



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0052034
(43) 공개일자 2024년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7010496
(22) 출원일자(국제) 2022년09월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/042486
(87) 국제공개번호 WO 2023/034582
국제공개일자 2023년03월09일
(30) 우선권주장
63/240,428 2021년09월03일 미국(US)
63/345,660 2022년05월25일 미국(US)

(71) 출원인
테시트 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
유1 바이오, 서드 플로어, 제이랩스, 오이스터 포
인트 블러바드 329
(72) 발명자
넬레스, 데이비드 에이.
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코,
유1 바이오, 서드 플로어, 제이랩스, 오이스터 포
인트 블러바드 329, 테시트 테라퓨틱스, 인코포레
이티드 내.
(74) 대리인
특허법인정진

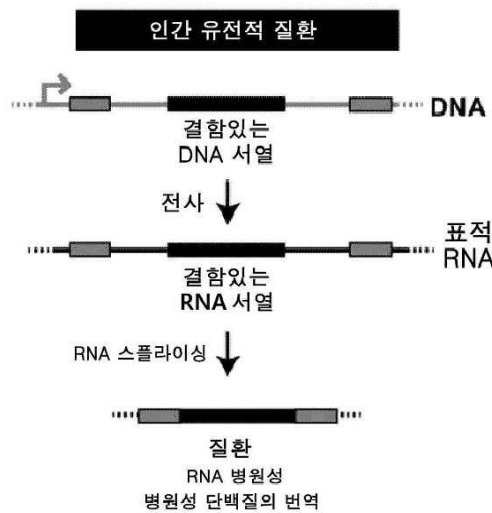
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 스플라이세오솜 구성요소의 동원을 통한 RNA 편집

(57) 요약

트랜스-스플라이싱을 촉진하기 위한 방법 및 조성물이 개시된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 표적 RNA 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함한다. 조성물은 RNA 공여체 분자를 추가로 포함할 수 있다.

대표도



도 1a

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 2320/33 (2013.01)

C12N 2830/48 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표적 RNA 분자와 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물.

청구항 2

표적 RNA 분자와 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 공여체 분자는 (a) 작동가능하게 연결된 치료적 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, RNA 공여체 분자는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11, 및 U12로 구성된 군으로부터 선택된 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리되고 RNA 공여체 분자와 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 5' 말단으로부터 16개 미만의 핵염기로 시작하는 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체는 vU1.4, vU1.11, vU1.8, vU1.7, vU1.5 및 vU1.12로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 소형 핵 RNA 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체,

화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함하는, 조성물.

청구항 12

RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물로서, (a) 작동가능하게 연결된 치료 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인; 및 (d) RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 RNA 공여체 분자에서의 스플라이스 공여체 부위로부터 200개 미만의 염기로 떨어져 위치되는, 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래되는, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 인간 소형 핵 RNA 유전자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11, 및 U12로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 합성이고 스플라이세오솜의 구성요소에 결합하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 유전자의 변이체로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, RNA 공여체 분자는 적어도 4개 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 번역-증강 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터의 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE) 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 공여체 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함하는, 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서, 벡터는 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 나노입자, 미셀, 리포솜, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 및 덴드리머로 구성된 군으로부터 선택되는, 벡터.

청구항 31

제29항 또는 제30항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 32

질환의 치료 방법으로서, 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제29항 또는 제30항의 벡터를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 33

대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법으로서, 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제29항 또는 제30항의 벡터를 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 34

질환의 치료 방법으로서, 치료적으로 유효한 양의 치료를 필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제29항 또는 제30항의 벡터를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 35

대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법으로서, 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제29항 또는

제30항의 벡터를 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 교차-참조

[0002] 본 출원은 2021년 9월 3일에 출원된 미국 가출원 번호 63/240,428 및 2022년 5월 25일에 출원된 미국 가출원 번호 63/345,660의 이익을 주장하며, 이 출원은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 질환-야기 RNA 서열을 대체하기 위한 필요성이 오랫동안 느껴졌지만 충족되지 않았다. 개시내용은 인간 세포에서 RNA 분자에서의 특정 RNA 서열의 대체를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 본 개시내용은 표적 RNA 내에서 선택된 RNA 서열의 대체를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 인간 유전자 요법의 맥락에서 질환을 치료하기 위해 스플라이세오솜의 구성요소를 RNA 공여체로 동원하고 표적 RNA의 편집을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA와 조합하여 사용되는 RNA 공여체 분자를 제공한다.

[0004] 인간 유전 장애의 효과적인 치료는 인간 세포에서 결함이 있는 유전 서열의 효율적인 대체를 필요로 한다. RNA 편집은 인간 유전자 치료제로 제안되었지만 RNA 편집의 낮은 효율성과 제한된 크기 및 조성에 기인하여 임상 시험에서 성공하지 못했다. 더욱이, RNA와 DNA를 편집하기 위한 면역원성 단백질의 사용은 안전성 문제를 제기했다. 본 개시내용은 오랫동안 느껴졌지만 충족되지 않은 이 요구를 해결할 수 있는 RNA 편집에 대한 개선을 기술한다.

발명의 내용

[0005] 특정 양태에서, 표적 RNA 분자 및 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물이 본 명세서에 개시된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택된 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리되고 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 5' 말단으로부터 16개 미만의 핵염기로 시작하는 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체는 vU1.4, vU1.11, vU1.8, vU1.7, vU1.5, vU1.12로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 소형 핵 RNA 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 적어도 4개의 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열과 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 적어도 4개의 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 번역-증진 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE), 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는

RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 청구 범위의 구성물을 포함하는 벡터가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 나노입자, 미셀, 리포솜, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 및 덴드리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 세포가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다.

[0006]

특정 양태에서, 표적 RNA 분자 및 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물이 본 명세서에 개시되며, RNA 공여체 분자는: (a) 작동가능하게 연결된 치료적 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택된 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리되고 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 5' 말단으로부터 16개 미만의 핵염기로 시작하는 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTCG-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체는 vU1.4, vU1.11, vU1.8, vU1.7, vU1.5, vU1.12로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 소형 핵 RNA 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미변역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 적어도 4개의 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열과 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTCG-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 적어도 4개의 뉴클레오타이드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미변역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 번역-증진 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE), 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 청구범위의 구성물을 포함하는 벡터가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 나노입자, 미셀, 리포솜, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 및 덴드리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는

세포가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다.

[0007]

특정 양태에서, (a) 작동가능하게 연결된 치료적 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결함을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인; 및 (d) RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 RNA 공여체 분자에서의 스플라이스 공여체 부위로부터 200개 미만 염기로 떨어져서 위치된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래된다. 일부 실시형태에서, 인간 소형 핵 RNA 유전자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 합성되고 스플라이세오솜의 구성요소에 결합한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 유전자의 변이체로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 적어도 4개의 뉴클레오티드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열과 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 적어도 4개의 뉴클레오티드 길이이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 번역-증진 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터의 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE), 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 청구범위의 조성물을 포함하는 벡터가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 나노입자, 미셀, 리포솜, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 및 덴드리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 세포가 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물 또는 본 명세서에 기술된 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서 유전적 결함을 교정하는 방법이 본 명세서에 기술된다.

[0008]

참조에 의한 통합

[0009]

본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 본 명세서에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도 1a-1c는 본 명세서에 기술된 방법의 일 실시형태를 도시한다. **도 1a**는 돌연변이된("결합있는") DNA 서열이 질환에 직접적으로 기여하는 RNA("RNA 병원성")로 전사되거나 질환-악기 단백질로의 번역("병원성 단백질의 번역")을 통해 간접적으로 전사되는 인간 유전 장애의 개념을 예시한다. **도 1b**는 공여체 RNA와 조작된 소형 핵 RNA("esnRNA")로 구성된 시스템을 예시한다. RNA 공여체 분자와 esnRNA의 조합은 돌연변이를 담지하는 표적 RNA에 RNA 공여체의 혼성화와, 이어서 esnRNA의 RNA 공여체와의 회합을 통해 돌연변이된 RNA를 교정하며, 이는 스플라이세오솜 구성요소의 동원과 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이에서 트랜스-스플라이싱을 초래한다. 이는 표적 RNA에서 선택된 서열을 대체하는 RNA 공여체 분자를 갖는 교정된 표적 RNA를 생성한다. **도 1c**는 구성요소가 상호작용하는 방식을 예시한다. RNA 공여체와 표적 RNA 사이의 염기 페어링은 이들 분자를 근접하게 만든다. esnRNA와 RNA 공여체 사이의 염기 페어링은 스플라이세오솜 구성요소를 근접하게 만들어 표적 RNA와 RNA 공여체 사이의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉진한다.

도 2a-2b는 2개의 비-제한적인 실시형태를 예시한다. **도 2a**는 표적 RNA 분자 내의 내부 서열에서 대체를 초래하는 버전을 예시한다. 이 실시형태에서는 내부 서열을 RNA 공여체 분자로 대체하면서 표적 RNA의 5' 및 3' 말단의 유지를 초래한다. **도 2b**는 표적 RNA의 3' 말단을 유지하면서 표적 RNA의 5' 말단 부분의 대체를 초래하는 것을 예시한다.

도 3a-3b는 2개의 비-제한적인 실시형태를 예시한다. 일 실시형태(**도 3a**)에서, esnRNA와 RNA는 별도의 분자이고 esnRNA와 RNA 공여체는 **도 1c**에 요약된 방식으로 회합한다. **도 3b**에서 esnRNA는 RNA 공여체 내의 도메인이다. 두 경우 모두에서, esnRNA 서열은 RNA 공여체에 대한 스플라이세오솜 구성요소의 동원이 표적 RNA와 RNA 공여체 사이의 트랜스-스플라이싱을 유도하는 동일한 메커니즘에 의해 작용한다.

도 4a-4d는 표적 RNA에서 내부 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA의 중요성을 밝히기 위해 고안된 실험을 예시한다. **도 4a**는 GFP의 N-말단 및 C-말단 부분("C-GFP")을 담지하지만 형광에 필요한 내부 GFP 서열을 결하는 분할 GFP 리포터의 디자인을 예시한다. 리포터에서, 이 내부 GFP 서열은 인트론에 의해 축적된 정지 코돈이 있는 짧은 엑손으로 대체된다. 내부 서열은 하나의 인트론 도메인과 하나의 안티센스 도메인에 의해 축적되는 RNA 공여체 분자 내의 대체 서열이다. **도 4b**는 시스-스플라이싱이 정지 코돈에 의해 중단된 GFP 서열을 생성하고 따라서 GFP 신호를 생성하지 않는 리포터 단독의 활성을 예시한다. **도 4c**는 유사하게 시스-스플라이싱이 주로 발생하고 GFP 신호가 생성되지 않도록 esnRNA의 함입이 없는 RNA 공여체 분자의 존재에서 리포터의 활성을 예시한다. **도 4d**는 트랜스-스플라이싱이 주로 발생하고 GFP 신호가 생성되도록 esnRNA의 함입을 갖는 RNA 공여체 분자의 존재에서 리포터의 활성을 예시한다.

도 5a-5b는 표적 RNA에서 5'-말단 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA의 중요성을 밝히기 위해 고안된 실험을 예시한다. **도 5a**는 GFP의 C-말단 부분("C-GFP")을 담지하지만 형광에 필요한 N-말단 GFP 서열을 결하는 분할 GFP 리포터의 디자인을 예시한다. 리포터에서, 이 N 말단 GFP 서열은 인트론에 의해 축적된 짧은 엑손으로 대체된다. N-말단 서열("N-GFP")은 하나의 인트론 서열과 하나의 안티센스 도메인에 의해 축적되는 RNA 공여체 분자 내의 대체 서열이다. **도 5b**는 시스-스플라이싱이 GFP의 N-말단 부분을 결하는 GFP 서열을 생성하고 따라서 GFP 신호를 생성하지 않는 리포터 단독의 활성을 예시한다. **도 5c**는 유사하게 시스-스플라이싱이 주로 발생하고 GFP 신호가 효율적으로 생성되지 않도록 esnRNA이 없는 RNA 공여체 분자의 존재에서 리포터의 활성을 예시한다. **도 5d**는 트랜스-스플라이싱이 주로 발생하고 GFP 신호가 효율적으로 생성되도록 esnRNA의 함입을 갖는 RNA 공여체의 존재에서 리포터의 활성을 예시한다.

도 6a는 표적 RNA 내의 특정 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA의 특정 특징의 중요성을 조사하는 실험 데이터이다. 인간 U1 snRNA에서 유래되었지만 5' 말단에 RNA 공여체 분자에 상보적인 영역을 생성하는 돌연변이를 담지하는 다양한 esnRNA(문자 A 내지 H)가 구축되었다. 이들 안티센스 도메인의 표적은 **도 6b**에 요약되어 있다. 인간 세포를 **도 5**에 기술된 리포터 시스템과 함께 RNA 공여체 및 다양한 esnRNA로 처리했다. 생성된 GFP 신호는 2개의 esnRNA("esnRNA B" 및 "esnRNA C")가 가장 높은 GFP 신호를 생성하므로 표적 RNA 안으로 RNA 공여체 분자의 가장 효율적인 삽입을 생성한다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 표적 부위 선택이 표적 RNA 안으로 RNA 공여체 서열의 효율적인 esnRNA-지향된 삽입을 달성하는데 중요한 요소임을 나타낸다. "음성 대조군"은 RNA 공여체가 리포터를 표적화하는 안티센스 도메인을 함유하지 않는 실험 조건을 지칭한다. "wt esnRNA"는 RNA 공여체가 실제로 리포터를 표적화하지만 esnRNA가 변형되지 않은 야생형 인간 U1 snRNA와 동일한 실험 조건을 지칭한다.

도 7은 표적 RNA 내의 특정 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA의 존재의 중요성을 조사하는 실험 데이터를 함유한다. esnRNA 분자의 부재에서 서열화된 클론은 전체 길이 GFP에 정렬되지 않았다(오른쪽 패널에 표시된 23개의 서열화된 클론 중 0개). esnRNA의 존재에서, 4개의 클론이 전체 길이 GFP에 정렬되었다(오른쪽 패널에 표시된 24개의 서열화된 클론 중 4개). 이들 완전히-정렬된 클론에는 "클론 1-4"로 표시된다. RNA 공여체 및 표적 RNA로부터 유래된 서열의 접합부를 추적하는 이들 클론의 서열은 모든 클론 사이의 완벽한 정렬 및 전체 길이 GFP의 예상 서열을 밝힌다.

도 8a-8b는 표적 RNA 내의 특정 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA의 다양한 특색의 중요성을 조사하는 실험 데이터를 함유한다. 세포를 esnRNA B 또는 esnRNA B의 다양한 돌연변이된 버전과 도 5에 설명된 리포터 시스템(RNA 공여체 및 리포터)으로 형질감염시켰다. 생성된 GFP 신호는 esnRNA 내의 줄기-루프 구조의 존재가 esnRNA의 활성화에 중요하다는 것을 나타낸다. 실제로, 스플라이세오솜 인자(줄기-루프 1, 줄기-루프 2, 또는 줄기-루프 4)를 동원하는 줄기-루프 구조의 제거 또는 돌연변이는 표적 RNA 안으로 RNA 공여체의 삽입을 감소시킨다. 결과는 도 8a에 묘사되어 있다. 다양한 돌연변이가 도 8b에 묘사되어 있다.

도 9a-9b는 표적 RNA 내의 특정 서열의 대체의 맥락에서 esnRNA 내의 안티센스 도메인의 중요성을 조사하는 실험 데이터를 함유한다. 세포를 esnRNA B 또는 esnRNA B의 다양한 돌연변이된 버전과 도 5에 설명된 리포터 시스템(RNA 공여체 및 리포터)으로 형질감염시켰다. 생성된 GFP 신호(도 9a)는 RNA 공여체에 상보적인 esnRNA에서 서열의 길이를 줄이는 것은 더 낮은 GFP 신호 및 따라서 표적 RNA 내 RNA 공여체의 덜 효율적인 삽입을 초래한다는 것을 나타낸다. esnRNA "+"는 RNA 공여체에 대한 10-염기 상보적 서열을 함유하는 esnRNA의 존재를 나타낸다. "9b", "4b" 및 "2b"는 각각 esnRNA 및 RNA 공여체 간의 9-염기, 4-염기 및 2-염기 상보적 서열을 나타낸다(도 9b). RNA 공여체 "+"는 표적 RNA에 상보적인 서열을 함유하는 RNA 공여체의 존재를 나타내고, "-"는 표적 RNA에 상보적이지 않은 대조군 RNA 공여체를 나타낸다. 결과는 도 9a에 묘사되어 있다. 다양한 돌연변이가 도 9b에 묘사되어 있다.

도 10은 표적 RNA 내의 특정 서열의 대체의 맥락에서 다양한 esnRNA의 활성을 기술하는 실험 데이터를 함유한다. U1 snRNA 및 U1 snRNA의 변이체로부터 유래된 다양한 esnRNA(번호 1-61이고 esnRNA B와 비교됨)가 구축되었다. 모든 esnRNA는 5' 말단에 RNA 공여체 분자에 상보적인 영역을 생성하는 돌연변이를 담지한다. 인간 세포를 도 5에 기술된 리포터 시스템과 함께 RNA 공여체 및 다양한 esnRNA로 처리했다. 생성된 GFP 신호는 RNA 편집과 연관된 효율성을 나타낸다. 이들 데이터는 U1 snRNA의 변이체에서 유래된 서열의 사용이 트랜스-스플라이싱에 의해 RNA 편집 효율성을 증가시키는 중요한 수단임을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

일 양태에서, 살아있는 세포에서 특정 RNA 분자 내의 임의 서열의 대체를 가능하게 하는 RNA 기술이 본 명세서에 개시된다. 이론에 얽매이지 않고, RNA 트랜스-스플라이싱을 기반으로 하는 이 기술은 인간 세포에 자연적으로-존재하는 스플라이세오솜을 활용하여 이 트랜스-스플라이싱 과정에 대한 촉매 활성을 제공한다. 전형적으로, RNA 스플라이싱은 엑손이 연쇄상으로 연결되고 인트론이 미성숙 메신저 RNA 분자(pre-mRNA)에서 제거되어 성숙한 메신저 RNA 분자(mRNA)를 형성하는 RNA 분자 내에서 발생한다. 이 과정을 시스-스플라이싱으로 지칭된다. RNA 트랜스-스플라이싱은 스플라이세오솜이 뚜렷하고 분리된 RNA 분자로부터 유래된 엑손을 연쇄상으로 연결하는 과정이다. 이 과정은 인간 세포에서는 거의 발생하지 않으며 RNA 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 최첨단 시스템은 낮은 수준에서 활성화된다. RNA 트랜스-스플라이싱의 효율을 증가시키는 조성물이 본 명세서에 기술되어 있다. 이들 개선된 RNA 트랜스-스플라이싱 조성물은 인간 질환을 해결하기 위해 표적 RNA 분자 내의 돌연변이된 서열을 대체하는데 사용될 수 있다. 임의 RNA 서열의 대체는 몇몇이 관련 증명으로 탐구된 수많은 특정 적용을 갖는 일반적인 능력이다. RNA 트랜스-스플라이싱은 조작된 서열을 표적 RNA 안에 삽입하여 변경된 RNA 안정성 또는 변경된 RNA 번역과 같은 새로운 활성을 표적 RNA에 부여할 수 있다. 이 기능은 표적 RNA에 의한 단백질의 생산을 증가시키는데 사용될 수 있다. 가장 넓은 의미에서, 이 RNA 트랜스-스플라이싱 기술은 표적 RNA의 코딩 영역과 비-코딩 영역 둘 모두에 임의 변화를 부여할 수 있다.

[0012]

RNA 공여체 분자와 esnRNA 분자의 사용을 포함하는 현재 개시된 RNA 트랜스-스플라이싱 기술은 다중 RNA 표적에 대해 높은 효율로 RNA-트랜스-스플라이싱을 보여주는 최초의 기술이다. 고도로 효율적인 RNA 트랜스-스플라이싱은 이전 RNA 트랜스-스플라이싱 시스템에 비해 3가지 주요 장점을 가지고 있다. 첫째, 이 향상된 효율성은 열성 유전 장애를 치료하기 위해 돌연변이된 유전자의 활성을 재구성하기에 충분한 수준으로 결함있는 RNA 서열을 대체할 수 있다. 실제로, 많은 열성 유전자 장애의 치료에는 적어도 15%의 효율성이 필요하며, 여기서 100%는 표적 RNA 내의 서열의 완전한 대체이다. 둘째, 이 향상된 효율성은 독성 기능 돌연변이의 획득과 관련된 유전 장

애를 치료하기에 충분한 수준으로 결합있는 RNA 서열을 대체할 수 있다. 이들 질환을 치료하려면 독성 돌연변이를 담지하는 RNA를 제거해야 하기 때문에 이 계열에서의 많은 질환에는 돌연변이된 서열의 고도로-효율적인 대체가 필요하다. 결과적으로 훨씬 더 높은 효율이 필요하다(50%+). 마지막으로, 다중 표적 RNA를 변형하기 위해 본 명세서에 기술된 RNA 트랜스-스플라이싱 기술의 광범위한 능력은 이 기술의 광범위하게-적용가능하고 효율적인 버전을 입증한다. 이는 매우 일반적인 기능이며, 본 개시내용은 서열을 다중 표적 RNA로 효율적으로 대체할 수 있는 RNA 트랜스-스플라이싱 시스템의 입증을 제공한다.

[0013] 본 기술을 형성하기 위한 esnRNA 분자의 함입은 표적 RNA 내에서 코딩 서열과 비-코딩 서열 둘 모두의 변경을 추가로 허용하는 능력이다. 표적 RNA의 5' 또는 3' 미번역된 영역을 고효율로 대체함으로써 이는 번역 또는 회전율과 같은 RNA 거동을 변경할 수 있다. 이들 효과의 최종 결과는 표적 RNA로부터 단백질의 증가된 생산 또는 변경된 RNA 수준과 연관된 기타 하류 효과이다.

[0014] **트랜스-스플라이싱을 촉진하기 위한 RNA 분자**

[0015] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 트랜스-스플라이싱을 촉진하기 위한 RNA 분자를 포함한다. 일 양태에서, RNA 공여체 분자가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체는 표적 RNA 분자 및 esnRNA 분자에 결합하여 트랜스-스플라이싱을 촉진한다. 다른 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 esnRNA 도메인을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 esnRNA 도메인을 포함하지 않는다. 예가 도 3a에 묘사되어 있다. 일 양태에서, esnRNA 분자 및 3개의 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 대체 도메인을 포함한다. 대체 도메인은 트랜스-스플라이싱 반응을 통해 표적 RNA 분자 안으로 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 표적 RNA에 상보적인 안티센스 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉진하는 인트론 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, esnRNA 분자는 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래되지만, RNA 공여체 분자에 상보적인 서열을 함유하도록 변경되었다. 이론에 얽매이지 않고, 트랜스-스플라이싱 RNA 공여체 분자와 RNA 공여체 분자와 접촉하는 esnRNA의 조합은 질환을 해결하기 위해 인간 세포에서의 질환-악기 RNA 서열을 대체하기에 충분히 효율적인 방식으로 표적 RNA 내에서 선택된 서열의 대체를 초래한다. 일부 실시형태에서, 개시내용은 질환-악기 RNA 분자를 서열-특이적 방식으로 표적화하고 이들 RNA 분자 내의 질환-악기 RNA 서열을 고효율로 대체하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자 및 esnRNA 구현은 질환-악기 서열의 대체 또는 조작된 서열의 표적 RNA 안으로의 삽입을 포함하는 다양한 맥락에서 유용성을 보여준다. 일부 실시형태에서, 조작된 서열은 표적 RNA의 번역 또는 안정성을 변경하여 단백질 생산 또는 표적 RNA 수준을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터, 조성물 및 세포, 그리고 트랜스-스플라이싱 RNA 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0017] 특정 양태에서, 인간 스플라이세오솜의 snRNA 유전자로부터 유래되거나 단리된 조작된 소형 핵 RNA("esnRNA") 분자 및 (a) 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 적어도 하나의 도메인("인트론 도메인"), (b) 인간 세포에 존재하는 pre-mRNA("표적 RNA")에 상보적인 서열을 함유하거나 이로 구성된 적어도 하나의 결합 도메인("안티센스 도메인"), 및 (c) 트랜스-스플라이싱을 통해 표적 RNA 안으로 삽입되는 코딩 도메인("대체 도메인")을 포함하는 RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물이 본 명세서에 기술된다. esnRNA 분자는 RNA 공여체 분자와 결합하고 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 스플라이세오솜 구성요소를 동원하여 RNA 공여체 분자 서열을 표적 RNA 안으로 삽입한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 각각 RNA 공여체 분자 및 esnRNA를 인코딩하는 2개의 핵산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0018] 특정 양태에서, 2개의 도메인(RNA 공여체 도메인 및 esnRNA 도메인)을 함유하는 단일 RNA 분자가 본 명세서에 기술되며, 여기서 단일 RNA 분자는 표적 RNA 분자에 선택적으로 결합하고 표적 RNA 분자와의 트랜스-스플라이싱 반응을 고효율로 촉진한다. 특정 양태에서, 개시내용은 단일 RNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터, 조성물 및 세포를 제공한다. 특정 양태에서, 개시내용은 질환 또는 장애를 치료하기 위해 개시내용의 단일 RNA 분자, 벡터, 조성물 및 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

[0019] 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 esnRNA 도메인을 포함한다. 예가 도 3b에 묘사되어 있다. 일 양태에서, 적어도 4개의 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자가 본 명세서에 개시된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 대체 도메인을 포함한다. 대체 도메인은 트랜스-스플라이싱 반응을 통해 표적 RNA 분자 안으로 삽입될 수

있다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 표적 RNA에 상보적인 안티센스 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉진하는 인트론 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래된 esnRNA 도메인을 포함한다.

[0020] 본 개시내용은, 일부 실시형태에서, (a) 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 적어도 하나의 도메인("인트론 도메인"), (b) 인간 세포에 존재하는 pre-mRNA("표적 RNA")에 상보적인 서열을 함유하거나 이로 구성된 적어도 하나의 결합 도메인("안티센스 도메인"), (c) 트랜스-스플라이싱을 통해 표적 RNA 안으로 삽입되는 코딩 도메인("대체 도메인"), 및 (d) esnRNA 서열을 포함하는 조작된 소형 핵 RNA("esnRNA") 도메인을 포함하는 조성물을 제공한다. esnRNA 도메인은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 스플라이세오솜 구성요소를 동원하여 RNA 공여체 분자 서열을 표적 RNA 안으로 삽입한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 RNA 공여체 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0021] **esnRNA 분자 및 도메인**

[0022] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물은 esrRNA 도메인을 포함하는 esnRNA 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물은 esRNA 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, esnRNA 도메인은 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택되는 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된다.

[0023] 본 명세서에 개시된 esnRNA 분자 및 esnRNA 도메인을 포함하는 조성물은 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된 임의의 서열을 포함한다. 소형 핵 RNA 유전자는 제한 없이 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12를 포함한다. esnRNA 분자는 RNA 공여체 분자에 상보적인 서열을 함유할 수 있다. 이 상보적 서열은 esnRNA 분자의 5' 말단 또는 그 근처에 위치될 수 있다. 상보적 서열은 제한 없이 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 상보적 서열에서, 티미딘 염기 중 어느 것도, 일부 또는 전부가 우라실로 대체될 수 있어 트랜스-스플라이싱 인핸서 서열은 제한 없이 5'-CGAGCUCUCU-3', 5'-AACGAGCUCU-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-UAUCGCAACG-3', 5'-AAUAAUACG-3', 5'-UAAGAGAGCU-3', 5'-AAGAGAGCUC-3', 5'-AGAGAGCUCGUUGC-3', 5'-GAGAGCUCGU-3', 5'-AGAGCUCGUUGC-3' 및 5'-GAGCUCGUUG-3'을 포함할 수 있다.

[0024] 일부 실시형태에서, esnRNA 도메인은 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 유래되거나 단리된 하나 이상의 줄기-루프형 RNA 서열을 함유한다. 일 실시형태에서, 이러한 esnRNA 도메인은 상응하는 야생형 또는 유래 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 일 실시형태에서, 이러한 esnRNA 도메인은 상응하는 야생형 또는 유래 서열과 최대 약 80%, 최대 약 85%, 최대 약 90%, 최대 약 91%, 최대 약 92%, 최대 약 93%, 최대 약 94%, 최대 약 95%, 최대 약 96%, 최대 약 97%, 최대 약 98%, 최대 약 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다.

[0025] 일부 실시형태에서, esnRNA 분자 또는 esnRNA 도메인은 임의의 살아있는 유기체로부터 유래되지 않고 스플라이세오솜 단백질에 결합하는 합성 서열로 구성된다.

[0026] 일부 실시형태에서, esnRNA 도메인은 대체 도메인으로부터 적어도 약 1개 뉴클레오타이드로 떨어져 위치된다. 일부 실시형태에서, esnRNA 도메인은 5' 방향에서 RNA 공여체 분자 내 대체 서열의 첫 번째 또는 마지막 뉴클레오타이드로부터 적어도 약 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 3개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 6개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 7개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 8개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 11개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 12개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 13개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 14개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 16개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 17개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 18개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 19개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 21개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 22개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 23개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 25개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 26개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 27개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 29개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 31개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 33개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 34개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 35개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개의 뉴클레오타이드, 적어도

약 37개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 38개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 39개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 41개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 42개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 43개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 44개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 45개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 46개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 47개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 48개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 49개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 55개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 65개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 75개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 85개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 95개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 110개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 120개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 130개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 140개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 150개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 160개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 170개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 180개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 190개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 200개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 250개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 300개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 400개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개의 뉴클레오타이드, 또는 500개 초과 뉴클레오타이드로 떨어져 위치된다. 일부 실시 형태에서, esnRNA 도메인은 5' 방향에서 RNA 공여체 분자 내 대체 서열의 첫 번째 또는 마지막 뉴클레오타이드로부터 최대 약 2개의 뉴클레오타이드, 최대 약 3개의 뉴클레오타이드, 최대 약 4개의 뉴클레오타이드, 최대 약 5개의 뉴클레오타이드, 최대 약 6개의 뉴클레오타이드, 최대 약 7개의 뉴클레오타이드, 최대 약 8개의 뉴클레오타이드, 최대 약 9개의 뉴클레오타이드, 최대 약 10개의 뉴클레오타이드, 최대 약 11개의 뉴클레오타이드, 최대 약 12개의 뉴클레오타이드, 최대 약 13개의 뉴클레오타이드, 최대 약 14개의 뉴클레오타이드, 최대 약 15개의 뉴클레오타이드, 최대 약 16개의 뉴클레오타이드, 최대 약 17개의 뉴클레오타이드, 최대 약 18개의 뉴클레오타이드, 최대 약 19개의 뉴클레오타이드, 최대 약 20개의 뉴클레오타이드, 최대 약 21개의 뉴클레오타이드, 최대 약 22개의 뉴클레오타이드, 최대 약 23개의 뉴클레오타이드, 최대 약 24개의 뉴클레오타이드, 최대 약 25개의 뉴클레오타이드, 최대 약 26개의 뉴클레오타이드, 최대 약 27개의 뉴클레오타이드, 최대 약 28개의 뉴클레오타이드, 최대 약 29개의 뉴클레오타이드, 최대 약 30개의 뉴클레오타이드, 최대 약 31개의 뉴클레오타이드, 최대 약 31개의 뉴클레오타이드, 최대 약 32개의 뉴클레오타이드, 최대 약 33개의 뉴클레오타이드, 최대 약 34개의 뉴클레오타이드, 최대 약 35개의 뉴클레오타이드, 최대 약 36개의 뉴클레오타이드, 최대 약 37개의 뉴클레오타이드, 최대 약 38개의 뉴클레오타이드, 최대 약 39개의 뉴클레오타이드, 최대 약 40개의 뉴클레오타이드, 최대 약 41개의 뉴클레오타이드, 최대 약 42개의 뉴클레오타이드, 최대 약 43개의 뉴클레오타이드, 최대 약 44개의 뉴클레오타이드, 최대 약 45개의 뉴클레오타이드, 최대 약 46개의 뉴클레오타이드, 최대 약 47개의 뉴클레오타이드, 최대 약 48개의 뉴클레오타이드, 최대 약 49개의 뉴클레오타이드, 최대 약 50개의 뉴클레오타이드, 최대 약 55개의 뉴클레오타이드, 최대 약 60개의 뉴클레오타이드, 최대 약 65개의 뉴클레오타이드, 최대 약 70개의 뉴클레오타이드, 최대 약 75개의 뉴클레오타이드, 최대 약 80개의 뉴클레오타이드, 최대 약 85개의 뉴클레오타이드, 최대 약 90개의 뉴클레오타이드, 최대 약 95개의 뉴클레오타이드, 최대 약 100개의 뉴클레오타이드, 최대 약 110개의 뉴클레오타이드, 최대 약 120개의 뉴클레오타이드, 최대 약 130개의 뉴클레오타이드, 최대 약 140개의 뉴클레오타이드, 최대 약 150개의 뉴클레오타이드, 최대 약 160개의 뉴클레오타이드, 최대 약 170개의 뉴클레오타이드, 최대 약 180개의 뉴클레오타이드, 최대 약 190개의 뉴클레오타이드, 최대 약 200개의 뉴클레오타이드, 최대 약 250개의 뉴클레오타이드, 최대 약 300개의 뉴클레오타이드, 최대 약 400개의 뉴클레오타이드, 최대 약 500개의 뉴클레오타이드, 또는 최대 약 500개의 뉴클레오타이드로 떨어져 위치된다.

[0027] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 esnRNA 서열이 있을 수 있다. 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA는 인간 U1 snRNA 유전자로부터 유래되거나 단리된다. 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 서열 esnRNA는 U1 snRNA 변이체로부터 유래되거나 단리된다. 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, U1 snRNA 변이체는 다음으로 이루어진 목록으로부터 선택된다(UCSC 인간 게놈 어셈블리 2006에 따른 명칭 뒤에 각괄호 안의 게놈 위치): tU1.1 [chr1:16713367-16712967], tU1.2 [chr1:16866030-16865630], vU1.1 [chr1:142438700-142438300], vU1.2 [chr1:142464813-142464413], vU1.4 [chr1:143022739-143022339], vU1.5 [chr1:143202968-143202568], vU1.7 [chr1:144680790-144680390], vU1.8 [chr1:145022927-145022527], vU1.9 [chr1:145977791-145977391], vU1.10 [chr1:146301289-146300889], vU1.11 [chr1:146327427-146327027], vU1.15 [chr1:146871696-146871296], vU1.16 [chr1:147033726-147033326], vU1.17 [chr1:147460893-147460493], vU1.18 [chr1:147490845-147490445], vU1.19 [chr1:147780880-147780480], tU1.3 [chr1:16939762-16940162], tU1.4 [chr1:17095226-17095626], vU1.3 [chr1:142478876-142479276], vU1.6 [chr1:144094114-144094514], vU1.12 [chr1:146341486-146341886], vU1.13 [chr1:146460770-146461170], vU1.14 [chr1:146608089-146608489], vU1.20 [chr1:147872535-147872935].

[0028] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 1):

[0029] CGAGCTCTCTgCAGGGGAAAGCGCGAACGCAGTACCACTACCACAAATTATGCAATCGAGTTTCCACATTTGGGGAAATCGCAGGGGTCAACACATCTGGA

GTGCAATGGATAAGCCTCGCCCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATGTTATCTCCCTG

- [0030] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 2):
- [0031] CGAGCTCTCTgTCCAGGGGAAAGCACAAACAGTTCCCCACTGCCACAAATTATGTAGTCGAGATTCCCTCATTTGGGGAAATCACAGGGGTCAGCACATCCA
GAGTAAATTTGCTAAGCCTTGCCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATAACATTTCTTCTG
- [0032] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 3):
- [0033] CGAGCTCTCTgCAGGGAAAAACAGACACAGTTCCCCACTGCCACAAATTATGTAATCAAGATTCCACATTCGGGGAAATCACAGGGGTCAGCACATCCA
CAGTAAACTGCTAAGCCTTGTCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATAACATTTCTTCTG
- [0034] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 4):
- [0035] CGAGCTCTCTgCAGGGGAAAGCGCGACGCAGTCCCCACTACCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCACATTTGGGGAAATCGCAGGGGTCAGCACATCCG
GAGTGCAATGGATAAGCCTCGCCCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATGGTATCTCCCTG
- [0036] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 5):
- [0037] CGAGCTCTCTgGGGGGAAAAGAGCGAACGCAGTCTCCCACTACCACAAATTATGCAGTCGAGTTCCACATTTGGGGAAAGTGCACGAATTAGCTTCGCC
TGCGAAAACACCTTCGTAACACGATTTTCTTCTGCTAGGTAATGTGAGTCTGCACGC
- [0038] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 6):
- [0039] CGAGCTCTCTgCAGAGGACAGCGAACGCAGTCCCCACTACCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCACATTTGGGGAAACGGCAGGGGTCAGCACATCCG
GAGTGCAATGGATAAGCCTCTCCCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATCGTATCTCCCTG
- [0040] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 7):
- [0041] CGAGCTCTCTgTCCAGGGGAAAGCACAAACAGTTCCCCACTGCCACAAATTATGTAGTCGAGATTCCCTCATTTGGGGAAATCACAGGGGTCAGCACATCCA
GAGTAAATTTGCTAAGCCTTGCCTGGGAAAACACCTTCGTGATCATAACATTTCTTCTG
- [0042] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 8):
- [0043] CGAGCTCTCTgCAGAGGAAAGCGCGAACGCAGTCCCCACTACCACAAATTATGCAATCGAGTTTCCACGTTTGGGGAAATCGCAGAGGTCAGCACATCCG
GAACACAATGGATAACCTTCGCCCTGAGAAAACACCTTCGTTTAGATAATAGTATCTCCCTG
- [0044] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 9):
- [0045] CGAGCTCTCTgCAAGAGAAAGCGCGAACGTAGTTCCCTACTATCACAATTATGCACTCGAGTTTCCCACTTGGGGAAATCGCAGGGGTCAGCACATCCG
GAACGCAATGGATAAGCTTCGCCCTGAGAAAACACCTTCGTGATCATGGTATCTCCCTT
- [0046] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 10):
- [0047] CGAGCTCTCTgCAGGGGAAAGCGCGAACGCAGTCCCTACTATCACAAGTTATGCAGTCGAGTTCTCACATTTGGGGGAAATGGCAGGGGTCAGTACACCC
GGAACATAACGGATAAGCCTCGCCCTGAGAAAACACCTTCGTGATCATGGTATCTCCCTG
- [0048] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 11):
- [0049] CGAGCTCTCTgCAGGGGAAAGCGCGAACAGTCCCTACTATCACAAGTTATGCAGTCGAGTTCTCACATTTGGGGGAAATGGCAGGGGTCAGTACACCC
GGAACATAACGGATAAGCCTCGCCCTGAGAAAACACCTTCGTGATCATGGTATCTCCCTG
- [0050] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 12):
- [0051] CGAGCTCTCTgCAGGGGAGATAGTATGATCATGAAAGTGGTTTTTCCAGAGCGAGGCTTATCCATTGCACTCCGGATGTGTTGACCTCTGCGATTTCCCAA
CTGTGGGAACTCGACTGCGTAATTTGTGGTAGTGGGGACTGCGTTTCGCGCTTCCCTG
- [0052] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 13):
- [0053] CGAGCTCTCTgCAGGGGAGATACTATTATCAAACGAAGGTGGTTTTTCTCAGGGCGAGGCTTATCCATTGTGTTCCGGATGTGCTGACCTCTGCGATTTCCC
CAAACGTGGGAACTCGACTGCATAATTTGTGGTAGTGGGGACTGCGTTTCGCGCTTCTCTG
- [0054] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 14):
- [0055] CGAGCTCTCTgCAGAAGAAATGTTATGATCACGAAGGTGGTTTTTCCAGAGCAAGGCTTAGCAGTTTACTGTGGATGTGCTGACCCCTGTGATTTCCCGA
ATGTGGGAATCTTGATTACATAATTTGTGGCAGTGGGAACTGTGTCTGTGTTTTCCCTG

- [0056] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 15):
- [0057] CGAGCTCTCTgcagggGAAAGCGGAACGCAGTACCACTACCAACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0058] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 16):
- [0059] CGAGCTCTCTgcagggGGGAAAGCACAAACAGTTCCCCACTGCCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0060] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 17):
- [0061] CGAGCTCTCTgcagggAAAAACAGACACAGTTCCCCACTGCCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0062] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 18):
- [0063] CGAGCTCTCTgcagggGAAAGCGGACGCAGTCCCCACTACCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0064] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 19):
- [0065] CGAGCTCTCTgcagggAAAAGAGCGAACGCAGTCTCCCACTACCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0066] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 20):
- [0067] CGAGCTCTCTgcagggGACAGCGGAACGCAGTCCCCACTACCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0068] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 21):
- [0069] CGAGCTCTCTgcagggGGGAAAGCACAAACAGTTCCCCACTGCCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0070] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 22):
- [0071] CGAGCTCTCTgcagggGAAAGCGGAACGCAGTCCCCACTACCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0072] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 23):
- [0073] CGAGCTCTCTgcagggGAAAGCGGAACGTAGTTCCCTACTATCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0074] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 24):
- [0075] CGAGCTCTCTgcagggGAAAGCGGAACGCAGTCCCTACTATCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0076] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 25):
- [0077] CGAGCTCTCTgcagggGAAACGGAACACAGTCCCTACTATCACagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0078] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 26):
- [0079] CGAGCTCTCTgcagggGAGATAGTATGATCATGAAAGTGGTTTTTCagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0080] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 27):
- [0081] CGAGCTCTCTgcagggGAGATACTATTATCAACGAAGGTGGTTTTcagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg

- [0082] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 28):
- [0083] CGAGCTCTCTgcagggGAAATGTTATGATCACGAAGGTGGTTTTTCcagggcgaggcttatccattgcactccggaatgtgctgaccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0084] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 29):
- [0085] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccATTATGCAATCGAGTTTCCACATTTGGGGAAATCGCAGGGTCcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0086] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 30):
- [0087] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGTAGTCGAGATTCCTCATTTGGGGAAATCACAGGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0088] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 31):
- [0089] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGTAATCAAGATTCACATTCGGGGAAATCACAGGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0090] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 32):
- [0091] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGCAGTCGAGTTTCCACATTTGGGGAAATCGCAGGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0092] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 33):
- [0093] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGCAGTCGAGCTTCCACATTTGGGGAAGTGCACGAACgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0094] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 34):
- [0095] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGTAGTCGAGATTCCTCATTTGGGGAAATCACAGGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0096] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 35):
- [0097] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGCAATCGAGTTTCCACGTTTGGGGAAATCGCAGAGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0098] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 36):
- [0099] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAATTATGCACTCGAGTTTCCACACTTGGGGAAATCGCAGGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0100] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 37):
- [0101] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAGTTATGCAGTCGAGTTCCTCACATTTGGGGAAAATGGCAGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0102] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 38):
- [0103] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccAAGTTATGCAGTCGAGTTCCTCACATTTGGGGAAAATGGCAGGGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0104] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 39):
- [0105] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccCAGAGCGAGGCTTATCCATTGCACTCCGGATGTGTTGACCTCTGcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0106] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 41):
- [0107] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccTCTCAGGGCGAGGCTTATCCATTGTGTTCCGGATGTGCTGACCTcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg

- [0108] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 42):
- [0109] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccCAGAGCAAGGCTTAGCAGTTTACTGTGGATGTGCTGACCCCTGcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0110] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 44):
- [0111] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgAACACATCTGGA
GTGCAATGGATAAGactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0112] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 46):
- [0113] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCA
GAGTAAATTGCTAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0114] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 47):
- [0115] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCG
GAGTGCAATGGATAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0116] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 48):
- [0117] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTTAGCTTCGCC
TGCGAAAACCACTactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0118] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 49):
- [0119] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCG
GAGTGCAATGGATAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0120] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 51):
- [0121] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCA
GAGTAAATTGCTAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0122] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 52):
- [0123] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCG
GAACACAATGGATAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0124] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 53):
- [0125] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgTCAGCACATCCG
GAACGAATGGATAactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0126] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 54):
- [0127] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgGTCAGTACACCC
GGAACATAACGGATactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0128] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 55):
- [0129] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgGTCAGTACACCC
GGAACATAACGGATactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0130] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 56):
- [0131] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgCGATTTCCTCCAA
CTGTGGGAAACTCGactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg
- [0132] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 57):
- [0133] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgCTGCGATTTCCTCC
CAAACGTGGGAAACactgcataatttgtggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctg

- [0134] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 58):
- [0135] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtgggtttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtCTTCGTGATCATGTTATCTCCCTG
- [0136] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 59):
- [0137] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtgggtttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtACCTTCGTGATCATAACATTCTTCTG
- [0138] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 60):
- [0139] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtgggtttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtACCTTCGTGATCATAACATTCTTCTG
- [0140] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, esnRNA의 서열은 다음을 포함하거나 이로 구성된다: (esnRNA 61):
- [0141] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtgggtttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgaccctgcgatttcccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttgtggtagtACCTTCGTGATCATGGTATCTCCCTG
- [0142] **안티센스 도메인**
- [0143] 개시내용의 일부 실시형태에서, 개시내용의 안티센스 도메인은 표적 서열에 결합한다. 개시내용의 일부 실시형태에서, 개시내용의 안티센스 도메인은 표적 RNA에 결합한다.
- [0144] 개시내용의 일부 실시형태에서, 안티센스 도메인은 성공적인 트랜스-스플라이싱이 표적 RNA에서 마이크로 오픈 리딩 프레임의 제거를 야기하도록 선택된다. 이 방식에서 트랜스-스플라이싱 시스템은 마이크로 오픈 리딩 프레임을 제거하고 표적 RNA로부터 단백질의 생산을 증가시킨다.
- [0145] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 안티센스 도메인을 포함하는 서열은 표적 RNA 서열에 대해 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 87%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 사이의 임의의 백분율의 상보성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 안티센스 도메인을 포함하는 서열은 표적 RNA 서열에 대해 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 80%, 최대 약 87%, 최대 약 90%, 최대 약 91%, 최대 약 92%, 최대 약 93%, 최대 약 94%, 최대 약 95%, 최대 약 96%, 최대 약 97%, 최대 약 98%, 최대 약 99% 또는 그 사이의 임의의 백분율의 상보성을 갖는다. 일부 실시형태에서 안티센스 도메인은 표적 RNA 서열에 상보적인 서열 사이에 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 110개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 120개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 130개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 140개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 150개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 160개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 170개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 180개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 190개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 200개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 210개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 220개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 230개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 240개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 250개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 260개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 270개의 뉴클레오타이드, 또는 적어도 약 270개 초과 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서 안티센스 도메인은 표적 RNA 서열에 상보적인 서열 사이에 최대 약 20개의 뉴클레오타이드, 최대 약 30개의 뉴클레오타이드, 최대 약 40개의 뉴클레오타이드, 최대 약 50개의 뉴클레오타이드, 최대 약 60개의 뉴클레오타이드, 최대 약 70개의 뉴클레오타이드, 최대 약 80개의 뉴클레오타이드, 최대 약 90개의 뉴클레오타이드, 최대 약 100개의 뉴클레오타이드, 최대 약 110개의 뉴클레오타이드, 최대 약 120개의 뉴클레오타이드, 최대 약 130개의 뉴클레오타이드, 최대 약 140개의 뉴클레오타이드, 최대 약 150개의 뉴클레오타이드, 최대 약 160개의 뉴클레오타이드, 최대 약 170개의 뉴클레오타이드, 최대 약 180개의 뉴클레오타이드, 최대 약 190개의 뉴클레오타이드, 최대 약 200개의 뉴클레오타이드, 최대 약 210개의 뉴클레오타이드, 최대 약 220개의 뉴클레오타이드, 최대 약 230개의 뉴클레오타이드, 최대 약 240개의 뉴클레오타이드, 최대 약 250개의 뉴클레오타이드, 최대 약 260개의 뉴클레오타이드, 최대 약 270개의 뉴클레오타이드, 또는 최대 약 270개 초과 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다.
- [0146] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 표적 서열은 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 10개

의 뉴클레오타이드, 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 25개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 35개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 45개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 55개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 65개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 75개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 85개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 95개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 125개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 150개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 175개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 200개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 225개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 250개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 275개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 300개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 325개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 350개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 375개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 400개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 425개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 450개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 475개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개의 뉴클레오타이드, 또는 500개 초과 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 최대 약 5개의 뉴클레오타이드, 최대 약 10개의 뉴클레오타이드, 최대 약 15개의 뉴클레오타이드, 최대 약 20개의 뉴클레오타이드, 최대 약 25개의 뉴클레오타이드, 최대 약 30개의 뉴클레오타이드, 최대 약 35개의 뉴클레오타이드, 최대 약 40개의 뉴클레오타이드, 최대 약 45개의 뉴클레오타이드, 최대 약 50개의 뉴클레오타이드, 최대 약 55개의 뉴클레오타이드, 최대 약 60개의 뉴클레오타이드, 최대 약 65개의 뉴클레오타이드, 최대 약 70개의 뉴클레오타이드, 최대 약 75개의 뉴클레오타이드, 최대 약 80개의 뉴클레오타이드, 최대 약 85개의 뉴클레오타이드, 최대 약 90개의 뉴클레오타이드, 최대 약 95개의 뉴클레오타이드, 최대 약 100개의 뉴클레오타이드, 최대 약 125개의 뉴클레오타이드, 최대 약 150개의 뉴클레오타이드, 최대 약 175개의 뉴클레오타이드, 최대 약 200개의 뉴클레오타이드, 최대 약 225개의 뉴클레오타이드, 최대 약 250개의 뉴클레오타이드, 최대 약 275개의 뉴클레오타이드, 최대 약 300개의 뉴클레오타이드, 최대 약 325개의 뉴클레오타이드, 최대 약 350개의 뉴클레오타이드, 최대 약 375개의 뉴클레오타이드, 최대 약 400개의 뉴클레오타이드, 최대 약 425개의 뉴클레오타이드, 최대 약 450개의 뉴클레오타이드, 최대 약 475개의 뉴클레오타이드, 또는 최대 약 500의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 약 5개 내지 약 500개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 약 50개 내지 약 250개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 약 5개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0147] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 병원성 RNA 분자는 표적 RNA이다. 일부 실시형태에서, 표적 RNA는 개시내용의 트랜스-스플라이싱 RNA의 안티센스 도메인에 상보적인 표적 서열을 포함한다.

[0148] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 표적 서열은 표적 RNA의 단일 연속 신장 내에 함유된다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 표적 RNA의 단일 연속 신장 사이에 분산되지 않은 하나 이상의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

[0149] 일부 실시형태에서, 안티센스 도메인은 때때로 질환-야기 돌연변이를 담지하는 표적 RNA를 인코딩하는 유전자(각괄호 안의 상응하는 수탁 번호, 괄호 안의 상응하는 질환)에 상보적이고 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다: TNFRSF13B [ENSG00000240505] (공통 가변성 면역 결핍증); ADA, CECR1 [ENSG00000196839, ENSG00000093072] (아데노신 데아미나제 결핍증); IL2RG [ENSG00000147168] (X-연관 중증 복합 면역결핍증); HBB [ENSG00000244734] (베타-지중해혈증); HBA1, HBA2 [ENSG00000206172, ENSG00000188536] (알파-지중해혈증); U2AF1 [ENSG00000160201] (골수이형성증후군); SOD1, TARDBP, FUS, MATR3, SOD1, C9ORF72 [ENSG00000142168, ENSG00000120948, ENSG00000089280, ENSG0000015479, ENSG00000142168, ENSG00000147894] (근위축성 측삭 경화증); MAPT, PGRN [ENSG00000186868, ENSG00000030582] (파킨슨증을 동반한 전두측두엽 치매); CDH23, MYO7A, USH2A [ENSG00000107736, ENSG00000137474, ENSG00000042781] (어서 증후군); GALC [ENSG00000054983] (크라베병); SMPD1, NPC1, NPC2 [ENSG00000166311, ENSG00000141458, ENSG00000119655] (니만픽병); PRNP [ENSG00000171867] (프리온 질환); SCN1A [ENSG00000144285] (드라베 증후군); PINK1, ATPGAP2 [ENSG00000158828] (조기 발병 파킨슨병); ATXN1, ATXN2, ATXN3, PLEKHG4, SPTBN2, CACNA1A, ATXN7, TTBK2, PPP2R2B, KCNC3, PRKCG, ITPR1, TBP, KCND1, FGF14 [ENSG00000124788, ENSG00000204842, ENSG00000066427, ENSG00000196155, ENSG00000173898, ENSG00000141837, ENSG00000163635, ENSG00000128881, ENSG00000156475, ENSG00000131398, ENSG00000126583, ENSG00000150995, ENSG00000112592, ENSG00000102057, ENSG00000102466] (척수소뇌실조증); SCN1A, SCN2A, CACNA1A, GRIN2B, GRIN2A, MECP2, FOXG1, SLC6A1, PRRT2, PTEN, KCNQ2, KCNQ3, STARD7, CLRN1 [ENSG00000144285, ENSG00000136531, ENSG00000141837, ENSG00000273079, ENSG00000183454, ENSG00000169057, ENSG00000176165, ENSG00000157103, ENSG00000167371, ENSG00000171862, ENSG00000075043, ENSG00000184156, ENSG00000084090, ENSG00000163646] (유전성 간질 장애); ATM [ENSG00000149311] (운동실조증-모세혈관확장증); GLB1 [ENSG00000170266] (GM1 신경절증); GBA

[ENSG00000177628] (고세병); GM2A [ENSG00000196743] (GM2 신경절증); UBE3A [ENSG00000114062] (엔젤만 증후군); SLC2A1 [ENSG00000117394] (글루코스 수송체 결핍 1형); LAMP2 [ENSG00000005893] (다논병); GLA [ENSG00000102393] (파브리병); PKD1, PKD2 [ENSG000000008710, ENSG00000118762] (상염색체 우성 다낭성 신장 질환); GAA [ENSG00000171298] (폼페병); PCSK9, LDLR, APOB, APOE [ENSG00000169174, ENSG00000130164, ENSG00000084674, ENSG00000130203] (가족성 고콜레스테롤혈증); MYOC, OPTN, TBK1, WDR36, CYPIB1 [ENSG00000034971, ENSG00000123240, ENSG00000183735, ENSG00000134987, ENSG00000138061] (개방각 녹내장); IDUA [ENSG00000127415] (헨리 증후군 또는 뮤코다당증 1); IDS [ENSG0000010404] (헨리 증후군 또는 뮤코다당증 2); CLN3 [ENSG00000188603] (바텐병); DMD [ENSG00000198947] (뒤시엔 근이영양증); LMNA [ENSG00000160789] (사지근이영양증 유형 1B); DYSF [ENSG00000135636] (사지근이영양증 유형 2B); SGCA [ENSG00000108823] (사지근이영양증 유형 2D); SGCB [ENSG00000163069] (사지근이영양증 유형 2E); SGCG [ENSG00000102683] (사지근이영양증 유형 2C); SGCD [ENSG00000170624] (사지근이영양증 유형 2F); DUX4 [ENSG00000260596] (안면견갑상완 근이영양증); F9 [ENSG00000101981] (혈우병 B); F8 [ENSG00000185010] (혈우병 A); USHA2A, RPGR, RP2, RHO, PRPF31, USH1F, PRPF3, PRPF6 [ENSG00000156313, ENSG00000102218, ENSG00000163914, ENSG00000105618, ENSG00000150275, ENSG00000117360, ENSG00000101161] (색소성 망막염); CFTR [ENSG00000001626] (낭포성 섬유증); GJB2, GJB6, STRC, DFNA1, WFS1 [ENSG00000165474, ENSG00000121742, ENSG00000242866, ENSG00000131504, ENSG00000109501] (상염색체 우성 청각 장애); POU3F3 [ENSG00000198914] (비증후군성 청력 상실).

[0150] 대체 도메인

[0151] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 대체 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 표적 RNA로부터 유래되거나 단리된다.

[0152] 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 인간 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열로 구성된다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인을 포함하는 서열은 인간 유전자와 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 87%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99% 또는 그 사이의 임의의 백분율의 동일성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인을 포함하는 서열은 인간 유전자와 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 80%, 최대 약 87%, 최대 약 90%, 최대 약 95%, 최대 약 97%, 최대 약 99% 또는 그 사이의 임의의 백분율의 동일성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 인간 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열과 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 적어도 약 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 110개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 120개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 130개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 140개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 150개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 160개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 170개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 180개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 190개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 200개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 210개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 220개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 230개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 240개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 250개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 260개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 270개의 뉴클레오타이드, 270개 초과 뉴클레오타이드, 또는 그 사이의 임의의 수의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 최대 약 2개의 뉴클레오타이드, 최대 약 5개의 뉴클레오타이드, 최대 약 10개의 뉴클레오타이드, 최대 약 20개의 뉴클레오타이드, 최대 약 30개의 뉴클레오타이드, 최대 약 40개의 뉴클레오타이드, 최대 약 50개의 뉴클레오타이드, 최대 약 60개의 뉴클레오타이드, 최대 약 70개의 뉴클레오타이드, 최대 약 80개의 뉴클레오타이드, 최대 약 90개의 뉴클레오타이드, 최대 약 100개의 뉴클레오타이드, 최대 약 110개의 뉴클레오타이드, 최대 약 120개의 뉴클레오타이드, 최대 약 130개의 뉴클레오타이드, 최대 약 140개의 뉴클레오타이드, 최대 약 150개의 뉴클레오타이드, 최대 약 160개의 뉴클레오타이드, 최대 약 170개의 뉴클레오타이드, 최대 약 180개의 뉴클레오타이드, 최대 약 190개의 뉴클레오타이드, 최대 약 200개의 뉴클레오타이드, 최대 약 210개의 뉴클레오타이드, 최대 약 220개의 뉴클레오타이드, 최대 약 230개의 뉴클레오타이드, 최대 약 240개의 뉴클레오타이드, 최대 약 250개의 뉴클레오타이드, 최대 약 260개의 뉴클레오타이드, 최대 약 270개의 뉴클레오타이드, 또는 그 사이의 임의의 수의 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성된다.

[0153] 본 명세서에 개시된 대체 도메인을 포함하는 조성물은 RNA 서열의 대체 또는 삽입이 효과적인 방법이 될 수 있는 임의의 전략을 포함한다. 대체 도메인의 예는 제한 없이 다음 유전자(각괄호 안에 유전자 수탁 ID와 괄호 안

에 연관된 질환을 가짐) 예컨대 TNFRSF13B [ENSG00000240505] (공통 가변성 면역 결핍증); ADA, CECR1 [ENSG00000196839, ENSG00000093072] (아데노신 데아미나제 결핍증); IL2RG [ENSG00000147168] (X-연관 중증 복합 면역결핍증); HBB [ENSG00000244734] (베타-지중해혈증); HBA1, HBA2 [ENSG00000206172, ENSG00000188536] (알파-지중해혈증); U2AF1 [ENSG00000160201] (골수이형성증후군); SOD1, TARDBP, FUS, MATR3, SOD1, C9ORF72 [ENSG00000142168, ENSG00000120948, ENSG00000089280, ENSG00000015479, ENSG00000142168, ENSG00000147894] (근위축성 측삭 경화증); MAPT, PGRN [ENSG00000186868, ENSG00000030582] (파킨슨증을 동반한 전두측두엽 치매); CDH23, MYO7A, USH2A [ENSG00000107736, ENSG00000137474, ENSG00000042781] (어서 증후군); GALT [ENSG00000054983] (크라베병); SMPD1, NPC1, NPC2 [ENSG00000166311, ENSG00000141458, ENSG00000119655] (니만픽병); PRNP [ENSG00000171867] (프리온 질환); SCN1A [ENSG00000144285] (드라베 증후군); PINK1, ATPGAP2 [ENSG00000158828] (조기 발병 파킨슨병); ATXN1, ATXN2, ATXN3, PLEKHG4, SPTBN2, CACNA1A, ATXN7, TTBK2, PPP2R2B, KCNC3, PRKCG, ITPR1, TBP, KCND1, FGF14 [ENSG00000124788, ENSG00000204842, ENSG00000066427, ENSG00000196155, ENSG00000173898, ENSG00000141837, ENSG00000163635, ENSG00000128881, ENSG00000156475, ENSG00000131398, ENSG00000126583, ENSG00000150995, ENSG00000112592, ENSG00000102057, ENSG00000102466] (척수소뇌실조증); SCN1A, SCN2A, CACNA1A, GRIN2B, GRIN2A, MECP2, FOXG1, SLC6A1, PRRT2, PTEN, KCNQ2, KCNQ3, STARD7, CLRN1 [ENSG00000144285, ENSG00000136531, ENSG00000141837, ENSG00000273079, ENSG00000183454, ENSG00000169057, ENSG00000176165, ENSG00000157103, ENSG00000167371, ENSG00000171862, ENSG00000075043, ENSG00000184156, ENSG00000084090, ENSG00000163646] (유전성 간질 장애); ATM [ENSG00000149311] (운동실조증-모세혈관확장증); GLB1 [ENSG00000170266] (GM1 신경절증); GBA [ENSG00000177628] (고세병); GM2A [ENSG00000196743] (GM2 신경절증); UBE3A [ENSG00000114062] (엔젤만 증후군); SLC2A1 [ENSG00000117394] (글루코스 수송체 결핍 1형); LAMP2 [ENSG00000005893] (다논병); GLA [ENSG00000102393] (파브리병); PKD1, PKD2 [ENSG00000008710, ENSG00000118762] (상염색체 우성 다낭성 신장 질환); GAA [ENSG00000171298] (폼페병); PCSK9, LDLR, APOB, APOE [ENSG00000169174, ENSG00000130164, ENSG00000084674, ENSG00000130203] (가족성 고콜레스테롤혈증); MYOC, OPTN, TBK1, WDR36, CYPIB1 [ENSG00000034971, ENSG00000123240, ENSG00000183735, ENSG00000134987, ENSG00000138061] (개방각 녹내장); IDUA [ENSG00000127415] (혈리 증후군 또는 뮤코다당증 1); IDS [ENSG0000010404] (헌터 증후군 또는 뮤코다당증 2); CLN3 [ENSG00000188603] (바텐병); DMD [ENSG00000198947] (뒤시엔 근이영양증); LMNA [ENSG00000160789] (사지근이영양증 유형 1B); DYSF [ENSG00000135636] (사지근이영양증 유형 2B); SGCA [ENSG00000108823] (사지근이영양증 유형 2D); SGCB [ENSG00000163069] (사지근이영양증 유형 2E); SGCG [ENSG00000102683] (사지근이영양증 유형 2C); SGCD [ENSG00000170624] (사지근이영양증 유형 2F); DUX4 [ENSG00000260596] (안면견갑상완 근이영양증); F9 [ENSG00000101981] (혈우병 B); F8 [ENSG00000185010] (혈우병 A); USHA2A, RPGR, RP2, RHO, PRPF31, USH1F, PRPF3, PRPF6 [ENSG00000156313, ENSG00000102218, ENSG00000163914, ENSG00000105618, ENSG00000150275, ENSG00000117360, ENSG00000101161] (색소성 망막염); CFTR [ENSG00000001626] (낭포성 섬유증); GJB2, GJB6, STRC, DFNA1, WFS1 [ENSG00000165474, ENSG00000121742, ENSG00000242866, ENSG00000131504, ENSG00000109501] (상염색체 우성 청각 장애); POU3F3 [ENSG00000198914] (비증후군성 청력 상실)로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함한다.

[0154] 일부 실시형태에서, 대체 도메인은 코돈 최적화된다.

[0155] 인간 유전자로부터 유래된 서열에 더하여, 대체 도메인은 표적 RNA의 안정성, 번역, 처리 또는 국소화를 변경하기 위해 다른 유기체로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 비-인간 소스로부터 유래된 대체 도메인의 예는 제한 없이 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사-후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터의 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE), 및 CAGYCX(Y = U 또는 A; X = U, C 또는 A) 형태의 철 반응 요소로부터 유래되거나 단리된 것과 같은 단백질 생산을 증가시키는 서열을 포함한다.

[0156] **인트론 도메인**

[0157] 특정 양태에서, 본 명세서에 기술된 RNA 공여체 분자는 인트론 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인트론 도메인은 질환-야기 돌연변이를 갖는 RNA-결합 단백질에 의해 우선적으로-표적화되는 결합 부위를 담지한다. 일부 실시형태에서, 이들 돌연변이된 RNA-결합 단백질 및 인트론 도메인의 해리 상수는 비-돌연변이된 RNA-결합 단백질 및 인트론 도메인의 해리 상수보다 낮다.

[0158] **RNA 모티프**

[0159]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 esnRNA 분자는 RNA 공여체 분자에 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 esnRNA 분자의 5' 말단에서 시작된다. 일부 실시형태에서, esnRNA 분자에서 적어도 약 3개의 염기, 적어도 약 4개의 염기, 적어도 약 5개의 염기, 적어도 약 6개의 염기, 적어도 약 7개의 염기, 적어도 약 8개의 염기, 적어도 약 9개의 염기, 적어도 약 10개의 염기, 적어도 약 11개의 염기, 적어도 약 12개의 염기, 적어도 약 13개의 염기, 적어도 약 14개의 염기, 적어도 약 15개의 염기, 적어도 약 16개의 염기, 적어도 약 17개의 염기, 적어도 약 18개의 염기, 적어도 약 19개의 염기, 적어도 약 20개의 염기, 적어도 약 21개의 염기, 적어도 약 22개의 염기, 적어도 약 23개의 염기, 적어도 약 24개의 염기, 적어도 약 25개의 염기, 적어도 약 26개의 염기, 적어도 약 27개의 염기, 적어도 약 28개의 염기, 적어도 약 29개의 염기, 적어도 약 30개의 염기, 적어도 약 31개의 염기, 적어도 약 32개의 염기, 적어도 약 33개의 염기, 적어도 약 34개의 염기, 적어도 약 35개의 염기, 적어도 약 36개의 염기, 적어도 약 40개의 염기, 적어도 약 50개의 염기, 적어도 약 60개의 염기, 적어도 약 70개의 염기, 적어도 약 80개의 염기, 적어도 약 100개의 염기, 또는 그 초과가 RNA 공여체 분자에 상보적이다. 일부 실시형태에서, esnRNA 분자에서 최대 약 3개의 염기, 최대 약 4개의 염기, 최대 약 5개의 염기, 최대 약 6개의 염기, 최대 약 7개의 염기, 최대 약 8개의 염기, 최대 약 9개의 염기, 최대 약 10개의 염기, 최대 약 11개의 염기, 최대 약 12개의 염기, 최대 약 13개의 염기, 최대 약 14개의 염기, 최대 약 15개의 염기, 최대 약 16개의 염기, 최대 약 17개의 염기, 최대 약 18개의 염기, 최대 약 19개의 염기, 최대 약 20개의 염기, 최대 약 21개의 염기, 최대 약 22개의 염기, 최대 약 23개의 염기, 최대 약 24개의 염기, 최대 약 25개의 염기, 최대 약 26개의 염기, 최대 약 27개의 염기, 최대 약 28개의 염기, 최대 약 29개의 염기, 최대 약 30개의 염기, 최대 약 31개의 염기, 최대 약 32개의 염기, 최대 약 33개의 염기, 최대 약 34개의 염기, 최대 약 35개의 염기, 최대 약 36개의 염기, 최대 약 40개의 염기, 최대 약 50개의 염기, 최대 약 60개의 염기, 최대 약 70개의 염기, 최대 약 80개의 염기, 또는 최대 약 100개의 염기가 RNA 공여체 분자에 상보적이다.

[0160]

일부 실시형태에서, esnRNA 분자는 5' 방향에서 esnRNA 분자의 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 적어도 약 1개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 2개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 3개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 6개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 7개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 8개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 11개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 12개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 13개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 14개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 16개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 17개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 18개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 19개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 21개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 22개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 23개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 25개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 26개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 27개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 29개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 30개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 31개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 33개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 34개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 35개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 37개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 38개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 39개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 40개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 41개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 42개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 43개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 44개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 45개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 46개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 47개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 48개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 49개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 55개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 60개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 65개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 70개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 75개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 80개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 85개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 90개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 95개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 110개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 120개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 130개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 140개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 150개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 160개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 170개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 180개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 190개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 200개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 250개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 300개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 400개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개 초과 뉴클레오타이드, 또는 그 사이에 임의의 개수의 뉴클레오타이드로 떨어진 RNA 공여체 분자에 상보적인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5' 방향에서 esnRNA 분자의 첫 번째 뉴클레오타이드로부터 최대 약 1개의 뉴클레오타이드, 최대 약 2개의 뉴클레오타이드, 최대 약 3개의 뉴클레오타이드, 최대 약 4개의 뉴클레오타이드, 최대 약 5개의 뉴클레오타이드, 최대 약 6개의 뉴클레오타이드, 최대 약 7개의 뉴클레오타이드, 최대 약 8개의 뉴클레오타이드, 최대 약 9개의 뉴클레오타이드, 최대 약 10개의 뉴클레오타이드, 최대 약 11개의 뉴클레오타이드, 최대 약 12개의 뉴클레오타이드, 최대 약 13개의 뉴

클레오티드, 최대 약 14개의 뉴클레오티드, 최대 약 15개의 뉴클레오티드, 최대 약 16개의 뉴클레오티드, 최대 약 17개의 뉴클레오티드, 최대 약 18개의 뉴클레오티드, 최대 약 19개의 뉴클레오티드, 최대 약 20개의 뉴클레오티드, 최대 약 21개의 뉴클레오티드, 최대 약 22개의 뉴클레오티드, 최대 약 23개의 뉴클레오티드, 최대 약 24개의 뉴클레오티드, 최대 약 25개의 뉴클레오티드, 최대 약 26개의 뉴클레오티드, 최대 약 27개의 뉴클레오티드, 최대 약 28개의 뉴클레오티드, 최대 약 29개의 뉴클레오티드, 최대 약 30개의 뉴클레오티드, 최대 약 31개의 뉴클레오티드, 최대 약 32개의 뉴클레오티드, 최대 약 33개의 뉴클레오티드, 최대 약 34개의 뉴클레오티드, 최대 약 35개의 뉴클레오티드, 최대 약 36개의 뉴클레오티드, 최대 약 37개의 뉴클레오티드, 최대 약 38개의 뉴클레오티드, 최대 약 39개의 뉴클레오티드, 최대 약 40개의 뉴클레오티드, 최대 약 41개의 뉴클레오티드, 최대 약 42개의 뉴클레오티드, 최대 약 43개의 뉴클레오티드, 최대 약 44개의 뉴클레오티드, 최대 약 45개의 뉴클레오티드, 최대 약 46개의 뉴클레오티드, 최대 약 47개의 뉴클레오티드, 최대 약 48개의 뉴클레오티드, 최대 약 49개의 뉴클레오티드, 최대 약 50개의 뉴클레오티드, 최대 약 55개의 뉴클레오티드, 최대 약 60개의 뉴클레오티드, 최대 약 65개의 뉴클레오티드, 최대 약 70개의 뉴클레오티드, 최대 약 75개의 뉴클레오티드, 최대 약 80개의 뉴클레오티드, 최대 약 85개의 뉴클레오티드, 최대 약 90개의 뉴클레오티드, 최대 약 95개의 뉴클레오티드, 최대 약 100개의 뉴클레오티드, 최대 약 110개의 뉴클레오티드, 최대 약 120개의 뉴클레오티드, 최대 약 130개의 뉴클레오티드, 최대 약 140개의 뉴클레오티드, 최대 약 150개의 뉴클레오티드, 최대 약 160개의 뉴클레오티드, 최대 약 170개의 뉴클레오티드, 최대 약 180개의 뉴클레오티드, 최대 약 190개의 뉴클레오티드, 최대 약 200개의 뉴클레오티드, 최대 약 250개의 뉴클레오티드, 최대 약 300개의 뉴클레오티드, 최대 약 400개의 뉴클레오티드, 최대 약 500개의 뉴클레오티드, 최대 약 500개 초과 뉴클레오티드로 떨어져 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, esnRNA 분자는 RNA 공여체 분자에 상보적이고 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택되는 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-AACGAGCTCT-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-CGCAACGAGC-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-TATCGCAACG-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-AATAATATCG-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-TAAGAGAGCT-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-AAGAGAGCTC-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-GAGAGCTCGT-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 5'-GAGCTCGTTG-3'을 포함한다.

[0162] 일부 실시형태에서, esnRNA 분자는 RNA 공여체 분자에 대해 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 87%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 사이에서 임의의 핵분자의 상보성인 RNA 공여체 분자에 대해 상보성인 RNA 모티프를 함유한다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 RNA 공여체 분자에 대해 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 80%, 최대 약 87%, 최대 약 90%, 최대 약 91%, 최대 약 92%, 최대 약 93%, 최대 약 94%, 최대 약 95%, 최대 약 96%, 최대 약 97%, 최대 약 98%, 최대 약 99% 또는 그 사이에서 임의의 핵분자의 상보성이다. 일부 실시형태에서, RNA 모티프는 RNA 공여체 분자에 대해 100% 상보적이다.

[0163] 일부 실시형태에서, esnRNA 분자 및 RNA 공여체 분자는 esnRNA-공여체 복합체라 불리는 복합체를 형성한다.

[0164] 일부 실시형태에서, esnRNA-공여체 복합체는 염기 페어링을 통해 표적 RNA와 회합한다.

[0165] *UTR*

[0166] 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 5' 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 안정성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 안정성을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 위치화를 변경한다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 처리를 변경한다.

[0167] 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자는 3' 미번역된 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 안정성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 3' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 안

정성을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 3' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 위치화를 변경한다. 일부 실시형태에서, 3' 미번역된 영역은 RNA 공여체 분자의 처리를 변경한다.

[0168] **핵산 변형**

[0169] 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자 또는 esnRNA는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드이고/이거나 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라 중 적어도 하나를 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "핵산 유사체"는 DNA 또는 RNA에서 발생하는 규범적 퓨린 또는 피리미딘 염기와 구조적 유사성을 갖는 화합물을 지칭한다. 핵산 유사체는 DNA 또는 RNA에서 자연적으로 발생하는 퓨린 또는 피리미딘 염기와 비교하여 변형된 당 및/또는 변형된 핵염기를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 유사체는 2'-데옥시리보뉴클레오타이드, 2'-리보뉴클레오타이드, 2'-데옥시리보뉴클레오타이드 또는 2'-리보뉴클레오타이드이고, 여기서 핵염기는 변형된 염기(예컨대, 예를 들어, 잔틴, 우리딘, 옥사닌(옥사노신), 7-메틸구아노신, 디하이드로우리딘, 5-메틸티딘, C3 스페이서, 5-메틸 dC, 5-하이드록시부틸-2'-데옥시우리딘, 5-니트로인돌, 5-메틸이소-데옥시시토신, 이소 데옥시구아노신, 데옥시우리딘, 이소 데옥시시티딘, 기타 0-1 퓨린 유사체, N-6-하이드록실아미노퓨린, 네블라린, 7-테아자 하이포크산틴, 기타 7-테아자퓨린 및 2-메틸 퓨린)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 유사체는 이노신, 7-테아자-2'-데옥시이노신, 2'-아자-2'-데옥시이노신, PNA-이노신, 모르폴리노-이노신, LNA-이노신, 포스포르아미데이트-이노신, 2'-O-메톡시에틸-이노신, 및 2'-OMe-이노신으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시형태에서 핵산 유사체는 핵산 모방체(예컨대, 예를 들어, 인공 핵산 및 이중 핵산(XNA)이다.

[0170] **핵산**

[0171] 또한 본 명세서에 기술된 유전자 전달 및 발현 기술에 사용하기 위해 본 명세서에 개시된 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 인코딩하는 핵산 서열이 본 명세서에 제공된다. 항상 명시적으로 언급된 것은 아니지만, 본 명세서에 제공된 서열이 동일한 생물학적 특성을 갖는 단백질을 생성하는 실질적으로 동일한 서열뿐만 아니라 발현 생성물을 제공하는데 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 이들 "생물학적으로 등가의" 또는 "생물학적으로 활성인" 또는 "등가의" 폴리펩티드는 본 명세서에 기술된 등가의 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩된다. 그들은 기본 조건 하에서 실행되는 서열 동일성 방법을 사용하여 비교할 때 참조 핵산 서열과 적어도 60%, 또는 대안적으로, 적어도 65%, 또는 대안적으로, 적어도 70%, 또는 대안적으로, 적어도 75%, 또는 대안적으로, 적어도 80%, 또는 대안적으로 적어도 85%, 또는 대안적으로 적어도 90%, 또는 대안적으로 적어도 95% 또는 대안적으로 적어도 98% 동일한 핵산 서열을 보유할 수 있다. 특정 실시형태의 예로서 특정 서열이 제공된다. 추가로, 등가의 폴리뉴클레오타이드는 엄격한 조건 하에 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 그 보체에 혼성화하는 것이다.

[0172] 본 명세서에 개시된 핵산 서열(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)은 코돈-최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 서로 다른 세포는 특정 코돈의 그 사용법이 다르다는 사실을 지칭한다. 이 코돈 편향은 세포 유형에서 특정 tRNA의 상대적 존재비에서의 편향에 상응한다. 상응하는 tRNA의 상대적 풍부도와 일치하도록 서열에서의 코돈을 변경함에 의해 발현을 증가시키는 것이 가능하다. 특정 세포 유형에서 상응하는 tRNA가 드물게 나타나는 코돈을 의도적으로 선택함에 의해 발현을 감소시키는 것도 가능하다. 코돈 사용법 표는 포유동물 세포뿐만 아니라 다양한 다른 유기체에도 사용될 수 있다. 유전자 코드에 기반하여, 다양한 대체 도메인을 코딩하는 핵산 서열이 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 서열은 개시된 방법이 실행되는 대체 도메인을 함유하는 RNA 공여체 분자를 발현하는데 사용되는 숙주 세포와 같은 숙주 또는 표적 세포(예컨대 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포)에서의 발현을 위해 최적화된다. 특정 종에 대한 코돈 선호도 및 코돈 사용법 표는 특정 종의 코돈 사용법 선호도의 이점을 활용하는 대체 도메인을 인코딩하는 단리된 핵산 분자(예컨대 그 상응하는 야생형 단백질과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 것)를 조작하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 대체 도메인은 특정 관심있는 유기체에 의해 우선적으로 사용되는 코돈을 갖도록 설계될 수 있다. 일 예에서, 대체 도메인 핵산 서열은 그의 상응하는 야생형 또는 유래 핵산 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 것과 같은, 인간 세포에서의 발현을 위해 최적화된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 대체 도메인(백터의 일부일 수 있음)을 인코딩하는 단리된 RNA 공여체 분자는 진핵 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 적어도 하나의 대체 도메인 코딩 서열, 또는 인간 세포에서의 발현에 대해 최적화된 적어도 하나의 대체 도메인 코딩 서열 코돈을 포함한다. 일 실시형태에서, 이러한 코돈 최적화된 대체 도메인 코딩 서열은 그 상응하는 야생형 또는 유래 서열과 적어도 약 80%, 적어도

약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 진행 세포 코돈 최적화된 핵산 서열은 그 상응하는 야생형 또는 유래 단백질과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 대체 도메인을 인코딩한다. 다른 실시형태에서, 서열은 다르지만 동일한 대체 도메인 단백질 서열을 인코딩하는 핵산과 같은, 기능적으로 등가의 핵산을 함유하는 다양한 클론이 일상적으로 생성될 수 있다. 코딩 서열에서의 사일런트 돌연변이는 유전자 코드의 축퇴(즉, 중복성)로 인해 발생하며, 이에 의해 하나 초과 코돈이 동일한 아미노산 잔기를 인코딩할 수 있다. 따라서, 예를 들어 류신은 CTT, CTC, CTA, CTG, TTA 또는 TTG에 의해 인코딩될 수 있고; 세린은 TCT, TCC, TCA, TCG, AGT 또는 AGC에 의해 인코딩될 수 있고; 아스파라긴은 AAT 또는 AAC에 의해 인코딩될 수 있고; 아스파르트산은 GAT 또는 GAC에 의해 인코딩될 수 있고; 시스테인은 TGT 또는 TGC에 의해 인코딩될 수 있고; 알라닌은 GCT, GCC, GCA 또는 GCG에 의해 인코딩될 수 있고; 글루타민은 CAA 또는 CAG에 의해 인코딩될 수 있고; 티로신은 TAT 또는 TAC에 의해 인코딩될 수 있고; 이소류신은 ATT, ATC 또는 ATA에 의해 인코딩될 수 있다. 표준 유전자 코드를 보여주는 표는 다양한 소스에서 찾을 수 있다(예를 들어, Stryer, 1988, Biochemistry, 3.sup.rd Edition, W.H. Freeman and Co., NY 참조).

[0173] "혼성화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 반응하여 뉴클레오타이드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 Watson-Crick 염기 페어링, Hoogsteen 결합 또는 임의의 기타 서열-특이적 방식에 의해 발생할 수 있다. 복합체는 이중가닥 구조를 형성하는 2개의 가닥, 다중-가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일 자가-혼성화 가닥, 또는 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 PC 반응의 개시 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오타이드의 효소적 절단과 같은 보다 광범위한 과정에서 한 단계를 구성할 수 있다.

[0174] 엄격한 혼성화 조건의 예는: 약 25°C 내지 약 37°C의 인큐베이션 온도; 약 6x SSC 내지 약 10x SSC의 혼성화 완충액 농도; 약 0% 내지 약 25%의 포름아미드 농도; 및 약 4x SSC 내지 약 8x SSC의 세정 용액을 포함한다. 적당한 혼성화 조건의 예는: 약 40°C 내지 약 50°C의 인큐베이션 온도; 약 9x SSC 내지 약 2x SSC의 완충액 농도; 약 30% 내지 약 50%의 포름아미드 농도; 및 약 5x SSC 내지 약 2x SSC의 세정 용액을 포함한다. 높은 엄격도 조건의 예는: 약 55°C 내지 약 68°C의 인큐베이션 온도; 약 1x SSC 내지 약 0.1x SSC의 완충액 농도를 포함한다;

[0175] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개의 펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 상동성은 비교의 목적을 위해 정렬될 수 있는 각 서열에서 위치를 비교함에 의해 결정될 수 있다. 비교된 서열에서 위치가 동일한 염기나 아미노산에 의해 점유되면, 분자는 해당 위치에서 상동성이다. 서열 간의 상동성의 정도는 서열에 의해 공유된 일치 또는 상동적인 위치의 수의 함수이다. "관련되지 않은" 또는 "비-상동적인" 서열은 본 명세서에 기술된 서열 중 하나와 40% 미만의 동일성, 또는 대안적으로 25% 미만의 동일성을 공유한다.

[0176] 프로모터

[0177] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자를 인코딩하는 서열은 진행 세포에서 RNA 공여체 분자를 발현할 수 있는 프로모터를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0178] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 조작된 소형 핵 RNA 분자를 인코딩하는 서열은 진행 세포에서 조작된 소형 핵 RNA 분자를 발현할 수 있는 프로모터를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0179] 벡터

[0180] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV)로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제 불능이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 단리되거나 재조합된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 자가-상보적이다.

[0181] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV)로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12의 AAV로부터 단리되거나 유래된 역 말단 반복 서열 또는 캡

시드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제 불능이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 단리되거나 재조합(rAAV)된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 자가-상보적(scAAV)이다.

[0182] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 나노입자, 미셀, 리포솜 또는 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스, 엑소솜 또는 덴드리머를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터 또는 재조합 발현 시스템이다. 본 명세서에 사용된 용어 "재조합 발현 시스템"은 재조합에 의해 형성된 특정 유전 물질의 발현을 위한 유전적 작제물을 지칭한다.

[0183] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 발현 벡터, 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터에는 발현 조절 요소가 제한 없이 포함된다. 본 명세서에 사용된 "발현 조절 요소"는 유전자와 같은 코딩 서열의 발현을 조절하는 임의의 서열을 지칭한다. 발현 제어 요소의 예에는 프로모터, 인핸서, 마이크로 RNA, 전사-후 조절 요소, 폴리아데닐화 신호 서열, 5' 또는 3' 미변역된 영역 및 인트론이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0184] 발현 제어 요소는 예를 들어 구성적, 유도성, 억제성 또는 조직-특이적일 수 있다. "프로모터"는 전사의 개시 및 속도가 제어되는 폴리뉴클레오타이드 서열의 영역인 제어 서열이다. 이는 RNA 폴리머라제 및 기타 전사 인자와 같이 조절 단백질과 분자가 결합할 수 있는 유전적 요소를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터에 의한 발현 제어는 조직-특이적이다. 프로모터의 비-제한적인 예에는 CMV, CBA, CAG, Cbh, EF-1a, PGK, UBC, GUSB, UCOE, hAAT, TBG, 테스민, MCK, C5-12, NSE, 시냅신, PDGF, MecP2, CaMKII, mGluR2, NFL, NFH, nβ2, PPE, ENK, EAAT2, GFAP, MBP, H1 및 U6 프로모터가 포함된다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 전달 RNA(tRNA)의 발현을 유도할 수 있는 프로모터로부터 단리되거나 유래된 서열이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 알려진 tRNA 프로모터, 아르기닌 tRNA 프로모터, 아스파라긴 tRNA 프로모터, 아스파르트산 tRNA 프로모터, 시스테인 tRNA 프로모터, 글루타민 tRNA 프로모터, 글루탐산 tRNA 프로모터, 글리신 tRNA 프로모터, 히스티딘 tRNA 프로모터, 이소류신 tRNA 프로모터, 류신 tRNA 프로모터, 라이신 tRNA 프로모터, 메티오닌 tRNA 프로모터, 페닐알라닌 tRNA 프로모터, 프롤린 tRNA 프로모터, 세린 tRNA 프로모터, 트레오닌 tRNA 프로모터, 트립토판 tRNA 프로모터, 티로신 tRNA 프로모터, 또는 발린 tRNA 프로모터로부터 단리되거나 유래된다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 발린 tRNA 프로모터로부터 단리되거나 유래된다.

[0185] 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 동물 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 동물 세포는 인간 세포이다.

[0186] "인핸서"는 전사의 가능성 또는 빈도를 증가시키기 위해 단백질을 활성화함에 의해 결합될 수 있는 DNA의 영역이다. 인핸서 및 전사-후 조절 요소의 비-제한적인 예에는 CMV 인핸서 및 WPRE가 포함된다.

[0187] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 발현 벡터, 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터는 제한 없이 "멀티시스트론" 또는 "폴리시스트론" 또는 "바이시스트론" 또는 트리시스트론" 작제물의 구성, 즉 이중, 삼중 또는 다중 코딩 영역 또는 엑손을 가지는 것을 위한 IRES 또는 2A 펩티드 부위와 같은 벡터 요소를 포함하고, 따라서 단일 작제물로부터 2개 이상의 단백질을 mRNA로부터 발현하는 능력을 가질 것이다. 멀티시스트론 벡터는 동일한 mRNA로부터 2개 이상의 별도의 단백질을 동시에 발현한다. 멀티시스트론 구성을 구축하는데 가장 널리 사용되는 2가지 전략은 IRES 또는 2A 자가-절단 부위의 사용을 통한 것이다. "IRES"는 폴리시스트론 벡터 작제물 내에서 사용되는 바이러스, 원핵 또는 진핵 기원의 내부 리보솜 진입 부위 또는 이의 일부를 지칭한다. 일부 실시형태에서, IRES는 캡-독립적 방식으로 번역 개시를 허용하는 RNA 요소이다. 용어 "자가-절단 펩티드" 또는 "자가-절단 펩티드를 인코딩하는 서열" 또는 "2A 자가-절단 부위"는 리보솜 스킵핑을 촉진하는 부위를 통합하고 따라서 단일 프로모터로부터 2개의 폴리펩티드를 생성하기 위해 벡터 작제물 내에서 사용되는 연결 서열을 지칭하며, 이러한 자가-절단 펩티드에는 제한 없이 T2A 및 P2A 펩티드 또는 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 서열이 포함된다.

[0188] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스/레트로바이러스 키메라 벡터, 단순 포진 바이러스 I 또는 II 벡터, 파보바이러스 벡터, 세망내피종 바이러스 벡터, 폴리오바이러스 벡터, 유두종바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 또는 2개 이상의 바이러스 벡터의 유리한 양태를 포함하는 임의의 하이브리드 또는 키메라 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 발현 제어 요소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 하나 이상의 선택가능한 마커를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 벡터는 낮은 독성을 갖는다. 일부 실

시형태에서, AAV 벡터는 숙주 게놈에 통합되지 않으므로 삽입 돌연변이를 야기할 가능성이 낮다. 일부 실시형태에서, AAV 벡터는 .3kb 내지 4.75kb의 총 폴리뉴클레오타이드의 범위를 인코딩할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물, 시스템, 방법 및 키트 중 임의의 것에 사용될 수 있는 AAV 벡터의 예는 AAV1 벡터, 변형된 AAV1 벡터, AAV2 벡터, 변형된 AAV2 벡터, AAV3 벡터, 변형된 AAV3 벡터, AAV4 벡터, 변형된 AAV4 벡터, AAV5 벡터, 변형된 AAV5 벡터, AAV6 벡터, 변형된 AAV6 벡터, AAV7 벡터, 변형된 AAV7 벡터, AAV8 벡터, AAV9 벡터, AAV.rh10 벡터, 변형된 AAV.rh10 벡터, AAV.rh32/33 벡터, 변형된 AAV.rh32/33 벡터, AAV.rh43 벡터, 변형된 AAV.rh43 벡터, AAV.rh74 벡터, 변형된 AAV.rh74 벡터, AAV.rh64R1 벡터, 변형된 AAV.rh64R1 벡터 및 임의의 임의의 조합 또는 등가물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 인테그라제-적격 렌티바이러스 벡터(ICLV)이다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 이식유전자 플라스미드 벡터뿐만 아니라 관련 플라스미드(예를 들어, 패키징 플라스미드, rev 발현 플라스미드, 엔벨롭 플라스미드)뿐만 아니라 바이러스 또는 바이러스-유사 진입 메커니즘을 통해 외인성 핵산을 세포 안으로 도입할 수 있는 렌티바이러스-기반 입자와 조합한 이식유전자 플라스미드 벡터를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 본 명세서에 기재된 조성물, 시스템, 방법 및 키트에 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 예는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 1 벡터, 변형된 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 1 벡터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 2 벡터, 변형된 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 2 벡터, 수티 망가베이 유인원 면역결핍 바이러스(SIVSM) 벡터, 변형된 수티 망가베이 유인원 면역결핍 바이러스(SIVSM) 벡터, 아프리카 녹색 원숭이 유인원 면역결핍 바이러스(SIVAGM) 벡터, 변형된 아프리카 녹색 원숭이 유인원 면역결핍 바이러스(SIVAGM) 벡터, 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV) 벡터, 변형된 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV) 벡터, 고양이 면역결핍 바이러스(FIV) 벡터, 변형된 고양이 면역결핍 바이러스(FIV) 벡터, Visna/maedi 바이러스(VNV/VMV) 벡터, 변형된 Visna/maedi 바이러스(VNV/VMV) 벡터, 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV) 벡터, 변형된 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV) 벡터, 소 면역결핍 바이러스(BIV) 또는 변형된 소 면역결핍 바이러스(BIV)를 포함할 수 있다.

[0189] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 벡터는 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 적어도 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 개시내용의 하나 이상의 RNA 공여체 분자(들) 및 esnRNA 분자(들)를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 개시내용의 2개 이상의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩한다. 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 벡터는 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 적어도 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 하나 이상의 RNA 공여체 분자(들)를 포함하거나 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 2개 이상의 RNA 공여체 분자들을 포함하거나 인코딩한다.

[0190] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV)로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제 불능이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 단리되거나 재조합된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 자가-상보적이다.

[0191] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV)로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12의 AAV로부터 단리되거나 유래된 역 말단 반복 서열 또는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제 불능이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 단리되거나 재조합(rAAV)된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 자가-상보적(scAAV)이다.

[0192] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 나노입자, 미셀, 리포솜 또는 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 또는 덴드리머를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터 또는 재조합 발현 시스템이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합 발현 시스템"은 재조합에 의해 형성된 특정 유전 물질의 발현을 위한 유전적 작제물을 지칭한다.

[0193] 일부 실시형태에서, 리포솜, 리포플렉스 또는 나노입자는 비-양이온성 지질, PEG 접합된 지질, 스테롤, 또는 임의의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0194] 일부 실시형태에서, 리포솜, 리포플렉스 또는 나노입자는 비-양이온성 지질을 추가로 포함하며, 여기서 비-이온

성 지질은 디스테아로일-sn-글리세로-포스포에탄올아민, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-모노메틸 PE), 디메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-디메틸 PE), 18-1-트랜스 PE, 1-스테로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 수소화 소이 포스파티딜콜린(HSPC), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 스펅고미엘린(SM), 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜글리세롤(DMPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디에루코일포스파티딜콜린(DEPC), 팔미토일로레이올포스파티딜글리세롤(POPG), 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민(DEPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린, 에그 스펅고미엘린(ESM), 세팔린, 카디오리핀, 포스파티딘산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 리소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린 및, 예를 들어, WO2017/099823 또는 US2018/0028664에 기술된 비-양이온성 지질로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0195] 일부 실시형태에서, 리포솜, 리포플렉스, 또는 나노입자는 접합된 지질을 추가로 포함하며, 여기서 접합된-지질은 PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디아킬옥시프로필(DAA), PEG-포스포리피드, PEG-세라마이드(Cer), 폐결화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE), PEG 숙시네이트 디아실글리세롤(PEGs-DAG)(예컨대 4-O-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-O-(ω-메톡시(폴리에톡시)에틸)부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 리포솜, 리포플렉스 또는 나노입자는 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체를 추가로 포함한다.

[0197] 일부 실시형태에서, 리포솜, 리포플렉스 또는 나노입자는 이온화가능한 지질, 비-양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질, 및 스테롤을 추가로 포함한다. 이온화가능한 지질, 비-양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질, 및 스테롤의 양은 독립적으로 다양할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지질 나노입자는 입자에 존재하는 전체 지질의 약 20mol% 내지 약 90mol% 양에서 이온화가능한 지질, 입자에 존재하는 전체 지질의 약 5mol% 내지 약 30mol% 양에서 비-양이온성 지질, 입자에 존재하는 전체 지질의 약 0.5mol% 내지 약 20mol%의 양에서 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질, 및 입자에 존재하는 전체 지질의 약 20mol% 내지 약 50mol%의 양에서 스테롤을 포함한다.

[0198] 총 지질 대 DNA 백터의 비율은 원하는 대로 다양할 수 있다. 예를 들어, 총 지질 대 DNA 백터(질량 또는 중량) 비율은 약 10:1 내지 약 30:1일 수 있다.

[0199] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 발현 백터, 바이러스 백터 또는 비-바이러스 백터에는 제한 없이, 발현 조절 요소가 포함된다. 본 명세서에 사용된 "발현 조절 요소"는 유전자와 같은 코딩 서열의 발현을 조절하는 임의의 서열을 지칭한다. 발현 제어 요소의 예에는 프로모터, 인핸서, 마이크로RNA, 전사-후 조절 요소, 폴리아데닐화 신호 서열 및 인트론이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 발현 조절 요소는 예를 들어 구성적, 유도성, 억제성 또는 조직-특이적일 수 있다. "프로모터"는 전사의 개시 및 속도가 제어되는 폴리뉴클레오타이드 서열의 영역인 제어 서열이다. 이는 RNA 폴리머라제 및 기타 전사 인자와 같이 조절 단백질과 분자가 결합할 수 있는 유전적 요소를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터에 의한 발현 제어는 조직-특이적이다. 프로모터의 비-제한적인 예에는 CMV, CBA, CAG, Cbh, EF-1a, PGK, UBC, GUSB, UCOE, hAAT, TBG, 테스민, MCK, C5-12, NSE, 시냅신, PDGF, MecP2, CaMKII, mGluR2, NFL, NFH, nβ2, PPE, ENK, EAAT2, GFAP, MBP 및 U6 프로모터가 포함된다. "인핸서"는 전사의 가능성 또는 빈도를 증가시키기 위해 단백질을 활성화함에 의해 결합될 수 있는 DNA의 영역이다. 인핸서 및 전사후 조절 요소의 비-제한적인 예에는 CMV 인핸서 및 WPRE가 포함된다.

[0200] 세포 및 조직

[0201] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 진핵 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 소, 뮤어라인, 고양이, 말, 돼지, 개, 유인원 또는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 비-인간 영장류 세포와 같은 비-인간 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 체세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 생식계열 세포이다. 일부 실시형태

에서, 개시내용의 생식계열 세포는 인간 세포가 아니다.

- [0202] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 배아 줄기 세포는 인간 세포가 아니다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 다능성 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 성체 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 세포는 조혈 줄기 세포(HSC)이다.
- [0203] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 면역 세포는 림프구이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 면역 세포는 T 림프구(본 명세서에서는 T-세포라고도 함)이다. 개시내용의 T-세포의 예에는 나이브 T 세포, 효과기 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포(Treg) 및 감마 델타 T 세포가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 면역 세포는 B 림프구이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 면역 세포는 자연 살해 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 면역 세포는 항원-제시 세포이다.
- [0204] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 근육 세포는 근아세포 또는 근세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 근육 세포는 심장 근육 세포, 골격근 세포 또는 평활근 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 근육 세포는 가로무늬 세포이다.
- [0205] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 체세포는 상피 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 상피 세포는 편평 세포 상피, 입방형 세포 상피, 원주 세포 상피, 중층 세포 상피, 가성중층 원주 세포 상피 또는 이행 세포 상피를 형성한다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 상피 세포는 송과선, 흉선, 뇌하수체, 갑상선, 부신, 아포크린선, 홀로크린선, 메로크린선, 장액샘, 점액샘 및 피지선을 포함하지만 이에 제한되지 않는 샘을 형성한다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 상피 세포는 폐, 비장, 위, 췌장, 방광, 장, 신장, 담낭, 간, 후두 또는 인두를 포함하지만 이에 제한되지 않는 기관의 외부 표면과 접촉한다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 상피 세포는 혈관 또는 정맥의 외부 표면과 접촉한다.
- [0206] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 뇌 세포는 뉴런 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 뉴런 세포는 중추신경계의 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 뉴런 세포는 뇌 또는 척수의 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 뉴런 세포는 뇌신경 또는 시신경의 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 뉴런 세포는 말초신경계의 뉴런이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 뉴런 세포는 신경교 또는 교세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 교세포는 희돌기교세포, 성상교세포, 뇌실막 세포 및 소교세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 중추신경계의 교세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 교세포는 슈반 세포 및 위성 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 말초신경계의 교세포이다.
- [0207] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 간 세포는 간세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 간 세포는 간 성상 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 간 세포는 쿠퍼 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 간 세포는 동양혈관 내피 세포이다.
- [0208] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 광수용체이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 광수용체 세포는 막대상이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 원추체이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 양극성 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 신경절 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 수평 세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 망막 세포는 무축삭 세포이다.
- [0209] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 심장 세포는 심근세포이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 심장 세포는 심장 박동조율기 세포이다.
- [0210] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 체세포는 일차 세포이다.
- [0211] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 체세포는 배양된 세포이다.
- [0212] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 체세포는 생체내, 시험관내, 생체외 또는 현장 내에 있다.
- [0213] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 체세포는 자가조직 또는 동종이다.
- [0214] **사용 방법**
- [0215] 일부 실시형태에서, 2개의 RNA 분자(RNA 공여체 및 조작된 소형 핵 RNA 또는 esnRNA)를 포함하는 조성물이 본

명세서에 기술되며 여기서 RNA 공여체는 표적 RNA 분자에 선택적으로 결합하는 반면 esnRNA는 RNA 공여체 분자에 결합하여 표적 RNA 분자와의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉진한다. 특정 양태에서, 내인성 스플라이세오솜에 의한 RNA 공여체 분자의 인식을 증가시키는 비-천연 RNA 공여체 분자를 표적화하는 비-천연 esnRNA 분자가 본 명세서에 기술되어 있다. 개시내용은 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터, 조성물 및 세포를 제공한다. 개시내용은 질환 또는 장애를 치료하기 위해 개시내용의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자, 벡터, 조성물 및 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

[0216] 이론에 구속됨이 없이, 트랜스-스플라이싱 RNA 공여체 분자와 RNA 공여체 분자와 접촉하는 esnRNA의 조합은 질환을 해결하기 위한 인간 세포에서 질환-야기 RNA 서열을 대체하기에 충분하게 효율적인 방식으로 표적 RNA 내에서 선택된 서열의 대체를 초래한다. 일부 실시형태에서, 개시내용은 질환-야기 RNA 분자를 서열 특이적 방식으로 표적화하고 이들 RNA 분자 내의 질환-야기 RNA 서열을 고효율로 대체하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자 및 esnRNA 구현은 질환-야기 서열의 대체 또는 조작된 서열의 표적 RNA 안으로의 삽입을 포함하는 다양한 맥락에서 유용성을 보여준다. 일부 실시형태에서, 조작된 서열은 표적 RNA의 번역 또는 안정성을 변경하여 단백질 생산 또는 표적 RNA 수준을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터, 조성물 및 세포, 그리고 트랜스-스플라이싱 RNA 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 4개의 도메인을 포함하는 RNA 공여체 분자가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자에서 4개 도메인의 조합은 질환을 해결하기 위해 인간 세포에서 질환-야기 RNA 서열을 대체하기에 충분하게 효율적인 방식으로 표적 RNA 내의 선택된 서열의 대체를 초래한다. 일부 실시형태에서, 개시내용은 질환-야기 RNA 분자를 서열-특이적 방식으로 표적화하고 이 RNA 분자 내의 질환-야기 RNA 서열을 고효율로 대체하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체 분자 구현은 질환-야기 서열의 대체 또는 조작된 서열의 표적 RNA 안으로의 삽입을 포함하는 다양한 맥락에서 유용성을 보여준다. 일부 실시형태에서, 조작된 서열은 표적 RNA의 번역 또는 안정성을 변경하여 단백질 생산 또는 표적 RNA 수준을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터, 조성물 및 세포, 그리고 트랜스-스플라이싱 RNA 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0218] 일부 실시형태에서, esnRNA 및 RNA 공여체는 도 1a-1c에 예시된 바와 같이 유전 질환을 교정하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체는 돌연변이를 담지하는 표적 RNA에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체와 표적 RNA 사이의 염기 페어링은 이들 분자를 근접하게 만든다. 일부 실시형태에서, esnRNA와 RNA 공여체 사이의 b 페어링은 스플라이세오솜 구성요소를 근접하게 만들어 표적 RNA와 RNA 공여체 사이의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉진한다. 일부 실시형태에서, esnRNA는 RNA 공여체와 접촉한다. 일부 실시형태에서, RNA 공여체를 esnRNA와 접촉시키는 것은 스플라이세오솜 구성요소의 동원을 초래한다. 일부 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱은 RNA 공여체 분자와 표적 RNA 사이에서 발생하여 표적 RNA에서 선택된 서열을 대체하는 RNA 공여체 분자로 교정된 표적 RNA를 초래한다.

[0219] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 표적 RNA의 내부 서열을 편집할 수 있다. 예가 도 2a에 묘사되어 있다. 일 실시형태에서, RNA 공여체 및 esnRNA는 내부 서열을 편집한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 표적 서열의 말단 부분을 편집할 수 있다. 예가 도 2b에 묘사되어 있다.

[0220] 일부 실시형태에서, RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 변형시키는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0221] 개시내용은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 활성을 변형시키는 방법을 제공한다.

[0222] 개시내용은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95, 또는 100% 효율성으로 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코

딩된 단백질의 서열을 최대 약 15%, 최대 약 20%, 최대 약 25%, 최대 약 30%, 최대 약 35%, 최대 약 40%, 최대 약 45%, 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 80%, 최대 약 85%, 최대 약 90%, 최대 약 95, 또는 100% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다.

[0223] 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 15% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 20% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 30% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 40% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 50% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 60% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 70% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 80% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 서열을 적어도 약 90% 효율성으로 변형시키는 것을 포함한다.

[0224] 개시내용은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, RNA 분자의 미번역된 영역의 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.

[0225] 개시내용은 RNA 분자에 하나 이상의 RNA 공여체 분자(또는 그 일부)의 결합 및 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 RNA 분자를 접촉시키는 것을 포함하는, WPRE 또는 유사한 활성을 갖는 서열의 삽입에 의해 RNA의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0226] 개시내용은 조성물과 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 표적 RNA를 포함하는 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 표적 RNA에 의해 인코딩된 단백질의 조성물을 변형시키는 방법을 제공한다.

[0227] 개시내용은 적어도 약 20% 효율성으로 표적 RNA의 조성물을 변형시키는 방법을 제공하며, 여기서 100% 효율성은 조성물과 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 표적 RNA를 포함하는 세포를 접촉시키는 것을 포함하는 표적 RNA 내에서 선택된 서열의 완전한 대체를 구성한다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 89%, 적어도 약 %, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 최대 약 20%, 최대 약 25%, 최대 약 30%, 최대 약 35%, 최대 약 40%, 최대 약 45%, 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 89%, 최대 약 %, 최대 약 85%, 최대 약 90%, 최대 약 95% 또는 100%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 20%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 40%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 60%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 80%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 90%이다. 일부 실시형태에서 효율성은 약 100%이다.

- [0228] 본 명세서에 기술된 바와 같이 표적 RNA에 의해 인코딩된 단백질의 조성물을 적어도 약 20% 효율성으로 변형시키는 방법이 기술되며, 여기서 100% 효율성은 조성물과 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 표적 RNA를 포함하는 세포를 접촉시키는 것을 포함하는 표적 RNA 내에서 선택된 서열의 완전한 대체를 구성한다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 89%, 적어도 약 %, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 최대 약 20%, 최대 약 25%, 최대 약 30%, 최대 약 35%, 최대 약 40%, 최대 약 45%, 최대 약 50%, 최대 약 55%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 89%, 최대 약 %, 최대 약 85%, 최대 약 90%, 최대 약 95% 또는 100%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 20%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 40%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 60%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 80%이다. 일부 실시형태에서, 효율성은 적어도 약 90%이다. 일부 실시형태에서 효율성은 약 100%이다.
- [0229] 개시내용은 조성물과 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 표적 RNA를 포함하는 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 표적 RNA의 조성물을 고효율로 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체내, 시험관내, 생체외 또는 현장 내에 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 AAV이다.
- [0230] 개시내용은 조성물과 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 조성물과 표적 RNA를 포함하는 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 표적 RNA에 의해 인코딩된 단백질의 조성물을 고효율로 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체내, 시험관내, 생체외 또는 현장 내에 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 AAV이다.
- [0231] 개시내용은 치료적으로 유효한 양의 개시내용의 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0232] 개시내용은 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 개시내용의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함하고, 조성물은 개시내용의 RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 발현의 수준을 변형시킨다.
- [0233] 개시내용은 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 개시내용의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함하고, 조성물은 개시내용의 RNA 분자 또는 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 발현의 수준을 변형시킨다.
- [0234] 개시내용은 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 개시내용의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함하고 조성물은 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 활성을 변형시킨다.
- [0235] 개시내용은 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 개시내용의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 조성물은 개시내용의 RNA 공여체 분자 및 esnRNA 분자를 포함하거나 인코딩하는 벡터를 포함하고 조성물은 RNA 분자에 의해 인코딩된 단백질의 활성을 변형시킨다.
- [0236] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 유전적 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 유전적 질환 또는 장애는 단일-유전자 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 상염색체 우성 질환 또는 장애, 상염색체 열성 질환 또는 장애, X-염색체 연관(X-연관) 질환 또는 장애, X-연관 우성 질환 또는 장애, X-연관 열성 질환 또는 장애, Y-연관 질환 또는 장애, 또는 미토콘드리아 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 공통 가변 면역 결핍증, 아테노신 데아미나제 결핍증, X-연관 중증 복합성 면역결핍증, 베타-지중해혈증, 알파-지중해혈증, 골수이형성 증후군, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨증을 동반한 전두측두엽 치매, 어서 증후군, 크라베병, 니만픽병, 프리온병, 드라베 증후군, 조기-발병 파킨슨병, 척수소뇌운동실조, 유전간질 장애, 운동실조증-모세혈관확장증, GM1 신경절증, 고셔병, GM2 신경절증, 엔젤만 증후군, 글루코스 수송체 결핍

유형 1, 다논병, 파브리병, 상염색체 우성 다낭성 신장 질환, 폐폐병, 가족성 고콜레스테롤혈증, 개방각 녹내장, 혈터 증후군 또는 1형 뮤코다당증, 헌터 증후군 또는 2형 뮤코다당증, 바텐병, 뒤시엔 근이영양증, 사지근이영양증 유형 1B, 사지근이영양증 유형 2B, 사지근이영양증 유형 2D, 사지근이영양증 유형 2E, 사지근이영양증 유형 2C, 사지근이영양증 유형 2F, 얼굴견갑상완 근이영양증, 혈우병 B, 혈우병 A, 색소성 망막염, 낭포성 섬유증, 상염색체 우성 청력 손상, 및 비-증후군성 청력 상실이지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 유전적 질환 또는 장애는 다중-유전자 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 유전적 질환 또는 장애는 다중-유전자 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 헌팅턴병, 신경섬유종증 유형 1, 신경섬유종증 유형 2, 마르판 증후군, 유전성 비용종증 결장직장암, 유전성 다발골외증, 폰 빌레브란트 병 및 급성 간혈 포르피린증을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상염색체 우성 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 백색증, 중쇄 아실-CoA 탈수소효소 결핍증, 낭포성 섬유증, 낮적혈구병, 테이-삭스병, 니만-픽병, 척수성 근위축증, 및 로버츠 증후군을 포함하나 이에 제한되지 않는 상염색체 열성 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 근이영양증, 뒤시엔 근이영양증, 혈우병, 부신백질이영양증(ALD), 레트 증후군 및 혈우병 A를 포함하지만 이에 제한되지 않는 X-연관 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 단일-유전자 질환 또는 장애는 레버 유전성 시신경병증을 포함하지만 이에 제한되지 않는 미토콘드리아 장애이다.

[0237] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 면역 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 면역 질환 또는 장애는 B-세포 결핍, T-세포 결핍, 호중구감소증, 무비증, 보체 결핍, 후천성 면역결핍 증후군(AIDS) 및 의학적 개입으로 인한 면역결핍(의학적 요법의 의도된 효과 또는 부작용으로서의 면역억제)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역결핍 질환 또는 장애이다. 일부 실시형태에서, 면역 질환 또는 장애는 이완불능증, 에디슨병, 성인 스틸병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 아밀로이드증, 항-GBM/항-TBM 신염, 항인지질 증후군, 자가면역 혈관부종, 자가면역 자율신경부전, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환(AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 자가면역 고환염, 자가면역 췌장염, 자가면역 망막병증, 자가면역 두드러기, 축삭 & 신경 신경병증(AMAN), 발로병, 베체트병, 양성 점막 유전포창, 수포성 유전포창, 캐슬만병(CD), 소아지방변증, 샤가스병, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 만성 재발성 다초점 골수염(CRMO), 처그-스트라우스 증후군(CSS) 또는 호산구성 육아종증(EGPA), 반흔성 유전포창, 코건 증후군, 한랭응집병, 선천성 심장 차단, 콕사키 심근염, CREST 증후군, 크론병, 포진성 피부염, 피부근염, 데릭병(시신경척수염), 원판상 루푸스, 드레슬러 증후군, 자궁내막증, 호산구성 식도염(EoE), 호산구성 근막염, 결절홍반, 본태성 혼합형 한랭글로불린혈증, 에반스 증후군, 섬유근육통, 섬유화성 폐포염, 거대세포 동맥염(측두동맥염), 거대세포 심근염, 사구체신염, 굿파스처 증후군, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-손라인 자반증(HSP), 임신성 포진 또는 천포창양 임신증(PG), 화농한선염(HS)(여드름 역여드름), 저감말글로불린혈증, IgA 신장병증, IgG4-관련 경화 질환, 면역성 혈소판감소성 자반증(ITP), 봉입체근염(IBM), 간질성 방광염(IC), 연소성 관절염, 연소성 당뇨병(제1형 당뇨병), 연소성 근염(JM), 가와사키병, 램버트-이튼 증후군, 백혈구과괴성 혈관염, 편평 태선, 경화 태선, 목질 결막염, 선형 IgA병(LAD), 루푸스, 만성 라임병, 메니에르병, 미세다발혈관염(MPA), 혼합된 결합 조직병(MCTD), 무렌레양, 무하-하버만병, 다초점 운동 신경병증(MMN) 또는 MMNCB, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 기면증, 신생아 루푸스, 시신경척수염, 호중구감소증, 눈 반흔성 천포창, 시신경염, 회문 류머티즘(PR), PANDAS, 부신생물 소뇌 변성(PCD), 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 패리 롬베르그 증후군, 파르스 평면염(말초 포도막염), 파소나지-터너 증후군, 천포창, 말초 신경병증, 정맥뇌척수염, 악성빈혈(PA), POEMS 증후군, 결절다발동맥염, 다선증후군 유형 I, II, III, 류마티스성 다발근통, 다발근염, 심근경색후 증후군, 심낭절개후 증후군, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 프로게스테론 피부염, 건선, 건선성 관절염, 순적혈구무형성증(PRCA), 괴저농피증, 레이노 현상, 반응성 관절염, 반사 교감신경 이영양증, 재발성 다연골염, 하지 불안 증후군(RLS), 후복막 섬유증, 류마티스열, 류마티스관절염, 사르코이드증, 슈미트 증후군, 공막염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 정자 & 고환 자가면역, 경직증후군(SPS), 아급성 세균성 심내막염(SBE), 수삭 증후군, 교감성 안염(SO), 타카야수 동맥염, 측두염 동맥염/거대세포 동맥염, 혈소판감소성 자반증(TTP), 톨로사-헌트 증후군(THS), 횡단 척수염, 제1형 당뇨병, 궤양성 대장염(UC), 미분화 결합 조직 질환(UCTD), 포도막염, 혈관염, 백반증, 보그트-코야나기-하라다병, 또는 베게너 육아종증을 포함하지만 이에 제한되지 않는 자가면역 질환 또는 장애이다.

[0238] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0239] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 대사 질환 또는 장애를 포함하

지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0240] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 퇴행성 또는 진행성 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 퇴행성 또는 진행성 질환 또는 장애는 근위축성 측삭 경화증(ALS), 헌팅턴병, 알츠하이머병 및 노화를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0241] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 감염성 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0242] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 소아 또는 발달 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0243] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 심혈관 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0244] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 증식성 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 증식성 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시형태에서, 암은 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 부신피질 암종, AIDS-관련 암, 카포시 육종(연조직 육종), AIDS-관련 림프종(림프종), 원발성 CNS 림프종(림프종), 항문암, 맹장암, 위장관 카르시노이드 종양, 성상세포종, 비정형 기형/형문근양 종양, 중추신경계(뇌암), 기저세포 암종, 담관암, 방광암, 뼈암, 유잉 육종, 골육종, 악성 섬유성 조직구종, 뇌종양, 유방암, 버킷 림프종, 카르시노이드 종양, 암종, 심장병(심장) 종양, 배아 종양, 생식 세포 종양, 원발성 CNS 림프종, 자궁경부암, 담관암종, 척색종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수증식성 신생물, 결장직장암, 두개인두종, 피부 T-세포 림프종, 관내 상피암종, 배아 종양, 자궁내막암(자궁암), 상의세포종, 식도암, 유두신경모세포종(두경부암), 유잉 육종(뼈암), 두개외 생식세포 종양, 생식선외 생식세포 종양, 안구암, 소아 안구내 흑색종, 안구내 흑색종, 망막모세포종, 나팔관암, 뼈의 섬유성 조직구종, 악성 및 골육종, 담낭암, 위의(위)암, 위장 유암종 종양, 위장 간질 종양(GIST)(연조직 육종), 소아 위장 간질 종양, 생식 세포 종양, 소아 두개외 생식 세포 종양, 생식선 외 생식 세포 종양, 난소 생식 세포 종양, 고환암, 임신성 용모성 질환, 모양 세포 백혈병, 두경부암, 심장 종양, 간세포(간)암, 조직구증가증, 호지킨 림프종, 하인두암(두경부암), 안내 흑색종, 섬 세포 종양, 췌장 신경내분비 종양, 카포시 육종(연조직 육종), 신장(신장 세포)암, 랑게르한스 세포 조직구종, 후두암(두경부암), 백혈병, 입술 및 구강암(두경부암), 간암, 폐암(비소세포 및 소세포), 소아 폐암, 림프종, 남성 유방암, 뼈의 악성 섬유성 조직구종 및 골육종, 흑색종, 메르켈 세포 암종(피부암), 중피종, 잠복 원발성을 동반한 전이성 편평 경부암(두경부암), NUT 유전자 변화를 동반한 정중선 암종, 구강암(두경부암), 다발성 내분비 종양 증후군, 다발성 골수종/형질 세포 신생물, 균상식육종(림프종), 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 비강 및 부비동암(두경부암), 비인두암 암(두경부암), 신경모세포종, 비-호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 입 암, 입술 및 구강암 및 구인두암, 골육종 및 뼈의 악성 섬유성 조직구종, 난소암, 췌장암, 췌장 신경내분비 종양(섬 세포 종양), 유두종증, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암(두경부암), 크롬친화세포종, 형질 세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 임신 및 유방암, 원발성 중추신경계(CNS) 림프종, 원발성 복막암, 전립선암, 직장암, 재발성 암, 신장세포(신장)암, 망막모세포종, 횡문근육종, 소아기(연조직 육종), 타액선암(두경부암), 육종, 소아 횡문근육종(연조직 육종), 소아 혈관 종양(연조직 육종), 유잉 육종(뼈암), 카포시 육종(연조직 육종), 골육종(뼈암), 자궁 육종, 세자리 증후군, 림프종, 피부암, 소세포 폐암, 소형 장암, 연조직 육종, 피부의 편평 세포 암종, 편평경부암, 위장(위)암, T-세포 림프종, 고환암, 인후암(두경부암), 비인두암, 구인두암, 하인두암, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우 및 요관의 이행세포암, 신세포암, 요도암, 자궁 육종, 질암, 혈관 종양(연조직 육종), 외음부암, 윌름스 종양 및 기타 소아 신장 종양을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0245] 개시내용의 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 질환 또는 장애는 증식성 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 증식성 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시형태에서, 암은 DNA의 결실 또는 전좌에 기인한 2개의 유전자로부터 유래된 서열을 갖는 키메라 RNA를 생성하는 유전자 융합의 존재를 수반한다. 유전자 융합 쌍에는 다음이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다: MAN2A1 및 FER, DNAB1 및 PRKACA, BCR-ABL1, TMPRSS2 및 ERG, EWSR1 및 FLI1, PML 및 RARA, EML4 및 ALK, KIAA1549 및 BRAF, CCDC6 및 RET, SS18 및 SSX1, RUNX1 및 RUNX1T1, PAX3 및 FOXO1, NCOA4 및 RET, ETV6 및 RUNX1, FUS 및 DDIT3, SS18 및 SSX2, NPM1 및 ALK, KMT2A 및 AFF1, TCF3 및 PBX1, STIL 및 TAL1, COL1A1 및 PDGFB, CRTC1 및 MAML2, NAB2 및 STAT6, EWSR1 및 ATF1, ETV6 및 NTRK3, EWSR1 및 ERG, EWSR1 및 WT1, DNAB1 및 PRKACA, PAX7 및 FOXO1, FUS 및 CREB3L2, CBFA2T3 및 GLIS2, PAX8 및 PPARG, KMT2A 및 MLLT1, EWSR1 및 NR4A3, KMT2A 및 MLLT3,

ASPCR1 및 TFE3, HMGA2 및 LPP, JAZF1 및 SUZ12, KIF5B 및 RET, FUS 및 ERG, SLC45A3 및 ERG, NUP214 및 ABL1, SET 및 NUP214, CD74 및 ROS1, ETV6 및 ABL1, TPM3 및 NTRK1, PRKARIA 및 RET, EWSR1 및 CREB1, KMT2A 및 AFDN, EWSR1 및 DDIT3, CLTC 및 ALK, ETV6 및 PDGFRB, TPM3 및 ALK, KMT2A 및 MLLT10, TMPRSS2 및 ETV1, BRD4 및 NUTM1, NUP98 및 KDM5A, RANBP2 및 ALK, CTNNB1 및 PLAG1, KMT2A 및 ELL, TAF15 및 NR4A3, FGFR3 및 TACC3, PCMI 및 JAK2, YWHAE 및 NUTM2B, STRN 및 ALK, CRT3 및 MAML2, CDH11 및 USP6, CDKN2D 및 WDFY2, CIC 및 DUX4, SLC34A2 및 ROS1, ATIC 및 ALK, CD74 및 NRG1, MYB 및 NFIB, PRCC 및 TFE3, KIF5B 및 ALK, TMPRSS2 및 ETV4, KMT2A 및 SEPT9, EWSR1 및 POU5F1, FGFR1 및 PLAG1, MN1 및 ETV6, TBL1XR1 및 TP63, KMT2A 및 EPS15, SLC45A3 및 ELK4, DHH 및 RHEBL1, HEY1 및 NCOA2, EZR 및 ROS1, GOPC 및 ROS1, HMGA2 및 WIF1, KMT2A 및 CREBBP, SS18 및 SSX4B, FAM131B 및 BRAF, EWSR1 및 FEV, EWSR1 및 PBX1, TPM4 및 ALK, SND1 및 BRAF, ACTB 및 GLI1, KMT2A 및 KNL1, KMT2A 및 SEPT6, SDC4 및 ROS1, TFG 및 ALK, HNRNPA2B1 및 ETV1, PTPRK 및 RSPO3, JAZF1 및 PHF1, HMGA2 및 RAD51B, KMT2A 및 MLLT11, TPR 및 NTRK1, AKAP9 및 BRAF, FUS 및 CREB3L1, ETV6 및 JAK2, HMGA2 및 NFIB, KMT2A 및 AFF3, CHCHD7 및 PLAG1, VTIIA 및 TCF7L2, LIFR 및 PLAG1, EWSR1 및 ETV1, SRGAP3 및 RAF1, KMT2A 및 AFF4, MEAF6 및 PHF1, PAX3 및 NCOA1, HAS2 및 PLAG1, EWSR1 및 NFATC2, HIP1 및 ALK, GOLGA5 및 RET, BCR 및 JAK2, EWSR1 및 ETV4, DCTN1 및 ALK, MBTD1 및 CXorf67, NDRG1 및 ERG, CARS 및 ALK, SFPQ 및 TFE3, KMT2A 및 ARHGAP26, KMT2A 및 EP300, KMT2A 및 TET1, PAX5 및 JAK2, PPFIBP1 및 ALK, YWHAE 및 NUTM2A, LRIG3 및 ROS1, TFG 및 NTRK1, TPM3 및 ROS1, SLC45A3 및 ETV1, ERC1 및 RET, SEC16A 및 NOTCH1, KTN1 및 RET, SEC31A 및 JAK2, TCEA1 및 PLAG1, QKI 및 NTRK2, RNF130 및 BRAF, EIF3E 및 RSPO2, EWSR1 및 ZNF444, LMNA 및 NTRK1, PPFIBP1 및 ROS1, PWWP2A 및 ROS1, EWSR1 및 YY1, FUS 및 ATF1, PAX3 및 NCOA2, ZC3H7B 및 BCOR, BRD3 및 NUTM1, CANT1 및 ETV4, CIC 및 FOXO4, COL1A1 및 USP6, EWSR1 및 ZNF384, KMT2A 및 ABI1, KMT2A 및 ACTN4, KMT2A 및 CEP170B, KMT2A 및 FOXO3, KMT2A 및 GAS7, KMT2A 및 MLLT6, KMT2A 및 SEPT2, KMT2A 및 SEPT5, MSN 및 ALK, VCL 및 ALK, EZR 및 ERBB4, RELCH 및 RET, SLC3A2 및 NRG1, TRIM24 및 BRAF, KLC1 및 ALK, ARID1A 및 MAST2, GPBP1L1 및 MAST2, NFIX 및 MAST1, NOTCH1 및 GABBR2, TADA2A 및 MAST1, ZNF700 및 MAST1, TRIM24 및 RET, TRIM33 및 RET, SSBP2 및 JAK2, KMT2A 및 EEFSEC, CLCN6 및 BRAF, GNAI1 및 BRAF, MKRN1 및 BRAF, NACC2 및 NTRK2, FGFR1 및 TACC1, TRIM27 및 RET, HMGA2 및 FHIT, HOOK3 및 RET, PCMI 및 RET, CEP89 및 BRAF, CLIP1 및 ROS1, ERC1 및 ROS1, HLA 및 A 및 ROS1, LSM14A 및 BRAF, MYO5A 및 ROS1, SHTN1 및 ROS1, TP53 및 NTRK1, TPM3 및 ROS1, ZCCHC8 및 ROS1, FGFR3 및 BAIAP2L1, KLK2 및 ETV1, ACSL3 및 ETV1, NUP107 및 LGR5, HMGA2 및 CCNB1IP1, HMGA2 및 COX6C, GATM 및 BRAF, HAC1 및 RAF1, HERPUD1 및 BRAF, ZSCAN30 및 BRAF, SLC45A3 및 BRAF, HMGA2 및 LHFPL6, COL1A2 및 PLAG1, ESRP1 및 RAF1, IRF2BP2 및 CDX1, TFG 및 NR4A3, CLTC 및 TFE3, EWSR1 및 MYB, NONO 및 TFE3, FCHSD1 및 BRAF, HMGA2 및 EBF1, ACBD6 및 RRP15, AGPAT5 및 MCPH1, AGTRAP 및 BRAF, ARFIP1 및 FHDC1, ATG4C 및 FBXO38, BBS9 및 PKD1L1, CENPK 및 KMT2A, CNBP 및 USP6, DDX5 및 ETV4, EIF3K 및 CYP39A1, EPC1 및 PHF1, ERO1A 및 FERMT2, ETV6 및 ITPR2, EWSR1 및 NFATC1, EWSR1 및 PATZ1, EWSR1 및 SMARCA5, EWSR1 및 SP3, FBXL18 및 RNF216, FGFR1 및 ZNF703, FN1 및 ALK, FUS 및 FEV, GMD5 및 PDE8B, HMGA2 및 ALDH2, IL6R 및 ATP8B2, INTS4 및 GAB2, JPT1 및 USH1G, KLK2 및 ETV4, KMT2A 및 ABI2, KMT2A 및 ARHGEF12, KMT2A 및 BTBD18, KMT2A 및 CASP8AP2, KMT2A 및 CBL, KMT2A 및 CIP2A, KMT2A 및 CT45A2, KMT2A 및 DAB2IP, KMT2A 및 FOXO4, KMT2A 및 FRYL, KMT2A 및 GMPs, KMT2A 및 GPHN, KMT2A 및 LASP1, KMT2A 및 LPP, KMT2A 및 MAPRE1, KMT2A 및 MYO1F, KMT2A 및 NCKIPSD, KMT2A 및 NRIP3, KMT2A 및 PDS5A, KMT2A 및 PICALM, KMT2A 및 PRRC1, KMT2A 및 SARNP, KMT2A 및 SH3GL1, KMT2A 및 SORBS2, KMT2A 및 TOP3A, KMT2A 및 ZFYVE19, MBOAT2 및 PRKCE, MIA2 및 GEMIN2, NF1 및 ASIC2, NFIA 및 EHF, NTN1 및 ACLY, OMD 및 USP6, PLA2R1 및 RBMS1, PLXND1 및 TMCC1, RAF1 및 DAZL, RBM14 및 PACS1, RGS22 및 SYCP1, SEC31A 및 ALK, SEPT8 및 AFF4, SLC22A1 및 CUTA, SLC26A6 및 PRKAR2A, SLC45A3 및 ETV5, SQSTM1 및 ALK, SS18L1 및 SSX1, SSH2 및 SUZ12, SUSD1 및 PTBP3, TCF12 및 NR4A3, TECTA 및 TBCEL, THRAP3 및 USP6, TMPRSS2 및 ETV5, TPR 및 ALK, UBE2L3 및 KRAS, WDCP 및 ALK, SS18 및 USP6.

[0246] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 질환 또는 장애를 갖는 것으로 진단되었다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 질환 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 대상체는 질환 또는 장애를 전개할 위험을 예측하는 바이오마커를 갖는다. 일부 실시형태에서, 바이오마커는 유전적 돌연변이이다.

[0247] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 대상체는 여성이다. 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 남성이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 2개의 XX 또는 XY 염색체를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 2개의 XX 또는 XY 염색체와 세 번째 염색체인 X 또는 Y를 갖는다.

[0248] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 신생아, 유아, 어린이, 성인, 연장자 또는 노인이

다. 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 적어도 약 1일, 적어도 약 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 적어도 약 29일, 적어도 약 30일, 또는 적어도 약 31일령이다. 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 11개월, 또는 적어도 약 12개월령이다. 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 적어도 약 1세, 적어도 약 2세, 적어도 약 3세, 적어도 약 4세, 적어도 약 5세, 적어도 약 6세, 적어도 약 7세, 적어도 약 8세, 적어도 약 9세, 적어도 약 10세, 적어도 약 15세, 적어도 약 20세, 적어도 약 25세, 적어도 약 30세, 적어도 약 35세, 적어도 약 40세, 적어도 약 45세, 적어도 약 50세, 적어도 약 55세, 적어도 약 60세, 적어도 약 65세, 적어도 약 70세, 적어도 약 75세, 적어도 약 80세, 적어도 약 85세, 적어도 약 90세, 적어도 약 95세, 적어도 약 100세 또는 임의의 수의 연령 또는 나이 사이의 일부 연령이다.

[0249] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 포유동물이다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 비-인간 포유동물이다.

[0250] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 대상체는 인간이다.

[0251] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 단일 용량의 개시내용의 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 개시내용의 조성물의 적어도 1회 용량을 포함하는 치료적으로 유효한 양을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 개시내용의 조성물의 하나 이상의 용량(들)을 포함하는 치료적으로 유효한 양을 포함한다.

[0252] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애의 징후 또는 증상을 제거한다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애의 징후 또는 증상의 중증도를 감소시킨다.

[0253] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애를 제거한다.

[0254] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애의 발병을 예방한다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애의 발병을 지연시킨다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 질환 또는 장애의 징후 또는 증상의 중증도를 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 치료적으로 유효한 양은 대상체에 대한 예후를 개선시킨다.

[0255] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 대상체에게 전신으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 정맥내 경로에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 주사 또는 주입에 의해 대상체에게 투여된다.

[0256] 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 대상체에게 국소적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 골내, 안구내, 뇌척수내 또는 척수내 경로에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 중추신경계의 뇌척수액에 직접적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 눈의 조직 또는 체액에 직접적으로 투여되고 눈 구조의 외부에서는 생체이용가능성을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 개시내용의 조성물은 주사 또는 주입에 의해 대상체에게 투여된다.

[0257] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물은 약학적 조성물로 제형화된다. 간략하게, 본 명세서에 개시된 바와 같이 사용하기 위한 약학적 조성물은 선택적으로 또한 면역 직교인 AAV에 선택적으로 포함되는 융합 단백질(들) 또는 융합 단백질(들)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등과 같은 완충액; 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 항산화제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 개시내용의 조성물은 경구, 정맥내, 국소, 장내, 안구내 및/또는 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물은 정맥내 투여용으로 제형화된다.

[0258] 번호가 매겨진 실시형태

- [0259] 특정 양태에서, 다음의 실시형태가 본 명세서에 개시되어 있다:
- [0260] 1. (a) 작동가능하게 연결된 치료적 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인, 및 (d) RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함하는, RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물.
- [0261] 2. 조작된 소형 핵 RNA 분자 및 RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물로서, (a) 작동가능하게 연결된 치료적 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인을 포함하는, 조성물.
- [0262] 3. 실시형태 2에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 RNA 공여체 분자 내의 서열에 상보적인 모티프를 함유하고 여기서 모티프는 다음 서열: 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3' 중 하나인, 조성물.
- [0263] 4. 실시형태 2에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 5' 말단에서 시작하여 RNA 공여체 분자에서의 서열에 상보적이고 인간 U1 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열이 이어지는 서열로 구성되는, 조성물.
- [0264] 5. 실시형태 2에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 5' 말단에서 시작하여 RNA 공여체 분자에서의 서열에 상보적이고 인간 snRNA 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열이 이어지는 서열로 구성되는, 조성물.
- [0265] 6. 실시형태 2에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA는 5' 말단에서 시작하여 합성되거나 인간 U1 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열, 이어서 RNA 공여체 분자에서의 서열에 상보적이고 인간 snRNA 유전자로부터 유래되거나 단리된 또 다른 서열이 이어지는 서열로 구성되는, 조성물.
- [0266] 7. 실시형태 2에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA는 5' 말단에서 시작하여 인간 U1 유전자로부터 유래되거나 단리되고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 상보적인 서열이 이어지는 서열로 구성되는, 조성물.
- [0267] 8. 실시형태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 대체 도메인은 GLB1(GM1 신경절증); GBA(고세병); GM2A(GM2 gangliosidosis); PCSK9, LDLR, APOB, APOE(가족성 고콜레스테롤혈증); GAA(포페병); MYOC, OPTN, TBK1, WDR36, CYP1B1(개방각 녹내장); IDS(헌터 증후군 또는 뮤코다당증 2); IDUA(헨리 증후군 또는 뮤코다당류증 1); CLN3(바텐병); F9(혈우병 B); F8(혈우병 A), LAMP2(다논병); GLA(파브리병); SLC2A1(글루코스 수송체 결핍 유형 1); UBE3A(엔젤만 증후군); MYOC, OPTN, TBK1, WDR36, CYP1B1(개방각 녹내장); IDUA(헨리 증후군 또는 뮤코다당류증 1); IDS(헌터 증후군 또는 뮤코다당증 2); CLN3(바텐병); LMNA(사지근이영양증 유형 1B); DMD(뒤시엔 근이영양증); DYSF(사지근이영양증 유형 2B); SGCB(사지근이영양증 유형 2E); SGCG(사지근이영양증 유형 2C); SGCA(사지근이영양증 유형 2D); SGCD(사지근이영양증 유형 2F); DUX4, D4Z4(안면건갑상완 근이영양증); USHA2A, RPGR, RP2, RHO, PRPF31, USH1F, PRPF3, PRPF6(색소성 망막염)으로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래되거나 단리되는, 조성물.
- [0268] 9. 실시형태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 대체 도메인은 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사-후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE) 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 선택된 발현-증강 서열로부터 유래되거나 단리되는, 조성물.
- [0269] 10. 실시형태 1-9 중 어느 하나에 있어서, 안티센스 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 인간 유전자로부터 유래되거나 단리된 서열에 상보적인, 조성물: TNFRSF13B (공통 가변성 면역 결핍증), ADA, CECR1 (아데노신 데아미나제 결핍증), IL2RG (X-연관 중증 복합 면역결핍증), HBB (베타-지중해혈증), HBA1, HBA2 (알파-지중해혈증), U2AF1 (골수이형성증후군), SOD1, TARDBP, FUS, MATR3, SOD1, C9ORF72 (근위축성 측삭 경화증), MAPT, PGRN (파킨슨증을 동반한 전두측두엽 치매), CDH23, MYO7A, USH2A (어서 증후군), GALC (크라베병), SMPD1, NPC1, NPC2 (니만픽병), PRNP (프리온 질환), SCN1A (드라베 증후군), PINK1, ATPGAP2 (조기 발병 파킨슨병), ATXN1, ATXN2, ATXN3, PLEKHG4, SPTBN2, CACNA1A, ATXN7, TTBK2, PPP2R2B, KCNC3, PRKCG, ITRP1, TBP, KCND1, FGF14 (척수소뇌실조증), SCN1A, SCN2A, CACNA1A, GRIN2B, GRIN2A, MECP2, FOXG1, SLC6A1, PRRT2, PTEN, KCNQ2, KCNQ3, STARD7, CLRN1 (유전성 간질 장애), ATM (운동실조증-모세혈관확장증), GLB1 (GM1 신경절증), GBA (고세병), GM2A (GM2 신경절증), UBE3A (엔젤만 증후군), SLC2A1 (글루코스 수송체 결핍 1형), LAMP2 (다논병), GLA (파브리병), PKD1, PKD2 (삼염색체 우성 다낭성 신장 질환), GAA (포페병), PCSK9, LDLR, APOB, APOE (가족성 고콜레스테롤혈증), MYOC, OPTN, TBK1, WDR36, CYP1B1 (개방각 녹내장), IDUA (헨리 증후군 또는

뮤코다당증 1), IDS (헌터 증후군 또는 뮤코다당증 2), CLN3 (바텐병), DMD (뒤시엔 근이영양증), LMNA (사지근이영양증 유형 1B), DYSF (사지근이영양증 유형 2B), SGCA (사지근이영양증 유형 2D), SGCB (사지근이영양증 유형 2E), SGCG (사지근이영양증 유형 2C), SGCD (사지근이영양증 유형 2F), DUX4, D4Z4 (안면건갑상완 근이영양증), F9 (혈우병 B), F8 (혈우병 A), USHA2A, RPGR, RP2, RHO, PRPF31, USH1F, PRPF3, PRPF6 (색소성 망막염), CFTR (낭포성 섬유증), GJB2, GJB6, STRC, DFNA1, DFNA14 (상염색체 우성 청각 장애), POU3F3 (비증후군성 청력 상실).

- [0270] 11. 실시형태 1-10 중 어느 하나에 있어서, RNA 공여체 분자는 RNA 공여체 분자 및/또는 esnRNA의 국소화, 가공 또는 전달을 변경하는 미번역된 영역을 포함하는, 조성물.
- [0271] 12. 실시형태 1-2 중 어느 하나에 있어서, RNA 공여체 분자 및/또는 esnRNA를 포함하는 서열은 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질에 의해 결합되는 서열을 포함하는, 조성물.
- [0272] 13. 실시형태 1-12 중 어느 하나에 있어서, RNA 공여체 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라인, 조성물.
- [0273] 14. 실시형태 1-13 중 어느 하나에 있어서, RNA 공여체 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0274] 15. 실시형태 1-14 중 어느 하나에 있어서, esnRNA는 이중 프로모터를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0275] 16. 실시형태 15 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 전달 RNA(tRNA)의 발현을 구동할 수 있는 프로모터로부터 단리되거나 유래되는, 조성물.
- [0276] 17. 표적 RNA 분자와 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물.
- [0277] 18. 표적 RNA 분자와 RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA를 포함하는 조성물로서, RNA 공여체 분자는 (a) 작동가능하게 연결된 치료 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인을 포함하는, 조성물.
- [0278] 19. 실시형태 17-18에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래되는, 조성물.
- [0279] 20. 실시형태 19에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 합성이고 스플라이세오솜의 구성요소에 결합하는, 조성물.
- [0280] 21. 실시형태 17-20에 있어서, 인간 소형 핵 RNA 유전자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [0281] 22. 실시형태 17-21에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 유전자의 변이체로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0282] 23. 실시형태 17-22에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 변이체로부터 유래되거나 단리되고 RNA 공여체 분자와 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 5' 말단으로부터 16개 미만의 핵염기로 시작하는 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.
- [0283] 24. 실시형태 17-23에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 RNA 공여체 분자에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.
- [0284] 25. 실시형태 24에 있어서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGCTCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [0285] 26. 실시형태 17-25에 있어서, RNA 공여체 분자는 길이가 적어도 4개의 뉴클레오티드이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.
- [0286] 27. 실시형태 17-26에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0287] 28. 실시형태 17-27에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.

- [0288] 29. 실시형태 17-28에 있어서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0289] 30. 실시형태 29에 있어서, 번역-증강 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터의 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE) 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0290] 31. 실시형태 17-30에 있어서, RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0291] 32. 실시형태 17-31에 있어서, RNA 공여체 분자 및 소형 핵 RNA 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산 유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라인, 조성물.
- [0292] 33. (a) 작동가능하게 연결된 치료 서열을 인코딩하는 하나 이상의 대체 도메인; (b) 대체 도메인의 RNA 스플라이싱을 촉진하는 하나 이상의 인트론 도메인; 및 (c) 표적 RNA 분자에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 안티센스 도메인; 및 (d) RNA 공여체 분자의 트랜스-스플라이싱을 촉진하는 조작된 소형 핵 RNA 도메인을 포함하는, RNA 공여체 분자를 포함하는 조성물.
- [0293] 34. 실시형태 33에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 분자는 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래되는, 조성물.
- [0294] 35. 실시형태 33 또는 34에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 소형 핵 RNA 유전자로부터 단리되거나 유래되는, 조성물.
- [0295] 36. 실시형태 33-35에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 합성이고 스플라이세오솜의 구성요소에 결합하는, 조성물.
- [0296] 37. 실시형태 33-36에 있어서, 인간 소형 핵 RNA 유전자는 U1, U2, U4, U5, U6, U7, U11 및 U12로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [0297] 38. 실시형태 37에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 유전자의 변이체로부터 단리되거나 유래된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0298] 39. 실시형태 37에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 인간 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0299] 40. 실시형태 39에 있어서, 조작된 소형 핵 RNA 도메인은 RNA 공여체 분자에서의 스플라이스 공여체 부위로부터 200 미만의 염기로 떨어져 위치되는, 조성물.
- [0300] 41. 실시형태 40에 있어서, RNA 모티프는 5'-CGAGCTCTCT-3', 5'-AACGAGTCCT-3', 5'-CGCAACGAGC-3', 5'-TATCGCAACG-3', 5'-AATAATATCG-3', 5'-TAAGAGAGCT-3', 5'-AAGAGAGCTC-3', 5'-AGAGAGCTCGTTGC-3', 5'-GAGAGCTCGT-3', 5'-AGAGCTCGTTGCGA-3', 및 5'-GAGCTCGTTG-3'으로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [0301] 42. 실시형태 33-41에 있어서, RNA 공여체 분자는 길이가 적어도 4개의 뉴클레오티드이고 RNA 공여체 분자에서의 서열에 부분적으로 또는 완벽하게 상보적인 RNA 모티프를 함유하는, 조성물.
- [0302] 43. 실시형태 33-42에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 또는 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0303] 44. 실시형태 33-43에 있어서, 조작된 소형 RNA 분자는 U1 소형 핵 RNA 유전자 및 U1 소형 핵 RNA 유전자의 변이체로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0304] 45. 실시형태 44에 있어서, RNA 공여체 분자는 번역을 증강시키는 미번역된 영역을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0305] 46. 실시형태 45에 있어서, 번역-증강 요소는 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사후 조절 요소(WPRE), MALAT1로부터의 삼중체, B형 간염 바이러스의 PRE(HPRE) 및 철 반응 요소로 구성된 군으로부터 유래되거나 단리된 서열을 포함하는, 조성물.
- [0306] 47. 실시형태 17-46에 있어서, RNA 공여체 분자와 표적 RNA 분자 사이의 상호작용을 강화하고 트랜스-스플라이싱 효율성을 증가시키는 RNA-결합 단백질을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0307] 48. 실시형태 17-47에 있어서, RNA 공여체 분자 및 소형 핵 RNA 분자는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, 핵산

유사체, 화학적으로-변형된 핵산, 또는 2개 이상의 핵산 또는 핵산 유사체로 구성된 키메라인, 조성물.

- [0308] 49. 실시형태 17-48에 있어서, 핵산 분자는 이중 프로모터를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0309] 50. 실시형태 17-49의 조성물을 포함하는 벡터.
- [0310] 51. 실시형태 50에 있어서, 벡터는 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 나노입자, 미셀, 리포솜, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 및 덴드리머로 구성된 군으로부터 선택되는, 벡터.
- [0311] 52. 실시형태 51의 벡터를 포함하는 세포.
- [0312] 53. 실시형태 17 또는 실시형태 18에 따른 RNA 공여체 분자 및 조작된 소형 핵 RNA 분자를 포함하는 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법.
- [0313] 54. 실시형태 17-49에 따른 RNA 공여체 분자 및 조작된 소형 핵 RNA 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서의 유전적 결함을 교정하는 방법.
- [0314] 55. 실시형태 17-49에 따른 RNA 공여체 분자를 포함하는 치료의 치료적으로 유효한 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법.
- [0315] 56. 실시형태 17-49에 따른 RNA 공여체 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 대상체에서의 유전적 결함을 교정하는 방법.

[0316] 정의

- [0317] 용어 "적어도", "초과", 또는 "이상"이 일련의 2개 이상의 수치 값 내 첫 번째 수치 값 앞에 올 때마다, 용어 "적어도", "초과", 또는 "이상"은 그 일련의 수치 값 내 각각의 수치 값에 적용된다. 예를 들어, 1, 2 또는 3 이상은 1 이상, 2 이상, 또는 3 이상과 동등하다.
- [0318] 용어 "최대", "미만", 또는 "이하"가 일련의 2개 이상의 수치 값 내 첫 번째 수치 값 앞에 올 때마다, 용어 "최대", "미만", 또는 "이하"는 그 일련의 수치 값 내 각각의 수치 값에 적용된다. 예를 들어, 3, 2 또는 1 이하는 3 이하, 2 이하, 또는 1 이하와 동등하다.
- [0319] 본 명세서에 사용된 용어 "커플링된"은 2개 이상의 원자 또는 분자 사이의 약하거나 강한 상호작용을 지칭할 수 있다. 상호작용은 하나 이상의 분자에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 매개될 수 있다.

[0320] 실시예

- [0321] 다음 실시예는 예시적 목적으로만 포함되고 발명의 범주를 제한하려는 의도는 아니다.

[0322] 실시예 1: 조작된 소형 핵 RNA의 식별

- [0323] 본 연구는 RNA 트랜스-스플라이싱의 맥락에서 변형된 소형 핵 RNA의 활성을 평가한다. 먼저, 8개의 조작된 소형 핵 RNA가 RNA 공여체 분자에 상보적인 다양한 서열을 함유할 때 RNA 공여체 분자의 RNA-트랜스-스플라이싱의 효율성을 증가시킬 수 있는지 여부를 평가했다(도 6a-6b). 이들 변이체 RNA 공여체 분자는 RNA 공여체 분자와의 성공적인 트랜스-스플라이싱 후에만 형광을 발하는 분할 GFP 리포터를 표적화한다(도 4a-4d, 5a-5d). 이 검정은 완전히 정량적이지는 않은, 정성적이지만 세포 생물학의 최종-사용자가 RNA의 존재, 부재 또는 일반적인 크기에 대한 과학적 질문에 대답하려고 할 때 자주 사용하는 것이기 때문에 유용하다. 따라서, GFP 트랜스-스플라이싱 리포터는 RNA 트랜스-스플라이싱 기술의 연구에 널리 사용되어 왔다. GFP 리포터를 사용하여 트랜스-스플라이싱 반응의 효율성에 대한 다양한 트랜스-스플라이싱 인핸서 서열의 상대적 영향을 비교했다.

- [0324] 도 6a-6b에 기술된 데이터를 수집하기 위한 실험은 리포터 플라스미드, RNA 공여체(또한 CMV 프로모터에 의해 구동되는 플라스미드에 인코딩됨) 및 esnRNA(플라스미드에 인코딩되고 네이티브 U1 프로모터에 의해 구동됨)인, 3가지 일시적으로-형질감염된 구성요소로 수행되었다. esnRNA는 인간 U1 snRNA로부터 유래되고 RNA 공여체 분자 내의 다양한 서열에 완벽하게 상보적인 10-14개의 염기 길이 영역을 담지하는 변형된 5' 말단을 담지한다. 인간 세포주 HEK293T를 5% CO₂에서, 37도씨에서 유지하고 각 웰에 300,000개 세포로 24-웰 플레이트에 도말했다. 제조업체의 지시에 따라 Lipofectamine 3000(Invitrogen)으로 상기 플라스미드로 세포를 형질감염시켰으며 여기서 형질감염된 총 플라스미드의 1/5은 리포터, 1/5은 RNA 공여체 플라스미드, 2/5는 esnRNA 플라스미드, 1/5은 mCherry의 발현을 구동하는 CMV 프로모터를 인코딩하는 형질감염 대조 플라스미드였다. mCherry 대조의 목적은 GFP 리포터에 의해 생성된 신호를 정규화하는 수단을 제공하는 것이다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고 Sony Spectral Analyser로 형광-활성화된 세포 분류를 사용하여 형광 측정을 실시했다. mCherry 신호에 대해 양

성인 세포를 식별한 다음 이 모집단에 대해 평균 GFP 및 mCherry 신호를 평가했다. GFP 신호를 mCherry 신호로 정규화하고 결과는 도 6a-6b에 보고되었다. 다양한 상보적 서열을 가진 대부분의 esnRNA는 미변형된 U1 snRNA (야생형 또는 "wt" esnRNA)에 비해 GFP 신호에서 눈에 띄는 증가를 생성하지 않는다. 도 6a-6b에 사용된 esnRNA의 전체 서열은 다음과 같다, esnRNA A:

[0325] GCTCTCTTACGcaggggagataccatgatcacgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA B:

[0326] CGAGCTCTTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA C:

[0327] AACGAGCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA D:

[0328] CGCAACGAGCgaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA E:

[0329] TATCGCAACGcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA F:

[0330] AATAATATCGcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
atgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtca
tatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccata
ggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA G:

[0331] atCTCTCTTACCTCggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
aatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtc
atatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccat
aggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA H:

[0332] atAGCTCTTACCTCggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaa
aatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtc
atatcttttttgttttggtttggcttggctttaaagttaatacctacagtggagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccat
aggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag. 도 6에 사용된 리포터는 CMV 프로모
터, 인간 COL17A1 유전자의 엑손 81, 인간 COL17A1 유전자의 인트론 81 및 acGFP의 C-말단 부분(127개 아미노
산 잔기)을 함유한다(5'에서 3' 방향). 이 리포터의 서열은 다음과 같다:

[0333] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
GATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCAGGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGA
CCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACCTCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCT
CTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACC
GAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCAAGCTTGGTGGTCATGGAGACCCTGGACCCTGGTGCCCCGgtgagtgaccagggaaactgcctg
gtgagggtctggaagggtcggataggcatctggccacagctgatgagccaggccttctctgtgttaatacctgagccctgttccctgcccttgacccttttc
tctGGATCCTTTTCCCTCCAGGTGAAGTTCGAGGGCGATACCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAGGAGGATGGCAACATCCTGGGC

AATAAGATGGAGTACAACACTACAACGCCACAAATGTGTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAATGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAATACCCCATCGGCGATGGCCCTGTGCTGCTGCCCATAACCACTACCTGTCCACCCAGAGCGCC
CTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATCTACTTCGGCTTCGTGACCGCCGCCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGTGA.

[0334]

다음으로 도 6a-6b에서 식별된 esnRNA가 다른 리포터 시스템의 맥락에서 고충실도 RNA 트랜스-스플라이싱을 촉진할 수 있는지 여부를 평가했다(도 7). 도 6a에서는 인간 COL17A1 유전자로부터의 서열과 관련된 리포터가 사용되었고, 반면에 도 7에서는 인간 SCN1A로부터의 서열이 리포터에 사용되었다. 따라서, 이들 2개의 표적 간의 성공적인 트랜스-스플라이싱은 이 방법이 많은 표적을 해결하기 위해 광범위하게 적용될 수 있음을 나타낸다. RNA 공여체 분자의 성공적인 트랜스-스플라이싱 후에만 형광을 발하는 분할 GFP 리포터와 관련된 유사한 검정을 사용했다(도 5a-5d).

[0335]

도 7에 기술된 데이터를 수집하기 위한 실험은 리포터 플라스미드, RNA 공여체(또한 CMV 프로모터에 의해 구동되는 플라스미드에 인코딩됨) 및 esnRNA B(플라스미드에 인코딩되고 네이티브 U1 프로모터에 의해 구동됨)인, 3가지 일시적으로-형질감염된 구성요소로 수행되었다. 인간 세포주 HEK293T를 5% CO2에서, 37도씨에서 유지하고 각 웰에 300,000개 세포로 24-웰 플레이트에 도말했다. 제조업체의 지시에 따라 Lipofectamine 3000(Invitrogen)으로 상기 플라스미드로 세포를 형질감염시켰으며 여기서 형질감염된 총 플라스미드의 1/5은 리포터, 1/5은 RNA 공여체 플라스미드, 2/5은 esnRNA 플라스미드, 1/5은 mCherry의 발현을 구동하는 CMV 프로모터를 인코딩하는 형질감염 대조 플라스미드였다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고 RNaseasy 키트(Qiagen)를 사용하여 세포로부터 RNA를 추출했다. 다음으로, 세포에 DNase(TurboDNase, Thermo)를 처리하고 역전사(Superscript III, Thermo)를 실시하였다. 다음으로, cDNA는 다음 프라이머를 사용하여 시스-스플라이싱된 및 트랜스-스플라이싱된 리포터 생성물 둘 모두를 증폭하는 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭되었다: 정방향: TAATACGACTCACTATAGGGAGACCC 및 역방향: CTCCATCTTATTGCCAGGA. 이들 PCR 생성물을 TOPO-TA 벡터(Thermo) 안으로 클로닝하고 Sanger 방법에 의해 서열분석했다. 서열분석 결과는 전체-길이 GFP로 정렬되었으며(도 7) 완벽하거나 거의-완벽한 정렬을 갖는 클론은 도 7에서 비교되었다. 전체-길이는 25개 클론 중 4개가 전체 길이 GFP를 생성하는 esnRNA의 존재에서만 관찰되었다(24개의 클론 중 0개는 esnRNA의 부재에서 전체 길이 GFP를 생성했다). 도 7에 사용된 리포터는 CMV 프로모터, 인간 SCN1A1 유전자의 엑손 15, 인간 SCN1A 유전자의 인트론 15, 및 acGFP의 C-말단 부분(127개 아미노산 잔기)을 함유한다(5'에서 3' 방향). 이 리포터의 서열은 다음과 같다:

[0336]

GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCATTGACGTCATGGGAGTTTGTGTTGG
CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT
CTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTA
CCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCAAGCTTCTCCGAGTGTTCAAGTTGGCAAAGTCTGGCCCACTGAATATGCTCATTAAAGTCAT
TGGTAACTCGGTGGGAGCACTGGGCAACCTGACTCTGGTGTGGCCATCATTGTCTTTATTTTGGCCGTGGTGGCATGCAGCTGTTTGGAAAAAGTTACAA
AGATTGTGTCTGCAAAATTGCCACTGACTGCAAACTCCACGTTGGCACATGAACGACTTCTTCCACTCGTTCCTGATCGTGTCCGCGTGTGTGTGGGA
GTGGATAGAGACCATGTGGGACTGCATGGAGGTGGCAGGACAAGCTATGTGCCTTACTGTCTTCATGATGGTCATGGTGATTGGGAACCTTGTGgtatgtac
ccaagtttagatatgcatttcagaaatacatcaataacataacaaatttgtgccaatttattaaaaaatgactttcatgataaataattttaaagtcctctg
atcttaagatatgtttatcttcttattctaaaaatataccgaacatggcaagtatagatcacaaatctactatggtaatatagaatacatctttaaaca
aatgtatgcacattaatattacatgatattttactctcaaatccatattttacagctctattttttaagacaaggtttctttctgtatccctggctgtc
ctggaacttgctctgtagatctagctgggcttgaactcagagatccactgcctctccatcccaagtaacttggtatgaagtgtatgtgccactggcttctc
aactctattttatcagtcacttcattgcatttagttattaaattgcataggactgttaaaaattacacaaatagtattgtgcgtgtgtttgtgtgtgat
gtctatgtgtgcgtgtgcatgtgagggagaaaggggcaattttgtctatagaatagtgtcaacaagaatggccatgcatatgttgaagactttcattcta
aatttgggtcatgactatgattttttcagttatcatccaacaacacaaatcatgaagagagaaaacccaaaatacatttaataaataatttgcaaatatta
atcatttttaaatttggaattgttaaagtatctcagtaaatatatctcttttactcatataatattaataataatgataaactaatcattcaagttcttc
atttcatgtatgggagatcttgagagcagtagaaagaatgcctcatgtacatagagatggagcaatcacaaattcagagtgtctcaaaacttttctagggc
ggagtgttgaaccaggggcctcatgttttctggctctggccacttaacttctagcaatgcctgtgtgtatcttgcctcatatagcatcgggttatctatc
tatagctaaaggaataagccatcctatgtcctctgtgtgtgtgtgaacacatacttatgtctgttttcaagGTCAGTTCGAGGGCGATACCTGGTGAATC
GCATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAGGAGGATGGCAACATCCTGGCAATAAGATGGAGTACAACACAACGCCACAATGTGTACATCATGACCGACA
AGGCCAAGAATGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAATACCCCATCGGCG
ATGGCCCTGTGCTGCTGCCCATAACCACTACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATCTACTTCGGCTTCG
TGACCGCCGCCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGTGA

[0337]

다음으로 RNA 공여체와 표적 RNA 사이의 증가된 트랜스-스플라이싱 효율성을 위해 esnRNA의 특정한 특성이 필요
한지 여부를 평가했다. 도 6에서 식별된 esnRNA(esnRNA B)를 시작으로, 특정 스플라이세오솜 구성요소와 상호작

용하는 esnRNA의 결실되고 돌연변이된 다양한 부분이 결실되거나 돌연변이되었다(도 8b). 구체적으로, 스플라이세오솜 구성요소와 상호작용하는 다양한 줄기-루프 구조는 아데노신의 반복적인 트랙으로 돌연변이되거나 결실되었다. 도 8a에 보고된 이들 데이터는 트랜스-스플라이싱 활성의 관찰된 증강을 위해 esnRNA에 의한 스플라이세오솜의 동원이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0338] 도 8a에 기술된 데이터를 수집하기 위한 실험은 리포터 플라스미드, RNA 공여체(또한 CMV 프로모터에 의해 구동되는 플라스미드에 인코딩됨) 및 esnRNA B(플라스미드에 인코딩되고 네이티브 U1 프로모터에 의해 구동됨)인, 3가지 일시적으로-형질감염된 구성요소로 수행되었다. 야생형 인간 U1 snRNA의 다양한 특징을 결하는 esnRNA B의 변이체를 비교했다. 인간 세포주 HEK293T를 5% CO2에서, 37도씨에서 유지하고 각 웰에 300,000개 세포로 24-웰 플레이트에 도말했다. 제조업체의 지시에 따라 Lipofectamine 3000(Invitrogen)으로 상기 플라스미드로 세포를 형질감염시켰으며 여기서 형질감염된 총 플라스미드의 1/5은 리포터, 1/5은 RNA 공여체 플라스미드, 2/5는 esnRNA 플라스미드, 1/5은 mCherry의 발현을 구동하는 CMV 프로모터를 인코딩하는 형질감염 대조 플라스미드였다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고 Sony Spectral Analyser로 형광-활성화된 세포 분류를 사용하여 형광 측정을 실시했다. mCherry 신호에 대해 양성인 세포를 식별한 다음 이 모집단에 대해 평균 GFP 및 mCherry 신호를 평가했다. GFP 신호는 mCherry 신호로 정규화하였고 결과는 도 8에 보고되었다. 결실 또는 돌연변이 줄기-루프 1, 2 또는 4는 GFP 신호에서의 급격한 감소를 초래했다. 이 결과는 스플라이세오솜 구성요소의 동원이 esnRNA가 RNA 공여체와 표적 RNA 사이의 트랜스-스플라이싱을 증가시키는 메커니즘일 가능성이 있음을 나타낸다. 도 8a-8b에 사용된 esnRNA의 전체 서열은 다음과 같다: esnRNA B:

[0339] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtggtgggactgcgttcgcgctttccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtggttgcgctttaaattgttaattcctacagtgagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag; esnRNA "mSL4":

[0340] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtggtgggactgcgttcgcgcttAAAAAtgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtggttgcgctttaaattgttaattcctacagtgagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag, esnRNA "-SL4":

[0341] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtggtgggactgcgttcgcgcttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtggttgcgctttaaattgttaattcctacagtgagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag, esnRNA "-SL1, -SL2":

[0342] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTggtggttttccagggcgaggcttatatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtggtgggactgcgttcgcgctttccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtggttgcgctttaaattgttaattcctacagtgagggtgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgctcag. 도 8a에 사용된 리포터는 CMV 프로모터, 인간 COL17A1 유전자의 엑손 81, 인간 COL17A1 유전자의 인트론 81 및 acGFP의 C-말단 부분(127개 아미노산 잔기)을 함유한다(5'에서 3' 방향). 서열은 상기에 나열되어 있다.

[0343] 다음으로 효율적인 트랜스-스플라이싱을 유도하는데 필요한 esnRNA와 RNA 공여체 분자 사이의 역상보성의 정도를 평가했다. 도 6a-8b는 esnRNA에 의한 RNA 공여체의 인식 및 스플라이세오솜 인자의 동원이 RNA 공여체와 표적 RNA 사이의 효율적인 트랜스-스플라이싱을 유도하기 위해 필요하다는 것을 나타내지만, 다음으로 RNA 공여체 분자와 esnRNA B의 역상보성을 감소시키는 것이 또한 트랜스-스플라이싱 효율성을 또한 감소시키는지 여부를 조사하였다. esnRNA B에는 리포터와 상보적인 10개의 뉴클레오타이드 서열이 함유되어 있다. 리포터에 상보적인 9개의 뉴클레오타이드, 4개의 뉴클레오타이드 및 2개의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 esnRNA B의 순차적 돌연변이가 만들어졌다(도 9b). 실제로, 역상보성의 정도를 감소시키는 것은 트랜스-스플라이싱 활성도 동시에 감소시킨다(도 9a). 이 결과는 트랜스-스플라이싱 활성을 증가시키기 위해서는 RNA 공여체 분자에 대한 esnRNA 분자의 회합이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0344] 도 9a-9b에 기술된 데이터를 수집하기 위한 실험은 리포터 플라스미드, RNA 공여체(또한 CMV 프로모터에 의해 구동되는 플라스미드에 인코딩됨) 및 esnRNA B 또는 다양한 돌연변이체(플라스미드에 인코딩되고 네이티브 U1 프로모터에 의해 구동됨)인, 3가지 일시적으로-형질감염된 구성요소로 수행되었다. 인간 세포주 HEK293T를 5% CO2에서, 37도씨에서 유지하고 각 웰에 300,000개 세포로 24-웰 플레이트에 도말했다. 제조업체의 지시에 따라

Lipofectamine 3000(Invitrogen)으로 상기 플라스미드로 세포를 형질감염시켰으며 여기서 형질감염된 총 플라스미드의 1/5은 리포터, 1/5은 RNA 공여체 플라스미드, 2/5은 esnRNA 플라스미드, 1/5은 mCherry의 발현을 구동하는 CMV 프로모터를 인코딩하는 형질감염 대조 플라스미드였다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고 Sony Spectral Analyser로 형광-활성화된 세포 분류를 사용하여 형광 측정을 실시했다. mCherry 신호에 대해 양성인 세포를 식별한 다음 이 모집단에 대해 평균 GFP 및 mCherry 신호를 평가했다. GFP 신호는 mCherry 신호로 정규화하고 결과는 도 9a에 보고되었다. 도 9a에 사용된 esnRNA의 전체 서열은 다음과 같다: esnRNA B:

[0345] CGAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtgcgtttaaattgttaactcctacagtgaggggctgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgcctcag, esnRNA 9b:

[0346] GAGCTCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtgcgtttaaattgttaactcctacagtgaggggctgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgcctcag esnRNA 4b:

[0347] aagaaaCTCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtgcgtttaaattgttaactcctacagtgaggggctgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgcctcag esnRNA 2b:

[0348] aagaaaaCTgcaggggagataccaTGATCAcgaaggtggttttcccagggcgaggcttatccattgcactccggatgtgctgacccctgcgatttccccaaatgtgggaaactcgactgcataatttggtagtgggggactgcgttcgcgctttcccctgactttctggagtttcaaaagtagactgtacgctaagggtcatatcttttttgttttggtttgtgtcttggtagtgcgtttaaattgttaactcctacagtgaggggctgcggaataggaagtaacatgtcgctgcacgccataggagaaaaagcgagcatcagccgtatcggtttgtaacacaaattagctatcgtgaagtcgcctcag. 도 9에 사용된 리포터는 CMV 프로모터, 인간 COL17A1 유전자의 엑손 81, 인간 COL17A1 유전자의 인트론 81 및 acGFP의 C-말단 부분(127개 아미노산 잔기)을 함유한다(5'에서 3' 방향). 서열은 상기에 나열되어 있다.

[0349] **실시예 2: 특정 표적 RNA의 번역을 증가시키기 위한 esnRNA 및 RNA 공여체 분자의 사용**

[0350] RNA 내의 특정 돌연변이된 서열을 비-돌연변이된 서열로 대체하는 것 외에도, 표적 mRNA 분자에 대한 또 다른 유용한 작업은 mRNA에 의해 생산되는 단백질을 증가시키는 것이다. 특정 mRNA로부터 불충분한 단백질 생산의 이 문제를 해결하려는 많은 시도가 있었지만 각 접근 방식에는 큰 단점이 있다. 실제로, 정지 코돈 판독을 촉진하여 번역을 증가시키는 소분자 약물은 비-표적 mRNA에 대한 판독의 촉진으로 인해 광범위한 표적-외를 겪는다. 더욱이, 조기-성숙 정지 코돈은 단백질 수준이 부족한 많은 원인 중 하나일 뿐이다. 조기-성숙 종결 코돈을 차단하기 위해 조작된 tRNA는 이 동일한 근본적인 문제를 겪고 있다(WO 2018/161032 A1). 대조적으로, RNA 트랜스-스플라이싱 시스템은 임의의 표적 mRNA에서의 서열을 번역-증폭 서열로 대체하여 단백질 생산을 증가시킬 수 있다. 인트론 트랜스-스플라이싱 증강 서열(트랜스-스플라이싱 인핸서 서열)에 의해 매개되는 효율적인 RNA 트랜스-스플라이싱은 특정 mRNA로부터 단백질 생산의 표적화된 증폭을 촉진하는 수단에 대한 오랫동안 느꼈지만 충족되지 않은 이 요구를 해결할 수 있다.

[0351] 근긴장성 이영양증은 스플라이싱 인자 MBNL1에 결합하는 반복적인 'CUG' 트랙을 담지하는 RNA에 의해 야기된다. 그 전형적인 표적에서 벗어나 MBNL1의 적정은 RNA 대체 스플라이싱의 광범위한 기능장애를 야기하고 환자에서 질환 발현 대부분의 원인이 된다. 효율적인 RNA 트랜스-스플라이싱 접근법으로 MBNL1 단백질을 생산을 증가시키면 대체 스플라이싱 조절에서 그 전형적인 활성을 재구성하기에 충분한 MBNL1 단백질의 생산을 통해 이 질환을 해결할 수 있다.

[0352] 특정 mRNA로부터 단백질 생산을 증가시키기 위한 트랜스-스플라이싱 인핸서 서열을 함유하는 RNA 트랜스-스플라이싱 시스템의 능력을 평가하기 위해, 다양한 시스-스플라이싱 인핸서 서열 및 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사-후 조절 요소(WPRE)를 담지하는 RNA 트랜스-스플라이싱 시스템이 생성되었다. 반딧불이 루시퍼라제 코딩 서열과 MBNL1의 마지막 2개 엑손 및 개재 인트론을 함유하는 리포터가 생성되었다.

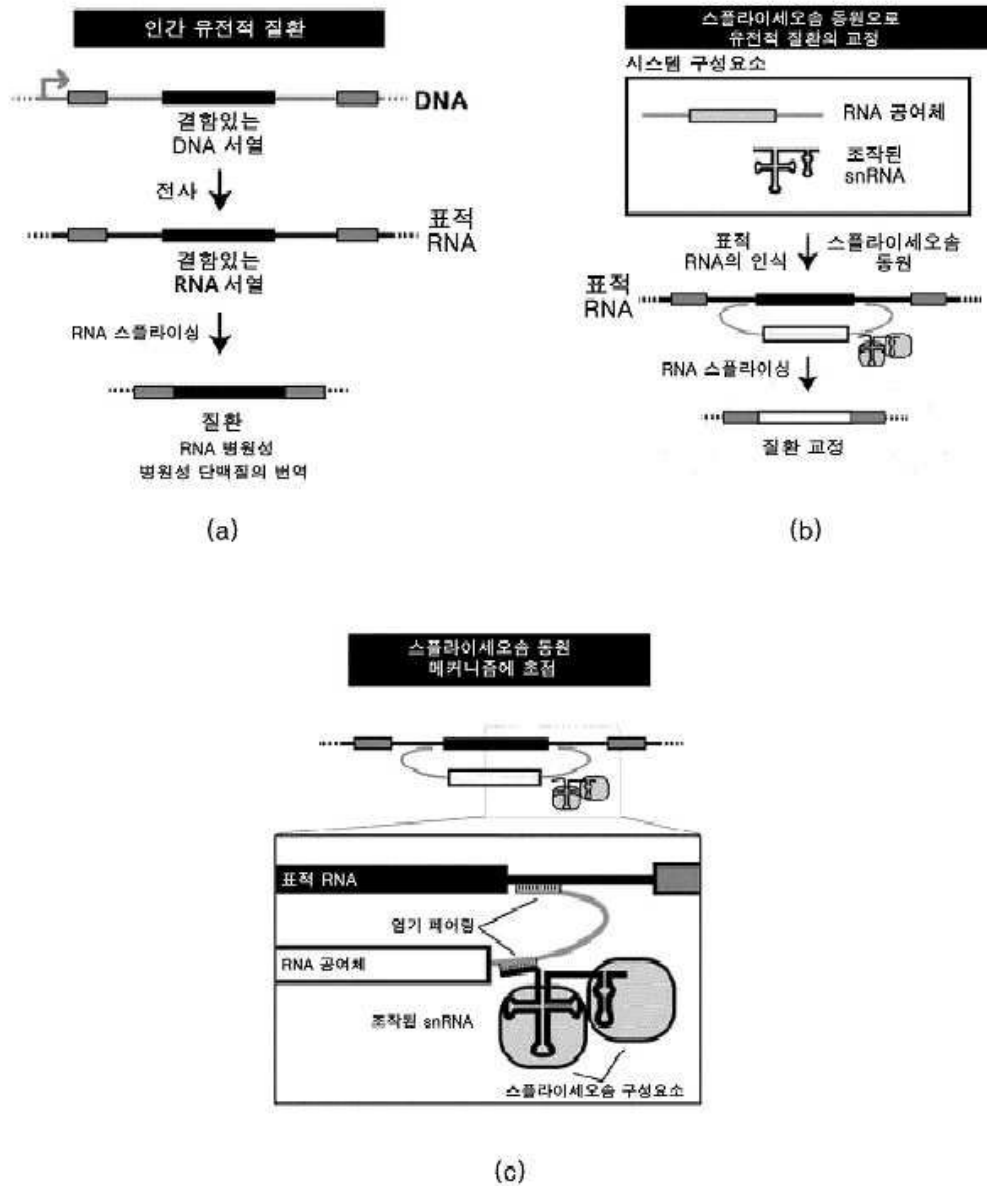
[0353] 실시예 1에 기술된 방법을 사용하여 일시적으로-형질감염된 리포터, RNA 공여체 및 esnRNA 또는 렌티바이러스에 패키징된 시스템으로 실험을 수행했다. 일부 번역-증강 3' 서열은 RNA 공여체 및 esnRNA 조합에 의해 생성된 GFP 리포터의 양을 증가시켰다. 결과는 도 10에 묘사되어 있다.

[0354]

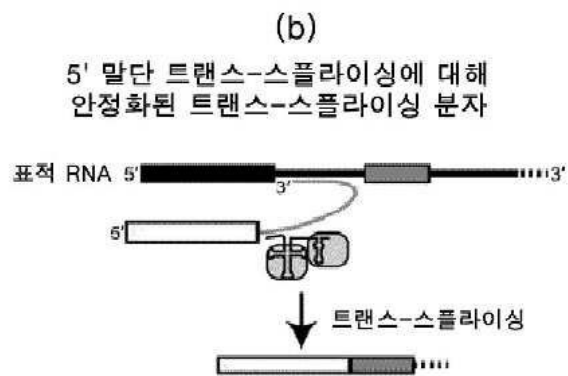
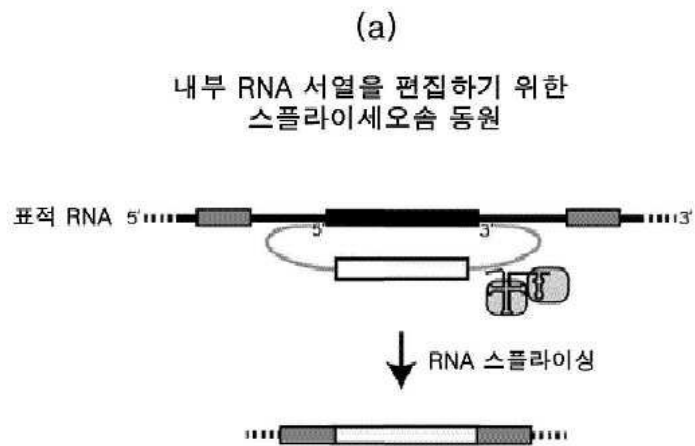
본 발명의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 도시되고 기술되었지만, 이러한 실시형태는 단지 예로서 제공된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 다양한 변경, 변화 및 대체가 발명을 벗어나지 않으면서 이제 당업자에게 발생할 것이다. 본 명세서에 기술된 발명의 실시형태에 대한 다양한 대안이 발명을 실시하는데 채용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 다음의 청구범위는 발명의 범주를 정의하고, 이들 청구범위 및 그 등가물의 범주 내의 방법 및 구조가 이에 의해 포괄되도록 의도된다.

도면

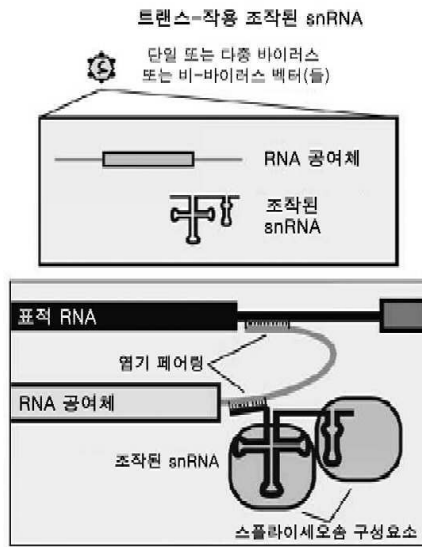
도면1



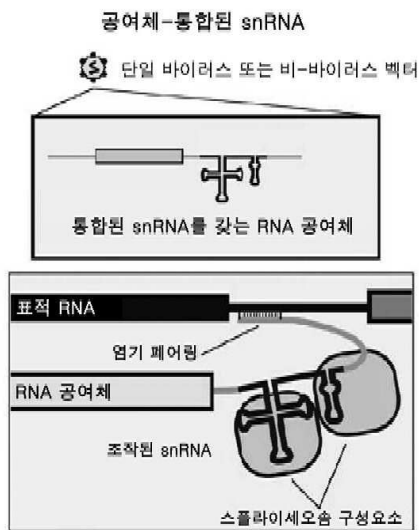
도면2



도면3

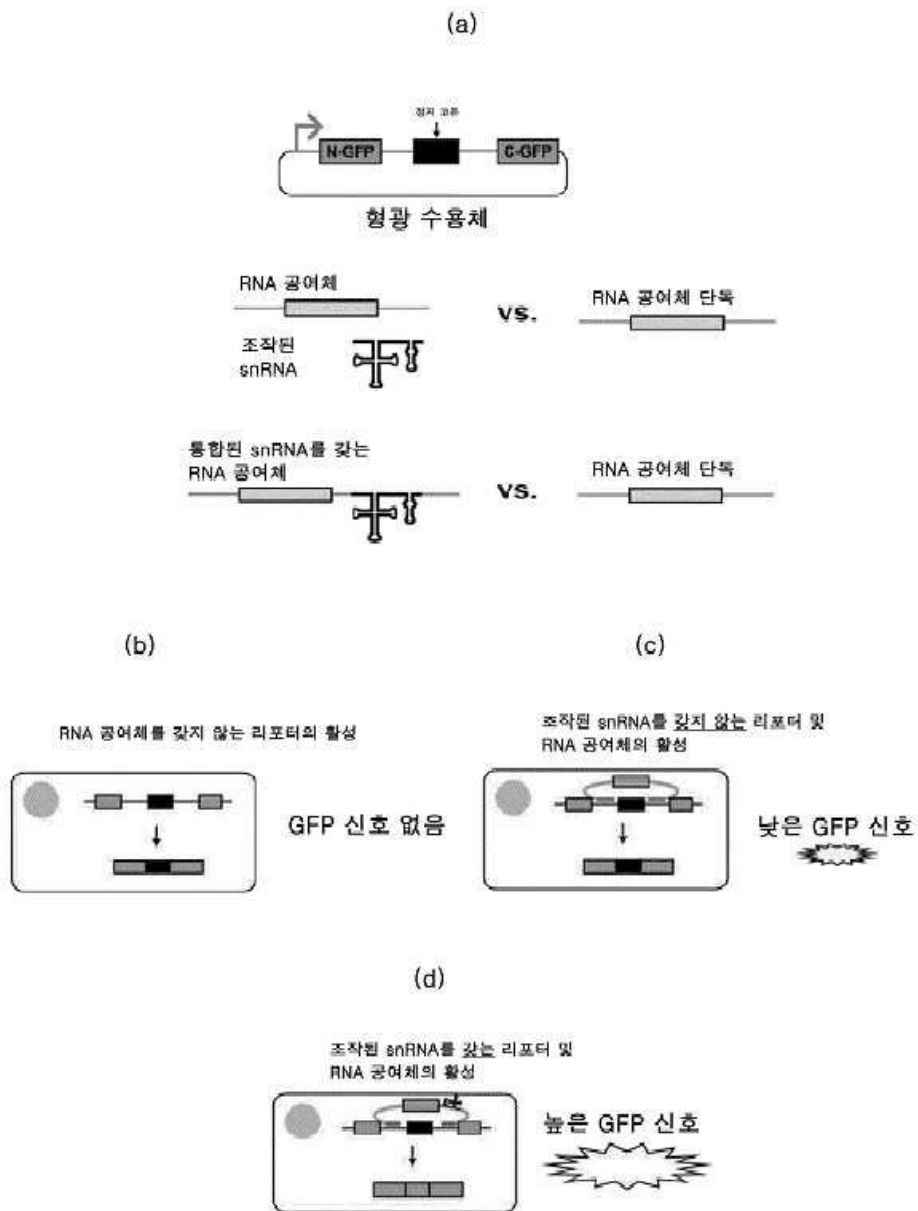


(a)

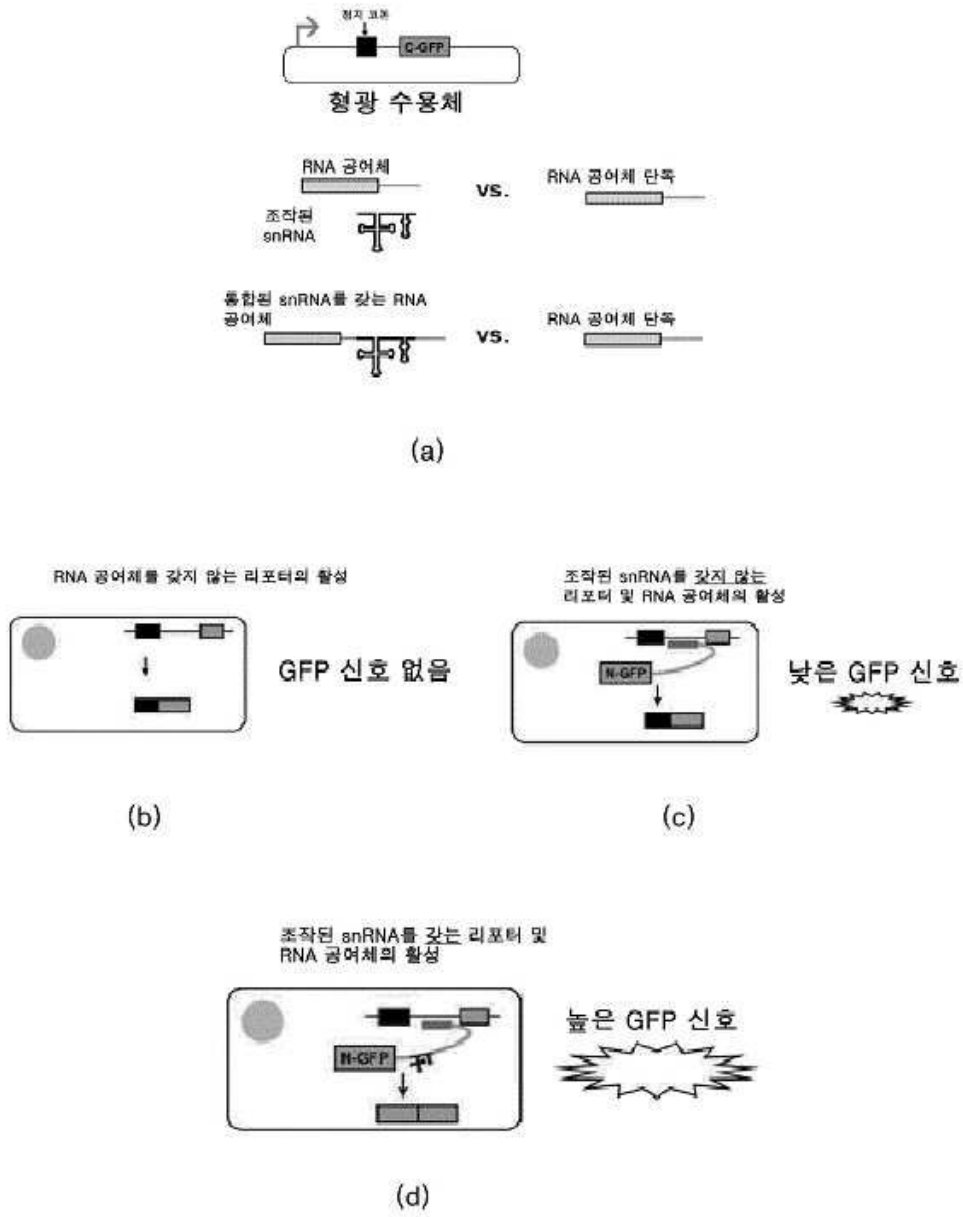


(b)

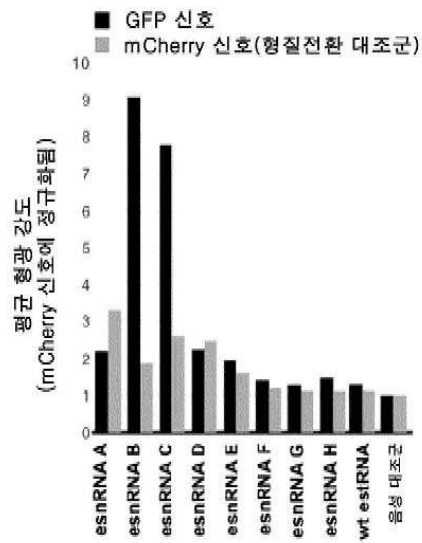
도면4



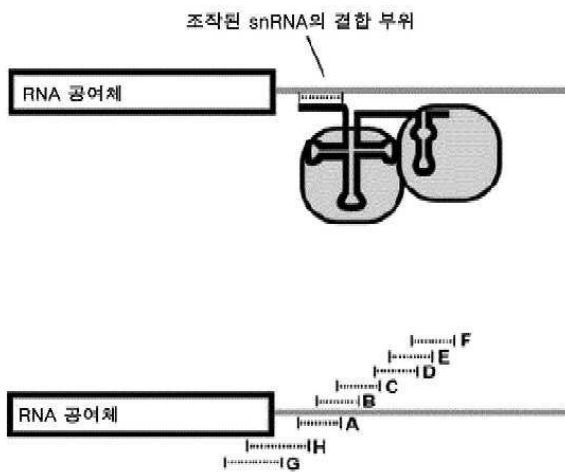
도면5



도면6

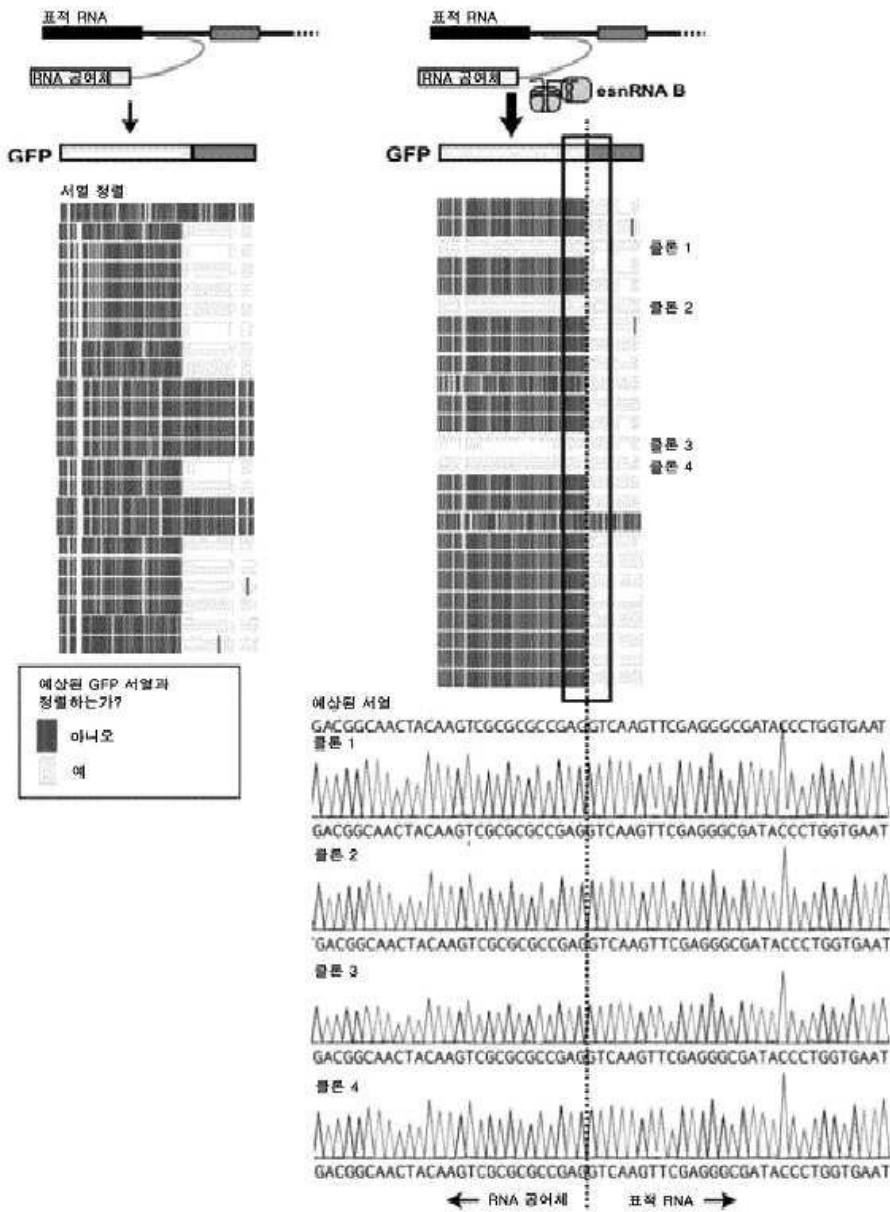


(a)

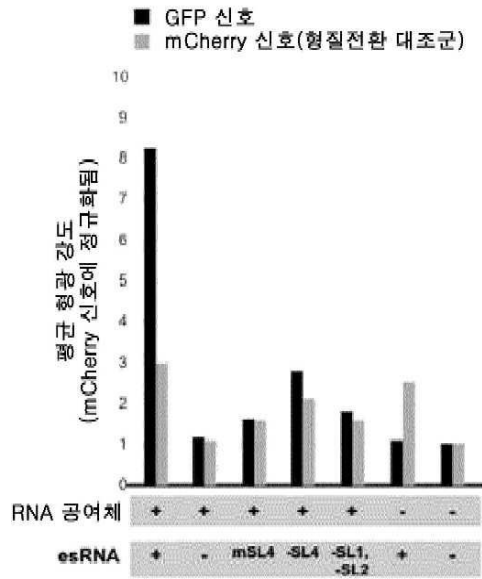


(b)

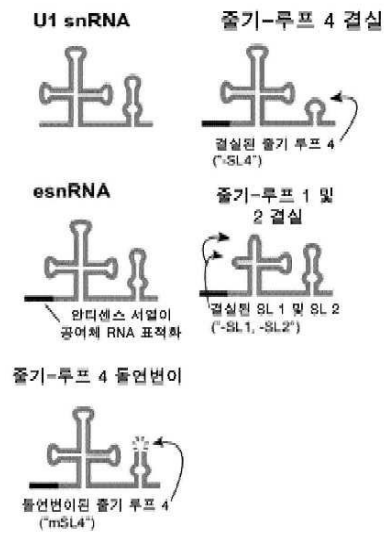
도면7



도면8

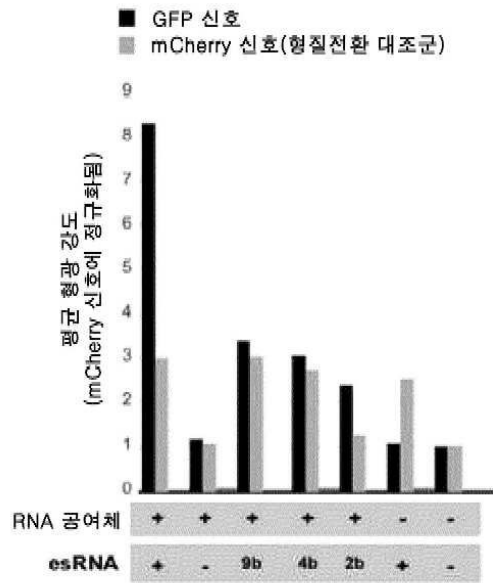


(a)

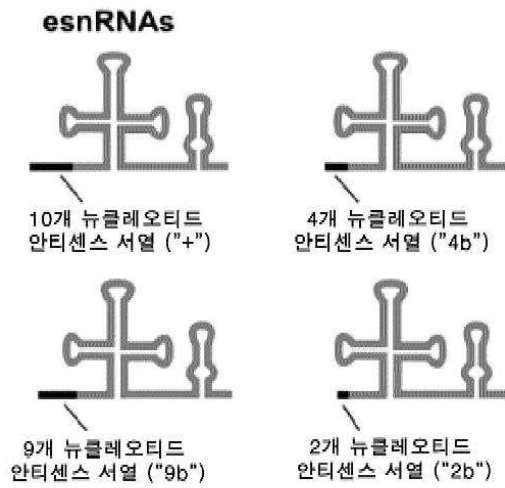


(b)

도면9

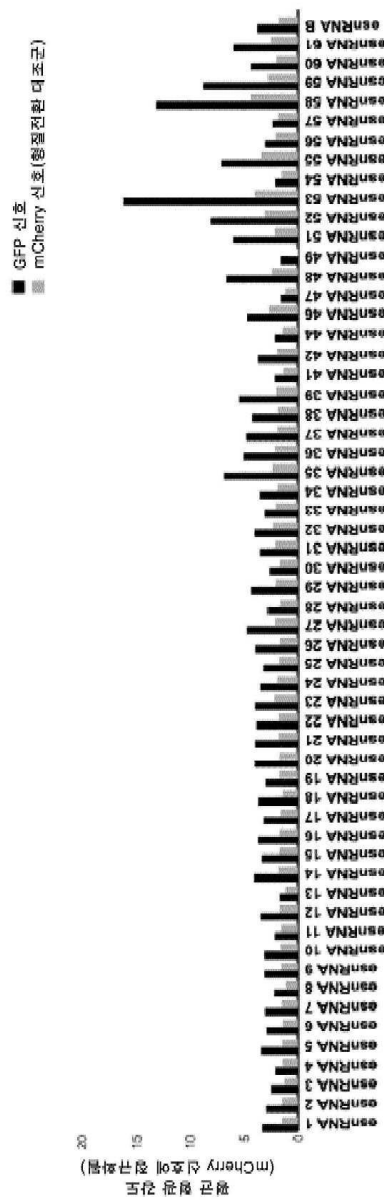


(a)



(b)

도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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