



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월30일

(11) 등록번호 10-2380324

(24) 등록일자 2022년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/18 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01) A61K 38/54 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)

A61K 38/1709 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2016-7031778

(22) 출원일자(국제) 2015년05월07일

심사청구일자 2020년02월25일

(85) 번역문제출일자 2016년11월14일

(65) 공개번호 10-2017-0005811

(43) 공개일자 2017년01월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/029748

(87) 국제공개번호 WO 2015/171932

국제공개일자 2015년11월12일

(30) 우선권주장

61/990,521 2014년05월08일 미국(US)

62/051,724 2014년09월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20130253040 A1*

US20130336947 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 94005 브리즈번 마리나 불러바드 7000

씨에이치디아이 파운데이션, 인코포레이티드

미합중국 뉴욕 10001 뉴욕 세븐쓰 애비뉴 350, 스위트 200

(72) 발명자

프릴리히 스티븐

미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커널 불러바드 501 상가모 바이오사이언스 인코포레이티드 내

곽 승

미국 뉴욕 10001 뉴욕 스위트 601 세븐쓰 애비뉴 350 씨에이치디아이 파운데이션 인코포레이티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 7 항

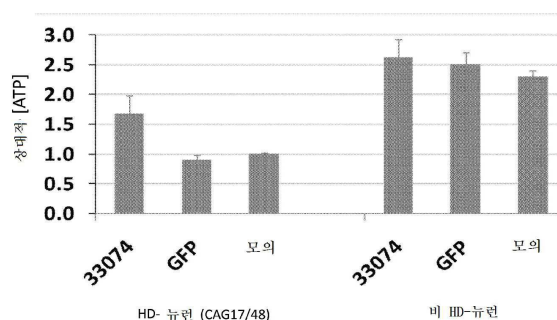
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 헌팅턴병을 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

헌팅턴병(HD)을 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물이 개시된다. 구체적으로, HD를 지니는 대상체에서 헌팅틴(Htt) 응집물을 감소 및/또는 제거하고/하거나 운동결핍을 개선시키고/시키거나, 세포의 활성(예를 들어, ATP 생성)을 증가시키고/시키거나, 세포자멸사를 감소시키는 방법 및 조성물이 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 돌연변이체 Htt(mHtt) 대립유전자의 리프레서를 투여하는 단계를 포함한다. 추가로, 대상체에서 HD의 진단 방법 및/또는 mHtt를 검출하는 단계를 포함하는 질환 진행의 모니터링 방법이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/465 (2013.01)

A61K 38/54 (2013.01)

A61K 48/005 (2013.01)

(72) 발명자

무뇨즈-산후안 이그나시오

미국 뉴욕 10001 뉴욕 스위트 601 세븐쓰 애비뉴
350 씨에이치디아이 파운데이션 인코포레이티드 내

장 에이치. 스티브

미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100
커넬 불러바드 501 상가모 바이오사이언스 인코포
레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 뉴런에서 헌팅틴(Htt) 응집물의 형성을 방지하거나 감소시킴으로써 대상체에서 헌팅턴병(HD)을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,

여기서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함하고 돌연변이체 Htt(mHtt) 대립유전자의 리프레서(repressor)를 암호화하고, 상기 리프레서는

- (i) F1: QSSDLR of SEQ ID NO:18,
F2: QWSTRKR of SEQ ID NO:65,
F3: QSSDLR of SEQ ID NO:18,
F4: QWSTRKR of SEQ ID NO:65, 및
F5: QSGDLTR of SEQ ID NO:28;
- (2) F1: RSDNLSE of SEQ ID NO:9,
F2: KRCNLRC of SEQ ID NO:10,
F3: QSSDLR of SEQ ID NO:18,
F4: QWSTRKR of SEQ ID NO:65, 및
F5: QSGDLTR of SEQ ID NO:28; 또는
- (3) F1: RSDNLSE of SEQ ID NO:9,
F2: KRCNLRC of SEQ ID NO:10,
F3: QSGDLTR of SEQ ID NO:28,
F4: QSGDLTR of SEQ ID NO:28,
F5: RSDNLSE of SEQ ID NO:9, 및
F6: KRCNLRC of SEQ ID NO:10

으로 이루어진 펩터를 갖는 Htt-표적화된 아연 펩터 단백질을 포함하고,

상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 대상체의 선조체(striatum)에 2×10^{10} 벡터 게놈 이상 투여되고, 상기 리프레서의 발현은 인간 시냅신(Synapsin) I 프로모터에 의해 유발되는, 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 뉴런에서 세포 활성이 증가되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2 항에 있어서, 세포 내 ATP 수준이 증가되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1 항에 있어서, 상기 뉴런에서 세포자멸사가 감소되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1 항에 있어서 상기 대상체에서 운동결핍이 감소되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5 항에 있어서, 상기 운동결핍은 움켜잡기(clasping)을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리프레서는 mHtt 발현을 85% 이상 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호참조

[0002]

본 출원은 2014년 5월 8일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/990,521호 및 2014년 9월 17일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/051,724호의 유익을 주장하며, 이들 기초출원의 개시내용은 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 헌팅턴병에 대한 진단 및 치료 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

헌팅턴 무도병으로서도 알려진 헌팅턴병(HD)은 진행성 운동장애, 인지 및 정신의학적 장애이다. 약 10%의 사례에서, 21세 이전에 발병되기는 하지만, 이 질환의 평균 연령은 35 내지 44세이고, 질환의 진단 후 평균 수명은

15 내지 18년이다. 유병률은 서유럽 혈통의 100,000명의 사람 중에서 약 3 내지 7명이다.

- [0006] 헌팅틴병은 1990년대 초에 처음 특성규명된 트라이뉴클레오타이드 반복부 확장 장애의 예이다(문헌[Di Prospero and Fischbeck (2005) *Nature Reviews Genetics* 6:756-765]). 이들 장애는 3개 뉴클레오타이드 세트의 불안정한 반복부의 극소화된 확장을 수반하며, 확장된 반복부가 존재하는 유전자 기능의 상실, 독성 기능의 획득, 또는 둘 다를 초래할 수 있다. 트라이뉴클레오타이드 반복부는 비암호 및 암호 유전자 영역을 포함하는 유전자의 임의의 부분에 위치될 수 있다. 암호 영역 내에 위치한 반복부는 전형적으로 반복된 글루타민 암호화 트리플렛(triplet)(CAG) 또는 알라닌 암호화 트리플렛(CGA) 중 하나를 수반한다. 비-암호화 서열 내의 확장된 반복부 영역은 유전자의 비정상적 발현을 야기할 수 있는 반면, 암호 영역 내의 확장된 반복부(또한 코돈 반복 장애로서 알려짐)는 미스폴딩 및 단백질 응집을 야기할 수 있다. 비정상 단백질과 관련된 병리생리학의 정확한 원인은 종종 알려져 있지 않다. 전형적으로, 트라이뉴클레오타이드가 확장된 야생형 유전자에서, 이들 영역은 정상 집단에서 가변적 수의 반복부 서열을 함유하지만, 고통받는 집단에서, 반복부의 수는 반복부 수의 2배로부터 대수 규모 증가까지 증가될 수 있다. HD에서, 반복부는 거대 사이토졸 단백질 헌팅틴(Htt)의 N 말단 암호 영역 내에 삽입된다. 정상 Htt 대립유전자는 15 내지 20개의 CAG 반복부를 함유하지만, 35개 이상의 반복부를 함유하는 대립유전자는 대립유전자를 야기하는 잠재적 HD일 수 있으며, 질환이 발생할 위험을 부여한다. 36 내지 39개의 반복부를 함유하는 대립유전자는 불완전 침투제로 고려되며, 해당 대립유전자를 보유하는 해당 개체는 질환이 발생할 수도 있고 또는 발생하지 않을 수도 있는 반면(또는 생애에서 이후에 증상이 발생할 수 있음), 40개 이상의 반복부를 함유하는 대립유전자는 불완전 침투제로 고려된다. 사실, 이런 다수의 반복부를 지니는 HD 대립유전자를 함유하는 무증상 사람은 보고되지 않았다. 청소년 개시 HD(21세 미만)를 지니는 해당 개체는 종종 60개 이상의 CAG 반복부를 갖는 것이 발견된다. CAG 반복부의 증가에 추가로, 또한 상기 영역이 폴리-글루타민보다는 폴리-세린 폴리펩타이드(+1 프레임시프트의 경우에 AGC 반복부에 의해 암호화됨) 트랙을 암호화하도록 HD는 반복부 서열 내에 +1 및 +2개의 프레임시프트(frameshift)를 수반할 수 있다는 것이 나타났다(Davies and Rubinsztein (2006) *Journal of Medical Genetics* 43: 893-896).
- [0007] HD에서, 돌연변이체 Htt 대립유전자는 보통 한 부모로부터 우성 형질로서 유전된다. HD 환자의 임의의 태어난 아이는 다른 부모가 장애로 고통받지 않았다면 질환이 발생할 50%의 가능성을 가진다. 일부 경우에, 부모는 중간 HD 대립유전자를 가지며, 무증상일 수 있는 반면, 반복부 확장에 기인하여 아이는 질환이 분명하게 나타난다. 추가로, HD 대립유전자는 예상으로서 알려진 현상을 나타낼 수 있되, 증가된 증증도 또는 감소된 개시 연령이 정상형성 동안 반복부 영역의 불안정한 특성에 기인하여 몇 세대에 걸쳐 관찰된다.
- [0008] 더 나아가, Htt에서 트라이뉴클레오타이드 확장은 선조체에서 중형 돌기 감마-아미노뷰티르산(GABA) 투사 신경원의 뉴런 상실을 야기하며, 뉴런 상실은 또한 피질에서 일어난다. 엔케팔린을 함유하고 외부 담창구로 돌출된 중형 돌기 뉴런은 물질 P를 함유하고 내부 담창구로 돌출된 뉴런보다 더 많이 수반된다. 헌팅틴병을 지니는 환자에서 크게 영향받는 다른 뇌 영역은 흑질, 피층 3, 5 및 6, 해마의 CA1 영역, 두정엽 내 각회, 소뇌의 푸르키네 세포, 시상하부의 가쪽융기핵 및 시상의 중심정중 다발핵 복합체를 포함한다(Walker (2007) *Lancet* 369:218-228).
- [0009] 정상 Htt 단백질의 역할은 불량하게 이해되지만, 신경발생, 세포자멸사, 및 소수포 수송에 연루될 수 있다. 추가로, 야생형 Htt는 뇌유래 신경 영양 인자(brain-derived neurotrophic factor: BDNF)의 생성, 선조 신경원에 대한 프로-생존 인자(pro-survival factor)를 자극한다는 증거가 있다. HD의 진행은 HD의 마우스 모델에서 BDNF 발현 감소와 상관관계가 있으며(Zuccato *et al* (2005) *Pharmacological Research* 52(2): 133-139), 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터-매개 유전자 전달을 통한 BDNF 또는 신경교세포주-유래 신경 영양 인자(GDNF) 중 하나의 전달은 HD의 마우스 모델에서 선조 신경원을 보호할 수 있는 것으로 나타났다(Kells *et al*, (2004) *Molecular Therapy* 9(5): 682-688).
- [0010] HD에 대한 진단 및 치료 선택사항은 현재 매우 제한되어 있다. 진단에 대해, 변경된(돌연변이체) Htt(mHTT) 수준은 질환 부담(disease burden) 스코어 및 질환이 진행함에 따른 가용성 mHTT 종 증가와 상당히 관련된다. 그러나, 낮은 존재비 mHTT는 환자 CNS에서 정량화를 어렵게 하는데, 이는 생체내 HD의 신경병리생물학에서 역할 연구를 제한하고, HTT-저해 약물에 의한 표적 맞물림(engagement)의 입증을 불가능하게 한다. 예를 들어, 문헌 [Wild *et al*. (2014) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:e4] 참조.
- [0011] 치료에 대해, 샤페로닌의 과발현 또는 화합물 겔다나마이신에 의한 열 충격 반응의 유도과 같이 연장된 폴리-글루타민 트랙을 통해 일어나는 단백질 응집과 관련된 독성을 방지하도록 설계된 일부 잠재적 방법은 시험관내 모델에서 이들 독성의 감소를 나타내었다. 다른 치료는 질환의 임상 징후에서 세포자멸사의 역할을 표적화한다.

예를 들어, 질환 증상의 늦춤은, 한쪽 부모가 HD 대립유전자를 함유하고 다른 부모가 카스파제 1에 대한 우성 음성 대립유전자를 갖는 경우에 마우스 교배 새끼의 동물 모델에서 카스파제 활성화의 차단을 통해 나타났다. 추가적으로, 카스파제에 의한 돌연변이체 HD Htt의 절단은 질환의 병원성에서 어떤 역할을 할 수 있다. 카스파제-6 내성 돌연변이체 Htt를 운반하는 유전자이식 마우스는 정상 신경기능을 유지하는 것으로 발견되었고, 비-카스파제 내성 돌연변이체 Htt 대립유전자를 운반하는 마우스에 비해 선조 신경퇴행이 발생하지 않았다(문헌[Graham et al. (2006) *Cell* 125: 1179-1191] 참조). 세포자멸사 경로의 구성원을 표적화하는 분자는 또한 징후에 대한 늦춤 효과를 갖는 것으로 나타났다. 예를 들어, 화합물 zVAD-fmk 및 미노사이클린(이들 둘 다 카스파제 활성을 저해함)은 마우스에서 질환 징후를 늦추는 것으로 나타났다. 약물 레마세마이드는 또한 작은 HD 인간 시험에서 사용되었는데, 화합물이 NDMA 수용체에 대한 돌연변이체 Htt의 결합을 막아서 신경 세포에 대한 독성 효과의 발현을 방지하는 것으로 생각된다. 그러나, 이들 시험에서의 뉴런 기능에서 통계학적으로 유의한 개선은 관찰되지 않았다. 추가로, 헌팅턴 연구 그룹은 조효소 Q를 이용하여 무작위, 이중맹검 연구를 수행하였다. 조효소 Q10으로 치료한 환자 중에서 더 느린 질환 진행에 대한 경향이 관찰되었지만, 총 기능적 능력의 감소율에서 유의한 변화는 없었다. (Di Prospero and Fischbeck, 이하 참조).

[0012] 아연 핑거 단백질("ZFP"), TAL-효과기 도메인("TALE") 및 CRISPR/Cas 전사 인자 시스템으로부터의 DNA 결합 도메인을 포함하는 제조된 전사 인자는 내인성 유전자의 유전자 발현을 조절하는 능력을 가진다(예를 들어, 미국 특허 제8,586,526호; 제6,534,261호; 제6,599,692호; 제6,503,717호; 제6,689,558호; 제7,067,317호; 제7,262,054호; 문헌[Perez-Pinera et al. (2013) *Nature Methods* 10:973-976; Platek et al. (2014) *Plant Biotechnology J.* doi: 10.1111/pbi.12284] 참조). 아연 핑거 단백질을 함유하는 이들 공학처리된 전사 인자를 이용하는 임상 시험은 이들 신규 전사 인자는 다양한 병태를 치료할 수 있는 것으로 나타났다. (예를 들어, 문헌[Yu et al. (2006) *FASEB J.* 20:479-481] 참조). 추가로, 아연 핑거 단백질("ZFP"), TAL-효과기 도메인("TALE"), Ttago 및 CRISPR/Cas 또는 Ttago 뉴클레아제 시스템으로부터 DNA 결합 도메인을 포함하는 인공 뉴클레아제는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 후의 상동성 관련 수선(homology directed repair: HDR) 및/또는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 유래 과정에 의하는 것을 포함하는 유전자의 뉴클레아제-매개 변형을 통해 내인성 유전자의 유전자 발현을 변형시키는 능력을 가진다. 예를 들어, 제8,623,618호; 제8,034,598호; 제8,586,526호; 제6,534,261호; 제6,599,692호; 제6,503,717호; 제6,689,558호; 제7,067,317호; 제7,262,054호; 제7,888,121호; 제7,972,854호; 제7,914,796호; 제7,951,925호; 제8,110,379호; 제8,409,861호; 미국 특허 공개 제20030232410호; 제20050208489호; 제20050026157호; 제20060063231호; 제20080159996호; 제201000218264호; 제20120017290호; 제20110265198호; 제20130137104호; 제20130122591호; 제20130177983호; 제20130177960호 및 제20150056705호를 참조하며, 이들의 개시내용은 그들의 전문이 모든 목적을 위하여 참고로 포함된다. 따라서, 이들 방법은 종종 비-상동성 말단 결합(NHEJ)과 같은 오류 유발 과정에 의한 파손의 수선 또는 수선 주형을 이용하는 수선(상동성 관련 수선 또는 HDR)이 유전자의 Nick아웃 또는 관심 대상의 서열의 삽입(표적화된 통합)을 초래하도록 이중 가닥 파손(double strand break: DSB) 또는 표적 DNA 서열 내 틈을 유도하기 위해 공학처리된 절단 시스템의 사용을 수반한다. 외부에서 공급된 수선 주형(예를 들어, "공여체" 또는 "이식유전자")가 없을 때 이중 가닥 파손의 도입은 세포의 NHEJ 경로에 의해 도입된 돌연변이("삽입결실"로서 알려진 삽입 및/또는 결실)를 통한 표적화된 유전자의 비활성을 위해 통상적으로 사용된다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110082093호는 Htt에 표적화된 특이적 아연 핑거 단백질을 개시하며, 미국 특허 공개 제20130253040호는 Htt와 같은 HD 대립 유전자의 발현을 조절하는 DNA-결합 단백질에 관한 것이다.

[0013] 그러나, HD의 신경병리생물학의 증가된 이해를 위해 그리고 질환-변형 HD 치료를 평가하기 위해 질환 진행을 모니터링하기 위한 mHTT의 검출을 포함하는, 헌팅턴병의 진단, 연구, 치료 및/또는 예방을 위한 방법에 대한 필요가 남아있다.

발명의 내용

[0014] 본 명세서에서 헌팅턴병을 진단 및/또는 치료하기 위한 방법 및 조성물이 개시된다. 특히, 본 명세서에서 HD를 지니는 대상체에서 Htt 응집물을 검출하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 제거하고, 운동결핍을 개선하고, 세포 활성화(예를 들어, ATP 활성화)를 증가시키고/시키거나 세포자멸사를 감소시키기 위한 방법 및 조성물이 제공된다.

[0015] 따라서, 일 양상에서, 본 명세서에서 HD를 지니는 대상체에서 뉴런을 변형시키는 방법이 기재되며, 상기 방법은 뉴런이 변형되도록 대상체에게 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서(repressor)를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 뉴런은 돌연변이체 Htt 대립유전자를 포함하고/하거나 세포내 응집된 Htt의 증가된 양을 포함하는 뉴런("HD 뉴런")이다. 특정 실시형태에서, 변형은 뉴런(예를 들어, HD 뉴런)에서 Htt의 응집을 감소시키

는 것; 예를 들어, 세포내 ATP 수준을 증가시킴으로써 뉴런(예를 들어, HD 뉴런) 에너지 대사를 증가시키는 것; 및/또는 뉴런(예를 들어, HD 뉴런)에서 세포자멸사에 대한 민감성을 감소시키는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 대상체는 포유류이다.

[0016] 따라서, 다른 양상에서, 본 명세서에서 HD를 지니는 대상체의 HD 뉴런에서 Htt 응집물의 형성을 방지하고/하거나 감소시키는 방법이 기재되며, 상기 방법은 대상체에게 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서를 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 다른 양상에서, 본 명세서에서 뉴런(예를 들어, HD 뉴런) 내 세포의 활성(예를 들어, ATP 활성)을 증가시키는 방법이 기재되며, 상기 방법은 뉴런에 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서를 투여하는 단계를 포함한다.

[0018] 다른 양상에서, 본 명세서에서 뉴런(예를 들어, HD 뉴런) 내 세포자멸사를 감소시키는 방법이 기재되며, 상기 방법은 뉴런에 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서를 투여하는 단계를 포함한다.

[0019] 다른 양상에서, 본 명세서에서 운동결핍(예를 들어, 움켜잡기(clasping))의 감소가 필요한 대상체에 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서를 투여함으로써 운동결핍의 감소가 필요한 HD 대상체에서 운동결핍을 감소시키기 위한 방법이 기재된다.

[0020] 또 다른 양상에서, 본 명세서에서 치료법에 반응하여(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Htt 리프레서의 투여에 반응하여) mHtt를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체에서(예를 들어, CSF에서) mHtt를 검출하기 위한 방법이 기재된다. 특정 실시형태에서, 검출하는 단계는 대상체에서 mHtt의 양을 정량화하는 단계를 수반한다. mHtt 수준은 질환이 진행함에 따라 질환 부담 스코어 및 농도에서 mHtt 수준 증가와 상당히 관련되기 때문에 본 명세서에 기재된 임의의 검출 방법은 HD의 진단을 위해 그리고/또는 질환 진행의 모니터링을 위해 사용될 수 있다. 더 나아가, 대상체에서 mHtt를 검출하는(예를 들어, 정량화하는) 임의의 방법은 HD의 신경병리생물학을 평가하고/하거나 질환 변형 HD 치료의 효능을 평가하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0021] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서는 ZFP-TF, 예를 들어, 돌연변이체 Htt 대립유전자 및 전사 억제 도메인(예를 들어, KOX, KRAB 등)에 특이적으로 결합하는 ZFP를 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 다른 실시형태에서, 돌연변이체 Htt 대립유전자의 리프레서는 TALE-TF, 예를 들어, 돌연변이체 Htt 대립유전자 및 전사 억제 도메인(예를 들어, KOX, KRAB 등)에 특이적으로 결합하는 TALE 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 Htt 대립유전자 리프레서는 단백질이 더 이상 DNA를 절단하지 않도록 Cas 단백질 내 뉴클레아제 도메인이 비활성화되는 CRISPR/Cas-TF이다. 얻어진 Cas RNA-가이드 DNA 결합 도메인은 돌연변이체 Htt 대립유전자를 억제하기 위해 전사 리프레서(예를 들어, KOX, KRAB 등)에 융합된다. 또한 추가 실시형태에서, 리프레서는 절단에 의해 돌연변이체 Htt 대립유전자를 억제하고, 이에 의해 돌연변이체 Htt 대립유전자를 비활성화시키는 뉴클레아제(예를 들어, ZFN, TALEN 및/또는 CRISPR/Cas 시스템)를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 뉴클레아제는 뉴클레아제에 의한 절단 후 비-상동성 말단 결합(NHEJ)을 통한 삽입 및/또는 결실("삽입결실")을 도입한다. 다른 실시형태에서, 뉴클레아제는 (상동성 또는 비상동성 관련 방법에 의해) 공여체 서열을 도입하며, 이때 공여체 통합은 돌연변이체 Htt 대립유전자를 비활성화한다.

[0022] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 리프레서는 단백질, 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질과 폴리뉴클레오타이드의 임의의 조합으로서 뉴런(예를 들어, HD 뉴런)에 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리프레서(들)는 발현 작제물, 예를 들어, 플라스미드, 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스(Ad) 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 등)를 이용하여 전달된다. 다른 실시형태에서, 리프레서는 mRNA로서 전달된다. 다른 실시형태에서, 리프레서(들)는 본 명세서에 기재된 임의의 발현 작제물의 조합물, 예를 들어 하나의 발현 작제물에 대한 하나의 리프레서(또는 이의 일부) 및 별도의 발현 작제물에 대한 하나의 리프레서(또는 이의 일부)를 이용하여 전달된다.

[0023] 더 나아가, 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 리프레서는 목적으로 하는 효과를 제공하는 임의의 농도(용량)로 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리프레서는 250 내지 1,000(또는 그 사이의 임의의 값)의 MOI에서 렌티바이러스 벡터를 이용하여 전달된다. 다른 실시형태에서, 리프레서는 150 내지 1,500ng/100,000개 세포(또는 그 사이의 임의의 값)에서 플라스미드 벡터를 이용하여 전달된다. 또한 추가 실시형태에서, 리프레서는 10,000 내지 500,000개 벡터 계능/세포(또는 그 사이의 임의의 값)에서 아데노-관련 바이러스 벡터를 이용하여 전달된다. 다른 실시형태에서, 리프레서는 150 내지 1,500ng/100,000개 세포(또는 그 사이의 임의의 값)에서 mRNA로서 전달된다.

- [0024] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 상기 방법은 대상체의 하나 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립유전자의 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상 또는 약 95% 이상 억제할 수 있다.
- [0025] 추가 양상에서, 본 명세서에 기재된 발명은 하나 이상의 Htt-조절 전사 인자, 예컨대 아연 핑거 단백질(ZFP TF), TALE(TALE-TF) 및 CRISPR/Cas-TF, 예를 들어, ZFP-TF, TALE-TF 또는 CRISPR/Cas-TF 중 하나 이상을 포함하는 Htt-조절 전사 인자를 포함한다. 특정 실시형태에서, Htt-조절 전사 인자는 대상체의 하나 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립유전자의 발현을 억제할 수 있다. 억제는 대상체의 비처리(야생형) 뉴런에 비해 대상체의 하나 이상의 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 대립유전자의 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상 또는 약 95% 이상 억제될 수 있다. 특정 실시형태에서, Htt-조절 전사 인자는 본 명세서에 기재된 방법 중 하나 이상을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0026] 또한 Htt-조절제 중 하나 이상(예를 들어, 리프레서) 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Htt-조절제(또는 이의 구성성분)를 암호화하고/하거나 구성성분을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 추가로 세포(예를 들어, 뉴런), 시약(예를 들어, CSF에서와 같이, mHtt 단백질을 검출하고/하거나 정량화하기 위함) 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 포함하는, 사용을 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 이들 및 다른 양상은 전체로서 개시내용에 비추어 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] **도 1**은 뉴런에 대한 표시 작제물의 투여 후 HD-뉴런(표시한 바와 같은 왼쪽 3개의 막대) 및 비-HD 뉴런(표시한 바와 같은 오른쪽 3개의 막대) 내 상대적 세포내 ATP 수준을 도시하는 그래프를 도시한 도면. "33074"는 전사 억제 도메인(KOX)뿐만 아니라 GFP 암호화 서열에 융합된 ZFP 33074(표 1A, 돌연변이체 Htt에 특이적임)를 포함하는 ZFP-TF 리프레서를 지칭하고; "GFP"는 GFP 만을(ZFP-TF 없음) 암호화하는 작제물을 지칭하며; "모의(mock)"는 암호화 서열이 없는 작제물을 지칭한다.
- 도 2**는 표시한 작제물(도 1 참조)의 뉴런에 대한 투여 후, TUNEL 분석에 의해 결정한 바와 같은 HD-뉴런(표시한 바와 같은 좌측 3개 막대) 및 비-HD 뉴런(표시한 바와 같은 오른쪽 3개의 막대)의 세포자멸사 세포의 백분율을 도시하는 그래프.
- 도 3A 내지 도 3K**는 Htt 돌연변이체 대립유전자의 ZFP-TF 리프레서에 의한 치료 후 Q175 마우스에서 돌연변이체 Htt 응집의 방지를 도시한 도면. 도 3A 내지 도 3H는 ZFP-TF 발현 작제물로 치료한 마우스로부터 얻은 뇌 슬라이스의 면역조직화학적 분석의 대표적인 이미지를 도시한 도면. 도 3A 내지 도 3D는 핵 DNA 및 FLAG 에피토프 태그에 대한 항체(ZFP-TF의 존재를 표시함)를 표시하는 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색된 이미지를 나타낸다. ZFP-TF는 그것이 투여되는 측면(동측성)에만 존재한다. 도 3E 내지 도 3H는 돌연변이체 Htt 응집물에 관련된 항체(mEM48)에 의한 염색 후 대표적인 이미지를 나타낸다. 주사를 받지 않은 대측성 선조체에서, 돌연변이체 Htt 응집물은 주사를 통해 ZFP-TF 발현 작제물을 받은 동측성 선조체에 비해 mEM48 항체에 의해 용이하게 검출되었고, 이때, 매우 저수준의 돌연변이체 Htt 응집이 관찰되었다. 도 3I는 표시된 작제물을 지니는 비주사 대측성 선조체에서 세포 당 응집물의 수에 대해 정규화한 동측성 선조체에서의 세포 당 핵 Htt 응집물의 수(FLAG(+)) 및 GFP(+) 세포에 대해 정규화한 바와 같음을 나타내는 그래프이다. 도 3J는 대측성 선조체로부터의 뉴런에 대해 정규화한 표시된 작제물을 받은 세포 내 Htt 응집물에 대한 핵 mEM48 염색의 강도를 나타내는 그래프이다. 도 3K는 대측성 선조 신경원에 대해 정규화한 ZFP-TF 리프레서 또는 GFP-발현 세포 내 핵 주위 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도를 나타내는 그래프이다. 도 3I 내지 도 3K에서, "GFP"는 GFP를 암호화하지만, ZFP-TF Htt 리프레서를 암호화하는 작제물을 지칭하고; "30640" 및 "30645"는 주사된 작제물에서 사용된 특이적 ZFP 설계를 지칭한다(표 1). 통계학적 분석을 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal Wallis test) 및 던(Dunn)의 다중 비교에 의해 수행하였고; * p<0.05; ** p<0.01, *** p<0.001; 데이터를 평균 + SEM에 의한 막대 그래프로 나타낸다.
- 도 4A 내지 도 4D**는 Htt 돌연변이체 대립유전자의 ZFP-TF 리프레서에 의한 치료 후 Q175 마우스에서 돌연변이체 Htt 응집의 반전을 도시한다. 도 4A는 대측성 및 동측성 선조체에서 DARPP-32(선조체-특이적 단백질) 및 항-Htt 응집 항체 mEM48로 염색한 ZFP-TF 및 대조군 동물 뇌 부문의 대표적인 이미지를 나타낸다. 도 4B는 표시 작제물을 지니는 비주사 대측성 선조체에서 세포 당 응집물의 수에 정규화한 동측성 선조체에서 세포 당 핵 Htt 응집물의 수(FLAG(+)) 및 GFP(+) 세포에 대해 정규화한 바와 같음을 나타내는 그래프이다. 도 4C는 대측성 선조체로부터의 뉴런에서 정규화된 표시 작제물을 받은 세포에서 Htt 응집에 대한 핵 mEM48 염색의 강도를 나타내는 그래프이다. 도 4D는 대측성 선조 신경원에 대해 정규화된 ZFP-TF 리프레서 또는 GFP-발현 세포 내 핵 주위 돌연

변이체 Htt 응집물의 밀도를 나타내는 그래프이다. 도 4B 내지 도 4D에서, "GFP"는 GFP를 암호화하지만, ZFP-TF Htt 리프레서를 암호화하는 작제물을 지칭하고; "GFP-2A-30640" 및 "GFP-2A-30645"는 주사된 작제물에서 사용된 GFP를 암호화하는 작제물 및 특이적 ZFP 설계를 지칭한다(표 1). 통계학적 분석은 크러스칼-왈리스 검정 및 던의 다중 비교에 의해 수행하였고; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; 데이터는 평균 + SEM에 의한 막대 그래프로 나타낸다.

도 5A 내지 도 5C는 AAV-ZFP-33074의 주사 후 Q175 마우스의 선조체에서 돌연변이체 Htt 응집의 예방을 도시는 도면. AAV 벡터는 2개월령에 선조체 내로 전달되고, 분석을 4개월령에 수행하였다. 도 5A는 AAV-형질도입된(GFP에 의해 표지됨) 중형 돌기 뉴런(MSN, DARPP32 항체에 의해 표지됨) 내 핵 Htt 응집물의 수를 나타내는 그래프를 도시하는 도면. 도 5B는 AAV-형질도입 MSN에서 핵외부 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도를 나타내는 그래프이다. 도 5C는 AAV-형질도입 MSN에서 Htt 응집물에 대한 핵 mEM48 항체의 강도를 나타내는 그래프이다. "대조군 AAV"는 GFP를 발현시키는 AAV 벡터를 지칭하고, "ZFP 33074"는 자기-절단 2A 캡타이드에 의해 연결된 ZFP 33074와 GFP를 둘 다 발현시키는 AAV 벡터를 지칭한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM에 의해 점 플롯으로서 나타낸다. 통계학적 분석은 대조군에 대한 던 사후 검정과 함께 크러스칼-왈리스 검정을 이용하여 수행하였다; ***= $p < 0.001$. 모든 그룹에 대해, 동물당 6개 부문을 지니는 4마리 동물 중 n마리를 정량화를 위해 사용하였다.

도 6A 내지 도 6C는 AAV-ZFP-33074 주사 후 Q175 마우스의 선조체에서 돌연변이체 Htt 응집의 감소를 도시한 도면. AAV 벡터는 6개월령에 선조체 내로 전달되었고, 분석을 10개월령에 수행하였다. 도 6A는 AAV-형질도입(GFP에 의해 표지) 중형 돌기 뉴런(MSN, DARPP32 항체에 의해 표지)에서 핵 Htt 응집물의 수를 나타내는 그래프이다. 도 6B는 AAV-형질도입 MSN에서 핵외부 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도를 나타내는 그래프이다. 도 6C는 AAV-형질도입 MSN에서 Htt 응집물에 대한 핵 mEM48 항체 염색의 강도를 나타내는 그래프이다. "대조군 AAV"는 GFP를 발현시키는 AAV 벡터를 지칭하고, "ZFP 33074"는 자기-절단 2A 캡타이드에 의해 연결된 ZFP 33074와 GFP를 둘 다 발현시키는 AAV 벡터를 지칭한다. "ZFP Δ DBD"는 아연 핑거 DNA 결합 도메인(DBD)이 없다는 것을 제외하고 "ZFP 33074"와 유사한 대조군 AAV 벡터를 지칭한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM에 의해 점 플롯으로서 나타낸다. 통계학적 분석은 대조군에 대한 던 사후 검정과 함께 크러스칼-왈리스 검정을 이용하여 수행하였다; ***= $p < 0.001$; n.s.=유의하지 않음. 모든 그룹에 대해, 동물 당 6개 부문을 지니는 4마리 동물 중 n마리를 정량화를 위해 사용하였다.

도 7A 및 도 7B는 AAV-ZFP-33074 주사 후 Q175 마우스의 선조체에서 면역염색에 의해 증가된 DARPP32 발현을 도시한 도면. AAV 벡터는 6개월령에 선조체 내로 전달되었고, 분석을 10개월령에 수행하였다. 도 7A는 DARPP32 발현이 동일한 연령의 야생형 마우스에 비해 10-개월령 Q175 마우스에서 감소된다는 것을 나타낸다. 도 7B는 ZFP 33074에 대한 AAV 벡터 또는 대조군 AAV 벡터로 처리한 Q175 선조체에서 DARPP32 수준을 나타낸다. "대조군 AAV"는 GFP를 발현시키는 AAV 벡터를 지칭하고, "ZFP 33074"는 자기-절단 2A 캡타이드에 의해 연결되는 ZFP 33074와 GFP를 둘 다 발현시키는 AAV 벡터를 지칭한다. "ZFP Δ DBD"는 아연 핑거 DNA 결합 도메인(DBD)을 결여한다는 것을 제외하고 "ZFP 33074"와 유사한 대조군 AAV 벡터를 지칭한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM에 의해 점 플롯으로서 나타낸다. 통계학적 분석은 대조군에 대한 던 사후 검정과 함께 크러스칼-왈리스 검정을 이용하여 수행하였다; **= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$; n.s.=유의하지 않음. 모든 그룹에 대해, 동물당 6개 부문을 지니는 4마리 동물 중 n마리를 정량화를 위해 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

본 명세서에서 질환 진행을 검출하고, 모니터링하며, 헌팅턴병(HD)을 치료 및/또는 예방하기 위한 조성물 및 방법이 개시된다. 특히, 본 명세서에서 HD를 지니는 대상체에서 뇌(예를 들어, HD 뉴런)를 변경시킴으로써 HD에 대한 치료법을 제공하는 방법이 기재된다. 아연 핑거 단백질(ZFP TF), TALE(TALE-TF) 또는 CRISPR/Cas-TF, 예를 들어, 돌연변이체 Htt 대립유전자의 발현을 억제하는 ZFP-TF, TALE-TF 또는 CRISPR/Cas-TF를 포함하는 Htt-조절 전사 인자, 예컨대 Htt-조절 전사 인자를 이용하여, 예를 들어 HD 뉴런 내 Htt의 응집을 감소시킴으로써, HD 뉴런 에너지를 증가시킴으로써(예를 들어, ATP 수준을 증가시킴으로써), HD 뉴런 내 세포자멸사를 감소시킴으로써 및/또는 HD 대상체에서 운동결핍을 감소시킴으로써 HD의 효과 및/또는 증상이 감소 또는 제거되도록 HD 대상체에서 HD 뉴런이 변형될 수 있다. 추가로, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 환자 샘플(예를 들어, CSF)에서 HD의 검출을 가능하게 할 수 있다. 환자 샘플에서 mHtt 수준을 검출하는 것은 HD의 진단; mHtt 수준에 기반한 질환 진행의 모니터링;뿐만 아니라 HD 치료법의 평가를 가능하게 할 수 있다.

[0030]

일반

[0031]

본 명세서에 개시된 방법의 실행뿐만 아니라 조성물의 제조 및 용도는, 달리 표시되지 않는 한, 당업계 기술 내

에서와 같이 분자 생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 컴퓨터 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 및 관련 분야의 종래 기술을 사용한다. 이들 기법은 문헌에서 완전하게 설명된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 및 Third edition, 2001; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 및 주기적 업데이트; 시리즈 METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 및 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999] 참조.

[0032] 정의

[0033] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호호환적으로 사용되며, 선형 또는 원형 입체구조로, 그리고 단일- 또는 이중-가닥 형태로 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 이들 용어는 중합체 길이에 대한 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 상기 용어는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 인산염 모이어티(예를 들어, 포스포로티오에이트 골격)에서 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오타이드의 유사체는 동일한 염기쌍 특이성을 가지며; 즉, A의 유사체는 T와 염기쌍을 이룰 것이다.

[0034] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호호환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 아미노산이 대응하는 천연 유래 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유사체인 아미노산 중합체에 적용된다.

[0035] "결합하는"은 거대분자 사이의(예를 들어, 단백질과 핵산 사이의) 서열-특이적, 비공유적 상호작용을 지칭한다. 전체로서의 상호작용이 서열-특이적인 한, 결합 상호작용의 모든 구성성분이 서열 특이적(예를 들어, DNA 골격 내 인산염 잔기와 접촉함)일 필요는 없다. 이러한 상호작용은 일반적으로 10^{-6} M^{-1} 이하의 해리상수(K_d)를 특징으로 한다. "친화도"는 결합 강도를 지칭한다(증가된 결합 친화도는 더 낮은 K_d 와 상관관계가 있다).

[0036] "결합 단백질"은 다른 분자에 비공유적으로 결합할 수 있는 단백질이다. 결합 단백질은, 예를 들어, DNA 분자(DNA-결합 단백질), RNA 분자(RNA-결합 단백질) 및/또는 단백질 분자(단백질-결합 단백질)에 결합할 수 있다. 단백질-결합 단백질의 경우에, 이는 그 자체에 결합할 수 있고(동종이량체, 동종삼량체 등을 형성함) 그리고/또는 상이한 단백질 또는 단백질들의 하나 이상의 분자에 결합할 수 있다. 결합 단백질은 결합 활성의 하나 초과 유형을 가질 수 있다. 예를 들어, 아연 핑거 단백질은 DNA-결합, RNA-결합 및 단백질-결합 활성을 가진다.

[0037] "아연 핑거 DNA 결합 단백질"(또는 결합 도메인)은, 구조가 아연 이온의 배위를 통해 안정화되는 결합 도메인 내의 아미노산 서열의 영역인 하나 이상의 아연 핑거를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 거대 단백질 내의 단백질 또는 도메인이다. 용어 아연 핑거 DNA 결합 단백질은 종종 아연 핑거 단백질 또는 ZFP로서 약칭된다.

[0038] "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"은 하나 이상의 TALE 반복부 도메인/단위를 포함하는 폴리펩타이드이다. 반복부 도메인은 TALE의 그의 동족 표적 DNA 서열에 대한 결합에 수반된다. 단일 "반복부 단위"(또한 "반복부"로서 지칭됨)는 전형적으로 길이로 33 내지 35개의 아미노산이며, 천연 유래 TALE 단백질 내에서 다른 TALE 반복부 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. 예를 들어, 미국 특허 제8,586,526호 참조.

[0039] "TtAgo"는 유전자 침묵에 수반될 것으로 생각되는 원핵세포 아거노트(Argonaute) 단백질이다. TtAgo는 박테리아 썬무스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*)로부터 유래된다. 예를 들어, 문헌[Swartz *et al.* (2014) *Nature* 507(7491):258-261, G. Sheng *et al.*, (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652)] 참조. "TtAgo 시스템"은, 예를 들어, TtAgo 효소에 의한 절단을 위한 가이드 DNA를 포함하는, 필요한 모든 구성성분이다. "재조합"은 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 및 상동성 재조합에 의한 공여체 포획을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 두 폴리뉴클레오타이드 사이의 유전자 정보 교환 과정을 지칭한다. 이 개시내용의 목적을 위해, "상동성 재조합(HR)"은, 예를 들어 상동성-관련 수선 메커니즘을 통한 세포 내 이중 가닥 파손의 수선 동안 일어나는 이러한 교환의 구체화된 형태를 지칭한다. 이 과정은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하고, "표적" 분자(즉, 이중-가닥 파손을 경험한 것)의 주형 수선에 대해 "공여체" 분자를 사용하며, "비-크로스오버 유전자 전환" 또는 "짧은 트랙 유전자 전환"으로서 다양하게 알려져 있는데, 그것이 공여체로부터 표적까지 유전자 정보의 전달을 야기하기 때문이다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되는 일 없이, 이러한 전달은 파손된 표적과 공

여체 사이에 형성된 이형이중가닥 DNA의 미스매치 교정 및/또는 "합성-의존적 가닥 어닐링"을 수반할 수 있는데, 이때 공여체는 표적 및/또는 관련된 과정의 부분이 될 유전자 정보를 재합성하기 위해 사용된다. 이러한 구체화된 HR은 종종 공여체 폴리뉴클레오타이드 서열의 부분 또는 모두가 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼입되도록 표적 분자 서열의 변경을 초래한다.

[0040] 아연 핑거 결합 도메인 또는 TALE DNA 결합 도메인은 사전결정된 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 천연 유래 아연 핑거 단백질의 인식 나선 영역의 공학처리(하나 이상의 아미노산 변경)를 통해 또는 TALE 단백질의 RVD를 공학처리함으로써 사전결정된 뉴클레오타이드 서열에 결합되도록 "공학처리"될 수 있다. 따라서, 공학처리된 아연 핑거 단백질 또는 TALE은 비천연 유래인 단백질이다. 아연 핑거 단백질 또는 TALE을 공학처리하는 방법의 비제한적 예는 설계 및 선택이다. "설계된" 아연 핑거 단백질 또는 TALE은 사실상 단백질의 설계/조성이 원칙적으로 합리적 기준으로부터 초래되는 것으로 생기지 않은 단백질이다. 설계를 위한 합리적 기준은 존재하는 ZFP 설계 및 결합 데이터의 정보를 저장하는 데이터베이스에서 정보를 처리하기 위한 대체 규칙 및 컴퓨터 알고리즘의 적용을 포함한다. "선택된" 아연 핑거 단백질 또는 TALE은 사실상 단백질의 생성이 주로 경험적 과정, 예컨대 파지 디스플레이, 상호작용 트랩 또는 혼성체 선택으로부터 초래되는 것으로 발견되지 않은 단백질이다. 예를 들어, 미국 특허 제8,586,526호; 제6,140,081호; 제6,453,242호; 제6,746,838호; 제7,241,573호; 제6,866,997호; 제7,241,574호 및 제6,534,261호; 또한 WO 03/016496호 참조.

[0041] 용어 "서열"은 DNA 또는 RNA일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오타이드 서열을 지칭하며; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있고, 단일-가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 용어 "공여체 서열"은 게놈 내로 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 공여체 서열은 임의의 길이, 예를 들어 길이로 2 내지 10,000개의 뉴클레오타이드(또는 그 사이의 또는 그것 초과)의 임의의 정수 값), 바람직하게는 길이로 약 100 내지 1,000개의 뉴클레오타이드(또는 그 사이의 임의의 정수), 및 바람직하게는 길이로 약 200 내지 500개 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.

[0042] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합을 위한 충분한 조건이 존재하는 조건 하에서 결합 분자가 결합되는 핵산의 부분을 정하는 핵산 서열이다.

[0043] "외인성" 분자는 정상적으로는 세포 내에 존재하지 않는 분자이지만, 하나 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. "세포 내의 정상적 존재"는 세포의 특정 발생 단계 및 환경적 조건에 대해 결정된다. 따라서, 예를 들어, 근육의 배아 발생 동안에만 존재하는 분자는 성인 근육 세포에 대한 외인성 분자이다. 유사하게, 열 충격에 의해 유도된 분자는 비-열 충격 세포에 대한 외인성 분자이다. 외인성 분자는, 예를 들어, 오작동 내인성 분자의 기능 형태 또는 정상-기능 내인성 분자의 오작동 형태를 포함할 수 있다.

[0044] 외인성 분자는 특히, 예컨대 조합적 화학 과정에 의해 생성되는 소분자 또는 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당 단백질, 지방단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체 또는 상기 분자 중 하나 이상을 포함하는 임의의 복합체와 같은 거대분자일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하고, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있으며; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있고; 임의의 길이를 가질 수 있다. 핵산은 이중가닥을 형성할 수 있는 것뿐만 아니라 삼중가닥-형성 핵산을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,176,996호 및 제5,422,251호 참조. 단백질은 DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 중합효소, 메틸라제, 데메틸라제, 아세틸라제, 데아세틸라제, 키나제, 포스파타제, 인터그라제, 재조합효소, 리가제, 토포아이스머라제, 자이라제 및 헬리카제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0045] 외인성 분자는 내인성 분자, 예를 들어, 외인성 단백질 또는 핵산과 동일한 유형의 분자일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 감염성 바이러스 게놈, 플라스미드 또는 세포 내로 도입된 에피솜 또는 세포 내에 정상적으로 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 세포 내로 외인성 분자의 도입을 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 지질-매개 전달(즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공법, 직접 주사, 세포 융합, 입자 총, 인산칼슘 공-침전, DEAE-텍스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 동일한 유형의 분자일 수 있지만 세포가 유래된 것과 상이한 종으로부터 유래된다. 예를 들어, 인간 핵산 서열은 마우스 또는 햄스터로부터 본래 유래된 세포주 내로 도입될 수 있다.

[0046] 대조적으로, "내인성" 분자는 특정 환경 조건 하의 특정 발생 단계에서 특정 세포 내에 정상적으로 존재하는 것이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아의 게놈, 염색체 또는 다른 유기체, 또는 천연 유래 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가적인 내인성 분자는 단백질, 예를 들어, 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.

[0047] "융합" 분자는 2 이상의 서브유닛 분자가, 바람직하게는 공유적으로 연결된 분자이다. 서브유닛 분자는 동일한

화학적 유형의 분자일 수 있거나, 또는 상이한 화학적 유형의 분자일 수 있다. 융합 분자의 제1 유형의 예는, 융합 단백질(예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인과 하나 이상의 활성화 도메인 사이의 융합) 및 융합 핵산(예를 들어, 상기 기재한 융합 단백질을 암호화하는 핵산)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 융합 분자의 제2 유형의 예는 삼중가닥-형성 핵산과 폴리펩타이드 사이의 융합, 및 소홈(minor groove) 결합제와 핵산 사이의 융합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0048] 세포 내 융합 단백질의 발현은 세포에 대한 융합 단백질의 전달로부터 또는 세포에 대한 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전달에 의해 초래될 수 있되, 폴리뉴클레오타이드는 전사되고, 전사체는 번역되어 융합 단백질을 생성한다. 트랜스-스플라이싱, 폴리펩타이드 절단 및 폴리펩타이드 결합이 또한 세포 내 단백질의 발현에 수반될 수 있다. 세포에 대한 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 전달을 위한 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 제시된다.

[0049] "다량체화 도메인"(또한 "이량체화 도메인" 또는 "단백질 상호작용 도메인"으로서 지칭됨)은 ZFP TF 또는 TALE TF의 아미노, 카복시 또는 아미노 및 카복시 말단 영역에 혼입된 도메인이다. 이들 도메인은 트라이뉴클레오타이드 반복부 도메인이 길이의 야생형 수를 지니는 더 짧은 트랙에 대해 다량체화된 ZFP TF 또는 TALE TF에 의해 우선적으로 결합되도록 다중 ZFP TF 또는 TALE TF 단위의 다량체화를 가능하게 한다. 다량체화 도메인의 예는 류신 지퍼를 포함한다. 다량체화 도메인은 소분자에 의해 조절될 수 있되, 다량체화 도메인은 소분자 또는 외부 리간드의 존재에서만 다른 다량체화 도메인과의 상호작용을 가능하게 하는 적절한 입체 구조를 추정한다. 이런 방법으로, 외인성 리간드는 이들 도메인의 활성을 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0050] 본 개시내용의 목적을 위해 "유전자"는, 이러한 조절 서열이 암호 및/또는 전사 서열에 인접해 있든 아니든, 유전자 산물을 암호화하는 DNA 영역(이하 참조)뿐만 아니라 유전자 산물의 생성을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 종결자, 전사 조절 서열, 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 유입 부위, 인핸서, 사일렌서, 격리자(insulator), 경계 요소, 복제 기점, 기질 부착 부위 및 좌위 제어 영역을 포함하지만, 반드시 제한되지 않는다.

[0051] "유전자 발현"은 유전자에 함유된 정보의 유전자 산물로의 전환을 지칭한다. 유전자 산물은 유전자의 직접적 전사 생성물(예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 임의의 다른 유형의 RNA) 또는 mRNA의 번역에 의해 생성된 단백질일 수 있다. 유전자 산물은 또한 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 편집과 같은 과정에 의해 변형되는 RNA, 및 예를 들어 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화 및 글리코실화에 의해 변형되는 단백질을 포함한다.

[0052] 유전자 발현의 "조절"은 유전자 활성의 변화를 지칭한다. 발현의 조절은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 게놈 편집(예를 들어, 절단, 변경, 비활성화, 무작위 돌연변이)이 발현을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 유전자 비활성화는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ZFP 또는 TALE 단백질을 포함하지 않는 세포에 비해 유전자 발현의 임의의 감소를 지칭한다. 따라서, 유전자 비활성화는 부분적이거나 또는 완전할 수 있다.

[0053] "관심 대상의 영역"은 외인성 분자에 결합하는 것이 바람직한 세포 염색질의 임의의 영역, 예를 들어 유전자 내의 또는 유전자에 인접한 유전자 또는 비암호 서열이다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합의 목적을 위할 수 있다. 관심 대상의 영역은, 예를 들어 염색체, 에피솜, 기관 게놈(예를 들어, 미토콘드리아, 엽록체) 또는 감염성 바이러스 게놈에 존재할 수 있다. 관심대상의 영역은 유전자의 암호 영역 내, 전사된 비-암호 영역, 예컨대 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론 내, 또는 암호 영역 상류 또는 하류의 비전사 영역 내일 수 있다. 관심 대상의 영역은 단일 뉴클레오타이드 쌍 또는 길이로 2,000개까지의 뉴클레오타이드 쌍, 또는 뉴클레오타이드 쌍의 임의의 정수값만큼 적을 수 있다.

[0054] "진핵" 세포는 진균 세포(예컨대 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유류 세포 및 인간 세포(예를 들어, T-세포)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0055] 용어 "조작적 결합" 및 "조작가능하게 연결된" (또는 "작동가능하게 연결된")은 2 이상의 구성성분(예컨대 서열 요소)의 접합위치에 대해 상호호환적으로 사용되며, 이때 구성성분은 둘 다 정상적으로 기능하고 구성성분 중 적어도 하나가 다른 구성성분 중 적어도 하나에 대해 발휘되는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하도록 구성성분이 배열된다. 예로서, 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터는, 전사 조절 서열이 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하는 암호 서열의 전사 수준을 제어한다면, 암호 서열에 조작가능하게 연결된다. 전사 조절 서열은 일반적으로 암호 서열과 시스로 조작가능하게 연결되지만, 그에 직접적으로 인접할 필요는

없다. 예를 들어, 인헨서는 그들이 인접하지 않을 때조차도, 암호 서열에 조작가능하게 연결된 전사 조절 서열이다.

[0056] 융합 폴리펩타이드에 대해, 용어 "조작가능하게 연결된"은 각각의 구성성분이 다른 구성성분에 대한 연결에서, 그렇게 연결되어 있지 않다고 해도 동일한 기능을 수행한다는 사실을 지칭할 수 있다. 예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인이 활성화 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드에 대해, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 및 비활성화 도메인은, 융합 폴리펩타이드에서, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있다면, 조작적 결합인 반면, 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향조절할 수 있다. 유전자 발현을 조절할 수 있는 도메인에 융합된 ZFP는 "ZFP-TF" 또는 "아연 핑거 전사 인자"로서 총괄적으로 지칭되는 반면, 유전자 발현을 조절할 수 있는 도메인에 융합된 TALE는 "TALE-TF" 또는 "TALE 전사 인자"로서 총괄적으로 지칭된다. ZFP DNA-결합 도메인이 절단 도메인("ZFN" 또는 "아연 핑거 뉴클레아제")에 융합된 융합 폴리펩타이드일 때, ZFP DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은, 융합 폴리펩타이드에서 ZFP DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있다면, 조작적 결합인 반면, 절단 도메인은 표적 부위 부근에서 DNA를 절단할 수 있다. TALE DNA-결합 도메인이 절단 도메인("TALEN" 또는 "TALE 뉴클레아제")에 융합된 융합 폴리펩타이드일 때, TALE DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은, 융합 폴리펩타이드에서 TALE DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있다면 조작적 결합인 반면, 절단 도메인은 표적 부위 부근에서 DNA를 절단할 수 있다. Cas DNA-결합 도메인이 활성화 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드에 대해, Cas DNA-결합 도메인 및 활성화 도메인은, 융합 폴리펩타이드에서 Cas DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 결합 부위에 결합할 수 있다면 조작적 결합인 반면, 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향 조절할 수 있다. Cas DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드일 때, Cas DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은 융합 폴리펩타이드에서, Cas DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 결합 부위에 결합할 수 있다면 조작적 결합인 반면, 절단 도메인은 표적 부위 부근에서 DNA를 절단할 수 있다.

[0057] 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산의 "기능성 단편"은 서열이 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일하지 않고, 아직 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일한 기능을 보유하는 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산이다. 기능성 단편은 대응하는 천연 분자보다 더 많거나, 더 적거나 또는 동일한 수의 잔기를 가질 수 있고/있거나 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 치환을 함유할 수 있다. 핵산의 기능(예를 들어, 암호 기능, 다른 핵산에 혼성화하는 능력)을 결정하기 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 유사하게, 단백질 기능을 결정하기 위한 방법은 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 DNA-결합 기능은, 예를 들어, 필터-결합, 전기영동이동도-이동 또는 면역침강반응 분석에 의해 결정될 수 있다. DNA 절단은 겔 전기영동에 의해 분석될 수 있다. 문헌[Ausubel *et al.*, 상기 참조] 참조. 다른 단백질과 상호작용하는 단백질의 능력은, 예를 들어, 공동-면역침강반응, 2혼성체 분석 또는 상보성에 의해, 유전적과 생화학적 둘 다로 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Fields *et al.* (1989) *Nature* **340**:245-246]; 미국 특허 제5,585,245호 및 PCT WO 98/44350 참조.

[0058] "벡터"는 표적 세포에 유전자 서열을 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 작제물", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 대상의 유전자의 발현을 지시할 수 있고, 표적 세포에 유전자 서열을 전달할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 의미한다. 따라서, 상기 용어는 클로닝 및 발현 비히클뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다.

[0059] "리포터 유전자" 또는 "리포터 서열"은, 바람직하게는 일상적인 분석에서 필수적은 아닐지라도, 용이하게 측정되는 단백질 생성물을 생성하는 임의의 서열을 지칭한다. 적합한 리포터 유전자는 항생제 내성(예를 들어, 암피실린 내성, 네오마이신 내성, G418 내성, 푸로마이신 내성)을 매개하는 단백질을 암호화하는 서열, 착색 또는 형광 또는 발광 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질, 향상된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시페라제), 및 향상된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질(예를 들어, 다이하이드로폴레이트 환원효소)을 암호화하는 서열을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 에피토프 태그는, 예를 들어, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출가능한 아미노산 서열 중 하나 이상의 복제물을 포함한다. "발현 태그"는 관심대상의 유전자의 발현을 모니터링하기 위해 목적으로 하는 유전자 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는 리포터를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0060] DNA-결합 도메인

[0061] 본 명세서에 기재된 방법은 Htt 유전자 내 표적 서열에 특이적으로 결합하고, 특히 복수의 트라이뉴클레오타이드 반복부를 포함하는 돌연변이체 Htt 대립유전자에 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함하는, 조성물, 예를 들어 Htt-조절 전사 인자를 사용하게 한다. 임의의 DNA-결합 도메인은 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다.

- [0062] 특정 실시형태에서, Htt-조절 전사 인자, 또는 그의 DNA 결합 도메인은 아연 핑거 단백질을 포함한다. 표적 부위의 선택; ZFP 및 융합 단백질(및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 설계 및 구성을 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 미국 특허 제6,140,081호; 제5,789,538호; 제6,453,242호; 제6,534,261호; 제5,925,523호; 제6,007,988호; 제6,013,453호; 제6,200,759호; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496에 상세하게 기재되어 있다.
- [0063] 특정 실시형태에서, ZFP는 돌연변이체 Htt 대립유전자 또는 야생형 Htt 서열 중 하나에 선택적으로 결합할 수 있다. Htt 표적 부위는 전형적으로 적어도 하나의 아연 핑거를 포함하지만, 복수의 아연 핑거(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 핑거)를 포함할 수 있다. 보통, ZFP는 적어도 3개의 핑거를 포함한다. 특정 ZFP는 4, 5 또는 6개의 핑거를 포함하는 한편, 일부 ZFP는 8, 9, 10, 11 또는 12개의 핑거를 포함한다. 3개의 핑거를 포함하는 ZFP는 전형적으로 9 또는 10개의 뉴클레오타이드를 인식하고; 4개의 핑거를 포함하는 전형적으로 ZFP는 12 내지 14 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위를 인식하는 반면; 6개의 핑거를 갖는 ZFP가 18 내지 21개의 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위를 인식할 수 있다. ZFP는 또한 하나 이상의 조절 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있는데, 이 도메인은 전사 활성화 또는 억제 도메인일 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 함께 연결된 2개의 ZFP DNA 결합 도메인을 포함한다. 따라서 이들 아연 핑거 단백질은 8, 9, 10, 11, 12개 이상의 핑거를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나의 DNA 결합 도메인이 4, 5 또는 6개의 아연 핑거를 포함하고, 제2 DNA 결합 도메인이 추가적인 4, 5 또는 5개의 아연 핑거를 포함하도록 2개의 DNA 결합 도메인은 연장가능한 가요성 링커를 통해 연결된다. 일부 실시형태에서, 핑거 배열이 8, 9, 10, 11 또는 12개 이상의 핑거를 포함하는 하나의 DNA 결합 도메인을 포함하도록 링커는 표준 핑거간 링커이다. 다른 실시형태에서, 링커는 가요성 링커와 같은 비전형적 링커이다. DNA 결합 도메인은 적어도 하나의 조절 도메인에 융합되고, 'ZFP-ZFP-TF' 구조로서 생각될 수 있다. 이들 실시형태의 구체적 예는 가요성 링커와 연결되고, 2개의 ZFP-KOX 융합 단백질이 링커를 통해 함께 융합되는 경우, KOX 리프레서 및 "ZFP-KOX-ZFP-KOX"에 융합된 2개의 DNA 결합 도메인을 포함하는 "ZFP-ZFP-KOX"로서 지칭될 수 있다.
- [0064] 대안적으로, DNA-결합 도메인은 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제, 예컨대 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한 미국 특허 제5,420,032호; 미국 특허 제6,833,252호; 문헌[Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* **82**:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* **12**:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* **263**:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* **280**:345-353] 및 뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs) 카탈로그를 참조한다. 추가로, 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비-천연 표적 부위에 결합하도록 공학처리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* **10**:895-905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**:2952-2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* **441**:656-659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* **7**:49-66]; 미국 특허 공개 제20070117128호 참조.
- [0065] "2 핸드" 아연 핑거 단백질은 2개의 아연 핑거 도메인이 2개의 불연속 표적 부위에 결합하도록 아미노산을 개재함으로써 아연 핑거 DNA 결합 도메인의 2개 클러스터를 분리시키는 해당 단백질이다. 아연 핑거 결합 단백질의 2핸드 유형의 예는 4개의 아연 핑거의 클러스터가 단백질의 아미노 말단에 위치되고 3개 핑거의 클러스터가 카복실 말단에 위치되는 SIP1이다(문헌[Remacle *et al.* (1999) *EMBO Journal* **18** (18): 5073-5084] 참조). 이들 단백질에서 아연 핑거의 각각의 클러스터는 독특한 표적 서열에 결합할 수 있고, 두 표적 서열 사이의 간격은 다수의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 2-핸드 ZFP는, 예를 들어 ZFP 중 하나 또는 둘 다에 융합된 기능성 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 기능성 도메인은 하나 또는 둘 다의 ZFP의 외부에 부착될 수 있거나(도 1C 참조) 또는 ZFP 사이에(ZFP 둘 다에 부착됨) 위치될 수 있다는 것이(도 4 참조) 명확할 것이다.
- [0066] Htt-표적화된 ZFP의 특이적 예는 본 명세서에 전문이 모든 목적을 위하여 참고로 포함되는 미국 특허 공개 제20130253040호뿐만 아니라 이하의 표 1에 개시되어 있다. 이 표에서 첫 번째 열은 ZFP에 대한 내부 기준 명칭(숫자)이며, 표 2의 1열에서의 동일한 명칭에 대응한다. "F"는 핑거를 지칭하며, "F" 다음의 숫자는 아연 핑거를 지칭한다(예를 들어, "F1"은 핑거 1을 지칭한다).

표 1

[0067]

Htt-표적화된 아연 핑거 단백질						
SBS #	설계					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
18856	RSDDL _{SR} (서열번호 1)	RNDNRTK(서열번호 2)	RSDDL _{TR} (서열번호 3)	RSDDRKT(서열번호 4)	RSADL _{TR} (서열번호 5)	QSSDL _{RR} (서열번호 6)
25920	RSAALS _{SR} (서열번호 7)	RSDALAR(서열번호 8)	RSDNLSE(서열번호 9)	KRCNLRC(서열번호 10)	QSSDL _{RR} (서열번호 6)	해당 없음
25921	WRSCRS _A (서열번호 11)	DRSNLS _R (서열번호 12)	QRTHLTQ(서열번호 13)	RSAHLS _R (서열번호 14)	TSGHLS _R (서열번호 15)	해당 없음
25923	RSDDL _{SR} (서열번호 1)	RNDNRTK(서열번호 2)	WRSCRS _A (서열번호 11)	RSDNLAR(서열번호 16)	QSGHLS _R (서열번호 17)	해당 없음
25922	RSAALS _{SR} (서열번호 7)	RSDALAR(서열번호 8)	RSDNLSE(서열번호 9)	KRCNLRC(서열번호 10)	QSSDL _{SR} (서열번호 18)	DRSHLAR(서열번호 19)
32468	RSDNLAR(서열번호 16)	WRGDRVK(서열번호 20)	DRSNLS _R (서열번호 12)	TSGSL _{TR} (서열번호 21)	ERGTLAR(서열번호 22)	RSDDRKT(서열번호 4)
32501	RSDALS _R (서열번호 23)	DRSHLAR(서열번호 19)	RSDHLS _R (서열번호 24)	QSSDL _{TR} (서열번호 25)	TSGNL _{TR} (서열번호 26)	DRSHLAR(서열번호 19)
31809	RSDDL _{SR} (서열번호 1)	RNDNRTK(서열번호 2)	RSDDL _{TR} (서열번호 3)	RSDDRKT(서열번호 4)	RSDDL _{TR} (서열번호 3)	QSSDL _{RR} (서열번호 6)
32528	QSGHLQR(서열번호 27)	TSGNL _{TR} (서열번호 26)	QSGDL _{TR} (서열번호 28)	DRSHLAR(서열번호 19)	RSDVLST(서열번호 29)	VRSRL _{RR} (서열번호 30)
30580	RSDNLAR(서열번호 16)	WRGDRVK(서열번호 20)	DRSDLS _R (서열번호 31)	RSDALAR(서열번호 8)	ERGTLAR(서열번호 22)	RSDDRKT(서열번호 4)
30929	DRSTLRQ(서열번호 32)	DRSDLS _R (서열번호 31)	QSSTRAR(서열번호 33)	RSDTLSE(서열번호 34)	HRRSRWG(서열번호 35)	해당 없음
32538	DRSDLS _R (서열번호 31)	RRDTLRS(서열번호 36)	RSDHLST(서열번호 37)	QSAHRIT(서열번호 38)	QSGDL _{TR} (서열번호 28)	DRSHLAR(서열번호 19)
32567	RSDHLSE(서열번호 39)	QNAHRKT(서열번호 40)	QSSDL _{SR} (서열번호 18)	HRSTRNR(서열번호 41)	QSSDL _{SR} (서열번호 18)	HRSTRNR(서열번호 41)
29627	DRSNLS _R (서열번호 12)	LRQDLKR(서열번호 42)	DRSHL _{TR} (서열번호 43)	DRSNL _{TR} (서열번호 44)	RSDHLST(서열번호 37)	QSAHRIT(서열번호 38)
29628	TSGNL _{TR} (서열번호 26)	LKQMLAV(서열번호 45)	RSDLSA(서열번호 46)	DRSDLS _R (서열번호 31)	RSDALST(서열번호 47)	DRSTRTK(서열번호 48)
29631	QSSDL _{SR} (서열번호 18)	DRSALAR(서열번호 49)	QSSDL _{SR} (서열번호 18)	QSGHLS _R (서열번호 17)	RSDVLSE(서열번호 50)	TSGHLS _R (서열번호 15)
29632	RSDTLSE(서열번호 34)	KLCNRKC(서열번호 51)	TSGNL _{TR} (서열번호 26)	HRTSLTD(서열번호 52)	RSAHLS _R (서열번호 14)	QSGNLAR(서열번호 53)
29637	DRSNLS _R (서열번호 12)	QSGNLAR(서열번호 53)	DRSNLS _R (서열번호 12)	LKHHLTD(서열번호 54)	QSGDL _{TR} (서열번호 28)	YRWLRNN(서열번호 55)

29638	RSDHLSQ_(서열 번호 56)	RSVRKN_(서열 번호 57)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	WSTSLRA_(서열 번호 58)	해당 없음
25917	DRSNLSR_(서열 번호 12)	QRTHLTQ_(서열 번호 13)	RSSHLSR_(서열 번호 59)	TSGLSR_(서열 번호 60)	TRQNRDT_(서열 번호 61)	해당 없음
25916	DQSTLRN_(서열 번호 62)	RSAALSR_(서열 번호 7)	RSDALAR_(서열 번호 8)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	해당 없음
33074	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)
33080	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSGDLTR_(서열 번호 28)
33084	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)	RSDTLSE_(서열 번호 34)	RRWTLVG_(서열 번호 63)	해당 없음	해당 없음
33088	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)	RSVLRSE_(서열 번호 64)	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)	해당 없음
30643	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)
30648	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)
30645	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	해당 없음
30640	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	해당 없음
30657	RSDTLSE_(서열 번호 34)	RRWTLVG_(서열 번호 63)	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)
30642	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	해당 없음
30646	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	해당 없음
32220	RSDVLRSE_(서열 번호 50)	QSSDLR_(서열 번호 18)	HRSTRNR_(서열 번호 41)	해당 없음	해당 없음	해당 없음
32210	QSGDLTR_(서열 번호 28)	QSSDLR_(서열 번호 18)	QWSTRKR_(서열 번호 65)	해당 없음	해당 없음	해당 없음
32215	RSDNLRE_(서열 번호 66)	RSDNLSE_(서열 번호 9)	KRCNLRC_(서열 번호 10)	해당 없음	해당 없음	해당 없음
30658	QSSDLR_(서열 번호18)	HRSTRNR_(서열 번호41)	QSSDLR_(서열 번호18)	HRSTRNR_(서열 번호41)	QSSDLR_(서열 번호18)	해당 없음
32218	QSSDLR_(서열 번호 18)	QSSDLR_(서열 번호 18)	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음
32427	ERGTLAR_(서열 번호22)	TSGSLTR_(서열 번호21)	RSDNLAR_(서열 번호16)	DPSNRVG_(서열 번호67)	RSDDLSK_(서열 번호68)	DNSNRIRK_(서열 번호69)

32653	RSDHLSR_(서열 번호 39)	QSGHLSR_(서열 번호 17)	RSDDLTR_(서열 번호 3)	YRWLLRS_(서열 번호 70)	QSSDLSR_(서열 번호 18)	RKDALVA_(서열 번호 71)
32677	QSGDLTR_(서열 번호 28)	RRADLSR_(서열 번호 72)	DRSHLTR_(서열 번호 43)	DRSHLAR_(서열 번호 19)	DRSNLSR_(서열 번호 12)	LAQPRNK_(서열 번호 73)
33560	ERGTLAR_(서열 번호22)	QSGSLTR_(서열 번호74)	RSDNLAR_(서열 번호16)	DDSHRKD_(서열 번호75)	RSDDLK_(서열 번호68)	DNSNRIK_(서열 번호69)
33583	DRSNLSR_(서열 번호12)	HKQHRDA_(서열 번호76)	DRSDLSR_(서열 번호31)	RRTDLRR_(서열 번호77)	RSANLAR_(서열 번호78)	DRSHLAR_(서열 번호19)
32685	RSDHLSA_(서열 번호 79)	RSADRTR_(서열 번호 80)	RSDVLSE_(서열 번호 50)	TSGHLSR_(서열 번호 15)	RSDDLTR_(서열 번호 3)	TSSDRKK_(서열 번호 81)
32422	RSANLAR_(서열 번호 78)	RSDDLTR_(서열 번호 3)	RSDTLSE_(서열 번호 34)	HHSARRC_(서열 번호 82)	ERGTLAR_(서열 번호 22)	DRSNLTR_(서열 번호 44)
32428	RSDVLST_(서열 번호 29)	DNSSRTR_(서열 번호 83)	DRSNLSR_(서열 번호 12)	HKQHRDA_(서열 번호 76)	DRSDLSR_(서열 번호 31)	RRTDLRR_(서열 번호 77)
32430	RSDVLST_(서열 번호 29)	VRSRLRR_(서열 번호 30)	ERGTLAR_(서열 번호 22)	TSGSLTR_(서열 번호 21)	RSDNLAR_(서열 번호 16)	DPSNRVG_(서열 번호 67)
32432	RSDVLST_(서열 번호 29)	VRSRLRR_(서열 번호 30)	ERGTLAR_(서열 번호 22)	TSGSLTR_(서열 번호 21)	RSDHLSA_(서열 번호 79)	RSADLSR_(서열 번호 84)
32714	RSDVLST_(서열 번호 29)	DNSSRTR_(서열 번호 83)	ERGTLAR_(서열 번호 22)	QSGNLAR_(서열 번호 53)	DRSHLTR_(서열 번호 43)	RNDDRKK_(서열 번호 85)
32733	DRSNLSR_(서열 번호 12)	QKVTLAA_(서열 번호 86)	RAHLSR_(서열 번호 14)	TSGNLTR_(서열 번호 26)	DRSDLSR_(서열 번호 31)	RRSTLRS_(서열 번호 87)
30901	DRSALS_(서열 번호 88)	QSGSLTR_(서열 번호 74)	QSSDLSR_(서열 번호 18)	LKWNLRT_(서열 번호 89)	RSDNLAR_(서열 번호 16)	LKWDRQT_(서열 번호 90)
31952	QSGALAR_(서열 번호91)	RSDDLTR_(서열 번호3)	DRSALS_(서열 번호88)	RSDHLTQ_(서열 번호92)	QSGDLTR_(서열 번호28)	WSTSLRA_(서열 번호58)
31921	RSDSLR_(서열 번호93)	RSDDLTR_(서열 번호3)	QSGDLTR_(서열 번호28)	RRDWLPQ_(서열 번호94)	DRSNLSR_(서열 번호12)	RSDDRKT_(서열 번호4)
30906	DRSHLSR_(서열 번호 95)	TSGNLTR_(서열 번호 26)	QSGDLTR_(서열 번호 28)	DRSHLAR_(서열 번호 19)	RSDVLST_(서열 번호 29)	VRSRLRR_(서열 번호 30)

[0068] 이들 단백질의 표적 부위에 대한 서열 및 위치를 표 2에 개시한다. ZFP 인식 나선에 의해 접촉된 표적 부위 내 뉴클레오타이드는 대문자로 나타내고; 비-접촉 뉴클레오타이드는 소문자로 나타낸다.

표 2

인간 및 마우스 Htt에 대한 표적 부위

SBS #	표적 부위
18856	AcGCTGCGCCGGCGGAGGCGgggccgcg (서열번호 96)
25920	gcGCTCAGCAGGTGGTGaccttgtggac_ (서열번호 97)
25921	atGGTGGGAGAGACTGTgaggcggcagc_ (서열번호 98)
25923	tgGGAGAGacTGTGAGGCGgcagctggg (서열번호 99)
25922	atGGCGCTCAGCAGGTGGTGaccttgtg_ (서열번호 100)
32468	agCCGGCCGTGGACTCTGAGccgaggtg_ (서열번호 101)
32427	cgCACTCGcCGCGAGgGTTGCCgggacg_ (서열번호 102)
32501	gtGGCGATGCGGGGGCGTGgtgaggtg_ (서열번호 103)
31809	acGCTGCGCCGGCGGAGGCGgggccgcg_ (서열번호 96)
32528	ccGGGACGGGTCCAaGATGGAcggccgc_ (서열번호 104)
30580	agCCGGCCGTGGACTCTGAGccgaggtg_ (서열번호 101)

[0069]

30929	ccGTCCCGGCAGCCCCacggcgcccttg_	(서열번호 105)
30658	ctGCTGCTGCTGCTGCTgctggaaggac_	(서열번호 106)
32538	cgGGTCCAAGATGGACGGCCgctcaggt_	(서열번호 107)
32567	ctGCTGCTGCTGCTGGAAGacttgagg_	(서열번호 108)
29627	tcAGATGGGACGGCGCTGACctggctgg_	(서열번호 109)
29628	ctGCCATGGACCTGAATGAtgggacca_	(서열번호 110)
29631	gtGGTCTGGGAGCTGTGCTgatgggcg_	(서열번호 111)
29632	ccGAAGGGCCTGATtCAGCTGttacccc_	(서열번호 112)
29637	aaCTTGCAAGTAACaGAAGACtcatcct_	(서열번호 113)
29638	ctTGTACAGCTGTGAGGgtgagcataat_	(서열번호 114)
25917	gcCATGGTGGGAGAGACTgtgaggcggc_	(서열번호 115)
25916	ctCAGCAGGTGGTGACcttgtggacatt_	(서열번호 116)
33074	agCAGCAGcaGCAGCagCAGCagcagca_	(서열번호 117)
33080	caGCAGCagCAGCAGcaGCAGCagcagc_	(서열번호 118)
33084	tgCTGCTGctGCTGCTgctgctggaagg_	(서열번호 119)
33088	ctGCTGCTgCTGctGCTGCTgctggaag_	(서열번호 120)
30643	caGCAGCAGCAGCagCAGCagcagcagc_	(서열번호 118)
30648	agCAGCAGCAGCAGCAGCagcagcagca_	(서열번호 117)
30645	caGCAGCAGCagCAGCAGcagcagcagc_	(서열번호 118)
30640	caGCAGCAGCAGCAGCagcagcagcagc_	(서열번호 118)
30657	ctGCTGCTGCTGCTgCTGCTGgaaggac_	(서열번호 106)
30642	caGCAGCAGCAGCAGCagcagcagcagc_	(서열번호 118)
30646	caGCAGCAGCagCAGCAGcagcagcagc_	(서열번호 118)
32220	ctGCTGCTgCTGctgctgctgctggaagg_	(서열번호 121)
32210	caGCAGCAGCagcagcagcagcagcagc_	(서열번호 118)
32215	agCAGCAGCAGcagcagcagcagcagca_	(서열번호 117)
32218	tGCTGCTgctgctgctgctgctggaagg_	(서열번호 122)
32653	ggCTGGCTTTTGCGGGAAGggcggggc_	(서열번호 123)
32677	gaATTGACaGGCGGAtGCGTCGtcctct_	(서열번호 124)
33560	cgCACTCGcCGCAGgGTTGCCgggacg_	(서열번호 102)
33583	gcGGCGAGtGCGTCCCGTGACgtcatgc_	(서열번호 103)
32685	atTCTGCGGGTCTGGCGTGGcctcgtct_	(서열번호 104)
32422	gtGACGTCATGCCGGCGGAGacgaggcc_	(서열번호 105)
32428	gtGCGTCCCGTGACGTCATGccggcgga_	(서열번호 106)
32430	gcCGCGAGgGTTGCCGGGACGggcccaa_	(서열번호 107)
32432	ccGCAGAGGTTGCCGGGACGggcccaa_	(서열번호 108)
32714	caTCGGGCagGAAGCCGTATGgcaacc_	(서열번호 109)
32733	tcCTGCCCCGATGGGACAGACcctgaaga_	(서열번호 110)
30901	gtACTGAGcAATGCTGTAGTCagcaatc_	(서열번호 111)
31952	ccTGTCCAagAGGGTCGCGGTAcctccct_	(서열번호 112)
31921	tgCCCGACCTGGCAGCGCGGtggtgggc_	(서열번호 113)
30906	ccGGGACGGGTCCAaGATGGACggccgc_	(서열번호 104)

[0070]

[0071]

특정 실시형태에서, DNA-결합 도메인은 천연 유래 또는 공학처리된 (비-천연 유래) TAL 효과기(TALE) DNA 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제8,586,526호 참조.

[0072]

산토모나스속(*Xanthomonas*)의 식물 병원성 박테리아는 중요한 작물 식물에서 다수의 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. 산토모나스속의 병원성은 식물 세포 내로 25종 초과 효과기 단백질을 주입하는 보존된 III형 분비(T3S) 시스템에 의존한다. 이들 주입된 단백질 중에 식물 전사 활성체를 모방하고 식물 전사체를 조작하는 전사 활성체-유사 효과기(TALE)가 있다(문헌[Kay *et al* (2007) *Science* 318:648-651]). 이들 단백질은 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 함유한다. 가장 잘 특성규명된 TALE 중 하나는 산토모나스속 캄페스트그리스 병원형 베시카토리아(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)로부터 유래된 AvrBs3이다(문헌[Bonas *et al* (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136] 및 W02010079430 참조). TALE는 종열 반복부의 집중된 도메인을 함유하며, 각각의 반복부는 이들 단백질의 DNA 결합 특이성에 중요한 대략 34개의 아미노산을 함유한다. 추가로, 그들은 핵 국소화 서열 및 산성 전사 활성화 도메인을 함유한다(검토를 위해 문헌[Schornack S, *et al*

(2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272] 참조). 추가로, 식물병원성 박테리아에서, 랄스토니아 소라나세아룸 (*R. solanacearum*) 생리적 변이체(biovar) 1 균주 GMI1000 내의 그리고 생리적 변이체 4 균주 RS1000 내의 산토모나스속의 AvrBs3 패밀리에 대해 상동성인 랄스토니아 소라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*) 2개 유전자 (brg11 및 hpx17로 표기됨)가 발견되었다(문헌[Heuer *et al* (2007) *Appl and Envir Micro* 73(13): 4379-4384] 참조). 이들 유전자는 서로에 대해 뉴클레오타이드 서열이 98.9% 동일하지만, hpx17의 반복부 도메인에서 1,575 bp의 결실만큼 상이하다. 그러나, 유전자 산물은 둘 다 산토모나스속의 AvrBs3 패밀리에 단백질과 40% 미만의 서열 동일성을 가진다.

[0073] 이들 TALE의 특이성은 종열 반복부에서 발견되는 서열에 의존한다. 반복된 서열은 대략 102bp를 포함하고, 반복부는 전형적으로 서로 91 내지 100% 상동성이다(Bonas *et al*, 이하 참조). 반복부의 다형성은 보통 위치 12 및 13에 위치되고, TALE의 표적 서열에서 연속적 뉴클레오타이드의 동일성을 지니는 위치 12 및 13에서 추가변 2잔기의 동일성 간에 1 대 1 대응이 되는 것으로 나타난다(문헌[Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501 및 Boch *et al* (2009) *Science* 326:1509-1512] 참조). 실험적으로, 이들 TALE의 DNA 인식을 위한 암호는, 위치 12 및 13에서 HD 서열이 사이토신(C)에 대한 결함을 야기하고, NG가 T에 대해, NI가 A, C, G 또는 T에 대해 결함하며, NN이 A 또는 G에 결함하고, NG가 T에 대한 결함을 야기하도록 결정되었다. 이들 DNA 결함 반복부는 새로운 조합 및 수의 반복부를 지니는 단백질에 조립되어 새로운 서열과 상호작용할 수 있는 인공 전사 인자를 만들었다. 추가로, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제8,586,526호 및 미국 특허 공개 제20130196373호는 N-캡 폴리펩타이드, C-캡 폴리펩타이드(예를 들어, +63, +231 또는 +278) 및/또는 신규한(비전형적) RVD를 지니는 TALE을 기재한다.

[0074] 예시적인 TALE은 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 공개 제20130253040호 및 이하의 표 3에 기재되어 있다.

[0075] 시험한 TALE TF에 대한 표적 및 수치적 식별자는 이하의 표 3에 나타낸다. 수치적 식별자는 "SBS#"로 표지하고, 센스(Sense) 또는 안티센스(Antisense) 가닥에 대한 특이성("S/A")뿐만 아니라 표적, 반복부 단위 또는 RVD의 수 및 C-말단의 유형이 표시된다.

표 3

[0076]

Htt 특이적 TALE-TF					
SBS#	S/A	표적(5'-3')	서열번호	RVD	C 말단
102449	S	gcAGCAGCAGCAGCAGCgca	114	17	+63
102450	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+63
102451	S	gcAGCAGCAGCAGca	116	11	+63
102452	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+63
102453	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	118	17	+63
102454	A	ctGCTGCTGCTGCTGctg	119	14	+63
102455	A	ctGCTGCTGCTGctg	120	11	+63
102456	A	ctGCTGCTGctg	121	8	+63
102457	S	gcAGCAGCAGCAGCAGCgca	114	17	+231
102458	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+231
102459	S	gcAGCAGCAGCAGca	116	11	+231
102460	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+231
102462	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	119	14	+231
102463	A	ctGCTGCTGCTGCTg	120	11	+231
102464	A	ctGCTGCTGctg	121	8	+231
102466	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+278
102467	S	gcAGCAGCAGCAGca	116	11	+278
102468	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+278
102469	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	118	17	+278
102470	A	ctGCTGCTGCTGCTGctg	119	14	+278
102471	A	ctGCTGCTGCTGctg	120	11	+278
102472	A	ctGCTGCTGctg	121	8	+278

[0077] 특정 실시형태에서, DNA 결함 도메인은 이량체화 및/또는 다량체화 도메인, 예를 들어 꼬인나선(coiled-coil:

CC) 및 이량체화 아연 핑거(dimerizing zinc finger: DZ)를 포함한다. 미국 특허 공개 제20130253040호 참조.

[0078] 진핵생물 RNAi 경로와 유사한 것으로 가설을 세운 고세균 및 다수의 박테리아에서 RNA-매개 게놈 방어 경로의 존재에 대한 유력한 증거가 최근에 나타났다(검토를 위해, 문헌[Godde and Bickerton, 2006. *J. Mol. Evol.* 62: 718-729; Lillestol *et al.*, 2006. *Archaea* 2: 59-72; Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7.; Sorek *et al.*, 2008. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 181-186] 참조). CRISPR-Cas 시스템 또는 원핵세포 RNAi(pRNA i)로서 알려진, 상기 경로는 두 진화론적으로 그리고 종종 신체적으로 연결된 유전자 좌위로부터 생기는 것으로 제안되었다: 시스템의 RNA 구성성분을 암호화하는 CRISPR(주기적 간격으로 분포하는 짧은 회문구조 반복부 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)) 좌위, 및 단백질을 암호화하는 cas(CRISPR-관련) 좌위(Jansen *et al.*, 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova *et al.*, 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft *et al.*, 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60). 미생물 숙주의 CRISPR 좌위는 CRISPR-관련(Cas) 유전자뿐만 아니라 CRISPR-매개 핵산 절단의 특이성을 프로그래밍할 수 있는 비-암호 RNA 요소의 조합을 함유한다. 개개 Cas 단백질은 진핵생물 RNAi 기작의 단백질 구성성분과 상당한 서열 유사성을 공유하지 않지만, 유사한 예측된 기능(예를 들어, RNA 결합, 뉴클레아제, 헬리카제 등)을 가진다(Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7). CRISPR-관련(cas) 유전자는 종종 CRISPR 반복부-스페이서 배열과 관련된다. 40종 초과와 상이한 Cas 단백질 패밀리가 기재되었다. 이들 단백질 패밀리 중에서, Cas1은 상이한 CRISPR/Cas 시스템 중에서 흔한 것으로 나타났다. cas 유전자 및 반복부 구조의 특정 조합은 8종의 CRISPR 아형(*E. coli*, *Y. pestis*, *N. meningitidis*, *D. vulgaris*, *T. neapoliensis*, *H. maris*, *A. pernix* 및 *M. tuberculosis*)을 정하기 위해 사용되었고, 이 중 일부는 반복부-관련 미스테리우스 단백질(repeat-associated mysterious protein: RAMP)을 암호화하는 추가적인 유전자 모듈과 관련된다. 1개 초과와 CRISPR 아형은 단일 게놈에서 생길 수 있다. CRISPR/Cas 아형의 산발적 분포는 미생물 진화 동안 시스템에 수평적으로 유전자를 전달한다는 것을 시사한다.

[0079] 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*)에서 처음 설명된 II형 CRISPR는 가장 잘 특성규명된 시스템 중 하나이며, 4개의 연속적 단계에서 표적화된 DNA 이중 가닥 파손을 수행한다. 처음에, 2개의 비-암호화 RNA, 즉, 프래-crRNA(pre-crRNA) 배열 및 tracrRNA는 CRISPR 좌위로부터 전사된다. 둘째로, tracrRNA는 프래-crRNA의 반복부 영역을 혼성화하고, 프래-crRNA의 개개 스페이서 서열을 함유하는 성숙 crRNA로의 가공을 매개하는데, 여기서 가공은 Cas9 단백질의 존재에서 이중 가닥-특이적 RNase III에 의해 일어난다. 셋째로, 성숙 crRNA:tracrRNA 복합체는 crRNA에 대한 스페이서와, 표적 인식에 대한 추가적인 필요가 있는 프로토스페이서 인접 모티프(proto-spacer adjacent motif: PAM) 다음의 표적 DNA 상의 프로토스페이서 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍을 통해 Cas9를 표적 DNA로 보낸다. 추가로, tracrRNA는 또한 그의 3' 말단에서 crRNA와 염기쌍을 형성함에 따라 제공되어야 하며, 이 회합은 Cas9 활성을 촉발한다. 최종적으로, Cas9는 표적 DNA의 절단을 매개하여 프로토스페이서 내의 이중-가닥 파손을 생성한다. CRISPR/Cas 시스템의 활성은 3단계를 포함한다: (i) '적응'으로 불리는 과정에서 장래의 공격을 방지하기 위해 이질적 DNA 서열의 CRISPR 배열 내로의 삽입, (ii) 적절한 단백질의 발현뿐만 아니라 배열의 발현 및 가공, 이어서 (iii) 이질적 핵산에 의한 RNA-매개 간섭. 따라서, 박테리아 세포에서, 'Cas' 단백질로 불리는 몇몇은 CRISPR/Cas 시스템의 천연 기능과 연루된다.

[0080] II형 CRISPR 시스템은 다수의 상이한 박테리아에서 발견되었다. 발견된 폰파라(Fonfara) 등((2013) *Nuc Acid Res* 42(4):2377-2590)에 의해 공개적으로 입수가능한 게놈에 대한 BLAST 검색은 347종의 박테리아에서 Cas9 오솔로그를 발견하였다. 추가적으로, 이 그룹은 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 뮤탄스(*S. mutans*), 스트렙토코커스 써모필루스(*S. thermophilus*), 캄필로박터 제주니(*C. jejuni*), 네이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*), 파스티렐라 물토시다(*P. multocida*) 및 프란시셀라 노비시다(*F. novicida*)로부터의 Cas9 오솔로그를 이용하는 DNA 표적의 시험관내 CRISPR/Cas 절단을 입증하였다. 따라서, 용어 "Cas9"는 DNA 결합 도메인을 포함하는 RNA 가이드 DNA 뉴클레아제 및 2개의 뉴클레아제 도메인을 지칭하며, 여기서 Cas9를 암호화하는 유전자는 임의의 적합한 박테리아로부터 유래될 수 있다.

[0081] Cas9 단백질은 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인을 가지며: 하나의 뉴클레아제 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 유사한 반면, 다른 하나는 Ruv 엔도뉴클레아제 도메인과 유사하다. HNH-형 도메인은 crRNA에 대해 상보성인 DNA 가닥을 절단하는 것을 초래하는 것으로 나타난 반면, Ruv 도메인은 비-상보성 가닥을 절단한다. 뉴클레아제 도메인 중 하나만이 기능성이 되도록 Cas 9 뉴클레아제가 공학처리되어 Cas 틱내기효소를 생성할 수 있다(문헌 [Jinek *et al.*], 이하 참조). 틱내기효소는 효소의 촉매적 도메인에서 아미노산의 특이적 돌연변이에 의해, 또는 더 이상 기능적이지 않도록 도메인의 부분 또는 모두의 절단에 의해 생성될 수 있다. Cas 9는 2개의 뉴클레아제 도메인을 포함하기 때문에, 이 접근은 도메인 중 하나에 대해 취해질 수 있다. 이중 가닥 파손은 2개의 이러한 Cas 9 틱내기효소의 사용에 의해 표적 DNA에서 달성될 수 있다. 틱내기효소는 DNA의 한 가닥을 각각 절단할 것

이고, 2개의 사용은 이중 가닥 파손을 생성할 것이다.

- [0082] crRNA-tracrRNA 복합체의 필요는 crRNA 및 tracrRNA의 어닐링에 의해 정상적으로 형성된 헤어핀을 포함하는 공학처리된 "단일-가이드 RNA"(sgRNA)의 사용에 의해 회피될 수 있다(문헌[Jinek *et al* (2012) *Science* 337:816 및 Cong *et al* (2013) *Scienceexpress*/10.1126/science.1231143] 참조). 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*)에서, 이중 가닥 RNA:DNA 이형이량체가 Cas 관련 RNA와 표적 DNA 사이에 형성될 때, 공학처리된 tracrRNA:crRNA 융합, 또는 sgRNA는 표적 DNA를 절단하도록 Cas9를 가이드한다. Cas9 단백질, 및 PAM 서열을 함유하는 공학처리된 sgRNA를 포함하는 이 시스템은 RNA 가이드 게놈 편집을 위해 사용되었고(문헌[Ramalingam], 이하 참조) ZFN 및 TALEN과 유사한 편집 효율을 지니는 생체내의 제브라피쉬 배아 게놈 편집을 위해 사용되었다(문헌[Hwang *et al* (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227] 참조).
- [0083] CRISPR 좌위의 1차 생성물은 침략자 표적화 서열을 함유하고 경로에서 가설로 세워진 역할에 기반하여 가이드 RNA 또는 원핵세포 침묵 RNA(psiRNA)로 칭해지는 짧은 RNA가 되는 것으로 나타난다(Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Hale *et al.*, 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). RNA 분석은 CRISPR 좌위 전사체가 반복부 서열 내에서 절단되어 개개 침략자 표적화 서열 및 측접 반복부 단편을 함유하는 대략 60- 내지 70-nt RNA 중간체를 방출한다는 것을 나타낸다(Tang *et al.* 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 7536-7541; Tang *et al.*, 2005. *Mol. Microbiol.* 55: 469-481; Lillestol *et al.* 2006. *Archaea* 2: 59-72; Brouns *et al.* 2008. *Science* 321: 960-964; Hale *et al.*, 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). 고세균 파이로코커스 퓨리오서스(*Pyrococcus furiosus*)에서, 이들 중간체 RNA는 풍부하고, 안정한 대략 35- 내지 45-nt 성숙 psiRNA로 가공된다(Hale *et al.* 2008. *RNA*, 14: 2572-2579).
- [0084] crRNA-tracrRNA 복합체의 필요는 crRNA 및 tracrRNA의 어닐링에 의해 정상적으로 형성된 헤어핀을 포함하는 공학처리된 "단일-가이드 RNA"(sgRNA)의 사용에 의해 회피될 수 있다(문헌[Jinek *et al* (2012) *Science* 337:816 및 Cong *et al* (2013) *Scienceexpress*/10.1126/science.1231143] 참조). 스트렙토코커스 피오게네스에서, 이중 가닥 RNA:DNA 이형이량체가 Cas 관련 RNA와 표적 DNA 사이에 형성될 때, 공학처리된 tracrRNA:crRNA 융합, 또는 sgRNA는 표적 DNA를 절단하도록 Cas9를 가이드한다. Cas9 단백질, 및 PAM 서열을 함유하는 공학처리된 sgRNA를 포함하는 이 시스템은 RNA 가이드 게놈 편집을 위해 사용되었고(문헌[Ramalingam], 이하 참조) ZFN 및 TALEN과 유사한 편집 효율을 지니는 생체내의 제브라피쉬 배아 게놈 편집을 위해 사용되었다(문헌[Hwang *et al* (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227] 참조).
- [0085] 키메라 또는 sgRNA는 임의의 목적으로 하는 표적에 대해 상보성인 서열을 포함하도록 공학처리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열은 길이로 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 이상의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열은 길이로 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 이하의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, RNA는 표적에 대해 상보성의 그리고 G[n19]의 형태의 22개 염기, 다음에 스트렙토코커스 피오게네스 CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하기 위한 형태 NGG 또는 NAG의 프로토스페이서-인접 모티프(PAM)를 포함한다. 따라서, 일 방법에서, sgRNA는 (i) 적절한 게놈(인간, 마우스 또는 특정 식물 중)의 기준 서열을 이용하여 ZFN 이형이량체의 인식 서열을 정렬하는 것; (ii) ZFN 절반-부위 사이의 스페이서 영역을 동정하는 것; (iii) 스페이서 영역에 가까운 모티프 G[N20]GG의 위치를 동정하는 것(1개 초과와 이러한 모티프가 스페이서와 중복될 때, 스페이서에 대해 집중된 모티프가 선택됨); (iv) sgRNA의 코어로서 모티프를 이용하는 것에 의한 관심 대상의 유전자에서 알려진 ZFN 표적의 이용에 의해 설계될 수 있다. 이 방법은 유리하게는 증명된 뉴클레아제 표적에 의존한다. 대안적으로, sgRNA는 G[n20]GG 식에 따르는 적합한 표적 서열을 동정함으로써 간단히 관심 대상의 임의의 영역을 표적화하도록 설계될 수 있다. 상보성 영역과 마찬가지로, sgRNA는 sgRNA의 tracrRNA 부분의 꼬리 영역으로 연장하는 추가적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다(문헌[Hsu *et al* (2013) *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt.2647] 참조). 꼬리는 +67 내지 +85개의 뉴클레오타이드, 또는 그 사이의 임의의 수로 +85개 뉴클레오타이드의 바람직한 길이를 가질 수 있다. 절단된 sgRNA, 즉, "tru-gRNA"가 또한 사용될 수 있다(문헌[Fu *et al.* (2014) *Nature Biotech* 32(3): 279] 참조). tru-gRNA에서, 상보성 영역은 길이로 17 또는 18개 뉴클레오타이드로 감소된다.
- [0086] 추가로, 대안의 PAM 서열이 또한 이용될 수 있으며, 여기서 PAM 서열은 피오게네스 Cas9를 이용하여 NGG에 대한 대안으로서 NAG일 수 있다(Hsu 2014, 이하 참조). 추가적인 PAM 서열은 또한 처음의 G가 없는 것을 포함할 수 있다(Sander and Joung (2014) *Nature Biotech* 32(4):347). 스트렙토코커스 피오게네스 암호화 Cas9 PAM 서열에 추가로, 다른 박테리아원으로부터 유래된 Cas9 단백질에 특이적인 다른 PAM 서열이 사용될 수 있다. 예를 들어, 이하에 나타내는 PAM 서열(문헌[Sander and Joung], 이하 참조, 및 문헌[Esvelt *et al.* (2013) *Nat Meth*

10(11):1116]으로부터 적합화)은 이들 Cas9 단백질에 특이적이다:

[0087]	종	PAM
[0088]	스트렙토코커스 피오게네스	NGG
[0089]	스트렙토코커스 피오게네스	NAG
[0090]	스트렙토코커스 류탄스	NGG
[0091]	스트렙토코커스 써모필루스	NGGNG
[0092]	스트렙토코커스 써모필루스	NNAAAW
[0093]	스트렙토코커스 써모필루스	NNAGAA
[0094]	스트렙토코커스 써모필루스	NNNGATT
[0095]	캠필로박터 제주니	NNNNACA
[0096]	네이세리아 메닌기티디스	NNNGATT
[0097]	파스퇴렐라 물토시다	GNNNCNNA
[0098]	프란시셀라 노비시다	NG
[0099]	따라서, 스트렙토코커스 피오게네스 CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하는데 적합한 표적 서열은 다음의 가이드라인에 따라 선택될 수 있다: [n17, n18, n19 또는 n20](G/A)G. 대안적으로, PAM 서열은 가이드라인 G[n17, n18, n19, n20](G/A)G에 따를 수 있다. 비-스트렙토코커스 피오게네스 박테리아로부터 유래된 Cas9 단백질에 대해, 교번의 PAM이 스트렙토코커스 피오게네스 PAM 서열로 치환되는 동일한 가이드라인이 사용될 수 있다.	
[0100]	잠재적인 표적을 벗어난 서열을 회피하는 특이성의 가장 높은 가능성을 지니는 표적 서열을 선택하는 것이 가장 바람직하다. 이들 원치않는 표적을 벗어난 서열은 다음의 속성을 고려함으로써 동정될 수 있다: i) 표적 서열 다음에, 이용 중인 Cas9 단백질과 함께 기능하는 것으로 알려진 PAM 서열에서의 유사성; ii) 목적으로 하는 표적 서열로부터 3개 미만의 미스매치를 지니는 유사한 표적 서열; iii) ii)에서와 같은 유사한 표적 서열, 여기서 미스매치는 PAM 근위 영역보다는 PAM 원위 영역에 모두 위치됨(때때로 '과중' 영역으로서 지칭되는(Wu <i>et al</i> (2014) <i>Nature Biotech</i> doi:10.1038/nbt2889) PAM에 바로 인접하거나 또는 근위인 뉴클레오타이드 1 내지 5는 인식을 위해 가장 중요하다는 일부 증거가 있으며, 따라서 과중 영역에 위치된 미스매치를 지니는 추정적인 표적을 벗어난 부위는 sg RNA에 의해 인식될 가능성이 가장 적을 수 있다); 및 iv) 미스매치가 연속적으로 이격되어 있지 않거나 또는 4개 초과 뉴클레오타이드만큼 떨어져서 이격된 유사한 표적 서열(Hsu 2014, 이하 참조). 따라서, CRISPR/Cas 시스템을 사용 중인 게놈 내의 잠재적 표적을 벗어난 부위 수의 분석을 수행함으로써, 상기의 이들 기준을 이용하여, sgRNA에 대한 적합한 표적 서열이 동정될 수 있다.	
[0101]	특정 실시형태에서, Cas 단백질은 천연 유래 Cas 단백질의 "기능성 유도체"일 수 있다. 천연 서열 폴리펩타이드의 "기능성 유도체"는 천연 서열 폴리펩타이드와 마찬가지로 정량적 생물학적 특성을 갖는 화합물이다. "기능성 유도체"는 천연 서열의 단편 및 천연 서열 폴리펩타이드의 유도체 및 그의 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 단, 그들은 대응하는 천연 서열 폴리펩타이드와 마찬가지로 생물학적 활성을 가진다. 본 명세서에 상정된 생물학적 활성은 DNA 기질을 단편으로 가수분해하는 기능적 유도체의 능력이다. 용어 "유도체"는 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체, 공유적 변형과 이의 융합을 포함한다. 일부 양상에서, 기능적 유도체는 천연 유래 Cas 단백질의 단일 생물학적 특성을 포함할 수 있다. 다른 양상에서, 기능적 유도체는 천연 유래 Cas 단백질의 생물학적 특성의 서브세트를 포함할 수 있다. Cas 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 적합한 유도체는 돌연변이체, 융합, Cas 단백질의 공유적 변형 또는 이들의 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. Cas 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 Cas 단백질뿐만 아니라 Cas 단백질의 유도체 또는 이의 단편은 세포로부터 또는 화학적 합성 또는 이들 두 절차의 조합에 의해 얻을 수 있다. 세포는 Cas 단백질을 천연으로 생성하는 세포, 또는 Cas 단백질을 천연으로 생성하고 더 높은 발현 수준에서 내인성 Cas 단백질을 생성하도록 또는 외인성으로 도입된 핵산으로부터 Cas 단백질을 생성하도록 유전자 공학처리된 세포일 수 있으며, 이 핵산은 내인성 Cas와 동일 또는 상이한 Cas를 암호화한다. 일부 경우에, 상기 세포는 Cas 단백질을 천연으로 생성하지 않으며, Cas 단백질을 생성하도록 유전자 공학처리된다.	
[0102]	특이적 유전자에 표적화된 예시적인 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은, 예를 들어, 미국 가출원 특허 제	

61/823,689호에 개시되어 있다.

- [0103] 따라서, 뉴클레아제는 DNA를 절단하는 뉴클레아제 도메인과 조합하여 공여체(이식유전자)를 삽입하도록 요망되는 임의의 유전자 내의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함한다.
- [0104] **융합 분자**
- [0105] DNA-결합 도메인은 본 명세서에 기재된 방법에서 사용하기 위한 임의의 추가적인 분자(예를 들어, 폴리펩타이드)에 융합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 적어도 하나의 DNA-결합 분자(예를 들어, ZFP, TALE 또는 단일 가이드 RNA) 및 비상동성 조절(기능적) 도메인(또는 이의 기능적 단편)을 포함하는 융합 분자를 사용한다.
- [0106] 특정 실시형태에서, 기능적 도메인은 전사 조절 도메인을 포함한다. 공통 도메인은, 예를 들어, 전사 인자 도메인(활성체, 리프레서, 공-활성체, 공-리프레서), 사일런서, 발암유전자(예를 들어, myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos 패밀리의 구성원 등); DNA 수선 효소 및 그들의 관련된 인자 및 변형자; DNA 재배열 효소 및 그들의 관련된 인자 및 변형자; 염색질 관련 단백질 및 그들의 변형자(예를 들어, 키나제, 아세틸라제 및 데아세틸라제); 및 DNA 변형 효소(예를 들어, 메틸전달효소, 토포아이스오머라제, 헬리카제, 리가제, 키나제, 포스포타제, 중합효소, 엔도뉴클레아제) 및 그들의 관련된 인자 및 변형자를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 공개 제20130253040호 참조.
- [0107] 활성화를 달성하기 위한 적합한 도메인은 HSV VP16 활성화 도메인(예를 들어, 문헌[Hagmann *et al.*, *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)] 참조) 핵 호르몬 수용체(예를 들어, 문헌[Torchia *et al.*, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)] 참조); 핵 인자 카파 B의 p65 서브유닛(Bitko & Barik, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) 및 Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)), 또는 인공 키메라 기능적 도메인, 예컨대 VP64 (Beerli *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33), 및 데그론(degron)(Molinari *et al.*, (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447)을 포함한다. 추가적인 예시적인 활성화 도메인은 Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2 및 CTF1(문헌[Seipel *et al.*, *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)])뿐만 아니라 p300, CBP, PCAF, SRC1, P/CAF, AtHD2A 및 ERF-2를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Robyr *et al.* (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347; Collingwood *et al.* (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275; Leo *et al.* (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna *et al.* (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik *et al.* (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; 및 Lemon *et al.* (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504] 참조. 추가적인 예시적인 활성화 도메인은 OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7, 및 -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, 및 TRAB1을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Ogawa *et al.* (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami *et al.* (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulmason *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels *et al.* (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; 및 Hobo *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353] 참조.
- [0108] 예시적인 억제 도메인은 KRAB A/B, KOX, TGF-베타-유도성 초기 유전자 (TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, DNMT 패밀리의 구성원(예를 들어, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb 및 MeCP2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Bird *et al.* (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler *et al.* (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler *et al.* (1999) *Cell* 99:447-450; 및 Robertson *et al.* (2000) *Nature Genet.* 25:338-342] 참조. 추가적인 예시적인 억제 도메인은 ROM2 및 AtHD2A를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Chem *et al.* (1996) *Plant Cell* 8:305-321; 및 Wu *et al.* (2000) *Plant J.* 22:19-27] 참조.
- [0109] 융합 분자는 당업자에게 잘 공지된 클로닝 및 생화학적 컨주게이션 방법에 의해 구성된다. 융합 분자는 DNA-결합 도메인 및 기능적 도메인(예를 들어, 전사 활성화 또는 억제 도메인)을 포함한다. 융합 분자는 또한 선택적으로 핵 국소화 신호(예를 들어, SV40 배지 T-항원으로부터 유래) 및 에피토프 태그(예를 들어, FLAG 및 혈구응집소)를 포함한다. 번역 리딩 프레임이 융합의 구성성분 중에서 보존되도록 융합 단백질(및 이를 암호화하는 핵산)이 설계된다.
- [0110] 한편으로 기능적 도메인(또는 이의 기능적 단편)의 폴리펩타이드 구성성분과 다른 한편으로 비-단백질 DNA-결합 도메인(예를 들어, 항생제, 삽입제, 소음 결합제, 핵산) 사이의 융합은 당업자에게 공지된 생화학적 컨주게이션 방법에 의해 구성된다. 예를 들어, 피어스 케미컬 컴퍼니(Pierce Chemical Company)(일리노이주 락포드에 소재)

카탈로그. 소름 결합제와 폴리펩타이드 사이의 융합을 생성하기 위한 방법 및 조성물이 기재되었다. 문헌[Mapp *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3930-3935].

- [0111] 융합 분자는 당업자에게 공지된 바와 같은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985]; 및 공동출원된 WO 00/42219 참조.
- [0112] 일단 융합 분자가 그의 DNA 결합 도메인을 통해 표적 서열에 결합한다면, 융합 분자의 기능성 구성성분/도메인은 유전자의 전사에 영향을 미칠 수 있는 임의의 다양한 상이한 구성성분으로부터 선택될 수 있다. 따라서, 기능적 구성성분은 다양한 전사 인자 도메인, 예컨대 활성체, 리프레서, 공-활성체, 공-리프레서 및 사일런서를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0113] 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 그들의 공학 처리된 (ZFP 또는 TALE) DNA 결합 도메인을 통해 그들의 의도된 핵산 표적을 인식할 수 있는 기능적 독립체를 생성하기 위해, 그리고 뉴클레아제 활성을 통해 DNA 결합 부위 근처에서 DNA가 절단되게 하는 뉴클레아제(예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제 또는 TALE 뉴클레아제)를 생성하기 위해 DNA-결합 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 포함한다.
- [0114] 따라서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 광범위하게 적용가능하고, 관심 대상의 임의의 뉴클레아제를 수반할 수 있다. 뉴클레아제의 비제한적 예는 메가뉴클레아제, TALEN 및 아연 핑거 뉴클레아제를 포함한다. 뉴클레아제는 이중성 DNA-결합 및 절단 도메인(예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제; TALEN; 이중성 절단 도메인을 지니는 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인)을 포함할 수 있거나 또는 대안적으로, 천연 유래 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 선택된 표적 부위(예를 들어, 동족 결합 부위와 상이한 부위에 결합하도록 공학처리된 메가뉴클레아제)에 결합되도록 변경될 수 있다.
- [0115] 뉴클레아제 도메인은 임의의 뉴클레아제, 예를 들어 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 Htt DNA-결합 도메인에 융합될 수 있는 적합한 뉴클레아제(절단) 도메인의 비제한적 예는 임의의 제한 효소, 예를 들어 IIS형 제한 효소(예를 들어, FokI)로부터의 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 절단 도메인은 절단 활성을 위해 이량체화를 필요로 하는 절단 절반-도메인이다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 제8,586,526호; 제8,409,861호 및 제7,888,121호 참조. 일반적으로 융합 단백질이 절단 절반-도메인을 포함한다면, 절단을 위해 2개의 융합 단백질이 필요하다. 대안적으로, 2개의 절단 절반-도메인을 포함하는 단일 단백질이 사용될 수 있다. 2개의 절단 절반-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제(또는 이의 기능적 단편)로부터 유래될 수 있거나, 또는 각각의 절단 절반-도메인은 상이한 엔도뉴클레아제(또는 이의 기능적 단편)로부터 유래될 수 있다. 추가로, 예를 들어 이량체화에 의해 절단 절반-도메인이 기능적 절단 도메인을 형성하는 서로에 대한 공간적 배향으로 절단 절반-도메인을 위치시키도록 2개의 융합 단백질의 그들 각각의 표적 부위에 대한 결합은 2개의 융합 단백질에 대한 표적 부위는 서로에 대해 바람직하게 배치된다.
- [0116] 뉴클레아제 도메인은 또한 절단 활성을 지니는 임의의 메가뉴클레아제(귀소 엔도뉴클레아제) 도메인으로부터 유래될 수 있고, 또한 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 본 명세서에 기재된 뉴클레아제와 함께 사용될 수 있다.
- [0117] 특정 실시형태에서, 뉴클레아제는 조밀한 TALEN(cTALEN)을 포함한다. 이들은 TALE DNA 결합 도메인을 TevI 뉴클레아제 도메인에 연결하는 단일쇄 융합 단백질이다. 융합 단백질은 TALE DNA 결합 도메인이 메가뉴클레아제(예를 들어, *TevI*) 뉴클레아제 도메인에 대해 위치되는지에 따라서, TALE 영역에 의해 국소화되는 틱내기 효소로서 작용할 수 있거나, 또는 이중 가닥 파손을 생성할 수 있다(문헌[Beurdeley *et al* (2013) *Nat Comm*: 1-8 DOI: 10.1038/ncomms2782] 참조).
- [0118] 다른 실시형태에서, TALE-뉴클레아제는 메가 TAL이다. 이들 메가 TAL 뉴클레아제는 TALE DNA 결합 도메인 및 메가뉴클레아제 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 메가뉴클레아제 절단 도메인은 단량체로서 활성이고, 활성을 위해 이량체화를 필요로 하지 않는다. (문헌[Boissel *et al.*, (2013) *Nucl Acid Res*: 1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224] 참조).
- [0119] 추가로, 메가뉴클레아제의 뉴클레아제 도메인은 또한 DNA-결합 작용성을 나타낼 수 있다. 임의의 TALEN은 추가적인 TALEN(예를 들어, 하나 이상의 메가-TAL을 지니는 하나 이상의 TALEN(cTALENs 또는 FokI-TALEN)) 및/또는 ZFN과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0120] 추가로, 절단 도메인은 야생형에 비해, 예를 들어, 표적을 벗어난 절단 효과를 감소시키거나 또는 제거하는 절

대 이형이량체의 형성을 위해 하나 이상의 변경을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제7,914,796호; 제8,034,598호; 및 제 8,623,618호 참조.

[0121] 본 명세서에 기재된 뉴클레아제는 이중-가닥 표적(예를 들어, 유전자)에서 이중- 또는 단일-가닥 파손을 생성할 수 있다. 단일-가닥 파손("틈")의 생성은, 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제8,703,489호에 기재되며, 이는 뉴클레아제 중 하나의 촉매적 도메인의 돌연변이가 틈내기효소를 생성하는 방법을 기재한다.

[0122] 따라서, 뉴클레아제(절단) 도메인 또는 절단 절반-도메인은 절단 활성을 보유하거나 또는 기능성 절단 도메인을 형성하도록 다량체화(예를 들어, 이량체화)하는 능력을 보유하는 단백질의 임의의 부분일 수 있다.

[0123] 대안적으로, 뉴클레아제는 소위 "분할-효소" 기법을 이용하여 핵산 표적 부위에서 생체내에서 조립될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20090068164호 참조). 이러한 분할 효소의 구성성분은 별도의 발현 작제물 상에서 발현될 수 있거나, 또는 개개 구성성분이, 예를 들어 자기-절단 2A 펩타이드 또는 IRES 서열에 의해 분리되는 하나의 오픈 리딩 프레임에서 연결될 수 있다. 구성성분은 개개 아연 핑거 결합 도메인 또는 메가뉴클레아제 핵산 결합 도메인의 도메인일 수 있다.

[0124] 뉴클레아제는, 예를 들어 미국 특허 공개 제20090111119호에 기재된 바와 같은 효모-기반 염색체 시스템에서 사용하기 전에 활성에 대해 선별될 수 있다. 뉴클레아제 발현 작제물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 용이하게 설계될 수 있다.

[0125] 융합 단백질의 발현은 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터, 예를 들어 라피노스 및/또는 갈락토스의 존재에서 활성화되고(탈억제됨) 글루코스의 존재에서 억제되는 갈락토키나제 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 특정 실시형태에서, 프로모터는, 예를 들어 고친화도 결합 부위의 포함을 통해 융합 단백질의 발현을 자가 조절한다. 예를 들어, 2014년 3월 18일자로 출원된 미국 특허 출원 제61,955,002호 참조.

[0126] 전달

[0127] 본 명세서에 기재된 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, ZFP, TALE, CRISPR/Cas), 및 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물은, 예를 들어, 단백질의 주사에 의해, mRNA를 통해 및/또는 발현 작제물(예를 들어, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, AAV 벡터, Ad 벡터 등)을 이용하는 것을 포함하는, 임의의 적합한 수단에 의해 표적 세포에 전달될 수 있다.

[0128] 본 명세서에 기재된 바와 같은 아연 핑거 단백질을 포함하는 단백질을 전달하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제6,453,242호; 제6,503,717호; 제6,534,261호; 제6,599,692호; 제6,607,882호; 제6,689,558호; 제6,824,978호; 제6,933,113호; 제6,979,539호; 제7,013,219호; 및 제7,163,824호에 기재되며, 이들 모두의 개시내용은 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 포함된다.

[0129] 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 제8,586,526호; 제6,534,261호; 제6,607,882호; 제6,824,978호; 제6,933,113호; 제6,979,539호; 제7,013,219호; 및 제7,163,824호 참조. 더 나아가, 임의의 이들 벡터는 하나 이상의 DNA-결합 단백질-암호화 서열을 포함할 수 있다는 것이 명확할 것이다. 따라서, 하나 이상의 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 단백질이 세포 내로 도입될 때, ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 단백질을 암호화하는 서열은 동일한 벡터 상에서 또는 상이한 벡터 상에서 운반될 수 있다. 다중 벡터가 사용될 때, 각각의 벡터는 하나 또는 다중 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

[0130] 종래의 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법은 세포(예를 들어, 포유류 세포) 및 표적 조직에서 공학처리된 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 암호화하는 핵산을 도입하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 또한 시험관내 세포에 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 암호화하는 핵산을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 암호화하는 핵산은 생체내 또는 생체밖 유전자 치료법 용도를 위해 투여된다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 네이키드(naked) 핵산, 및 리포솜 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함하는데, 이는 세포에 대한 전달 후에 에피솜 또는 통합된 게놈을 가진다. 유전자 요법 절차의 검토를 위해, 문헌[Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995);

Haddada *et al.*, *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Böhm (eds.) (1995); 및 Yu *et al.*, *Gene Therapy* 1:13-26 (1994)] 참조.

- [0131] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 전기천공법, 리포펙션, 미세주입법, 유전자총법, 바이로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다양이온 또는 지질:핵산 컨주게이트, 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제-향상 흡수를 포함한다. 예를 들어, 소니트론(Sonitron) 2000 시스템(Rich-Mar)을 이용하는 초음파천공법(Sonoporation)은 핵산의 전달을 위해 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 핵산은 mRNA로서 전달된다. 또한 번역 효능 및/또는 mRNA 안정성을 증가시키기 위해 캡핑된 mRNA의 사용이 바람직하다. 특히 ARCA(안티-리버스(anti-reverse) 캡 유사체) 캡 또는 이의 변이체가 바람직하다. 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 제 7074596호 및 미국 특허 제 8153773호 참조.
- [0132] 추가적인 예시적인 핵산 전달 시스템은 아마사 바이오시스템즈(Amaxa Biosystems)(독일 쾰른에 소재), 맥스사이트 인코포레이티드(Maxcyte, Inc.)(메릴랜드주 락빌에 소재), BTX 몰레큘러 딜리버리 시스템즈(BTX Molecular Delivery Systems)(매사추세츠주 홀리스턴에 소재) 및 코페르니쿠스 थे라퓨틱스 인코포레이티드(Copernicus Therapeutics Inc.)(예를 들어, 미국 특허 제 6008336호 참조)에 의해 제공된 것을 포함한다. 리포펙션은, 예를 들어, 미국 특허 제 5,049,386호; 제 4,946,787호; 및 제 4,897,355호에 기재되어 있고, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예를 들어, 트랜스펙탐(Transfectam)(상표명) 및 리포펙틴(Lipofectin)(상표명) 및 리포펙타민(Lipofectamine)(상표명) RNAiMAX). 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 펠그너(Felgner)의 WO 91/17424, WO 91/16024를 포함한다. 전달은 세포(생체밖 투여) 또는 표적 조직(생체내 투여)일 수 있다.
- [0133] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하는 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad *et al.*, *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992)]; 미국 특허 제 4,186,183호, 제 4,217,344호, 제 4,235,871호, 제 4,261,975호, 제 4,485,054호, 제 4,501,728호, 제 4,774,085호, 제 4,837,028호 및 제 4,946,787호).
- [0134] 추가적인 전달 방법은 EnGeneIC 전달 비히클(EDV) 내로 전달될 핵산의 패키징의 사용을 포함한다. 항체의 하나의 암이 표적 조직에 대해 특이성을 가지고 다른 하나가 EDV에 대해 특이성을 갖는 이중특이성 항체를 이용하여 이들 EDV는 표적 조직에 특이적으로 전달된다. 항체는 표적 세포 표면에 EDV를 가져오고, 이어서, EDV는 세포작용에 의해 세포 내로 들어온다. 일단 세포 내에서, 내용물은 방출된다(문헌[MacDiarmid *et al* (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643] 참조).
- [0135] 공학처리된 ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템을 암호화하는 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 신체 내 특이적 세포에 대해 바이러스를 표적화하기 위한 고도로 진화된 과정 및 바이러스 페이로드(payload)의 핵에 대한 수송의 이점을 취한다. 바이러스 벡터는 환자에게 직접적으로(생체내) 투여될 수 있거나 또는 그들은 시험관내 세포를 처리하기 위해 사용될 수 있고, 변형된 세포는 환자에게(생체밖) 투여된다. ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템의 전달을 위한 종래 바이러스 기반 시스템은 유전자 전달을 위한 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련, 백시니아 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 숙주 게놈 내 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노-관련 바이러스 유전자 전달 방법에 의해 가능한데, 이는 종종 삽입된 이식유전자의 장기간 발현을 초래한다. 추가적으로 높은 형질도입 효율이 다수의 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다.
- [0136] 레트로바이러스의 굴성은 외래의 외피 단백질을 혼입함으로써 변경되어, 표적 세포의 잠재적 표적 집단을 확장시킬 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분할 세포를 형질도입하거나 또는 감염시킬 수 있고, 전형적으로 고 바이러스 역가를 생성할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 의존한다. 레트로바이러스 벡터는 외래 서열의 6 내지 10kb까지에 대해 패키징 능력을 지니는 시스-작용성의 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 시스-작용성 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이는 그 다음에 치료적 유전자를 표적 세포 내로 통합하여 영구적인 이식유전자 발현을 제공하기 위해 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 마우스 백혈병 바이러스(MuLV), 긴 팔 원숭이 유인원 백혈병 바이러스(GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SIV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 이들의 조합에 기반한 것을 포함한다(예를 들어, 문헌[Buchscher *et al.*, *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann *et al.*, *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller *et*

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

- [0137] 일시적 발현이 바람직한 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 다수 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율이 있을 수 있고, 세포 분할을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터를 이용하여, 고역가 및 고수준의 발현이 얻어졌다. 이 벡터는 상대적으로 단순한 시스템에서 대량으로 생성될 수 있다. 아데노-관련 바이러스("AAV") 벡터는 또한, 예를 들어 핵산 및 펩타이드의 시험관내 생성에서, 그리고 생체내 및 생체밖 유전자 치료법 절차를 위해 표적 핵산을 이용하여 세포를 형질도입하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[West *et al.*, *Virology* 160:38-47 (1987)]; 미국 특허 제4,797,368; WO 93/24641; 문헌[Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994)] 참조). 재조합 AAV 벡터의 구성은 미국 특허 제 5,173,414호; 문헌[Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989)]을 포함하는 다수의 간행물에 기재되어 있다.
- [0138] 적어도 6개의 바이러스 벡터 접근은 임상 시험에서 유전자 전달을 위해 현재 입수가 가능한데, 이는 형질도입 체제를 생성하기 위해 헬퍼 세포주 내도 삽입된 유전자에 의해 결합 벡터의 상보성을 수반하는 접근을 이용한다.
- [0139] pLASN 및 MFG-S는 임상시험에서 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다(Dunbar *et al.*, *Blood* 85:3048-305 (1995); Kohn *et al.*, *Nat. Med.* 1:1017-102 (1995); Malech *et al.*, *PNAS* 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN은 유전자 치료법 시험에서 사용된 제1 치료 벡터였다. (Blaese *et al.*, *Science* 270:475-480 (1995)). 50% 이상의 형질도입 효율을 MFG-S 패키징 벡터에 대해 관찰하였다. (Ellem *et al.*, *Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997); Dranoff *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 1:111-2 (1997)).
- [0140] 재조합체 아데노-관련 바이러스 벡터(rAAV)는 결합 및 비병원성 파코바이러스 아데노-관련 2형 바이러스에 기반한 유망한 대안의 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 이식유전자 발현 카세트에 측접하는 AAV 145 bp 역위 말단 반복부만을 보유하는 플라스미드로부터 유래된다. 형질도입된 세포의 게놈 내로의 통합에 기인하는 효율적인 유전자 전달 및 안정한 이식유전자 전달은 이 벡터 시스템에 대한 중요한 특징이다.(Wagner *et al.*, *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998), Kearns *et al.*, *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)). AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8AAV 8.2, AAV9, 및 AAV rh10 및 위형 AAV, 예컨대 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6를 포함하는 다른 AAV 혈청형은 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0141] 복제-결핍 재조합 아데노바이러스 벡터(Ad)는 고 역가에서 생성될 수 있고, 다수의 상이한 세포 유형을 용이하게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 이식유전자가 Ad E1a, E1b, 및/또는 E3 유전자를 대신하도록 공학처리되며; 후속적으로, 복제 결핍 벡터는 결실 유전자 기능을 도중에 공급하는 인간 293 세포에서 증식된다. Ad 벡터는 비분할, 분화 세포, 예컨대 간, 신장 및 근육에서 발견되는 것을 포함하는 다양한 유형의 생체내 조직을 형질도입할 수 있다. 종래의 Ad 벡터는 거대 운반 능력을 가진다. 임상 시험에서 Ad 벡터 사용의 예는 근육내 주사에 의한 항종양 면역화를 위해 폴리뉴클레오타이드 치료법을 수반하였다(Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). 임상 시험에서 유전자 전달을 위한 아데노바이러스 벡터 사용의 추가적인 예는 문헌[Rosenecker *et al.*, *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); Welsh *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 2:205-18 (1995); Alvarez *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 5:597-613 (1997); Topf *et al.*, *Gene Ther.* 5:507-513 (1998); Sterman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998)]을 포함한다.
- [0142] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하기 위해 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 ψ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료법에서 사용되는 바이러스 벡터는 바이러스 입자 내로 핵산 벡터를 패키징하는 생산자 세포주에 의해 보통 생성된다. 벡터는 전형적으로 (적용가능하다면) 숙주 내로 패키징 및 후속적 도입에 필요한 최소 바이러스 서열을 함유하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 암호화하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 상실된 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 도중에 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료법에서 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 숙주 게놈 내로 패키징 및 통합을 위해 필요한 AAV 게놈으로부터의 역위 말단 반복부(ITR) 서열만을 가진다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉, *rep* 및 *cap*을 암호화하는 헬퍼 플라스미드를 함유하지만, ITR 서열이 없는 세포주에 패키징된다. 세포주는 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 결여에 기인하여 상당한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다.

- [0143] 다수 유전자 치료법 적용에서, 유전자 치료법 벡터는 특정 조직 유형에 대해 높은 정도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스의 외부 표면 상에서 바이러스 외피 단백질과의 융합 단백질로서 리간드를 발현시킴으로써 주어진 세포 유형에 대해 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 관심 대상의 세포 유형 상에 존재하는 것으로 알려진 수용체에 대해 친화도를 갖도록 선택된다. 예를 들어, 문헌[Han et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995)]은 몰로니(Moloney) 마우스 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린(heregulin)을 발현시키도록 변형되고, 재조합 바이러스가 인간 상피 성장 인자 수용체를 발현시키는 특정 인간 유방암 세포를 감염시킨다는 것을 보고하였다. 이 원칙은 다른 바이러스-표적 세포쌍으로 확장될 수 있는데, 이때 표적 세포는 수용체를 발현시키고, 바이러스는 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현시킨다. 예를 들어, 사상 파지는 사실상 임의의 선택된 세포 수용체에 대해 특이적 결합 친화도를 갖는 항체 단편(예를 들어, Fab 또는 Fv)를 나타내도록 공학처리될 수 있다. 상기 설명이 바이러스 벡터에 대해 주로 적용되지만, 동일한 원칙이 비바이러스 벡터에 적용될 수 있다. 이러한 벡터는 특이적 표적 세포에 의한 흡수가 바람직한 특이적 흡수 서열을 함유하도록 공학처리될 수 있다.
- [0144] 유전자 요법 벡터는 전형적으로 이하에 기재하는 바와 같은 전신 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의해 개개 환자에 대한 투여에 의해 생체내로 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 생체밖 세포, 예컨대 개개 환자로부터 외식된 세포(예를 들어, 림프구, 골수 흡입, 조직 생검)에 또는 보편적 공여체 조혈 줄기 세포에 전달된 다음에 보통 벡터가 혼입되는 세포에 대한 선택 후 환자 내로 세포가 재이식될 수 있다.
- [0145] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질)은 생체내로 직접적으로 전달된다. 조성물(세포, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질)은 뇌 또는 척수 내로 직접적 주사를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 중추 신경계(CNS) 내로 직접적으로 투여될 수 있다. 해마, 흑질, 마이네르트 기저핵(nucleus basalis of Meynert: NBM), 선조체 및/또는 피질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 뇌의 하나 이상의 영역이 표적화될 수 있다. CNS 전달에 대해 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 전신으로(예를 들어, 정맥내, 복강내, 심장내, 근육내, 척추강내, 피하, 및/또는 두개내 주입) 투여될 수 있다. 대상체에게 직접적으로(CNS 내로 직접적으로를 포함함) 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 전달을 위한 방법 및 조성물은 바늘 조립체를 통한 직접적 주사(예를 들어, 정위적 주사)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 방법은, 예를 들어, 조성물(발현 벡터를 포함함)의 뇌에 대한 전달에 대해 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제7,837,668호; 제8,092,429호 및 미국 특허 공개 제20060239966호에 기재되어 있다.
- [0146] 진단, 연구를 위한 또는 (예를 들어, 숙주 유기체 내로 형질감염된 세포의 재주입을 통한) 유전자 치료법을 위한 생체밖 세포 형질감염은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 대상 유기체로부터 단리되며, ZFP, TALE 또는 CRISPR/Cas 시스템 핵산(유전자, cDNA 또는 mRNA)로 형질감염되고, 대상 유기체(예를 들어, 환자) 내로 다시 재주입된다. 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 핵산은 mRNA로서 전달된다. 또한 번역 효율 및/또는 mRNA 안정성을 증가시키기 위한 캡핑 mRNA의 사용이 바람직하다. 특히 ARCA(안티-리버스 캡 유사체) 캡 또는 이의 변이체가 바람직하다. 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 제7,074,596호 및 미국 특허 제8,153,773호 참조. 생체밖 형질감염에 적합한 다양한 세포 유형은 당업자에게 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)] 및 환자로부터의 세포를 단리 및 배양하는 방법의 논의에 대해 그것에 인용된 참고문헌 참고).
- [0147] 일 실시형태에서, 줄기 세포는 세포 형질감염 및 유전자 요법을 위한 생체밖 절차에서 사용된다. 줄기 세포를 이용하는 것에 대한 이점은 그들이 시험관내 다른 세포 유형으로 분화될 수 있거나, 또는 그들이 골수 내에서 접합될 경우 포유류(예컨대 세포의 공여체) 내로 도입될 수 있다는 것이다. GM-CSF, IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 사이토카인을 이용하여 시험관내 CD34+ 세포를 임상적으로 중요한 면역 세포 유형으로 분화시키는 방법은 공지되어 있다(문헌[Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)] 참조).
- [0148] 줄기 세포는 공지된 방법을 이용하여 형질도입 및 분화를 위해 단리된다. 예를 들어, 줄기 세포는 원치않는 세포, 예컨대 CD4+ 및 CD8+(T 세포), CD45+(panB 세포), GR-1(과립구), 및 Iad(분화된 항원 제시 세포)에 결합하는 항체를 이용하여 골수 세포를 패닝함으로써 골수세포로부터 단리된다(문헌[Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)] 참조).
- [0149] 변형된 줄기 세포는 또한 일부 실시형태에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포자멸사에 대해 내성으로 만들어진 신경 줄기 세포는 줄기 세포가 또한 본 발명의 ZFP TF를 함유하는 치료적 조성물로서 사용될 수 있다. 세포자멸사에 대한 내성은, 예를 들어, 줄기 세포에서 BAX- 또는 BAK-특이적 TALEN 또는 ZFN(미국 특허 제8,597,912호

참조)을 이용하여 BAX 및/또는 BAK, 또는 카스파제-6 특이적 ZFN을 다시 이용하여 카스파제에서 봉괴된 것을 Nick아웃함으로써 실현될 수 있다. 이들 세포는 돌연변이체 또는 야생형 Htt를 조절하는 것으로 알려진 ZFP TF 또는 TALE TF를 이용하여 형질감염될 수 있다.

[0150] 치료적 ZFP 핵산을 함유하는 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 리포솜 등)는 또한 생체내에서 세포의 형질도입을 위해 유기체에 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용 및 전기천공법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 혈액 또는 조직 세포와 궁극적으로 접촉되는 분자를 도입하기 위해 정상적으로 사용되는 임의의 경로에 의한다. 이러한 핵산을 투여하는 적합한 방법은 이용가능하며, 당업자에게 잘 공지되어 있고, 하나 초과와 경로의 특정 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있지만, 특정 경로는 종종 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0151] 조혈 줄기 세포 내로 DNA의 도입을 위한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,928,638호에 개시되어 있다. 조혈 줄기 세포, 예를 들어, CD34⁺ 세포 내로 이식유전자의 도입에 유용한 벡터는 아데노바이러스 35형을 포함한다.

[0152] 면역세포(예를 들어, T-세포) 내로 이식유전자의 도입에 적합한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Ory *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11382-11388; Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* **72**:8463-8471; Zuffery *et al.* (1998) *J. Virol.* **72**:9873-9880; Follenzi *et al.* (2000) *Nature Genetics* **25**:217-222] 참조.

[0153] 약제학적으로 허용가능한 담체는 투여 중인 특정 조성물에 의해서뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 이하에 기재하는 바와 같이 이용가능한 약제학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 있다(예를 들어, 문헌[Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., 1989] 참조).

[0154] 상기 주목한 바와 같이, 개시된 방법 및 조성물은 원핵세포 세포, 진균 세포, 고세균 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포, 척추동물 세포, 포유류 세포 및 인간 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 유형의 세포에서 사용될 수 있다. 단백질 발현을 위한 적합한 세포주는 당업자에게 공지되어 있으며, COS, CHO(예를 들어, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, 헬라(HeLa), HEK293(예를 들어, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), perC6, 곤충세포, 예컨대 스포도페라 푸기페르다(*Spodoptera fugiperda*: Sf), 및 진균 세포, 예컨대 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pischia*) 및 쉬조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 세포주의 자손, 변이체 및 유도체가 또한 사용될 수 있다.

[0155] 투여될 유효량은 환자에 따라 그리고 투여 방식 및 투여 부위에 따라서 다를 것이다. 따라서, 유효량은 조성물을 투여하는 의사에 의해 가장 잘 결정되며, 적절한 투약량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 통합 및 발현을 위해 충분한 시간을 허용한 후에(예를 들어, 전형적으로 4 내지 15일), 치료적 폴리펩타이드의 혈청 또는 다른 조직 수준의 분석 및 투여 전 초기 수준에 대한 비교는 투여 중인 양이 너무 낮은지, 올바른 범위 내인지 또는 너무 높은지의 여부를 결정할 것이다. 초기 및 후속적 투여를 위한 적합한 요법은 또한 가변적이지만, 초기 투여 다음에, 필요하다면 후속적 투여에 의해 전형화된다. 후속 투여는 며칠 내지 1년에 한번 내지 몇 년 마다의 범위에 있는 가변적 간격으로 투여될 수 있다.

[0156] 인간 뇌에 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 이용하여 ZFP을 전달하기 위해, 선조체 당 1×10^{10} 내지 5×10^{12} (또는 그 사이의 임의의 값) 벡터 게놈의 용량 범위가 적용될 수 있다. 주목한 바와 같이, 투약량은 다른 뇌 구조에 대해 그리고 상이한 전달 프로토콜에 대해 다를 수 있다.

[0157] **적용**

[0158] 본 명세서에 기재한 바와 같은 Htt-결합 분자(예를 들어, ZFPs, TALEs, CRISPR/Cas 시스템, Ttago 등) 및 그들을 암호화하는 핵산은 다양한 적용을 위해 사용될 수 있다. 이들 적용은 Htt-결합 분자(DNA-결합 단백질)를 암호화하는 핵산을 포함)가 대상체에게 투여되고 대상체 내의 표적 유전자의 발현을 조절하기 위해 사용되는 치료 방법을 포함한다. 조절은 억제, 예를 들어, HD 질환 상태에 기여하는 mHtt의 억제 형태일 수 있다. 대안적으로, 조절은 내인성 세포 유전자의 발현 또는 증가된 발현의 활성화가 질환 상태를 개선시킬 때의 활성화 형태일 수 있다. 또한 추가 실시형태에서, 조절은, 예를 들어, 돌연변이체 Htt 유전자의 비활성화를 위한 (예를 들어, 하나 이상의 뉴클레아제에 의한) 절단일 수 있다. 상기 주목한 바와 같이, 이러한 적용을 위해, Htt-결합 분자, 또는 더 전형적으로, 그들을 암호화하는 핵산은 약제학적 조성물로서 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화된다.

- [0159] Htt-결합 분자 또는 그들을 암호화하는 벡터는 단독으로 또는 다른 적합한 구성성분(예를 들어, 리포솜, 나노입자, 또는 당업계에 공지된 다른 구성성분)과 조합하여 에어로졸 제형으로 제조되어(즉, 그들은 "네블라이징"될 수 있음) 흡입을 통해 투여될 수 있다. 에어로졸 제형은 가압된 허용가능한 추진제, 예컨대 다이클로로다이플루오로메탄, 프로판, 질소 등에 놓일 수 있다. 예를 들어, 정맥내, 근육내, 진피내 및 피하 경로와 같은 비경구 투여에 적합한 제형은 항산화제, 완충제, 정균제 및 의도된 수용인의 혈액과 등장성인 제형을 제공하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성, 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 조성물은, 예를 들어 정맥내 주입, 경구, 국소, 복강내, 방광내 또는 척추강내에 의해 투여될 수 있다. 화합물의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 다회 용량 밀봉 용기로 제공될 수 있다. 주사 용액 및 현탁액은 앞서 기재한 종류의 멸균 분말, 파립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0160] 환자에게 투여될 용량은 시간에 따라 환자에서 유리한 치료적 반응을 달성하는데 충분하여야 한다. 용량은 사용되는 특정 Htt-결합 분자의 효능 및 K_d , 표적 세포 및 환자의 병태뿐만 아니라 치료될 환자의 체중 또는 표면적에 의해 결정된다. 용량의 크기는 또한 특정 환자에서 특정 화합물 또는 벡터의 투여를 수반하는 존재, 특성 및 임의의 이상반응 효과 정도에 의해 결정된다.
- [0161] 다른 적용에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 분자의 효능은 환자에서, 예를 들어 뇌척수액(cerebral spinal fluid: CSF)과 같은 샘플에서 mHTT 단백질의 양을 측정하도록 설계된 검출 방법을 이용하여 분석된다. 예를 들어, 문헌[Wild *et al.* (2014) *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:10]에 기재된 바와 같은 초-민감 면역분석은 환자 샘플에서 HD와 관련된 돌연변이체 Htt 단백질의 존재를 검출(및/또는 정량화)하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, CSF 내 mHtt 수준의 변화 검출은 본 명세서에 기재된 바와 같은 HD 치료법(예를 들어, ZFP, TALE 등)에 반응하여 대상체에서 HD의 진행을 결정하기 위한 진단을 제공한다.
- [0162] 면역 분석을 포함하는 진단 분석을 수행하기 위한 임의의 적합한 형식이 사용될 수 있다. 예를 들어, 포획 시약(예를 들어, 항체, 수용체 등)은 ELISA 플레이트 상에 고정될 수 있다. 대안적으로, 검출 시약은 자기 입자 스캐닝과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 정량화하기 위해 칩 상의 초민감 면역검출(ultrasensitive immunodetection on-chip)에 의해 이용된다(예를 들어, 문헌[Cornaglia *et al* (2014) *Anal Chem* 86(16):8213-23] 참조). 검출 시약은 결합이 일어나는 조건 하에서 돌연변이체 Htt 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 접촉되고, 정량화는 당업계에 공지된 방법에 의해 행해진다.
- [0163] 따라서, mHTT 수준은 질환 부담 스코어 및 질환 진행에 따른 농도의 수준 증가와 관련되기 때문에, CSF 또는 다른 환자 샘플 내 mHtt의 검출은 HD에서 Htt-결합 분자의 효능 모니터링을 허용할 뿐만 아니라 HD의 신경병리생물학에 대해 치료 효과를 연구하는 능력을 보조하고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환-변형 HD 치료의 임상 시험을 뒷받침하기 위해 사용될 수 있다.
- [0164] 다음의 실시예는 Htt-조절제가 아연 핑거 단백질 또는 CRISPR/Cas 시스템을 포함하는 본 개시내용의 예시적 실시형태에 관한 것이다. 이는 단지 예시의 목적을 위한 것이며 공학처리된 DNA-결합 도메인을 지니는 TALE-TF, 추가적인 ZFP, ZFN, TALEN, 추가적인 CRISPR/Cas 시스템, 귀소 엔도뉴클레아제(메가뉴클레아제)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다른 Htt-분자가 사용될 수 있다는 것이 명확할 것이다.
- [0165] 실시예
- [0166] **실시예 1: ZFP-TF는 배양된 HD 뉴런의 표현형을 구한다**
- [0167] 다양한 연구는 성장 인자 회수에 대한 감소된 세포내 ATP 수준 및 증가된 취약성과 같은 HD 환자 유래 세포에서 확장된 CAG 반복부와 관련된 표현형 변화를 나타내었다. 예를 들어, 문헌[Jung-Il *et al.* (2012) *Biochemical Journal* 446(3):359-371; HD IPSC Consortium (2012) *Cell Stem Cell* 11(2):264-278; An *et al.* (2012) *Cell Stem Cell* 11(2):253-263] 참조.
- [0168] 따라서, 본 발명자는 Htt의 대립유전자-특이적 ZFP 리프레서의 발현이 환자 유래 뉴런에서 이러한 표현형을 구하는지의 여부를 평가하였다. 간략하게, 비너스(Venus)(GFP) 및 ZFP-TF 33074-KOX-2A-비너스에 대한 렌티바이러스 벡터는 본 명세서에서 그리고 미국 특허 공개 제20130253040호에서 생성되었다. 절단가능한 2A 펩타이드는 비너스(GFP) 및 ZFP가 동일한 벡터로부터 발현되게 하며, ZFP-발현 세포는 GFP 발현에 의해 동정될 수 있다. 렌티바이러스 발현 작제물은 제3 세대 자기-비활성화 HIV-기반 LV였다. CMV 프로모터 하류에 2A 링커 및 GFP 비너스와 함께 ZFP-TF를 삽입함으로써 33074 발현 벡터를 구성하였다. GFP 발현 작제물은 CMV 프로모터 하류의 GFP-비너스만을 함유한다. 재조합 LV는 리포펙타민 2000(라이프 테크놀로지스사(Life Technologies))를 이용하여

293T 세포의 일시적 형질감염에 의해 제조하였다. 바이러스 상청액을 형질감염 후 48 및 72시간에 채취하고 나서, 0.45 μ m 필터를 통해 여과시킨 후, 4℃(옵티마(Optima) L-80K 분취 초원심분리, 베크만 쿨터(Beckman Coulter))에서 90분 동안 50,000 $\times g$ 로 원심분리에 의해 300배로 농축시켰다. 이어서 바이러스 펠렛을 헵크스 완충액(Hank's Buffered Salt Solution)(론자(Lonza))에서 재현탁시키고 나서, -80℃에서 저장하였다. 바이러스 역가를 293T 세포의 감염에 의해 결정하고 나서, GFP-비너스 발현의 유세포분석에 의해 측정하였다.

[0169] HD-ESC는 아쿠타제와 함께 계대시키고 나서, E8 배지(라이프 테크놀로지스)에서 매트릭셀 코팅된 플레이트 상에서 배양시켰다. 신경 줄기 세포를 스템프로 뉴럴 인덕션 배지(StemPro Neural Induction Medium)(라이프 테크놀로지스)를 이용하여 유도하였다. 간략하게, ESC를 200,000개 세포/웰로 겔트렉스(geltrex) 코팅된 6웰 접시에 파종시키고, 10 내지 20% 합류일 때, 배지를 스템프로 뉴럴 인덕션 배지로 바꾸었다. 배지를 2일마다 바꾸고, NSC를 채취하고 나서, 제7일에 확장시켰다. 스템프로 NSC SFM 배지(라이프 테크놀로지스)를 사용하여 HD-NSC 및 비-HD NSC(HIP(상표명) 글로바스템(Globalstem))를 배양시켰다. NSC를 겔트렉스 코팅 플레이트 상에서 아쿠타제와 함께 계대시켰다. 배지를 B-27 무혈청 보충물 및 글루타맥스(GlutaMAX)(상표명)(라이프 테크놀로지스)를 지니는 뉴로베이셜(Neurobasal) 배지를 함유하는 신경 분화 배지로 바꾸어서 뉴런 분화를 유도하였다. 배지를 3 내지 4일마다 바꾸었다.

[0170] 분화 뉴런을 MOI 500에서 비너스(GFP) 및 ZFP-TF 33074-KOX-2A-비너스에 대한 렌티바이러스 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 후속적으로, 상청액을 새로운 신경 분화 배지로 대체하고 나서, 배양물을 21일까지 유지하였다.

[0171] HD 환자(CAG17/48) 또는 정상 대상체로부터 유래된 배양 뉴런의 세포내 ATP 수준을 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)(등록상표) 발광 분석(프로메가(Promega))를 이용하여 측정하고, 각각의 샘플 내 세포 수를 아포리브-글로(ApoLive-Glo)(등록상표) 분석(프로메가)을 이용하여 결정하였다. 간략하게, 뉴런에서 세포내 ATP 수준을 제조업자의 설명서에 따라 셀타이터-글로 발광 분석(프로메가)를 이용하여 측정하였다. 30분 후에 퍼킨 엘머 월락 1420 빅터2 마이크로플레이트 판독기(Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader) 상에서 발광(RLU)을 측정하고, 값을 아포리브-글로 분석(프로메가)를 이용함으로써 그리고 형광(A.U.)을 측정함으로써 웰 내 세포 수에 대해 정규화시켰다. 이어서, 상이한 세포/치료로부터의 세포값 당 ATP 수준을 모의-감염 HD 뉴런의 세포값에 대해 정규화시켰다.

[0172] 도 1에 나타난 바와 같이, 모의 감염자 렌티-GFP-감염 HD 뉴런은 비-HD(정상) 뉴런에 비해 상당히 감소된 세포내 ATP 수준을 가졌다. 대조적으로, 렌티-33074-KOX-2A-GFP 감염은 HD 뉴런에서 세포내 ATP 수준의 대략 60% 증가를 야기하였는데, 이는 돌연변이체 Htt 대립유전자의 ZFP-유래 억제제가 이들 세포의 손상된 에너지 대사를 정상화시켰음을 나타낸다.

[0173] 테옥시뉴클레오티딜 전달효소 dUTP 틸 말단 표지(TUNEL) 분석을 이용하여 성장 인자 회수에 의해 유도된 HD 및 비-HD 뉴런의 세포사를 측정하였다. 간략하게, 뉴런을 ATP 분석에 대해 상기 기재한 바와 같이 3회 중복하여 LV로 감염시켰다. 이어서, 세포를 12일 동안 배양시키고, 임의의 첨가물(성장인자) 없이 새로운 뉴로베이셜 배지로 바꾸었다. 48시간 동안 이 성장 인자 회수 배지에서 세포를 유지시켰다. ApoBrdU Red DNA 단편화 키트(바이오비전(BioVision))를 이용하여 TUNEL 분석을 수행하였다. 뉴런을 15분 동안 얼음 상에서 4% 파라폼알데하이드로 고정시켰다. 세포자멸사를 제조업자 권고(ApoBrdU Red DNA 단편화 키트, 바이오비전)에 따라 TUNEL-양성 세포를 정량화함으로써 평가하였다. GFP에 의한 항-BrdU-Red 염색과 LV 형질도입에 의해 둘 다 아포토시스를 측정하기 위해 유세포분석을 사용하였다.

[0174] 도 2에 나타난 바와 같이, 성장 인자 회수의 48시간 후에, HD 뉴런(모의 감염)은 비-HD 뉴런(~20%)보다 더 높은 세포사(대략 50%)를 나타내었다. 렌티-GFP 감염이 HD 뉴런에서 세포사 수준에 영향을 미치지 않았지만, 렌티-33074-KOX-2A-GFP 감염은 세포자멸사 세포의 상당한 뉴런 감소(백분율)(대략 50% 내지 20%)를 야기한다.

[0175] 따라서, 돌연변이체 Htt의 ZFP-유래 억제는 성장 인자 회수에 대해 HD 뉴런의 취약성을 감소시킨다.

[0176] **실시예 2: ZFP-TF는 Q175 마우스에서 돌연변이체 Htt 응집을 방지하고 반전시킨다**

[0177] 돌연변이체 Htt ZFP-TF(ZFP-30640 및 30645)의 대립유전자-특이적 리프레스의 생체내 효능을 Q175 녹인(knock-in) 마우스 모델에서 시험하였는데(Menalled *et al.* (2012) *PLoS One* 7(12):e49838), 이때 마우스 Htt 대립유전자 중 하나의 엑손 1을 확장된 CAG 반복부(대략 179 CAG)를 함유하는 인간 Htt 엑손 1로 대체하였다. 돌연변이체 Htt의 병리학적 응집물은 2개월령 만큼의 Q175 마우스의 선조체에서 검출되기 시작할 수 있으며, 연령에 따라 증가를 계속하고; 응집은 6개월령까지 잘 확립되었다.

[0178] ZFP가 선조체 내 돌연변이체 Htt의 축적을 방지할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, 음성 대조군으로서 AAV-

ZFP, 또는 AAV-GFP의 한쪽 선조체 내 주사(2×10^{10} 개 벡터 계능/선조체)를 2개월령 Q175 마우스에서 수행하였고; ZFP 및 GFP 발현을 인간 시냅신(Synapsin) 1 프로모터에 의해 유발하였다.

[0179] 주사 2개월 후(4개월령), 뇌를 채취하고 나서, 절단하고, 면역조직화학 분석을 실시하여 ZFP 및 Htt 발현을 평가하였다. ZFP 발현을 FLAG 에피토프 태그에 대해 항체에 의해 검출하였고, 돌연변이체 Htt 응집물을 항-Htt 항체(mEM48)에 의해 검출하였다. AAV-30645-주사 마우스로부터의 대표적인 이미지를 도 3A 내지 도 3H에 나타낸다. 주사를 받지 않은 대측성 선조체에서, 돌연변이체 Htt(mEM48) 응집물을 용이하게 검출하였고; AAV-30645 주사를 받은 동측성 선조체에서, 매우 저수준의 돌연변이체 Htt 응집물만이 ZFP-발현 세포에서 관찰되었다(양성 FLAG 염색에 의해 표시함).

[0180] 도 3I에 나타난 바와 같이, 세포당 핵 Htt 응집물 수를 AAV-ZFP 및 AAV-GFP-주사 마우스의 동측성 선조체 내 FLAG(+) 및 GFP(+) 세포에 대해 각각 정량화시켰을 때, 그리고 이어서 비주사 대측성 선조체에서 세포당 응집물 수에 대해 정규화시켰을 때, ZFP-30640와 30645는 둘 다 핵 Htt 응집물 수가 상당히 감소되었다(>90%)($P < 0.001$, 크루스칼-왈리스 검정 및 Dunn의 다중 비교).

[0181] 도 3J에 나타난 바와 같이, ZFP- 또는 GFP-발현 세포에서 핵 mEM48 염색 강도를 대측성 선조체로부터의 뉴런에서의 염색 강도에 대해 정규화시켰을 때, 핵 mEM48 강도의 50 내지 60% 감소를 ZFP-주사 선조체에서 관찰하였다($P < 0.001$). 도 3K에 나타난 바와 같이, ZFP- 또는 GFP-발현 세포에서 핵 주위 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도를 대측성 선조 신경원에서의 밀도에 대해 정규화시켰고, 핵 주위 Htt 응집물 밀도의 45 내지 70% 감소를 ZFP-주사 선조체에서 관찰하였다($P < 0.01$).

[0182] 이들 결과는 2개월령에 주사하였을 때, ZFP-TF가 4개월령에 Q175 마우스의 선조체에서 돌연변이체 Htt 응집을 방지하였음을 나타낸다.

[0183] ZFP가 잘 확립된 Htt 응집을 반전시킬 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, AAV-GFP-2A-ZFP의 한쪽 선조체 내 주사를 6개월령 Q175 마우스에서 수행하였고; 절단가능한 2A 펩타이드는 GFP 및 ZFP가 동일한 벡터로부터 발현되게 하며, ZFP-발현 세포는 GFP 발현에 의해 동정할 수 있다. 8개월령에, 뇌를 채취하고 나서, 절단하고, 면역조직화학 분석을 실시하여 Htt 응집을 평가하였다. AAV-GFP-2A-30645-주사 마우스로부터의 대표적인 이미지를 도 4A에 나타낸다. 선조체-특이적 단백질인 DARPP-32에 대한 항체를 사용하여 선조체를 표지하였다. 주사를 받지 않은 대측성 선조체에서, 고수준의 돌연변이체 Htt 응집(mEM48 항체에 의해 검출함)을 관찰하였고; AAV-GFP-2A-30645 주사를 받은 동측성 선조체에서, 돌연변이체 Htt 응집의 감소를 관찰하였다.

[0184] 더 나아가, 세포당 Htt 응집물의 수를 AAV-GFP-2A-ZFP 및 AAV-GFP-주사 마우스의 동측성 선조체에서 GFP(+) 세포에 대해 정량화하였고, 이어서 비주사 대측성 선조체에서 세포 당 응집물의 수에 대해 정규화시켰다. 도 4B에 나타난 바와 같이, GFP-2A-30640의 전달은 Htt 핵 응집물 수의 대략 20% 감소($P < 0.001$, 크루스칼-왈리스 검정 및 Dunn의 다중 비교)를 야기하였고, GFP-2A-30645의 전달은 또한 세포당 Htt 핵 응집물 수의 적은 감소를 야기하였다.

[0185] AAV-GFP-2A-ZFP- 및 AAV-GFP-주사 마우스의 동측성 선조체로부터의 GFP(+) 세포 내 핵 mEM48 염색의 강도를 또한 대측성 선조체로부터의 뉴런에 대해 정규화시켰다. 도 4C에서 나타난 바와 같이, 핵 mEM48 강도의 대략 20% 감소($P < 0.001$)를 GFP-2A-30645-주사 선조체에서 관찰하였다. 핵 mEM48 강도의 대략 10% 감소를 또한 GFP-2A-30640-주사 선조체에서 관찰하였다.

[0186] AAV-GFP-2A-ZFP- 및 AAV-GFP-주사 마우스의 동측성 선조체에서 GFP(+) 세포 내 핵 주위 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도를 측정하고 나서, 대측성 선조 신경원에서의 밀도에 대해 정규화시켰다. 도 4D에 나타난 바와 같이, 핵 주위 Htt 응집물 밀도의 30 내지 50% 감소($P < 0.001$)를 ZFP-주사 선조체에서 관찰하였다.

[0187] 이들 결과는 6개월령에 주사할 때, ZFP-TF가 2개월 후에만 Q175 마우스의 선조체 내의 이미 존재한 돌연변이체 Htt 응집물을 반전시켰다는 것을 나타낸다. 돌연변이체 Htt 응집물의 더 실질적인 클리어런스는 마우스 뇌를 분석하기 전에 2개월 초과 동안 ZFP의 발현이 계속되는지의 여부를 예상한다.

[0188] 종합하면, 데이터는 HD 대상체의 뇌에 전달된 돌연변이체 Htt-대립유전자 리프레서가 HD 뉴런에서 증가된 수준의 세포내 ATP 농도를 야기하고, HD 뉴런에서 세포자멸사를 감소시켰으며, 존재하는 Htt 응집을 방지하고 클리어런스시켰다.

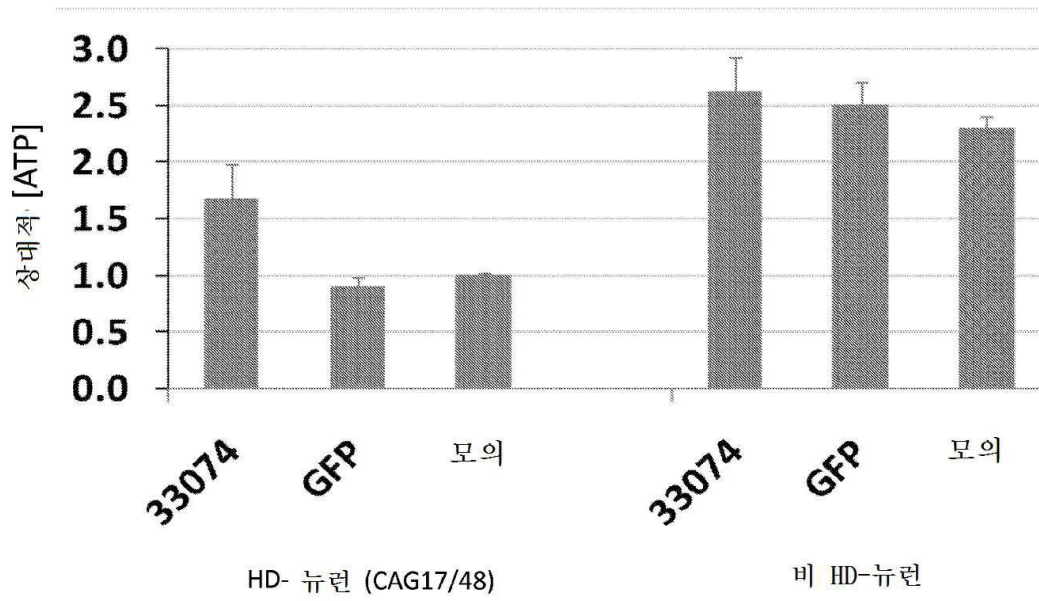
[0189] **실시예 3: ZFP-TF 치료의 효능**

- [0190] 돌연변이체 Htt 대립유전자에 대해 특이적인 Htt-결합 분자(예를 들어, ZFP-TF, TALE-TF 등)로 치료한 대상체 상에서 진단 시험을 수행한다. HD 대상체를 본 명세서에 기재한 바와 같은 Htt-결합 분자로 치료한다. CSF를 표준 방법(예를 들어, 요추 천자)에 의해 대상체로부터 추출하고, 이어서, 당업계에 공지된 방법을 실시하여 mHtt 단백질을 검출하고 정량화한다(문헌[Wild *et al*], 이하 참조). mHtt 단백질 수준은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료법 후 CSF에서 감소된다.
- [0191] **실시예 4: ZFP-TF는 Q175 마우스에서 돌연변이체 Htt 응집을 방지하고 감소시키며, DARPP32 유전자의 발현을 증가시킨다.**
- [0192] 돌연변이체 Htt ZFP-TF(ZFP-33074)의 다른 대립유전자-특이적 리프레서의 생체내 효능을 Q175 녹인 마우스 모델에서 시험하였고(Menalled *et al.* (2012) *PLoS One* 7(12):e49838), 이때 마우스 Htt 대립유전자 중 하나의 엑손 1을 확장된 CAG 반복부(대략 179 CAG)를 함유하는 인간 Htt 엑손 1로 대체하였다. 돌연변이체 Htt의 병리학적 응집물은 2개월령 만큼의 Q175 마우스의 선조체에서 검출되기 시작할 수 있으며, 연령에 따라 증가를 계속하고; 응집은 6개월령까지 잘 확립되었다.
- [0193] ZFP가 선조체 내 돌연변이체 Htt의 축적을 방지할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, 음성 대조군으로서 AAV-ZFP-2A-GFP 또는 AAV-GFP의 한쪽 선조체 내 주사(2×10^{10} 개 벡터 게놈/선조체)를 2개월령 Q175 마우스에서 수행하였고; ZFP 및 GFP 발현을 인간 시냅신 1 프로모터에 의해 유발하였다. 자가 절단성 2A 펩타이드는 GFP 및 ZFP가 동일한 벡터로부터 발현되게 하며, ZFP-발현 세포는 GFP 발현에 의해 동정될 수 있다.
- [0194] 주사 2개월 후(4개월령), 뇌를 채취하고 나서, 절단하고, 면역조직화학 분석을 실시하여 ZFP 및 Htt 발현을 평가하였다. 형질도입한 세포를 GFP에 의해 표시하고 나서, 중형 돌기 뉴런(MSN)을 DARPP32 항체에 의해 표지하고, 돌연변이체 Htt 응집물을 항-Htt 항체(mEM48)에 의해 검출하였다.
- [0195] 도 5A에 나타난 바와 같이, AAV-형질도입 MSN(GFP 및 DARPP32 항체에 의해 표지)에서, 세포당 핵 Htt 응집물 또는 봉입물의 수는 ZFP 33074에 의해 유의하게 감소되었다($P < 0.001$). 도 5B는 AAV-형질도입 세포에서 핵 외 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도가 ZFP-처리 선조체에서 유의하게 감소되었다는 것을 나타낸다($P < 0.0001$). 도 5C는 핵 mEM48 염색(돌연변이체 Htt)의 강도가 ZFP-처리 마우스에서 유의하게 감소되었음을 나타낸다($P < 0.001$).
- [0196] 이들 결과는 2개월령에 주사하였을 때, ZFP 33074가 Q175 마우스의 선조체에서 돌연변이체 Htt 응집을 방지한다는 것을 나타낸다.
- [0197] ZFP가 Q175 선조체에서 잘 확립된 후에 그것이 Htt 응집을 감소시킬 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, AAV-GFP-2A-ZFP 또는 AAV-GFP의 한쪽 선조체 내 주사를 6개월령 Q175 마우스에서 수행하였다. 10개월령에, 뇌를 채취하고, 절단하고 나서, 면역조직화학을 실시하였다.
- [0198] **도 6A**는 AAV-형질도입 MSN(GFP 및 DARPP32 항체에 의해 표지)에서, 세포 당 핵 Htt 응집물/봉입물의 수가 ZFP 33074에 의해 유의하게 감소되었음을 나타낸다($P < 0.001$). **도 6B**는 AAV-형질도입 세포에서 핵 외 돌연변이체 Htt 응집물의 밀도가 ZFP-처리 선조체에서 유의하게 감소되었음을 나타낸다($P < 0.0001$). **도 6C**는 핵 mEM48 염색의 강도(돌연변이체 Htt)가 ZFP-처리 마우스에서 유의하게 감소되었음을 나타낸다($P < 0.001$).
- [0199] **도 7A**는 10개월령 Q175 마우스에서, MSN 마커 DARPP32의 발현이 연령-매칭 야생형 마우스에 비해 감소된다는 것을 나타내는데($P < 0.05$), 이는 이들 마우스에서 MSN의 퇴행을 시사한다. **도 7B**는 Q175 마우스를 6개월령에 AAV-ZFP-2A-GFP로 주사하고 10개월령에 DARPP32 발현에 대해 분석하였을 때, DARPP32 발현의 유의한 증가가 대조군-치료 마우스에 비해 ZFP 33074-치료 마우스에서 발견되었음을 나타낸다.
- [0200] 종합하면, 이들 결과는 6개월령에 주사했을 때, ZFP 33074가 존재하는 응집물의 존재에서 돌연변이체 Htt 발현 및 응집을 감소시킬 수 있다는 것을 입증한다. 게다가, ZFP 33074는 DARPP32의 발현을 구할 수 있는데, 이는 MSN의 보호를 시사한다. 확장된 CAG 반복부에 대해 ZFP를 동원하는 DNA 결합 도메인(DBD)이 필요한데, DBD(ZFP ΔDBD)가 없는 대조군 벡터는 돌연변이체 Htt 응집 또는 DARPP32 발현을 달성하지 않기 때문이다.
- [0201] **실시예 5: CRISPR/Cas-TF는 HD 뉴런에서 돌연변이체 Htt 응집을 방지하고 감소시킨다**
- [0202] CRISPR/Cas 시스템에서 사용하기 위한 sgRNA는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 합성으로 만든다(문헌[Hsu *et al* (2013) *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt.2647 또는 Sternberg *et al.* (2014) *Nature* 507: 62] 참조). gRNA는 상기 기재한 바와 같이 공학처리하고, mHtt에서 서열을 표적화하도록 설계한다. 예를 들어, sgRNA는 다음의 서열 중 하나를 가질 수 있으며, 여기서 PAM 서열을 밑줄 표시한다:

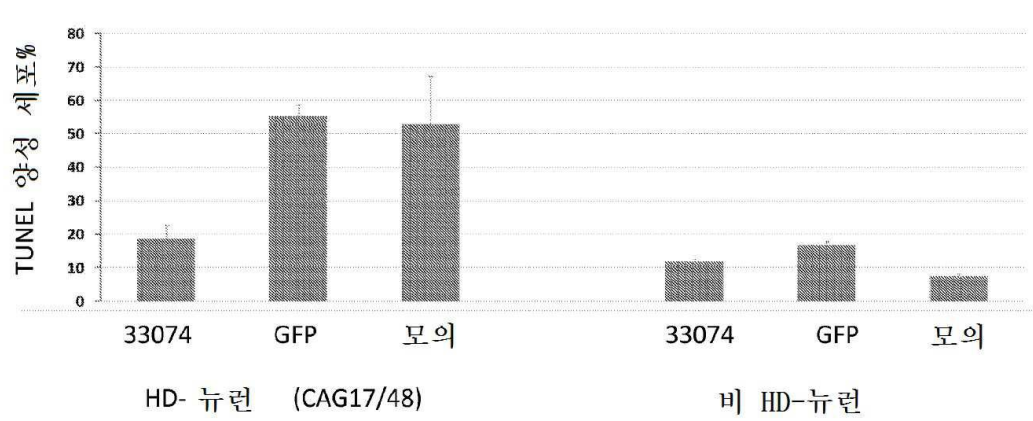
- [0203] 5' GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3' 서열번호122
- [0204] 5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3' 서열번호123
- [0205] 5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3' 서열번호124
- [0206] 5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 3' 서열번호125
- [0207] CRISPR/Cas 전사 인자를 당업계에 공지된 방법에 따라 제조한다(예를 들어, 문헌[Perez-Pinera (2013) *Nature* 10(10):973 및 Qi and Arkin (2014) *Nature Reviews Microbiology* 12:341] 참조). 간략하게, 뉴클레아제 결합 Cas9 단백질을 사용하고 억제 도메인(즉, KRAB)에 융합시킨다.
- [0208] 배양 HD 뉴런을 상기 기재한 바와 같은 Cas9(뉴클레아제)-KRAB 융합 단백질 암호화 mRNA(20 μ g/ml) 및 sgRNA로 형질감염시키되, sgRNA를 BTX ECM830를 이용하는 전기천공법에 의해 mRNA(예를 들어, 2 내지 4 μ g) 또는 DNA 발현 벡터(예를 들어, 400ng 내지 800ng)를 통해 도입한다. 세포를 5일 후 정량적 택맨(Taqman) 분석으로 수집하여 mHtt 발현을 측정한다. 추가적으로, 세포에 상기 기재한 실험을 실시하여 세포내 ATP 수준을 측정하고 세포 자멸사를 분석한다. 데이터는 sgRNA를 이용하는 mHtt-특이적 CRISPR/Cas 전사 인자가 mHtt 발현을 억제하고 mHtt 단백질 응집에 의해 야기되는 표현형 특성을 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0209] **실시예 6: 운동결핍의 감소**
- [0210] 동물(예를 들어, 마우스)에 본 명세서에 기재한 바와 같은 Htt-리프레서를 투여하고, 이들 동물에 의해 나타나는 잘 확립된 동물 결함인 움켜잡기 거동에 대해 정기적으로 시험하였다(Mangiarini *et al.* 1996 *Cell* 87, 493-506). 간략하게, 각각의 동물을 그의 홈(home) 우리로부터 제거하고, 우리 뚜껑에 위치시켰다. 이어서, 동물이 약 12인치만큼 표면 위로 매달릴 때까지 부드럽게 움직이면서 관찰자에 의해 동물을 뒤쪽으로 그리고 위쪽으로 부드럽게 끌어당긴다. 이어서, 동물을 30초 동안 스코어링한다. 앞다리 움켜잡기만이 관찰된다면, 동물은 1점이 주어진다. 뒷다리 움켜잡기만이 관찰된다면, 동물은 2점이 주어진다. 뒷다리와 앞다리 움켜잡기가 둘 다 관찰되지만, 동시는 아니라면, 동물은 3점이 주어진다. 중심부 내로 단단하게 당겨진 동시의 뒷다리와 앞다리 움켜잡기에 의해 나타나는 완전한 움켜잡기는 4점이 주어진다. 30초 매단 후에, 동물을 그의 홈 우리에 복귀시킨다. 각각의 처리군뿐만 아니라 연령-매칭 야생형 한배 새끼에 대해, 각각의 매주 관찰에 완전한 움켜잡기(4점)을 나타내는 동물의 비율을 결정한다.
- [0211] 대조군(Htt-리프레서 없음)에 비해, 본 명세서에 기재된 Htt-리프레서는 잘 특성규명된 운동결함인 움켜잡기 거동을 개선시킨다.
- [0212] 본 명세서에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물은 그들의 전문이 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0213] 개시내용을 이해의 명확함의 목적을 위해 예시 및 실시예의 방법에 의해 일부 상세하게 제공하였지만, 다양한 변화 및 변형이 본 개시내용의 정신 또는 범주로부터 벗어나는 일 없이 실행될 수 있다는 것이 명확할 것이다. 따라서, 앞서 언급한 설명 및 실시예는 제한으로서 해석되어서는 안 된다.

도면

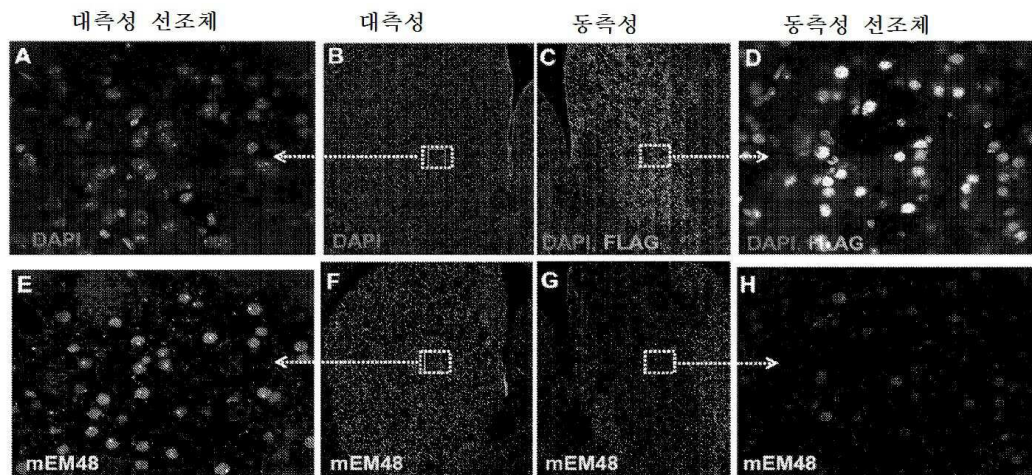
도면1



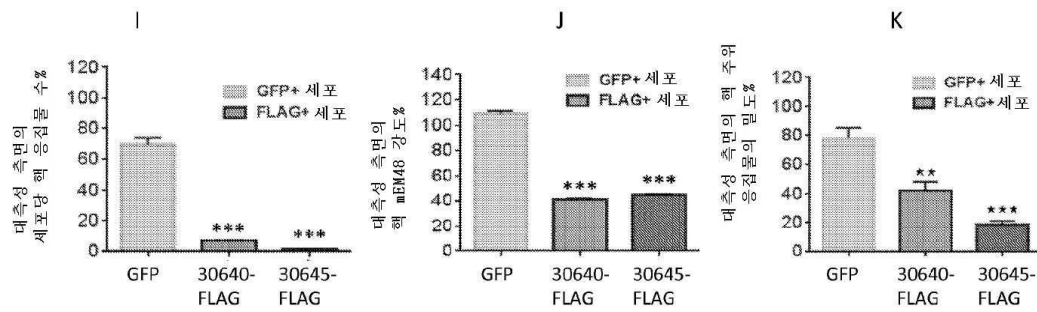
도면2



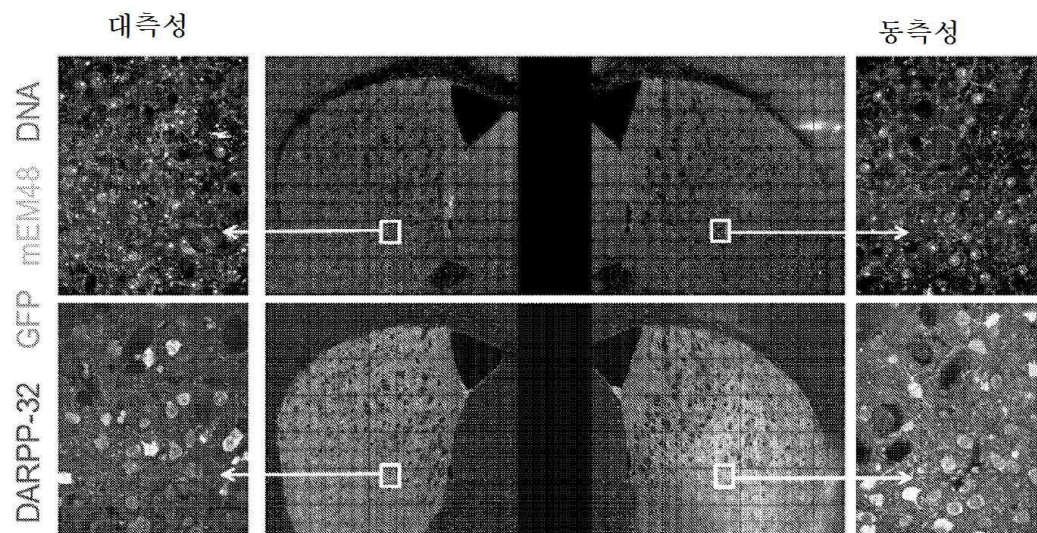
도면3ah



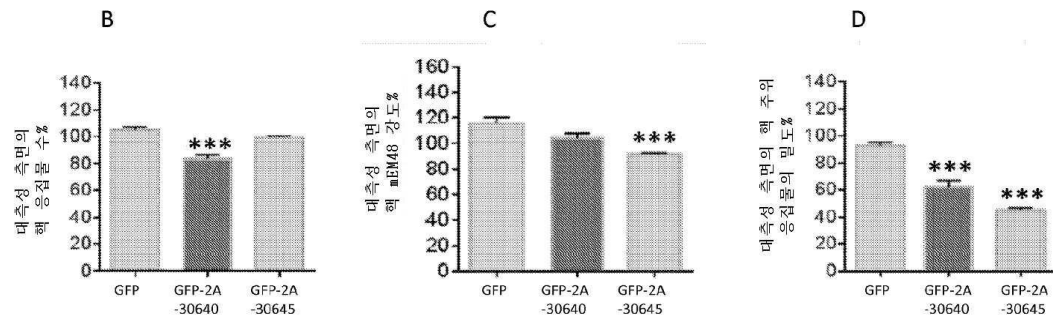
도면3ik



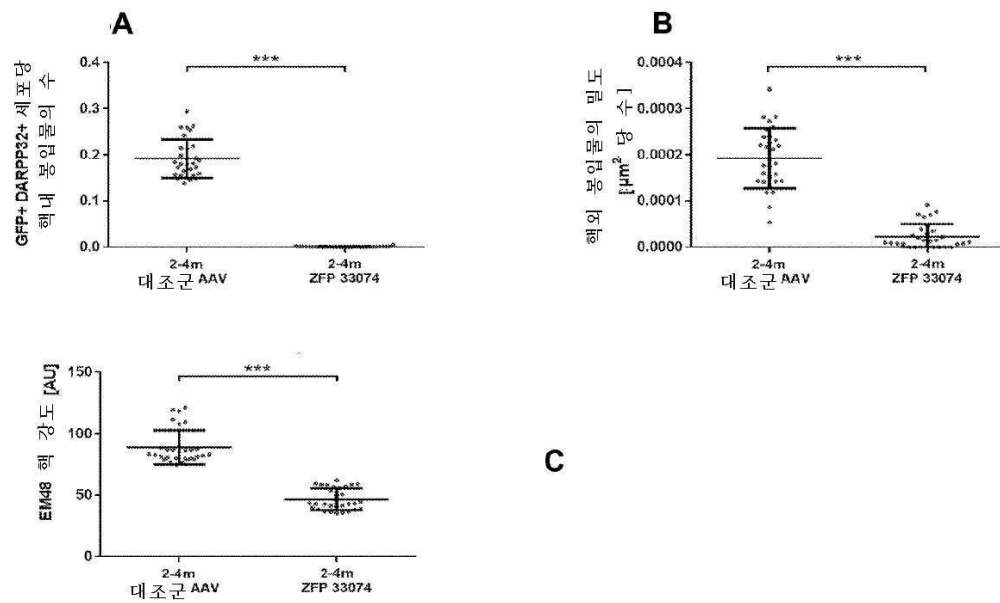
도면4a



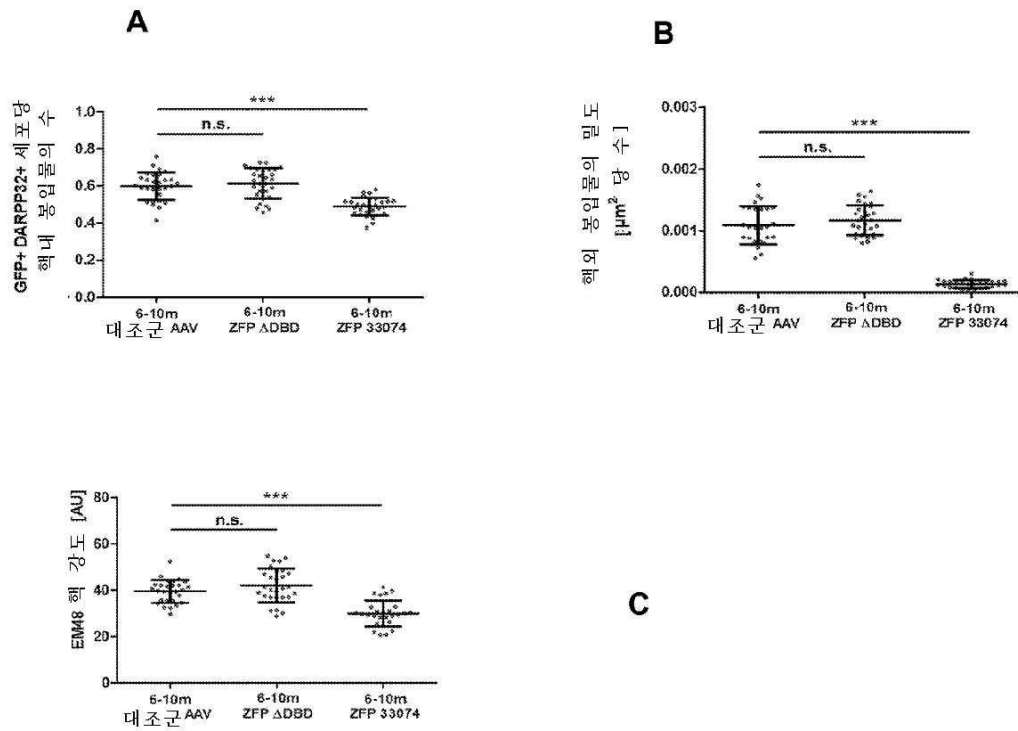
도면4bd



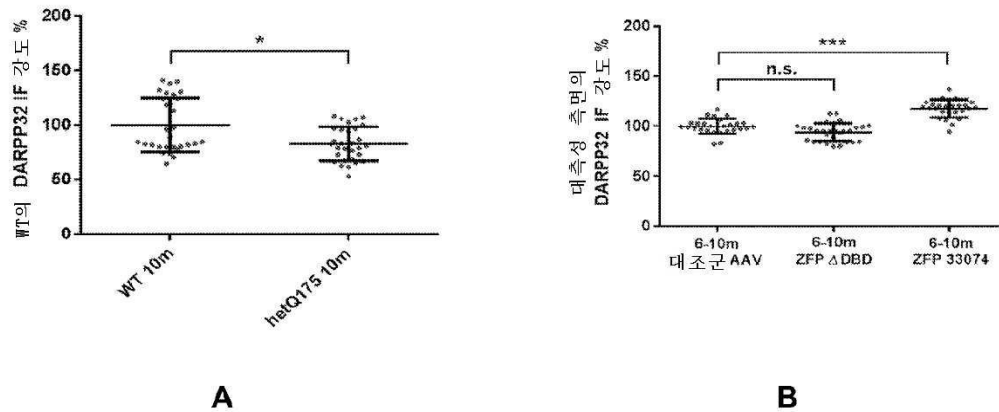
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.

CHDI FOUNDATION, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING HUNTINGTON'S DISEASE

<130> WO/2015/171932

<140> PCT/US2015/029748

<141> 2015-05-07

<150> US 62/051,724

<151> 2014-09-17

<150> US 61/990,521

<151> 2014-05-08

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

Arg Asn Asp Asn Arg Thr Lys

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Arg Ser Asp Asp Arg Lys Thr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 5

Arg Ser Ala Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 6

Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 7

Arg Ser Ala Ala Leu Ser Arg

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 9

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 11

Trp Arg Ser Cys Arg Ser Ala

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 12

Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 13

Gln Arg Thr His Leu Thr Gln

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Arg Ser Ala His Leu Ser Arg

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 15

Thr Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

Gln Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 19

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Trp Arg Gly Asp Arg Val Lys

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 23

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Arg

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 25

Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

Thr Ser Gly Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

Gln Ser Gly His Leu Gln Arg

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Arg Ser Asp Val Leu Ser Thr

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

Val Arg Ser Arg Leu Arg Arg

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

Asp Arg Ser Thr Leu Arg Gln

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 33

Gln Ser Ser Thr Arg Ala Arg

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 35

His Arg Arg Ser Arg Trp Gly

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 36

Arg Arg Asp Thr Leu Arg Ser

1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 37

Arg Ser Asp His Leu Ser Thr

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 38

Gln Ser Ala His Arg Ile Thr

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 39

Arg Ser Asp His Leu Ser Glu

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 40

Gln Asn Ala His Arg Lys Thr

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

His Arg Ser Thr Arg Asn Arg

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

Leu Arg Gln Asp Leu Lys Arg

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

Asp Arg Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 44

Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Leu Lys Gln Met Leu Ala Val

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 47

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Thr

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

Asp Arg Ser Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 49

Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 51

Lys Leu Cys Asn Arg Lys Cys

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 52

His Arg Thr Ser Leu Thr Asp

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 54

Leu Lys His His Leu Thr Asp

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

Tyr Arg Trp Leu Arg Asn Asn

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 56

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 57

Arg Ser Ala Val Arg Lys Asn

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 58

Trp Ser Thr Ser Leu Arg Ala

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 59

Arg Ser Ser His Leu Ser Arg

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 60

Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 61

Thr Arg Gln Asn Arg Asp Thr

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 62

Asp Gln Ser Thr Leu Arg Asn

1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 63

Arg Arg Trp Thr Leu Val Gly

1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 64

Arg Ser Ala Val Leu Ser Glu

1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 65

Gln Trp Ser Thr Arg Lys Arg

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 66

Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 67

Asp Pro Ser Asn Arg Val Gly

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 69

Asp Asn Ser Asn Arg Ile Lys

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 70

Tyr Arg Trp Leu Leu Arg Ser

1 5

<210> 71

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 71
 Arg Lys Asp Ala Leu Val Ala

1 5
 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 72
 Arg Arg Ala Asp Leu Ser Arg

1 5
 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 73
 Leu Ala Gln Pro Arg Asn Lys

1 5
 <210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 74

Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg

1 5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

Asp Asp Ser His Arg Lys Asp

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

His Lys Gln His Arg Asp Ala

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

Arg Arg Thr Asp Leu Arg Arg

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 78

Arg Ser Ala Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 79

Arg Ser Asp His Leu Ser Ala

1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 80

Arg Ser Ala Asp Arg Thr Arg

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 81

Thr Ser Ser Asp Arg Lys Lys

1 5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 82

His His Ser Ala Arg Arg Cys

1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 83

Asp Asn Ser Ser Arg Thr Arg

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84

Arg Ser Ala Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 85

Arg Asn Asp Asp Arg Lys Lys

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

Gln Lys Val Thr Leu Ala Ala

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 87

Arg Arg Ser Thr Leu Arg Ser

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 88

Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 89

Leu Lys Trp Asn Leu Arg Thr

1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 90

Leu Lys Trp Asp Arg Gln Thr

1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

Gln Ser Gly Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Arg Ser Asp His Leu Thr Gln

1 5

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 93

Arg Ser Asp Ser Leu Leu Arg

1 5

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 94

Arg Arg Asp Trp Leu Pro Gln

1 5

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

Asp Arg Ser His Leu Ser Arg

1 5

<210> 96

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 96

acgctgcgcc ggcggaggcg gggccgcg

28

<210> 97

<211> 28

<212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Human and mouse
 target sequence
 <400> 97
 gcgctcagca ggtggtgacc ttgtggac 28
 <210> 98
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Human and mouse
 target sequence
 <400> 98
 atggtgggag agactgtgag gcggcagc 28
 <210> 99
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Human and mouse
 target sequence
 <400> 99
 tgggagagac tgtgaggcgg cagctggg 28
 <210> 100
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Human and mouse
 target sequence
 <400> 100
 atggcgctca gcaggtggtg accttgtg 28
 <210> 101
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 101
agccggccgt ggactctgag ccgaggtg 28

<210> 102
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 102
cgcaactcgcc gcgagggttg ccgggacg 28

<210> 103
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 103
gtggcgatgc ggggggcgtg gtgaggtg 28

<210> 104
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 104
ccgggacggg tccaagatgg acggccgc 28

<210> 105
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 105

ccgtcccggc agcccccacg ggccttg 28

<210> 106

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 106

ctgctgctgc tgctgctgct ggaaggac 28

<210> 107

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 107

cgggtccaag atggacggcc gctcaggt 28

<210> 108

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 108

ctgctgctgc tgctggaagg acttgagg 28

<210> 109

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 109
tcagatggga cggcgctgac ctggctgg 28

<210> 110
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 110
ctgccatgga cctgaatgat gggaccca 28

<210> 111
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 111
gtggtctggg agctgtcgct gatgggcg 28

<210> 112
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 112
ccgaagggcc tgattcagct gttacccc 28

<210> 113
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 113
aacttgcaag taacagaaga ctcaccc 28

<210> 114

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 114

cttgtacagc tgtgagggtg agcataat 28

<210> 115

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 115

gccatggtgg gagagactgt gaggcggc 28

<210> 116

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 116

ctcagcaggt ggtgaccttg tggacatt 28

<210> 117

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 117

agcagcagca gcagcagcag cagcagca 28

<210> 118

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 118

cagcagcagc agcagcagca gcagcagc 28

<210> 119

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 119

tgctgctgct gctgctgctg ctggaagg 28

<210> 120

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 120

ctgctgctgc tgctgctgct gctggaag 28

<210> 121

<211> 29

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 121

ctgctgctgc tgctgctgct gctggaagg 29

<210> 122

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 122

gcagcagcag cagcagcagc agcagcag 28

<210> 123

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 123

gcagcagcag cagcagcagc agcag 25

<210> 124

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 124

gcagcagcag cagcagcagc ag 22

<210> 125

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 125

gcagcagcag cagcagcag 19

<210> 126

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 126

tgctgctgct gctgctgctg ctggaagg 28

<210> 127

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 127

ggctggccttt tgcgggaagg ggcgggggc 28

<210> 128

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 128

gaattgacag gcggatgcgt cgtcctct 28

<210> 129

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence

<400> 129

gcggcgagtgc cgtcccgatga cgtcatgc 28

<210> 130

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 130

attctgcggg tctggcgtgg cctcgtct 28

<210> 131

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 131

gtgacgtcat gccggcggag acgaggcc 28

<210> 132

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 132

gtgcgtcccg tgacgtcatg ccggcgga 28

<210> 133

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 133

gccgcgaggg ttgccgggac gggcccaa 28

<210> 134

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Human and mouse

target sequence

<400> 134
ccgcgagggt tgccgggacg ggccaag 28
<210> 135
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 135
catcgggcag gaagccgtca tggcaacc 28
<210> 136
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 136
tcctgcccga tgggacagac cctgaaga 28
<210> 137
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 137
gtactgagca atgctgtagt cagcaatc 28
<210> 138
<211> 28
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse
target sequence
<400> 138

cctgtccaga gggtcgcggt acctccct	28
<210> 139	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Description of Unknown: Human and mouse target sequence	
<400> 139	
tgccggacct ggcagcggcg gtggtggc	28
<210> 140	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 140	
gcagcagcag cagcagcagc a	21
<210> 141	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 141	
gcagcagcag cagcagca	18
<210> 142	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 142	
gcagcagcag cagca	15

<210> 143

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 143

gcagcagcag ca

12

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 144

ctgctgctgc tgctgctgct g

21

<210> 145

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 145

ctgctgctgc tgctgctg

18

<210> 146

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 146

ctgctgctgc tgctg

15

<210> 147

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 147

ctgctgctgc tg

12