

[0311] 상기 처리가 생존성을 개선하고 체중 감소를 약화시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해, DMSXL 마우스를 3개의 상이한 용량으로 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리하고, 생존율 및 체중을 모니터링하였다. 중간 용량 및 고용량을 이용한 8주의 처리 후 개선된 체중 및 생존율이 관찰되었다. 반면에, 저용량 또는 균형 염 용액(BSS) 대조군에서는 개선이 관찰되지 않았다(**도 5a** 및 **도 5b**).

[0312] 다음으로, AAV nDes-miR155-amiR-DMPK^{204}의 효능을 근긴장증 및 심장 이상의 예방과 같은 질병의 기능적 징후의 관점에서 측정하였다. 근전도검사 측정에 의하면 AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리된 마우스에서 근긴장증의 유의한 감소가 나타났다(**표 2**). 특히, 처리 후, 중간 용량으로 처리된 동물의 7.6%만이 근긴장증을 가졌다. 이와는 대조적으로, 대조군(BSS로 처리됨) 또는 저용량군에서 50% 초과의 마우스가 지속적인 근긴장증(점수 1)을 가졌다.

[0313] **표 2. AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}로 처리한 후 근긴장증을 갖는 DMSXL DM1 마우스의 수.**

군	근긴장증(비복근)을 갖는 동물의 수
야생형	0/10
DMSXL-대조군(비처리)	4/7
DMSXL-5E11 VG/Kg (저용량)	3/5
DMSXL-5E12 VG/Kg (중간 용량)	1/13
DMSXL-5E13 VG/Kg (고용량)	1/7

P<0.05

[0314]

[0315] 근긴장 전위를 4점 척도로 등급화하였다: 0, 근긴장증 없음; 1, 바늘 삽입의 50% 미만에서 가끔 근긴장 전위; 2, 바늘 삽입의 50% 초과에서 근긴장 전위; 3: 거의 모든 삽입에 의해 근긴장 전위.

[0316] DMSXL 마우스의 심장 기능은 또한 골격근 기능과 함께 처리 8주 후 표면 심장초음파를 사용하여 모니터링하였다. AAV nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}는 BSS 처리된 대조군과 비교하여 심박출량을 개선하였다. 8주의 처리 후 중간 용량군(5e12 vg/kg)에서 심박출량의 유의한 개선이 관찰되었다(**도 6**).

[0317] **실시예 4: AAVrh74N502I 캡시드는 개선된 근육 형질도입 및 감소된 간 형질도입을 갖는다**

[0318] 비인간 영장류의 다양한 조직에서 AAVrh74N502I VP1 캡시드 단백질(WO 2019178412; SEQ ID NO: 50)을 함유하는 AAV 캡시드의 형질도입 효율을 테스트하기 위한 실험을 수행하였다. 실험의 개요가 **도 7a**에 예시되어 있다. 비인간 영장류를 각각 eGFP 발현 카세트를 함유하는 AAV9, AAVrh74, 또는 AAVrh74N502I 캡시드 1 x 10^{13} vg/kg으로 정맥내 처리하였다. 처리 21일 후, 동물을 희생시키고, 전경골(TA), 대퇴이두근, 사두근, 심장 및 간에서의 eGFP 발현 수준을 측정하였다.

[0319] AAVrh74N502I 캡시드 단백질을 함유하는 캡시드는 비교 캡시드와 비교하여 비인간 영장류에서 개선된 근육 형질도입(**도 7b~도 7e**) 및 감소된 간 형질도입(**도 7f**)을 가졌다. (표 3).

[0320] **표 3. AAV9 및 AAVrh74 캡시드로 처리된 것에 비해 AAVrh74N502I 캡시드로 처리된 비인간 영장류의 조직에서의 eGFP 수준의 증가.**

조직	AAV9	AAVrh74
전경골	+13x	+178x
대퇴이두근	+303x	+56x
사두근	NS*	+32x
심장	NS	+13x
간	-15x	-2x

*NS = 유의하지 않음

[0321]

[0322] **실시예 5: DMSXL 마우스 모델에서의 AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 표적 결속의 평가**

[0323] 가장 효과적인 용량을 결정하기 위해, 2개의 별개의 용량의 AAVrh74N502I 캡시드의 전달을 조사하였다. miR155 스캐폴드를 갖는 amiR-DMPK^{204}(miR155- amiR-DMPK^{204})에 대한 발현 카세트를 코딩하는 AAV를 용량-증량 연구에서

평가하였다. 8주령 DMSXL 마우스에 저용량, 및 고용량에 상응하는 9 × 10^{13}개의 벡터 게놈(vg)/kg, 및 1.8 × 10^{14}개의 vg/kg을 정맥내 주사하였다. 마우스를 유전자 전달 8주 후에 안락사시키고, DMPK 억제 및 amiR-DMPK^{204} 발현 수준을 소형 RNA TaqMan에 의해 측정하고, mRNA 입력 수준을 u6 소형 핵 RNA에 대해 정규화하였다.

[0324] 다수의 조직에서 amiR-DMPK^{204}의 발현이 용량 의존적 방식으로 관찰되었으며(**도 8a**) 총 DMPK 발현의 용량-의존적 감소를 초래하였다(**도 8b**). 전반적으로, 약 10개의 amiR-DMPK^{204} 카피/U6이 심장 및 횡경막에서 DMPK를 ≥50% 감소시키기에 충분하였으며, 상기 양은 DM1 환자를 치료하기에 충분할 수 있다.

[0325] 마지막으로, 근친화성 캡시드인 AAVrh74N502I(SEQ ID NO: 50)의 맥락에서 리드 벡터인 nDes-miR155-amiR-DMPK^{204}는 심근세포 유래 DM1 iPSC에서 효력있는 시험관 내 활성을 갖는 것으로 나타났다(**도 9**).

[0326] **실시예 6: 트랜스크립톰 상의 AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}의 평가**

[0327] amiR-DMPK^{204} 처리가 트랜스크립톰에 대한 임의의 주요 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, CBA miR155- amiR-DMPK^{204} 플라스미드로 HEK293 세포주를 형질감염시킴으로써 amiR-DMPK^{204} -처리된 것을 CTL3(스크램블 miRNA)과 비교하여 게놈 전체 RNA 서열결정(RNA-seq)을 수행하였다. 관찰된 비-*DMPK* 유전자 발현 변화가 amiR-DMPK^{204}의 오프-타겟 효과로 인한 것인지의 여부를 평가하기 위해, 유의하게 하향조절된 표적에서의 시드 상보성에 대한 강화를 평가하였다. 5% 위발견률(FDR) 유의성 역치를 사용할 경우 3' UTR이 TTCGAC 시드 상보체를 함유하는 4개의 차등 발현된 유전자 OPN4(12.5배), DMPK(1.7배), KRTAP21-2(1.7배), C8ORF44-SGK3(1.7배)이 있었다(**표 4**). 1% FDR을 이용하는 경우, 단지 OPN4(12.5배), DMPK(1.7배)가 차등 발현을 나타낸다(**도 10**). 예상대로, *DMPK*는 가장 유의하게 영향을 받은 mRNA 수준(44% 침묵화) 중 하나였다. 전반적으로, HEK293 세포에서 amiR-DMPK^{204}의 과발현 후 최소한의 오프-타겟 효과가 관찰되었다.

[0328] **표 4**

유전자 명칭	로그 2 배수 204 (CTL3 대비)	배수 204 (CTL3 대비)	P 값	FDR_BH <0.05	FDR_BH <0.01
OPN4	-3.64	12.5	2.7746E-17	5E-13	있음
DMPK	-0.77	1.7	3.4308E-10	2E-06	있음
KRTAP21-2	-0.76	1.7	0.0001	0.0103	
C8orf44-SGK3	-0.79	1.7	0.0003	0.0191	

[0329]

[0330] **실시예 7: 비인간 영장류에서 AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}의 생체분포 및 활성을 탐구하기 위한 용량 범위 결정 연구**

[0331] AAVrh74MN502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}의 생체분포 및 활성을 결정하기 위해, 시노몰구스 원숭이에게 단회 정맥내 주입(IV) 용량을 투여하였다. 연구 기간은 단회 주사 후 12주 동안이었다.

[0332] 16마리의 총 시노몰구스 원숭이(8마리의 수컷, 8마리의 암컷; 24 내지 48개월령)에게 연구 1일차에 1회 복재 정맥에 IV를 통해 투약하였다. 용량은 아래의 표 5에 표시되어 있다. 용량 수준(vg/kg)을 기반으로 하여 동물을 4개의 상이한 범주로 군으로 나누었다(군당 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷): 제형 완충액(군 1); 5 x 10^{13} vg/kg(군 2); 1 x 10^{14} vg/kg(군 3); 및 2 x 10^{14} vg/kg(군 4). 12주 후, 동물을 희생시키고, 분석을 위해 조직을 수확하였다.

[0333] 표 5

군	테스트 물품 또는 대조 물품	용량 수준 (vg/kg)	용량 농도 (vg/mL)	동물 수	
				수컷	암컷
1	제형 완충액	0	0	2	2
2	AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}	5 x 10^{13}	5 x 10^{12} vg/ml	2	2
3	AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}	1 x 10^{14}	1 x 10^{13} vg/ml	2	2
4	AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK^{204}	2 x 10^{14}	2 x 10^{13} vg/ml	2	2

[0334]

[0335] 수확된 조직을 RNA 및 DNA 추출을 위해 기계적으로 균질화하고, 샘플을 디지털 PCR(dPCR)로 분석하였다.

[0336] AAVrh74N502I nDes-miR155- amiR-DMPK204의 용량-의존적 생체분포 및 활성은 몇몇 근육 및 비근육 조직에서 입증되었다. 몇몇 골격근(전경골근(TA); 비복근; 사두근; 이두근; 비장근; 장지신근(EDL); 횡격막)과, 심장 근육 및 간 조직을 분석하였다. 바이러스 게놈 카피는 테스트된 모든 조직에서 발견되었고, 각각의 조직에서의 카피수/세포는 용량-의존적 방식이었다(도 12). amiR-DMPK 발현의 발현량(도 13) 및 DMPK의 하향조절(도 14)도 다양한 근육 조직, 심장 조직 및 간 조직에서 용량-의존적 방식이었다. DMPK 발현의 용량-의존적 감소는 대조군과 비교하여 최대 90% 감소된 것으로 밝혀졌다. 동물에서 테스트된 모든 용량은 동물에 의해 내약성이 우수하고 안전한 것으로 밝혀졌다.

[0337] 서열

[0338] 모든 폴리펩티드 서열은 달리 표시되지 않는 한 N-말단에서 C-말단으로 제시된다. 모든 핵산 서열은 달리 표시되지 않는 한 5'에서 3'으로 제시된다.

[0339] Byrne 데스민 인핸서 서열

[0340]
```
CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTT
TC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGT
TG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGT
GT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCA
GGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAA
ACTG
AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCA
CCCTCGA (SEQ ID NO:21)
```

[0341] 소스: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570.

[0342] 염색체 2 상의 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 데스민 유전자좌 제어 영역(DES-LCR)(NCBI 참조 서열: NG_046330.1)

[0343] Byrne 인핸서 서열은 참조 서열에서 17767~18125에 상응한다.

[0344] Paulin 데스민 인핸서 서열

CCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTTCTCCT
CT
ATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTG
GG
TTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTG
TG
AGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAA
GTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTGAA **(SEQ ID NO:22)**

[0345]

[0346] 소스: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570.

[0347] 염색체 2 상의 호모 사피엔스 데스민 유전자좌 제어 영역(DES-LCR)(NCBI 참조 서열: NG_046330.1)

[0348] Paulin 인핸서 서열은 참조 서열에서 17787~18063에 상응한다

[0349] Paulin 데스민 프로모터 서열 (-228 내지 +75)

CTGCAGAC**C**TGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAG
GA
CCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCC
CC
CACGGCCACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGG
AG
GGGAGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCT
GT
CTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCG
CCCGCCAGCCTCGCCCG **(SEQ ID NO:23)**

[0350]

[0351] 공개된 서열과는 하나의 염기쌍 차이가 있다(A 대신 C, 볼드체 및 밑줄로 나타냄).

[0352] 소스: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570.

[0353] 염색체 2 상의 호모 사피엔스 데스민 유전자좌 제어 영역(DES-LCR)(NCBI 참조 서열: NG_046330.1)

[0354] Paulin 프로모터 서열은 참조 서열에서 18535~18844에 상응한다.

[0355] 전체 nDes 프로모터 서열

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTT
TC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGT
TG
CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGT
GT
GTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCA
GG
GGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAAC
TG
AAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGCCCCA
CCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCA
TGCG
TTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGG
AG
ATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCG
TG
GGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAG
CC
ACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTCT
GC
AGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGACC
CC
CGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCA
CG
GCCACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGG
GA
GGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCT
CC
CCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCG
CCAGCCTCGCCCG **(SEQ ID NO:12)**

[0356]

[0357] 소스: Li and Paulin, et. al. 1991. "High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer." Journal of Biol Chem. 266.10: 6562-6570.

[0358] 토끼 β-글로빈 인트론

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACC
ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATT
TGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATT
CCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA
AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATT
GGTAGAAACAACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACC
ATGTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG **(SEQ ID NO: 13)**

[0359]

[0360] 토끼 β-글로빈 인트론의 5' 아암

GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTA
TA
TGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCA
CC
ATG**CATG**GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCA
TT
GTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCA
TT
TGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGA
TTC **(SEQ ID NO:14)**

[0361]

[0362] 소스: *오릭토톨라구스 쿠닌쿨루스(Oryctolagus cuninculus)* 헤모글로빈, 베타(HBB2) 유전자 ID 100009084

[0363] 본 발명의 서열은 유전자 ID 100009084에 존재하지 않는 추가의 CATG(볼드체 및 밑줄로 나타냄)를 갖는다.

[0364] **토끼 β-글로빈 인트론의 3' 아암**

[0365] CAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAAT
TA
AATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTA
TT
GGTAGAAACAACTACA**T**CCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGA
TA
TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAA
CCATGTTCATGCCTTCTTCT**T**TTTCCTACAG **(SEQ ID NO:15)**

[0366] 소스: 오릭토톨라구스 쿠닌쿨루스 헤모글로빈, 베타(HBB2) 유전자 ID 100009084

[0367] 본 발명의 서열은 유전자 ID 100009084에서 2개의 C 잔기 대신에 2개의 T 잔기를 갖는다(위에 볼드체 및 밑줄로 나타냄).

[0368] **miR155-DMPK^{204} 서열:**

[0369] **5' miR155 측면 서열**

[0370] RNA 서열

[0371] CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCU **(SEQ ID NO:9)**

[0372] **DNA 서열**

[0373] CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCT **(SEQ ID NO:40)**

[0374] 소스: BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits 카탈로그 번호 K493500

[0375] 조작된 pre-miRNA 서열 구조는 뮤린 miR-155 서열을 기반으로 한다(문헌[Lagos-Quintana *et al.*, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739]).

[0376] **amiR-DMPK^{204} 가이드-DNA**

[0377] AGTCGAAGACAGTTCTAGGGT **(SEQ ID NO:4)**

[0378] **miR155 말단 루프-DNA**

[0379] GTTTTGGCCACTGACTGAC **(SEQ ID NO:6)**

[0380] 소스: BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits 카탈로그 번호 K493500

[0381] 조작된 pre-miRNA 서열 구조는 뮤린 miR-155 서열을 기반으로 한다(문헌[Lagos-Quintana *et al.*, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739]).

[0382] **amiR-DMPK^{204} 패신저-DNA**

[0383] ACCCTAGATGTCTTCGATT **(SEQ ID NO:5)**

[0384] **amiR-DMPK^{204} 가이드-RNA-miR155 말단 루프-amiR-DMPK^{204} 패신저-RNA**

[0385] AGUCGAAGACAGUUCUAGGGUUGUUUUGGCCACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUU
(SEQ ID NO:7)

[0386] **amiR-DMPK^{204} 가이드-DNA-miR155 말단 루프-amiR-DMPK^{204} 패신저-DNA**

[0387] AGTCGAAGACAGTTCTAGGGTTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATT
(SEQ ID NO:8)

[0388] **3' miR155 측면 서열**

[0389] RNA 서열

[0390] GACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC **(SEQ ID NO:10)**

[0391] **DNA 서열**

[0392] GACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCC **(SEQ ID NO:41)**

[0393] 소스: BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits 카탈로그 번호 K493500

[0394] 조작된 pre-miRNA 서열 구조는 뮤린 miR-155 서열을 기반으로 한다(문헌[Lagos-Quintana *et al.*, 2002, *Current Biology*, 12:9, 735-739]).

[0395] **miR155**

[0396] RNA

[0397] CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCACAUG
GAACAAAUGGCC **(SEQ ID NO:11)**

[0398] DNA

[0399] CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATG
GAACAAATGGCC **(SEQ ID NO:42)**

[0400] **전체 miR155-DMPK^{204} 이중체 서열 - RNA**

[0401] CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAGUCGAAGACAGUUCUAGGGUGUUUUGGC
CACUGACUGACACCCUAGAUGUCUUCGAUUCAGGACACAAGGCCUGUUACUAGCACU
CACAUGGAACAAAUGGCC **(SEQ ID NO:24)**

[0402] **전체 miR155-DMPK^{204} 이중체 서열 - DNA**

[0403] CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAGTTCTAGGGTGTTTTGGC
CACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACT
CACATGGAACAAATGGCC **(SEQ ID NO:25)**

[0404] **최소 BGHpA 서열**

[0405] TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGC **(SEQ ID NO:16)**

[0406] 소스: *보스 타우루스*(*Bos taurus*) 성장 호르몬 1(GH1) mRNA NCBI 참조 서열 NM_180996.1

[0407] **1138 bp A1AT 인트론 스터퍼 서열(발현 카세트의 상류)**

[0408] TACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATC
AC
ATGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGG
AT
GGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACTTT
TC
CCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCAATCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGT
TG
AACTTGACCTCGGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCA
GC
TTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGAGA
GA
AGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACC
TC
CCAGGAAGCGCTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCT

GT
CACATAGGCCTTGCTCCTCCTCAAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTC
CA
TCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCAGGTGCACCCACAACTCAGAACAGGGA
AG
AGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTTCTAGTACACGGCTT
GA
AGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCAAGAT
AA
TGCAGCCATTCATGGAACTGCAGGTTGTTCATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATA
AG
TGTCACTTTAGCTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGG
AG
TCAGAAATTCCTTTGAAACAACTTAGCCCAAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAAT
CA
AGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGTTGAAATTCAGGGTCAGTGACACAAC
CT
CAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCTGCCTGGCTTTGCTGTTT
GC
CCACCGTCCCGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTCA
TT
TGTTTCCCTCGGCCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCCACACATTC
TTCCCTACAGATACCATGG **(SEQ ID NO:18)**

[0409]

[0410] 소스: 플라스미드 DC 969(SerpinA1= A1AT) 염색체 14 NG_008290.1

[0411] 398 bp A1AT 인트론 스터퍼 서열(발현 카세트의 하류)

GCATGCAGAGTGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACA
GA
AGGAGGAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCC
AG
GACTTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAA
GA
GCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCCTGGCCTTGCCTCCCACCTCCCCTC
CC
CTATGCTGTTTTCCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCAGG
AC
CCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCAT
CA CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT **(SEQ ID NO:19)**

[0412]

[0413] 소스: 플라스미드 DC 969(SerpinA1= A1AT) 염색체 14 NG_008290.1

[0414] ITR-nDes-miR155- amiR-DMPK[204] -BGHpA-스터퍼-ITR(3739 bp)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
GAC

[0415]

CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTT
CCTTACGTACAATTGGGATCCTTCGAACTTGAGAGAAAACATCCCAGGGATTTACAGATCACATGCAG
GCA
GGGACCAGCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGG
AGC
GAGAGGCAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTT
CAA
TCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTTGAACTTGACCTCGGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAA
AAC
ATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGG
AGA
GAAGCAGAGACACGTTGTAAGGCTGATCCCAGGCCTCGAGCAAGGCTCACGTGGACACCTCCCAGGAA
GCG
CTCACTCCCCCTGGACGGCCCTGGCCCTGCACATCCTCTCCCTCCCTGTCACATAGGCCTTGCTCCTC
CTC
AAGGCTTTGGCTGATGGGGCTGGCTCCCCTCTGTCCATCTTCCTGACAAGCGCCTCTCCCCCTGCTCA
GGT
GCACCCACAACTCAGAACAGGGAAGAGCATCGTCACTCCACTAGTCTGCCTCCAGGGCTCTCTCCTTT
CTA
GTACACGGCTTGAAGCTCCTTGAGGACACGGACCCTGGCAGTGACCTTCACAGTGCCCAGACCCCAAG
ATA
ATGCAGCCATTCATGGAACTGCAGGTTGTTCATTGGTCGCCTTTAGTTTTCCAAAATAAGTGTCACTT
TAG
CTGAAATCATTCATTAATTCAGACACCAAATCTCACAGATCGAAGGAGTCAGAAATTCCTTTGAAACA
ACT
TAGCCCAAACCTTTCTGTGTCAGTATGGATAAATCAAGGCCCAATGTCTAGAAGGTCTTGGGCAAAGT
TGA
AATTCAGGGTCAGTGACACAACCTCAAGGGAGGCCCCGAAAGTGCCAGCTGCACAGCAGCCCCTGCCT
GGC
TTTGCTGTTTGCCCACCGTCCCGTGTCAGTGAATCACGGGCATCTTCAGGAGCTCAGCCTGGGTCTTC
ATT
TGTTTCCCTCGGCCCCTTCCTCAGCCTCAGGACAGTGCTAGCAGCCCCCACACATTCTTCCCTACAGA
TAC
CATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAG
CCA
TGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGT
TGG
GTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGG
GAT
GAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGC
ACA
TAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGG
CCC
CACCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGTTCTC
CTC
TATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATG
CGG
CTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGG
AGG
GGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTG
GAA
ACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAG
GAC
CCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCACGGCCACG
GGC
CGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATGTCAG
GAG
GGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGC
CTG
CCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCC*GGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCGCGCC*
TGA
[0416] GAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTAT

[0417]

ATG
GAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGCATGGACC
CTC
ATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCAT
TTT
CTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGTTTATTTG
TCA
GATTGTAAGATCCCATCGATTCGGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAGACAG
TTC
TAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC
ACT
CACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAA
CAA
TTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTT
ATT
GGTAGAAACAACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTT
TGA
GATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTT
TCC
TACAGCTCCTGGGCAACGTGCTG*ACCGGT*CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGC
CTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT
TGTCTG
AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
TAGCGCATGCAGAGTGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACAGAAGGAG
GAGACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTTAGCTGTGC
TGACTGCAG
CCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCC
CTG
GCCTTGCCTCCCACCTCCCCTCCCCTATGCTGTTTTCCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCC
TGG
GGCCCCCAGGACCCTGGCATTTTAACCCCTCAGGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAGTCCA
TCA
CCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTCGACATTTAAATT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG**
CCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

(SEQ ID NO:20)

[0418] **표 5.** ITR-nDes-miR155- amiR-DMPK^{204} 서열 주석(5'ITR에서 3'ITR로)(3739 bp)

서열 넘버링	SEQ ID NO	주석
1 ~ 145	43	5' ITR
146 ~ 1283	44	A1AT 스터퍼
1284 ~ 2238	12	nDes 프로모터(아래에 세부 사항)
1284 ~ 1642	21	Byrne 인핸서
1643 ~ 1648	n/a	Kpn1 제한효소 부위
1647 ~ 1923	22	Paulin 인핸서
1923 ~ 1928	n/a	HindIII 제한효소 부위
1929 ~ 1934	n/a	PstI 제한효소 부위
1929 ~ 2238	23	Paulin 프로모터
2268 ~ 2578	45	토끼 B글로빈 인트론의 5' 아암
2579 ~ 2584	n/a	BamH1 제한효소 부위
2585 ~ 2611	46	5'miR155 측면 서열
2612	n/a	Invitrogen Block-IT 키트로부터의 추가 염기
2613 ~ 2633	4	DMPK^{204} miRNA 가이드
2634 ~ 2652	6	miR155 말단 루프
2653 ~ 2671	5	DMPK^{204} miRNA 패신저
2672 ~ 2674		Invitrogen Block-IT 키트로부터의 추가 염기
2675 ~ 2716	41	3'miR155 측면 서열
2717 ~ 2722	n/a	Xho1 제한효소 부위
2723 ~ 3005	47	토끼 B글로빈 인트론의 3' 아암
3011 ~ 3196	16	minBGH 폴리A
3197 ~ 3594	48	A1AT 스터퍼
3595 ~ 3739	49	3'ITR

[0419]

[0420] 합성된 nDes-miR155-204 단편의 서열:

AGATCTCCATGGCACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGT
TTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGG
AGA
TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGA
GTA
GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTG
GGA
GCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAA
CTT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATG
CGT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGT
TGA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGA
ATC
AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATA
GCA
ATTGGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCC
GTC
ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCAC
GGC
CACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTG
ATG
TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGC
CGG
CCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAG
GCG

[0421]

CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTC
ATG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGC
ATG
GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTC
TTT
TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGT
TTA
TTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATTCGGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCG
AAG
ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGT
TAC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTT
TAG
AGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAA
TAT
TCTTATTGGTAGAAACAACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATA
CAC
TGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTC
TTC
TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCC
CCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATC
GCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCGCATGCGTCGACT **(SEQ ID NO: 26)**

[0422]

[0423] 폴리A에 대한 nDes-miR155-204 프로모터

CACCCATGCCTCCTCAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTC
CCAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGA
TGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTA
GGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGA
GCGCACATAGCAATTGGAAACTGAAAGCTTATCAGACCCTTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTT
GAGGCCCCACCCTCGAGGTACCCCCTGCCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCCAGCCATGCGT
TCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGA
CATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATC
AGGGAGGGGGCGGGGGACCCAGGGGGCAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCA
ATTGGAAACTGAAAGCTTCTGCAGACCTGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTC
ACAGGACCCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTCTTGCGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCACGGC
CACGGGCCGCCCTTTCCTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCAGCTGTCAGGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATG
TCAGGAGGGATACAAATAGTGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGG
CCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGGAGCTCTGAGTAGACGAAGCTAAGGCG
CGCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAATTCATG
TTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGCATG
GACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTT
TCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGTTTA
TTTGTCAGATTGTAAGATCCCATCGATTCGGATCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGAAG
ACAGTTCTAGGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCCTAGATGTCTTCGATTCAGGACACAAGGCCTGTTAC
TAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCTCGAGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAG
AGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATAT
TCTTATTGGTAGAAACAACTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACAC
TGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTC
TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGACCGGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGC

[0424] **(SEQ ID NO: 17)**

[0425] AAVrh74 변이체의 아미노산 서열(WO 2019178412)

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
            20                  25                  30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
        115                 120                 125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145                 150                 155                 160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
                165                 170                 175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
            180                 185                 190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
        195                 200                 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
    210                 215                 220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225                 230                 235                 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
                245                 250                 255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
            260                 265                 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
        275                 280                 285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
    290                 295                 300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305                 310                 315                 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
                325                 330                 335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
            340                 345                 350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
        355                 360                 365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
    370                 375                 380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385                 390                 395                 400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
                405                 410                 415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
            420                 425                 430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
        435                 440                 445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
    450                 455                 460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
465                 470                 475                 480
```

[0426]

```
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
                485                 490                 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
            500                 505                 510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
        515                 520                 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
    530                 535                 540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545                 550                 555                 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
                565                 570                 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Tyr Ile
            580                 585                 590
Gly Ser Arg Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
        595                 600                 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
    610                 615                 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625                 630                 635                 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
                645                 650                 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
            660                 665                 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
        675                 680                 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
    690                 695                 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705                 710                 715                 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
                725                 730                 735

Asn Leu (SEQ ID NO:39)
```

[0427]

[0428] AAVrh74N502I의 아미노산 서열

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFN
GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNL
GRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLN
FGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHC
DSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRF
HCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAG
PNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSIFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAM
ATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVAD
NLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGL
KHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQY
TSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 50)

[0429]

[0430] AAVrh74 N502I 캡시드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT
CGCGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA
GCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACG

[0431]

ACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAAT
CACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAAC
CTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTT
GAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA
GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAA
AGAGACTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAA
TCGGAGAACCACCAGCAGGCCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCG
GTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCA
GGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACC
CGCACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGG
ACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGG
GTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC
ATCAACAACAACTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC
CAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTAC
CAGCACGATTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTC
GGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGTA
CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCGTCCTTCTACTG
CCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACTTTGAATTCAGCTA
CAACTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACC
GGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
CGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCCTAACAACA
TGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCT
CCACGACACTGTCGCAGAACAACAACAGCATCTTTGCCTGGACGGGTGCCACCAAGT
ATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACA
AGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGG
GAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGAA
ATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACCT
GCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTACC
TGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGA
TTCCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGA
AGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGA
CCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAGG
TCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCA
GAGATTCAGTACACTTCCAACTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAAT
ACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATC
TGTAA (**SEQ ID NO: 51**)

[0432]

[0433] AAVrh74W505R의 아미노산 서열

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFN
GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNL
GRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLN
FGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHC
DSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRF
HCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAG
PNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFARTGATKYHLNGRDSLVNPGVAM
ATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVAD
NLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGL

[0434]

KHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQY
TSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL (**SEQ ID NO: 52**)

[0435]

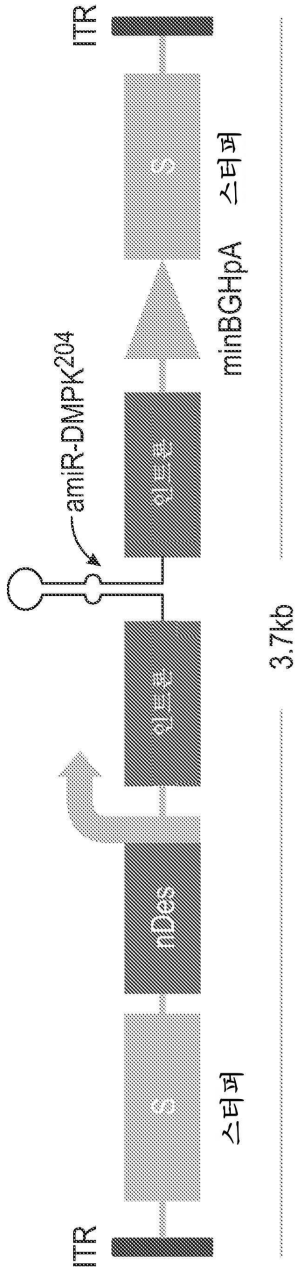
[0436] AAVrh74W505R을 코딩하는 뉴클레오티드 서열:

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT
CGCGAGTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA
GCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACG
ACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAAT
CACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAAC
CTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGGGCCTGGTT
GAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA
GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAA
AGAGACTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAA
TCGGAGAACCACCAGCAGGCCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCG
GTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCA
GGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACC
CGCACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGG
ACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGG
GTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC
ATCAACAACAACTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC
CAAGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTAC
CAGCACGATTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTC
GGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGTA
CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCGTCCTTCTACTG
CCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACTTTGAATTCAGCTA
CAACTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACC
GGCTGATGAACCCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
CGGGCGGTACTGCAGGAACTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCCTAACAACA
TGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCT
CCACGACACTGTCGCAGAACAACAACAGCAACTTTGCCAGGACGGGTGCCACCAAG
TATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCAC
AAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAG
GGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGA
AATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACC
TGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTAC
CTGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAG
ATTCCTCATACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTG
AAGCATCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCG
ACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAG
GTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCC
AGAGATTCAGTACACTTCCAACTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAA
TACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAAT
CTGTAA (**SEQ ID NO: 53**)

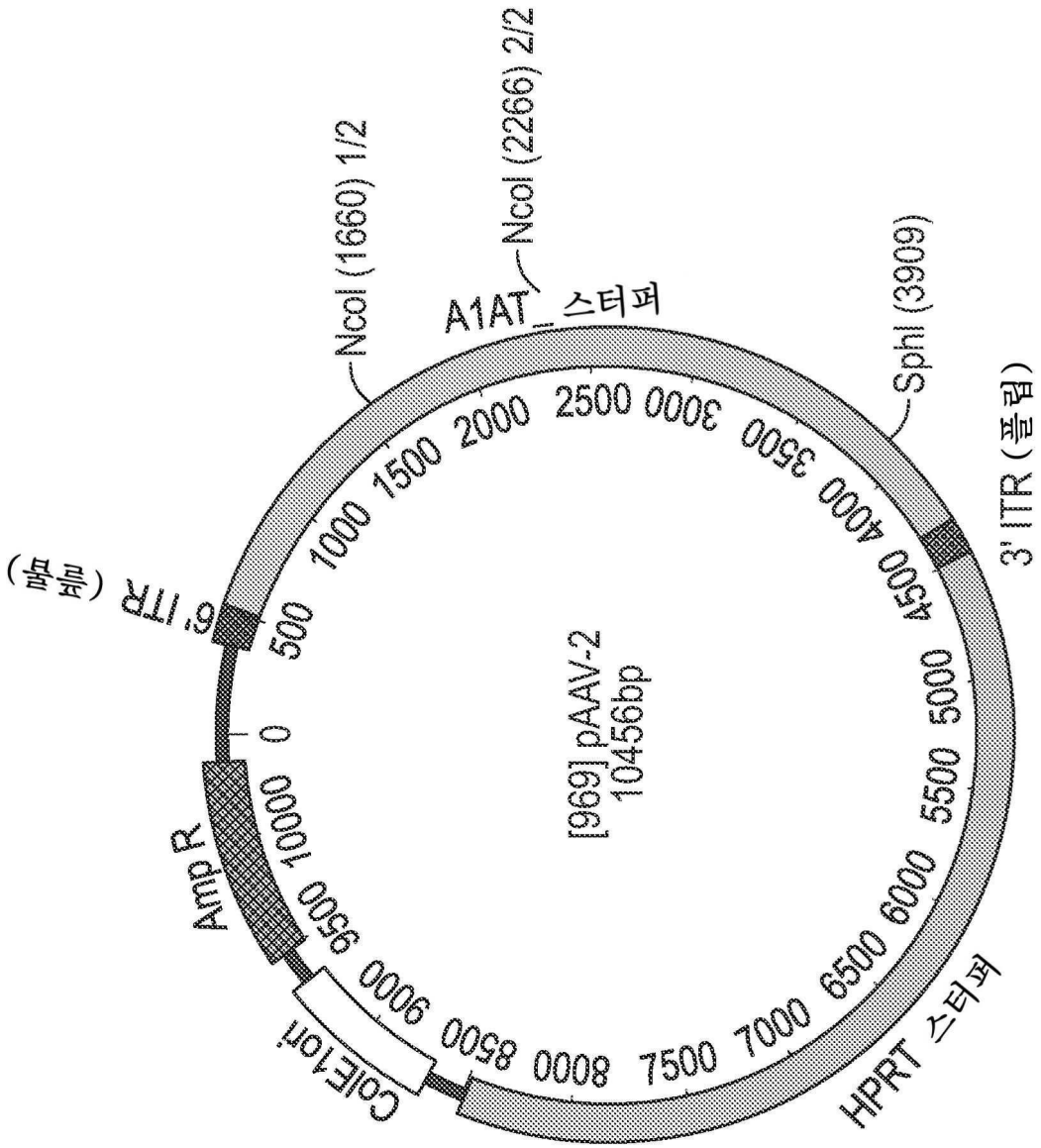
[0437]

도면

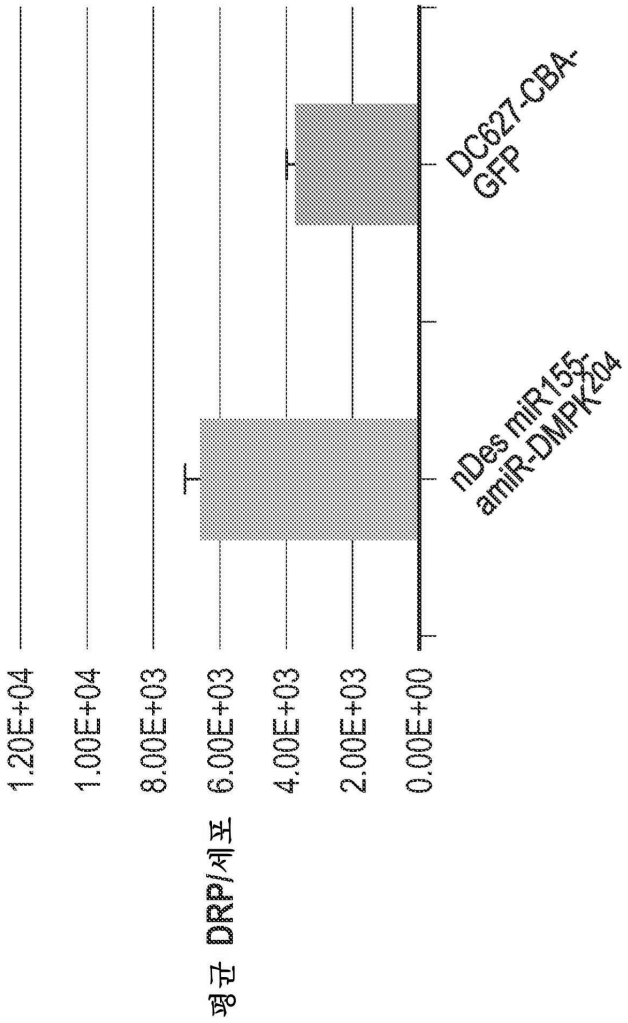
도면1a



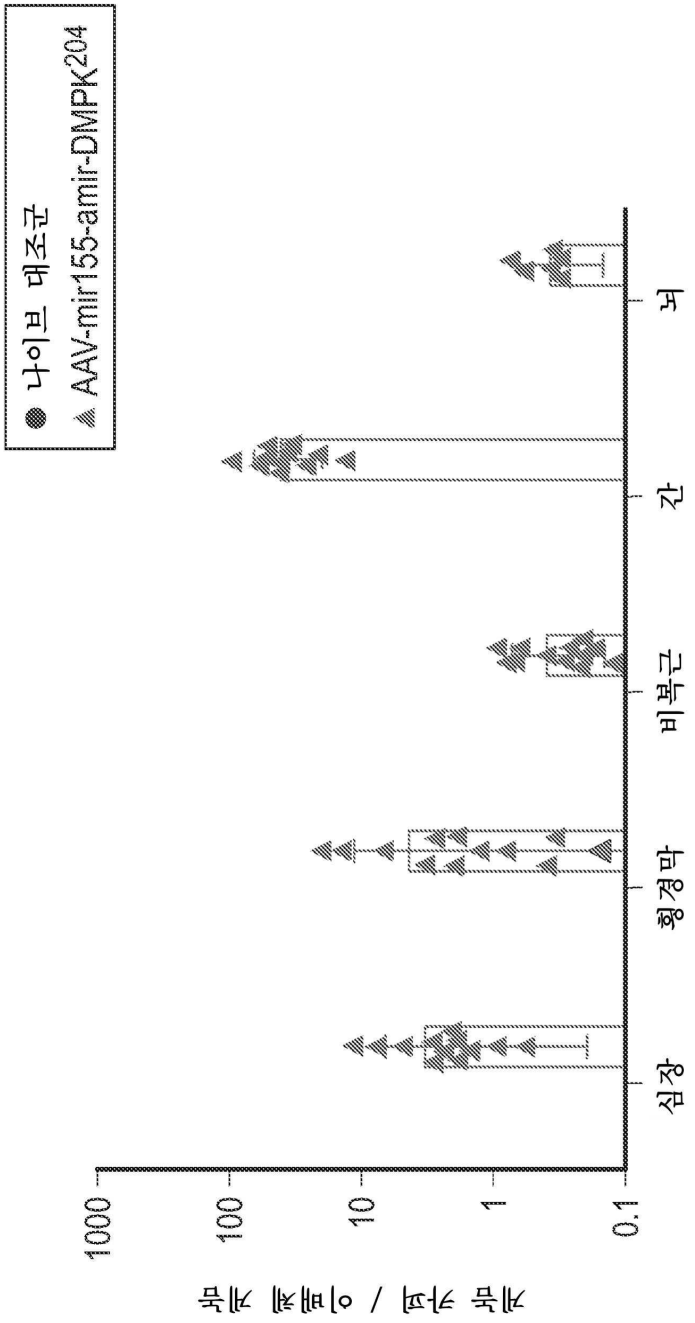
도면1b


NcoI (1660) 1/2
NcoI (2266) 2/2
A1AT_스터퍼
SphI (3909)
3' ITR (플립)
5' ITR (플롭)
[969] pAAV-2
10456bp
Amp R
ColE1ori
HPRT 스터퍼
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500
6000
6500
7000
7500
8000
8500
9000
9500
10000

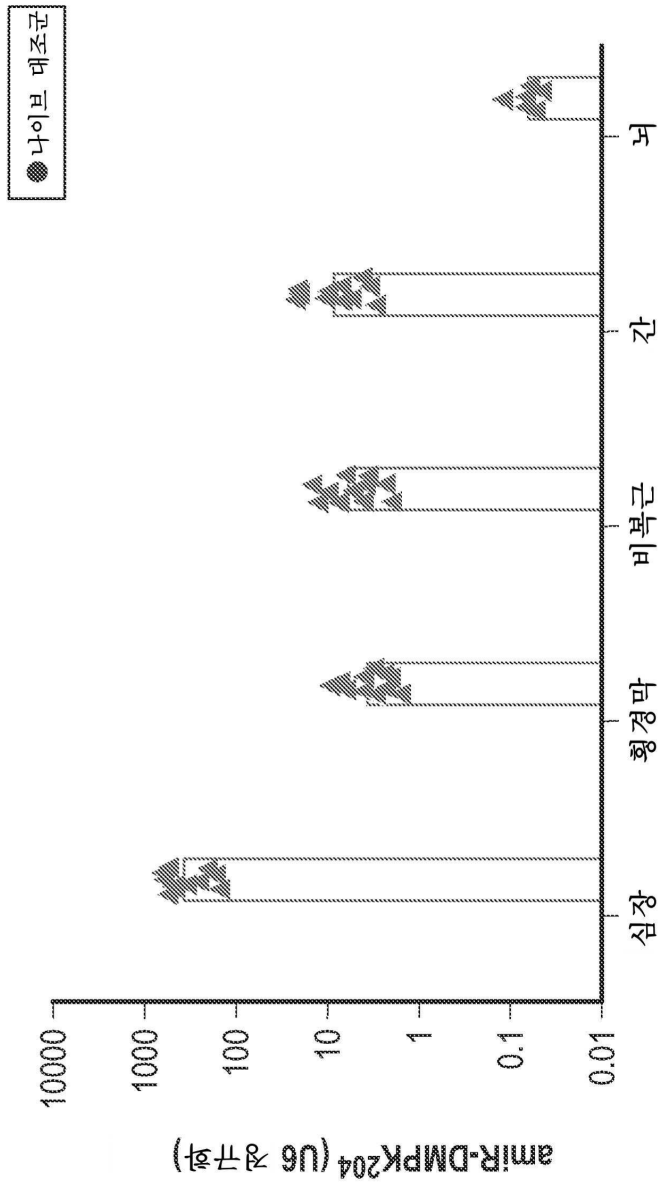
도면1c


1.20E+04
1.00E+04
8.00E+03
6.00E+03
4.00E+03
2.00E+03
0.00E+00
평균 DRP/세포
DC627-CBA-GFP
nDes miR155-amiR-DMPK204

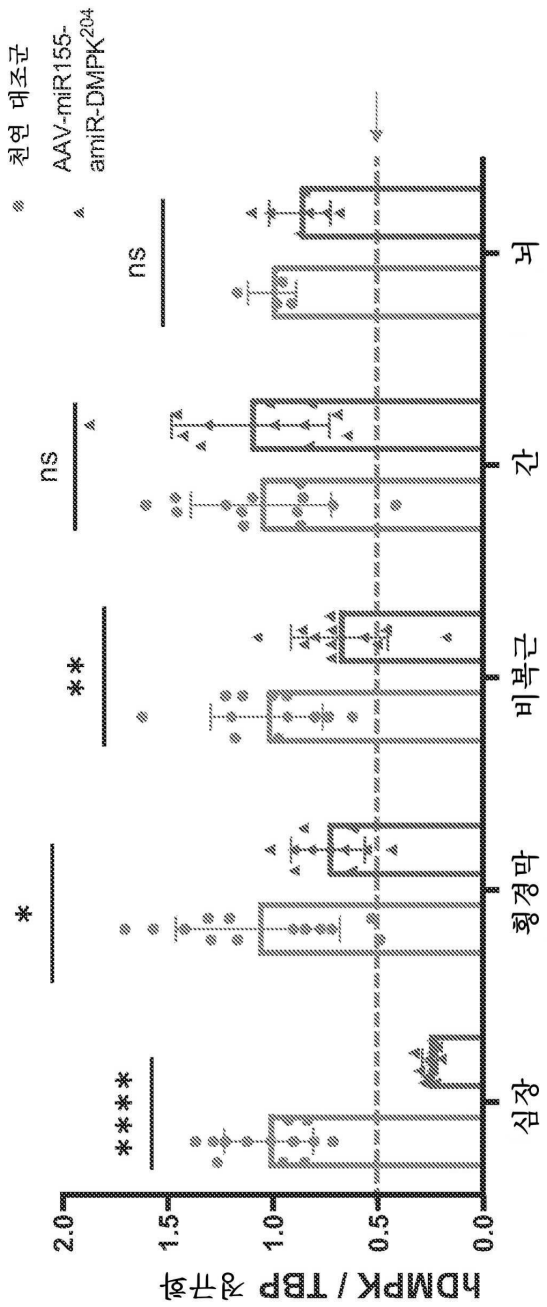
도면2a


● 나이브 대조군
▲ AAV-mir155-amir-DMPK204
게놈 카피 / 이배체 게놈
1000
100
10
1
0.1
심장
횡경막
비복근
간
뇌

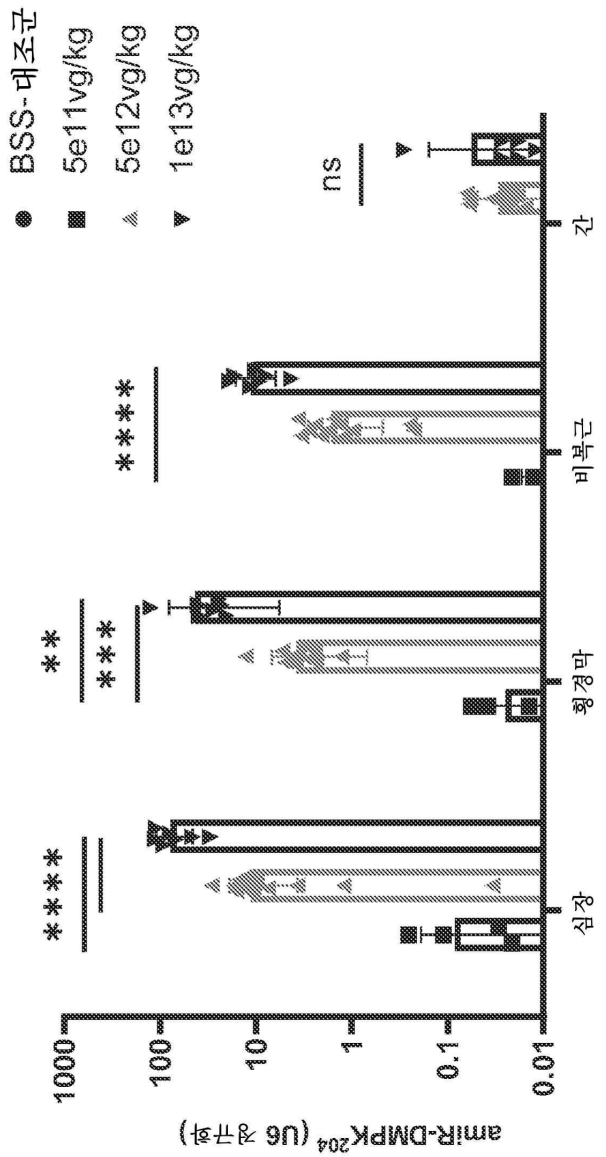
도면2b


나이브 대조군
amiR-DMPK204 (U6 정규화)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
심장
횡경막
비복근
간
뇌

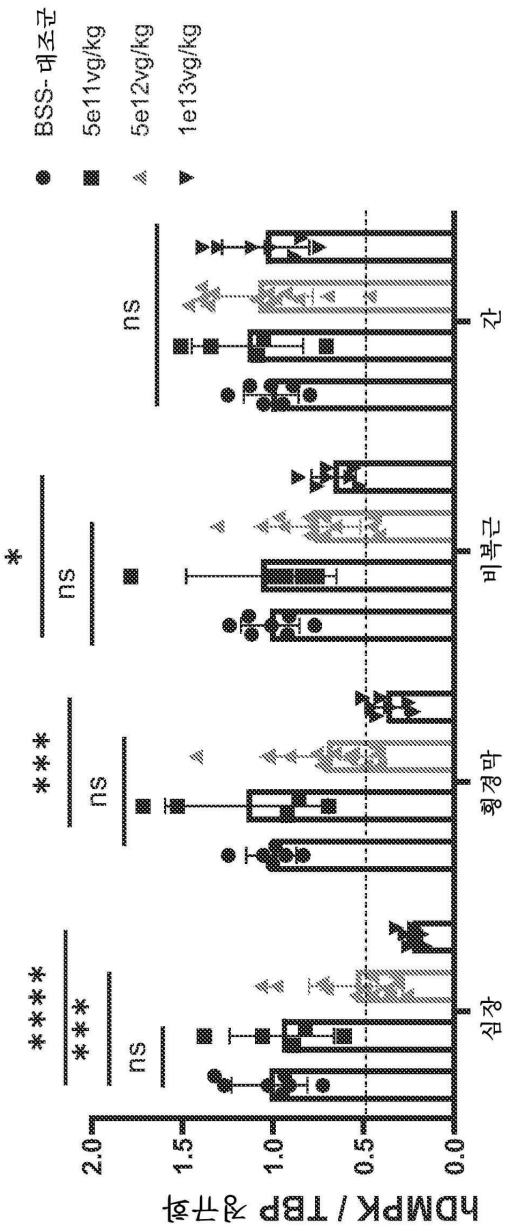
도면2c


천연 대조군
AAV-miR155-amiR-DMPK204
hDMPK / TBP 정규화
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
*
**
ns
ns
심장
횡경막
비복근
간
뇌

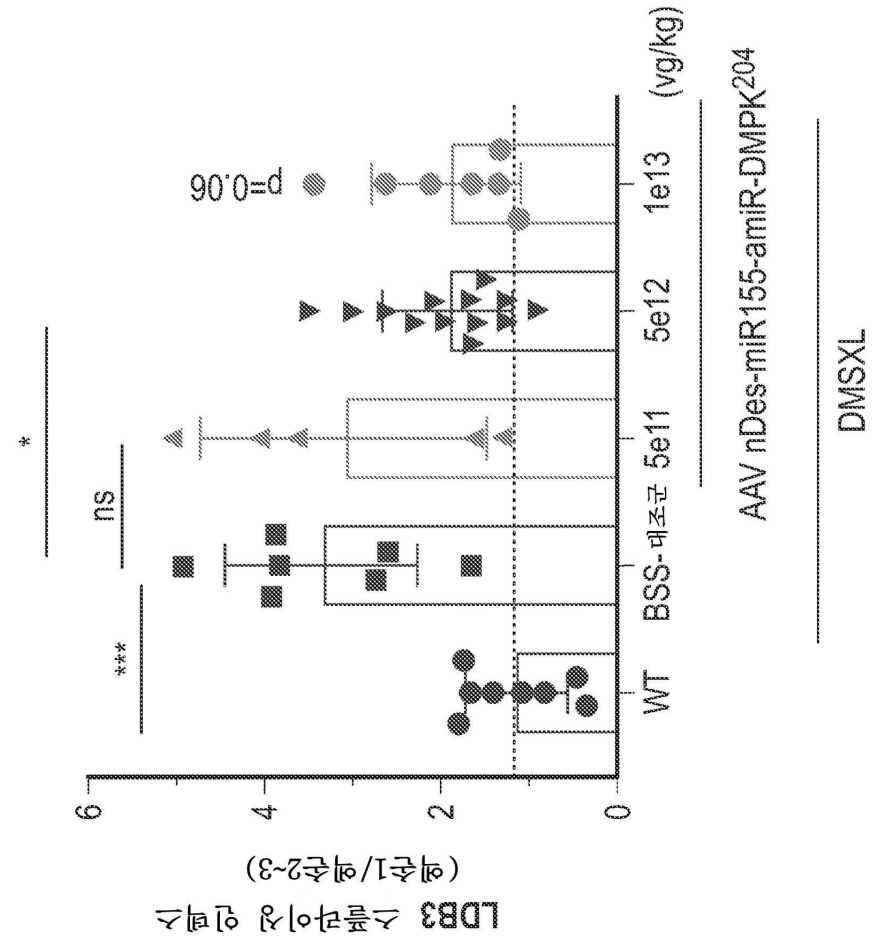
도면3a


BSS-대조군
5e11vg/kg
5e12vg/kg
1e13vg/kg
amiR-DMPK204 (U6 정규화)
1000
100
10
1
0.1
0.01
****
**
***
****
ns
심장
횡경막
비복근
간

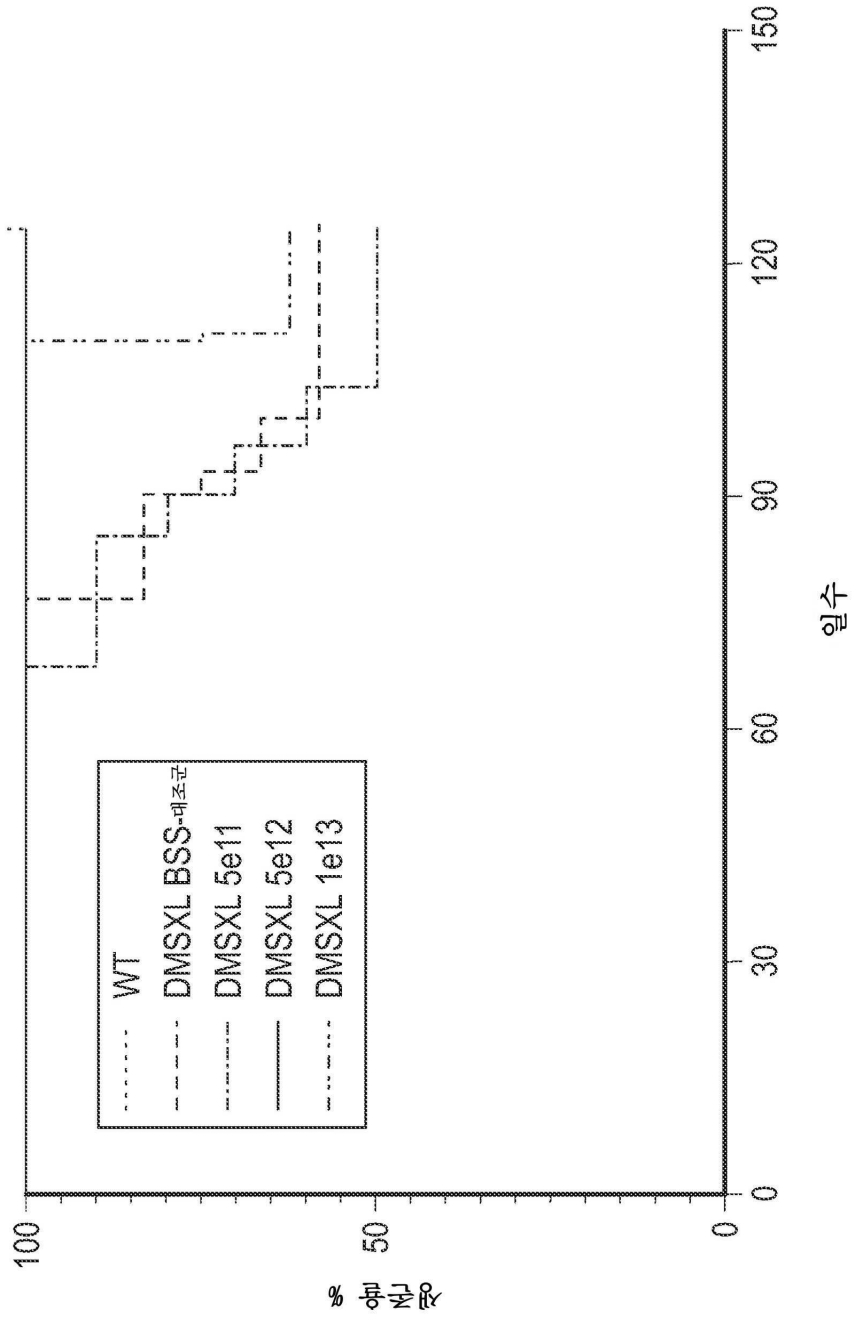
도면3b


BSS- 대조군
5e11vg/kg
5e12vg/kg
1e13vg/kg
hDMPK / TBP 정규화
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
***
ns
***
ns
*
ns
ns
심장
횡경막
비복근
간

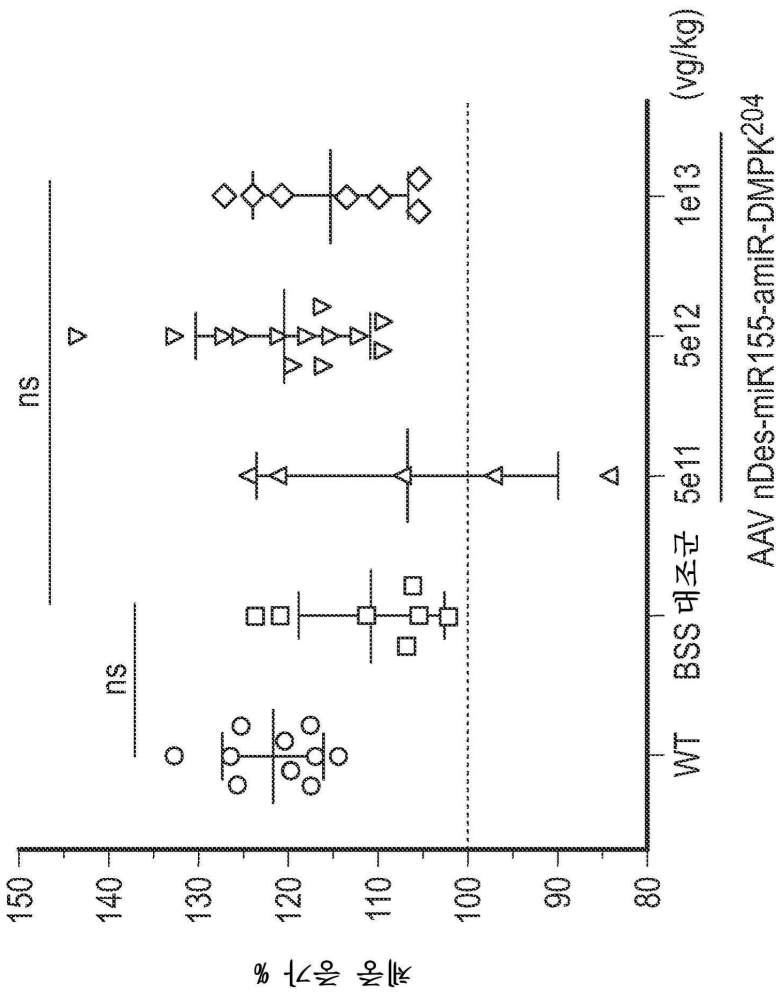
도면4


LDB3 스플라이싱 인덱스
(엑손1/엑손2~3)
0
2
4
6
WT
BSS-대조군
5e11
5e12
1e13
(vg/kg)
AAV nDes-miR155-amiR-DMPK204
DMSXL
p=0.06
ns
***
*

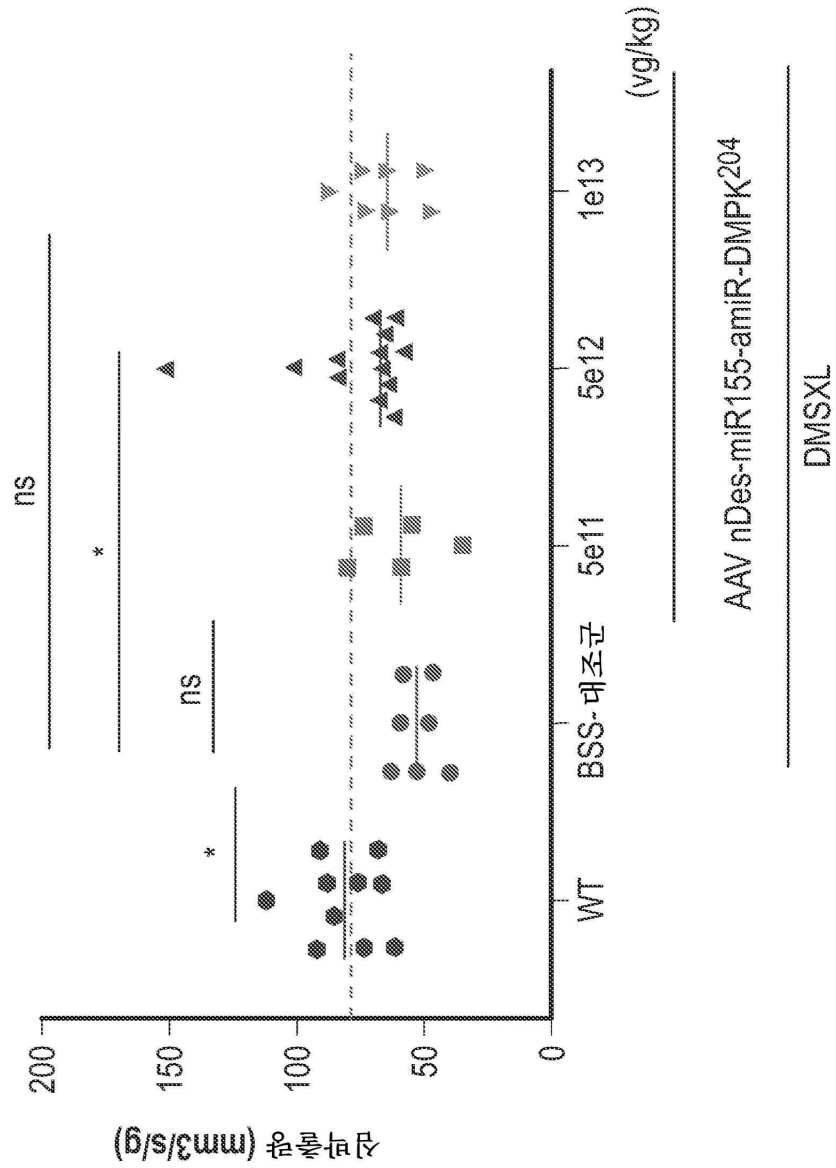
도면5a


WT
DMSXL BSS-대조군
DMSXL 5e11
DMSXL 5e12
DMSXL 1e13
생존율 %
100
50
0
0
30
60
90
120
150
일수

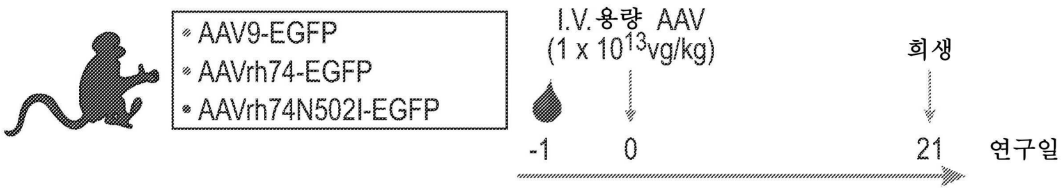
도면5b


150
140
130
120
110
100
90
80
% 악력 개선
ns
ns
WT
BSS 대조군
5e11
5e12
1e13
(vg/kg)
AAV nDes-miR155-amiR-DMPK204

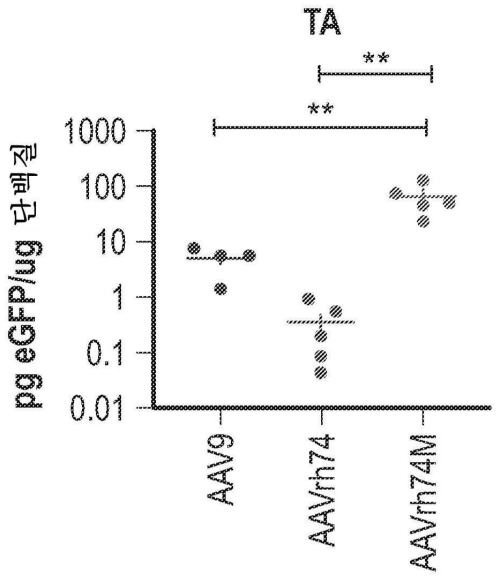
도면6


심박출량 (mm3/s/g)
200
150
100
50
0
WT
BSS-대조군
5e11
5e12
1e13
(vg/kg)
AAV nDes-miR155-amiR-DMPK204
DMSXL
ns
*
ns
*

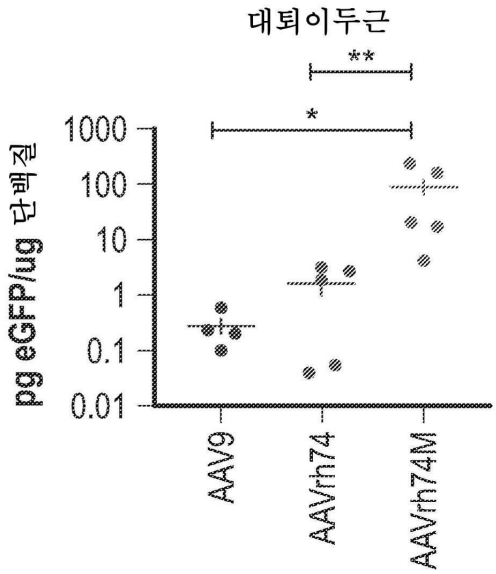
도면7a


AAV9-EGFP
AAVrh74-EGFP
AAVrh74N502I-EGFP
I.V.용량 AAV
(1 x 10^13vg/kg)
희생
-1
0
21
연구일

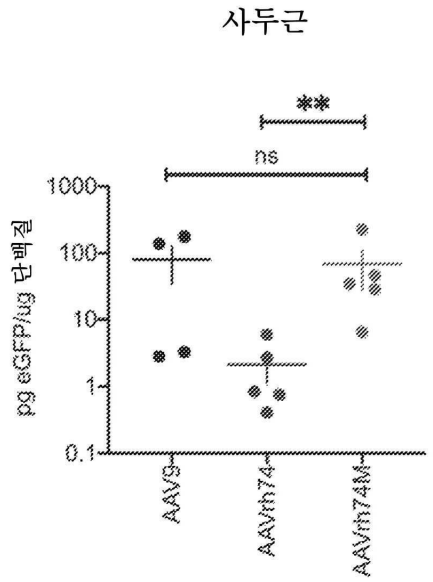
도면7b


TA
**
**
pg eGFP/ug 단백질
1000
100
10
1
0.1
0.01
AAV9
AAVrh74
AAVrh74M

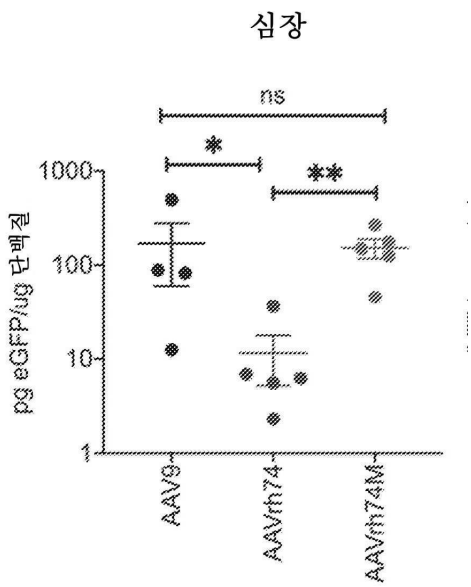
도면7c


대퇴이두근
**
*
pg eGFP/ug 단백질
1000
100
10
1
0.1
0.01
AAV9
AAVrh74
AAVrh74M

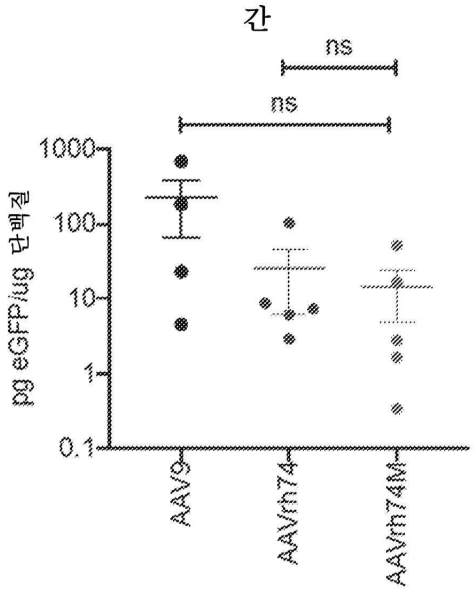
도면7d


사두근
**
ns
1000
100
10
1
0.1
pg eGFP/ug 단백질
AAV9
AAVrh74
AAVrh74M

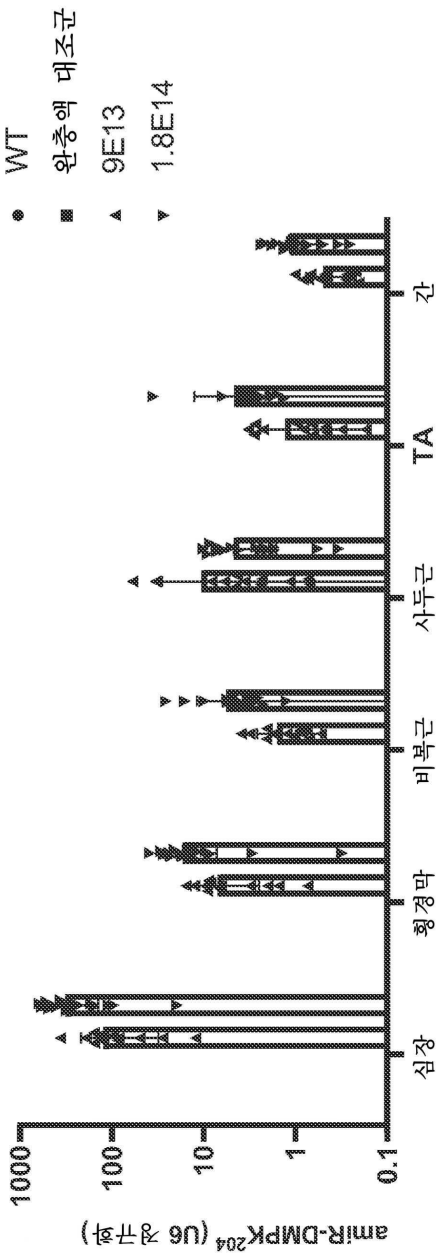
도면7e


심장
ns
*
**
1000
100
10
1
pg eGFP/ug 단백질
AAV9
AAVrh74
AAVrh74M

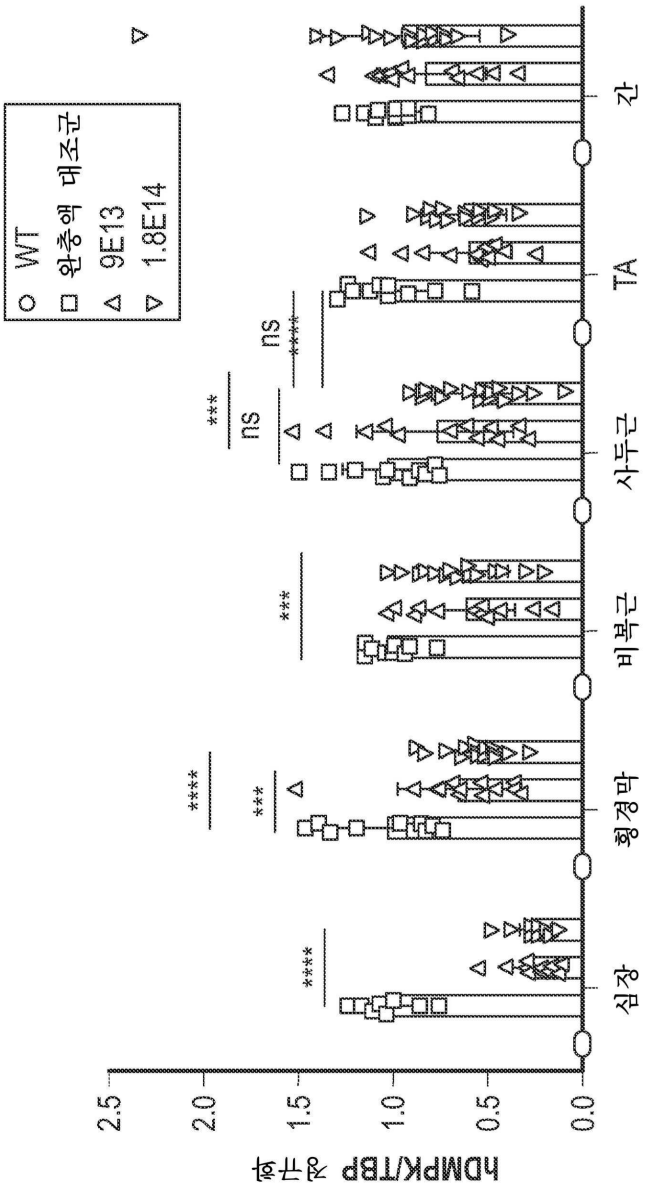
도면7f



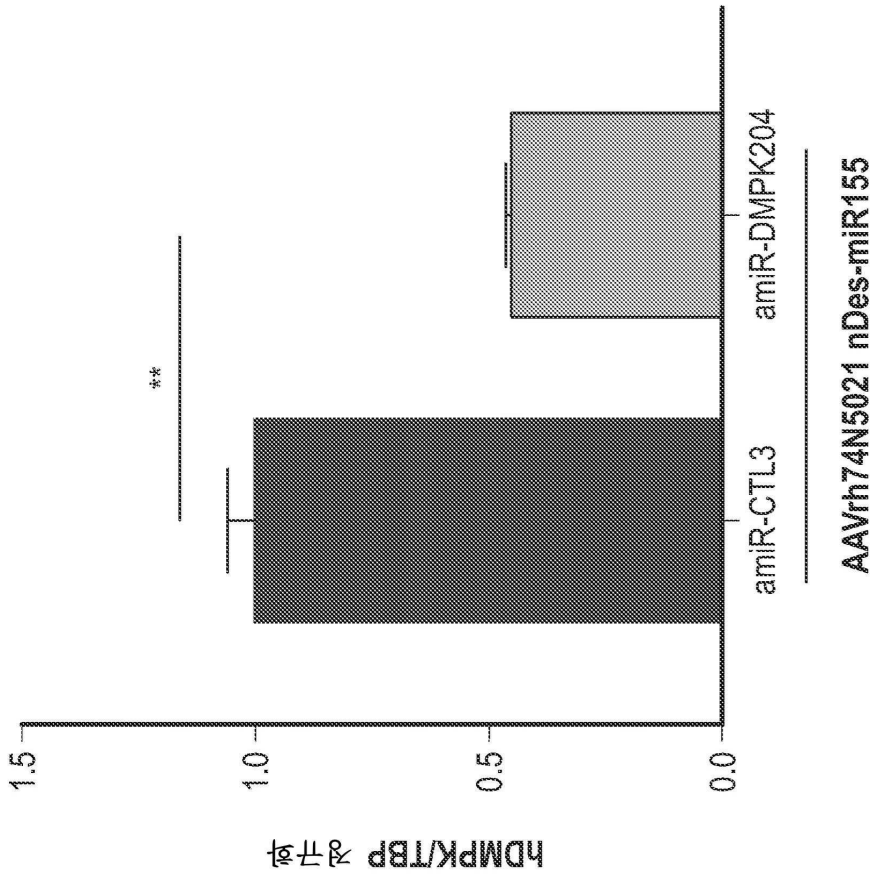
도면8a


WT
완충액 대조군
9E13
1.8E14
amiR-DMPK204 (U6 정규화)
1000
100
10
1
0.1
심장
횡경막
비복근
사두근
TA
간

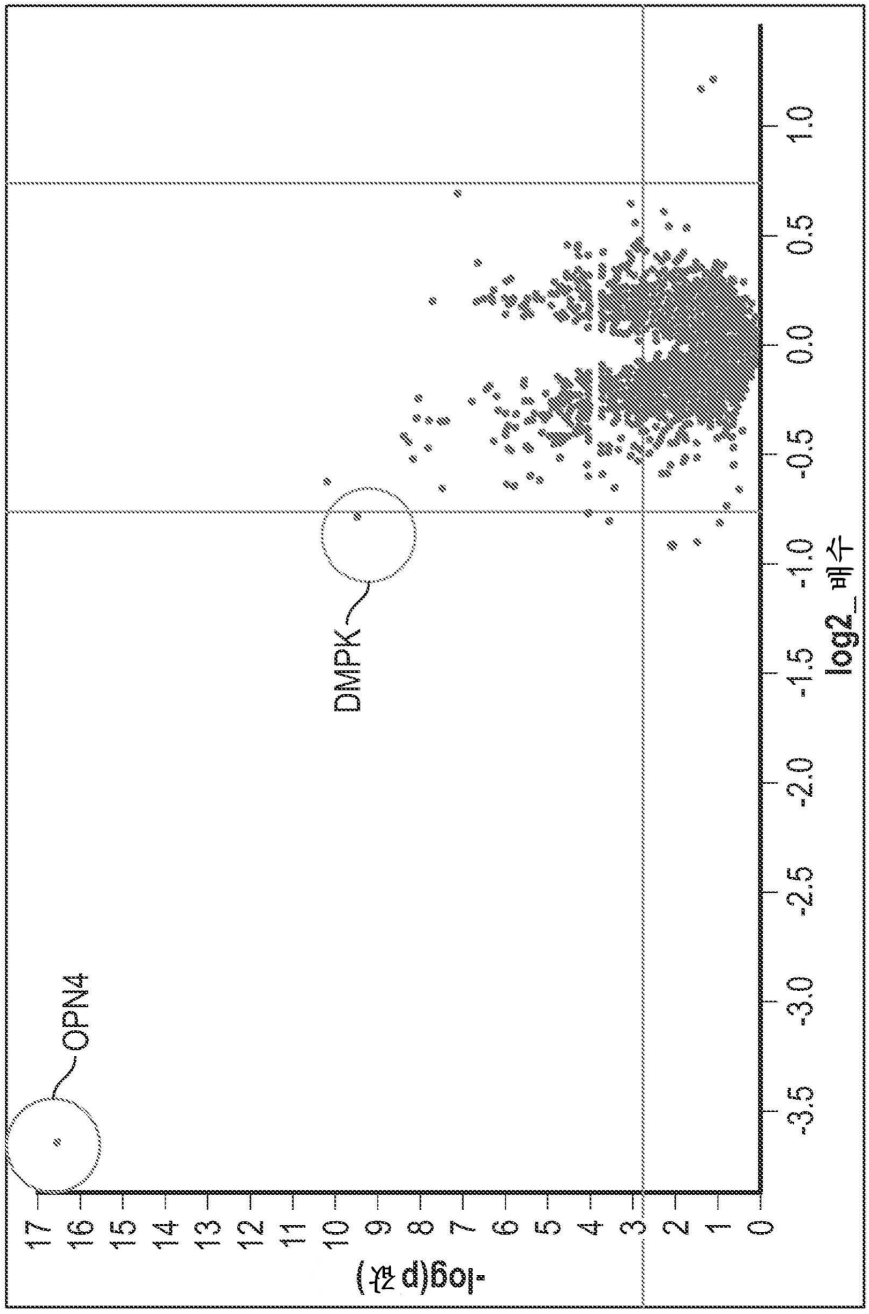
도면8b


WT
완충액 대조군
9E13
1.8E14
hDMPK/TBP 정규화
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
심장
횡경막
비복근
사두근
TA
간
****
***
***
ns
***
ns
****

도면9


hDMPK/TBP 정규화
1.5
1.0
0.5
0.0
**
amiR-CTL3
amiR-DMPK204
AAVrh74N5021 nDes-miR155

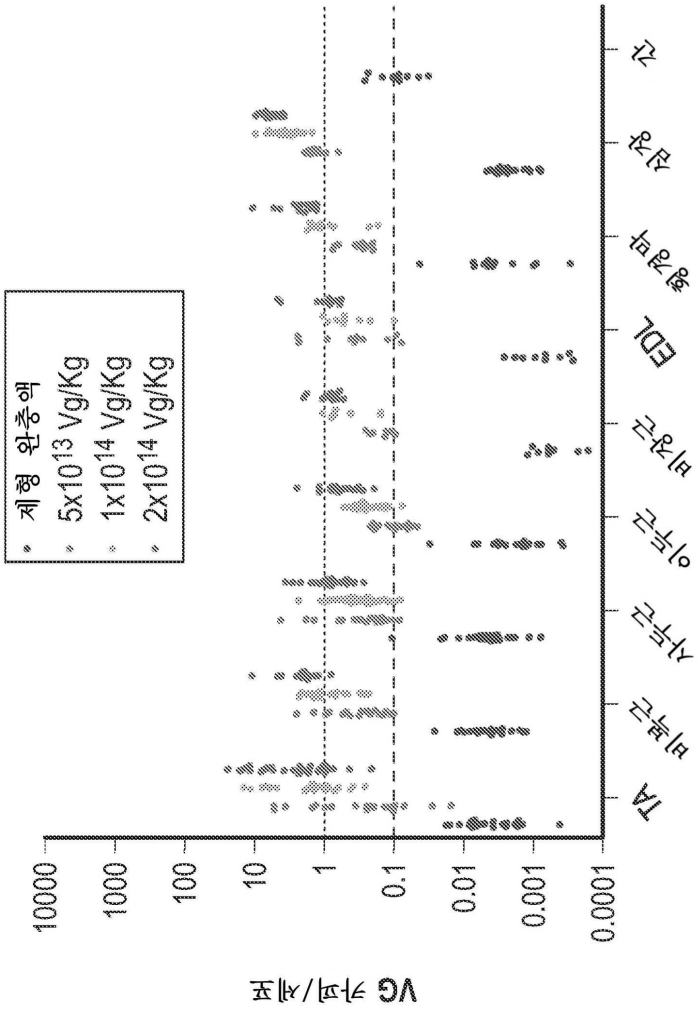
도면10


OPN4
DMPK
-log(p값)
log2_배수
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-3.5
-3.0
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0

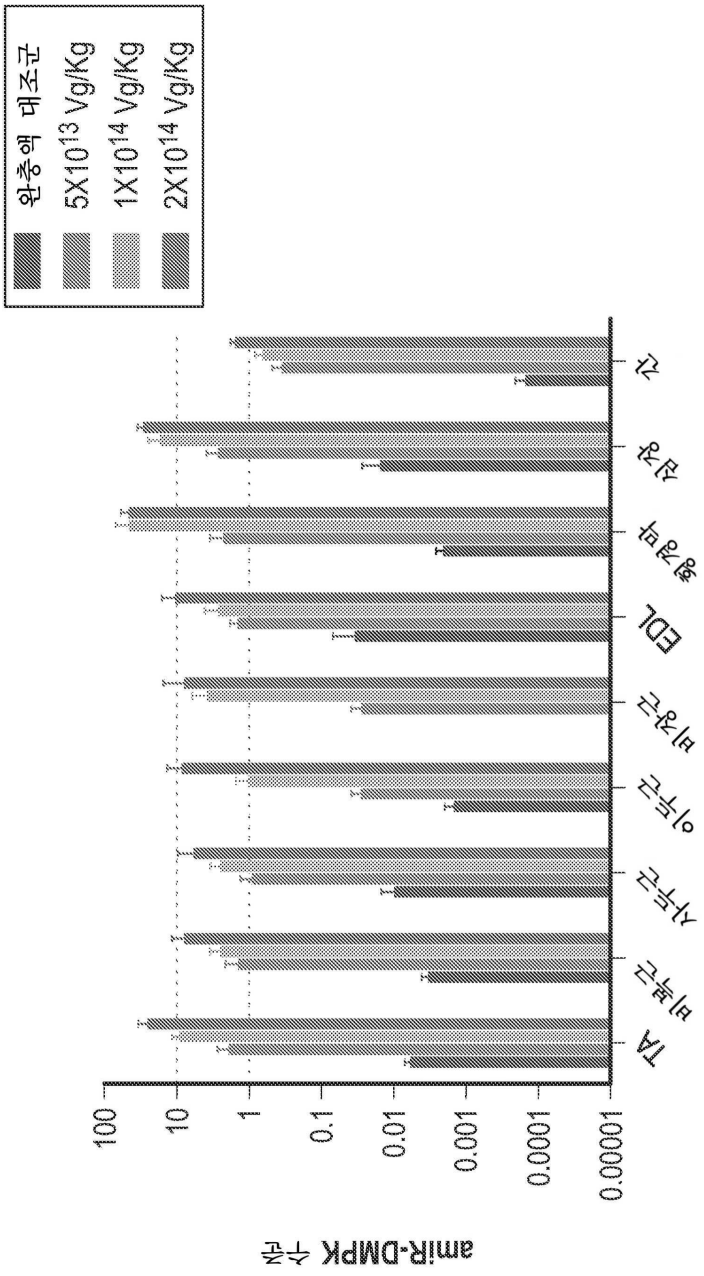
도면11

DNA	
표적 서열(인간)	ACCCTAGAACTGTCTTCGACT
표적 서열(마카크)	ACCCTAGAACTGTCTTCGACT
표적 서열(마우스)	ACCCTAAGACTCCAAGCCATC
표적 서열(래트)	ACCCTAAGACTCCAAGCCATT
표적 서열(개)	ACCCTAGAGCCCCAAGCCGGA

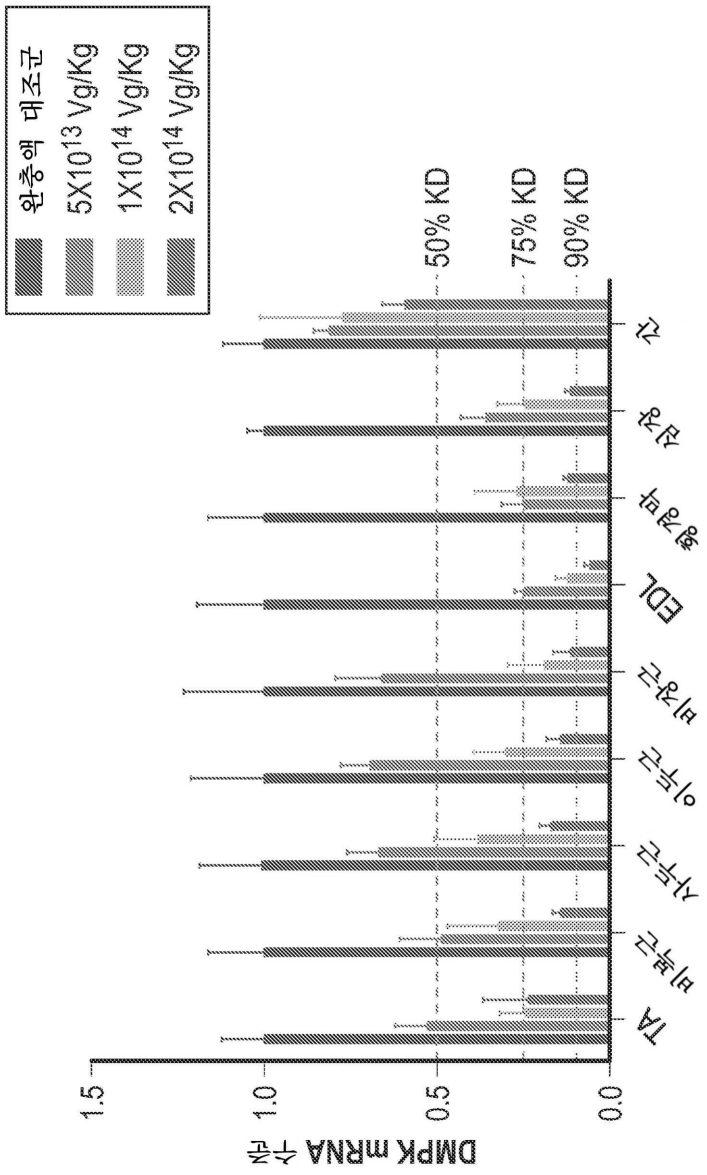
도면12



도면13


완충액 대조군
5X10^13 Vg/Kg
1X10^14 Vg/Kg
2X10^14 Vg/Kg
amiR-DMPK 수준
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
TA
비늑근
사두근
어두근
비장근
EDL
횡경막
심장
간

도면14


완충액 대조군
5X10^13 Vg/Kg
1X10^14 Vg/Kg
2X10^14 Vg/Kg
50% KD
75% KD
90% KD
DMPK mRNA 수준
1.5
1.0
0.5
0.0
TA
비복근
자뇌근
어뇌근
비장근
EDL
횡경막
심장
간

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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