



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월02일

(11) 등록번호 10-2271675

(24) 등록일자 2021년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7010964

(22) 출원일자(국제) 2017년09월22일

심사청구일자 2020년09월22일

(85) 번역문제출일자 2019년04월17일

(65) 공개번호 10-2019-0053236

(43) 공개일자 2019년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/052902

(87) 국제공개번호 WO 2018/057855

국제공개일자 2018년03월29일

(30) 우선권주장

62/398,487 2016년09월22일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2017522005 A

WO2016102664 A1

(73) 특허권자

유니버시티 오브 매사추세츠

미국 매사추세츠주 02108 보스턴 31 플로어 원 비
컨 스트리트

(72) 발명자

필러, 크리스천

미국 01605 매사추세츠주 우스터 워터 스트리트
#305 48

아로닌, 닐

미국 02460 매사추세츠주 뉴턴빌 휘티어 로드 19

피스터, 에디트, 엘.

미국 01719 매사추세츠주 박스버러 힐 로드 214

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 22 항

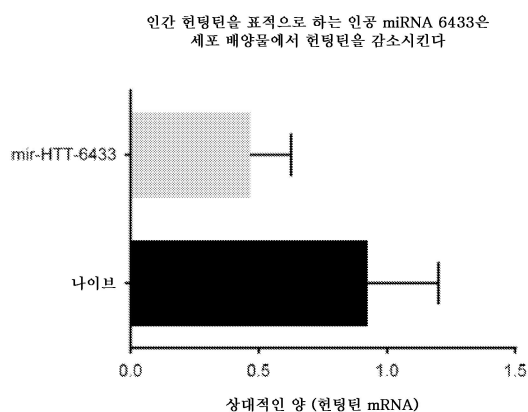
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 헌팅톤병의 AAV 치료

(57) 요약

본 개시내용의 측면들은 헌팅톤병을 치료하는 데에 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 헌팅틴 유전자 (HTT)를 표적으로 하는 간접 핵산 (예컨대 인공 miRNA), 및 그를 사용한 헌팅톤병의 치료 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/14 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/141 (2013.01)

C12N 2750/14141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산이며, 여기서 각각의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 핵산 서열은 서열식별번호: 7에 제시되어 있는 서열로 구성되고 이중 miRNA 백본 서열에 의해 플랭킹되어 있는 것인 단리된 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 이중 miRNA 백본 서열이 mir-155 백본 서열, mir-30 백본 서열 또는 mir-64 백본 서열인 단리된 핵산.

청구항 3

제1항에 있어서, 트랜스진이 프로모터를 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 4

제3항에 있어서, 프로모터가 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 U6 프로모터인 단리된 핵산.

청구항 5

제1항에 있어서, 트랜스진이 서열식별번호: 21 또는 22에 제시되어 있는 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산.

청구항 6

제1항에 있어서, 트랜스진에는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR) 또는 그의 변이체가 플랭킹되어 있는 것인 단리된 핵산.

청구항 7

제6항에 있어서, ITR 변이체에는 기능성 말단 분해 부위 (TRS)가 결핍되어 있는 것인 단리된 핵산.

청구항 8

제7항에 있어서, TRS가 결핍되어 있는 ITR 변이체가 Δ TRS ITR인 단리된 핵산.

청구항 9

하나 이상의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 벡터이며, 여기서 각각의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 핵산 서열은 서열식별번호: 7에 제시되어 있는 서열로 구성되고 이중 miRNA 백본 서열에 의해 플랭킹되어 있는 것인 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 플라스미드인 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 각각의 이중 miRNA 백본 서열이 mir-155 백본 서열, mir-30 백본 서열 또는 mir-64 백본 서열인 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서, 트랜스진이 프로모터를 포함하는 것인 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 프로모터가 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 U6 프로모터인 벡터.

청구항 14

제10항에 있어서, 트랜스진이 서열식별번호: 21 또는 22에 제시되어 있는 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 15

제10항에 있어서, 트랜스진에는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR) 또는 그의 변이체가 플랭킹되어 있는 것인 벡터.

청구항 16

제15항에 있어서, ITR 변이체에는 기능성 말단 분해 부위 (TRS)가 결핍되어 있는 것인 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, TRS가 결핍되어 있는 ITR 변이체가 Δ TRS ITR인 벡터.

청구항 18

(i) 캡시드 단백질; 및

(ii) 하나 이상의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산으로서, 여기서 각각의 성숙한 단일-가닥 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 핵산 서열은 서열식별번호: 7에 제시되어 있는 서열로 구성되고 이중 miRNA 백본 서열에 의해 플랭킹되어 있는 것인 단리된 핵산

을 포함하는 재조합 AAV (rAAV).

청구항 19

제18항에 있어서, 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 서열이 플랭킹되어 있는 것인 rAAV.

청구항 20

제18항에 있어서, 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 및 Δ TRS ITR이 플랭킹되어 있는 것인 rAAV.

청구항 21

제18항에 있어서, 캡시드 단백질이 AAV9 캡시드 단백질인 rAAV.

청구항 22

제21항에 있어서, 캡시드 단백질이 서열식별번호: 20에 제시되어 있는 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

[관련 출원]

본 출원은 발명의 명칭이 "AAV TREATMENT OF HUNTINGTON'S DISEASE"인 2016년 9월 22일자 U.S. 가출원 제 62/398,487호의 출원일에 대한 35 U.S.C. 119(e)하의 우선권을 주장하며, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[연방 후원 연구]

본 발명은 국립보건원(National Institutes of Health)에 의해 교부되는 NS038194하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 소정의 권리를 가진다.

배경 기술

헌팅톤병(Huntington's disease) (HD)은 헌팅틴(huntingtin) 유전자 엑손 1 CAG 반복 영역의 확장에 의해 야기되는 파괴적인 유전성 신경변성 질환이다. 헌팅틴 단백질(HTT)이 신체 전체에 걸쳐 발현되기는 하지만, 폴리글루타민 확장 단백질은 선조체의 중간 가시 뉴런(medium spiny neuron) 및 그의 피질 연결에 대하여 특히 독성이다. 환자들은 우울 및 불안을 포함한 정서적 증상 및 특징적인 운동 교란 및 무도병으로 고생한다. 현재 헌팅톤병에 대한 치료법은 존재하지 않으며; 치료 선택사항은 질환 증상을 개선하는 것에 제한된다.

발명의 내용

[발명의 개요]

본 개시내용의 측면들은 헌팅톤병 (HD)을 치료하는 데에 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서는, 인간 헌팅틴 (HTT)과 특이적으로 혼성화되어 그의 발현을 억제하는 억제성 핵산 (예컨대 인공 miRNA와 같은 miRNA)이 제공된다.

이에 따라, 일부 측면에서, 본 개시내용은 서열식별번호(SEQ ID NO): 2-10 또는 21-22 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함하거나 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 인간 헌팅틴은 서열식별번호: 1에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1의 적어도 2개 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 개)의 연속되는 염기에 대하여 상보성인 핵산 (예컨대 miRNA)을 제공한다.

일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다: 제1 아테노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체(inverted terminal repeat) (ITR), 또는 그의 변이체를 포함하는 제1 영역; 및 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 제2 영역. 일부 실시양태에서, 각 miRNA를 코딩하는 서열은 miRNA 백본 서열을 코딩하는 서열이 플랭킹되어 있는 서열식별번호: 2-10 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함한다.

일부 실시양태에서, 각 miRNA 백본 서열은 mir-155 백본 서열, mir-30 백본 서열 또는 mir-64 백본 서열이다.

일부 실시양태에서, 상기 트랜스진은 추가적으로 프로모터를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 U6 프로모터이다.

일부 실시양태에서, 트랜스진은 추가적으로 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 단백질은 치료용 단백질 (예컨대 비-돌연변이 헌팅틴) 또는 리포터 단백질 (예를 들면 형광 단백질 예컨대 GFP)이다.

일부 실시양태에서, 상기 하나 이상의 miRNA는 트랜스진의 비번역 부분에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 비번역 부분은 인트론이다. 일부 실시양태에서, 비번역 부분은 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 최종 코돈과 폴리-A 테일 서열 사이에 존재한다. 일부 실시양태에서, 비번역 부분은 프로모터 서열의 최종 핵산 염기와 폴리-A 테일 서열의 첫 번째 염기 사이에 존재한다.

일부 실시양태에서, 상기 단리된 핵산은 추가적으로 제2 아테노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR), 또는 그의 변이체를 포함하는 제3 영역을 포함한다.

일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 ITR 변이체에는 기능성인 말단 분해 부위(terminal resolution site) (TRS)

가 결핍되어 있으며, 임의적으로 이 경우 ITR 변이체는 Δ TRS ITR이다.

- [0016] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 miRNA는 인간 헌팅틴과 혼성화되어 그의 발현을 억제한다.
- [0017] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 의해 기술되는 바와 같은 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 플라스미드이다.
- [0018] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 의해 기술되는 바와 같은 단리된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0019] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 재조합 AAV (rAAV)를 제공한다: 캡시드 단백질; 및 본 개시내용에 의해 기술되는 바와 같은 단리된 핵산.
- [0020] 일부 실시양태에서, 상기 캡시드 단백질은 AAV9 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열 식별번호: 20에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 상기 rAAV는 자가-상보성(self-complementary) AAV (scAAV)이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, rAAV는 중추신경계 (CNS)에의 전달용으로 제제화된다.
- [0023] 본 개시내용의 측면들은 병원성 헌팅틴의 발현을 감소시킬 수 (예컨대 억제할 수) 있으며, 그에 따라 헌팅톤병의 치료에 유용할 수 있는 단리된 핵산에 관한 것이다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 그를 필요로 하는 대상체에서의 헌팅톤병의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 헌팅톤병에 걸려 있거나 그것이 발병할 위험이 있는 대상체에게 본 개시내용에 의해 기술되는 바와 같은 단리된 핵산 또는 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 36개를 초과하는 CAG 반복체, 40개를 초과하는 반복체 또는 100개를 초과하는 반복체를 가지는 헌팅틴 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연령 20세 미만이거나, 또는 청소년 HD에 걸린 것으로 진단되어 있다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 상기 투여는 대상체의 중추신경계 (CNS)에 대한 상기 단리된 핵산 또는 rAAV의 전달을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 투여는 주사, 임의적으로는 정맥내 주사 또는 선조체내 주사를 통한다.
- [0026] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 제공하며, 여기서 각 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 서열은 miRNA 백본 서열이 플랭킹되어 있는 서열식별번호: 7 또는 8에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 각 miRNA 백본 서열은 mir-155 백본 서열, mir-30 백본 서열 또는 mir-64 백본 서열이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 U6 프로모터이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 서열식별번호: 21 또는 22에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 트랜스진에는 아테노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR) 또는 그의 변이체가 플랭킹되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 ITR 변이체에는 기능성인 말단 분해 부위 (TRS)가 결핍되어 있다. 일부 실시양태에서, TRS가 결핍되어 있는 ITR 변이체는 Δ TRS ITR이다.
- [0031] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하며, 여기서 각 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 서열은 miRNA 백본 서열이 플랭킹되어 있는 서열식별번호: 7 또는 8에 제시되어 있는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드이다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 트랜스진의 각 miRNA 백본 서열은 mir-155 백본 서열, mir-30 백본 서열 또는 mir-64 백본 서열이다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터 또는 U6 프로모터이다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 서열식별번호: 21 또는 22에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 트랜스진에는 아테노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR) 또는 그의 변이체가 플랭킹되어 있다. 일부 실시양태에서, ITR 변이체에는 기능성인 말단 분해 부위 (TRS)가 결핍되어 있다. 일부

실시양태에서, TRS가 결핍되어 있는 ITR 변이체는 Δ TRS ITR이다.

- [0036] 일부 측면에서, 본 개시내용은 캡시드 단백질; 및 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 제조합 AAV (rAAV)를 제공하며, 여기서 각 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 서열은 miRNA 백본 서열이 플랭킹되어 있는 서열식별번호: 7 또는 8에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 서열이 플랭킹되어 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 및 Δ TRS ITR이 플랭킹되어 있다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV9 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 20에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0039] 일부 측면에서, 본 개시내용은 그를 필요로 하는 대상체에서의 헌팅톤병의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 헌팅톤병에 걸려 있거나 그것이 발병할 위험이 있는 대상체에게 본원에서 기술되는 바와 같은 rAAV (예컨대 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 rAAV)의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 각 miRNA를 코딩하는 트랜스진의 서열은 miRNA 백본 서열이 플랭킹되어 있는 서열식별번호: 7 또는 8에 제시되어 있는 서열을 포함한다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산의 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 서열이 플랭킹되어 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진에는 전체-길이 AAV ITR 및 Δ TRS ITR이 플랭킹되어 있다.
- [0041] 일부 실시양태에서, rAAV는 AAV9 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 대상체는 36개를 초과하는 CAG 반복체, 40개를 초과하는 반복체 또는 100개를 초과하는 반복체를 가지는 헌팅틴 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연령 20세 미만이다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 투여는 주사를 통한다. 일부 실시양태에서, 주사는 정맥내 주사 또는 선조체내 주사이다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 인간 헌팅틴을 표적으로 하는 mir-HTT-6433을 발현하는 플라스미드로 형질감염된 헬라(HeLa) 세포를 나타낸다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고, 정량 RT-PCR (qRT-PCR)용으로 RNA를 추출하였다. 결과는 mir-HTT-6433이 50 %까지 만큼 내생 인간 헌팅틴을 감소시킨다는 것을 표시한다.
- 도 2는 AAV9 벡터에 패키징되어 돌연변이 인간 헌팅틴을 발현하는 트랜스제닉 마우스 (Yac128 마우스)의 선조체에 직접 주사되는 mir-HTT-6433을 나타낸다. 주사 1개월-후, qRT-PCR에 의해 인간 헌팅틴 mRNA의 수준을 측정하였다. 하나의 동물 세트 (n=5)에서는, 주사된 측면에서 인간 헌팅틴의 수준을 비-주사 측면에서의 수준과 비교하였다. 주사된 측면에서 헌팅틴 mRNA의 상당한 (p=0.0017) 감소가 관찰되었다. 두 번째 동물 세트 (n=5/군)에서는, mir-HTT-6433이 주사된 동물에서 헌팅틴 mRNA의 수준을 비히클 단독 주사를 투여받은 동물과 비교하였다. 이러한 동물에서도 역시 헌팅틴의 상당한 감소 (p=0.0004)가 관찰되었다. 세 번째 동물 세트 (n=5/군)에서는, mir-HTT-6433이 주사된 동물에서 헌팅틴 mRNA의 수준을 AAV9-GFP가 주사된 것들과 비교하였다. 이러한 동물에서도 역시 헌팅틴 mRNA의 상당한 (p=0.0064) 감소가 존재하였다. 종합하면, 데이터는 mir-HTT-6433이 생체 내의 뇌에서 헌팅틴 mRNA를 50 %까지 감소시킨다는 것을 표시한다.
- 도 3은 AAV9-mir-HTT-6433 또는 PBS를 사용한 편측으로의 돌연변이 헌팅틴 (인간)을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 주사를 나타낸다. 주사 6개월-후, 평균대에서 마우스를 시험하였다. 데이터는 mir-HTT-6433으로 처리된 마우스가 PBS로 처리된 HD 마우스에 비해 평균대를 건너는 데에 걸리는 시간량의 감소를 나타낸다는 것을 표시한다.
- 도 4a-4c는 인간 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA가 세포 배양물 및 생체 내에서 헌팅틴 mRNA를 감소시킨다는 것을 보여준다. 도 4a는 인간 헌팅틴 mRNA상 표적 부위들의 위치를 나타낸다. 도 4b는 인간 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA를 발현하는 플라스미드로 형질감염된 헬라 세포를 나타내는데; 48시간 후 qPCR에 의해 헌팅틴 mRNA 수준을 측정하였다. 헌팅틴 발현은 세포 수에 있어서의 웰별 변이를 반영하기 위하여 HPRT에 대하여 정규화하고, 미처리/나이브 대조에 대비하여 나타내었다. 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다. 도 4c는 세포 배양물에서의 결과를 바탕으로 하여 생체내 시험용으로 선택된 후보 miRNA들을 나타낸다. 마우스의 선조체에 편측으로 주사하였다. 주사 1개월-후, 선조체를 수확하고, GFP 양성 조직을 절제 분리하였다. 데이터는 HPRT에 대하여 정규화하고, GFP-단독 대조에 대비하여 나타내었다.
- 도 5a-5c는 U6 프로모터로부터 인공 miRNA를 발현시키는 것이 마우스 선조체에서의 헌팅틴의 침묵화를 향상시키

지 않는다는 것을 보여준다. 도 5a는 CBA (polII) 및 U6 프로모터로부터 miRNA를 발현하는 AAV9 구성체에 관한 데이터를 나타낸다. CBA-프로모터 추진 miRNA는 GFP 유전자의 3'-UTR에 위치하는 반면, U6 프로모터 추진 인공 miRNA를 포함하는 구성체는 별도의 프로모터로부터 GFP를 공동-발현한다. 도 5b는 부위 5155 (좌측) 및 6433 (우측)을 표적으로 하는 U6 및 CBA-프로모터 추진 인공 miRNA의 주사 후 주사된 선조체에서의 헌팅틴 mRNA의 상대적인 양을 나타낸다. 데이터는 비-주사 측면에 대비하여 나타내었다. 도 5c는 부위 6433을 표적으로 하는 U6 및 CBA-프로모터 추진 miRNA가 편측으로 주사된 마우스에서의 헌팅틴 mRNA의 상대적인 양을 나타낸다. 데이터는 GFP-발현 대조 벡터가 주사된 마우스의 군에 대비하여 나타내었다.

도 6a-6b는 U6 프로모터로부터의 mir-HTT-6433의 장기 선조체 발현이 행동 이상을 야기한다는 것을 보여준다. 도 6a는 주사 6개월-후, U6-프로모터 추진 mir-HTT-6433이 주사된 마우스가 보금자리를 트는 데에 실패하였음을 보여준다. 사진은 케이지에 새로운 네슬렛(nestlet)을 위치시키고 24시간 후에 촬영되었다. 도 6b는 PBS, CBA-mir-HTT-6433 또는 U6-mir-HTT-6433으로 처리된 Yac128 마우스의 케이지 모니터링을 나타낸다. 24-27시간 동안, 케이지 주변으로 움직이면서 소요되는 시간량을 기록하였다. 시간 당 평균 시간은 총 시간량을 기록 시간 수로 나누는 것에 의해 계산하였다.

도 7a-7b는 U6 프로모터로부터의 mir-HTT-6433의 장기 발현이 선조체 수축을 야기한다는 것을 보여준다. 도 7a는 주사 1개월 (상단) 및 6개월 (하단)-후의 Yac128 마우스의 주사된 측면에서의 DARPP-32 염색의 대표적인 이미지를 나타낸다. 도 7b는 주사 6개월-후의 DARPP-32 양성 면적의 정량을 나타낸다.

도 8a-8d는 U6 프로모터로부터의 mir-HTT-6433의 장기 발현이 소교세포의 지속적인 활성화를 야기한다는 것을 보여준다. 도 8a는 주사 1개월 (상단) 및 6개월 (하단)-후의 Yac128 마우스의 주사된 측면에서의 Iba1 염색의 대표적인 이미지를 나타낸다. 이미지는 주사 측면에서 촬영되었다. 주사 6개월 후의 총 (도 8b), 활성화 (도 8c) 및 휴지 (도 8d) 소교세포의 정량을 나타내었다.

도 9a-9c는 U6 프로모터로부터의 mir155 기반 인공 miRNA의 발현이 헌팅틴 표적화 가이드 가닥 및 다른 서열의 과발현을 발생시킨다는 것을 보여준다. 도 9a는 관독의 개시 위치가 헌팅틴 표적화 인공 miRNA 헤어핀 (mir-155 백본)에 맵핑된다는 것을 보여준다. 위치는 성숙한 가닥에 대비하여 기록하였으며, 각 샘플에서 맵핑되는 내생 miRNA의 총 수에 대하여 관독치를 정규화하였다. 수평선은 대조 샘플에서 발견되는 인공 miRNA의 바탕 수준을 나타낸다. 도 9b는 정량 RT-PCR에 의한 성숙한 miR-HTT (mir-155 백본으로부터의 것)의 상대적 정량을 나타낸다. 도 9c는 관독의 개시 부분이 mir-30 백본에 삽입되어 U6 프로모터로부터 발현되는 헌팅틴 표적화 인공 miRNA에 맵핑된다는 것을 보여준다.

도 10a-10b는 mir-HTT-6433의 발현이 표적 부위를 가지는 mRNA를 우선적으로 감소시킨다는 것을 보여준다. 도 10a는 mRNA가 인공 miRNA 부위들 (범례)에 일치하는 정준(canonical) miRNA 결합을 포함하는 것들 및 없는 것들로 분할되었다는 것을 보여준다. AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스 군에서는, 그와 같은 부위가 있고 없는 mRNA들 사이에 차이가 없었다. 반면, 도 10b는 AAV-U6-mir-HTT-6433 군에서 완전한 8량체 부위를 가지는 mRNA의 발현쪽으로 이동이 있었음을 보여준다.

도 11a-11c는 벡터 투여량을 감소시키는 것이 마우스 선조체에서의 감소된 확산 및 녹다운을 발생시킨다는 것을 보여준다. 도 11a는 헌팅틴 표적화 인공 miRNA 및 EGFP 양자를 코딩하는 벡터가 주사된 마우스 선조체에서의 GFP 염색을 보여준다. GFP 양성인 선조체의 %를 측정하기 위하여, 이미지J가 사용되었다. 도 11b는 Yac128 마우스의 선조체에서 인간 헌팅틴 mRNA를 측정하는 정량 RT-PCR을 나타낸다. 도 11c는 3종의 서로 다른 투여량으로 헌팅틴 표적화 miRNA 및 EGFP 양자를 코딩하는 벡터가 주사된 마우스의 대표적인 사진을 나타낸다. 데이터는 벡터 투여량을 감소시키는 것이 감소된 확산 및 녹다운을 발생시킨다는 것을 표시한다.

도 12a-12b는 U6-프로모터 추진 헌팅틴 표적화 인공 miRNA의 주사 후, Yac128 마우스가 평균대를 건너는 능력의 감소를 나타낸다는 것을 표시하는 데이터를 나타낸다. 도 12a는 2-3개월에 주사된 마우스가 평균대를 건너는 시간의 분명한 증가를 나타내며, 그 중 일부는 완전히 건너는 데에 실패한다는 것을 보여준다. 도 12b는 7개월령에 PBS 또는 CBA-mir-HTT-6433 중 어느 하나가 주사된 Yac128 마우스가 평균대에서의 행동에 있어서 연령-관련 감소를 나타낸다는 것을 보여준다. U6-mir-HTT-6433 (적색 점)을 사용한 주사는 이와 같은 감소를 가속한다.

도 13a-13b는 C57BL/6 마우스가 U6-프로모터 추진 헌팅틴 표적화 인공 miRNA의 주사 후 평균대에서 최초의 행동 악화를 나타낸다는 것을 보여준다. 도 13a는 대조 (나이프) 마우스, 및 AAV-U6-mir-HTT-6433 및 AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스의 평균대를 건너는 데에 걸리는 시간량을 보여준다. 도 13b는 대조 (나이프)

마우스, 및 AAV-U6-mir-HTT-6433 및 AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스에서의 DARPP-32 양성 선조체 면적의 정량을 나타낸다.

도 14a-14b는 내생 miRNA의 분포가 mir-HTT-6433을 사용한 주사 후 거의 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다. 도 14a는 AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스에서의 분포를 보여주는데; mir-HTT-6433 가이드 및 패신저 가닥의 수준은 녹색으로 나타내었으며, 적색으로 나타낸 것은 모두 AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스에서 상당한 변화를 나타내는 내생 miRNA 종들이다. 도 14b는 AAV-U6-mir-HTT-6433이 주사된 마우스에서의 분포를 나타낸다.

도 15a-15c는 mir-HTT-6433으로 처리된 마우스에서의 mRNA 프로파일을 보여준다. 도 15a는 AAV-CbA-mir-HTT-6433이 주사된 마우스가 mRNA 발현에 있어서 거의 변화를 나타내지 않는다는 것을 보여주는데; 녹색으로 나타낸 것은 모두 상당한 p-값을 나타내는 유전자이며, 청색으로 나타낸 것은 다중 비교를 위한 조정 후 유의성 있게 유지되는 것들이다. 도 15b는 AAV-U6-mir-HTT-6433이 주사된 마우스가 CbA에 비해 mRNA 발현에 있어서 더 많은 변화를 나타낸다는 것을 보여준다. 도 15c는 mir-HTT-6433로 처리된 마우스에서의 mRNA 프로파일을 보여주는데; 7종의 RNA가 U6 및 CbA 처리 군 사이에서 상당히 차별적으로 발현되었다.

도 16은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 1개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 미상핵(middle caudate)에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 대조 양에서의 htt 발현 수준에 대한 데이터도 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신(calnexin)에 대하여 정규화하였다. 주의: CbA 및 U6 구성체 각각에는 mir155 백본을 사용하였음.

도 17은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 1개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 조가비핵(middle putamen)에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 대조 양에서의 발현 수준에 대한 데이터도 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 18은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 미상핵의 내측 측면에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 측면 및 주사된 측면에서의 발현 수준에 대한 데이터를 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 19는 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 미상핵의 외측 측면에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 측면 및 주사된 측면에서의 발현 수준에 대한 데이터를 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 20은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 미상핵에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 대조 양에서의 htt 발현 수준에 대한 데이터도 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 21은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 조가비핵의 외측 측면에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 측면 및 주사된 측면에서의 발현 수준에 대한 데이터를 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 22는 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 조가비핵의 내측 측면에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 측면 및 주사된 측면에서의 발현 수준에 대한 데이터를 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 23은 scAAV9 CbA-mir-HTT ("CbA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 중간 조가비핵에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 대조 양에서의 htt 발현 수준에 대한 데이터도 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 24는 scAAV9 CBA-mir-HTT ("CBA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 전방 선조체에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다. 비-주사 대조 양에서의 htt 발현 수준에 대한 데이터도 나타내었다. 상대적인 htt 발현 수준은 양 칼넥신에 대하여 정규화하였다.

도 25a-25b는 인간 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA의 예상 헤어핀 구조를 나타낸다. 도 25a는 mir-155-6433 (서열식별번호: 23)의 예상 헤어핀 구조를 나타낸다. 도 25b는 mir-30-6433 (서열식별번호: 24)의 예상 헤어핀 구조를 나타낸다.

도 26a-26b는 양 뇌의 AAV 벡터의 전달을 보여준다. 도 26a는 전체 선조체가 4, 6 mm 블록 내에 포함되도록 관상면에서 절제된 양 뇌의 개략적인 개관을 보여준다 (상단). 전방 블록은 속섬유막에 의해 분할되지 않은 선조체의 전방 부분을 포함한다 (중단). 주사가 표적으로 하는 내측 블록은 한정된 조가비핵을 포함하며, 미상핵은 하단에 나타내었다. 도 26b는 대조 (AAV9) 및 처리 (AAV9miRHTT) 처리된 동물에서의 AAV 벡터 게놈을 나타낸다. 벡터 게놈은 참조 유전자로서 게놈 HPRT를 사용하는 디지털 액적 PCR에 의해 측정하였다. 값들은 log 척도로 플로팅하였다.

도 27은 인공 miRNA 가이드 가닥이 디지털 액적 PCR에 의해 정량되었음을 보여준다. let-7e*에 대하여 정규화함으로써 상대적인 miRNA 수준을 계산하고, 그와 같은 값을 log 척도로 플로팅하였다. RQN < 5인 샘플은 배제하였다. 기록되는 수는 이와 같은 품질 임계치를 통과하여 miRNA 분석에 사용된 샘플의 총 수이다. P 값은 다중 시험을 위한 튜키(tukey) 보정을 포함하는 2-원 아노바(ANOVA)를 사용하여 계산하였다.

도 28은 scAAV9-항-HTT-6433이 선조체에서 인간 돌연변이 헌팅틴 mRNA를 감소시킨다는 것을 보여준다. 나타낸 데이터는 양 칼넥신에 대하여 정규화된 HTT mRNA의 신호이다. 별표는 비쌍형 t-검정을 사용한 p, 0.03 이하에서의 처리 군들 (AAV9 또는 AAV9miRHTT) 사이의 상당한 평균 차이를 표시한다. U6-프로모터 추진 인공 miRNA는 주사 1개월-후에 미상핵 및 조가비핵에서, 그리고 주사 6개월-후에는 조가비핵에서 인간 돌연변이 HTT mRNA를 상당히 낮추었다. CBA-프로모터 추진 인공 miRNA는 주사 1개월-후에 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서, 주사 6개월-후에는 미상핵 및 조가비핵에서 HTT mRNA를 낮추었다. 분석에서는 미상핵의 내측 영역, 외측 조가비핵 및 전방 선조체를 조사하였다.

도 29a-29b는 AAV9 및 AAV9miRHTT 처리된 양에서의 내생 양 htt mRNA 및 단백질의 수준을 나타낸다. 도 29a는 양 htt mRNA 수준이 방법에서 기술된 바와 같이 측정되었으며 양 칼넥신 (Canx)에 대비하여 표현되었음을 보여준다. 나타낸 것은 연구 2의 결과이다. AAV9와 AAV9miRHTT 처리 군 사이에 내생 양 htt mRNA 수준의 차이는 존재하지 않았다. 도 29b는 연구 2의 주사 6개월-후 조가비핵에서 항-htt1-17 항체 (Ab1)를 사용하여 검출된 내생 양 헌팅틴 및 인간 mHTT 단백질의 수준을 나타낸다. 샘플 웨스턴 블롯은 AAV9miRHTT가 일 측면상에 주사된 4 마리의 서로 다른 양에서의 뇌의 주사 및 비-주사 측면의 wt htt (화살표) 및 인간 돌연변이 htt (화살촉)의 신호를 보여준다. 그래프는 % 주사된 측면 대 비-주사 측면으로서 농도측정에 의해 측정된 평균 wt 양 htt 및 인간 mHTT 신호를 나타낸다. AAV9miRHTT를 사용한 처리가 내생 양 헌팅틴 단백질의 수준에는 영향을 주지 않았으나, 인간 mHTT의 수준은 상당히 감소시켰음에 유의한다. 별표는 비쌍형 t-검정을 사용한 p=0.005를 표시한다.

도 30은 AAV9-miRHTT가 선조체에서 인간 돌연변이 헌팅틴 단백질을 감소시킨다는 것을 보여준다. 연구 1 및 2로부터의 조가비핵의 샘플 웨스턴 블롯은 항체 3B5H10를 사용하여 검출되는 돌연변이 HTT 및 적재 대조로서의 액틴을 보여준다 (상단). 그래프는 AAV9 (대조) 또는 AAV9-miRHTT 중 어느 하나로 처리된 양에서의 개별 값 및 평균 (수평 막대)의 분포를 나타낸다 (하단). 나타낸 것은 연구 1 및 2, 그리고 주사 1 및 6개월-후의 서로 다른 선조체 영역 (미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체)에서의 결과이다. 연구 2에서는, 주사 6개월-후 각 영역에서 2개의 영역 (영역 1 및 2)을 조사하였다. 별표는 비쌍형 t-검정을 기준으로 한 p<0.05 이하에서의 주사된 측면상에서의 AAV9과 AAV9-miRHTT 사이의 상당한 차이를 표시한다.

도 31은 연구 1 (U6 프로모터) 및 연구 2 (CBA 프로모터)에서의 주사 1 및 6개월-후의 MSD 검정에 의해 검출되는 인간 돌연변이 HTT 수준을 나타낸다. 그래프는 AAV9 (대조) 또는 AAV9-miRHTT 중 어느 하나로 처리된 양에서의 개별 값 및 평균 (수평 막대)의 분포를 나타낸다. 서로 다른 선조체 영역 (미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체)에 대하여 결과를 나타내었다. 별표 *는 비쌍형 t-검정을 기준으로 한 p<0.05 이하에서의 주사된 측면상에서의 AAV9과 AAV9-miRHTT 사이의 상당한 차이를 표시한다.

도 32a-32b는 miRHTT 주사된 양 선조체의 같은쪽 피질 및 반대쪽 미상핵 조가비핵에서 mHTT 수준이 변화되지 않

는다는 것을 보여준다. 도 32a는 miRHTT 주사된 선조체의 같은쪽 피질에서의 액틴에 대하여 정규화된 mHTT의 평균 수준을 표시하는 그래프를 나타낸다. 데이터는 연구 1에서의 비쌍형 t-검정을 기반으로 한 주사 1 및 6개월-후 NS의 것이다. 도 32b는 miRHTT-주사된 선조체의 반대쪽 미상핵 및 조가비핵에서의 액틴에 대하여 정규화된 mHTT의 수준을 표시하는 막대 그래프를 나타낸다. 데이터는 연구 1에서의 비쌍형 t-검정을 기반으로 한 주사 1 및 6개월-후 NS의 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명의 측면들은 대상체에게 전달되었을 때 대상체에서의 병원성 헌팅틴 단백질 (HTT)의 발현을 감소시키는 데에 효과적인 특정 간섭 RNA(interfering RNA) (예컨대 인공 miRNA와 같은 miRNA)에 관한 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기술되는 방법 및 조성물은 헌팅톤병의 치료에 유용하다.
- [0046] 헌팅톤병의 치료 방법
- [0047] 본 개시내용에 의해, 대상체에게 트랜스진 (예컨대 miRNA와 같은 억제성 RNA)을 전달하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 통상적으로 헌팅틴 (htt) 단백질의 발현을 감소시킬 수 있는 간섭 RNA를 코딩하는 단리된 핵산, 또는 헌팅틴 단백질의 발현을 감소시킬 수 있는 억제성 RNA를 발현시키기 위한 핵산을 포함하는 rAAV의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0048] 일부 측면에서, 본 개시내용은 인간 헌팅틴 (예컨대 서열식별번호: 1)의 적어도 2개 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상)의 연속되는 염기에 특이적으로 결합하는 (예컨대 그와 혼성화되는) 억제성 miRNA를 제공한다. 본원에서 사용될 때, "연속되는 염기"는 (예컨대 핵산 분자의 일부로서) 서로 공유 결합되어 있는 (예컨대 하나 이상의 포스포디에스테르 결합 등에 의함) 2개 이상의 뉴클레오타이드 염기를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 miRNA는 서열식별번호: 1의 2개 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상)의 연속되는 뉴클레오타이드 염기와 약 50 %, 약 60 %, 약 70 %, 약 80 %, 약 90 %, 약 95 %, 약 99 % 또는 약 100 % 동일하다. 일부 실시양태에서, 억제성 RNA는 서열식별번호: 2-10 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함하거나 그에 의해 코딩되는 miRNA이다.
- [0049] 본원에서 사용될 때, "헌팅톤병" 또는 "HD"는 병원성 돌연변이 헌팅틴 단백질 (HTT 또는 mHTT)의 생성을 초래하는 *HTT* 유전자에서의 3-뉴클레오타이드 반복체 확장 (예컨대 CAG, 폴리-글루타민 또는 폴리Q, 트랙트(tract)로 번역됨)에 의해 야기되는 점진적으로 악화되는 운동, 인지 및 행동 변화를 특징으로 하는 신경변성 질환을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 헌팅틴 단백질은 뇌의 특정 영역에서의 뉴런 세포 사멸 속도를 가속한다. 일반적으로, HD의 중증도는 대상체에서의 3-뉴클레오타이드 반복체 확장의 크기와 상관된다. 예를 들어, 36 내지 39개 사이의 반복체를 포함하는 CAG 반복체 영역을 가지는 대상체는 "발현성 감퇴(reduced penetrance)" HD를 가지는 것을 특징으로 하는 반면, 40개를 초과하는 반복체를 가지는 대상체는 "완전 발현성" HD를 가지는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, HD에 걸려 있거나 그것에 걸릴 위험이 있는 대상체는 약 36 내지 약 39개 사이의 CAG 반복체 (예컨대, 36, 37, 38 또는 39개의 반복체)를 포함하는 *HTT* 유전자를 가진다. 일부 실시양태에서, HD에 걸려 있거나 그것에 걸릴 위험이 있는 대상체는 40개를 초과하는 (예컨대, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200개 또는 그 이상인) CAG 반복체를 포함하는 *HTT* 유전자를 가진다. 일부 실시양태에서, 100개를 초과하는 CAG 반복체를 포함하는 *HTT* 유전자를 가지는 대상체는 100개 미만의 CAG 반복체를 가지는 대상체에 비해 더 일찍 HD를 발병한다. 일부 실시양태에서, 100개를 초과하는 CAG 반복체를 포함하는 *HTT* 유전자를 가지는 대상체는 약 20세의 연령 전에 HD 증상들을 발병할 수 있는데, 청소년 HD (무동-경직성 HD 또는 웨스트팔(Westphal) 변이 HD로도 지칭됨)에 걸린 것으로 지칭된다. 대상체 *HTT* 유전자 대립유전자 (allele)에서의 CAG 반복체의 수는 관련 기술분야에 알려져 있는 임의의 적합한 양식에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 대상체의 생물학적 샘플 (예컨대 혈액)로부터 핵산 (예컨대 DNA)이 단리될 수 있으며, PCR 또는 핵산 서열분석 (예컨대 일루미나(Illumina) 서열분석, 생거(Sanger) 서열분석, SMRT 서열분석 등)과 같은 혼성화-기반 방법에 의해 *HTT* 대립유전자의 CAG 반복체 수가 측정될 수 있다.
- [0050] 물질의 "유효량"은 원하는 효과를 산출하기에 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산의 유효량은 대상체 표적 조직의 충분한 수의 표적 세포를 형질감염 (또는 rAAV 매개 전달 맥락에서의 감염)시키기에 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, 표적 조직은 중추신경계 (CNS) 조직 (예컨대 뇌 조직, 척수 조직, 뇌척수액 (CSF) 등)이다. 일부 실시양태에서, (예컨대 rAAV를 통하여 전달될 수 있는) 단리된 핵산의 유효량은 대상체에서 치료적 이익을 가지기에, 예를 들면 병원성 유전자 또는 단백질 (예컨대 HTT)의 발현을 감소시키기에, 대상체의 수명을 연장하기에, 대상체에서 질환의 하나 이상의 증상 (예컨대 헌팅톤병의 증상)을 개선하기에 충분한 양일

수 있는 등이다. 유효량은 예를 들면 대상체의 종, 연령, 체중, 건강, 및 표적화될 조직과 같은 다양한 인자들에 따라 달라지게 되며, 그에 따라 본 개시내용의 다른 어딘가에서 기술되는 바와 같이 대상체 및 조직간에 가변적일 수 있다.

[0051] 단리된 핵산

[0052] 일부 측면에서, 본 개시내용은 인간 헌팅틴 (HTT)의 발현을 감소시키는 (예컨대 억제하는) 데에 유용한 단리된 핵산을 제공한다. "핵산" 서열은 DNA 또는 RNA 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질 및 핵산은 단리된다. 본원에서 사용될 때, "단리된"이라는 용어는 인공적으로 산출되는 것을 의미한다. 핵산과 관련하여 본원에서 사용될 때, "단리된"이라는 용어는 하기를 의미한다: (i) 예를 들면 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 시험관 내에서 증폭되는 것; (ii) 클로닝에 의해 재조합으로 제조되는 것; (iii) 절단 및 겔 분리에 의한 것과 같이 정제되는 것; 또는 (iv) 예를 들면 화학적 합성에 의해 합성되는 것. 단리된 핵산은 관련 기술분야에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술에 의해 용이하게 조작가능한 핵산이다. 따라서, 5' 및 3' 제한 부위가 알려져 있거나 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 프라이머 서열이 개시되어 있는 벡터에 포함되어 있는 뉴클레오타이드 서열은 단리된 것으로 간주되나, 그의 자연 숙주 내에서 그의 고유 상태로 존재하는 핵산 서열은 그렇지 않다. 단리된 핵산이 실질적으로 정제될 수도 있으나, 그럴 필요가 있는 것은 아니다. 예를 들어, 클로닝 또는 발현 벡터 내에서 단리되는 핵산은 그것이 존재하는 세포내 물질을 미미한 백분율이지만 그것이 포함할 수 있다는 점에서 순수하지 않다. 그러나, 본원에서 용어가 사용될 때 그와 같은 핵산은 단리된 것인데, 그것이 관련 기술분야 통상의 기술자에게 알려져 있는 표준 기술에 의해 용이하게 조작가능하기 때문이다. 단백질 또는 펩티드와 관련하여 본원에서 사용될 때, "단리된"이라는 용어는 그의 자연 환경으로부터 단리되거나 인공적으로 제조된 (예컨대 화학적 합성, 재조합 DNA 기술 등에 의한) 단백질을 지칭한다.

[0053] 숙련 기술자라면, 캡시드 단백질의 기능적으로 등가인 변이체 또는 동종체를 제공하기 위하여 보존성 아미노산 치환이 이루어질 수 있다는 것도 알고 있을 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 보존성 아미노산 치환을 발생시키는 서열 대안을 포괄한다. 본원에서 사용될 때, 보존성 아미노산 치환은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대적인 전하 또는 크기 특징을 변경하지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 해당 방법들을 열거하고 있는 참고문헌 예를 들면 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989] 또는 [Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에 나와 있는 것들과 같이 관련 기술분야 통상의 기술자에게 알려져 있는 폴리펩티드 서열 변경 방법에 따라 제조될 수 있다. 아미노산의 보존성 치환에는 하기 군 내의 아미노산들 사이에서 이루어지는 치환이 포함된다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D. 이에 따라, 본원에서 개시되는 단백질 및 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대한 보존성 아미노산 치환이 이루어질 수 있다.

[0054] 본 발명의 단리된 핵산은 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 (rAAV 벡터)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기술되는 바와 같은 단리된 핵산은 제1 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역전 말단 반복체 (ITR), 또는 그의 변이체를 포함하는 영역 (예컨대 제1 영역)을 포함한다. 단리된 핵산 (예컨대 재조합 AAV 벡터)은 캡시드 단백질에 패키징되어 대상체에게 투여되고/거나 선택된 표적 세포로 전달될 수 있다. "재조합 AAV (rAAV) 벡터"는 통상적으로 최소한 트랜스진 및 그의 조절 서열, 그리고 5' 및 3' AAV 역전 말단 반복체 (ITR)로 구성된다. 트랜스진은 본원의 다른 어딘가에서 개시되는 바와 같이 대상체의 내생 mRNA를 표적으로 하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 억제성 RNA (예컨대 miRNA)를 코딩하는 하나 이상의 영역을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 다른 어딘가에서 기술되는 바와 같이, 트랜스진은 또한 예를 들면 단백질 및/또는 발현 조절 서열 (예컨대 폴리-A 테일)을 코딩하는 영역을 포함할 수 있다.

[0055] 일반적으로, ITR 서열은 길이가 약 145 bp이다. 이러한 서열의 어느 정도의 사소한 변형은 허용가능하지만, 바람직하게는 실질적으로 전체인 ITR 코딩 서열이 분자에 사용된다. 이러한 ITR 서열을 변형시키는 능력은 관련 기술분야의 기술에 속한다 (예컨대 문헌 [Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]과 같은 교재; 및 문헌 [K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)] 참조). 본 발명에 사용되는 그와 같은 분자의 예는 선택된 트랜스진 서열 및 연관 조절 요소들이 5' 및 3' AAV ITR 서열에 의해 플랭킹되어 있는, 트랜스진을 포함하는 "시스-작용(cis-acting)" 플라스미드이다. AAV ITR 서열은 현재 확인되어 있는 포유동물 AAV 유형들을 포함하여, 어떠한 알려져 있는 AAV로부터도 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산 (예컨대 rAAV 벡터)은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 이들의 변이체에서 선택되는 혈청형을 가지는 적어도 하나의 ITR

을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 AAV2 ITR을 코딩하는 영역 (예컨대 제1 영역)을 포함한다.

[0056] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 추가적으로 제2 AAV ITR을 포함하는 영역 (예컨대 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 이들의 변이체에서 선택되는 혈청형을 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 ITR은 기능성인 말단 분해 부위 (TRS)가 결핍되어 있는 돌연변이 ITR이다. "말단 분해 부위가 결핍되어 있는"이라는 용어는 ITR의 말단 분해 부위 (TRS)의 기능을 무효화하는 돌연변이 (예컨대 센스(sense) 돌연변이 예컨대 비-동의 돌연변이, 또는 미스센스 돌연변이)를 포함하는 AAV ITR, 또는 기능성인 TRS를 코딩하는 핵산 서열이 결핍되어 있는 감축된 AAV ITR (예컨대 Δ TRS ITR)을 지칭할 수 있다. 임의의 특정 이론에 얽매이지 않는 것은 아니나, 기능성인 TRS가 결핍되어 있는 ITR을 포함하는 rAAV 벡터는 예를 들면 문헌 [McCarthy (2008) *Molecular Therapy* 16(10):1648-1656]에 기술되어 있는 바와 같이 자가-상보성인 rAAV 벡터를 산출한다.

[0057] 재조합 AAV 벡터에 대하여 상기에서 밝힌 주요 요소들 이외에, 벡터는 또한 본 발명에 의해 제조되는 벡터에 의해 형질감염되거나 바이러스에 의해 감염된 세포에서의 그의 전사, 번역 및/또는 발현을 가능하게 하는 방식으로 트랜스진의 요소들과 작용가능하게 연결된 통상적인 조절 요소들을 포함한다. 본원에서 사용될 때, "작용가능하게 연결된" 서열에는 해당 유전자와 연속되는 발현 조절 서열, 및 트랜스로 작용하거나 원거리에서 작용하여 해당 유전자를 조절하는 발현 조절 서열 둘 다 포함된다. 발현 조절 서열에는 적절한 전사 개시, 종료, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 프로세싱 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리 A) 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 강화하는 서열 (즉 코자크(Kozak) 공통 서열); 단백질 안정성을 강화하는 서열; 및 원할 경우 코딩된 생성물의 분비를 강화하는 서열이 포함된다. 고유성, 상시성, 유도성 및/또는 조직-특이성인 프로모터를 포함한 수많은 발현 조절 서열들이 관련 기술분야에 알려져 있으며, 활용될 수 있다.

[0058] 본원에서 사용될 때, 핵산 서열 (예컨대 코딩 서열)과 조절 서열은 핵산 서열의 발현 또는 전사를 조절 서열의 영향 또는 조절하에 위치시키도록 하는 방식으로 그들이 공유 연결되는 경우, 작용가능하게 연결된 것으로 지칭된다. 핵산 서열이 기능성인 단백질로 번역되는 것을 원하는 경우, 2개의 DNA 서열은 5' 조절 서열에서의 프로모터의 유도가 코딩 서열의 전사를 발생시키는 경우, 그리고 2개 DNA 서열들 사이 연결의 특성이 (1) 프레임-쉬프트(frame-shift) 돌연변이의 도입을 발생시키지 않거나, (2) 코딩 서열의 전사를 유도하는 프로모터 영역의 능력을 방해하지 않거나, 또는 (3) 단백질로 번역되는 해당 RNA 전사체의 능력을 방해하지 않는 경우에 작용가능하게 연결된 것으로 지칭된다. 따라서, 생성되는 전사체가 원하는 단백질 또는 폴리펩티드로 번역될 수 있도록 프로모터 영역이 해당 DNA 서열의 전사에 영향을 줄 수 있었던 경우, 프로모터 영역은 핵산 서열에 작용가능하게 연결되는 것이다. 마찬가지로, 2개 이상의 코딩 영역들은 공통 프로모터로부터의 그들의 전사가 2개 이상 단백질의 발현이 인 프레임(in frame)으로 번역되도록 하는 것을 발생시키는 방식으로 그들이 연결되는 경우, 작용가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서는, 작용가능하게 연결된 코딩 서열들이 융합 단백질을 산출한다. 일부 실시양태에서, 작용가능하게 연결된 코딩 서열들은 기능성 RNA (예컨대 miRNA)를 산출한다.

[0059] 일부 측면에서, 본 개시내용은 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 제공하며, 여기서 상기 트랜스진은 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA) (예컨대 miRNA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. "마이크로RNA" 또는 "miRNA"는 전사 또는 전사-후 유전자 침묵화(silencing)를 매개할 수 있는 소형 비-코딩 RNA 분자이다. 통상적으로, miRNA는 효소적으로 프레(pre)-miRNA로 프로세싱되는 (예컨대 드로샤(Drosha), DGCR8, 파샤(Pasha) 등에 의한) 일차 miRNA (프리(pri)-miRNA)로 지칭되는 헤어핀 또는 스템-루프 (예컨대 자가-상보성, 단일-가닥 백본을 가짐) 이중체 구조로 전사된다. 프리-miRNA의 길이는 가변적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프리-miRNA는 길이가 약 100 내지 약 5000개 염기쌍 (예컨대 약 100, 약 200, 약 500, 약 1000, 약 1200, 약 1500, 약 1800 또는 약 2000개 염기쌍) 범위이다. 일부 실시양태에서, 프리-miRNA는 길이가 200개 염기쌍을 초과한다 (예컨대 2500, 5000, 7000, 9000개 또는 그 이상 염기쌍의 길이).

[0060] 역시 헤어핀 또는 스템-루프 이중체 구조를 특징으로 하는 프레-miRNA도 길이가 가변적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프레-miRNA는 크기가 약 40개 염기쌍 길이 내지 약 500개 염기쌍 길이 범위이다. 일부 실시양태에서, 프레-miRNA는 크기가 약 50 내지 100개 염기쌍 길이 범위이다. 일부 실시양태에서, 프레-miRNA는 크기가 약 50 내지 약 90개 염기쌍 길이 (예컨대 약 50, 약 52, 약 54, 약 56, 약 58, 약 60, 약 62, 약 64, 약 66, 약 68, 약 70, 약 72, 약 74, 약 76, 약 78, 약 80, 약 82, 약 84, 약 86, 약 88 또는 약 90개 염기쌍 길이) 범위이다.

[0061] 일반적으로, 프레-miRNA는 세포질로 외수송되어 다이서(Dicer)에 의해 효소적으로 프로세싱됨으로써, 먼저 불완

전한 miRNA/miRNA* 이중체를, 그리고 다음에는 단일-가닥의 성숙한 miRNA 분자를 산출하며, 이는 이후 RNA-유도 침묵화 복합체 (RISC)에 적재된다. 통상적으로, 성숙한 miRNA 분자는 크기가 약 19 내지 약 30개 염기쌍 길이 범위이다. 일부 실시양태에서, 성숙한 miRNA 분자는 길이가 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 30개 염기쌍이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 단리된 핵산은 서열식별번호: 2-10 또는 21-22 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함하는 프리-miRNA, 프레-miRNA 또는 성숙한 miRNA를 코딩하는 서열을 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서는 단리된 핵산 또는 벡터 (예컨대 rAAV 벡터)가 하나를 초과하는 (예컨대 2, 3, 4, 5, 10개 또는 그 이상과 같은 다수의) miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다는 것을 알아야 한다. 일부 실시양태에서, 상기 하나를 초과하는 miRNA 각각은 동일한 표적 유전자를 표적으로 한다 (예컨대 그와 혼성화되거나 거기에 특이적으로 결합함) (예를 들면 각 miRNA가 HTT 유전자를 표적으로 하는 3종의 독자적인 miRNA를 코딩하는 단리된 핵산). 일부 실시양태에서, 하나를 초과하는 miRNA 각각은 서로 다른 표적 유전자를 표적으로 한다 (예컨대 그와 혼성화되거나 거기에 특이적으로 결합함).

[0063] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 인공 miRNA를 코딩하는 단리된 핵산 및 벡터 (예컨대 rAAV 벡터)를 제공한다. 본원에서 사용될 때, "인공 miRNA" 또는 "amiRNA"는 예를 들면 문헌 [Eamens et al. (2014), *Methods Mol. Biol.* 1062:211-224]에 기술되어 있는 바와 같이 miRNA 및 miRNA* (예컨대 miRNA 이중체의 패시저(passenger) 가닥) 서열이 표적 유전자의 고도로 효율적인 RNA 침묵화를 유도하는 상응하는 amiRNA/amiRNA* 서열로 대체되어 있는 내생 프리-miRNA 또는 프레-miRNA (예컨대 기능성인 성숙한 miRNA를 생성시킬 수 있는 전구체 miRNA인 miRNA 백본)를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 인공 miRNA는 내생 miR-155 성숙 miRNA-코딩 서열 대신 성숙한 HTT-특이적 miRNA를 코딩하는 서열 (예컨대 서열식별번호: 2-10 중 어느 하나)이 삽입되어 있는 miR-155 프리-miRNA 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에서 기술되는 바와 같은 miRNA (예컨대 인공 miRNA)는 miR-155 백본 서열, miR-30 백본 서열, miR-64 백본 서열 또는 miR-122 백본 서열을 포함한다.

[0064] 트랜스진을 포함하는 영역 (예컨대 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)은 단리된 핵산의 어떠한 적합한 위치에도 배치될 수 있다. 상기 영역은 예를 들면 인트론, 5' 또는 3' 비번역 영역 등을 포함하여 핵산의 어떠한 비번역 부분에도 배치될 수 있다.

[0065] 일부 경우에는, 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (예컨대 단백질 코딩 서열) 첫 번째 코돈의 상류에 상기 영역 (예컨대 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)을 배치시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 상기 영역은 단백질 코딩 서열의 첫 번째 코돈과 첫 번째 코돈의 2000개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 단백질 코딩 서열의 첫 번째 코돈과 첫 번째 코돈의 1000개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 단백질 코딩 서열의 첫 번째 코돈과 첫 번째 코돈의 500개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 단백질 코딩 서열의 첫 번째 코돈과 첫 번째 코돈의 250개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 단백질 코딩 서열의 첫 번째 코돈과 첫 번째 코돈의 150개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다.

[0066] 일부 경우 (예컨대 트랜스진에 단백질 코딩 서열이 결핍되어 있는 경우)에는, 트랜스진의 폴리-A 테일의 상류에 상기 영역 (예컨대 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)을 배치하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 2000개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 1000개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 500개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 250개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 150개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 100개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 50개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 첫 번째 염기와 첫 번째 염기의 20개 뉴클레오티드 상류 사이에 배치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 영역은 프로모터 서열의 마지막 뉴클레오티드 염기와 폴리-A 테일 서열의 첫 번째 뉴클레오티드 염기 사이에 배치된다.

[0067] 일부 경우에서, 상기 영역은 트랜스진 폴리-A 테일의 마지막 염기의 하류에 배치될 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 마지막 염기와 마지막 염기의 2000개 뉴클레오티드 하류 위치 사이에 존재할 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 마지막 염기와 마지막 염기의 1000개 뉴클레오티드 하류 위치 사이에 존재할 수 있다. 상기 영

역은 폴리-A 테일의 마지막 염기와 마지막 염기의 500개 뉴클레오티드 하류 위치 사이에 존재할 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 마지막 염기와 마지막 염기의 250개 뉴클레오티드 하류 위치 사이에 존재할 수 있다. 상기 영역은 폴리-A 테일의 마지막 염기와 마지막 염기의 150개 뉴클레오티드 하류 위치 사이에 존재할 수 있다.

[0068] 트랜스진이 하나를 초과하는 miRNA를 코딩하는 경우, 각 miRNA는 트랜스진 내의 어떠한 적합한 위치에도 배치될 수 있다는 것을 알아야 한다. 예를 들면, 제1 miRNA를 코딩하는 핵산은 트랜스진의 인트론에 배치될 수 있으며, 제2 miRNA를 코딩하는 핵산 서열은 또 다른 비번역 영역 (예컨대 트랜스진의 단백질 코딩 서열 마지막 코돈과 폴리-A 테일 첫 번째 염기 사이)에 배치될 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 추가적으로 하나 이상의 발현 조절 서열 (예컨대 프로모터 등)을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 발현 조절 서열에는 적절한 전사 개시, 종료, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 프로세싱 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리 A) 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 강화하는 서열 (즉 코자크 공통 서열); 단백질 안정성을 강화하는 서열; 및 원할 경우 코딩된 생성물의 분비를 강화하는 서열이 포함된다. 고유성, 상시성, 유도성 및/또는 조직-특이성인 프로모터를 포함한 대단히 많은 수의 발현 조절 서열들이 관련 기술분야에 알려져 있으며, 활용될 수 있다.

[0070] "프로모터"는 특정 유전자 전사를 개시하는 데에 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다. "작용가능하게 배치된", "조절하에 있는" 또는 "전사 조절하에 있는"이라는 구는 프로모터가 RNA 폴리머라제 개시 및 유전자의 발현을 조절하는 데에 있어서 핵산과 관련하여 올바른 위치 및 방향으로 존재한다는 것을 의미한다.

[0071] 단백질을 코딩하는 핵산의 경우, 폴리아데닐화 서열은 일반적으로 트랜스진 서열 후 및 3' AAV ITR 서열 전에 삽입된다. 본 개시내용에 유용한 rAAV 구조체는 바람직하게는 프로모터/인핸서 서열과 트랜스진 사이에 위치하는 인트론을 포함할 수도 있다. 한 가지 가능한 인트론 서열은 SV-40으로부터 유래하며, SV-40 T 인트론 서열로 지칭된다. 사용될 수 있는 또 다른 벡터 요소는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)이다. IRES 서열은 단일 유전자 전사체로부터 하나를 초과하는 폴리펩티드를 생성시키는 데에 사용된다. IRES 서열은 하나를 초과하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단백질을 생성시키는 데에 사용되게 된다. 이러한 공통적인 벡터 요소들 및 다른 것들의 선택은 통상적인 것으로서, 많은 그와 같은 서열들이 구입가능하다 (예컨대 문헌 [Sambrook et al.] 및 예를 들면 그안의 페이지 3.18 3.26 및 16.17 16.27에 인용되어 있는 참고문헌, 그리고 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989] 참조). 일부 실시양태에서는, 발입병 바이러스 2A 서열이 다중단백질(polyprotein)에 포함되는데; 이는 다중단백질의 절단을 매개하는 것으로 나타나 있는 소형 펩티드 (대략 18개 아미노산 길이)이다 (문헌 [Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933]; [Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127]; [Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873]; 및 [Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459]). 2A 서열의 절단 활성은 플라스미드 및 유전자 치료법 벡터 (AAV 및 레트로바이러스)를 포함한 인공 시스템에서 이미 입증되어 있다 (문헌 [Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933]; [Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127]; [Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873]; 및 [Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459]; [de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208]; [de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.]; 및 [Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817]).

[0072] 상시성 프로모터의 예에는 비제한적으로 레트로바이러스 로우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의적으로 RSV 인핸서 포함), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의적으로 CMV 인핸서 포함) (예컨대 문헌 [Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, β -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터 및 EF1 α 프로모터 [인비트로젠(Invitrogen) 사]가 포함된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 강화된 닭 β -액틴 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 U6 프로모터이다.

[0073] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하며, 외인성으로 공급되는 화합물, 온도와 같은 환경 인자, 또는 특정 생리학적 상태의 존재, 예를 들면 세포 또는 복제중인 세포에서만만의 급성인 단계, 특정 분화 상태에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 비제한적으로 인비트로젠 사, 클론테크(Clontech) 사 및 아리아드(Ariad) 사를 포함한 다양한 시중의 공급원으로부터 구입가능하다. 많은 다른 시스템들이 기술된 바 있으며, 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인성으로 공급되는 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예에는 아연-유도성 양 메탈로티오닌 (MT) 프로모터, 텍사메타손 (Dex)-유도성 마우스 포유동물 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템 (WO 98/10088호); 액디

손 곤충 프로모터 (문헌 [No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)]); 테트라사이클린-억제성 시스템 (문헌 [Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)]); 테트라사이클린-유도성 시스템 (문헌 [Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995)], 문헌 [Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)]도 참조); RU486-유도성 시스템 (문헌 [Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)] 및 [Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)]) 및 라파마이신-유도성 시스템 (문헌 [Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)])이 포함된다. 이와 같은 맥락에서 유용할 수 있는 또 다른 유형의 유도성 프로모터는 특정 생리학적 상태, 예를 들면 온도, 세포 또는 복제중인 세포에서만 급성 단계, 특정 분화 상태에 의해 조절되는 것들이다.

[0074] 또 다른 실시양태에서는, 트랜스진의 고유 프로모터가 사용되게 된다. 고유 프로모터는 트랜스진의 발현이 고유 발현을 모방하기를 원하는 경우에 바람직할 수 있다. 고유 프로모터는 트랜스진의 발현이 일시적으로 또는 발생에 따라, 또는 조직-특이적인 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서는, 고유 발현을 모방하기 위하여 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코자크 공통 서열과 같은 다른 고유 발현 조절 요소들이 사용될 수도 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, 조절 서열은 조직-특이적인 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에서, 조직-특이적인 조절 서열은 조직 특이적인 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적인 전사 인자에 결합한다. 그와 같은 조직-특이적 조절 서열 (예컨대 프로모터, 인핸서 등)에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 대표적인 조직-특이적 조절 서열에는 하기의 조직 특이적 프로모터들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다: 간-특이적 티룩신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 인슐린 프로모터, 글루카곤 프로모터, 소마토스타틴 프로모터, 췌장 폴리펩티드 (PPY) 프로모터, 시냅신-1 (Syn) 프로모터, 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 포유동물 데스민 (DES) 프로모터, α -미오신 중쇄 (α -MHC) 프로모터 또는 심장 트로포닌 T (cTnT) 프로모터. 다른 대표적인 프로모터로는 숙련 기술자라면 알고 있을 여러 가지 중에서도 베타-액틴 프로모터, B형 간염 바이러스 코어 프로모터 (문헌 [Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996)]); 알파-페토단백질 (AFP) 프로모터 (문헌 [Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)]), 골 오스테오칼신 프로모터 (문헌 [Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)]); 골 시알로단백질 프로모터 (문헌 [Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)]), CD2 프로모터 (문헌 [Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)]); 이뮤노글로불린 중쇄 프로모터; T 세포 수용체 α -사슬 프로모터, 뉴런성 예컨대 뉴런-특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터 (문헌 [Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)]), 뉴로필라멘트 경-쇄 유전자 프로모터 (문헌 [Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)]) 및 뉴런-특이적 vgf 유전자 프로모터 (문헌 [Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)])가 포함된다.

[0076] 본 개시내용의 측면들은 하나를 초과하는 프로모터 (예컨대 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 프로모터)를 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 예를 들어, 단백질을 코딩하는 제1 영역 및 억제성 RNA (예컨대 miRNA)를 코딩하는 제2 영역을 포함하는 트랜스진을 가지는 구성체의 맥락에서는, 제1 프로모터 서열 (예컨대 단백질 코딩 영역에 작용가능하게 연결된 제1 프로모터 서열)을 사용하여 단백질 코딩 영역의 발현을 추진하고, 제2 프로모터 서열 (예컨대 억제성 RNA 코딩 영역에 작용가능하게 연결된 제2 프로모터 서열)을 사용하여 억제성 RNA 코딩 영역의 발현을 추진하는 것이 바람직할 수 있다. 일반적으로, 상기 제1 프로모터 서열 및 제2 프로모터 서열은 동일한 프로모터 서열 또는 서로 다른 프로모터 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 프로모터 서열 (예컨대 단백질 코딩 영역의 발현을 추진하는 프로모터)은 RNA 폴리머라제 III (polIII) 프로모터 서열이다. polIII 프로모터 서열의 비-제한적인 예에는 U6 및 H1 프로모터 서열이 포함된다. 일부 실시양태에서, 상기 제2 프로모터 서열 (예컨대 억제성 RNA의 발현을 추진하는 프로모터 서열)은 RNA 폴리머라제 II (polII) 프로모터 서열이다. polII 프로모터 서열의 비-제한적인 예에는 T7, T3, SP6, RSV 및 사이토메갈로바이러스 프로모터 서열이 포함된다. 일부 실시양태에서는, polIII 프로모터 서열이 억제성 RNA (예컨대 miRNA) 코딩 영역의 발현을 추진한다. 일부 실시양태에서는, polII 프로모터 서열이 단백질 코딩 영역의 발현을 추진한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 핵산은 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함한다. 상기 단백질은 치료용 단백질 (예컨대 포유동물 대상체에서의 질환 상태의 치료 또는 예방에 유용한 펩티드, 단백질 또는 폴리펩티드) 또는 리포터 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 치료용 단백질은 헌팅턴병의 치료 또는 예방에 유용한 것, 예를 들면 문헌 [Marelli et al. (2016) *Orphanet Journal of Rare Disease* 11:24; doi:10.1186/s13023-016-0405-3]에 기술되어 있는 바와 같은 폴리글루타민 결합 펩티드 1 (QBP1), PTD-QBP1, ED11, C4 내부체(intrabody), VL12.3 내부체, MW7 내부체, Happ1 항체, Happ3 항체, mEM48 내부체, 특정 단일클론 항체 (예컨대 1C2) 및 펩티드 P42, 그리고 이들의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 치료용 단백질은 야생형 헌팅턴 단백질 (예컨대 36개 미

만의 반복체를 포함하는 폴리Q 반복 영역을 가지는 헌팅틴 단백질)이다.

[0078] 어떠한 특정 이론에도 얽매하고자 하는 것은 아니나, 야생형 HTT 발현 및 기능이 세포에서 보존되기 때문에, 돌연변이 헌팅틴 (HTT)의 대립유전자-특이적 침묵화는 비-대립유전자 특이적 침묵화 (예컨대 야생형 및 돌연변이 HTT 대립유전자 둘 다의 침묵화)에 비해 대상체에서 향상된 안전성 프로파일을 제공할 수 있다. 본 발명의 측면들은 비-대립유전자-특이적인 방식으로 HTT 유전자를 표적으로 하면서도 경화된(hardened) 야생형 HTT 유전자 (miRNA에 의해 표적화되지 않는 야생형 HTT 유전자)의 발현을 추진하는 하나 이상의 억제성 RNA (예컨대 miRNA) 서열을 포함하는 단리된 핵산 및 벡터가 예를 들면 CNS 조직에서 야생형 HTT의 증가된 발현에 의해 동시적인 돌연변이 HTT 녹다운(knockdown)을 달성할 수 있다는 발명자들의 인지 및 인식과 관련된다. 일반적으로, 내생 야생형 및 돌연변이 HTT mRNA를 코딩하는 핵산과 "경화된" 야생형 HTT mRNA를 코딩하는 트랜스진 핵산의 서열은 충분히 서로 달라서, "경화된" 야생형 HTT 트랜스진 mRNA는 하나 이상의 억제성 RNA (예컨대 miRNA)에 의해 표적화되지 않는다. 이는 예를 들면 HTT 트랜스진 서열에 하나 이상의 침묵 돌연변이를 도입함으로써 그것이 내생 야생형 HTT 유전자와 동일한 단백질을 코딩하나 상이한 핵산 서열을 가지도록 하는 것에 의해 달성될 수 있다. 이와 같은 경우, 외인성 mRNA는 "경화된" 것으로 지칭될 수 있다. 대안적으로, 억제성 RNA (예컨대 miRNA)는 내생 야생형 HTT mRNA의 5' 및/또는 3' 비번역 영역을 표적으로 할 수 있다. 다음에, 이러한 5' 및/또는 3' 영역은 트랜스진 mRNA가 하나 이상의 억제성 RNA에 의해 표적화되지 않도록 트랜스진 mRNA에서는 제거되거나 대체될 수 있다.

[0079] 트랜스진에 제공될 수 있는 리포터 유전자 (예컨대 리포터 단백질을 코딩하는 핵산 서열)에는 비제한적으로 β -락타마제, β -갈락토시다제 (LacZ), 알칼리성 포스파타제, 티미딘 키나제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 클로르암페니콜 아세틸프랜스퍼라제 (CAT), 루시퍼라제, 및 관련 기술분야에 잘 알려져 있는 다른 것들을 코딩하는 DNA 서열이 포함된다. 그의 발현을 추진하는 조절 요소들과 결합될 경우, 리포터 서열은 효소, 방사선사진, 색상측정, 형광 또는 기타 분광사진 검정, 형광 활성화 세포 분류 검정, 그리고 효소 연관 면역흡착제 검정 (ELISA), 방사선면역검정 (RIA) 및 면역조직화학을 포함한 면역학적 검정을 포함한 통상적인 수단에 의해 검출 가능한 신호를 제공한다. 예를 들어, 마커 서열이 LacZ 유전자인 경우, 신호를 보유하는 벡터의 존재는 β -갈락토시다제 활성에 대한 검정에 의해 검출된다. 트랜스진이 녹색 형광 단백질 또는 루시퍼라제인 경우, 신호를 보유하는 벡터는 발광측정기에서 색상 또는 광 생성에 의해 시각적으로 측정될 수 있다. 이와 같은 리포터들은 예를 들면 핵산의 조직-특이적 표적화 능력 및 조직 특이적 프로모터 조절 활성을 검증하는 데에 유용할 수 있다.

[0080] *제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)*

[0081] 일부 측면에서, 본 개시내용은 단리된 AAV를 제공한다. AAV와 관련하여 본원에서 사용될 때, "단리된"이라는 용어는 인공적으로 제조되거나 수득된 AAV를 지칭한다. 단리된 AAV는 제조합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 그와 같은 AAV는 본원에서 "제조합 AAV"로 지칭된다. 제조합 AAV (rAAV)는 바람직하게는 조직-특이적 표적화 능력을 가지고 있어서, rAAV의 뉴클레아제 및/또는 트랜스진이 하나 이상의 예정된 조직(들)으로 특이적으로 전달되게 된다. AAV 캡시드는 이러한 조직-특이적 표적화 능력을 결정하는 데에 있어서 중요한 요소이다. 이에 따라, 조직이 표적화되는 데에 적절한 캡시드를 가지는 rAAV가 선택될 수 있다.

[0082] 원하는 캡시드 단백질을 가지는 제조합 AAV를 수득하기 위한 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다 (예를 들면 그 내용이 전체적으로 본원에 참조로 포함되는 US 2003/0138772호 참조). 통상적으로, 상기 방법은 AAV 캡시드 단백질; 기능성인 *rep* 유전자; AAV 역전 말단 반복체 (ITR) 및 트랜스진으로 구성되는 제조합 AAV 벡터; 및 AAV 캡시드 단백질에의 제조합 AAV 벡터의 패키징화를 가능하게 하기에 충분한 헬퍼(helper) 기능성들을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV의 cap 유전자에 의해 코딩되는 구조 단백질이다. AAV는 모두 대안적인 스플라이싱을 통하여 단일 cap 유전자로부터 전사되는 3종의 캡시드 단백질인 비리온 단백질 1 내지 3 (VP1, VP2 및 VP3으로 지칭됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, VP1, VP2 및 VP3의 분자량은 각각 약 87 kDa, 약 72 kDa 및 약 62 kDa이다. 일부 실시양태에서, 번역시, 캡시드 단백질은 바이러스 게놈 주변으로 구형의 60-량체 단백질 쉘(shell)을 형성한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질의 기능은 바이러스 게놈을 보호하고, 게놈을 전달하며, 숙주와 상호작용하는 것이다. 일부 측면에서, 캡시드 단백질은 조직 특이적인 방식으로 숙주로 바이러스 게놈을 전달한다.

[0083] 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9 및 AAV10으로 구성되는 군에서 선택되는 AAV 혈청형의 것이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 비-인간 영장류로부터 유래하는 혈청형, 예를 들면 AAVrh8 혈청형의 것이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 AAV9 혈청형의

것이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 20에 제시되어 있는 서열을 포함한다.

[0084] AAV 캡시드에 rAAV 벡터를 패키징화하기 위하여 숙주 세포에서 배양될 구성요소들은 트랜스로(*in trans*) 숙주 세포에 제공될 수 있다. 대안적으로, 필요한 구성요소들 중 임의의 하나 이상 (예컨대 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능성)은 관련 기술분야 통상의 기술자에게 알려져 있는 방법을 사용하여 필요한 구성요소 중 하나 이상을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 그와 같은 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 조절하에 필요한 구성요소(들)를 함유하게 된다. 그러나, 필요한 구성요소(들)는 상시성 프로모터의 조절하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 상시성 프로모터의 예는 본원의 트랜스진과 함께 사용하기에 적합한 조절 요소들에 대한 논의에서 제공된다. 또 다른 대안에서, 선택되는 안정한 숙주 세포는 상시성 프로모터의 조절하에 있는 선택된 구성요소(들)를, 그리고 하나 이상의 유도성 프로모터의 조절하에 있는 다른 선택된 구성요소(들)를 함유할 수 있다. 예를 들면, 293 세포 (상시성 프로모터의 조절하에 E1 헬퍼 기능성을 포함함)로부터 유래하나 유도성 프로모터의 조절하에 rep 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 또 다른 안정한 숙주 세포가 생성될 수도 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 단백질 (예컨대 야생형 헌팅틴 단백질, 임의적으로 "경화된" 야생형 헌팅틴 단백질)을 코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 상기한 숙주 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 숙주 세포를 포함하는 상기 조성물은 추가적으로 냉동보존제를 포함한다.

[0086] 본 개시내용의 rAAV를 제조하는 데에 필요한 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열 및 헬퍼 기능성은 어떠한 적절한 유전자 요소 (벡터)를 사용하여서도 패키징화용 숙주 세포로 전달될 수 있다. 선택되는 유전자 요소는 본원에서 기술되는 것들을 포함한 어떠한 적합한 방법에 의해서도 전달될 수 있다. 본 개시내용의 임의 실시양태를 구성하는 데에 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있으며, 유전 공학, 재조합 공학 및 합성 기술이 포함된다. 예를 들면, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]을 참조한다. 마찬가지로, rAAV 비리온을 생성시키는 방법이 잘 알려져 있으며, 적합한 방법의 선택이 본 개시내용에 있어서 제한이 되는 것은 아니다. 예를 들면, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 U.S. 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 삼중 형질감염법 (U.S. 특허 제6,001,650호에 상세하게 기술되어 있음)을 사용하여 제조될 수 있다. 통상적으로, 재조합 AAV는 AAV 입자로 패키징화될 재조합 AAV 벡터 (트랜스진을 포함하는 것), AAV 헬퍼 기능성 벡터 및 액세서리 기능성 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질감염시키는 것에 의해 제조된다. AAV 헬퍼 기능성 벡터는 증식성 AAV 복제 및 캡시드화(encapsidation)에 트랜스로 기능하는 "AAV 헬퍼 기능성" 서열 (즉 rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게는, AAV 헬퍼 기능성 벡터는 조금의 검출가능한 야생형 AAV 비리온 (즉 기능성인 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)도 생성시키지 않는 효율적인 AAV 벡터 제조를 뒷받침한다. 본 개시내용과 함께 사용하기에 적합한 벡터의 비-제한적인 예에는 U.S. 특허 제6,001,650호에 기술되어 있는 pHLP19 및 U.S. 특허 제6,156,303호에 기술되어 있는 pRep6cap6 벡터가 포함되며, 둘 다 전체적으로 본원에 참조로 포함된다. 액세서리 기능성 벡터는 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 AAV가 복제를 위하여 의존하는 세포 기능성 (즉 "액세서리 기능성")을 위한 뉴클레오타이드 서열들을 코딩한다. 액세서리 기능성에는 비제한적으로 AAV 유전자 전사 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, cap 발현 생성물의 합성 및 AAV 캡시드 조립에 연관되어 있는 부분들을 포함한 AAV 복제에 필요한 기능성들이 포함된다. 바이러스-기반 액세서리 기능성은 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 (헤르페스 심플렉스 바이러스 유형-1이 아닌 다른 것) 및 박시니아 바이러스와 같은 알려져 있는 헬퍼 바이러스들 중 어느 것으로부터 유래할 수 있다.

[0088] 일부 측면에서, 본 개시내용은 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. "형질감염"이라는 용어는 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데에 사용되는 것으로써, 외인성 DNA가 세포막 내부로 도입된 경우에 세포는 "형질감염된" 것이다. 수많은 형질감염 기술들이 관련 기술분야에 일반적으로 알려져 있다. 예를 들면 문헌 [Graham et al. (1973) Virology, 52:456], [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York], [Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier] 및 [Chu et al. (1981) Gene 13:197]을 참조한다. 그와 같은 기술들은 뉴클레오타이드 통합 벡터 및 기타 핵산 분자와 같은 하나 이상의 외인성 핵산을 적합한 숙주 세포로 도입하는 데에 사용될 수 있다.

[0089] "숙주 세포"는 해당 물질을 함유하거나 함유할 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 종종, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 숙주 세포는 AAV 헬퍼 구성체, AAV 미니유전자 플라스미드, 액세서리 기능성 벡터, 또는 재조합 AAV

의 제조와 연관되어 있는 다른 이전 DNA의 수용자로 사용될 수 있다. 상기 용어는 형질감염된 기원 세포의 자손을 포함한다. 따라서, 본원에서 사용될 때의 "숙주 세포"는 외인성 DNA 서열에 의해 형질감염된 바 있는 세포를 지칭할 수 있다. 자연적이거나, 우연하거나 또는 고의적인 돌연변이로 인하여, 단일 모체 세포의 자손들이 형태구조 또는 게놈 또는 총 DNA 보체에 있어서 원래의 모체와 반드시 완전히 동일할 필요는 없을 수 있는 것으로 이해된다.

[0090] 본원에서 사용될 때, "세포주"라는 용어는 시험관 내에서 연속적이거나 장기간인 성장 및 분할을 할 수 있는 세포 군집을 지칭한다. 종종, 세포주는 단일 선조 세포로부터 유래하는 클론 군집이다. 그와 같은 클론 군집의 저장 또는 이전 동안 핵형에 있어서 자발적이거나 유도된 변화가 발생할 수 있다는 것 또한 관련 기술분야에 알려져 있다. 따라서, 언급되는 세포주로부터 유래하는 세포들은 조상 세포 또는 배양물과 정확하게 동일하지는 않을 수 있는데, 언급되는 세포주는 그와 같은 변이체들을 포괄한다.

[0091] 본원에서 사용될 때, "제조합 세포"라는 용어는 생물학적으로-활성인 폴리펩티드의 전사 또는 생물학적으로 활성인 핵산 예컨대 RNA의 생성으로 이어지는 DNA 분절과 같은 외인성 DNA 분절이 도입되어 있는 세포를 지칭한다.

[0092] 본원에서 사용될 때, "벡터"라는 용어에는 적절한 조절 요소와 결합될 경우 복제를 할 수 있으며 세포들 사이에서 유전자 서열을 이전할 수 있는 임의의 유전자 요소, 예컨대 플라스미드, 파지, 트랜스포손, 코스미드, 염색체, 인공 염색체, 바이러스, 비리온 등이 포함된다. 따라서, 상기 용어에는 클로닝 및 발현 비히클은 물론, 바이러스 벡터도 포함된다. 일부 실시양태에서, 유용한 벡터는 전사될 핵산 분절이 프로모터의 전사 조절하에 배치되는 벡터인 것으로 생각된다. "프로모터"는 유전자의 특이적인 전사를 개시하는 데에 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다. "작용가능하게 배치된", "조절하에 있는" 또는 "전사 조절하에 있는"이라는 구는 프로모터가 RNA 폴리머라제 개시 및 유전자의 발현을 조절하는 핵산과 관련하여 올바른 위치 및 배향으로 존재한다는 것을 의미한다. "발현 벡터 또는 구성체"라는 용어는 서열을 코딩하는 핵산의 일부 또는 전체가 전사될 수 있는 핵산을 포함하는 임의 유형의 유전자 구성체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 발현에는 예를 들면 전사되는 유전자로부터 생물학적으로-활성인 폴리펩티드 생성물 또는 기능성 RNA (예컨대 가이드 RNA)를 생성시키기 위한 핵산의 전사가 포함된다. 본 개시내용의 rAAV를 제조하기 위한 원하는 AAV 캡시드에의 제조합 벡터의 전기한 패키징화 방법이 제한되는 것을 의미하는 것은 아니며, 숙련 기술자라면 다른 적합한 방법이 떠오르게 될 것이다.

[0093] 일부 실시양태에서는, 서열 목록에서 제공되는 서열을 포함한 본원에서 제공되는 서열 중 임의의 하나 이상 티미딘 (T) 뉴클레오티드 또는 우리딘 (U) 뉴클레오티드가 아데노신 뉴클레오티드와의 염기 쌍형성 (예컨대 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍을 포함)에 적합한 임의의 다른 뉴클레오티드로 대체될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 서열 목록에서 제공되는 서열을 포함한 본원에서 제공되는 서열 중 임의의 하나 이상 티미딘 (T) 뉴클레오티드는 우리딘 (U) 뉴클레오티드로 적합하게 대체될 수 있거나, 또는 그 반대이다.

[0094] 투여 양식

[0095] 본 개시내용의 rAAV는 관련 기술분야에 알려져 있는 임의의 적절한 방법에 따라 조성물 중에서 대상체에게 전달될 수 있다. 예를 들면, 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 담체에 현탁된 (즉 조성물 중의) rAAV가 대상체, 즉 숙주 동물, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니 피그, 햄스터, 닭, 칠면조 또는 비-인간 영장류 (예컨대 마카크)에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 숙주 동물에 인간이 포함되지 않는다.

[0096] 포유동물 대상체로의 rAAV의 전달은 예를 들면 근육내 주사에 의하거나, 또는 포유동물 대상체 혈류로의 투여에 의할 수 있다. 혈류로의 투여는 정맥, 동맥 또는 임의의 다른 혈관의 주사에 의할 수 있다. 일부 실시양태에서, rAAV는 수술 관련 기술분야에 잘 알려져 있는 기술인 격리된 사지 관류(isolated limb perfusion)에 의해 혈류로 투여되는데, 상기 방법은 본질적으로 통상의 기술자가 rAAV 비리온의 투여 전에 전신 순환으로부터 사지를 격리하는 것을 가능하게 한다. U.S. 특허 제6,177,403호에 기술되어 있는 격리된 사지 관류 기술의 변형 역시 근육 세포 또는 조직으로의 형질도입을 잠재적으로 강화하기 위하여 격리된 사지의 혈관구조에 비리온을 투여하는 데에 숙련 기술자에 의해 사용될 수 있다. 또한, 어떤 경우에는, 대상체의 CNS로 비리온을 전달하는 것이 바람직할 수 있다. "CNS"는 척추동물 뇌 및 척수의 모든 세포 및 조직을 의미한다. 따라서, 상기 용어에는 뉴런 세포, 신경아교세포, 별아교세포, 뇌척수액 (CSF), 간질 공간, 골, 연골 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 제조합 AAV는 예컨대 뇌실 영역에의 주사에 의해 직접 CNS 또는 뇌로는 물론, 정위 주사에 의하는 것과 같이 관련 기술분야에 알려져 있는 신경외과적 기술을 사용하여 바늘, 카테터 또는 관련 장치에 의해 선조

체 (예컨대 선조체의 미상핵 또는 조가비핵), 척수 및 신경근 이음부 또는 소뇌 소엽으로 전달될 수 있다 (예컨대 문헌 [Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999]; [Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000]; [Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993]; 및 [Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000] 참조). 일부 실시양태에서, 본 개시내용에서 기술되는 바와 같은 rAAV는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 뇌내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 수막강내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 선조체내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 두개내 주사에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 대조(cisterna magna) 주사에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 뇌 외측 뇌실 주사에 의해 전달된다.

[0097] 본 개시내용의 측면들은 캡시드 단백질 및 트랜스진을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 여기서 상기 트랜스진은 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각 miRNA는 서열식별번호: 2-10 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 또한 AAV ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 rAAV는 서열식별번호: 16-19 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열 또는 그의 일부로 표시되는 rAAV 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 추가적으로 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0098] 본 개시내용의 조성물은 단독, 또는 하나 이상의 다른 바이러스 (예컨대 하나 이상의 다른 트랜스진을 코딩하여 보유하는 제2의 rAAV)와의 조합으로써 rAAV를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 각각 하나 이상의 서로 다른 트랜스진을 가지는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10종 또는 그 이상의 서로 다른 rAAV를 포함한다.

[0099] 적합한 담체는 rAAV가 가이드되는 지시의 관점에서 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 한 가지 적합한 담체로는 다양한 완충 용액과 배합될 수 있는 식염수가 포함된다 (예컨대 포스페이트 완충 식염수). 다른 대표적인 담체에는 멸균 식염수, 락토스, 수크로스, 칼슘 포스페이트, 젤라틴, 텍스트란, 아가, 펙틴, 땅콩 오일, 참깨 오일 및 물이 포함된다. 담체의 선택이 본 개시내용의 제한이 되는 것은 아니다.

[0100] 임의적으로, 본 개시내용의 조성물은 rAAV 및 담체(들) 이외에 다른 통상적인 제약용 성분들, 예컨대 보존제 또는 화학적 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 대표적인 보존제에는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화 황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀이 포함된다. 적합한 화학적 안정화제에는 젤라틴 및 알부민이 포함된다.

[0101] rAAV는 원하는 조직의 세포를 형질감염시키기에, 그리고 과도한 부작용 없이 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하기에 충분한 양으로 투여된다. 통상적인 제약상 허용되는 투여 경로에는 선택된 기관으로의 직접 전달 (예컨대 간으로의 문맥내 전달), 경구, 흡입 (비내 및 기관내 전달 포함), 안내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 종양내 및 기타 비경구 투여 경로가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 원할 경우, 투여 경로들이 조합될 수도 있다.

[0102] 특정 "치료 효과"를 달성하는 데에 필요한 rAAV 비리온의 투여량, 예를 들면 체중 킬로그램 당/게놈 카피수 (GC/kg)로 나타낸 투여량 단위는 비제한적으로 하기를 포함한 몇 가지 인자들을 기준으로 가변적이게 된다: rAAV 비리온 투여의 경로, 치료 효과를 달성하는 데에 필요한 유전자 또는 RNA 발현의 수준, 치료되는 구체적인 질환 또는 장애, 및 유전자 또는 RNA 생성물의 안정성. 관련 기술분야 통상의 기술자라면 상기 언급된 인자들은 물론 관련 기술분야에 잘 알려져 있는 다른 인자들을 기준으로 특정 질환 또는 장애를 가지고 있는 환자들을 치료하기 위한 rAAV 비리온 투여량 범위를 용이하게 결정할 수 있다.

[0103] rAAV의 유효량은 원하는 조직을 표적으로 하여 동물을 표적 감염시키기에 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, rAAV의 유효량은 안정한 체세포 트랜스제닉 동물 모델을 생성시키기에 충분한 양이다. 유효량은 일차적으로 대상체의 종, 연령, 체중, 건강, 그리고 표적화될 조직과 같은 인자들에 따라 달라지게 되며, 그에 따라 동물 및 조직간에 가변적일 수 있다. 예를 들면, rAAV의 유효량은 일반적으로 약 10^9 내지 10^{16} 개의 게놈 카피를 함유하는 용액 약 1 ml 내지 약 100 ml의 범위이다. 일부 경우에는, 약 10^{11} 내지 10^{13} 개 사이 rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 특정 실시양태에서는, 10^{12} 또는 10^{13} 개의 rAAV 게놈 카피가 CNS 조직을 표적화하는 데에 효과적이다. 일부 경우에, 안정한 트랜스제닉 동물은 다수의 rAAV 투여에 의해 생성된다.

[0104] 일부 실시양태에서, rAAV의 투여분은 역일(calendar day) (예컨대 24-시간 기간) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV의 투여분은 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 역일 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다.

일부 실시양태에서, rAAV의 투여분은 역주(calendar week) (예컨대 7 역일) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV 투여분은 격주 (예컨대 2 역주 기간에 1회) 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV 투여분은 역월 (calendar month) 당 1회 (예컨대 30 역일에 1회) 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV 투여분은 6 역월 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV 투여분은 역년(calendar year) (예컨대 365일 또는 윤년의 경우 366일) 당 1회 이하로 대상체에게 투여된다.

[0105] 일부 실시양태에서, rAAV 조성물은 특히 고농도의 rAAV가 존재하는 경우 (예컨대 $\sim 10^{13}$ GC/ml 또는 그 이상) 조성물 중 AAV 입자의 응집을 감소시키도록 배합된다. rAAV의 응집을 감소시키는 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있는데, 예를 들면 계면활성제의 첨가, pH 조정, 염 농도 조정 등이 포함된다 (예컨대 그 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178] 참조).

[0106] 제약상-허용되는 부형제 및 담체 용액의 배합에 대해서는 관련 기술분야 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는데, 다양한 치료 요법에서의 본원에서 기술되는 특정 조성물을 사용하기 위한 적합한 투여 및 치료 요법의 개발도 그러하다.

[0107] 통상적으로, 이러한 배합물은 적어도 약 0.1 % 또는 그 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 상기 백분율은 당연히 가변적일 수 있으며, 편리하게도 총 배합물 중량 또는 부피의 약 1 또는 2 % 내지 약 70 % 또는 80 % 또는 그 초과 사이일 수 있다. 물론, 각 치료상-유용한 조성물 중 활성 화합물의 양은 어떠한 주어진 화합물의 단위 투여분에서도 적합한 투약량이 수득되게 되는 방식으로 준비될 수 있다. 관련 기술분야 통상의 기술자라면, 그와 같은 제약용 배합물을 제조함에 있어서 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 생성물 저장 수명과 같은 인자들은 물론, 다른 약학적 고려사항들을 고려하게 될 것이므로, 말 그대로 다양한 투약량 및 치료 요법들이 바람직할 수 있다.

[0108] 소정의 상황에서는, 본원에서 개시되는 적합하게 배합된 제약용 조성물 중 rAAV-기반 치료용 구성체를 피하, 체장내, 비내, 비경구, 정맥내, 근육내, 수막강내 또는 경구, 복강내 중 어느 하나로, 또는 흡입에 의해 전달하는 것이 바람직하게 된다. 일부 실시양태에서는, U.S. 특허 제5,543,158호; 5,641,515호 및 5,399,363호 (각각 그 전체가 구체적으로 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있는 바와 같은 투여 양태들이 rAAV를 전달하는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바람직한 투여 양식은 문맥 주사에 의한 것이다.

[0109] 주사가능 용도에 적합한 제약용 형태에는 멸균 수용액 또는 분산액, 그리고 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 중에서, 그리고 오일 중에서 제조될 수도 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건하에서, 이러한 조제물들은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 많은 경우에서, 상기 형태는 멸균되며, 용이한 주사성 (syringability)이 존재하는 정도까지 유동성이다. 그것은 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존되어야 한다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항세균 및 항진균 작용제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들면 당 또는 나트륨 클로라이드를 포함시키는 것이 바람직하게 된다. 주사가능 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 조성물 중 사용에 의해 달성될 수 있다.

[0110] 주사가능 수용액 투여의 경우, 예를 들면 용액은 필요에 따라 적합하게 완충된 것, 및 먼저 충분한 식염수 또는 글루코스를 사용하여 등장화된 액체 희석제일 수 있다. 이러한 특정 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여서는, 사용될 수 있는 멸균 수성 매체가 관련 기술분야 통상의 기술자에게 알려져 있을 것이다. 예를 들면, 1 투약량이 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해된 후, 1000 ml의 피하주입 유체에 첨가되거나, 또는 제안된 주입 부위에 주사되는 것 중 어느 하나일 수 있다 (예를 들면 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 숙주의 조건에 따라 약간의 투약량 변동은 반드시 발생하게 된다. 어떠한 경우에도, 투여를 담당하는 사람이 개별 숙주를 위한 적절한 투여량을 결정하게 된다.

[0111] 멸균 주사가능 용액은 필요에 따라 본원에서 열거되는 다양한 다른 성분들과 함께 활성 rAAV를 필요한 양으로 적절한 용매에 혼합한 후, 이어서 여과 멸균하는 것에 의해 제조된다. 일반적으로, 분산액은 상기에서 열거된

것들에 속하는 기본 분산 매체 및 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균 활성 성분들을 혼합하는 것에 의해 제조된다. 멸균 주사가능 용액 제조용 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 그들의 미리 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 더하기 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공-건조 및 냉동-건조 기술이다.

[0112] 본원에서 개시되는 rAAV 조성물은 중성 또는 염 형태로 배합될 수도 있다. 제약상-허용되는 염에는 산 부가염 (단백질의 유리 아미노기에 의해 형성됨)이 포함되는데, 예를 들면 염산 또는 인산과 같은 무기 산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기 산과 형성된다. 유리 카르복실 기를 사용하여 형성되는 염은 예를 들면 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철 히드록시드와 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래할 수 있다. 배합시, 용액은 투약 배합물과 상용성인 방식으로, 그리고 치료적으로 유효한 만큼의 양으로 투여되게 된다. 배합물은 주사가능 용액, 약물-방출 캡슐 등과 같은 다양한 투약 형태로 용이하게 투여된다.

[0113] 본원에서 사용될 때, "담체"에는 임의의 모든 용매, 분산 매체, 비히클, 코팅, 희석제, 항세균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등이 포함된다. 제약 활성 물질용으로서의 그와 같은 매체 및 작용제들의 사용에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 보충 활성 성분이 조성물에 혼합될 수도 있다. "제약상-허용되는"이라는 구는 숙주에게 투여되었을 때 알레르기 반응 또는 유사한 원치 않는 반응을 야기하지 않는 분자 물질 및 조성물을 지칭한다.

[0114] 적합한 숙주 세포에의 본 개시내용 조성물의 도입을 위하여, 리포좀, 나노캡슐, 미세입자, 미세구체, 지질 입자, 소포 등과 같은 전달 비히클이 사용될 수 있다. 특히, rAAV 벡터 전달 트랜스진은 지질 입자, 리포좀, 소포, 나노구체 또는 나노입자 등 중 어느 하나에의 캡슐화된 전달용으로 제제화될 수 있다.

[0115] 그와 같은 제제는 본원에서 개시되는 핵산 또는 rAAV 구성체의 제약상 허용되는 배합물의 도입에 바람직할 수 있다. 리포좀의 형성 및 사용에 대해서는 관련 기술분야 통상의 기술자에게 일반적으로 알려져 있다. 최근에는, 향상된 혈청 안정성 및 순환 반감기를 가지는 리포좀이 개발되었다 (U.S. 특허 제5,741,516호). 또한, 잠재적인 약물 담체로서의 리포좀 및 리포좀 유사 조제물의 다양한 방법들이 기술되어 있다 (U.S. 특허 제 5,567,434호; 5,552,157호; 5,565,213호; 5,738,868호 및 5,795,587호).

[0116] 리포좀은 다른 절차에 의한 형질감염에 대해서는 보통 내성인 수많은 세포 유형과 함께 성공적으로 사용되어 왔다. 또한, 리포좀에는 바이러스-기반 전달 시스템에서 통상적인 DNA 길이 제약이 없다. 리포좀은 다양한 배양 세포주 및 동물에 유전자, 약물, 방사선치료제, 바이러스, 전사 인자 및 알로스테릭 이펙터(allosteric effector)를 도입하는 데에 효과적으로 사용되어 왔다. 또한, 리포좀-매개 약물 전달의 효과성을 조사하는 몇 가지 성공적인 임상 시험들이 완료된 바 있다.

[0117] 리포좀은 수성 매체 중에 분산되어 자발적으로 다층상 동심 이중층 소포 (다층상 소포 (MLV)로도 지칭됨)를 형성하는 인지질로부터 형성된다. MLV는 일반적으로 25 nm 내지 4 μ m의 직경을 가진다. MLV의 초음파처리하는 200 내지 500 Å 범위의 직경을 가지며 코어에 수용액을 함유하는 소형 단층상 소포 (SUV)의 형성을 발생시킨다.

[0118] 대안적으로, rAAV의 나노캡슐 제제가 사용될 수 있다. 나노캡슐은 일반적으로 안정하고 재현가능한 방식으로 물질을 포획할 수 있다. 세포내 중합체 파부하로 인한 부작용을 방지하기 위하여, 그와 같은 초미세 입자 (0.1 μ m 가량의 크기)는 생체 내에서 분해될 수 있는 중합체를 사용하여 설계되어야 한다. 이러한 요건을 충족하는 생분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자가 사용 고려된다.

[0119] 상기한 전달 방법들에 더하여, 하기하는 기술들도 숙주에의 rAAV 조성물의 대안적인 전달 방법으로 고려된다. 초음파영동(sonophoresis) (즉 초음파)이 사용된 바 있는데, 순환 시스템으로서, 그리고 그를 통한 약물 투과 속도 및 효능을 강화하기 위한 장치로서 U.S. 특허 제5,656,016호에 기술되어 있다. 고려되는 다른 약물 전달 대안으로는 골내 주사 (U.S. 특허 제5,779,708호), 마이크로칩 장치 (U.S. 특허 제5,797,898호), 안구 제제 (문헌 [Bourlais et al., 1998]), 경피 매트릭스 (U.S. 특허 제5,770,219호 및 5,783,208호) 및 피드백 (feedback)-조절 전달 (U.S. 특허 제5,697,899호)이 있다.

[0120] **키트 및 관련 조성물**

[0121] 일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 작용제는 치료, 진단 또는 연구 적용분야에서의 그의 사용을 용이하게 하기 위한 제약용 또는 진단용 또는 연구용 키트로 조립될 수 있다. 키트는 본 개시내용의 구성요소들 및 사용 지침을 수용하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 구체적으로, 그와 같은 키트는 해당 작용제의 예정된 적용분야 및 적정한 사용에 대해 기술하는 지침과 함께 본원에서 기술되는 하나 이상의 작용제를 포함할 수 있다.

특정 실시양태에서, 키트 내의 작용제는 특정 적용분야 및 작용제의 투여 방법에 적합한 제약용 제제 및 투약분으로 존재할 수 있다. 연구 목적의 키트는 다양한 실험을 전개하는 데에 적절한 농도 또는 양으로 구성요소들을 포함할 수 있다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 rAAV를 생성시키기 위한 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는 서열식별번호: 2-10 중 어느 하나에 제시되어 있는 서열을 포함하거나 그에 의해 코딩되는 miRNA를 포함하는 단리된 핵산을 수용하는 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 또한 AAV 캡시드 단백질, 예를 들면 AAV9 캡시드 단백질을 코딩하는 단리된 핵산을 수용하는 용기를 포함한다.

[0123] 키트는 연구자들에 의한 본원에서 기술되는 방법의 사용을 용이하게 하도록 설계될 수 있으며, 많은 형태를 취할 수 있다. 키트 중 조성물 각각은 해당될 경우 액체 형태로 (예컨대 용액 중으로), 또는 고체 형태 (예컨대 건조 분말)로 제공될 수 있다. 특정 경우에는, 조성물 중 일부가 예를 들면 키트와 함께 제공될 수 있거나 제공되지 않을 수 있는 적합한 용매 또는 다른 중 (예컨대 물 또는 세포 배양 배지)의 첨가에 의해 (예컨대 활성인 형태로) 구성가능하거나 달리 가공가능할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "지침"은 지침 및/또는 홍보물의 구성요소로 정의될 수 있는데, 통상적으로 본 개시내용의 패키지화에 대한 것이거나 그와 연관된 기재된 지침을 포함한다. 지침에는 지침이 키트와 연관되어 있는 것임을 사용자가 분명하게 인식하게 되도록 하는 소정의 방식으로 제공되는 임의의 구두 또는 전자 지침, 예를 들면 시청각 (예컨대 비디오테이프, DVD 등), 인터넷 및/또는 웹-기반 통신 등도 포함될 수 있다. 기재된 지침은 제약용 또는 생물학적 생성물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 부처에 의해 규정된 형태로 존재할 수 있는데, 상기 지침은 동물 투여용 제조, 사용 또는 판매 부처에 의한 승인을 반영할 수도 있다.

[0124] 키트는 하나 이상의 용기 내에 본원에서 기술되는 구성요소들 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 예로서, 일 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 키트 구성요소들을 혼합하는 것, 및/또는 샘플을 단리하고 혼합하는 것, 및 대상체에게 적용하는 것에 대한 지침을 포함할 수 있다. 키트는 본원에서 기술되는 작용제를 수용하는 용기를 포함할 수 있다. 상기 작용제는 액체, 젤 또는 고체 (분말)의 형태로 존재할 수 있다. 작용제는 멸균 제조되어, 주사기 내에 포장된 후, 냉동 출하될 수 있다. 대안적으로, 그것은 바이알 또는 다른 저장 용기에 수용될 수 있다. 제2의 용기가 멸균 제조된 다른 작용제를 포함할 수도 있다. 대안적으로, 키트는 사전혼합되어 주사기, 바이알, 튜브 또는 다른 용기 내로 출하되는 활성 작용제를 포함할 수 있다.

[0125] 하기 실시예에 의해, 본 발명의 대표적인 실시양태들이 더욱 상세하게 기술될 것이다. 이들 실시양태는 본 발명을 대표하는 것으로서, 관련 기술분야 통상의 기술자라면, 대표적인 실시양태로 제한되는 것은 아님을 알고 있을 것이다.

[실시예]

[실시예 1: 재료 및 방법]

[0128] 세포 배양 및 스크리닝 검정

[0129] DMEM, 10 % 열 불활성화된 FBS를 사용한 고도 글루코스 및 1 % 페니실린 스트렙토마이신 (써모피셔 (ThermoFisher) 사) 중에서 헬라 세포를 유지하였다. 형질감염 24-시간 전에, 세포를 6-웰 플레이트상에 $0.8-1.0 \times 10^6$ 세포/웰로 시딩하였다. 형질감염 일자에, 성장 배지를 1.6 ml의 옵티(Opti)-MEM (써모피셔 사)으로 대체하였다. 2 μ l/웰의 다르마펙트 듀오(DharmaFECT Duo) (다르마콘(Dharmacon) 사)를 사용하여 플라스미드를 형질감염시켰다. 각 웰은 0.6 μ g의 플라스미드 DNA를 수용하였다. 형질감염 48시간 후, 세포를 수확하고, 미르바나(MirVana) RNA 단리 키트를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1 μ g의 RNA/올리고-dT 및 수퍼스크립트(Superscript) III (인비트로젠 사)를 사용하는 반응을 사용하여 cDNA를 생성시켰다. 타크만(TaqMan) 검정 (써모피셔 사)을 사용하여 헌팅틴 mRNA를 측정하였다. 하우스키퍼 유전자(housekeeping gene)로서 인간 히포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT)를 사용하는 $\Delta \Delta C(T)$ 법을 사용하여 상대적인 헌팅틴 mRNA 수준을 계산하였다.

[0130] 마우스 수용, 주사 및 유지

[0131] YAC128 및 야생형 FVB 마우스를 입수하였다. 야생형 수컷 마우스를 YAC128 암컷과 교배시키는 것에 의해 마우스를 FVB 배경에서 사육하였다. 생성되는 이형접합 YAC128 및 야생형 마우스를 12:12 광 일정으로 유지하면서, 임의의 먹이 및 물에 대한 접근권을 주었다. 꼬리 단편 또는 귀 천공물로부터 추출된 DNA의 PCR에 의해 유전형을 검증하였다. UMPC3 또는 UMPC4 미세주사기 (월드 프레시전 인스트루먼트(World Precision Instruments))

사, 플로리다 사라소타 소재)의 도움으로 소형 동물 스테레오택스(stereotax) SAS-4100 (ASI 인스트루먼트(Instruments) 사, 미시간 와켄 소재)에 의해 마우스의 선조체에 직접 선택된 AAV를 주사하였다. 284 mg/kg의 트리브로모에탄올을 사용하여 마우스를 마취한 후, 스테레오택스에 위치시켰다. 정수리점을 0점으로 사용하여 수술을 수행하고, 전방 1.0 mm, 측면 2.0 mm를 측정 한 후, 33 게이지 바늘을 선조체로 3.0 mm 내렸다. 125 nl/분의 속도로 3.0 μ l를 전달하도록 펌프를 설정하였다. 주사 후, 가온 패드상에서 마우스를 회복시킨 다음, 다시 수용 영역의 해당 케이지에 위치시켰다.

[0132] 조직 추출

[0133] 적절한 시점에, 마우스를 희생시키고, RNA 분석 또는 면역조직화학용으로 조직을 추출하였다. RNA 추출의 경우, 마우스를 마취한 후, 경부 탈구에 의해 사망시켰다. 뇌를 제거하고, 선조체를 절제 분리하였다. 가용할 경우, GFP 발현을 사용하여 절제를 가이드함으로써, GFP 양성 조직만을 분석하였다. 조직을 즉시 RNA레이터(RNAlater) (암비온(Ambion) 사)에 위치시켰다. 이어서, 그것을 -80 °C에서 냉동 저장하였다. 실험 종료 시에는, 면역조직화학용으로 예정된 마우스를 깊게 마취하고, 식염수 후 이어서 4 % 파라포름알데히드를 심장내로 관류하였다. 샘플을 저온 2 % 파라포름알데히드에 밤새 후고정한 다음, 4 °C로 포스페이트 완충 식염수 중에 저장하였다. 레이카(Leica) VT1000s 비브라툼(vibratome)에서 40 마이크로미터 절편을 슬라이싱함으로써, 관상 절편을 제조하였다.

[0134] 마우스 행동

[0135] 평균대 보행: (평균대 크기) 평균대를 건너도록 마우스를 훈련시켰다. 훈련 후, 그것이 평균대의 하나의 단부로부터 다른 단부로 건널 때, 마우스를 기록하였다. 마우스 당 3회의 시도를 기록하였다. 기록을 바탕으로, 마우스가 평균대의 하나의 단부상 표시로부터 다른 단부로 건너는 데에 걸리는 시간량을 측정하였다.

[0136] 거주 케이지 활성화: 마우스를 26시간 동안 단독으로 자동화된 거주 케이지 페노타이핑 스캐닝 시스템(phenotyping scanning system) (클레버(Clever) Sys, Inc. 사, 버지니아 레스턴 소재)에 위치시켰다. 시간당 평균 활성화 시간을 계산하기 위하여, 마우스가 새로운 환경에 적응하는 첫 번째 데이터 시간을 삭제한 다음; 총 보행 기록 시간 빼기 1시간으로 나눈 보행에 소요된 총 시간을 계산하였다.

[0137] 면역조직화학 및 정량

[0138] 3 % 수소 퍼옥시드를 사용하여 3분 동안 고정된 조직 슬라이스를 블로킹한 다음, 0.5 % 트리톤(triton) x를 사용하여 20분 동안 인큐베이션하였다. 토끼 또는 마우스 유래 항체용 벡터 라보라토리즈 엘리트(Vector Laboratories Elite) ABC 키트 시약을 사용하여 DARPP32 (아브캄(Abcam) 사 ab40801; 1:10,000 희석), Iba1 (와코(Wako) 사 019-19741; 1:1,000 희석), GFP (라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 사 G10362; 1:1000 희석) 및 NeuN (EMD 밀리포어(Millipore) 사 MAB377; 1:1000 희석)에 대하여 면역조직화학을 수행하였다. 금속 강화 DAB 기제 키트 (피어스(Pierce) 사)를 사용하여 디아미노벤지딘으로 2분 동안 절편을 염색하였다.

[0139] 소형 RNA 라이브러리 클로닝 및 분석

[0140] 미르바나 RNA 단리 키트를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 15 % 변성 폴리아크릴아미드 겔상에서 5 μ g의 총 RNA를 사용하여 18-30개 뉴클레오타이드 RNA의 크기 선택을 수행하였다. 크기 선택 후, 소형 RNA는 에탄올 침전시키고, 아데닐레이트화-전 3'-어댑터 (5'-rAppTGGGAATTCCTCGGTGCCAAGG/ddC/-3'; 서열식별번호: 11)에 결합시켰다. 결합 생성물을 RT 프라이머 (5'-CCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'; 서열식별번호: 12)에 어닐링하고, 5'-어댑터 (RNA: 5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-3'; 서열식별번호: 13)에 결합시켰다. AMV 역전사 혼합물 (NEB 사)을 사용하여 역전사를 수행하고, 하나의 범용 프라이머 (5'-AATGATACGCGACCCAGATCTACACGTTCTACAGTCCGA-3'; 서열식별번호: 14) 및 하나의 바코드화된 프라이머 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'; 서열식별번호: 15)와 함께 아큐프라이임(AccuPrime) Pfx DNA 폴리머라제 (인비트로젠 사)를 사용하여, PCR 증폭하였다. 라이브러리를 서열분석하고, mm9 게놈 및 AAV 게놈에 대하여 맵핑하였다. miRNA 헤어핀상에서의 5'-말단 맵핑의 위치를 기반으로 miRNA 종을 분류하였는데, 이에 따라 각 종은 공유된 시드 서열을 가지는 모든 소형 RNA로 구성되었다. 종 할당에서 3'-말단은 고려되지 않았다. 엣지(edge)R 패키지를 사용하여 차별적인 내생 miRNA의 발현을 분석하였다.

[0141] mRNA 라이브러리 클로닝 및 분석

[0142] 상기와 같이 RNA를 추출하였다. 표준 방법에 의해 라이브러리를 구축하였다. 탑햇(topHat)2를 사용하여 관독치를 맵핑하고, 데세크(deseq)2 패키지를 사용하여 차등 발현을 계산하였다.

[0143] 양 실험

[0144] 헌팅톤병의 트랜스제닉 양 모델 (예컨대 병원성 인간 헌팅틴 단백질을 발현하는 트랜스제닉 양)에 scAAV9-CBA-mir-HTT (mir-155 백본에 miRNA 6433을 포함함), scAAV-U6-mir-HTT (mir-155 백본에 miRNA 6433을 포함함) 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나를 주사하였다. 주사 1개월 후 또는 6개월 후 중 어느 하나에 양을 희생시켰다. 조직 및 핵산 샘플을 제조하고, 정량 PCR 및 면역조직화학에 의해 분석하였다.

[0145] 실시예 2: 마우스 생체내 실험

[0146] 헌팅틴 표적화 인공 miRNA의 설계 및 선택

[0147] 인간 헌팅틴 mRNA를 표적으로 하는 9종의 서열 (표 1, 도 1)을 시험하였다. 9개의 표적으로 하는 서열 위치의 개략적인 도식을 도 4a에 나타내었다. 인공 miRNA의 2개 카피를 동시에 내생 miRNA-155 또는 miR-30을 기반으로 하는 백본에 클로닝하고, 전체 인공 miRNA를 EGFP의 3'-UTR에 삽입하였다 (도 5a, 상단). mir-155-기반 및 mir-30-기반 항-HTT amiRNA의 예상 헤어핀 구조를 각각 도 25a-25b에 나타내었다. 생성되는 플라스미드를 헬라 세포에 형질감염시켰다. 48시간 후, 세포를 수확하고, 정량 RT-PCR (qRT-PCR)에 의해 내생 헌팅틴 mRNA의 수준을 측정하였다. 9종의 인공 miRNA 중 3종이 50 % 초과만큼 헌팅틴을 감소시켰다 (도 1-2 및 4b-4c).

표 1: 헌팅틴 mir 표적

명칭	성숙한 miRNA 서열	SEQ ID NO:
miR-1873-항-HTT	5'-TAAATGTGCCTGTTGAAGGGC-3'	2
miR-2029-항-HTT	5'-AAGAGGTGCAGAGTCATCATC-3'	3
miR-4173-항-HTT	5'-TTCTGGAGGACATCAAACCAT-3'	4
miR-4448-항-HTT	5'-TGAAGTGGCCCACTTCAATGT-3'	5
miR-6088-항-HTT	5'-TTCCATTGGCAACTGGGCCAT-3'	6
miR-6433-항-HTT	5'-TAAGCATGGAGCTAGCAGGCT-3'	7
miR-TS1-항-HTT	5'-TAGCGTTGAAGTACTGTCCCC-3'	8
miR-TS2-항-HTT	5'-TTGAGGCAGCAGCGGCTGTGC-3'	9
miR-E14-항-HTT	5'-TTCATCAGCTTTTCCAGGGTC-3'	10

[0148]

[0149] 최초 스크린으로부터 3종의 서열이 생체내 실험용으로 선택되었다. 공지의 siRNA (E1.4)를 기반으로 하는 인공 miRNA도 시험하였다. 후보 서열들을 자가-상보성 AAV9 벡터에 패키징화한 후, 대략 128개의 폴리글루타민 코딩 반복체의 연장체를 가지는 인간 헌팅틴을 발현하는 트랜스제닉 마우스 (Yac128 마우스)의 선조체에 직접 그것을 주사하였다. 1개월 후, 3종의 상이한 투여량에서 AAV9의 분포 및 GFP 리포터의 발현을 평가하였다. 최고 투여량에서, 선조체 전체에 걸쳐 GFP 염색이 존재하였으며 (도 11a), AAV9-C β A-항-HTT-6433 (p=0.006) 또는 AAV9-C β A-항-HTT-5155 (p=0.013, 도 4c; mir-155 백본을 사용하였음) 중 어느 하나로 처리된 마우스에서 인간 헌팅틴 mRNA가 상당히 감소되었다. 벡터의 투여량을 감소시키는 것은 감소된 GFP 발현 (도 11a)을 발생시켰으며, 1:10 희석에서는 인간 헌팅틴 mRNA의 상당한 감소가 달성되지 않았다 (도 11b). 도 11c는 3종의 상이한 투여량으로 헌팅틴 표적화 miRNA 및 EGFP 양자를 코딩하는 벡터가 주사된 마우스의 대표적인 사진을 제공한다.

[0150] U6 프로모터로부터 인공 miRNA를 발현시키는 것은 헌팅틴의 침묵화를 향상시키지 않는다

[0151] 가장 강력한 miRNA (HTT-6433)의 단일 카피를 U6 프로모터의 조절하에 AAV9 벡터로 클로닝하였다 (도 5a, 하단). 마우스에 편측으로 원래의 2개 카피 AAV9-CBA-항-HTT-6433 (서열식별번호: XX 포함), AAV9-CBA-항-HTT-5155, AAV9-U6-항-HTT-6433 (서열식별번호: XX 포함) 또는 AAV9-U6-항-HTT-5155 중 어느 하나를 주사하였다. 1개월 후, 선조체를 수확하고, GFP 발현을 확인한 후, qRT-PCR에 의해 헌팅틴 mRNA의 수준을 측정하였다. 인공 miRNA의 서열에 관계없이, AAV9-U6-항-HTT 및 AAV9-CBA-항-HTT로 처리된 마우스 사이에 상당한 녹다운 차이는 관찰되지 않았다. AAV9-U6-항-HTT-6433 및 AAV9-CBA-항-HTT-6433로 처리된 마우스 둘 다에서, 주사된 측면에서의 헌팅틴 mRNA의 양이 비-주사 측면에서의 것의 대략 50 %였다 (도 5b). 각 동물의 대조로서 반대쪽 (비-주사) 측면을 사용하는 것이 동물 대 동물 가변성을 감소시킨다는 것에 유의한다. 편측으로 AAV9-GFP가 주사된 마우스에서는, 반대쪽 측면에서 종종 적은 수의 GFP 양성 뉴런이 관찰됨으로써, 일부 바이러스가 비-주사 측면으로 확산된다는 것을 표시하였다. 따라서, 반대쪽 측면을 대조로 사용하는 것은 녹다운을 저평가할 수 있다.

대조로서 반대쪽 측면을 사용하는 것의 잠재적인 교란 효과를 제거하기 위하여, 대조로서 PBS만이 주사된 동물 군을 사용하여 실험을 반복하였다. 데이터는 AAV9-U6-항-HTT-6433 및 AAV9-CBA-mir-HTT-6433 둘 다가 대략 50 %까지 헌팅틴 mRNA를 감소시킨다는 것을 표시하였다 (도 5c).

[0152] U6 프로모터로부터의 *mir-HTT-6433*의 장기 선조체 발현은 마우스에서 독성이다

[0153] AAV9-U6-항-HTT-6433 또는 AAV9-CBA-항-HTT-6433을 Yac128 마우스의 선조체에 직접 편측으로 주사하였다. 주사 6개월 후, AAV9-U6-항-HTT-6433이 주사된 마우스가 보금자리를 틀지 않고 일부가 과다활성 표현형을 나타낸다는 것이 관찰되었다. 이러한 이상을 기록하기 위하여, 각 케이지의 네슬렛(nestlet)을 교체하였다. 24-시간 후, AAV9-U6-항-HTT-6433의 새로운 네슬렛은 사용되지 않은 반면, PBS 및 AAV9-CBA-항-HTT-6433 주사된 마우스는 예상대로 보금자리를 틀었다 (도 6a). 거주-케이지 모니터링 시스템을 사용하여, 마우스를 24시간 동안 기록하였다. AAV9-U6-항-HTT-6433으로 처리된 마우스는 PBS 또는 AAV9-CBA-항-HTT-6433으로 처리된 마우스에 비해 상당히 더 많은 시간을 그의 거주 케이지 주변으로 움직이면서 소요하였다 (도 6b). 마우스가 평균대를 건너는 데에 걸리는 평균 시간도 측정하였다. 이와 같은 시험에서, 마우스는 평균대 건너기를 3회 완료할 것을 요구받았다. 평균적으로, AAV9-CBA-항-HTT-6433 처리된 마우스는 PBS 주사만을 투여받은 마우스에 비해 더 빠르게 건너는 경향이 있었다 (도 3 및 12a). AAV9-U6-항-HTT-6433 군의 나머지 4마리의 마우스 중, 2마리는 평균대에서 뛰거나 떨어지는 것 중 어느 하나로써, 성공적으로 건널 수 없었다 (도 12a). 더 고령인 Yac128 마우스 (7개월령)에서 수행된 두 번째 실험에서는, 평균대를 건너는 시간의 연령 관련 증가가 관찰되었다. 이와 같은 증가는 나이브 마우스 및 AAV9-CBA-항-HTT-6433으로 처리된 마우스 양자에서 존재하였으며, AAV9-U6-항-HTT-6433으로 처리된 마우스에서 가속되었다 (도 12b).

[0154] 신경병리학적 발견들이 상기한 행동 결과와 상관된다. 주사된 측면에서, AAV9-U6-항-HTT-6433 마우스는 뇌질의 확장, DARPP-32 양성 뉴런의 상실 및 선조체 수축을 나타내었다 (도 7a-7b). 나머지 선조체에서, 그들은 증가된 Iba1 염색 (도 8a, 하단), 총 및 활성화 소교세포의 증가, 및 휴지 소교세포 수의 감소 (도 8b-8d)를 나타내었다. 야생형 C57BL/6 마우스 및 FVB 마우스에 동일한 벡터를 주사하고, 독성이 그와 같은 맥락에서의 돌연변이 헌팅틴의 존재에 대하여 의존성인지를 확인하기 위하여, U6 추진 miR의 결과를 평가하였다. FVB 마우스에서는, 평균대에서의 빠른 퇴행 및 심각하게 확장된 뇌질을 가지는 Yac128 마우스에서의 것과 효과가 유사하였다. 그러나, C57BL6 마우스에서는, 효과가 존재하지는 하였으나, 덜 현저하였다. U6 군에서 평균대를 건너는 시간에 있어서의 최초의 증가가 존재하지는 하였지만, 연구 종료 시에는 군들 사이에 상당한 차이가 존재하지 않았다 (도 13a). 선조체 수축 역시 C57BL6 마우스에서는 덜 심각하였다 (도 13b).

[0155] U6 프로모터로부터의 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA의 발현은 헌팅틴 표적화 소형 RNA의 과발현을 발생시킨다

[0156] 마우스 군에 편측으로 U6 및 C β A 프로모터로부터 인공 miRNA 6433을 발현하는 scAAV9 벡터를 주사하였다. 주사 2주-후에 생성되는 소형 RNA를 클로닝하고, 서열분석하였다. 양 군에서, AAV 계놈에 맵핑되는 서열 중 96 %가 예상 소형 RNA 생성물에 맵핑되었으며, 적은 백분율만이 부정확한 다이서 또는 드로샤 절단을 나타내었다. U6 프로모터 추진 인공 miRNA가 주사된 군에서는, 서열분석 결과 헌팅틴 표적화 서열이 우세해서, 모든 맵핑 가능한 서열의 절반 (50 %)에 달했던 반면, CBA 벡터가 주사된 마우스에서는 서열 중 5 %만이 벡터가 코딩하고 있는 소형 RNA와 일치하였다 (도 9a). 이에 따라, 잠재적으로, 센스 가닥 및 미끄러짐(slippage) 생성물을 포함한 대안적인 시드 서열을 가지는 소형 RNA가 기능성인 내생 miRNA의 것과 유사한 수준으로 존재할 수 있다 (도 9a). qPCR에 의해 헌팅틴 표적화 소형 RNA의 상대적인 양을 측정함으로써, 헌팅틴 표적화 서열의 과발현을 확인하였다. U6 프로모터 추진 구성체가 주사된 마우스에서 소형 RNA의 발현이 150 내지 250배 더 높은 것으로 관찰되었다 (도 9b).

[0157] 내생 miRNA 30 서열은 보통 인공 miRNA용 스캐폴드(scaffold)로 사용된다. 이와 같은 스캐폴드로부터 유래하는 이성질체(isomir) 프로파일이 더 바람직한지를 확인하기 위하여, miR-30 백본에 항-HTT-6433 서열을 삽입한 후, 10주령 Yac128 마우스에 주사하였다 (도 9c). mir-30 스캐폴드는 C β A 프로모터에 의해 산출되는 것과 유사한 성숙한 인공 miRNA의 수준을 산출하였으며 (도 9a), 50 % 가까이까지 인간 헌팅틴을 감소시켰다. mir-155 스캐폴드와 달리, mir-30 스캐폴드는 안티센스 (가이드) 가닥과 유사한 수준으로 성숙한 센스 (패시저) 가닥을 생성시킨다. C β A 프로모터의 mir-155 백본과의 조합은 바탕을 초과하도록 예정된 안티센스 가닥만을 생성시킨다 (도 9a).

[0158] 샘플 중 판독분의 절반이 넘게 AAV-코딩된 인공 miRNA에 맵핑될 수 있기는 하였지만, 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA의 과발현은 내생 miRNA의 분포에는 최소한의 효과를 가졌다 (도 14a-14b). 사실상, 주사된 군을 비

-주사 (반대쪽) 측면과 비교하였을 때 가장 큰 차이가 관찰됨으로써, 주사 자체가 miRNA 프로파일의 국소적인 변화를 생성시킨다는 것을 암시하였다. 이는 시간이 지나면서 해결될 수 있는 손상에 대한 국소적 염증 반응을 반영할 수 있다.

[0159] U6 프로모터로부터의 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA의 발현은 다중 mRNA의 발현을 왜해한다

[0160] 헌팅틴 표적화 miRNA 과발현의 결과를 조사하기 위하여, AAV9-U6-항-HTT-6433 또는 AAV9-CBA-항-HTT-6433 중 어느 하나로 처리된 마우스 선조체의 RNAseq 분석을 수행하였다. 주사 2주-후, 주사 및 비-주사 측면에서의 선조체 mRNA 프로파일을 비교하였다. 데이터는 CBA-mirHTT-6433로 처리된 마우스에 상당한 차이가 거의 존재하지 않는다는 것을 표시하였다 (도 14a). AAV9-U6-항-HTT-6433으로 처리된 마우스에서는, 처리에 반응하여 증가된 mRNA 및 감소된 것들 모두가 관찰되었다 (도 14b). 2주에 AAV9-U6-항-HTT-6433 및 AAV9-CBA-항-HTT-6433의 프로파일을 비교하였을 때, 8종의 mRNA만이 이러한 2개 군 사이에서 상당히 차별적으로 발현되는 것으로 관찰되었다. 인공 miRNA의 예정된 표적 부위의 존재 또는 부재에 따라 RNA를 분류하고, 표적 부위가 존재하거나 부재하는 mRNA에서의 변화의 누적 분포를 플로팅하였다. AAV-U6-6433이 주사된 마우스에서는, 가장 풍부한 AAV-유래 소형 RNA 종과 일치하는 완전한 8량체 표적 부위를 그의 3'-UTR에 포함하는 유전자의 약간의 하향조절로의 이동이 관찰되었다 (도 10b). AAV-CBA-6433 (도 10a)은 물론, 다른 AAV-유래 소형 RNA 종들 중 어느 것 (도 15a-15c)이 주사된 마우스에서도 이와 같은 이동이 분명하지 않았다.

[0161] 실시예 3: 양 생체내 실험

[0162] 본 실시예에서는, 인간 헌팅톤병의 양 모델을 사용하였다. 간단하게 말하자면, 인간 헌팅틴 (인간 htt) 단백질을 발현하는 트랜스제닉 양을 생성시켰다. scAAV9 CBA-mir-HTT ("CBA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나를 선조체내로 양에 주사하였다. 각 구성체는 각각 CBA 프로모터 또는 U6 프로모터와 β -글로불린 폴리아데닐화 서열 사이에 존재하는 인트론 내에 위치하는 mir-155 백본에 삽입된 항-헌팅틴 mir-6433 서열 (서열식별번호: 7)의 단일 카피를 포함하였다. 본 실험에서 투여된 rAAV를 제조하는 데에 사용된 구성체를 서열식별번호: 18 (scAAV9 CBA-mir-HTT) 및 19 (scAAV9 U6-mir-HTT)에 제시하였다.

[0163] 주사 1개월 또는 6개월-후 중 어느 하나에 양을 희생시켰다. 조직 및 핵산 샘플을 제조하고, 정량 PCR 및 면역조직화학에 의해 분석하였다.

[0164] 데이터는 1개월 시점에 U6 프로모터하에 발현되는 mir-HTT의 주사가 비-주사 및 빈-scAAV9-주사 대조 마우스와 비교하였을 때 양의 중간 미상핵 및 중간 조가비핵 모두에서 htt 발현의 감소를 발생시킨다는 것을 표시하였다. 도 16은 scAAV9 U6-mir-HTT 주사 1개월-후의 양의 중간 미상핵에서의 인간 htt 발현의 감소와 관련된 데이터를 나타낸다. 도 17은 scAAV9 U6-mir-HTT 주사 1개월-후의 양 모델의 중간 조가비핵에서의 인간 헌팅틴 발현의 감소와 관련된 데이터를 나타낸다. 이전 실시예에서 기술된 마우스 모델과 달리, U6 프로모터로부터 발현되는 mir-HTT가 헌팅톤병의 양 모델에서는 독성이 아니었다는 것에 유의한다.

[0165] 데이터는 6개월 시점에 CBA 프로모터하에 발현되는 mir-HTT의 주사가 비-주사 및 빈 scAAV9-주사 대조 마우스와 비교하였을 때 양의 중간 미상핵 및 중간 조가비핵 모두에서 htt 발현의 감소를 발생시킨다는 것을 표시하였다.

[0166] 도 18 및 19는 양 중간 미상핵의 내측 (도 18) 및 외측 (도 19) 측면에서의 인간 htt 발현의 감소와 관련된 데이터를 나타낸다. 데이터는 CBA 프로모터로부터 발현되는 mir-HTT가 뇌의 비-주사 측면 및 빈 scAAV9-주사 대조 마우스와 비교하였을 때 뇌의 주사된 측면에서 인간 htt 발현의 감소를 야기한다는 것을 표시하였다. 주사 6개월-후, 중간 미상핵에서의 htt 침묵화에 대한 CBA 및 U6 프로모터로부터의 mir-HTT 발현의 효과도 비교하였다. 데이터는 U6 프로모터 또는 CBA 프로모터 중 어느 하나로부터 발현되는 mir-HTT가 비-주사 및 빈 scAAV9-주사 대조 동물과 비교하였을 때 중간 미상핵에서의 인간 htt 발현의 감소를 발생시킨다는 것을 표시하였다 (도 20).

[0167] 도 21 및 22는 주사 6개월-후의 양 중간 조가비핵의 외측 (도 21) 및 내측 (도 22) 측면에서의 인간 htt 발현의 감소와 관련된 데이터를 나타낸다. 데이터는 CBA 프로모터로부터 발현되는 mir-HTT가 뇌의 비-주사 측면 및 빈 scAAV9-주사 대조 마우스와 비교하였을 때 뇌의 주사된 측면에서 인간 htt 발현의 감소를 야기한다는 것을 표시하였다. 주사 6개월-후, 중간 미상핵에서의 htt 침묵화에 대한 CBA 및 U6 프로모터로부터의 mir-HTT 발현의 효과도 비교하였다. 데이터는 U6 프로모터 또는 CBA 프로모터 중 어느 하나로부터 발현되는 mir-HTT가 비-주사 및 빈 scAAV9-주사 대조 동물과 비교하였을 때 중간 조가비핵에서의 인간 htt 발현의 감소를 발생시킨다는 것을 표시하였다 (도 23).

- [0168] 도 24는 scAAV9 CBA-mir-HTT ("CBA 프로모터"), scAAV9 U6-mir-HTT ("U6 프로모터") 또는 빈 scAAV9 대조 벡터 중 어느 하나의 선조체내 주사 6개월 후의 헌팅톤병 양 모델의 전방 선조체에서의 인간 헌팅틴 (인간 htt) RNA의 상대적인 발현과 관련된 데이터를 나타낸다.
- [0169] **실시예 4: 헌팅톤병의 트랜스제닉 양 모델에서 인공 miRNA는 선조체 전체에 걸쳐 인간 돌연변이 헌팅틴을 감소시킨다**
- [0170] 동물 및 동물 절차
- [0171] 본 실시예에서는 메리노(merino) 양을 사용하였다. 마취제의 투여 전에, 대략 8시간 동안 밤새 동물들을 굶겼다. 동물들에게 심장 박동수, 호흡수, 온도 및 체중을 포함한 수술-전 신체검사를 제공하였다. 혈청 (5 ml) 및 CSF의 기준선 샘플을 수집하였다.
- [0172] 2개의 서로 다른 양의 군을 사용하여 2개 부분으로 연구를 수행하였다. 첫 번째 연구의 경우, 대략 8개월령인 41 마리의 트랜스제닉 동물 (21 마리의 거세 숫양, 20 마리의 암양)에게 총 3×10^{12} 개의 게놈 카피를 위한 1×10^{13} gc/ml의 역가로 300 μ l의 자가-상보성 AAV9 (scAAV9) 벡터를 편측으로 주사하였다. 두 번째 연구의 경우, 14개월령의 14 마리의 동물에게는 이와 같은 벡터를, 그리고 14 마리에게는 대조 벡터를 주사하였다. 주사 확산의 수술-후 영상화를 가능하게 하기 위하여, 벡터 제제에 가돌리늄을 첨가하였다. 동물들을 수술실로 이동시키고, 수술 준비를 하였다. 그들을 사지를 집거나 사지를 결박하여 발포 쿠션상에서 스프링스 자세로 휴지시켰다. 정위 프레임 (코프(Kopf) 사, 대형 동물)을 사용하여 동물의 두부를 제자리에 고정하였다. 19 게이지 요추 천자 캐놀러를 사용한 요추 천자를 통하여 뇌척수액을 수집하였다. 속섬유막을 표적으로 하여 선조체에 직접 rAAV를 전달하였다. 동물의 두부를 면도하고, 베타딘으로 준비한 후, 투명한 플라스틱으로 감쌌다. #15 스칼펠(scalpel)을 사용하여 곡선 절개를 수행함으로써, 정수리점을 노출시켰다. 일단 정수리점을 확인하고 나서, 전기 드릴을 사용하여 정수리점의 앞쪽(rostral) 10 mm 및 중심선의 외측 11 mm에 3-4 mm의 천두공(burr hole)을 위치시켰다. 통상적인 강화 전달 (CED) 캐놀러 (MRI 인터벤션스(MRI Interventions) 사, 캘리포니아 어빈 소재)를 조작장치에 고정하고, 주사될 작용제로 프라임하여 라인으로부터 공기를 제거하였다. #11 스칼펠을 사용한 1.5 mm 절개에 의해 경질막을 개방하고, 경질막 표면으로부터 표적 깊이까지 CED 캐놀러를 25 mm 전진시켰다. 외부 캐놀러 (1.65 mm)는 경질막 절개부를 밀봉하여 주입 동안의 CSF 누출을 방지한다. 팁 주변의 조직이 안정화되도록 하기 위하여, 주입은 캐놀러 삽입 5분 후에 개시하였다. 주입 속도는 300 μ l의 총 부피가 주사될 때까지 3.33 μ l/분으로 설정하였다. 주입이 완료되고 10분 후, 캐놀러를 천천히 회수하고, 골 왁스 플러그(bone wax plug)를 사용하여 두개골을 복구함으로써 CSF 누출을 방지하였다. 식염수를 사용하여 상처를 세척한 후, 3.0 비크릴 봉합사를 사용하여 폐쇄하였다. 표준 마취 풀립 및 회복 절차에 따랐다. 수술-후 MRI를 수행하여 가돌리늄의 확산을 확인하였다. 첫 번째 연구에서 한 마리의 동물이 수술 후 배제되었는데, 영상화시 가돌리늄이 가시적이지 않았기 때문이었으며, 두 번째 연구에서 두 번째 동물이 배제되며, 가돌리늄이 주로 뇌실에 존재하는 것으로 나타났기 때문이다. 수술 후, 동물들을 3일 동안 관찰하에 유지하였으며, 5일 동안 실내에서 수용하였다. 다음에, 그들을 실외로 옮기고, 나머지 연구 동안 실외 방목지에 수용하였다. 연구 전체에 걸쳐 고충의 징후 및 행동의 변화에 대하여 동물들을 시각적으로 모니터링하였다. 두 마리의 동물이 수술 합병증에 걸림으로써, 부분적인 사지 마비를 초래하였다. 이는 마취하에서의 동물의 배치에 기인하는 것으로 여겨졌다. 한 마리는 조기에 마취되었으며, 한 마리는 6개월 군으로부터 1개월 군으로 이동시켰다. 주사-후 기간 전체에 걸쳐 주기적으로 동물들을 칭량하고, 뇌척수액, 혈액 및 혈청의 샘플을 채취하여, 추가 분석용으로 저장하였다.
- [0173] 세포 계수 및 감별을 위하여, 목정맥 정맥천자를 통해 칼륨 EDTA 혈액 수집 튜브 (라벤더 탑(Lavender top); LT)에 혈액을 수집하고, 감별 (CBE 감별)에 의한 완전 혈액 조사를 수행하였다. 임상 화학용으로, 목정맥 정맥천자를 통해 혈청 수집 튜브 (레드 탑(red top); RT)에 혈액을 수집하였다. 샘플을 다중 생화학 분석(MBA)용으로 제출하였다.
- [0174] 주사 1개월 및 6개월-후, 동물들을 수확한 후, 조직학 또는 생화학 분석 중 어느 하나에 동물들을 사용하였다. 동물들을 수술 테이블로 수송하고, 대략 6 mL의 CSF를 수집하는 동안 배쪽 횡와(ventral recumbency)로 위치시켰다. 동물들을 등쪽 횡와로 재위치시켰다. 목동맥을 노출시키고, 캐놀러 팁으로부터 4 cm의 깊이로 캐놀러삽입하였다. 목정맥을 노출시키고, 200-500 U 헤파린/kg을 목정맥에 주사하였다. 헤파린 투여 5분 후, 1 ml/체중2kg의 레타바르(Lethabarb) (325 mg 펜타바르비톤 나트륨/ml) 정맥내 주사에 의해 양을 안락사시켰다. 저온 9 % NaCl을 사용하여 주입 펌프를 프라임하고, 목동맥 캐놀러에 연결하였다. 500 mmHg의 압력으로 대략 8 L의 저온 9 % NaCl을 사용하여 동물들을 관류하였다. 조직학용으로는, 500 mmHg 압력의 8 L 4 % 파라포름알데히

드로 주입을 전환하였다. 뇌 및 간을 추출하였다. 조직을 4 °C에서 24시간 동안 4 % 파라포름알데히드에 후-고정하고, 4 °C에서 최소 14일 동안 1X 포스페이트 완충된 식염수 중 30 % 수크로스로 옮겼다.

[0175] RNA, 단백질 및 DNA 검정용으로는, 상기한 바와 같은 저온 9 % NaCl을 사용하여 양을 관류하였다. 하기의 순서로 말초 조직의 수집을 수행하였다: 간, 부신, 난소 (해당될 경우), 근육 및 심장. 서로 다른 기기의 사용, 그리고 10 % 표백제 및 70 % 에탄올을 사용하여 검시 표면을 세척하는 것에 의해 교차 오염을 방지하였다. 신체로부터 기관을 제거하고, 3 mm 생검 펀치를 사용하여 샘플을 수집하였다. 각 기관으로부터 총 10개의 샘플을 수집하였는데; 2개의 샘플은 액체 질소 중에서 급속-냉동하였으며, 8개의 샘플은 4 °C에서 24시간 동안 RNA 레이더(later) 중에 저장하였다 (간, 근육 및 심장 샘플용으로 300 μ l의 RNA 레이더, 부신 및 난소 샘플용으로 500 μ l의 RNA 레이더).

[0176] 원형 톱 및 골 검자를 사용하여 두개골로부터 뇌를 제거하였다. 추출 후, 뇌를 칭량하고, 맞춤형 플렉시글라스 뇌 매트릭스에 배측으로 위치시켰다. 4 6 mm 블록에 선조체를 완전히 포함하도록 뇌에 9개의 절단부(cut)를 형성시켰다. 제1 절단부는 후각 망을 부착부의 전방에 형성시켰으며 (매트릭스의 시작으로부터 대략 18 mm), 이어서 6 mm 간격으로 4개의 절단부를 형성시켰다. 선조체를 후방으로부터 전방으로 4개의 6 mm 블록으로 분할하였다: 2p (후방), 2m1 (내측 1), 2m2 (내측 2) 및 2a (전방). 하기의 순서로 선조체 절제를 수행하였다: 2p, 2m1, 2a. 우측 (비-주사) 반구의 선조체를 모든 블록에서 먼저 절제하였는데, 반구들 사이에서는 스칼펠 날을 교체하였다. 절제는 드라이 아이스상의 페트리 접시에서 수행하였는데, 가능한 한 많은 백색질을 선조체 조직으로부터 제거하기 위하여 주의를 기울였다. 일단 절제 분리되고 나서는, 선조체 단편 (미상핵 및 조가비핵)을 절반으로 분할한 후; 내측 단편 (블록의 중심선에 가장 가까움)은 4 °C에서 1 ml의 RNA 레이더에 저장하고, 외측 단편은 액체 질소 중에서 급속 냉동하였다. CBA 연구에서의 6개월 군의 선조체 절제는 미상핵 및 조가비핵 양자로부터 4개의 선조체 샘플을 생성시키는 방식으로 수행하였다. 등쪽 절편 (내측 및 외측 모두)은 액체 질소 중에서 급속 냉동하였으며, 배쪽 절편 (내측 및 외측 모두)은 4 °C에서 1 ml의 RNA 레이더에 저장하였다. 24시간 후에 RNA 레이더를 제거하고, 샘플을 -80 °C에서 저장하였다.

[0177] 2m2 블록은 OCT를 사용하여 충분히 덮은 후, 2-메틸부탄 및 드라이 아이스 조에서 냉동시켰다. 2a, 2m1 및 2p 블록 중 나머지는 동일한 방식으로 냉동시켰다. 등쪽 대 배쪽 방식으로 각 블록으로부터 10개의 피질 샘플을 채취하였는데: 2개는 액체 질소 중에서 급속 냉동시켰으며, 8개는 4 °C에서 1 ml의 RNA 레이더에 저장하였다.

[0178] 조직학적 분석용 조직의 절개

[0179] 조직학적 분석을 위한 조직 절개 전에, 뇌로부터 선조체를 분리하여, OCT에 의해 충분히 덮고, -20 °C에서 24시간 동안 저장하였다. 전체 선조체를 관통하여 슬라이딩 마이크로톰(sliding microtome) (라이체르트-정 테트라더(Reichert-Jung Tetrader) 슬라이딩 마이크로톰)으로 40 μ m 두께로 측정되는 관상 절편을 절단하였다. 절편을 4 °C에서 1X 포스페이트 완충된 식염수 중 0.01 % 나트륨 아지드에 저장하였다.

[0180] 벡터 클로닝 및 rAAV9 제조

[0181] 첫 번째 연구의 경우, 시험 벡터는 내생 mir155 백본을 기반으로 하는 인공 miRNA를 추진하는 U6 프로모터를 포함하였다 (AAV9-U6-miR^{HTT}). 인공 miRNA는 인간은 표적으로 하나, 양 헌팅틴은 표적으로 하지 않는다. AAV 패키징화를 향상시키기 위하여, 키메라 인트론을 추진하는 키메라 사이토메갈로바이러스 인헨서/닭 β -액틴 (CBA) 프로모터가 포함되었다. 대조 벡터 (AAV9)는 빈 CBA 프로모터 및 인트론만을 포함하였다. 두 번째 연구의 경우, 시험 벡터는 CMV 인헨서 및 CBA 프로모터, 인트론 및 miRNA-155 기반 인공 miRNA를 포함하였다 (AAV9-CBA-miR^{HTT}).

[0182] 패키징화를 위하여, rAAV 벡터 플라스미드, 패키징화 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드를 HEK 293 세포에 공동-형질감염시켰다. 패키징화 플라스미드는 rAAV 벡터 플라스미드로부터 AAV 비리온으로의 재조합 계층의 절제, 복제 및 패키징화로 이어지는 조절 및 AAV9 캡시드 단백질을 발현하였다. 재조합 바이러스는 표준 CsCl 구배 침강 및 투석에 의한 탈염에 의해 정제하였다.

[0183] 헌팅틴 mRNA 수준의 분석

[0184] 분지 DNA 검정 (bdNA)을 사용하여 RNA 레이더 보존 샘플 중 RNA 농도를 분석하였다. RNA 레이더 (어피메트릭스 이바이오사이언스(Affymetrix eBioscience) 사, 퀀티진(Quantigene)® 샘플 처리 키트)에 저장된 조직으로부터의 조직 균질물의 제조에 대한 제조자의 지침에 따라 샘플을 처리하였다. bdNA 검정 (퀀티진® 2.0 시약 시스템

템)에 대한 제조자의 지침에 따라 균질화된 샘플을 분석하였다. 인간 헌팅틴 (인간 HD, 퀀티진의 SA-50339), 양 헌팅틴 (양 헌팅틴, 퀀티진의 SF-10586) 및 하우키펡 유전자로서의 양 칼넥신 (양 칼넥신, 퀀티진의 SF-10622)을 검출하기 위하여, 프로브를 사용하여 샘플을 분석하였다. 검정 결과는 테칸 인피니트(Tecan Infinite) M1000 프로(PRO) 발광측정기를 사용하여 측정하였다 (노출 시간(integration time)은 200 ms로 설정).

[0185] *miR-Htt 수준의 분석*

[0186] 냉동된 블록에서, 외측 미상핵 및 내측 조가비핵으로부터 생검 편치 (2 mm)를 샘플링하였다. 일부 변형을 가한 트리졸(TRIZOL) 제조자의 지침 (암비온(Ambion) 사)을 사용하여 RNA 추출을 수행하였다. 트리졸 추출에서의 상 분리 후, 수성 상을 RNA 클린 앤 콘센트레이터(Clean & Concentrator) (자이모(Zymo) 사) 컬럼으로 옮기고, 그의 프로토콜에 따랐다. 분석시까지 RNA를 -80 °C로 저장하였다. 단편 분석기 (어드밴스드 애널리티칼 테크놀로지스(Advanced Analytical Technologies) Inc. 사)에서 RNA 품질 및 농도를 확인하였다. 분석 직전에, RNA를 20 ng/μl로 희석하였다. 타크만(TaqMan) 마이크로RNA 역전사 키트 (Cat# 4366596, 써모 사이언티픽(Thermo Scientific) 사), 2 μl의 RNA 및 가이드 가닥 특이적 스태-루프 프라이머 (UAAGCAUGGAGCUAGCAGGCU (서열식별번호: 25)를 표적으로 하는 써모피서 사 맞춤형 검정, 또는 검정 id 002407, let7e*)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 인공 miRNA 가이드 가닥을 역-전사하였다. 다중화를 가능하게 하기 위하여, 5 μl의 RT 생성물, 1x 농도의 miR-Htt 검정 및 0.3x 농도의 let-7e* 검정을 사용하여 ddPCR 반응을 구성하였다. QX200 액적 생성기 (Cat# 1864002, 바이오래드(Biorad) 사)를 사용하여 액적을 생성시키고, 종료점 PCR 증폭 (40 주기) 후 양성 신호에 대하여 모니터링하였다. miR^{HTT} 및 let-7e* 사이의 절대 농도 비를 계산하는 것에 의해 miR^{HTT}의 상대적인 발현을 확인하였다.

[0187] *백터 게놈 분포*

[0188] 젠트라 퓨어젠(Gentra Puregene) 조직 키트 (키아젠(Qiagen) 사)를 사용하여, 액체 질소에 급속 냉동시켰던 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 나노드롭 원(NanoDrop ONE)^c 분광광도계를 사용하여 게놈 DNA 농도를 측정하였다. 투입분으로서의 50 ng의 DNA, 그리고 백터-특이적 CB 및 U6 프로모터 및 HPRT 참조 유전자를 검출하는 타크만 검정을 사용하여, 제조자의 권장사항에 따라 액적 디지털 PCR (ddPCR, 바이오래드 사)을 수행하였다. 결과를 이배체 게놈 당 백터 게놈 (vg/dg)로 나타내었다.

[0189] *헌팅틴 단백질 수준의 분석 -- mHTT에 대한 중간규모 검출 검정 (MSD)*

[0190] 선조체 샘플을 10 mM HEPES, 250 mM 수크로스, 1 mM EDTA 및 프로테아제 억제제 (로체(Roche) 사)로 구성되는 완충제 중에서 균질화하고, 10 % 진폭으로 10초 초음파처리하였다. 브래드포드(Bradford) 검정을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 96-웰 퀵플렉스(QuicPlex) 표준 플레이트 (MSD 사)를 PBS 중 토끼 단일클론 항-HTT 프롤린 1220 영역 항체 (D7F7, 세포 신호전달, 1:250)로 4 °C에서 밤새 코팅하였다. PBST (PBS + 0.05 % 트윈(Tween)20)를 사용하여 3x 10분 동안 플레이트를 세척하고, PBS 중 3 % 소 혈청 알부민 (BSA)으로 RT에서 2시간 동안 블로킹하였다. PBST로 3x 10분 동안 세척한 후, 25 μL의 균질화 완충제 중에 20 μg의 단백질을 포함하는 샘플의 기술적 2반복물, 또는 바탕물 (균질화 완충제)을 플레이트에 분배하고, 퀴드 진탕기에서 4 °C로 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST 중에서 3x 10분 세척하고, 하기와 같이 이차/검출 항체 혼합물 중에서 인큐베이션하였다: mHTT의 검출을 위하여, 마우스 단일클론 항-폴리Q 항체 MW1 (DSHB)을 PBS 중 1 % BSA 중에 각 항체 1 μg/mL로 항-마우스 술포태그(SulfoTag) 검출 항체 (MSD 사)와 혼합하였다. 웰 당 30 μL의 검출 항체 혼합물을 적용하고, 퀴드 진탕기에서 RT로 3시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST 중에서 3x 10분 세척하고, 퀵플렉스 SQ120 (MSD 사)에서의 판독 직전에 웰 당 150 μL의 2x 판독 완충제 (MSD 사)를 적용하였다.

[0191] *웨스턴 블로팅*

[0192] 냉동된 블록으로부터 소형 조직 단편을 제거하고, 얼음상에서 200 μl의 10 mM HEPES pH 7.2, 250 mM 수크로스, 1 mM EDTA + 프로테아제 억제제 정제 (미니, 완전, 무-EDTA 로체 사 #11836170001) 중에 균질화하였다. 10초 동안 샘플을 초음파처리한 후, 브래드포드법 (바이오래드 사 #500-0006)을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 3-8 % 트리스(Tris)-아세이트 겔 (라이프 테크놀로지스 사 #EA03785BOX) 상에서의 SDS-PAGE에 의해 동일 농도의 단백질 (25 μg)을 분리하고, 트랜스블롯 터보(TransBlot Turbo) (바이오래드 사)를 사용하여 니트로셀룰로스로 옮겼다. 트리스-완충 식염수 + 0.1 % 트윈-20 (TBST) 중 5 % 무-지방 분유 중에서 1시간 동안 블로팅을 블로킹하고, 블로킹 용액에 희석된 일차 항체 중에서 4 °C로 밤새 인큐베이션하였다. 사용된 일차 항체는

하기였다: 항-폴리-Q (MW1, 코리엘(Coriell) 사, 1:500 또는 3B5H10, 시그마(Sigma) 사, 1:1000), 항-헌팅틴 (MAB2166, EMD 밀리포어 사, 1:1000 또는 Ab1, 문헌 [DiFiglia et al., 1995], 1:1000), 항-DARPP32 (#ab40801, 아브캄(Abcam) 사, 1:10,000), 항-액틴 (A4700, 시그마 사, 1:1000) 및 항-스펙트린 (MAB1622, EMD 밀리포어 사, 1:4000). TBST 중에서 블랏을 세척하고, 실온에서 1시간 동안 블로킹 용액 중에 1:5000 희석된 퍼옥시다제 표지 이차 항체 중에서 인큐베이션한 후, TBST 중에서 세척하고, 슈퍼시그널 웨스트 피코 (SuperSignal West Pico) 화학발광 기질 (피어스(Pierce) 사 #34080) 중에서 인큐베이션하였다. CCD 영상화 시스템 (알파 이노테크(Alpha Innotech) 사) 및 하이퍼필름(Hyperfilm) ECL (GE 헬스케어(Healthcare) 사)을 사용하여 이미지를 획득하였다. 이미지J 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 디지털 이미지상에서 농도측정을 수행하였다. 비쌍형 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행하고, 결과를 주사된 측면에 대한 평균 값으로 나타내었다.

[0193] *DARPP32, NeuN 및 Iba1에 대한 면역조직화학*

[0194] DARPP32 양성 세포를 정량하기 위하여, 모든 20 번째 절편을 1X PBS 중 3 % 수소 퍼옥시드 중에서 3분, 0.5 % 트리톤(Triton)-X-100 중에서 20분, 그리고 이어서 1X PBS 중 1.5 % 표준 염소 혈청 (벡터 랩스(Vector Labs) 사, S-1000) 중에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 절편들을 1.5 % 표준 염소 혈청 중 항-DARPP32 (아브캄 사, ab40801, 1:1,000 희석) 중에서 4 °C로 밤새 인큐베이션하였다. 다음에, 절편들을 1X PBS 중 바이오티닐화 염소 항-토끼 IgG 항체 (벡터 랩스 사, AP-1000, 1:200 희석) 중에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 절편들을 1X PBS 중 벡타스타인 엘리트(Vectastain Elite) ABC 키트 (벡터 랩스 사, PK-6100)의 2 % 엘리트 A 및 2 % 엘리트 B 시약과 함께 5분 동안 인큐베이션하였다. 금속 강화 DAB 키트 (씨모피서 사이언티픽 사, 34065)를 사용하여 DARPP32 양성 세포를 가시화하였다. 절편들을 안정한 퍼옥시드 완충제 중 1X 3,3'-디아미노벤지딘 중에서 인큐베이션하였다.

[0195] NeuN 양성 세포를 정량하기 위하여, 모든 20 번째 절편을 1X PBS 중 3 % 수소 퍼옥시드 중에서 3분, 0.5 % 트리톤-X-100 중에서 20분, 그리고 이어서 4 °C로 밤새 1X PBS 중 1.5 % 표준 염소 혈청 (벡터 랩스 사, S-1000) 중에서 밤새 인큐베이션하였다. 절편들을 1.5 % 표준 염소 혈청 중 항-NeuN (케미콘(Chemicon) 사, MAB377, 1:1,000 희석) 중에서 4 °C로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다음에, 절편들을 형광 AF594 염소 항-마우스 IgG (씨모피서 사이언티픽 사, A-11005, 1:2,000 희석) 중에서 40분 동안 인큐베이션함으로써, NeuN 양성 세포를 가시화하였다.

[0196] Iba1 양성 세포를 정량하기 위하여, 모든 20 번째 절편을 1X PBS 중 5 % 표준 염소 혈청 (벡터 랩스 사, S-1000), 1 % 소 혈청 알부민 (시그마 사, A-3059), 0.2 % 트리톤-X-100 및 0.03 % 수소 퍼옥시드의 용액 중에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 절편들을 5 % 표준 염소 혈청 (벡터 랩스 사, S-1000) 중 항-Iba1 (와코 케미칼스(Wako Chemicals) 사, 019-19741, 1:1,000 희석) 및 1 % 소 혈청 알부민 (시그마 사, A-3059) 중에서 4 °C로 밤새 인큐베이션하였다. 절편들을 1X PBS 중 바이오티닐화 염소 항-토끼 IgG 항체 (벡터 랩스 사, AP-1000, 1:200 희석) 중에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 절편들을 1X PBS 중 벡타스타인 엘리트 ABC 키트 (벡터 랩스 사, PK-6100)의 2 % 엘리트 A 및 2 % 엘리트 B 시약과 함께 5분 동안 인큐베이션하였다. 금속 강화 DAB 키트 (씨모피서 사이언티픽 사, 34605)를 사용하여 안정한 퍼옥시드 완충제 중 1X 3,3'-디아미노벤지딘 중에서 절편을 인큐베이션하는 것에 의해 반응을 가시화하였다. 각 절편의 니콘 에클립스(Nikon Eclipse) E600 현미경을 사용한 이미지 (DARPP32의 경우 20X 및 Iba1의 경우 40X)를 촬영하는 것에 의해, 뇌의 좌측 및 우측 반구에서의 DARPP32 및 Iba1 양성 세포의 정량을 수행하였다. 서로 다른 절편들 사이에서 일관되게 이미지를 포착하기 위하여, 선조체의 내측 등쪽 가장자리에서 첫 번째 이미지를 포착하고, 스테이지를 배쪽 가장자리를 향하여 0.5 cm 이동하였다. 일단 배쪽 가장자리에 도달하고 나서, 10개의 이미지가 포착될 때까지 스테이지를 0.5 cm 외측 및 0.5 cm 등쪽으로 이동하였다. 각 이미지에는 무작위 번호를 할당함으로써, 세포를 정량할 때의 선입견을 제거하였다. 이미지J 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 세포를 계수하였다.

[0197] 치우 테크니칼 코포레이션(Chiu Technical Corporation) 사의 머큐리(Mercury) 100-W 램프가 구비된 니콘 에클립스 E600을 사용하여 60X로 NeuN 양성 세포의 정량을 수행하였다. DARPP32 및 Iba1 이미지를 포착하는 데에 사용된 입체학적 방법을 NeuN 양성 세포를 정량하는 데에도 사용하였다. 선조체 전체에 걸쳐 모든 20 번째 절편 (동물 측면 당 29-35개 절편)의 주사 및 비-주사 측면에서 이미지J 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 DARPP32 염색된 영역에 수동으로 원을 그림으로써, 각 절편에서의 선조체, 미상핵 및 조가비핵의 면적을 측정하였다. 관찰자는 조건에 대하여 맹검처리되었다. 면적에 절편 두께 (40 마이크로미터)를 곱하고 슬라이드들 사이의 절편 수 (20)를 곱한 후, 각 동물에 대하여 서로 더함으로써, 각 영역의 총 부피를 측정하였다. 통계 분석은 마이크로소프트 엑셀, 쌍형성 및 비쌍형 t-검정, 군 당 N = 3 또는 4 마리의 동물을 사용하여 수행하였다.

- [0198] 주사 후 벡터 게놈 및 *miRNA* 분포
- [0199] HD의 녹-인(knock-in) 모델에서의 확장된 마우스 헌팅틴 및 HD의 트랜스제닉 마우스 모델에서의 인간 *mHTT* 트랜스진 mRNA의 침묵화를 관찰하였다. 이와 같은 실시예에서는, 2개 HD 양 군 (연구 1 및 연구 2)의 선조체에 편측으로 주사하였다. 연구 1에서는, 비-코딩 스테퍼(stuffer) 서열이 프로모터와 폴리-A 신호 사이에 삽입되어 있는 scAAV9-U6-miR^{HTT} (AAV9miRHTT) 또는 scAAV9-CBA-빈것 (AAV9)을 8-9개월령의 양에 주사하였다. 연구 2에서는, scAAV9-CBA-miR^{HTT} 또는 scAAV9-CBA-빈것 (AAV9)을 14개월령의 양에 주사하였다. AAV9-miR^{HTT} 투여 1개월 및 6개월 후에, 뇌를 수확하였다.
- [0200] 액적 디지털 PCR (ddPCR, 도 26b)에 의해 영역 하위세트 (도 26a)에서 게놈 카피수를 측정하였다. 게놈 카피수는 비-주사 측면에 비해 주사된 측면의 미상핵 및 조가비핵에서 최고였으며, 주사 1 및 6개월 후 scAAV9-U6-miR^{HTT} 처리 군에서 최고 수준이었다. 피질 및 간에 소량의 벡터 게놈이 존재하였으나, 부신에서는 검출가능하지 않았다 (도 26b).
- [0201] RNA 품질 번호 (RQN)로 지칭되는 점수를 생성시키는 단편 분석기를 사용하여 RNA 품질을 측정하였다. RQN은 전기-영동도를 분석하고, 28S와 18S 리보솜 피크 선명도 및 기준선 사이의 비와 같은 RNA 완전성의 수많은 서로 다른 척도들을 통합하는 것에 의해 생성된다. 점수는 일반적으로 0 (완전히 분해됨) 내지 10의 범위이다. 5를 초과하는 점수를 가지는 샘플을 사용하여 인공 miRNA 가이드 가닥의 수준을 분석하였다. 낮은 RQN 점수로 인하여, 연구 1로부터 2 마리 및 연구 2로부터 2 마리의 동물을 분석에서 배제하였다. ddPCR을 사용하여 인공 miRNA 가이드 가닥의 수준을 측정하고, 내생 *let7e**에 대하여 정규화하였다 (도 27). 인공 miR 안티센스 가닥의 상대적인 품질은 비-주사 측면에 비해 주사된 측면에서 3.5-1000배 더 높았으며, 주사 6개월-후에 비해 1개월-후에서 더 높았다. AAV9-miR^{HTT}를 사용한 주사 반대쪽 측면에서는 miRNA 가이드 가닥이 낮은 수준으로 검출되었다.
- [0202] scAAV9-miR^{HTT}의 단일 투여가 미상핵 및 조가비핵에서 인간 돌연변이 헌팅틴 mRNA를 장기간 감소시킨다
- [0203] 인간 *HTT* mRNA는 특이적으로 인식하며 양 *HTT* mRNA는 그렇게 하지 않는 분지 DNA (bDNA) 검정을 사용하여, 전방 및 내측 선조체 중 *HTT* mRNA를 측정하였다. 이와 같은 검정은 RNA 단리를 필요로 하지 않기 때문에, 모든 샘플을 분석에 포함시켰다. 주사 1개월-후, 내측 블록의 주사에 가장 가까운 곳에서, scAAV9-U6-miR^{HTT} (연구 1)가 미상핵 및 조가비핵 모두에서 50 % 초과까지 인간 *HTT* mRNA를 감소시켰다 (도 28). 주사 부위로부터 더 멀었던 전방 선조체에서는 상당한 침묵화가 검출되지 않았다 (도 28). 주사 6개월-후, mRNA 침묵화는 미상핵에서 현저하였다 (도 28). scAAV9-CβA-miR^{HTT} 군 (연구 2)에서는, 주사 1개월-후에 내측 조가비핵, 내측 미상핵 및 전방 선조체에서 (도 28), 그리고 주사 6개월-후에 내측 미상핵 및 내측 조가비핵 일부에서 (도 28) *HTT* mRNA의 현저한 침묵화가 발생하였다. 전방 선조체는 6개월 후에서 상당한 저하를 나타내지 않았다. 내생 양 *HTT* mRNA의 상당한 침묵화는 존재하지 않았다 (도 29a).
- [0204] 웨스턴 블롯 검정 및 전기화학발광 (MSD 검정)은 scAAV9-miR^{HTT}가 미상핵 및 조가비핵에서 인간 돌연변이 헌팅틴 단백질을 감소시킨다는 것을 보여준다
- [0205] 동일한 샘플 조제물에서 웨스턴 블롯 (도 30) 및 전기화학발광 (중간 규모 발견(Meso Scale Discovery) (MSD) (도 30)에 의해 *HTT* 단백질을 검출하였다. 연구 1에서는, 웨스턴 블롯에 의해, 야생형 *HTT*에 비교하여 mHTT (돌연변이 *HTT*)를 우선적으로 검출하는 3BH510 항체를 사용하여 mHTT 단백질을 검출하였다 (도 30). scAAV9-U6-miR^{HTT}를 사용한 처리 1개월 후 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서, 그리고 처리 6개월-후에 조가비핵에서 miR^{HTT}가 결핍되어 있는 AAV9를 사용한 처리에 비해 mHTT 단백질의 상당한 감소가 존재하였다. 연구 2 (도 30, 하단)에서, scAAV9-CβA-miR^{HTT} 처리는 주사 1개월-후 조가비핵에서, 그리고 주사 6개월-후 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서 mHTT를 상당히 침묵화하였다.
- [0206] 검출에 MW1을 사용한 MSD 검정에 의한 결과는 scAAV9-U6-miR^{HTT} 처리 (연구 1)가 처리 1 및 6개월-후 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서 mHTT 단백질 수준을 상당히 낮춘다는 것을 보여주었다. scAAV9-CBA-miR^{HTT}는 주사 1개월-후에 미상핵에서, 그리고 처리 6개월 후 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서 mHTT 단백질을 현저하게 침묵화하였다 (도 31). 이러한 결과는 MSD 검정에 의한 결과 (도 31)와 웨스턴 블롯 검정에 의해 수득된 결과

(도 30) 사이에 충분한 일치성이 존재한다는 것을 표시하였다.

[0207]

표 2: 연구 1 및 2에서의 웨스턴 블롯 및 MSD 검정에 의한 돌연변이 헌팅틴 단백질 저하의 평균 %. 연구 1에서는 항-htt 폴리Q 항체 3B5H10을, 연구 2에서는 항체 3B5H10, 양 HTT는 인식하지 않는 (문헌 [Reid et al., 2013]) MAB2166 (항-HTT443-456) 및 항-폴리Q 단일클론 항체 MW1을 사용한 웨스턴 블롯에 의해 인간 돌연변이 헌팅틴 단백질을 측정하였다. MSD 검정에서는 검출 항체로서 MW1을 사용하였다. 이와 같은 표는 미상핵, 조가비핵 및 전방 선조체에서의 평균 % mHTT 저하를 기록한다. % 저하는 AAV9miRHTT 처리된 양의 주사된 측면에서의 평균 신호를 AAV9 단독 처리된 동물의 주사된 측면에서의 평균 신호로 나누는 것에 의해 계산하였다.

[0208]

표 1. 연구 1 및 2에서의 웨스턴 블롯 및 MSD 검정에 의한 돌연변이 헌팅틴 단백질 저하의 평균 %.												
연구# (프로토포타)	연구 1 (U6)						연구 2 (CBA)					
검정 돌연변이 htt 항체	웨스턴 블롯 (3B5H10)		MSD MW1		웨스턴 블롯 (3B5H10)		웨스턴 블롯 (MAB2166)		웨스턴 블롯 (MW1)		MSD MW1	
주사-후 간격 (개월)	1	6	1	6	1	6	1	6	1	6	1	6
미상핵	78**	30	71**	74**	16	30, 43	61	46, 58*	50*	65*, 70	43*	40*, 47*
조가비핵	61*	47*	73**	50*	40*	55*, 44	68*	65*, 67*	54	51*, 56*	42	63**, 56**
전방 선조체	63**	22	49*	33	46	60**, 48	46	81*, 62*	-8	74*, 53*	22	62**, 67**

[0209]

mHTT를 검출하는 항체들은 서로 다른 민감성을 가질 수 있기 때문에, 웨스턴 블롯, MAB2166 및 MW1에 의해 인간 mHTT 단백질을 검출하는 2종의 다른 항체를 연구 2에 포함시켰다 (표 2). HD 트랜스제닉 양에서, MAB2166은 인간 헌팅틴만을 인식하며, 양 HTT는 인식하지 않는다. MW1은 HTT의 확장된 폴리글루타민 영역을 우선적으로 인식하므로, 역시 MSD 검정에서 mHTT의 검출에 사용하였다. 표 2는 연구 1 및 2에서 3종의 항-mHTT 항체 (3B5H10, 2166 및 MW1)를 사용한 웨스턴 블롯, 그리고 MW1을 사용한 MSD 검정에 의해 검출된 mHTT의 평균 % 저하를 비교한다. 연구 2에서는, 웨스턴 블롯 분석의 3종 전체 항체가 다중 선조체 영역에서의 상당한 mHTT 저하를 검출하였다 (49 % 내지 81 %). MSD 검정에 의한 mHTT 저하의 결과는 연구 2에서 동일한 선조체 영역으로부터의 2개의 샘플이 분석된 경우, 일치하였다. 연구 2에서의 웨스턴 블롯 및 MW1을 사용한 MSD 검정에 의한 결과의 비교 역시 주목할 만하다. mHTT 저하 크기에 있어서의 이러한 2종의 서로 다른 mHTT 검출 방법 사이에는 충분한 일치가 존재하였다.

[0210]

웨스턴 블롯 분석에 의하면, AAV9-miR^{HTT} 주사된 선조체를 덮고 있는 피질은 AAV9 주사된 피질에 비해 mHTT 단백질 수준의 감소를 나타내지 않았다 (도 32a). AAV9-miR^{HTT} 주사된 선조체의 반대쪽 측면상의 미상핵 및 조가비핵에서는, 낮은 mRNA 가이드 가닥 수준이 검출되었다. 이들 영역은 웨스턴 블롯 분석에서 감소된 mHTT 단백질 수준을 나타내지 않았다 (도 32b).

[0211]

인간 HD 유전자에 대항하는 AAV9-miR^{HTT}를 사용한 처리가 내생 양 HTT의 수준에 영향을 주는지를 조사하기 위하여, SDS PAGE에서의 2종 단백질의 이동에 있어서의 차이를 이용하는 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 인간 트랜스젠 mHTT의 수준을 내생 양 HTT의 수준과 직접 비교하였다 (도 29b). htt1-17을 인식하는 Ab1 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석은 인간 mHTT와 달리, 내생 양 HTT가 miR^{HTT}를 사용한 처리에 의해 저하되지 않는다는 것을 보여주었다 (도 29b).

[0212]

DARPP32 표지된 뉴런 및 선조체 부피는 *miRNA* 처리에 의해 영향을 받지 않는다

[0213]

AAV 벡터 주사의 안전성을 조사하기 위하여, 중간 가시 뉴런의 마커인 DARPP32에 대한 면역조직화학을 수행하고, DARPP32 양성 세포의 수를 계수하였다. AAV9-miR^{HTT} 처리 및 AAV9 처리 군의 세포수 사이에, 상당한 차이는 존재하지 않았으며 (표 3), 뉴런 세포의 마커인 NeuN의 염색된 세포의 수에 있어서 처리 군들 사이에 상당한 차이는 존재하지 않았다. DARPP32 표지 절편에서의 선조체의 단면적 측정을 사용하여 선조체 부피를 측정하였는데, miRNA 처리 후의 대조에 비해 변화되지 않는다는 것이 발견되었다 (표 4).

[0214]

표 3: DARPP32 및 NeuN 양성 세포의 수. 쌍형성 t-검정 (주사 대 비-주사 측면)에 의해 데이터를 분석하였다. AAV9-CBA-miRHTT가 주사된 WT 양에서만 주사 6개월 후 쌍형성 t-검정에서 ¹p=0.002로 주사 및 비-주사 측면 사이에 상당한 차이가 발견되었다.

연구# (프로모터)	군	주사-후 간격 (개월)	측면	DARPP32 양성 세포의 수	NeuN 양성 세포의 수
연구 1 (U6)	HD	1	주사	4201±389	
			비-주사	4056±488	
		6	주사	2819±614	1185±70
			비-주사	3314±364	1368±180
		1	주사	4327±1444	
			비-주사	4587±838	
연구 2 (CBA)	HD	6	주사	3884±1222	1547±315
			비-주사	4149±924	1633±262
		6	주사	2459±85	1111±314
			비-주사	2324±347	1184±330
		6	주사	2061±321	1404±61
			비-주사	2084±460	1499±46
연구 2 (CBA)	WT	6	좌측	1852±232	1440±76
			우측	2047±306	1183±220
		6	주사	2121±96	1157±180
			비-주사	2148±146	1106±86
		6	주사	1799±223	1285±151 ¹
			비-주사	1895±327	1434±142
		6	좌측	1963±181	1188±328
			우측	2101±219	1056±258

[0215]

[0216]

표 4: 선조체 부피. 부피는 동물 당 측면 당 29-35개 40 μm 절편의 단면적으로부터 측정하였다. 군 당 N=3 마리의 양, ¹ p=0.01, ² p=0.03, ³ p=0.02, 쌍형성 t-검정 사용.

				부피 (mm ³), 평균±SD		
				연구 1 (U6)		연구 2 (CBA)
				주사 1개월-후	주사 6개월-후	주사 6개월-후
미상핵	HD	AAV9	주사	293±54	241±13	
			비-주사	300±48	248±17	
			% 주사/비-주사	97.3±4.2	97.2±3.2	
		AAV9 miRHTT	주사	257±48	302±15	280±79
			비-주사	290±48	325±33	304±49
			% 주사/비-주사	88.6±9.3	93.8±15	91.1±12
	WT	AAV9 miRHTT	주사			283±67 ¹
			비-주사			309±65
			% 주사/비-주사			91.4±2.7
조가비핵	HD	AAV9	주사	298±46	247±33	
			비-주사	307±52	274±11	
			% 주사/비-주사	97.0±1.4	90.3±13	
		AAV9 miRHTT	주사	278±57	318±39 ²	281±10
			비-주사	285±50	340±45	314±21
			% 주사/비-주사	97.5±8.9	93.6±1.2	89.9±6.9
	WT	AAV9 miRHTT	주사			292±45
			비-주사			329±63
			% 주사/비-주사			89.2±3.7
선조체 (앞쪽 극 + 미상핵 + 조가비핵)	HD	AAV9	주사	1041±172	947±28	
			비-주사	1034±150	1006±49	
			% 주사/비-주사	101±2.3	94.3±5.6	
		AAV9 miRHTT	주사	1023±85	1030±31 ³	1165±145
			비-주사	1037±96	1110±31	1222±116
			% 주사/비-주사	98.8±4.7	92.8±1.7	95.1±4.0
	WT	AAV9 miRHTT	주사			1159±76
			비-주사			1210±32
			% 주사/비-주사			95.7±3.8

[0217]

[0218]

scAAV9를 사용한 직접 주사후에는 활성화된 소교세포의 일시적인 증가가 발생한다

[0219]

소교세포에 국소화되어 그의 활성화시 상향조절되는 단백질인 Iba1의 면역-조직화학적 국소화를 조사하였다. 표지된 세포들을 형태구조를 기준으로 휴지 또는 활성화 소교세포로서 확인하였다 (표 5). scAAV9-U6-miR^{HTT} 또는 상응하는 대조 벡터의 주사는 주사 1개월-후 주사된 측면에서의 활성화된 소교세포의 수를 증가시켰지만, 주사 6개월 후에는 주사 및 비-주사 측면이 구별불가능하였다. 두 번째 연구에서는, 연구 종료점 (6개월)에만 소교세포 반응을 조사하였는데, 그 시점에 군들 사이의 상당한 차이는 존재하지 않았다. 결과는 활성화된 소교세포의 일시적인 증가가 AAV 적재물과는 무관하며, 임의의 벡터 또는 수술 단독으로도 발생할 수 있다는 것을 암시한다.

[0220]

표 5: IBA1 양성 세포의 형태구조를 기준으로 한 수 및 분류. 통계 분석은 쌍형성 t-검정 (주사된 측면 대 비-주사 측면)에 의해 수행하였다. 6개월에 AAV9-U6-miR^{HTT} (¹p=0.01)가 주사된 HD 양 및 AAV9 (²p=0.006)가 주사된 WT 양에서 비-주사 측면에 비교한 주사된 측면에서의 활성화된 소교세포의 상당한 증가가 발견되었다. 1개월에 AAV9 (³p=0.05) 및 AAV9-U6-miR^{HTT} (⁴p=0.04) 양자가 주사된 HD 양에서 휴지 소교세포의 상당한 감소가 발견되었으며, 연구 2의 6개월에 AAV9가 주사된 HD 양에서 총 소교세포의 상당한 증가가 발견되었다 (⁴p=0.04). 모든 분석은 주사 대 비-주사 측면을 비교하는 쌍형성 t-검정에 의해 수행하였다.

연구# (프로모터)	군		주사- 후 간격 (개월)	측면	Iba1 활성화 소교세포의 수	Iba1 휴지 소교세포의 수	Iba1 양성 세포 총 수
연구 1 (U6)	HD	AAV9	1	주사	253±178	180±102 ³	433±168
				비-주사	2.0±2	305±70	307±68
			6	주사	29±19	351±104	380±123
				비-주사	12±6	377±214	388±219
		AAV9 miRHTT	1	주사	195±2	201±77 ⁴	396±135
				비-주사	2.8±3	347±116	350±113
			6	주사	29±8 ¹	279±202	308±194
				비-주사	6.7±4	311±148	318±144
연구 2 (CBA)	HD	AAV9	6	주사	38±10	263±31	301±23 ⁴
				비-주사	23±3	248±29	271±32
		AAV9 miRHTT	6	주사	10±4	240±38	251±37
				비-주사	6.0±4	260±32	266±36
		주사 없음	6	좌측	8.3±5	256±90	265±85
				우측	13±17	192±112	204±100
		AAV9	6	주사	16±4 ²	288±39	303±35
				비-주사	7.0±4	256±50	263±46
연구 2 (CBA)	WT	AAV9 miRHTT	6	주사	22±18	261±29	283±26
				비-주사	8.7±7	303±59	312±55
		주사 없음	6	좌측	10±12	246±108	256±96
				우측	9.3±8	298±63	307±69

[0221]

[0222]

scAAV9-miR^{HTT} 처리가 혈구 계수, 전해질, 또는 간 및 신장 기능에는 영향을 주지는 않는다

[0223]

하기 4개 시점에 혈액 샘플을 채취하였다: 기준선 (처리전), 처리 후 28 (또는 30)일, 90일 및 180일. 전체 혈구 계수, 전해질을 측정하고, 간 및 신장 기능 시험을 수행하였다 (표 6). 이들 측정 중 어느 것에서도 AAV9-miR^{HTT} 주사 양과 대조 사이에 변화는 발견되지 않았다. 또한, 이들 시점에 체중의 변화는 존재하지 않았다.

[0224] 표 6. 모든 양들의 임상 병리 및 전체 혈구 계수.

	기준선				28일				90일				180일			
	대조		시험		대조		시험		대조		시험		대조		시험	
	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n
나트륨 mmol/L	146	19	147	22	148	18	148	20	146	10	145	10	146	10	145	10
칼륨 mmol/L	4.14	18	4.15	22	5.26	18	5.17	20	5.21	10	5.38	9	5.21	10	5.38	9
클로라이드 mmol/L	105	19	106	22	109	18	109	20	109	10	109	10	109	10	109	10
비카르보네이트 mmol/L	27	19	26	22	26	18	26	20	26	10	26	10	26	10	26	10
음이온 mmol/L	18	18	19	22	18	18	18	20	17	10	16	10	17	10	16	10
글루코스 mmol/L	4.57	18	4.15	21	2.73	18	3.48	20	2.89	10	2.70	10	2.89	10	2.70	10
우레아 mmol/L	7.56	19	7.44	22	5.46	18	5.24	20	6.08	10	5.75	10	6.08	10	5.75	10
크레아티닌 $\mu\text{mol/L}$	53	19	51	22	62	18	60	20	57	10	55	10	57	10	55	10
콜레스테롤 mmol/L	1	19	1	22	2	18	1	20	1	10	2	10	1	10	2	10
삼투질 mmol/L	291	18	292	22	293	18	294	20	291	10	288	9	291	10	288	9
우레이트 mmol/L	0.00	19	0.09	22	0.00	18	0.00	20	0.00	10	0.00	10	0.00	10	0.00	10
포스페이트 mmol/L	2.31	19	2.31	22	2.09	18	1.97	20	1.95	10	2.14	10	1.95	10	2.14	10
T Cal mmol/L	2.48	19	2.40	22	2.44	18	2.42	20	2.54	10	2.46	10	2.54	10	2.46	10
이온 Cal mmol/L	1.28	18	1.25	22	1.28	13	1.26	12	1.33	10	1.29	10	1.33	10	1.29	10
알부민 g/L	36	19	35	22	35	18	35	20	35	10	35	10	35	10	35	10
글로불린 g/L	29	19	29	22	28	18	28	20	28	10	28	10	28	10	28	10
총 단백질 g/L	65	19	64	22	63	18	63	20	63	10	64	10	63	10	64	10
총 빌리루빈 $\mu\text{mol/L}$	2	19	1	22	1	18	1	20	0	10	1	10	0	10	1	10
GGT U/L	55	19	58	22	58	18	63	20	47	10	51	10	47	10	51	10
ALP U/L	153	19	140	22	157	18	151	20	202	10	211	10	202	10	211	10
ALT U/L	16	19	16	22	15	18	17	20	21	10	21	10	21	10	21	10
AST U/L	84	19	78	22	82	18	91	20	111	10	107	9	111	10	107	9
LDH U/L	498	18	496	22	532	18	536	20	624	10	577	9	624	10	577	9

	기준선				28일				90일				180일			
	대조		시험		대조		시험		대조		시험		대조		시험	
	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n	평균	n
해모글로빈 g/L	102	19	100	22	115	18	113	21	115	10	120	10	115	10	120	10
적혈구 $\times 10^{12}/\text{L}$	9.02	19	9.07	22	10.17	18	10.47	21	10.07	10	10.41	10	10.07	10	10.41	10
중성 세포 부피 L/L	0.34	19	0.34	22	0.38	18	0.40	21	0.39	10	0.40	10	0.39	10	0.40	10
평균 세포 부피 fL	37.71	19	37.97	22	37.79	18	37.94	21	38.39	10	37.92	10	38.39	10	37.92	10
평균 세포 해모글로빈 pg	11.28	19	11.08	22	11.36	18	11.30	21	11.44	10	11.52	10	11.44	10	11.52	10
평균 세포 해모글로빈 농도 g/L	299	19	292	22	301	18	298	21	299	10	305	10	299	10	305	10
적혈구 간격 폭 %	20	19	20	22	20	18	20	21	19	10	19	10	19	10	19	10

혈소판 $\times 10^9/\text{L}$	343	16	334	22	397	17	347	20	305	9	241	9	305	9	241	9
백혈구 계수 $10^9/\text{L}$	4.87	19	5.35	22	5.82	18	5.89	21	5.89	10	6.16	10	5.89	10	6.16	10
호중구 %	40	19	41	22	46	18	64	21	40	10	41	10	40	10	41	10
림프구 %	58	19	56	22	51	18	51	21	53	10	58	10	53	10	58	10
단핵구 %	1	19	1	22	2	18	2	21	4	10	5	10	4	10	5	10
호산구 %	1	19	1	22	1	18	0	21	4	10	2	10	4	10	2	10
호염기구 %	0	19	0	22	0	18	0	21	0	10	0	10	0	10	0	10

[0226]

[0227]

[서열목록]

[0228] >서열식별번호: 1 헌팅틴 mRNA; NCBI 참조 서열 NM_002111.8)

GCTGCCGGGACGGGTCCAAGATGGACGGCCGCTCAGGTTCTGCTTTTACCTGCGGC
CCAGAGCCCCATTTCATTGCCCCGGTGCTGAGCGGCGCCGCGAGTCGGCCCCGAGGCC
TCCGGGGACTGCCGTGCCGGGGGGAGACCGCCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT
GAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
GCCGCCGCCGCCGCTCCTCAGCTTCTCAGCCGCCGCCGCCGAGGCACAGCCGCTGCT
GCCTCAGCCGCAGCCGCCCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTGTGG

[0229]

CTGAGGAGCCGCTGCACCGACCAAAGAAAGAACTTTTCAGCTACCAAGAAAGACCGT
GTGAATCATTGTCTGACAATATGTGAAAACATAGTGGCACAGTCTGTCAGAAATTCT
CCAGAATTTTCAGAAACTTCTGGGCATCGCTATGGAACCTTTTCTGCTGTGCAGTGAT
GACGCAGAGTCAGATGTCAGGATGGTGGCTGACGAATGCCTCAACAAAGTTATCAA
AGCTTTGATGGATTCTAATCTTCCAAGGTTACAGCTCGAGCTCTATAAGGAAATTAA
AAAGAATGGTGCCCCCTCGGAGTTTGCCTGTGCTGCCCTGTGGAGGTTTGTGAGCTGGC
TCACCTGGTTTCGGCCTCAGAAATGCAGGCCTTACCTGGTGAACCTTCTGCCGTGCCT
GACTCGAACAACAGACACCCGAAGAATCAGTCCAGGAGACCTTGGCTGCAGCT
GTTCCCAAAATTATGGCTTCTTTTGGCAATTTTGCAAATGACAATGAAATTAAGGTT
TTGTTAAAGGCCTTCATAGCGAACCTGAAGTCAAGTCCCCCACCATTTCGGCGGAC
AGCGGCTGGATCAGCAGTGAGCATCTGCCAGCACTCAAGAAGGACACAATATTTCT
ATAGTTGGCTACTAAATGTGCTCTTAGGCTTACTCGTTCCTGTGCGAGGATGAACACT
CCACTCTGCTGATTCTTGCGTGCTGCTCACCCTGAGGTATTTGGTGCCCTTGTGCA
GCAGCAGGTCAAGGACACAAGCCTGAAAGGCAGCTTCGGAGTGACAAGGAAAGAA
ATGGAAGTCTCTCCTTCTGACAGCAGCTTGTCCAGGTTTATGAAGTACGTTACAT
CATAACAGCACCAAGACCACAATGTTGTGACCGGAGCCCTGGAGCTGTTGCAGCA
GCTCTTCAGAACGCCTCCACCCGAGCTTCTGCAAACCTGACCGCAGTCGGGGGCA
TTGGGCAGCTCACCGCTGCTAAGGAGGAGTCTGGTGGCCGAAGCCGTAGTGGGAGT
ATTGTGGAACCTATAGCTGGAGGGGGTCCCTCATGCAGCCCTGTCTTTCAAGAAAA
CAAAAAGGCAAGTGCTCTTAGGAGAAGAAGAAGCCTTGGAGGATGACTCTGAAT
CGAGATCGGATGTCAGCAGCTCTGCCTTAACAGCCTCAGTGAAGGATGAGATCAGT
GGAGAGTGGCTGCTTCTTTCAGGGGTTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTCATGACATC
ATCACAGAACAGCCACGGTCACAGCACACACTGCAGGCGGACTCAGTGGATCTGGC
CAGCTGTGACTTGACAAGCTCTGCCACTGATGGGGATGAGGAGGATATCTTGAGCC
ACAGCTCCAGCCAGGTCAGCGCCGTCCCATCTGACCCTGCCATGGACCTGAATGAT
GGGACCCAGGCCTCGTCGCCCCATCAGCGACAGCTCCCAGACCACCACCGAAGGGCC
TGATTACAGCTGTTACCCCTTCAGACAGTTCTGAAATTGTGTTAGACGGTACCGACAA
CCAGTATTTGGGCCCTGCAGATTGGACAGCCCCAGGATGAAGATGAGGAAGCCACAG
GTATTCTTCTGCTGAAAGCCTCGAGGCCTTCAGGAACCTTCCATGGCCCTTCAAC
AGGCACATTTATTGAAAAACATGAGTCACTGCAGGCAGCCTTCTGACAGCAGTGTT
GATAAATTTGTGTTGAGAGATGAAGCTACTGAACCGGGTGATCAAGAAAACAAGCC
TTGCCGCATCAAAGGTGACATTGGACAGTCCACTGATGATGACTCTGCACCTCTTGT
CCATTGTGTCCGCCCTTTATCTGCTTCGTTTTTGCTAACAGGGGGAAAAAATGTGCT
GGTTCGGGACAGGGATGTGAGGGTCAGCGTGAAGGCCCTGGCCCTCAGCTGTGTGG
GAGCAGCTGTGGCCCTCCACCCGGAATCTTTCTTCAGCAAACTCTATAAAGTTCCCTC
TTGACACCACGGAATACCCTGAGGAACAGTATGTCTCAGACATCTTGAAGTACATC
GATCATGGAGACCCACAGGTTTCGAGGAGCCACTGCCATTCTCTGTGGGACCCTCAT
CTGCTCCATCCTCAGCAGGTCCCGCTTCCACGTGGGAGATTGGATGGGCACCATTAG
AACCCTCACAGGAAATACATTTTCTTTGGCGGATTGCATTCCTTTGCTGCGGAAAAC
ACTGAAGGATGAGTCTTCTGTTACTTGCAAGTTAGCTTGTACAGCTGTGAGGAACTG
TGTCATGAGTCTCTGCAGCAGCAGCTACAGTGAGTTAGGACTGCAGCTGATCATCG
ATGTGCTGACTCTGAGGAACAGTTCTATTGGCTGGTGAGGACAGAGCTTCTGGAA
ACCCTTGACAGAGATTGACTTCAGGCTGGTGAGCTTTTGGAGGCAAAAGCAGAAAA
CTTACACAGAGGGGCTCATCATTATACAGGGCTTTTAAACTGCAAGAACGAGTGC
TCAATAATGTTGTCATCCATTGCTTGGAGATGAAGACCCAGGGTGCGACATGTTG
CCGCAGCATCACTAATTAGGCTTGTCCCAAAGCTGTTTTATAAATGTGACCAAGGAC
AAGCTGATCCAGTAGTGGCCGTGGCAAGAGATCAAAGCAGTGTTTACCTGAAACTT
CTCATGCATGAGACGCAGCCTCCATCTCATTTCTCCGTCAGCACAAATAACCAGAATA

[0230]

TATAGAGGCTATAACCTACTACCAAGCATAACAGACGTCCTATGGAAAATAACCT
 TTCAAGAGTTATTGCAGCAGTTTCTCATGAACATAATCACATCAACCACCAGAGCACT
 CACATTTGGATGCTGTGAAGCTTTGTGTCTTCTTCCACTGCCTTCCCAGTTTGCATT
 TGGAGTTTAGGTTGGCACTGTGGAGTGCCTCCACTGAGTGCCTCAGATGAGTCTAGG
 AAGAGCTGTACCGTTGGGATGGCCACAATGATTCTGACCCTGCTCTCGTCAGCTTGG
 TTCCCATTGGATCTCTCAGCCCATCAAGATGCTTTGATTTTGGCCGGAAACTTGCTT
 GCAGCCAGTGCTCCCAAATCTCTGAGAAGTTTCATGGGCCTCTGAAGAAAGAAGCCAA
 CCCAGCAGCCACCAAGCAAGAGGAGGTCTGGCCAGCCCTGGGGGACCGGGCCCTG
 GTGCCCATGGTGGAGCAGCTCTTCTCTCACCTGCTGAAGGTGATTAACATTTGTGCC
 CACGTCCTGGATGACGTGGCTCCTGGACCCGCAATAAAGGCAGCCTTGCCTTCTCTA
 ACAAACCCCCCTTCTCTAAGTCCCATCCGACGAAAGGGGAAGGAGAAAGAACCAG
 GAGAACAAGCATCTGTACCGTTGAGTCCCAAGAAAGGCAGTGAGGCCAGTGCAGCT
 TCTAGACAATCTGATACCTCAGGTCTGTTACAACAAGTAAATCCTCATCACTGGGG
 AGTTTCTATCATCTTCTTCATACCTCAAACCTGCATGATGTCCTGAAAGCTACACAC
 GCTAACTACAAGGTCACGCTGGATCTTCAGAACAGCACGGAAAAAGTTTGGAGGGTT
 TCTCCGCTCAGCCTTGGATGTTCTTTCTCAGATACTAGAGCTGGCCCACTGCAGGA
 CATTTGGGAAGTGTGTTGAAGAGATCCTAGGATACCTGAAATCCTGCTTTAGTCGAG
 AACCAATGATGGCAACTGTTTGTGTTCAACAATTGTTGAAGACTCTCTTTGGCACAA
 ACTTGGCCCTCCCAGTTTGTATGGCTTATCTTCCAACCCAGCAAGTCACAAGGCCGAG
 CACAGCGCCTTGGCTCCTCCAGTGTGAGGCCAGGCTTGTACCACTACTGCTTCATGG
 CCCCCTACACCCACTTCACCCAGGCCCTCGCTGACGCCAGCCTGAGGAACATGGTG
 CAGGCGGAGCAGGAGAACGACACCTCGGGATGGTTGATGTCTCCAGAAAGTGTC
 TACCCAGTTGAAGACAAACCTCACGAGTGTACAAAAGAACCCTGCAGATAAGAATG
 CTATTCATAATCACATTCGTTTGTGTTGAACCTCTTGTATATAAAGCTTTAAACAGTA
 CACGACTACAACATGTGTGCAGTTACAGAAGCAGGTTTTAGATTTGCTGGCGCAGC
 TGGTTCAGTTACGGGTTAATTACTGTCTTCTGGATTTCAGATCAGGTGTTTATTGGCTT
 TGTATTGAAACAGTTTGAATACATTGAAGTGGGCCAGTTCAGGGAATCAGAGGCAA
 TCATTCCAAACATCTTTTCTTCTTGGTATTACTATCTTATGAACGCTATCATTCAAA
 ACAGATCATTGGAATTCCTAAAATCATTCAGCTCTGTGATGGCATCATGGCCAGTGG
 AAGGAAGGCTGTGACACATGCCATACCGGCTCTGCAGCCCATAGTCCACGACCTCT
 TTGTATTAAGAGGAACAAATAAAGCTGATGCAGGAAAAGAGCTTGAAACCCAAAA
 AGAGGTGGTGGTGTCAATGTTACTGAGACTCATCCAGTACCATCAGGTGTTGGAGA
 GTTTCATCTTGTCTGTCAGCAGTGCCACAAGGAGAATGAAGACAAGTGGAAGCGA
 CTGTCTCGACAGATAGCTGACATCATCTCCCAATGTTAGCCAAACAGCAGATGCA
 CATTGACTCTCATGAAGCCCTTGGAGTGTAAATACATTATTTGAGATTTTGGCCCC
 TTCTTCCCTCCGTCCCGTAGACATGCTTTTACGGAGTATGTTCTGCTACTCCAAACAC
 AATGGCGTCCGTGAGCACTGTTCAACTGTGGATATCGGGAATTCTGGCCATTTTGGAG
 GGTCTGATTTCCAGTCAACTGAAGATATTGTTCTTTCTCGTATTCAGGAGCTCTCC
 TTCTCTCCGTATTTAATCTCCTGTACAGTAATTAATAGGTTAAGAGATGGGGACAGT
 ACTTCAACGCTAGAAGAACACAGTGAAGGGGAAACAAATAAAGAATTTGCCAGAAG
 AAACATTTTCAAGGTTTCTATTACAACCTGGTTGGTATTCTTTTGAAGACATTGTTAC
 AAAACAGCTGAAGGTGGAAATGAGTGAGCAGCAACATACTTTCTATTGCCAGGAAC
 TAGGCACACTGCTAATGTGTCTGATCCACATCTTCAAGTCTGGAATGTTCCGGAGAA
 TCACAGCAGCTGCCACTAGGCTGTTCCGCAGTGATGGCTGTGGCGGCAGTTTCTACA
 CCCTGGACAGCTTGAACCTTGCGGGCTCGTTCCATGATCACCACCCACCCGGCCCTGG
 TGCTGCTCTGGTGTGAGATACTGCTGCTTGTCAACCACACCGACTACCGCTGGTGGG
 CAGAAGTGCAGCAGACCCCGAAAAGACACAGTCTGTCCAGCACAAAGTTACTTAGT
 CCCCAGATGTCTGGAGAAGAGGAGGATTCTGACTTGGCAGCCAAACTTGGAATGTG

[0231]

CAATAGAGAAATAGTACGAAGAGGGGCTCTCATTCTCTTCTGTGATTATGTCTGTCA
 GAACCTCCATGACTCCGAGCACTTAACGTGGCTCATTGTAAATCACATTCAAGATCT
 GATCAGCCTTTCCACGAGCCTCCAGTACAGGACTTCATCAGTGCCGTTTCATCGGAA
 CTCTGCTGCCAGCGGCTGTTTCATCCAGGCAATTCAGTCTCGTTGTGAAAACCTTTC
 AACTCCAACCATGCTGAAGAAAACCTTTCAGTGCTTGGAGGGGATCCATCTCAGCC
 AGTCGGGAGCTGTGCTCACGCTGTATGTGGACAGGCTTCTGTGCACCCCTTCCGCTG
 TGCTGGCTCGCATGGTCGACATCCTTGCTTGTGCGCCGGGTAGAAAATGCTTCTGGCTG
 CAAATTTACAGAGCAGCATGGCCAGTTGCCAATGGAAGAACTCAACAGAATCCAG
 GAATACCTTCAGAGCAGCGGGCTCGCTCAGAGACACCAAAGGCTCTATTCCCTGCT
 GGACAGGTTTCGTCTCTCCACCATGCAAGACTCACTTAGTCCCTCTCCTCCAGTCTCT
 TCCCACCCGCTGGACGGGGATGGGCACGTGTCACTGGAAACAGTGAGTCCGGACAA
 AGACTGGTACGTTTCATCTTGTCAAATCCCAAGTGTGGACCAGGTCAGATTCTGCACT
 GCTGGAAGGTGCAGAGCTGGTGAATCGGATTCTGCTGAAGATATGAATGCCTTCA
 TGTGAACTCGGAGTTCAACCTAAGCCTGTAGCTCCATGCTTAAGCCTAGGGATG
 AGTGAAATTTCTGGTGGCCAGAAGAGTGCCCTTTTGAAGCAGCCCGTGAGGTGAC
 TCTGGCCCGTGTGAGCGGCACCGTGCAGCAGCTCCCTGCTGTCCATCATGTCTTCCA
 GCCCCGAGCTGCCTGCAGAGCCGGCGGCCTACTGGAGCAAGTTGAATGATCTGTTTG
 GGGATGCTGCACTGTATCAGTCCCTGCCACTCTGGCCCCGGGCCCTGGCACAGTACC
 TGGTGGTGGTCTCCAACTGCCAGTCATTTGCACCTTCCTCCTGAGAAAGAGAAGG
 ACATTGTGAAATTCGTGGTGGCAACCTTGAGGCCCTGTCTGGCATTGTGATCCATG
 AGCAGATCCCGCTGAGTCTGGATCTCCAGGCAGGGCTGGACTGCTGCTGCCTGGCC
 CTGCAGCTGCCTGGCCTCTGGAGCGTGGTCTCCTCCACAGAGTTTGTGACCCACGCC
 TGCTCCCTCATCTACTGTGTGCACTTCATCCTGGAGGCCGTTGCAGTGCAGCCTGGA
 GAGCAGCTTCTTAGTCCAGAAAGAAGGACAAATACCCAAAAGCCATCAGCGAGG
 AGGAGGAGGAAGTAGATCCAAACACACAGAAATCCTAAGTATATCACTGCAGCCTGT
 GAGATGGTGGCAGAAATGGTGGAGTCTCTGCAGTCGGTGTGGCCTTGGGTGATAA
 AAGGAATAGCGGCGTGCCGGCGTTTCTACGCCATTGCTAAGGAACATCATCATCA
 GCCTGGCCCCGCTGCCCCCTGTCAACAGCTACACACGTGTGCCCCCACTGGTGTGGA
 AGCTTGGATGGTCAACCAAACCGGGAGGGGATTTTGGCACAGCATTCCCTGAGATC
 CCCGTGGAGTTTCTCCAGGAAAAGGAAGTCTTTAAGGAGTTCATCTACCGCATCAA
 CACACTAGGCTGGACCAGTCGTAAGTCTAGTCTTGAAGAACTTGGGGCCACCCTCCTTG
 TGTCTGGTGACGCAGCCCCCTCGTGATGGAGCAGGAGGAGAGCCCACCAGAAGAA
 GACACAGAGAGGACCCAGATCAACGTCTGGCCGTGCAGGCCATCACCTCACTGGT
 GCTCAGTGCAATGACTGTGCCTGTGGCCGGCAACCCAGCTGTAAGCTGCTTGGAGC
 AGCAGCCCCGGAACAAGCCTCTGAAAGCTCTCGACACCAGGTTTGGGAGGAAGCTG
 AGCATTATCAGAGGGATTGTGGAGCAAGAGATTCAAGCAATGGTTTCAAAGAGAGA
 GAATATTGCCACCCATCATTTATATCAGGCATGGGATCCTGTCCCTTCTCTGTCTCCG
 GCTACTACAGGTGCCCTCATCAGCCACGAGAAGCTGCTGCTACAGATCAACCCCGA
 GCGGGAGCTGGGGAGCATGAGCTACAACTCGGCCAGGTGTCCATACACTCCGTGT
 GGCTGGGGAACAGCATCACACCCCTGAGGGAGGAGGAATGGGACGAGGAAGAGGA
 GGAGGAGGCCGACGCCCCTGCACCTTCGTACACCCACGTCTCCAGTCAACTCCA
 GGAAACACCGGGCTGGAGTTGACATCCACTCCTGTTTCGAGTTTTTGTCTGAGTTGT
 ACAGCCGCTGGATCCTGCCGTCCAGCTCAGCCAGGAGGACCCCGGCCATCCTGATC
 AGTGAGGTGGTCAAGATCCCTTCTAGTGGTCTCAGACTTGTTCACCGAGCGCAACCA
 TTTGAGCTGATGTATGTGACGCTGACAGAACTGCGAAGGGTGCACCCCTCAGAAGA
 CGAGATCCTCGCTCAGTACCTGGTGCCTGCCACCTGCAAGGCAGCTGCCGTCTTGG
 GATGGACAAGGCCGTGGCGGAGCCTGTCAGCCGCCTGCTGGAGAGCACGCTCAGGA
 GCAGCCACCTGCCAGCAGGGTTGGAGCCCTGCACGGCGTCTCTATGTGCTGGAG

[0232]

TGCGACCTGCTGGACGACACTGCCAAGCAGCTCATCCCGGTCATCAGCGACTATCTC
 CTCTCCAACCTGAAAGGGATCGCCCACTGCGTGAACATTACAGCCAGCAGCACGT
 ACTGGTCATGTGTGCCACTGCGTTTTACCTCATTGAGAACTATCCTCTGGACGTAGG
 GCCGGAATTTTCAGCATCAATAATACAGATGTGTGGGGTGATGCTGTCTGGAAGTG
 AGGAGTCCACCCCTCCATCATTTACCACTGTGCCCTCAGAGGCCTGGAGCGCCTCC
 TGCTCTCTGAGCAGCTCTCCCGCTGGATGCAGAAATCGCTGGTCAAGCTGAGTGTGG
 ACAGAGTGAACGTGCACAGCCCGCACCGGGCCATGGCGGCTCTGGGCCTGATGCTC
 ACCTGCATGTACACAGGAAAGGAGAAAGTCAGTCCGGGTAGAACTTCAGACCCTAA
 TCCTGCAGCCCCGACAGCAGTCAGTGATTGTGCTATGGAGCGGGTATCTGTTCT
 TTTTGATAGGATCAGGAAAGGCTTTCCTTGTGAAGCCAGAGTGGTGGCCAGGATCC
 TGCCCCAGTTTCTAGACGACTTCTTCCCACCCAGGACATCATGAACAAAGTCATCG
 GAGAGTTTCTGTCCAACCAGCAGCCATACCCCAAGTTCATGGCCACCGTGGTGATA
 AGGTGTTTCAGACTCTGCACAGCACCGGGCAGTCGTCCATGGTCCGGGACTGGGTC
 ATGCTGTCCCTCTCCAACCTTCACGCAGAGGGCCCCGGTCGCCATGGCCACGTGGAG
 CCTCTCCTGCTTCTTTGTCAGCGCGTCCACCAGCCCGTGGGTGCGGCGATCCTCCC
 ACATGTCATCAGCAGGATGGGCAAGCTGGAGCAGGTGGACGTGAACCTTTTCTGCC
 TGGTCGCCACAGACTTCTACAGACACCAGATAGAGGAGGAGCTCGACCGCAGGGCC
 TTCCAGTCTGTGCTTGAGGTGGTTGCAGCCCCAGGAAGCCCATATCACCGGCTGCTG
 ACTTGTTTACGAAATGTCCACAAGGTCACCACCTGCTGAGCGCCATGGTGGGAGAG
 ACTGTGAGGCGGCAGCTGGGGCCGGAGCCTTTGGAAGTCTGCGCCCTTGTGCCCTG
 CCTCCACCGAGCCAGCTTGGTCCCTATGGGCTTCCGCACATGCCGCGGGCGGCCAG
 GCAACGTGCGTGTCTCTGCCATGTGGCAGAAGTGCTCTTTGTGGCAGTGGCCAGGC
 AGGGAGTGTCTGCAGTCTGGTGGGGCTGAGCCTGAGGCCTTCCAGAAAGCAGGAG
 CAGCTGTGCTGCACCCCATGTGGGTGACCAGGTCCCTTCTCCTGATAGTCACCTGT
 GGTGTTGCCAGGTTGCAGCTGCTCTTGATCTGGGCCAGAAAGTCCCTCCCTCCTGCA
 GGCTGGCTGTTGGCCCCCTCTGCTGTCTGTCAGTAGAAGGTGCCGTGAGCAGGCTTTG
 GGAACACTGGCCTGGGTCTCCCTGGTGGGGTGTGCATGCCACGCCCCGTGTCTGGAT
 GCACAGATGCCATGGCCTGTGCTGGGCCAGTGGCTGGGGGTGCTAGACACCCGGCA
 CCATTCCTCCCTTCTCTCTTTTCTTCTCAGGATTTAAAATTTAATTATATCAGTAAAGA
 GATTAATTTTAACGTAACCTCTTCTATGCCCCGTGTAAAGTATGTGAATCGCAAGGCC
 TGTGCTGCATGCGACAGCGTCCGGGGTGGTGGACAGGGCCCCCGGCCACGCTCCCT
 CTCTGTAGCCACTGGCATAGCCCTCCTGAGCACCCGCTGACATTTCCGTTGTACAT
 GTTCCTGTTTATGCATTACAAAGGTGACTGGGATGTAGAGAGGCGTTAGTGGGCAG
 GTGGCCACAGCAGGACTGAGGACAGGCCCCCATTATCCTAGGGGTGCGCTCACCTG
 CAGCCCCCTCCTCCTCGGGCACAGACGACTGTCGTTCTCCACCCACCAGTCAGGGACA
 GCAGCCTCCCTGTCACTCAGCTGAGAAGGCCAGCCCTCCCTGGCTGTGAGCAGCCTC
 CACTGTGTCCAGAGACATGGGCCTCCCACTCCTGTTCCCTTGCTAGCCCTGGGGTGGC
 GTCTGCCTAGGAGCTGGCTGGCAGGTGTTGGGACCTGCTGCTCCATGGATGCATGCC
 CTAAGAGTGTCACTGAGCTGTGTTTTGTCTGAGCCTCTCTCGGTCAACAGCAAAGCT
 TGGTGTCTTGGCACTGTTAGTGACAGAGCCCCAGCATCCCTTCTGCCCCCGTTCCAGC
 TGACATCTTGACCGGTGACCCCTTTTAGTCAGGAGAGTGCAGATCTGTGCTCATCGG
 AGACTGCCCCACGGCCCTGTCAGAGCCGCCACTCCTATCCCCAGGCCAGGTCCCTG
 GACCAGCCTCCTGTTTGCAGGCCCAGAGGAGCCAAGTCATTAATAATGGAAGTGGAT
 TCTGGATGGCCGGGCTGCTGCTGATGTAGGAGCTGGATTTGGGAGCTCTGCTTGCCG
 ACTGGCTGTGAGACGAGGCAGGGGCTCTGCTTCCTCAGCCCTAGAGGCGAGCCAGG
 CAAGGTTGGCGACTGTCATGTGGCTTGGTTTGGTCATGCCCGTCGATGTTTTGGGTA
 TTGAATGTGGTAAGTGGAGGAAATGTTGGAACCTCTGTGCAGGTGCTGCCTTGAGAC
 CCCCAGCTTCCACCTGTCCCTCTCCTATGTGGCAGCTGGGGAGCAGCTGAGATGTG

[0233]

GACTTGTATGCTGCCCACATACGTGAGGGGGAGCTGAAAGGGAGCCCCCTCCTCTGA
GCAGCCTCTGCCAGGCCTGTATGAGGCTTTTCCCACCAGCTCCCAACAGAGGCCTCC
CCCAGCCAGGACCACCTCGTCTCTGCGGGGGCAGCAGGAGCGGTAGAAAGGGG
TCCGATGTTTGGAGAGGCCCTTAAGGGAAGCTACTGAATTATAACACGTAAGAAAA
TCACCATTCCGTATTGGTTGGGGGCTCCTGTTTCTCATCCTAGCTTTTTCTGGAAG
CCCGCTAGAAGGTTTGGGAACGAGGGGAAAGTTCTCAGAAGCTGTTGGCTGCTCCCC
ACCCGCCTCCCGCCTCCCCCGCAGGTTATGTCAGCAGCTCTGAGACAGCAGTATCAC
AGGCCAGATGTTGTTCTGGCTAGATGTTTACATTTGTAAGAAATAAACTGTGAAT
GTAAACACAGAGCCATCCCTTGGAATGCATATCGCTGGGCTCAACATAGAGTTGTCT
TTCTCTTGTTTACGACGTGATCTAAACCAGTCCTTAGCAAGGGGCTCAGAACACCC
CGCTCTGGCAGTAGGTGTCCCCACCCCCAAAGACCTGCCTGTGTGCTCCGGAGATG
AATATGAGCTCATTAGTAAAAATGACTTCACCCACGCATATACATAAAGTATCCAT
GCATGTGCATATAGACACATCTATAATTTTACACACACACCTCTCAAGACGGAGAT
GCATGGCCTCTAAGAGTGCCCGTGTGCGTTCTTCCTGGAAGTTGACTTTCCTTAGAC
CCGCCAGGTCAAGTTAGCCGCGTGACGGACATCCAGGCGTGGGACGTGGTCAGGGC
AGGGCTCATTGCTGCCCCTAGGATCCCACTGGCGAAGATGGTCTCCATATCAGCT
CTCTGCAGAAGGAGGAAGACTTTATCATGTTTCCTAAAAATCTGTGGCAAGCACCC
ATCGTATTATCCAAATTTTGTGCAAATGTGATTAATTTGGTTGTCAAGTTTGGGG
GTGGGCTGTGGGGAGATTGCTTTTGTTCCTGCTGGTAATATCGGGAAAGATTTTA
ATGAAACCAGGGTAGAATTGTTTGGCAATGCACTGAAGCGTGTTTCTTTCCCAAAT
GTGCCTCCCTTCCGCTGCGGGGCCAGCTGAGTCTATGTAGGTGATGTTTCCAGCTGC
CAAGTGCTCTTTGTTACTGTCCACCCTCATTTCTGCCAGCGCATGTGTCTTTCAAGG
GGAATGTGAAGCTGAACCCCTCCAGACACCCAGAATGTAGCATCTGAGAAGGC
CCTGTGCCCTAAAGGACACCCCTCGCCCCATCTTCATGGAGGGGGTCATTTAGAG
CCCTCGGAGCCAATGAACAGCTCCTCCTTGGAGCTGAGATGAGCCCCACGTGGA
GCTCGGGACGGATAGTAGACAGCAATAACTCGGTGTGTGGCCGCCTGGCAGGTGGA
ACTTCTCCCGTTGCGGGGTGGAGTGAGGTTAGTTCTGTGTGTCTGGTGGGTGGAGT
CAGGCTTCTCTTGCTACCTGTGAGCATCCTTCCCAGCAGACATCCTCATCGGGCTT
GTCCCTCCCCCGCTTCCTCCCTCTGCGGGGAGGACCCGGGACCACAGCTGCTGGCCA
GGGTAGACTTGGAGCTGTCTCCAGAGGGGTCACGTGTAGGAGTGAGAAGAAGGA
AGATCTTGAGAGCTGTGAGGGACCTTGGAGAGCTCAGGATGGCTCAGACGAGGAC
ACTCGCTTGCCGGGCTGGGCCTCCTGGGAAGGAGGGAGCTGCTCAGAATGCCGCA
TGACAACCTGAAGGCAACCTGGAAGGTTGAGGGGCCGCTCTTCCCCCATGTGCCTGT
CACGCTCTGGTGAGTCAAAGGAACGCCTTCCCCTCAGTTGTTTCTAAGAGCAGAGT
CTCCCGCTGCAATCTGGGTGGTAAGTCCAGCCTTGGAGGATCGTGGCCAACGTGG
ACCTGCCTACGGAGGGTGGGCTCTGACCCAAGTGGGGCCTCCTTGTCAGGTCTCAC
TGCTTTGCACCGTGGTCAGAGGGACTGTCAGCTGAGCTTGAGCTCCCCTGGAGCCA
GCAGGGCTGTGATGGGCGAGTCCCGGAGCCCCACCCAGACCTGAATGCTTCTGAGA
GCAAAGGGAAGGAGTACGAGAGATGTATATTTAATTTTAACTGCTGCAAACAT
TGTACATCCAAATTAAAGGAAAAAATGGAACCATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0234]

[0235] >서열식별번호: 2

[0236] TAAATGTGCCTGTTGAAGGGC

[0237] >서열식별번호: 3

[0238] AAGAGGTGCAGAGTCATCATC

[0239] >서열식별번호: 4

[0240] TTCTGGAGGACATCAAACCAT

[0241] >서열식별번호: 5

[0242] TGAAGTGGCCCACTTCAATGT

[0243] >서열식별번호: 6

[0244] TTCCATTGGCAACTGGGCCAT

[0245] >서열식별번호: 7

[0246] TAAGCATGGAGCTAGCAGGCT

[0247]	>서열식별번호: 8
[0248]	TAGCGTTGAAGTACTGTCCCC
[0249]	서열식별번호: 9
[0250]	TTGAGGCAGCAGCGGCTGTGC
[0251]	>서열식별번호: 10
[0252]	TTCATCAGCTTTTCCAGGGTC
[0253]	>서열식별번호: 11
[0254]	TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
[0255]	>서열식별번호: 12
[0256]	CCTTGGCACCCGAGAATTCCA
[0257]	>서열식별번호: 13
[0258]	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
[0259]	>서열식별번호: 14
[0260]	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA
[0261]	>서열식별번호: 15
[0262]	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGA GAATTCCA
[0263]	>서열식별번호: 16
[0264]	좌위 dsCB-GFP-mir155- 5483 bp DNA 원형 SYN 11-OCT-2012
[0265]	정의 dsCB-GFP-mirFlank-폴리A*에의 6433의 결찰
[0266]	등재 dsCB-GFP-mir155-
[0267]	키워드.
[0268]	원천 미지.
[0269]	생물체 미지
[0270]	미분류.
[0271]	참조 1 (염기 1 내지 5483)
[0272]	저자 자체
[0273]	잡지 미발표.
[0274]	코멘트 SciEd 센트럴(Central), 사이언티픽 앤 에듀케이션 소프트웨어(Scientific & Educational Software) 에 의해 생성된 SECID/파일
[0275]	코멘트 SECNOTES 백터 분자: dsCB-GFP-mirFlank-폴리A*
[0276]	단편 단부: BsmBI
[0277]	단편 크기: 5419
[0278]	삽입 분자: 6433
[0279]	단편 단부:

[0280]	단편 크기: 64
[0281]	특징 위치/수식어
[0282]	misc_특징 662..767
[0283]	/유전자="돌연변이 ITR"
[0284]	/SECDrawAs="영역"
[0285]	misc_특징 814..1093
[0286]	/유전자="CMV 인핸서"
[0287]	/SECDrawAs="영역"
[0288]	misc_특징 870..899
[0289]	/유전자="잠정용"
[0290]	/SECDrawAs="영역"
[0291]	misc_특징 1100..1126
[0292]	/유전자="프로브"
[0293]	/SECDrawAs="영역"
[0294]	misc_특징 1100..1369
[0295]	/유전자="B-액틴 프로모터"
[0296]	/생성물="답"
[0297]	/SECDrawAs="영역"
[0298]	misc_특징 상보체 (1168..1190)
[0299]	/유전자="rev"
[0300]	/SECDrawAs="영역"
[0301]	misc_특징 1435..1465
[0302]	/유전자="SV40_late_19s_int"
[0303]	/SECDrawAs="영역"
[0304]	misc_특징 1435..1531
[0305]	/유전자="modSV40_late_16s_int"
[0306]	/SECDrawAs="영역"
[0307]	CDS 1605..2314
[0308]	/유전자="GFP'"
[0309]	/SECDrawAs="유전자"
[0310]	misc_특징 2341..2357
[0311]	/유전자="'MCS"
[0312]	/SECDrawAs="영역"
[0313]	misc_특징 2372..2395
[0314]	/유전자="'5'miR Flank'"
[0315]	/SECDrawAs="영역"

[0316] misc_특징 2460..2504

[0317] /유전자="3'miR Flank"

[0318] /SECDrawAs="영역"

[0319] misc_특징 2573..2699

[0320] /유전자="폴리 A 신호"

[0321] /생성물="토끼 글로빈 폴리 A"

[0322] /SECDrawAs="영역"

[0323] misc_특징 상보체 (2788..2917)

[0324] /유전자="3' ITR"

[0325] /SECDrawAs="영역"

[0326] CDS 3680..4537

[0327] /유전자="Amp(R)"

[0328] /SECDrawAs="유전자"

[0329] 기원

1 gcccaatac gaaacgcct cccccgcg gttggccgat tcattaatgc agctgattct
61 aacgagggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
121 cgcattaagc gggcggggtg tgggtgttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 cctagcgcgc gtcctttcg cttcttccc ttcttttc gccacgttcg ccggctttcc
241 ccgtcaagct ctaaactggg ggtcccttt aggttccga tttagtctt tacggcacct
301 cgaccccaaa aaacttgatt aggggtatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac
361 ggtttttcg ctttgacgt tggatccac gttcttaat agtgactct tgttccaaac
421 tggacaaca ctaacccta tctcgtcta ttctttgat ttataaggga ttttccgat
481 ttggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaa tttaacgcga attttaacaa
541 aatattaacg ctacaattt aaataattgc ttatacaatc ttctgttt tggggctttt
601 ctgattatca accgggtac atatgattga catgctagt ttacattac cgttcacgc
661 cctgcgcgt cgtcgtca ctgagggccg ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt
721 tggtcgccg gcctcagtga gcgagcagc gcgcagagag ggagtggat tcacgcgtgg
781 atctgaattc aattcacgc tggatcctt gtcgttaca taacttacgg taaatggccc
841 gcctggctga ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataagact atgttccat
901 agtaacgcca atagggactt tccattgac tcaatgggtg gagtattac ggtaaacgc
961 ccacttgga gtacatcaag tctatcatat gccaaatag cccctattg acgtcaatga
1021 cgttaaatgg ccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg
1081 gcagtacatc tactcagac cacttctgc ttaactctcc ccatctccc cccctccca
1141 ccccaattt tttatttt ttattttta ttatttttg cagcgatggg ggcggggggg
1201 gggggggggc gcgcgccagg cggggcgagg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgagggcg
1261 agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgtccgaa agtttcttt tatgagcagg
1321 cggcgcgagg ggcggcccta taaaaagca agcgcgcggc gggcgggagc gggatcagcc
1381 accgcgggtg cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaagta actggttaag
1441 ttatgttttt tttttttt ttacgtccc ggtccggtg gttgtgcaa tcaagaact
1501 gctcctcagt ggtgtgtcc ttacttcta ggcctgtac gaagtgtac ttctgtcta
1561 aaagtgcgg aattgtacc gcggccgac caccggtgc caccatggtg agcaagggcg
1621 aggagctgtt caccgggtg gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc
1681 acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga
1741 agttcatctg caccaccggc aagctgccc tgcctggcc caccctgtg accacctga
1801 cctacggcgt gcagtgttc agcgtctac ccgaccacat gaagcagcac gacttctca
1861 agtccgcat cccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttctcaag gacgacggca
1921 actacaagac ccgcgccgag gtgaagttc agggcgacac cctgtgtaac cgcacgagc
1981 tgaaggcat cgactcaag gaggacggca acatctggg gcacaagctg gactacaact
2041 acaacagcca caactctat atcatggcg acaagcaga gaacggcatc aagtgtaact
2101 tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cggcgaccac taccgcaga
2161 acaccccat cggcgaggc cccgtgtct tggcgacaa cactacctg agcaccagt
2221 ccgcctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgtg gattcgtga
2281 ccggcgagg gatcactct gcgatggac agctgtacaa gtaagcggc ctagcgttt
2341 ccggcgagg tctagcgtc gaccagtga tctggaggc ttgtgaagg ctgtatgtg
2401 taagcatgga gctagcagg tttttggc actgactgac agcctgctt ccatgcttac

[0330]

2461 aggcacaaag gcctgtact agcactcaca tggacaaaat ggcccagatc tggccgcact
 2521 cgaaaacggg ccctctagac tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgatctttt
 2581 tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagccctt gagcatctga ctctggcta
 2641 ataaaggaaa ttattttca ttgcaatagt gtgttgaat ttttgtgc tctactcgg
 2701 aagcaattcg ttgatctgaa ttccgaccac ccataatacc cattaccctg gtagataagt
 2761 agcatggcgg gtaaatcatt aactacaagg aacccttagt gatggagtgg gccactccct
 2821 ctctgcgcgc tcgtcgtc actgaggccg ggcgacaaa ggtcgcccg cgcgggggct
 2881 ttgcccgggc ggccctcagt agcgagcgag cgcgcagcct taattaacct aattcactgg
 2941 ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccctg
 3001 cagcatatcc ccttttgc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt
 3061 cccaacagt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgc ctgtagcggc gcatlaagcg
 3121 cggcgggtgt ggtgtttacg cgcagcgtga ccgtacact tgcagcgcc ctagecggcg
 3181 ctcttttgc ttttccct tctttctc ccacgttgc cggctttccc cgtcaagctc
 3241 taaatcgggg gctcccttta ggtttccgat ttatgtcttt acggcacctc gacccaaaa
 3301 aacttgatta ggtgatggt tcacgtagt ggccatgcc ctgatagac gtttttgc
 3361 ctttgacgtt ggagtcacg tctttaata ttggactctt gtccaaact ggaacaacac
 3421 tcaacctat ctcgtctat tctttgatt tataaggat ttgccgatt tggcctatt
 3481 ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaa ttaacgcga ttttaacaa atattaacgc
 3541 ttacaattta ggtggcactt ttccgggaaa tgcgcgga acccctattt gttattttt
 3601 ctaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcctcaata
 3661 atattgaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccccta tcccttttt
 3721 tggcgattt tgccttctg tttttgcta ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc
 3781 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg gatctcaaca gcggaagat
 3841 ccttgagagt ttccgcccg aagaacgtt tccaatgat agcactttta aagttctgct
 3901 atgtggcgc gttatttccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca
 3961 ctattctcag aatgacttgg ttgagtact accagtcaca gaaaagcgc ttacggatgg
 4021 catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataacctg agtgataaca ctgcggccaa
 4081 ctacttctg acaacgatc gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg
 4141 ggatcatgta atcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga
 4201 cgagcgtgac accacgatc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg
 4261 cgaactact atctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt
 4321 tgcaggacca ctctgcgtc cggcccttcc ggctggctg ttattgctg ataatctgg
 4381 agccggtgag cgtgggtc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc
 4441 ccgtatcgt gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca
 4501 gatcgtcgt ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc
 4561 atattactt tagattgatt taaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat
 4621 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcttcc actgagcgtc
 4681 agacccgta gaaaagatca aagatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg
 4741 ctgcttgcac acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt ttgttgcgg atcaagagct
 4801 accaactct tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct
 4861 tctagtgtg ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct
 4921 cgctctgta atctgtttac cagtggctgc tgcagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
 4981 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tgggctgaa cgggggggtc
 5041 gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacacgaa ctgagatacc tacagcgtga
 5101 gctatgagaa agcggccacg ttccgaagg gagaaaggc gacaggtatc cgttaagcgg
 5161 cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga gcttcagggg ggaaacgct ggtatcttta
 5221 tagtctgtc gggtttgc accctgact tgagcgtcga ttttgtgat gctcgtcagg
 5281 gggggcggag ctatggaaaa acgccagcaa cggcccttt ttacggttcc tggcctttt

[0331]

5341 ctggcctttt gctcacatgt tcttctctgc gttatccctt gattctgtg ataaccgtat
 5401 taccgctttt gattgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc
 5461 agtgagcgag gaagcggaag agc

[0332]

[0333] >서열식별번호: 17

[0334] //좌위 pdsU6-Mir-htt-64 5686 bp DNA 원형 SYN 17-SEP-2013

[0335] 정의 pU6-miRNAflank-GFP*에의 6433의 결찰

[0336] 등재 pdsU6-Mir-htt-64

[0337] 키워드.

[0338] 원천 미지.

[0339] 생물체 미지

[0340] 미분류.

[0341]	참조 1 (염기 1 내지 5686)
[0342]	저자 자체
[0343]	잡지 미발표.
[0344]	코멘트 SciEd 센트럴, 사이언티픽 & 에듀케이션 소프트웨어에 의해 생성된 SECID/파일
[0345]	코멘트 SECNOTES 백터 분자: pU6-miRNAFlank-GFP*
[0346]	단편 단부: BsmBI
[0347]	단편 크기: 5622
[0348]	삽입 분자: 6433
[0349]	단편 단부:
[0350]	단편 크기: 64
[0351]	특징 위치/수식어
[0352]	misc_특징 662..767
[0353]	/유전자="돌연변이 ITR"
[0354]	/SECDrawAs="영역"
[0355]	misc_특징 777..1041
[0356]	/유전자="U6 프로모터"
[0357]	/SECDrawAs="영역"
[0358]	misc_신호 1041..1041
[0359]	/유전자="Pol III 개시"
[0360]	/생성물="전사 개시 "
[0361]	/SECDrawAs="표지"
[0362]	CDS 1042..1065
[0363]	/유전자="5' miR Flank'"
[0364]	/SECDrawAs="유전자"
[0365]	CDS 1130..1175
[0366]	/유전자="miR 3' Flank"
[0367]	/SECDrawAs="유전자"
[0368]	misc_신호 1176..1181
[0369]	/유전자="Pol III term"
[0370]	/생성물="pol III 종료자"
[0371]	/SECDrawAs="표지"
[0372]	misc_특징 1199..1478
[0373]	/유전자="CMV 인핸서"
[0374]	/SECDrawAs="영역"
[0375]	misc_특징 1255..1284
[0376]	/유전자="잠정용"

[0377] /SECDrawAs="영역"

[0378] misc_특징 1485..1754

[0379] /유전자="B-액틴 프로모터"

[0380] /생성물="닭"

[0381] /SECDrawAs="영역"

[0382] misc_특징 1485..1511

[0383] /유전자="프로브"

[0384] /SECDrawAs="영역"

[0385] misc_특징 상보체 (1553..1575)

[0386] /유전자="rev"

[0387] /SECDrawAs="영역"

[0388] misc_특징 1820..1916

[0389] /유전자="modSV40_late_16s_int"

[0390] /SECDrawAs="영역"

[0391] misc_특징 1820..1850

[0392] /유전자="SV40_late_19s_int"

[0393] /SECDrawAs="영역"

[0394] CDS 1990..2699

[0395] /유전자="GFP' "

[0396] /SECDrawAs="유전자"

[0397] misc_특징 2726..2737

[0398] /유전자="'MCS' "

[0399] /SECDrawAs="영역"

[0400] misc_특징 2776..2902

[0401] /유전자="폴리 A 신호"

[0402] /생성물="토끼 글로빈 폴리 A"

[0403] /SECDrawAs="영역"

[0404] misc_특징 상보체 (2991..3120)

[0405] /유전자="3' ITR"

[0406] /SECDrawAs="영역"

[0407] CDS 3883..4740

[0408] /유전자="Amp(R)"

[0409] /SECDrawAs="유전자"

[0410] 기원

1 gcccaatagc caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcaataatgc agctgattct
61 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
121 cgcattaagc ggggggggtg tgggtgttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 ctagcgccc gctcctttcg ctttctccc ttctttctc gccacgttcg ccggtttcc
241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt aggggtccga tttagtgctt tacggcacct
301 cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttacgtagt gggccatcgc cctgatagac
361 ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttcttfaat agtggactct tgttccaac
421 tggacaaca ctaacccta tctcggtcta ttctttgat ttataaggga ttttgccgat
481 ttggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttacaaaaa tttaacgca attttaacaa
541 aatattaacg cttaacaatt aaatatgtc ttataacat ttctgtttt tggggctttt
601 ctgattatac accggggtag atatgattga catgctagt ttacgattac cgttcatcgc
661 cctgcgcgt cgtcgtcga ctgagggcgc ccgggcaaaag cccggggcgc gggcgacctt
721 tggtcgccc gctcagtgga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggaa tctataaagg
781 tcgggcagga agagggccta ttcccatga ttcttcata ttgcatata cgatacaagg

[0411]

841 ctgttagaga gataattaga attaatgtga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata
901 cgtgacgtag aaagtaataa ttcttgggt agtttcaggt tttaaaatta tgttttaaaa
961 tggactatca tatgctacc gtaactgaa agtatctga tttctggct ttatatatct
1021 tgtgaaaagg acgaaacacc gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga
1081 gctagcaggc tgttttgcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag
1141 gcctgttact agcactaca tggacaacaa ggccctttt tctagtggta cctctggtcg
1201 ttacataact tacggtaat ggccgcctg gctgacgcc caacgacccc cggccattga
1261 cgtcaataat gacgtatgt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat
1321 ggggtggagt ttacggtaa actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa
1381 gtacgcccc tattgacgtc aatgacgga aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca
1441 tgacctatg ggactttct acttggcagt acatctactc gagggcacgt tctgcttca
1501 tctcccacat tccccccct cccaccccc aattttgtat ttattttt tttaattatt
1561 ttgtgcagcg atggggggcg gggggggggg gggggcgcg ccaggcgggg cggggggggg
1621 cgagggggcg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct
1681 ccgaaagttt cttttatgg cgagggcg gcggcgggc cctataaaa agcgaagcgc
1741 gcggcgggcg ggagcgggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga
1801 aaaaccagaa agttaactgg taagttagt cttttgtct ttatttcag gtcccggatc
1861 cgggtggtgt gcaaatcaaa gaactgctcc ttagtgatg ttgcctttac ttataggcct
1921 gtacggaaat gttactctg ctctaaaagc tgggaattg taccgcggc cgatccaccg
1981 gtcgccacca tggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catctggct
2041 gagctggac gcatcaagg ggcacacaag ttacgtgtg ccgcgagggg cgagggcgat
2101 gccacctagc gcaagctgac cctgaagtc atctgcacca ccggcaagct gccctgccc
2161 tggccacccc tctgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac
2221 cacatgaagc agcagactt ctcaagtc gccatgccg aaggctactg ccaggagcgc
2281 accatctct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc
2341 gacacctgg tgaaccgat cgagctgaag ggcctgact tcaaggagga cggcaacatc
2401 ctggggcaca agctggagt caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag
2461 cagaagaacg gcatcaagg gaaattcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg
2521 cagctgcgcg acctactaca gcagaacac ccatcgcg acggccccgt gctgctgccc
2581 gacaaccact acctgagcac ccagtcgcc ctgagcaaa accccaacga gaagcgcgat
2641 cacatgttc tctggagtt cgtgaccgc gccgggatca ctctcgcat ggacgagctg
2701 tacaagtaaa gcggccctag cgtttccggc gacggtgcta gactcgagga cggggtgaac
2761 tacgctgag gatccgatct ttttccctc gccaaaaatt atggggacat catgaagccc
2821 ctgagcactc tgaattctg ctaataaagg aaatttatt tcaattgaat agtgtgttg
2881 aatttttgt gtctctact cggaaacaa tegtgtat gaatttcgac caccataat
2941 accattacc ctgtagata agtagcatg cgggttaatc attactaca aggaaccct
3001 agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgtcgtcgc ctactgagg ccggcgacc
3061 aaagtgccc cgagccccgg gctttgccg ggcggcctca gtgagcgagc gacgcgagc
3121 ccttaattaa ctaattcac tggcgtcgt tttaaacgt cgtgactggg aaaacctgg
3181 cgttaccaca ctaatgcc ttgcagaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga
3241 agaggcccc accgatgcc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggagcg
3301 gccctgtagc ggcgcattaa gcggggggg tgtgtgtgt acgcgcagc tgaccgctac
3361 acttgccc gcctagcgc ccgtctctt cgtttctc ccttcttc tggccagt
3421 cgccggctt cccgtcaa cctaaatcg ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc
3481 ttacggcac ctcgaccca aaaaactga ttagggtgat ggttcagta gttggccatc
3541 gccctgatag acggttttc gcccttgac gttggagtc acgttctta atagtggact
3601 cttgttcaa actggaaca cactcaacc tatctcggtc tttctttt attataaagg
3661 gattttccg atttcgcct attgttaaa aatagagctg atttaacaa aatttaacgc

[0412]

3721 gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc
3781 ggaaccccta ttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgatccgct catgagacaa
3841 taacctgat aaatgctca ataatttga aaaaggaaga gtatgagfat tcaacatttc
3901 cgtgtcggcc ttattccctt ttgtcggca ttgtcccttc ctgtttttgc tcaccagaa
3961 acgctgttga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggtg ttacatcgaa
4021 ctggtatcta acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg
4081 atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa
4141 gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc
4201 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc
4261 atgagtata acactcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta
4321 accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactgcc ttgatcgttg ggaaccggag
4381 ctgaatgaag ccatacaaa cgacgagcgt gacaccaga tgcctgtagc aatggcaaca
4441 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag ctcccgga acaatttaata
4501 gactggatgg agggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggtggc
4561 tggtttattg ctgataatc tggagccggt gacgtgtggc ctgcggtat cattgcagca
4621 ctggggccag atgttaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtacggca
4681 actatggatg aacgaaatag acagatcgt gagatagtg cctactgat taagcattgg
4741 taactgtcag accaagtta ctatataata cttagattg atttaaaact tcaatttaata
4801 tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatccta tgaccaaaat cccttaacgt
4861 gagttttctg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat
4921 ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcggtg
4981 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga
5041 gcgcagatac caaataactgt tcttctagt tagccctagt taggccacca cttcaagaac
5101 tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt
5161 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag
5221 cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagccagct tggagcgaac gacctacac
5281 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag
5341 gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca
5401 gggggaaacg cctggtatct ttatagctct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt
5461 cgatttttgt gatgtctgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc
5521 tttttacggt tcttgccct ttgctggcct ttgtctaca tgttctttc tgcgttatcc
5581 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgcagc
5641 cgaacgaccg agcgacgga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagc

[0413]

[0414] >서열식별번호: 18

[0415] 좌위 pCVscAsaq+mir64 5155 bp DNA 원형 SYN 17-SEP-2013

[0416] 정의 pCVscAsaq+mirFlank*에의 6433의 결찰

[0417] 등재 pCVscAsaq+mir64

[0418] 키워드.

[0419] 원천 미지.

[0420] 생물체 미지

[0421] 미분류.

[0422] 참조 1 (염기 1 내지 5155)

[0423] 저자 자체

[0424] 잡지 미발표.

[0425] 코멘트 SciEd 센트럴, 사이언티픽 & 에듀케이션 소프트웨어에 의해 생성된 SECID/파일

[0426] 코멘트 SECNOTES|벡터 분자: pCVscAsaq+mirFlank*

[0427] 단편 단부: BsmBI

[0428] 단편 크기: 5090

[0429] 삽입 분자: 6433

[0430] 단편 단부:

[0431] 단편 크기: 64

[0432]	특징 위치/수식어
[0433]	misc_특징 1..105
[0434]	/유전자="ITR"
[0435]	/SECDrawAs="영역"
[0436]	misc_특징 182..449
[0437]	/유전자="CMV"
[0438]	/생성물="CMV 인핸서"
[0439]	/SECDrawAs="영역"
[0440]	CDS 448..753
[0441]	/유전자="CB 프로모터"
[0442]	/생성물="프로모터 진핵"
[0443]	/SECDrawAs="유전자"
[0444]	CDS 754..1819
[0445]	/유전자="인트론"
[0446]	/생성물="인트론"
[0447]	/SECDrawAs="유전자"
[0448]	CDS 1820..1839
[0449]	/유전자="MCS"
[0450]	/SECDrawAs="유전자"
[0451]	misc_특징 1843..1847
[0452]	/유전자="MCS"
[0453]	/SECDrawAs="영역"
[0454]	misc_특징 1862..1885
[0455]	/유전자="5'miR Flank' "
[0456]	/SECDrawAs="영역"
[0457]	misc_특징 1950..1994
[0458]	/유전자="3'miR Flank"
[0459]	/SECDrawAs="영역"
[0460]	CDS 2002..2128
[0461]	/유전자="RBG pA"
[0462]	/생성물="폴리A 신호"
[0463]	/SECDrawAs="유전자"
[0464]	misc_특징 상보체 (2002..2128)
[0465]	/유전자="RBGwpA"
[0466]	/SECDrawAs="정보용"
[0467]	misc_특징 2139..2281

[0468] /유전자="3' ITR"

[0469] /SECDrawAs="영역"

[0470] CDS 2317..2509

[0471] /유전자="lacZ"

[0472] /SECDrawAs="유전자"

[0473] CDS 2510..2965

[0474] /유전자="f1 ori"

[0475] /SECDrawAs="유전자"

[0476] misc_특징 3097..3957

[0477] /유전자="bla-AmpR"

[0478] /SECDrawAs="영역"

[0479] misc_특징 4117..4731

[0480] /유전자="rep-pMB1"

[0481] /SECDrawAs="영역"

[0482] 기원

1 ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtc ggcgacctt
 61 ggctgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtgtagcc atgctctagg
 121 aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agctctggtc gttacataac
 181 ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa
 241 tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt
 301 atttacggta aactgccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtccgcccc
 361 ctattgacgt caatgacgg aaatggcccg cctggcatta tggcagtac atgacctac
 421 gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggctgagg
 481 tgagcccccac gttctgttc actctccca tctcccccc cccccacc ccaattttgt
 541 attatttat ttttaatta tttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg
 601 cggcaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc gggggggggc gaggcggaga ggtgcggcgg
 661 cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttcttttat ggcgagggcg cggcggcgcg
 721 ggccataaa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgtgc ctcgccccg
 781 tggcccgctc cgcccgccgc tcgcgccgc cgcccggt ctgactgacc gcttactcc
 841 cacaggttag cggcggggac ggcccttct ctcggggtg taattagcg ttggttaat
 901 gacggcttgt ttctttctg ttgctgcgtg aaagcctga ggggtccgg gagggccctt
 961 tgtcggggg gagcggtc ggggggtgc tgcgtgtgt tgtcgtggg gagcgccgcg
 1021 tgcggctccg cgtgcccgg cggctgtgag cgtgcgggc gcggcgccgg gctttgtgcg
 1081 ctccgcatg tgcgcgagg gagcgcgcc gggggcggtg ccccgcggtg cggggggggc
 1141 tgcgagggga acaaggctg cgtcggggtg gtgtgcgtg ggggggtgag aggggggtg
 1201 ggcggtcgg tcgggtgca acccccctg cccccctc cccgattgc tgacacggc
 1261 ccggctcgg gtgcggggt ccgtacggg cgtggcgcg ggcgcgcgt gccggcggg
 1321 ggggtggcgg aggtgggggt gccggcggg gcggggccgc ctcgggccgg gaggggtcgt
 1381 ggggaggggc gcggcgccc ccggagcgc gcgggtgtc gaggcgcgc gagccgcagc
 1441 cattgcctt tatgtaac gtgcgagagg gcgcaggac ttctttgtc ccaaatctg
 1501 gcggagccga aatctggag gcgcgccgc accccctca gcggcgcgcg gcggaagcgg
 1561 tgcggcgccg gcaggaaaga aatggcggg gagggcctt gtgcgtgcc gcgcgccgt
 1621 ccccttcc ctcacagc tcggggtgt ccggggggg acggctgcct tcggggggga
 1681 cggggcagg cggggtcgg ctctggcgt gtgaccggc gctctagagc ctctgtaac
 1741 catgtcatg ccttctctt ttctacag ctctgggca acgtgctgt tattgtgtg
 1801 tctcatatt ttggcaaga attcatgat accgtcgag atctagcgt gaccagtga
 1861 tctggaggc ttgctgaagg ctgtatgtg taagcatgga gctagcagg tgtttggcc
 1921 actgactgac agcctgctt ccatgttac aggacacaag gcctgttact agcactaca
 1981 tggaaacaaat ggccagatc cgtctttt cctctgcca aaaattatgg ggacatcatg
 2041 aagccccgtg agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagt
 2101 tgttgaatt tttgtgtct ctactgat cagatctgag gaaccctag tgatggagt
 2161 ggccactccc tcttgcgcg ctcgtcgt cactgaggcc gcccgggcaa agccggggcg
 2221 tcgggcgacc ttgtgcgc cgccctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc
 2281 ccccccccc cccccctt gattctaga gagtccaat tcgcctata gtgagtcga
 2341 ttacgcgcg tactggccg tcgtttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac
 2401 ccaacttaat cgcctgcag cacatcccc ttccgcagc tggcgtata gcgaagaggc

[0483]

2461 ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaatgga aattgtaagc
 2521 gftaatattt ttttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa
 2581 taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat aggggtgagt
 2641 gttgttcag tttggaacaa gaggccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggg
 2701 cgaaaaaccg tctatcaggc cgtatggcca ctacgtgaac caccacccta atcaagtttt
 2761 ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaaacctt aaggagagccc ccgatttaga
 2821 gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg
 2881 ggcgtaggg cgctggcaag tgtagcggc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg
 2941 cttaatgcgc cgctacaggc cgctcaggc ggacatttc ggggaatgt gcgcggaacc
 3001 cctattttt ttttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc
 3061 tgataaatgc ttaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttccgtgtc
 3121 gcccttattc cctttttgc ggcattttgc ctctctgtt ttgtcacc agaaacgctg
 3181 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat
 3241 ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggccgaag aacgtttcc aatgatgagc
 3301 acttttaag tctgctatg tggcgcggtt ttatccgta ttgacggcg gcaagagcaa
 3361 ctgggtgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc agtcacagaa
 3421 aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctgagt
 3481 gataacactg cgccaactt actctgaca acgacggag gaccgaagga gctaaccgct
 3541 ttttgaca acatggggga tcatgtaact cgcttgatc gtgggaacc ggagctgaat
 3601 gaagccatc caaacgaca gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgtt
 3661 cgcaaatat taactggcg actactact ctacttccc ggcaacaatt aatagactgg
 3721 atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcg ccctccggc tggctggtt
 3781 attgctgata aatctggagc cgtgagcgt ggtctcgcg gtatcattgc agcactggg
 3841 ccagatgga agccctccc tatcgtagt atctacaga cggggagta ggcaactatg
 3901 gatgaacga atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgaatgaagc ttgtaactg
 3961 tcagaccaag ttactcata tatactttag atgatttaa aactcattt ttaatttaa
 4021 aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctatgacca aaatcccta acgtgagtt
 4081 tcttccact gagcgtcaga cccgtagaa aagatcaaag gatctctt agatccttt
 4141 tttctgcgc taatctgct ctgcaacaa aaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt
 4201 ttccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag
 4261 ataccaata ctgctcttct agttagccc tagttaggcc accactcaa gaactctga
 4321 gcaccgcta caccctgc tctgtaac ctgtaccag tggctgctgc cagtggcgat
 4381 aagtcgtgc ttaccgggtt ggactcaaga cgtatgtac cggataagc gcagcggtc
 4441 ggctgaacg ggggttctg cacacagccc agcttgagc gaacgacct caccgaactg
 4501 agatactac agcgtgagc atgagaaag gccacgctt ccgaaggag aaaggcggac
 4561 aggtatccg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcga cgaggagct tccaggggga
 4621 aacgcctgt atctttatg tctgtcggg ttctgccacc tctgactga gcgtgatt
 4681 ttgtgatgt cgtcagggg gcggagccta tggaaaaag ccagcaacgc ggcctttta
 4741 cggttcctg ccttttctg gccctttgct cacatgttct ttctgcgtt atccctgat
 4801 tctgtggata accgtattac gcctttgag tgaactgata ccgctcgcg cagccgaacg
 4861 accgagcga cgcagtcagt gaggaggaa gcggaagag gcccaatac caaacgcct
 4921 ctccccgcg gttggcgat tcaatattgc agctggcag acaggttcc cactggaaa
 4981 gcgggcagt gcgcgaacgc aattaatgt agttagctca ctattagc accccaggct
 5041 ttacacttta tcttccgcg tctatgttg tttggaattg tgagcggata acaattcac
 5101 acaggaaaca gctatgaca tgattaccc agatttaatt aaggcctta ttagg

[0484]

[0485] >서열식별번호: 19

[0486] 좌위 U6-mir6433-BGHPA 5223 bp DNA 원형 SYN 12-SEP-2013

[0487] 정의 U6-MIRBA-6433-GFP**에의 dsAAV CB MCS**의 결찰

[0488] 등재 U6-mir6433-BGHPA

[0489] 키워드.

[0490] 원천 미지.

[0491] 생물체 미지

[0492] 미분류.

[0493] 참조 1 (염기 1 내지 5223)

[0494]	저자 자체
[0495]	잡지 미발표.
[0496]	코멘트 SciEd 센트럴, 사이언티픽 & 에듀케이션얼 소프트웨어에 의해 생성된 SECID/파일
[0497]	코멘트 SECNOTES 백터 분자: U6-MiRBA-6433-GFP**
[0498]	단편 단부: 둔단 및 EagI
[0499]	단편 크기: 4954
[0500]	삽입 분자: dsAAV CB MCS**
[0501]	단편 단부: EagI 및 둔단
[0502]	단편 크기: 269
[0503]	특징 위치/수식어
[0504]	misc_특징 662..767
[0505]	/유전자="돌연변이 ITR"
[0506]	/SECDrawAs="영역"
[0507]	misc_특징 777..1041
[0508]	/유전자="U6 프로모터"
[0509]	/SECDrawAs="영역"
[0510]	misc_신호 1041..1041
[0511]	/유전자="Pol III 개시"
[0512]	/생성물="전사 개시 "
[0513]	/SECDrawAs="표지"
[0514]	CDS 1042..1065
[0515]	/유전자="5' miR Flank'"
[0516]	/SECDrawAs="유전자"
[0517]	CDS 1130..1175
[0518]	/유전자="miR 3' Flank"
[0519]	/SECDrawAs="유전자"
[0520]	misc_신호 1176..1181
[0521]	/유전자="Pol III term"
[0522]	/생성물="pol III 종료자"
[0523]	/SECDrawAs="표지"
[0524]	misc_특징 1199..1478
[0525]	/유전자="CMV 인핸서"
[0526]	/SECDrawAs="영역"
[0527]	misc_특징 1255..1284
[0528]	/유전자="잠정용"
[0529]	/SECDrawAs="영역"

[0530] misc_특징 1485..1511

[0531] /유전자="프로브"

[0532] /SECDrawAs="영역"

[0533] misc_특징 1485..1754

[0534] /유전자="B-액틴 프로모터"

[0535] /생성물="답"

[0536] /SECDrawAs="영역"

[0537] misc_특징 상보체 (1553..1575)

[0538] /유전자="rev"

[0539] /SECDrawAs="영역"

[0540] misc_특징 1820..1850

[0541] /유전자="SV40_late_19s_int"

[0542] /SECDrawAs="영역"

[0543] misc_특징 1820..1916

[0544] /유전자="modSV40_late_16s_int"

[0545] /SECDrawAs="영역"

[0546] misc_특징 2034..2230

[0547] /유전자="BGHpA"

[0548] /SECDrawAs="영역"

[0549] misc_특징 2263..2274

[0550] /유전자="'MCS'"

[0551] /SECDrawAs="영역"

[0552] misc_특징 2313..2439

[0553] /유전자="폴리 A 신호"

[0554] /생성물="토끼 글로빈 폴리 A"

[0555] /SECDrawAs="영역"

[0556] misc_특징 상보체 (2528..2657)

[0557] /유전자="3' ITR"

[0558] /SECDrawAs="영역"

[0559] CDS 3420..4277

[0560] /유전자="Amp(R)"

[0561] /SECDrawAs="유전자"

[0562] 기원

```

1  gcccaatacg caaacegcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
61  aacgagggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
121  cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181  cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc
241  ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgett tacggcacct
301  cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt ggcccatcgc cctgatagac
361  ggtttttgc cctttgacgt tggagtcac gtctttaat agtggactct tgtccaaac
421  tggacaaca ctaacccta tctcggtcta ttctttgat ttataaggga tttgccgat
481  ttggcctat tggftaaaaa atgagctgat ttaacaaaa ttaacgcga attttaacaa
541  aatattaacg cttaacaatt aaataattgc ttataaatc ttctgtttt tggggctttt
601  ctgattatca accggggtag atatgattga catgctagt ttacgattac cgttcacgc
661  cctgcgcgt cgtcgcctca ctgaggccgc ccgggcaaa cccgggcgc gggcgacctt
721  tggtcgccc gctcagtgga gcgagcgcgc gcgcagagag ggagtggaa tctataagg
781  tcgggcagga agagggccta ttcccatga ttcttcata ttgcatata cgatacaagg
841  ctgtagaga gataatfaga attaatfga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata
901  cgtgacgtag aaagtaataa ttcttgggt agttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa
961  tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa agtatttcga ttcttgct ttatatatct
1021  tgtggaaagg acgaaacacc gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga
1081  gctagcaggc tgtttggcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag
1141  gcctgttact agcactcaca tggacaacaa ggcccttttt tctagtggta cctctggtcg

```

[0563]

1201 ttacataaat tacggtaaat ggcccgccctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga
 1261 cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat
 1321 ggggtggagta ttacgggtaa actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa
 1381 gtacgcccc tattgacgtc aatgacgga aatggccgc ctggcattat gcccagtaca
 1441 tgaccttatg ggaatttctt acttggcagt acatctactc gaggccacgt tctgttcac
 1501 tctccccatc tccccccct ccccccccc aattttgtat ttatttattt ttaattatt
 1561 ttgtgcagcg atggggggcg gggggggggg gggggcgcg ccaggcgggg cggggcgggg
 1621 cgagggggcg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct
 1681 ccgaagttt cttttatgg cgaggcgcg gcggcgcgcg ccctataaaa agcgaagcgc
 1741 gcggcgcgcg ggagcgggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga
 1801 aaaaccagaa agttaactgg taagttagt cttttgtct ttatttcag gtcccgatc
 1861 cgggtggtgt gcaaatcaaa gaactgtcc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct
 1921 gtacggaagt gtacttctg ctctaaaagc tgcggaattg tacccgcggc cgcgtttaa
 1981 ccttgcaggt ctgaaaagct tatcatacc gtctactaga gtcgctgat cagcctcag
 2041 tgtgccttct agtggccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct
 2101 ggaaggtgcc actccactg tctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct
 2161 gagtagtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg
 2221 ggaagacaat agcagggtac aagtaaacg gccctagcgt ttccggcgac ggtgctagac
 2281 tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgatctttt tccctctgcc aaaaattatg
 2341 gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa ttattttca
 2401 ttgcaatagt gtgttggaat ttttgtgtc tctactcg aagcaattcg ttgatctgaa
 2461 ttctgaccac ccaataacc cattaccctg gtatataagt agcatggcgg gttaatcatt
 2521 aactacaagg aaccctagt gatggagtg gccactccct ctctgcgcgc tgcctcctc
 2581 actgaggcgg ggcgacccaa ggtcgccga cggccgggct ttgcccgggc ggcctcagt
 2641 agcgagcgag cgcgcagcct taattaacct aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtct
 2701 gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatgccttg cagcacatcc cctttcggc
 2761 agctggcgta atagcgaaga ggcgcgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg
 2821 aatggcgaaat gggacgcgcc ctgtagcggc gcaatagcg cggcggggtgt ggtggttacg
 2881 cgcagcgtga ccgtactact tgcagcgcc ctgagcgccc ctctttcgc ttcttccct
 2941 tctttctcgc ccagttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta
 3001 ggggtccagt ttagtgttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta ggggatggt
 3061 tcacgtagt ggcctatgcc ctgatagacg gttttcggc ctttgacgtt ggagtccacg
 3121 ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat
 3181 tcttttgatt tataagggat ttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt
 3241 taacaaaaat ttaacgcgaa tttaacaaa atattaacgc ttacaattta ggtggcactt
 3301 ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gttttttt ctataacat tcaaatatgt
 3361 atccgtcat gagacaataa cctgataaa tgcctcaata atattgaaaa aggaagagta
 3421 tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttctg
 3481 tttttgctca ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac
 3541 gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtlaagat ccttgagagt ttctgccccg
 3601 aagaacgttt tcaatgatg agcactttta aagtctgct atgtggcgcg gtattatccc
 3661 gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg
 3721 ttgagtactc accagtacaa gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat
 3781 gcagtgtctc cataacctg agtgataaca ctgcggccaa ctacttctg acaacgatc
 3841 gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggaatcatga actcgccttg
 3901 atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accagcatgc
 3961 ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt
 4021 cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca ctctcgcgt

[0564]

4081 cgggcccttcc ggctggctgg ttattgctg ataatctgg agccgggtgag cgtgggtctc
 4141 gcggtatcat tgcagactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgt gttatctaca
 4201 cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct
 4261 cactgattaa gcatgtgtaa ctgtcagacc aagttactc atatatacti tagattgatt
 4321 taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttggat aatcicatga
 4381 ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgtcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca
 4441 aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactg ctgctgcaa acaaaaaaac
 4501 caccgctacc agcgggtggt ttgttgcgg atcaagagct accaactct tttccgaagg
 4561 taactggctt cagcagagcg cagatacca atactgtct tctagttag ccgtagttag
 4621 gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgtctgcta atcctgttac
 4681 cagtggctgc tggcagtgcc gataagtcgt gtctaccgg gttggactca agacgatagt
 4741 taccggataa ggccgagcgg tgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg
 4801 agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggcagc
 4861 ttcccgaagg gagaaggcg gacaggtatc ggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc
 4921 gcacgagggg gcttcaggg ggaacgctt ggtatctta tagtctgtc gggtttcgcc
 4981 acctctgact tgagcgtcga ttttctgat gctcgtcagg gggcgaggc ctatggaaaa
 5041 acgccagcaa cgggcccctt ttacgggtcc tggcctttg ctggccttt gctcacatgt
 5101 tcttctctgc gttatccctt gattctgtg ataacgtat taccgcctt gattgagctg
 5161 ataccgctc cgcagcgga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag
 5221 agc

[0565]

[0566]

>서열식별번호: 20 AAV9 캡시드 단백질

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGP
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKR
 LNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNW
 HCDSQWLGDRTVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDF
 NRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQV
 FTDSQYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQ
 MLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLK
 FSVAGPSNMAVQGRNYIPGYSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMN
 PGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYG
 QVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSP
 LMGFGMKHPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEIQYTSNYYKSNNEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0567]

[0568]

>서열식별번호: 21

GCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTAAGCATGGAGCTAGCAGGCTGTTTT
 GGCCACTGACTGACAGCCTGCTCTCCTAGCTTACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC
 ACTCACATAACAAATGGCCCTTTT

[0569]

[0570]

>서열식별번호: 22

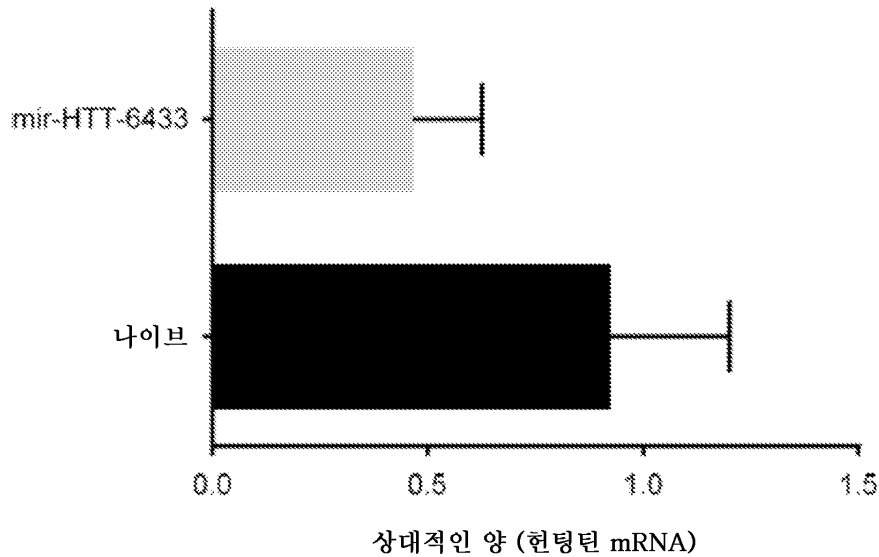
GCTCGAGTGAGCGCAGCCTGCTAGCTCCATGCTTACTGTAAAGCCACCAGATGGGT
 AAGCATGGAGCTAGCAGGCTTCGCCTACTAGTTTT

[0571]

도면

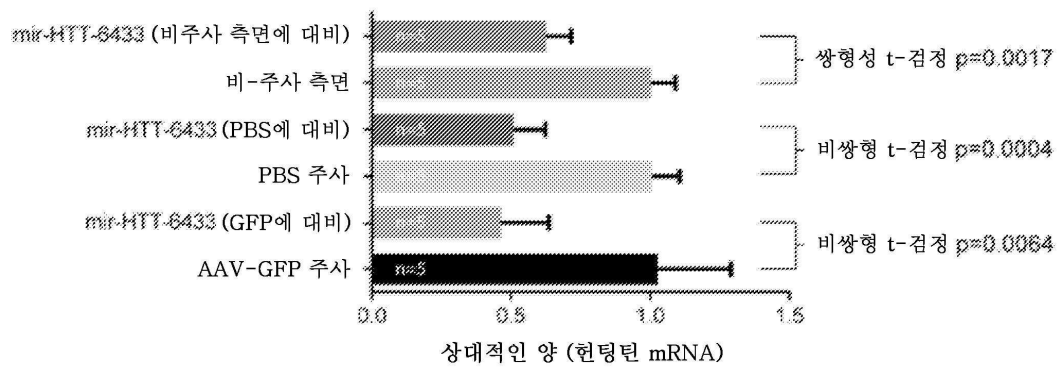
도면1

인간 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA 6433은
세포 배양물에서 헌팅틴을 감소시킨다



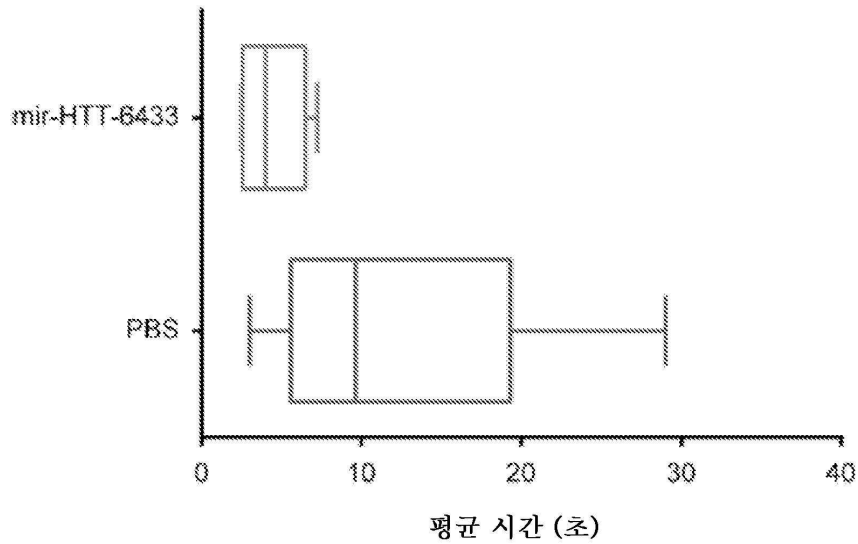
도면2

인간 헌팅틴을 표적으로 하는 인공 miRNA 6433은 헌팅톤병 트랜스제닉 모델의
생체 내에서 돌연변이 헌팅틴을 감소시킨다

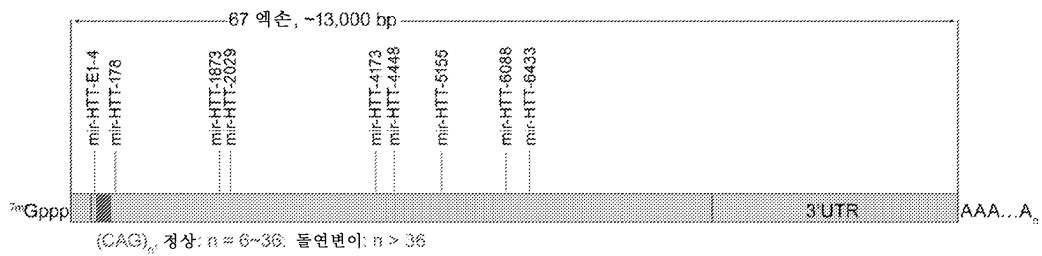


도면3

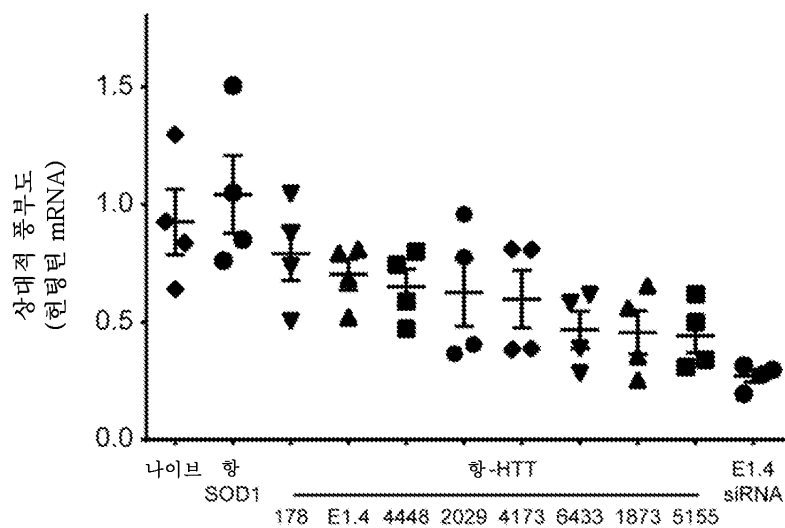
mir-HTT-6433을 사용한 처리는 돌연변이 인간 헌팅틴을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 평균대에서의 수행성을 향상시킨다



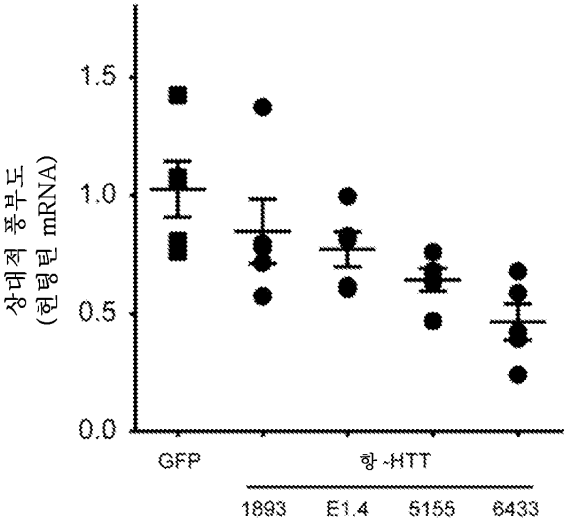
도면4a



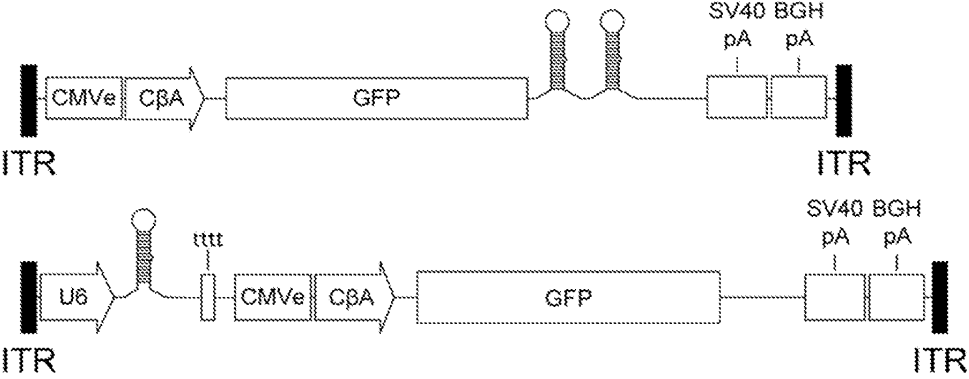
도면4b



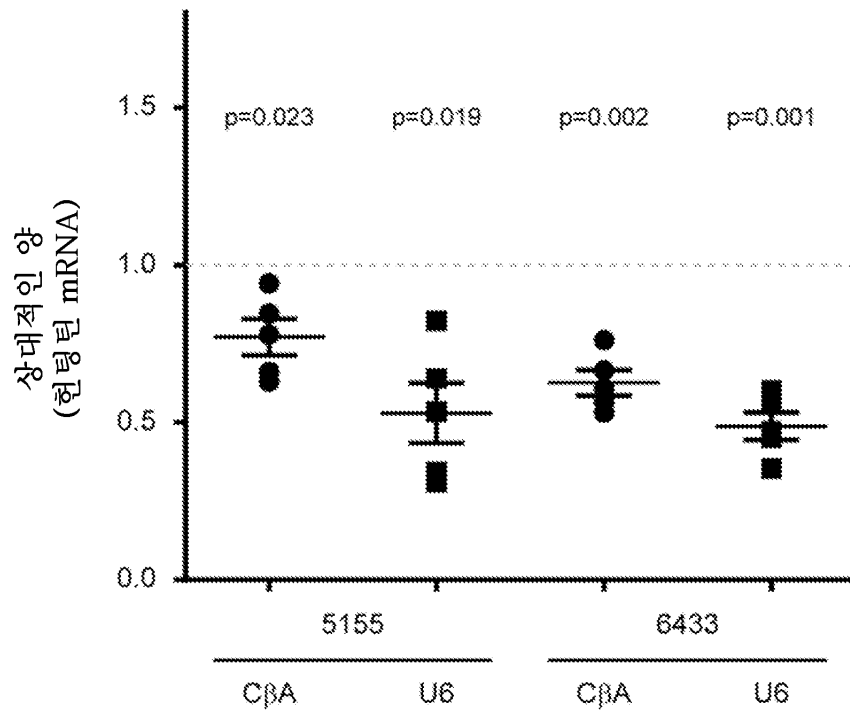
도면4c



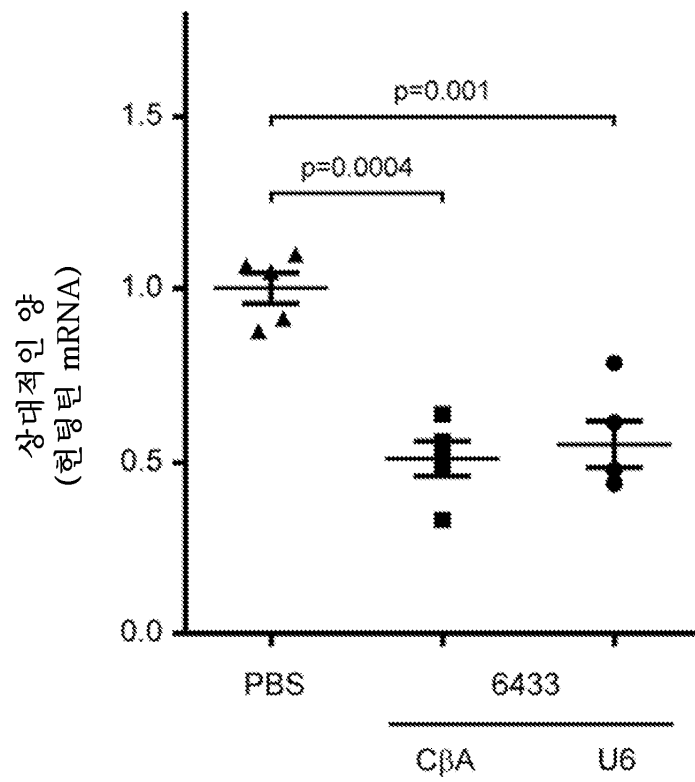
도면5a



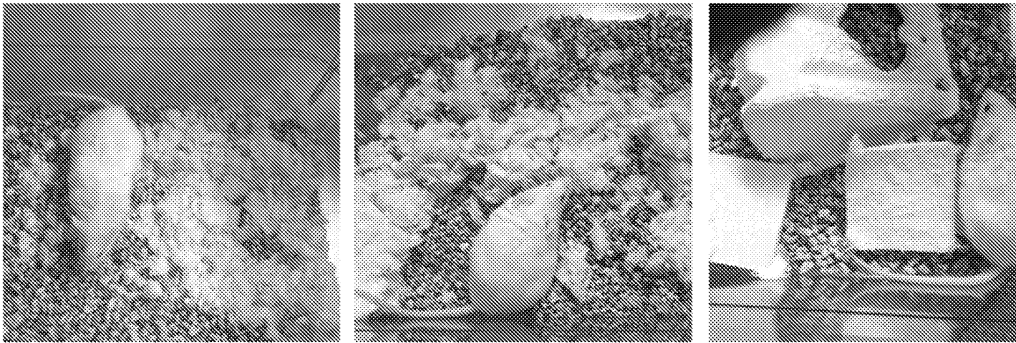
도면5b



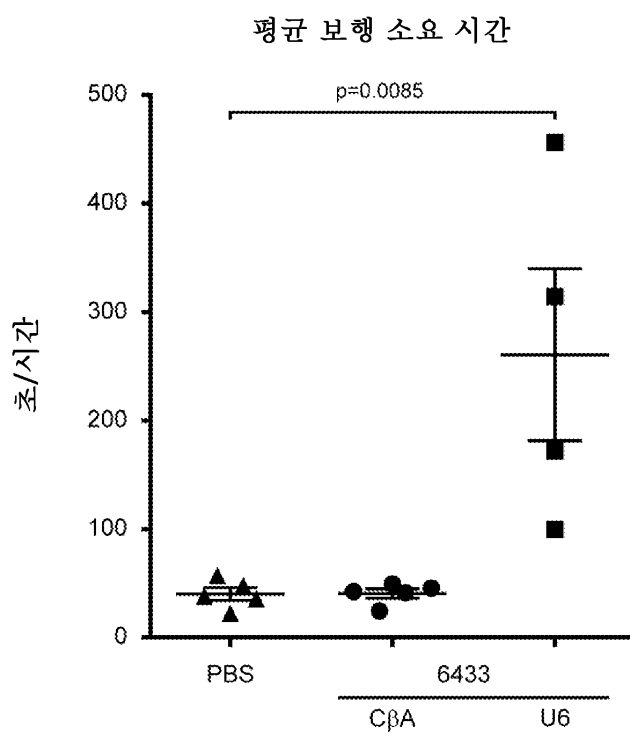
도면5c



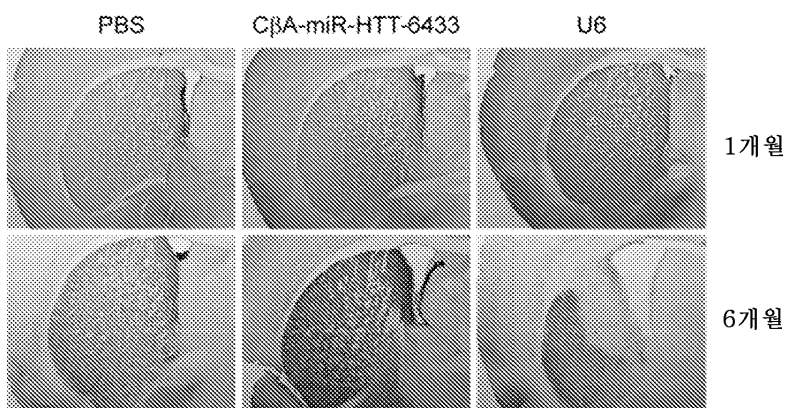
도면6a



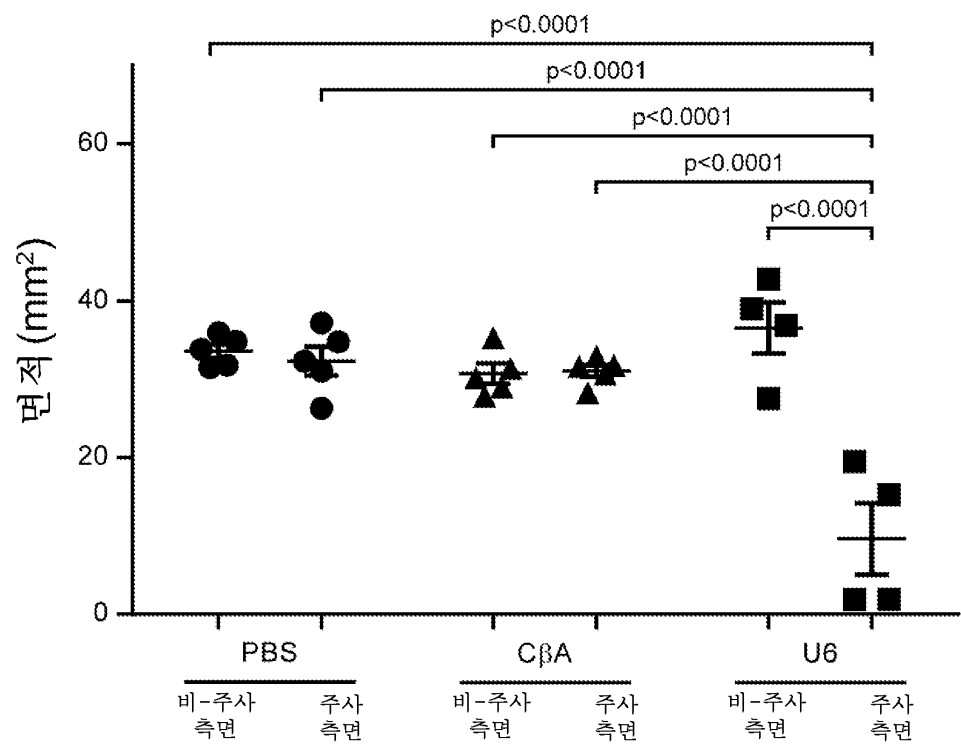
도면6b



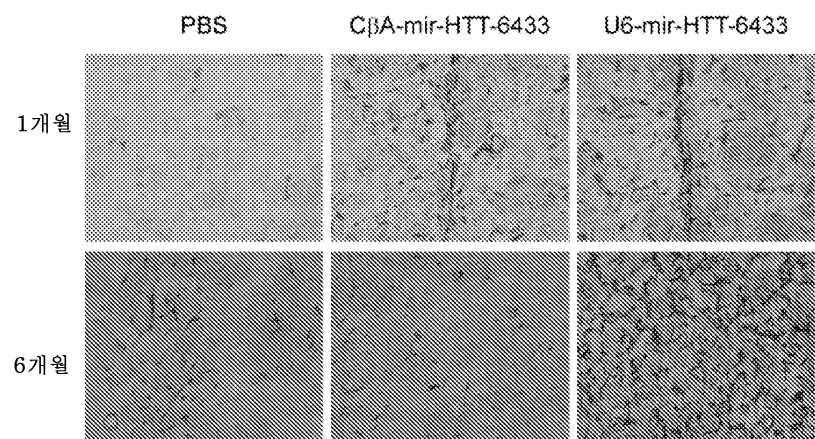
도면7a



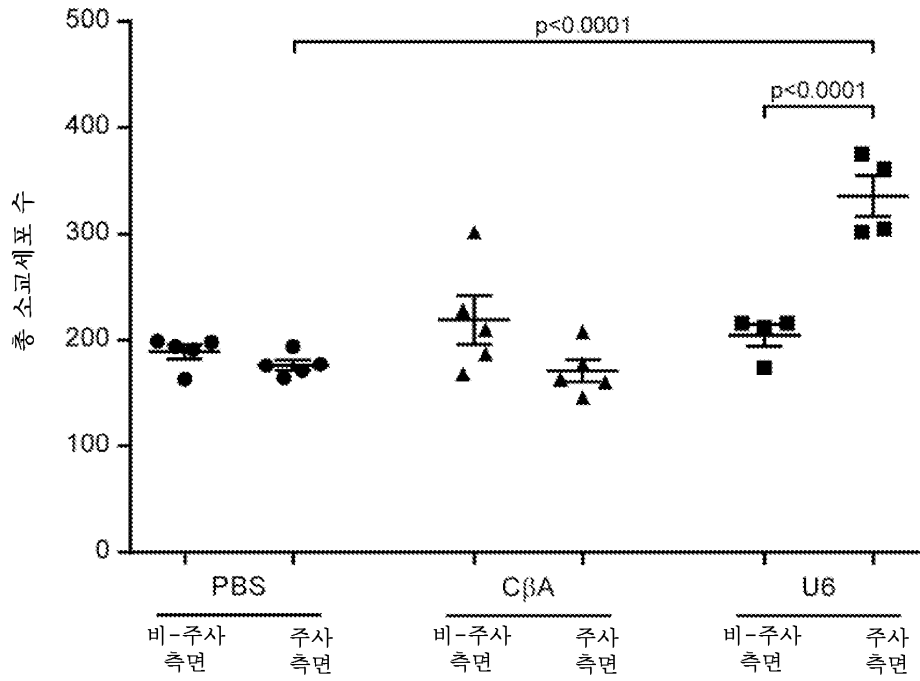
도면7b



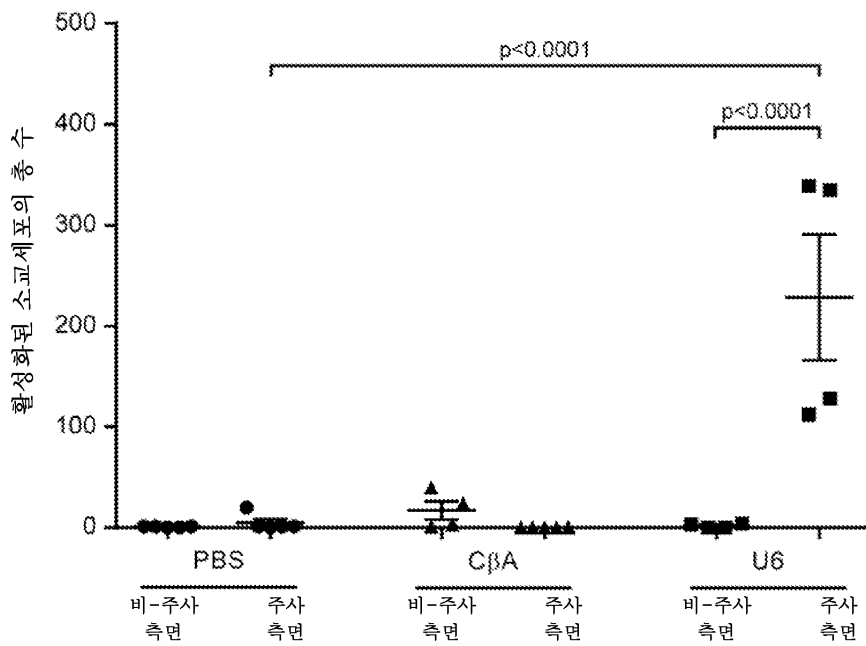
도면8a



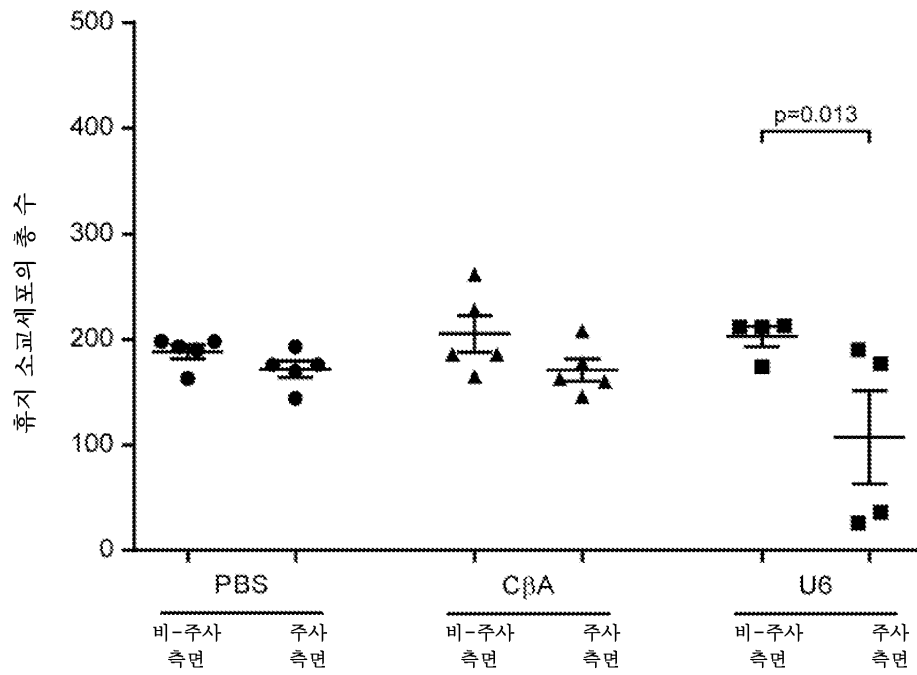
도면8b



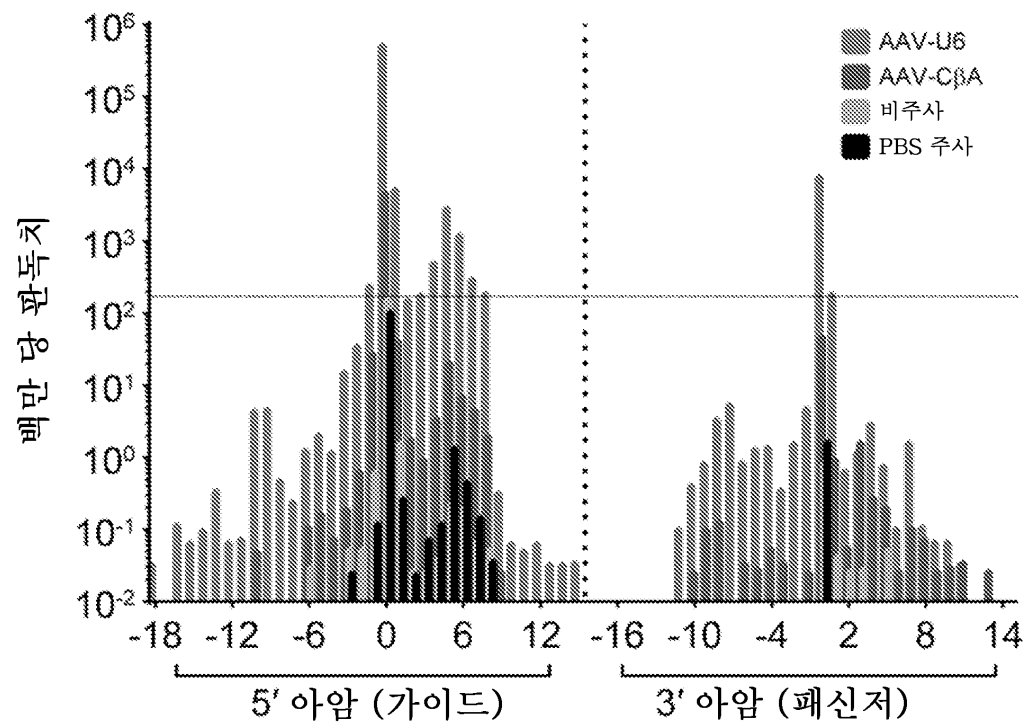
도면8c



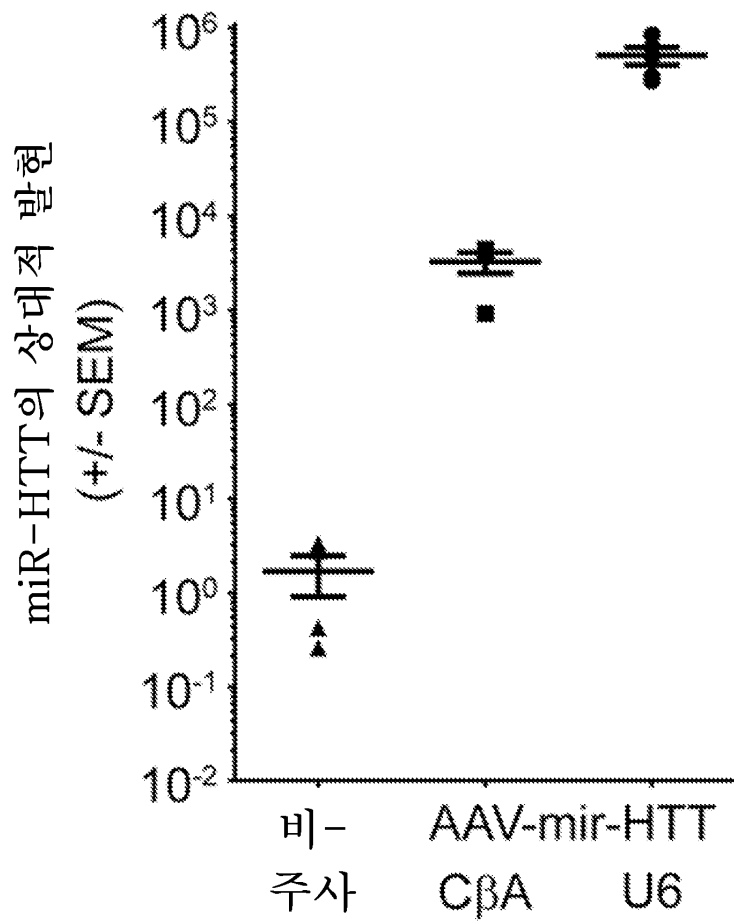
도면8d



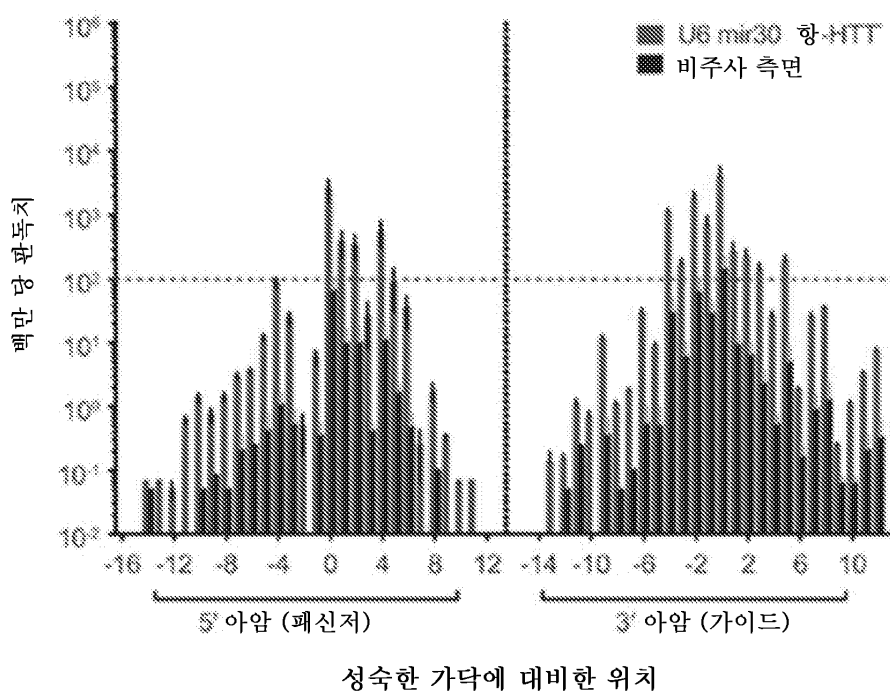
도면9a



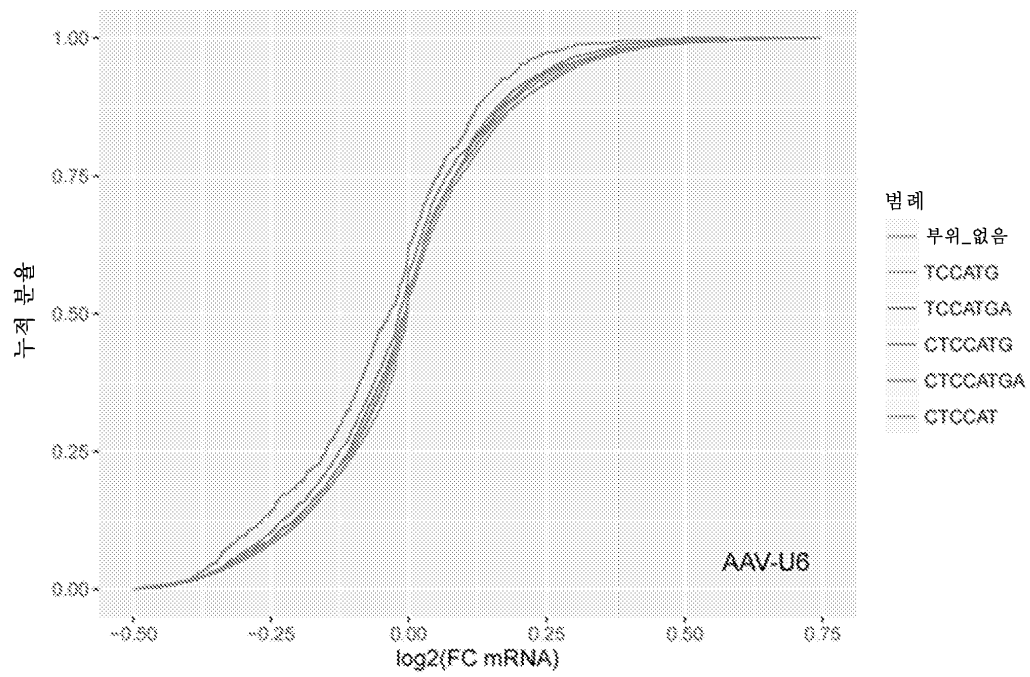
도면9b



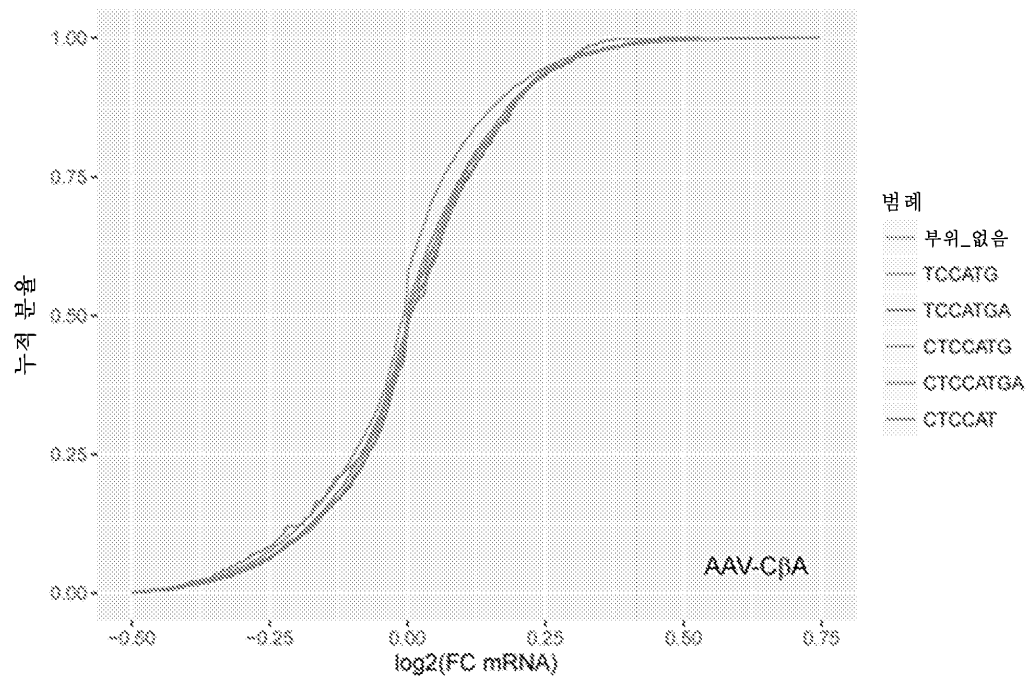
도면9c



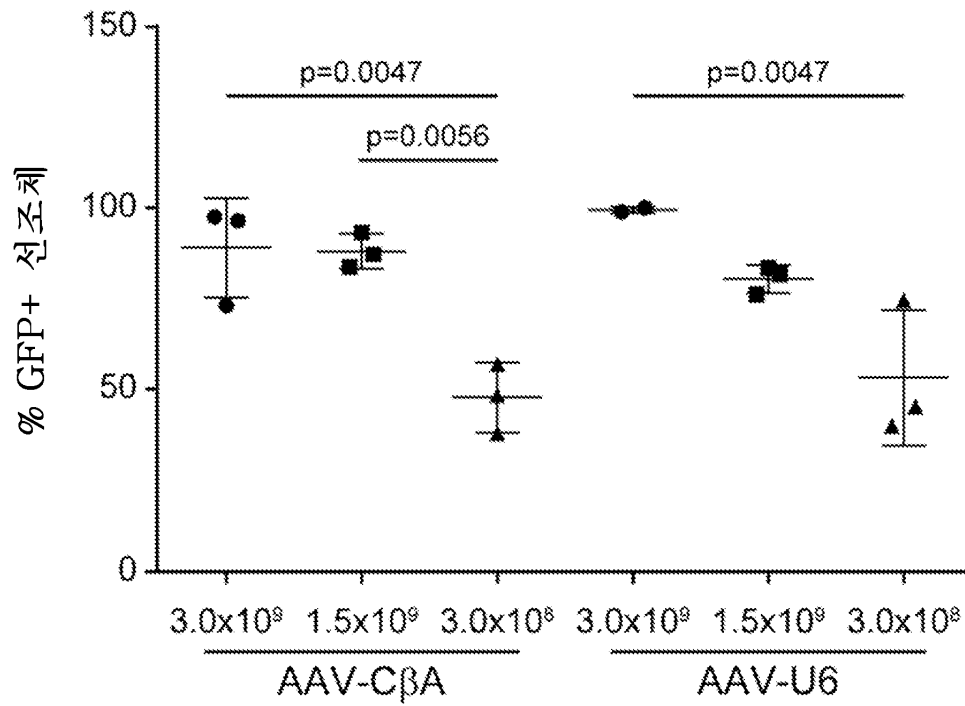
도면10a



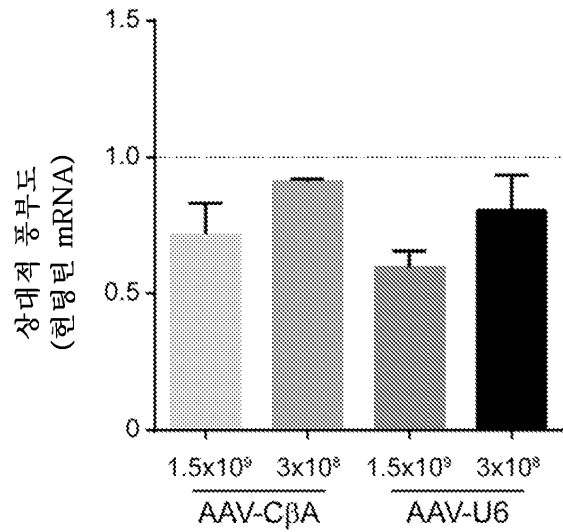
도면10b



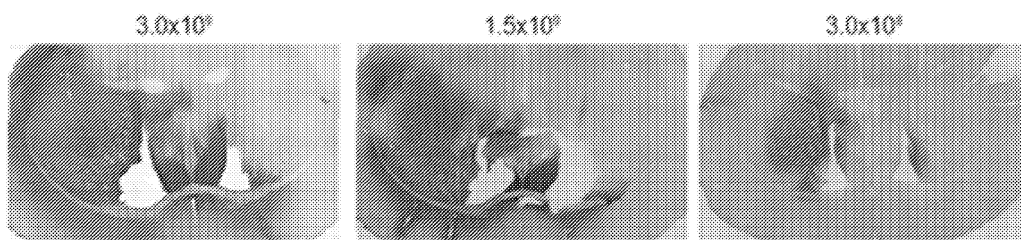
도면11a



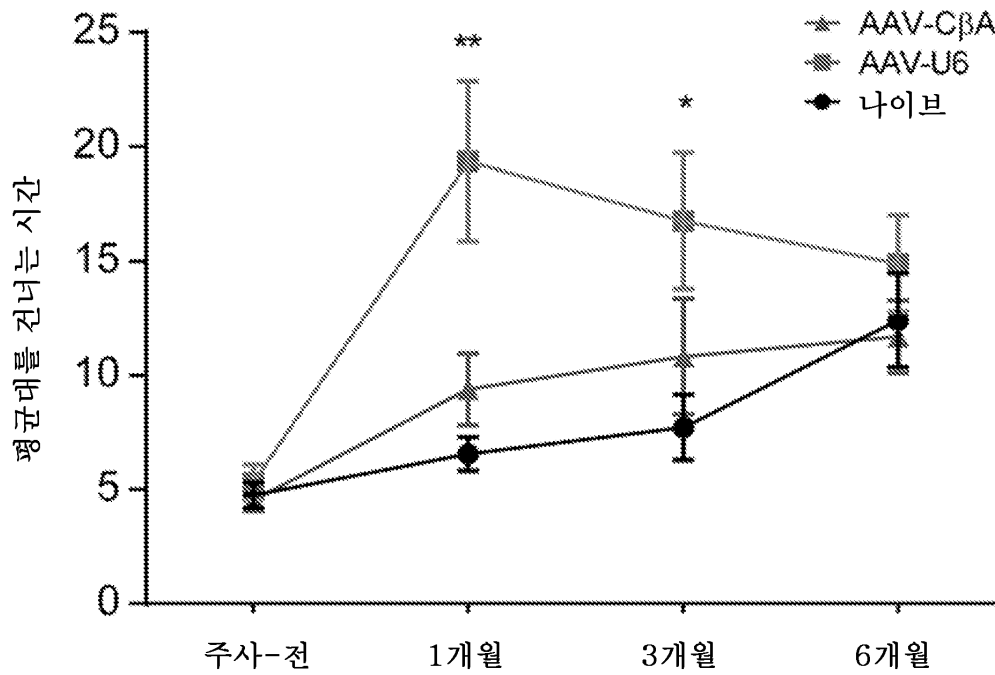
도면11b



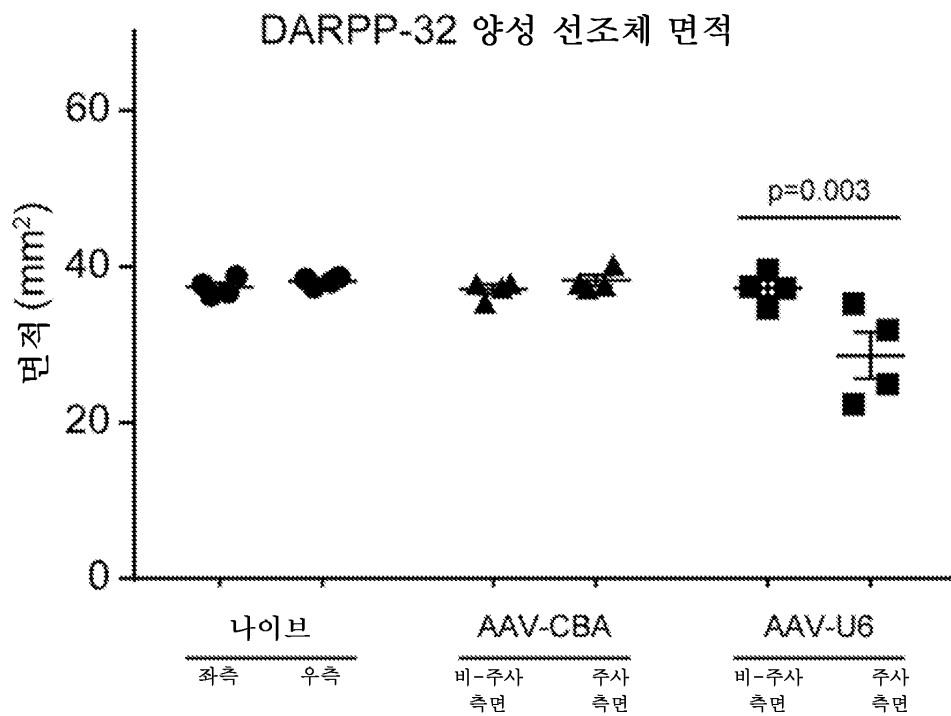
도면11c



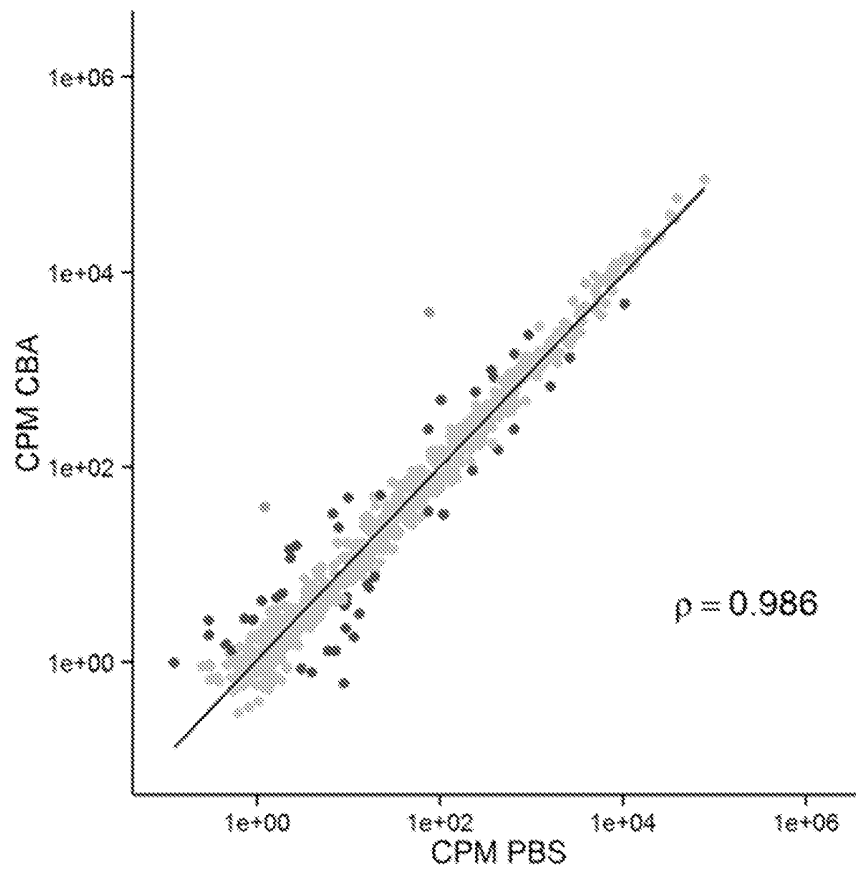
도면13a



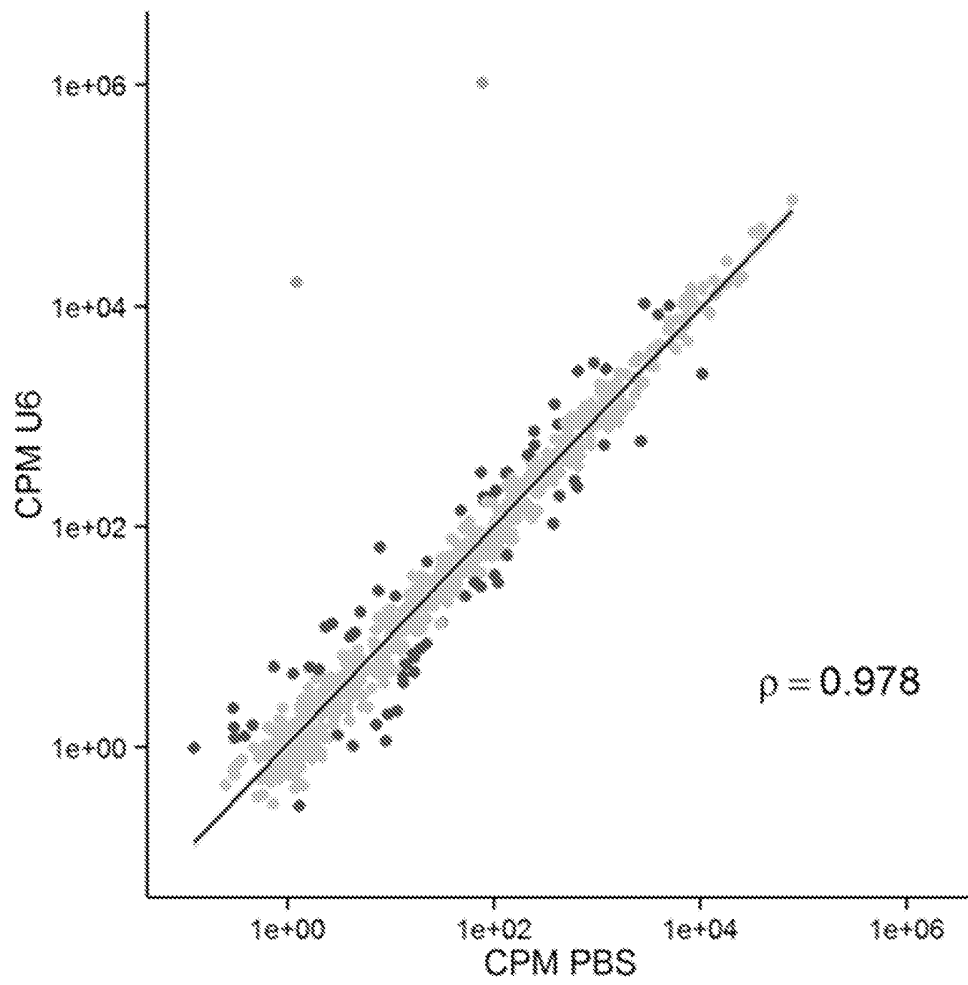
도면13b



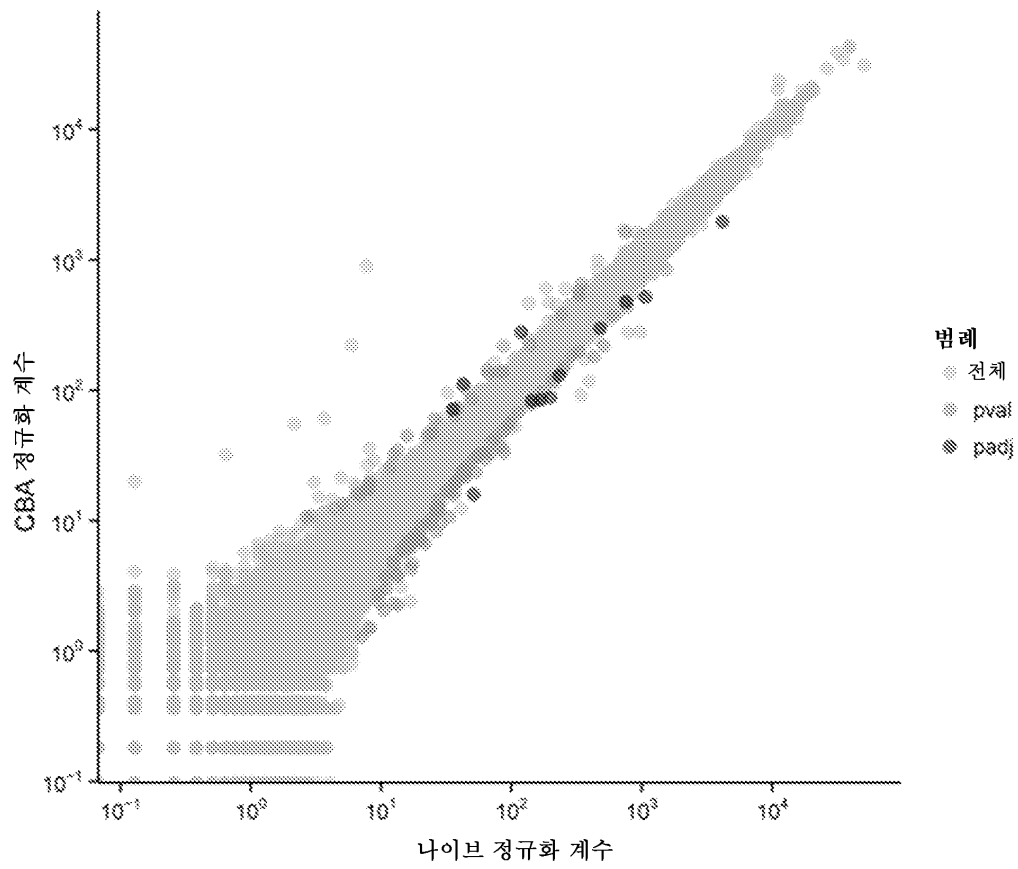
도면14a



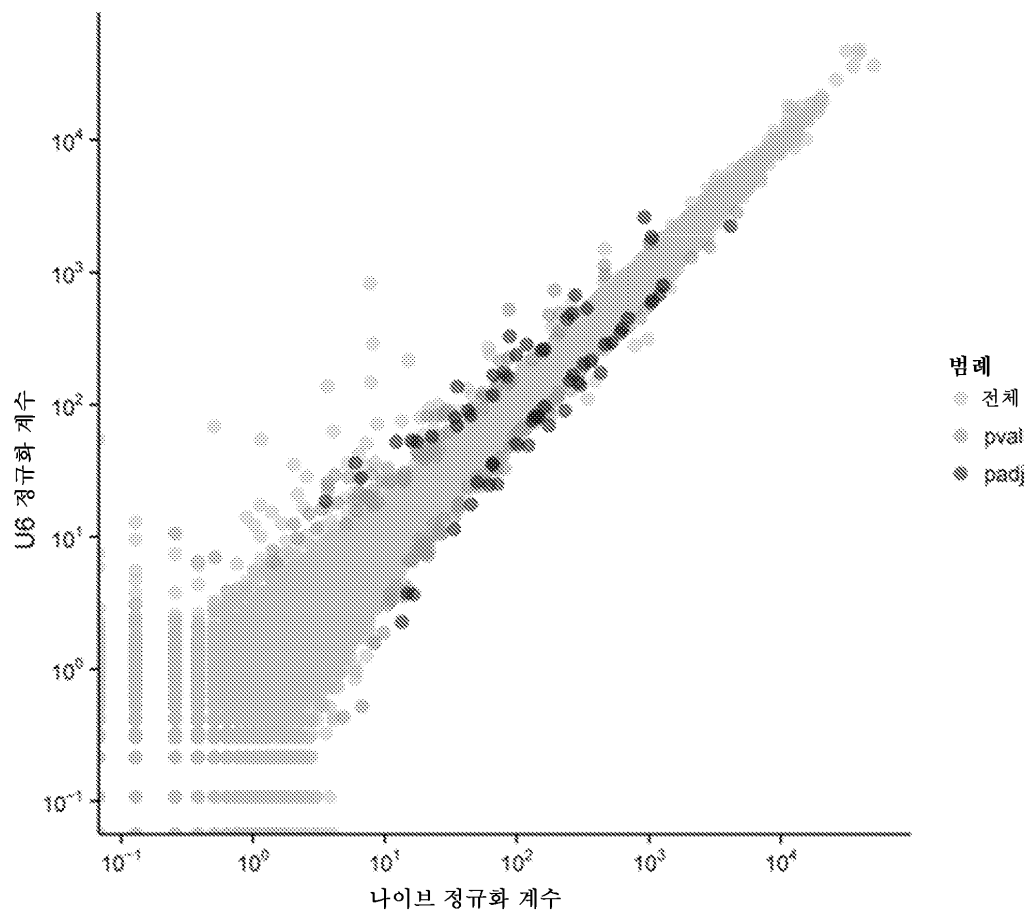
도면14b



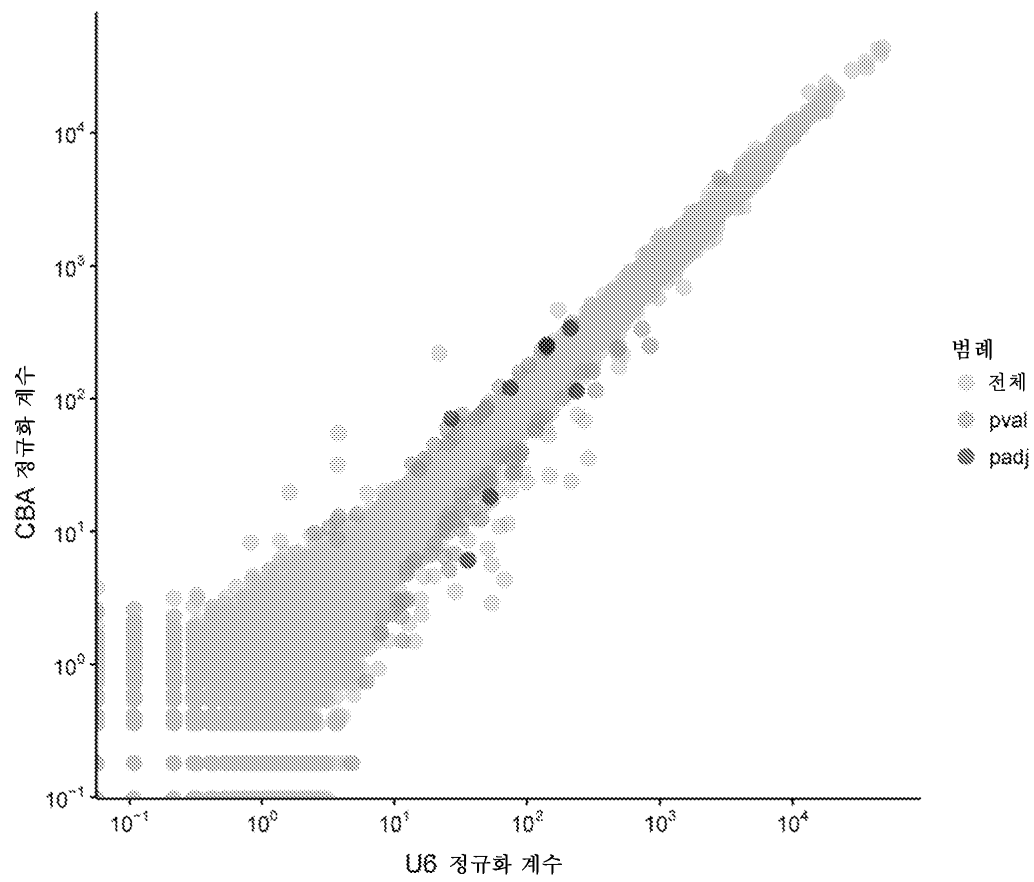
도면15a



도면15b

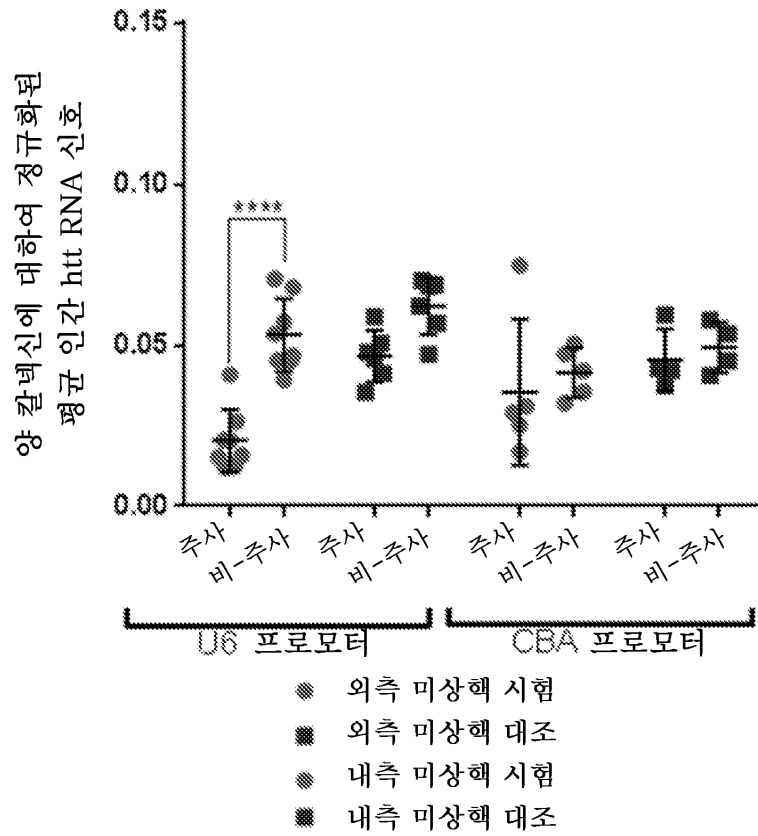


도면15c



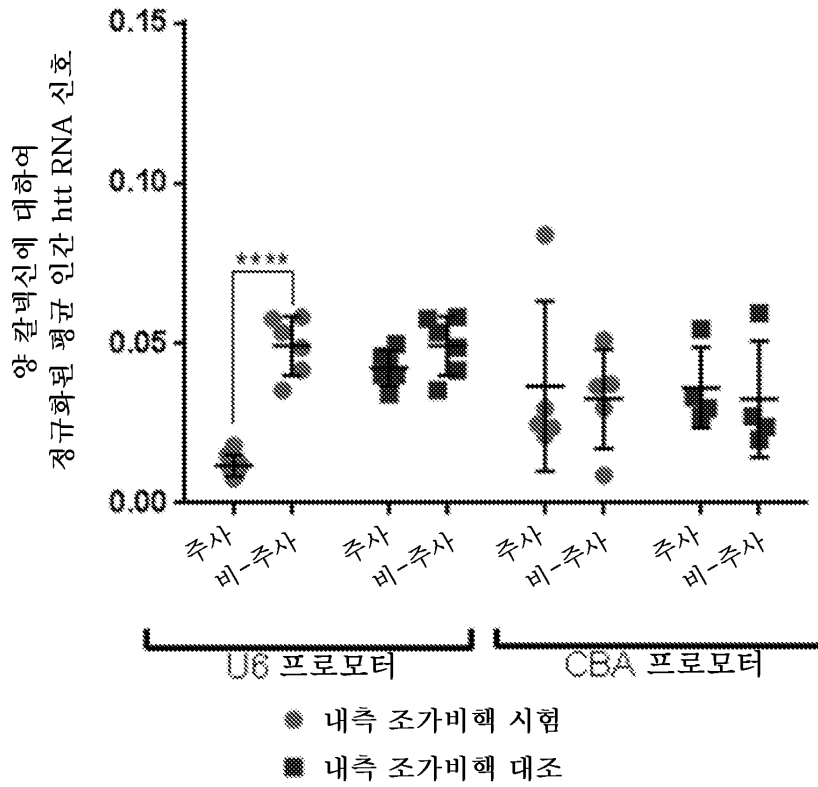
도면16

1개월 양의 중간 미상핵에서의
양 칼넥신에 대비한 인간 HTT



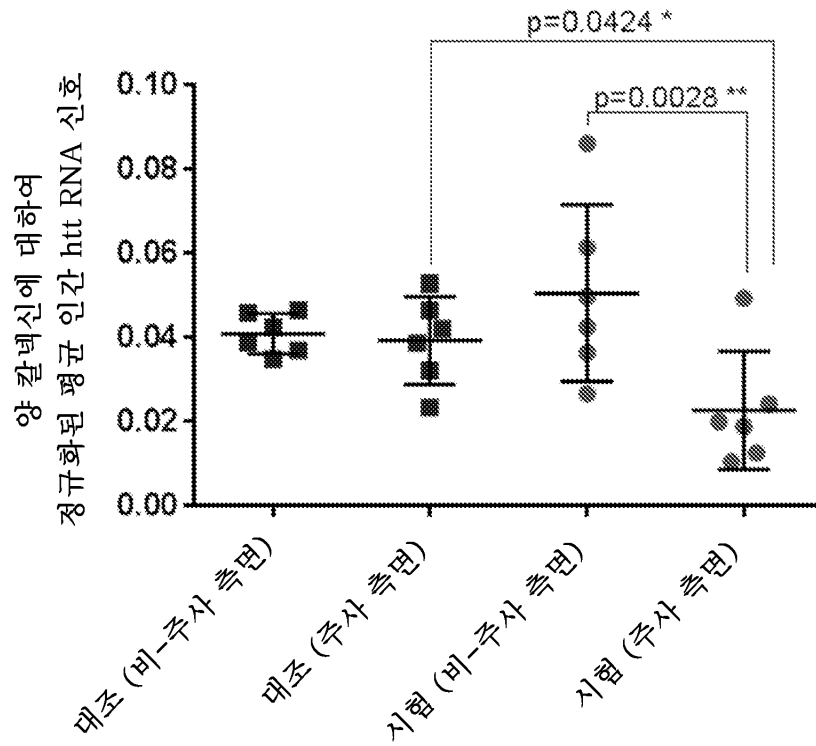
도면17

1개월 양의 중간 조가비핵에서의
양 칼넥신에 대비한 인간 HTT



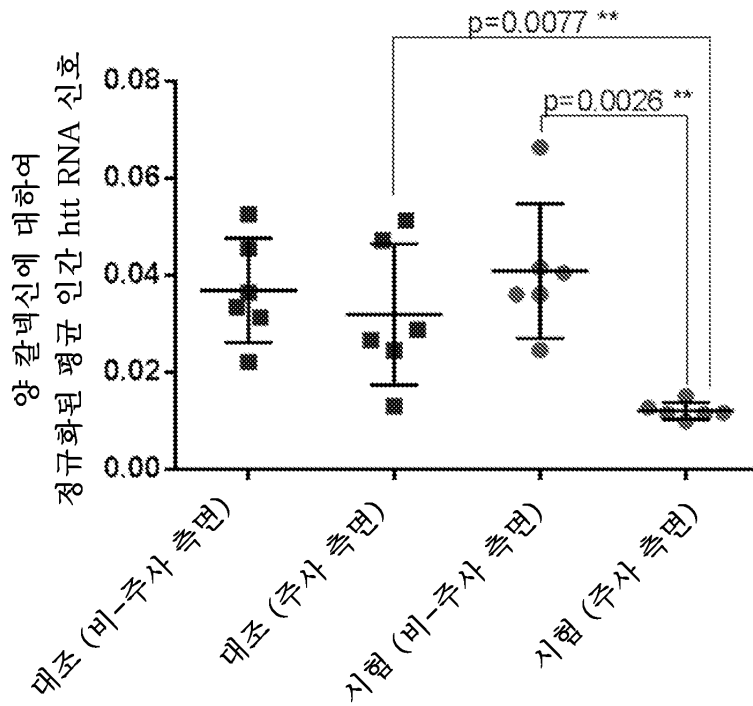
도면18

중간 미상핵의 내측 측면에서의
양 칼넥신에 대비한 인간 HTT
(6개월 양, CBA 프로모터)

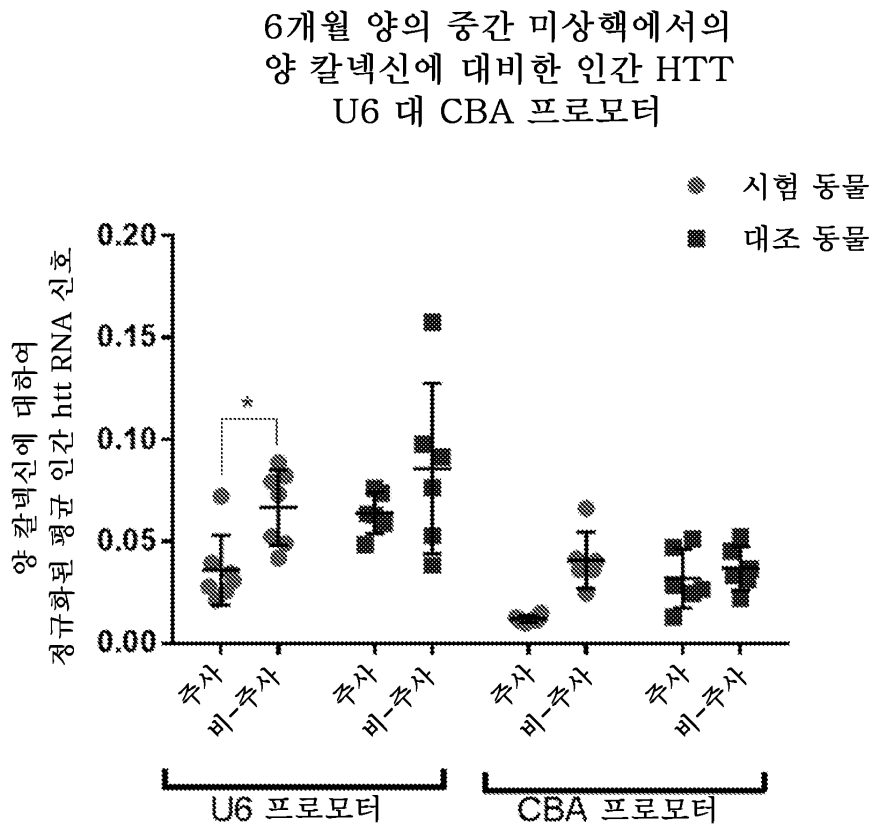


도면19

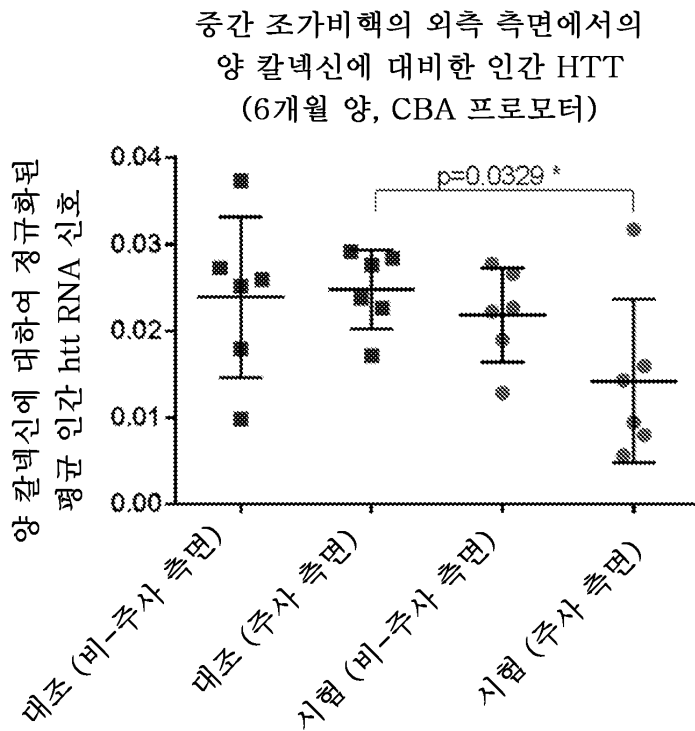
중간 미상핵의 외측 측면에서의
양 칼넥신에 대비한 인간 HTT
(6개월 양, CBA 프로모터)



도면20

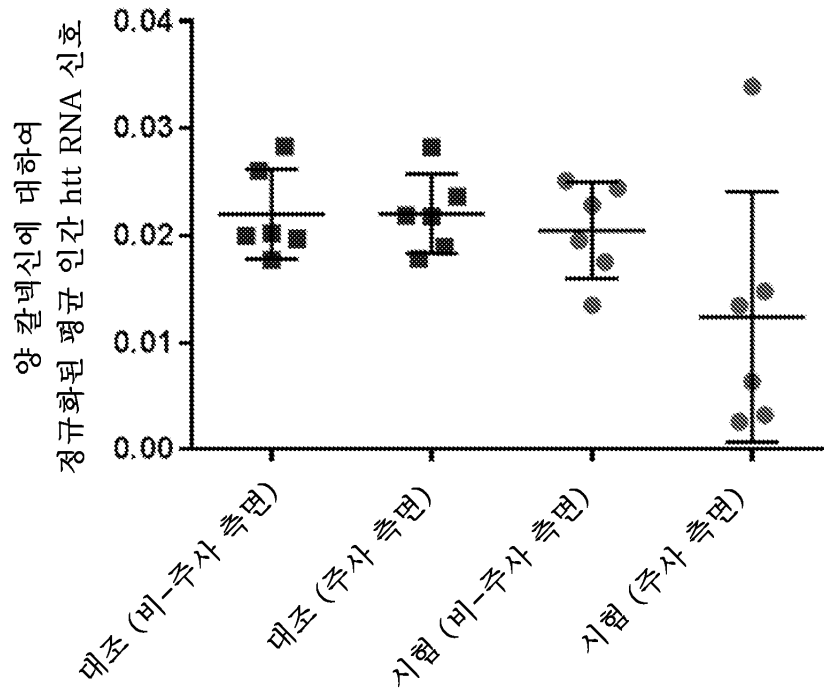


도면21

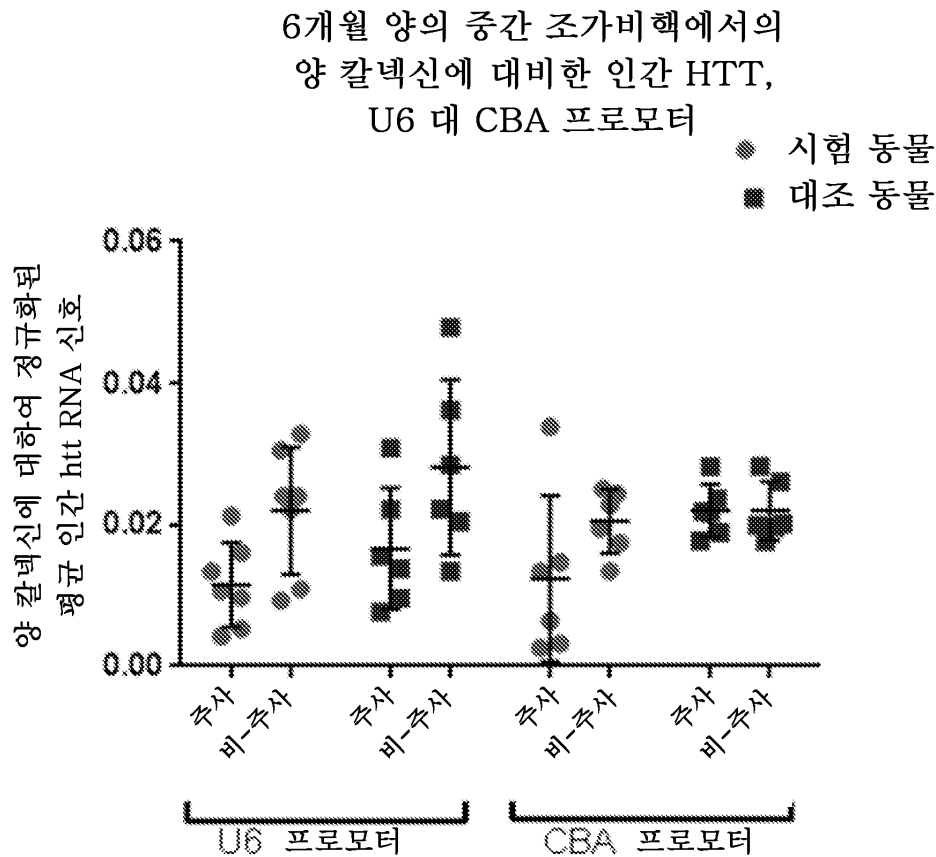


도면22

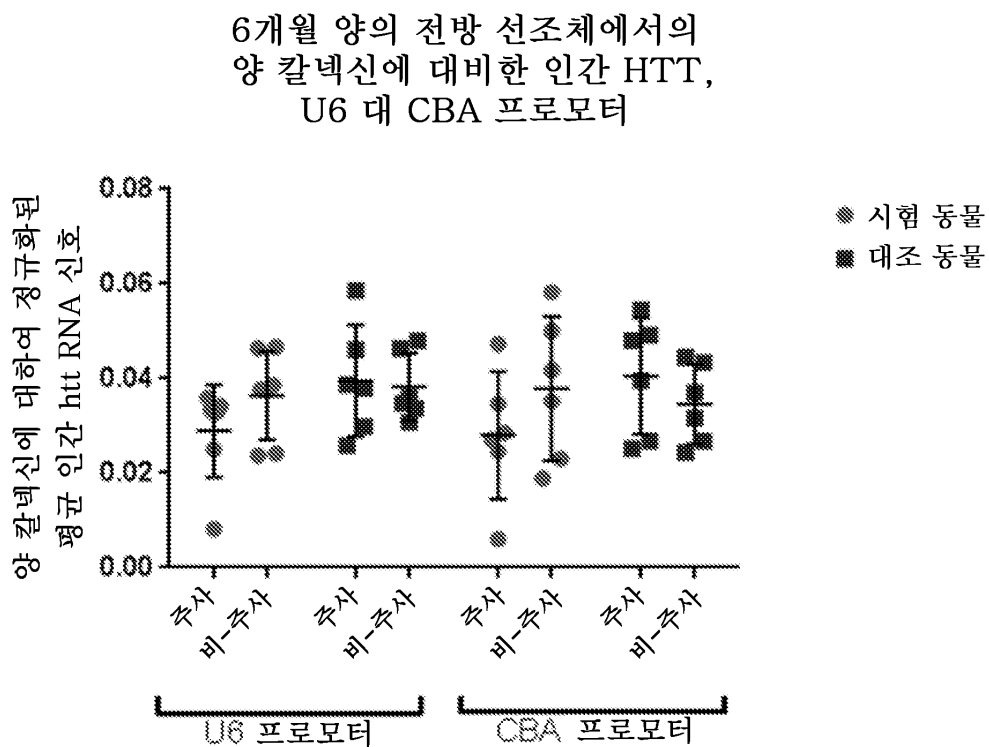
중간 조가비핵의 내측 측면에서의
양 칼넥신에 대비한 인간 HTT
(6개월 양, CBA 프로모터)



도면23



도면24



도면25a

```

      5' -G          UGCUGA      GUAUG      CU      UUGGCC
          CC  UG  GAG  GCU      AGGCU      CUGUAAGCAUGGAG  AGCAGGCUGUU  A
          GG  AC  CUC  CGA      UCCGG      GACAUUCGAUCCUC  UCGUCCGACAG  C
3'-UUUUC CCGUAAACAA  U  A  A      UCAUUG      A      G      ACACA      UCAGU

```

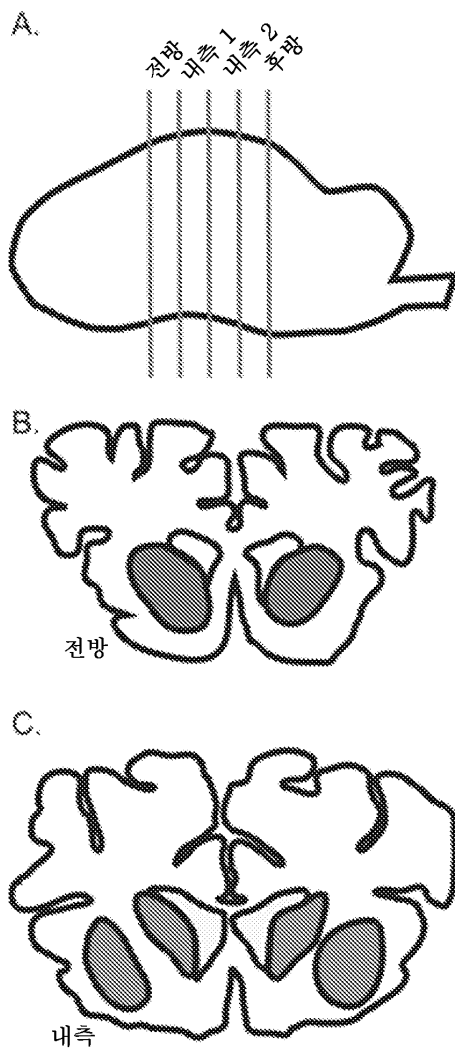
도면25b

```

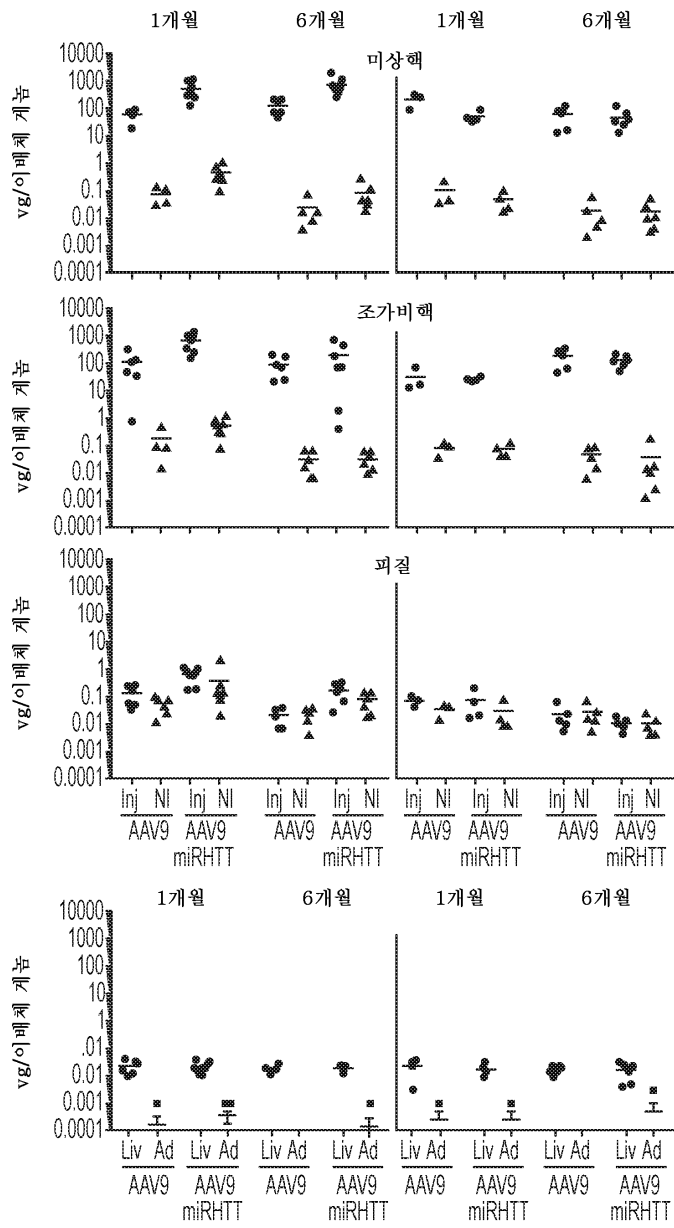
                        UAAAG
5' -GCUCG      A  C      G      C
      AGUG  GCG  AGCCUGCUAGCUCCAUGCUUACU      C
      UCAU  CGC  UCGGACGAUCGAGGUACGAAUGG      A
3' -UUUUGA      C  U      G      C
                        UAGAC

```

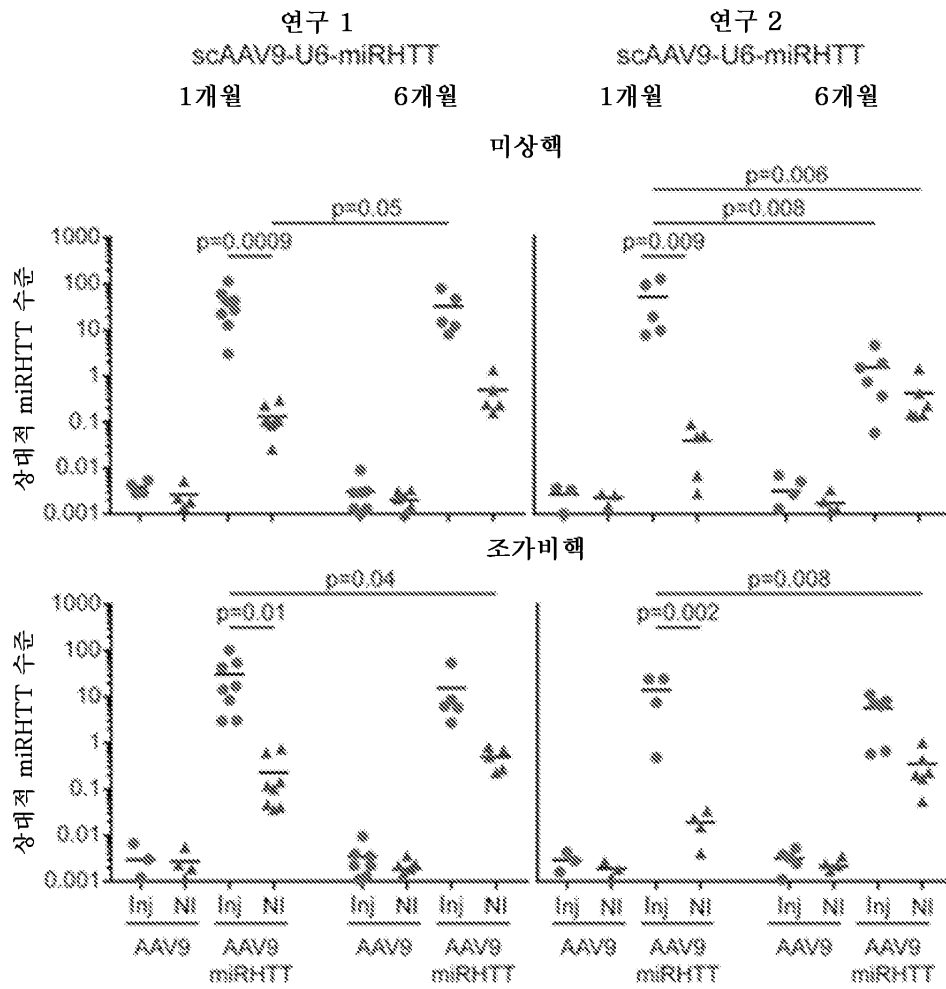
도면26a



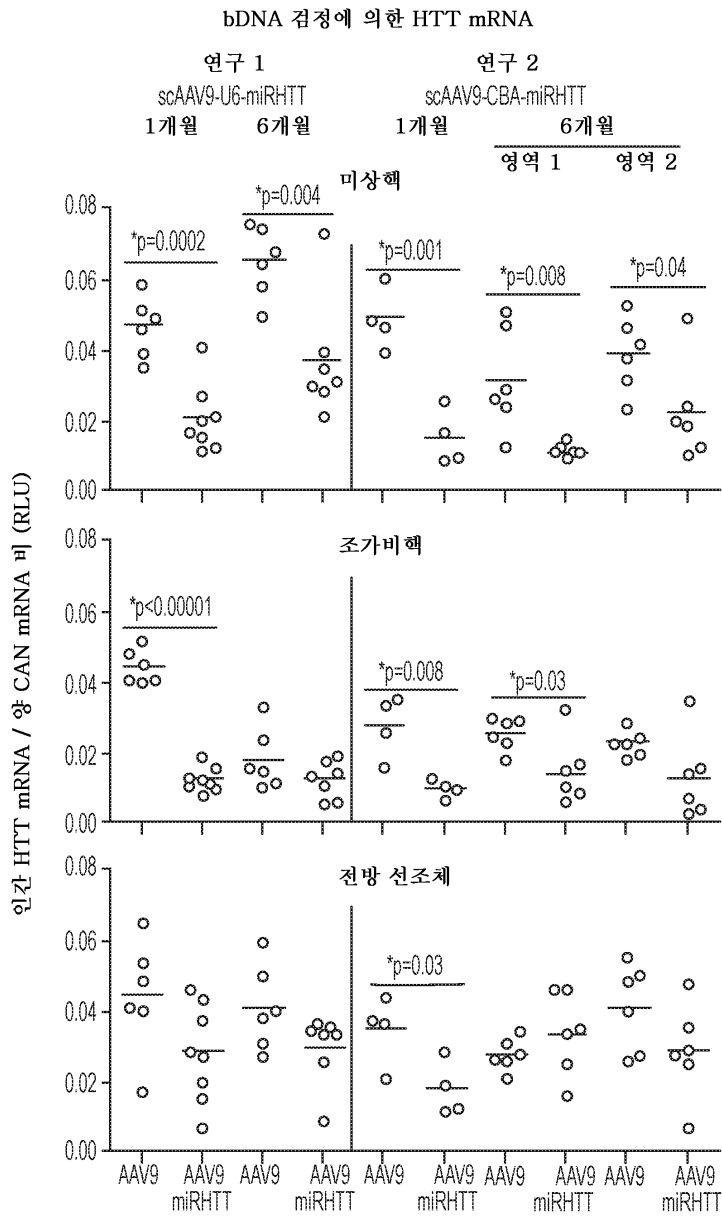
도면26b



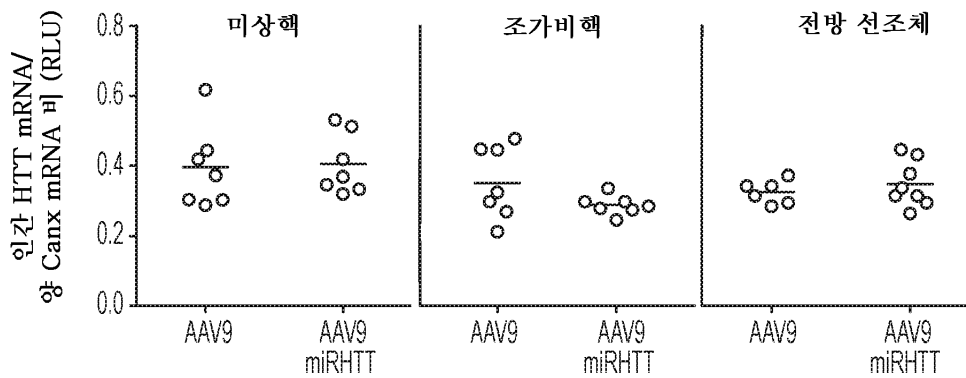
도면27



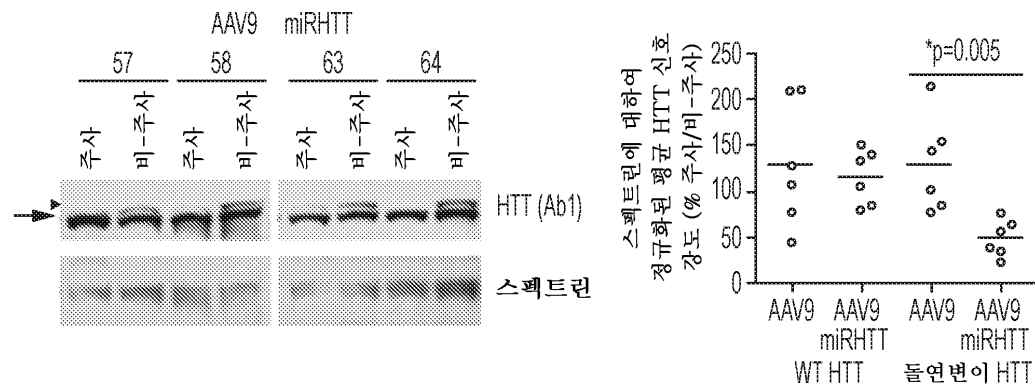
도면28



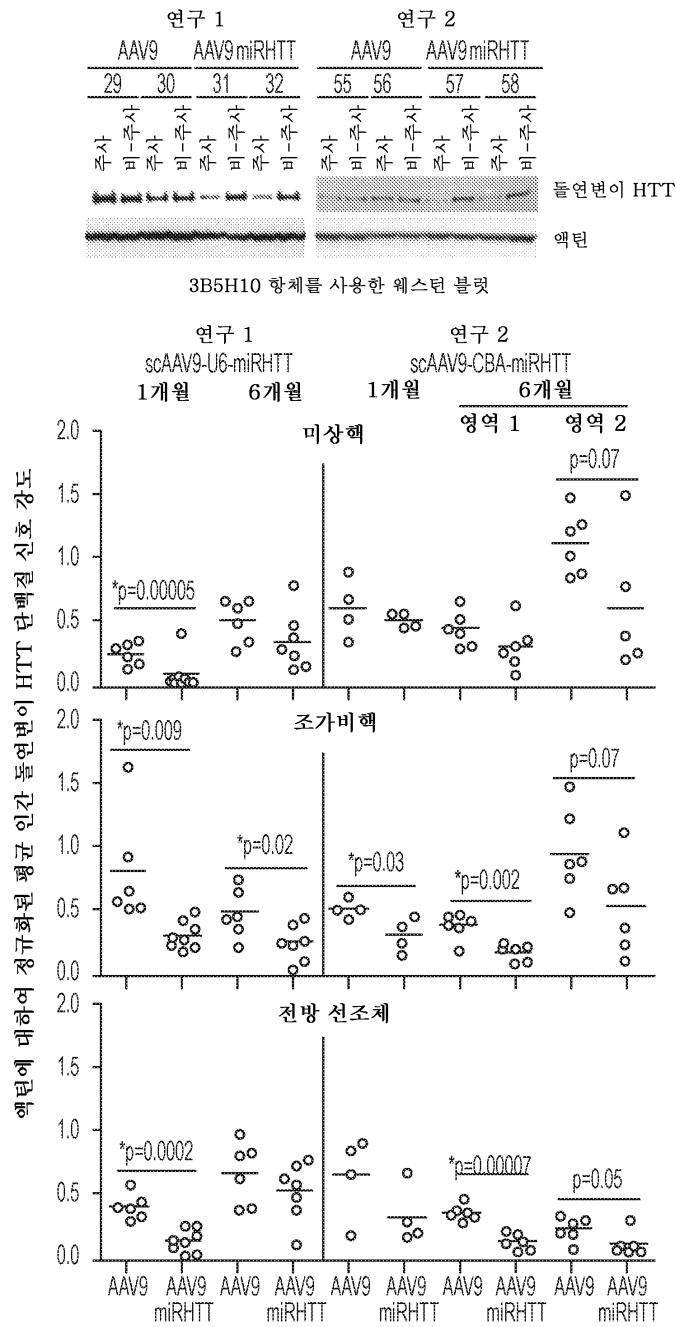
도면29a



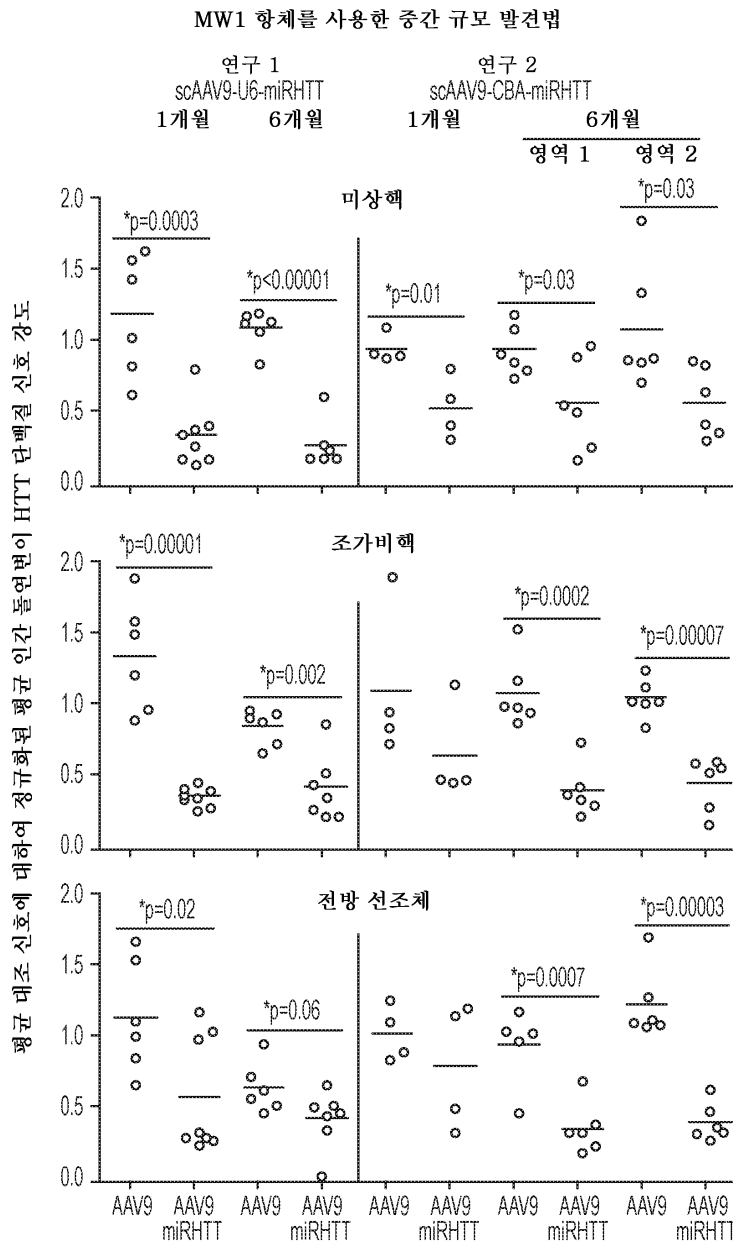
도면29b



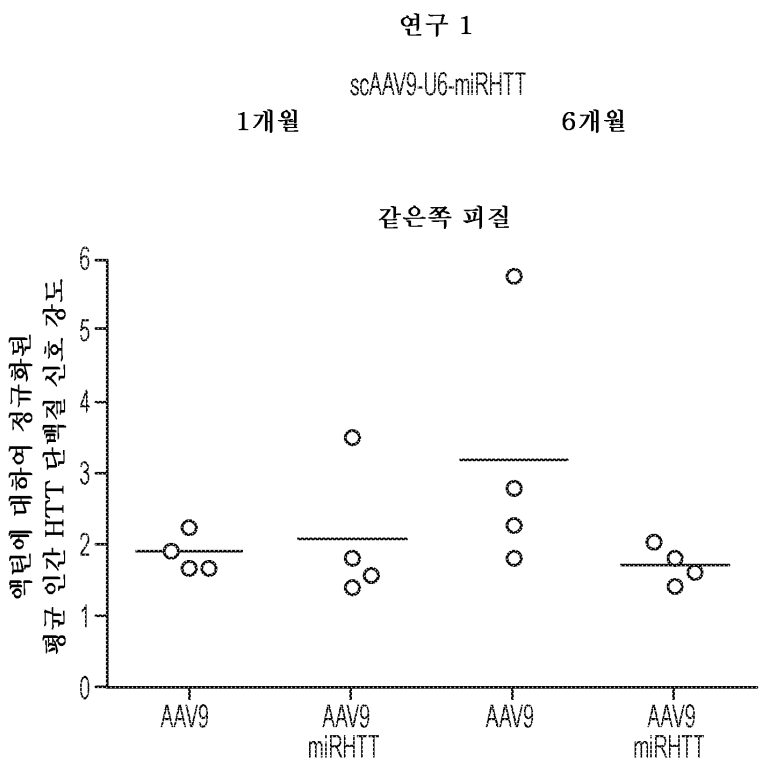
도면30



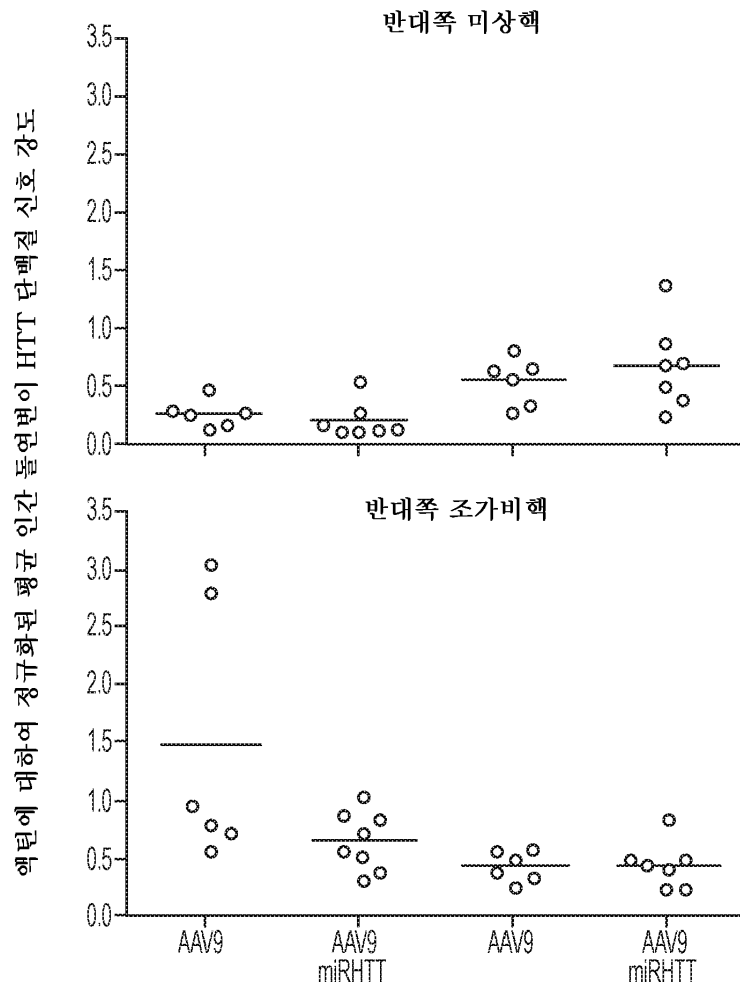
도면31



도면32a



도면32b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> University of Massachusetts
- <120> AAV TREATMENT OF HUNTINGTON'S DISEASE
- <130> U0120.70084W000
- <140> Not Yet Assigned
- <141> 2017-09-22
- <150> US 62/398,487
- <151> 2016-09-22
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 13498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgcccgga cgggtccaag atggacggcc gtcagggttc tgcttttacc tgcggcccag	60
agccccattc attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cgccccgagg cctccgggga	120
ctgccgtgcc gggcgggaga ccgccatggc gacctggaa aagctgatga aggccttcga	180
gtccctcaag tccttcacgc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca	240
gcagcagcag cagcagcagc aacagccgcc accgccccg ccgccccgc cgcctcctca	300
gttctctcag ccgccccgc aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cggccccgcc	360
gccgccccgc ccgccaccgc gcccggtgt ggctgaggag ccgtgcacc gaccaaagaa	420
agaactttca gctaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat	480
agtggcacag tcgtcagaa attctccaga atttcagaaa cttctgggca tcgtatgga	540
actttttctg ctgtgcagtg atgacgcaga gtcagatgtc aggatggtgg ctgacgaatg	600
ctcaacaaa gttatcaaag ctttgatgga ttctaatttt ccaaggttac agctcgagct	660
ctataaggaa attaaaaaga atggtgcccc tcggagtttg cgtgctgccc tgtggaggtt	720
tgctgagctg gtcacctgg ttccgcctca gaaatgcagg cttacctgg tgaaccttct	780
gccgtgcctg actcgaacaa gcaagagacc cgaagaatca gtccaggaga cttggctgc	840
agctgttccc aaaattatgg cttcttttgg caattttgca aatgacaatg aaattaaggt	900
tttgttaaag gccttcatag cgaacctgaa gtcaagctcc ccaccattc ggccgacagc	960
ggctggatca gcagtgagca tctgccagca ctcaagaagg acacaatatt tctatagttg	1020
gctactaaat gtgctcttag gcttactcgt tcctgtcgag gatgaacact ccactctgct	1080
gattcttggc gtgctgctca ccctgaggta ttggtgccc ttgctgcagc agcaggtcaa	1140
ggacacaagc ctgaaaggca gcttcggagt gacaaggaaa gaaatggaag tctctccttc	1200
tgacagcagc cttgtccagg tttatgaact gacgttacat catacacagc accaagacca	1260
caatgttgtg accggagccc tggagctgtt gcagcagctc ttcagaacgc ctccaccga	1320
gcttctgcaa accctgaccg cagtcggggg cattgggcag ctaccgctg ctaaggagga	1380
gtctggtggc cgaagccgta gtgggagtat tgtggaactt atagctggag ggggttcctc	1440
atgcagccct gtcctttcaa gaaaacaaaa aggcaaagtg ctcttaggag aagaagaagc	1500
cttgaggat gactctgaat cgagatcgga tgcagcagc tctgccttaa cagcctcagt	1560
gaaggatgag atcagtggag agctggctgc ttcttcaggg gtttccactc cagggtcagc	1620
aggtcatgac atcatcacag aacagccacg gtcacagcac aactgcagg cggactcagt	1680

ggatctggcc agctgtgact tgacaagctc tgccactgat ggggatgagg aggatatctt	1740
gagccacagc tccagccagg tcagcgccgt cccatctgac cctgccatgg acctgaatga	1800
tgggaccag gcctcgtcgc ccatcagcga cagctcccag accaccaccg aagggcctga	1860
ttcagctgtt accccttcag acagttctga aattgtgtta gacggtaccg acaaccagta	1920
tttgggcctg cagattggac agccccagga tgaagatgag gaagccacag gtattcttcc	1980
tgatgaagcc tcggaggcct tcaggaactc ttccatggcc cttcaacagg cacatttatt	2040
gaaaaacatg agtcactgca ggcagccttc tgacagcagt gttgataaat ttgtgttgag	2100
agatgaagct actgaaccgg gtgatcaaga aaacaagcct tgccgcatca aaggtgacat	2160
tggacagtcc actgatgatg actctgcacc tcttgtccat tgtgtccgcc ttttatctgc	2220
ttcgtttttg ctaacagggg gaaaaaatgt gctggttccg gacagggatg tgagggtcag	2280
cgtaaggcc ctggccctca gctgtgtggg agcagctgtg gccctccacc cggaatcttt	2340
cttcagcaaa ctctataaag ttctcttga caccacggaa taccctgagg aacagtatgt	2400
ctcagacatc ttgaactaca tcgatcatgg agaccacag gttcgaggag ccactgccat	2460
tctctgtggg accctcatct gctccatcct cagcaggtcc cgcttccag tgggagattg	2520
gatgggcacc attagaacct tcacaggaaa tacattttct ttggcggatt gcattccttt	2580
gctgcggaaa aactgaagg atgagtcttc tgttacttgc aagttagctt gtacagctgt	2640
gaggaactgt gtcatgagtc tctgcagcag cagctacagt gagttaggac tgcagctgat	2700
catcgatgtg ctgactctga ggaacagttc ctattggctg gtgaggacag agcttctgga	2760
aacccttgca gagattgact tcaggctggt gagctttttg gaggcaaaag cagaaaactt	2820
acacagaggg gctcatcatt atacagggct tttaaaactg caagaacgag tgctcaataa	2880
tgttgtcatc catttgcttg gagatgaaga cccaggggtg cgacatgttg ccgcagcatc	2940
actaattagg ctgtgccaa agctgtttta taaatgtgac caaggacaag ctgatccagt	3000
agtggccgtg gcaagagatc aaagcagtgt ttacctgaaa cttctcatgc atgagacgca	3060
gcctccatct catttctccg tcagcacaat aaccagaata tatagaggct ataacctact	3120
accaagcata acagacgtca ctatggaaaa taacctttca agagtattg cagcagtttc	3180
tcatgaacta atcacatcaa ccaccagagc actcacattt ggatgctgtg aagctttgtg	3240
tcttctttcc actgccttcc cagtttgcatt ttggagtta ggttggcact gtggagtgcc	3300
tccactgagt gcctcagatg agtctaggaa gagctgtacc gttgggatgg ccacaatgat	3360
tctgaccctg ctctcgtcag cttggttccc attggatctc tcagcccatc aagatgcttt	3420
gattttggcc ggaaacttgc ttgcagccag tgcctccaaa tctctgagaa gttcatgggc	3480

ctctgaagaa gaagccaacc cagcagccac caagcaagag gaggtctggc cagccctggg	3540
ggaccgggcc ctggtgccca tggaggagca gctcttctct cacttgctga aggtgattaa	3600
catttggtgcc cactgctgg atgacgtggc tctgggaccc gcaataaagg cagccttgcc	3660
ttctctaaca aacccccctt ctctaagtcc catccgacga aaggggaagg agaaagaacc	3720
aggagaacaa gcatctgtac cgttgagtcc caagaaaggc agtgaggcca gtgcagcttc	3780
tagacaatct gatacctcag gtctgtttac aacaagtaaa tctcatcac tggggagttt	3840
ctatcatctt ccttcatacc tcaaaactgca tgatgtcctg aaagctacac acgctaacta	3900
caaggtcacg ctggatcttc agaacagcac ggaaaagttt ggagggtttc tccgctcagc	3960
cttggatgtt ctttctcaga tactagagct ggccacactg caggacattg ggaagtgtgt	4020
tgaagagatc ctaggatacc tgaaatcctg ctttagtcga gaaccaatga tggcaactgt	4080
ttgtgttcaa caatgttga agactctctt tggcacaac ttggcctccc agtttgatgg	4140
cttatcttcc aaccccgca agtcacaagg ccgagcacag cgccttggct cctccagtgt	4200
gaggccaggc ttgtaccact actgttcat ggccccgtac acccacttca cccaggccct	4260
cgctgacgcc agcctgagga acatggtgca ggccggagcag gagaacgaca cctcgggatg	4320
gtttgatgtc ctccagaaag tgtctacca gttgaagaca aacctcacga gtgtcacaaa	4380
gaaccgtgca gataagaatg ctattcataa tcacattcgt ttgtttgaac ctcttgttat	4440
aaaagcttta aaacagtaca cgactacaac atgtgtgcag ttacagaagc aggttttaga	4500
tttgctggcg cagctgggtc agttacgggt taattactgt cttctggatt cagatcaggt	4560
gtttattggc ttgtattga aacagtttga atacattgaa gtgggccagt tcagggaatc	4620
agaggcaatc attccaaca tcttttctt cttggtatta ctatcttatg aacgctatca	4680
ttcaaaacag atcattggaa ttcttaaaat cattcagctc tgtgatggca tcatggccag	4740
tggaaggaag gctgtgacac atgccatacc ggtctctgag cccatagtcc acgacctctt	4800
tgtattaaga ggaacaaata aagctgatgc aggaaaagag cttgaaaccc aaaaagaggt	4860
ggtggtgtca atgttactga gactcatcca gtaccatcag gtgttgaga gtgtcattct	4920
gtctctgag cagtgcaca aggagaatga agacaagtgg aagcgactgt ctgcacagat	4980
agctgacatc atcctccaa tgttagccaa acagcagatg cacattgact ctcatgaagc	5040
ccttgagtg ttaaatacat tatttgagat ttggccctt tctcctcc gtccggtaga	5100
catgctttta cggagtatgt tcgtcactcc aaacacaatg gcgtccgtga gcactgttca	5160
actgtggata tcgggaattc tggccatttt gagggttctg atttcccagt caactgaaga	5220

tattgttctt tctcgtattc aggagctctc cttctctccg tatttaatct cctgtacagt	5280
aattaatagg ttaagagatg gggacagtac ttcaacgcta gaagaacaca gtgaaggga	5340
acaaataaag aatttgccag aagaaacatt ttcaaggttt ctattacaac tggttggtat	5400
tcttttagaa gacattgta caaacagct gaaggtggaa atgagtgagc agcaacatac	5460
tttctattgc caggaactag gcacactgct aatgtgtctg atccacatct tcaagtctgg	5520
aatgttccgg agaatacacag cagctgccac taggctgttc cgcagtgatg gctgtggcgg	5580
cagtttctac accctggaca gcttgaactt gcgggctcgt tccatgatca ccaccaccc	5640
ggccctggtg ctgctctggt gtcagatact gctgcttgtc aaccacaccg actaccgtg	5700
gtgggcagaa gtgcagcaga ccccgaaaag acacagtctg tccagcaca agttacttag	5760
tccccagatg tctggagaag aggaggattc tgacttggca gccaaacttg gaatgtgcaa	5820
tagagaaata gtacgaagag gggctctcat tctcttctgt gattatgtct gtcagaacct	5880
ccatgactcc gagcacttaa cgtggctcat tgtaaatcac attcaagatc tgatcagcct	5940
ttcccacgag cctccagtac aggacttcat cagtgccgtt catcggaact ctgctgccag	6000
cggcctgttc atccaggcaa ttcagtctcg ttgtgaaaac ctttcaactc caacatgct	6060
gaagaaaact cttcagtgtc tggaggggat ccatctcagc cagtcgggag ctgtgtcac	6120
gctgtatgtg gacaggcttc tgtgcacccc ttccgtgtg ctggctcgca tggtcgacat	6180
ccttgcttgt cgccgggtag aaatgcttct ggctgcaaat ttacagagca gcatggccca	6240
gttgccaatg gaagaactca acagaatcca ggaatacctt cagagcagcg ggctcgtca	6300
gagacaccaa aggtctctatt cctgctgga caggtttcgt ctctccacca tgcaagactc	6360
acttagtccc tctcctccag tctcttccca cccgtggac ggggatgggc acgtgtcact	6420
ggaaacagtg agtccggaca aagactggtt cgttcatctt gtcaaatccc agtgttggac	6480
caggtcagat tctgcactgc tggaaggtgc agagctggtg aatcggttc ctgctgaaga	6540
tatgaatgcc ttcatgatga actcggagtt caacctaaag ctgctagctc catgcttaag	6600
cctagggatg agtgaaattt ctggtggcca gaagagtgcc ctttttgaag cagcccgtga	6660
ggtgactctg gccctgtgta gcggcacctg gcagcagctc cctgctgtcc atcatgtctt	6720
ccagcccag ctgcctgcag agccggcggc ctactggagc aagtigaatg atctgtttgg	6780
ggatgctgca ctgtatcagt cctgccccac tctggcccgg gccctggcac agtacctggt	6840
ggtggctctc aaactgcccc gtcatttgca ccttctctct gagaaagaga aggacattgt	6900
gaaattcgtg gtggcaaccc ttgaggccct gtccctggcat ttgatccatg agcagatccc	6960
gctgagtctg gatctccagg cagggtgga ctgctgtctg ctggccctgc agctgcctgg	7020
cctctggagc gtggtctcct ccacagagtt tgtgaccac gccctgctcc tcactactg	7080

tgtgcacttc atcctggagg ccgttgcagt gcagcctgga gagcagcttc ttagtccaga	7140
aagaaggaca aatacccca aagccatcag cgaggaggag gaggaagtag atccaaacac	7200
acagaatcct aagtataca ctgcagcctg tgagatgggt gcagaaatgg tggagtctct	7260
gcagtcggtg ttggccttgg gtcataaaaag gaatagcggc gtgccggcgt ttctcacgcc	7320
attgctaagg aacatcatca tcagcctggc ccgcctgccc cttgtcaaca gctacacacg	7380
tgtgccccca ctggtgtgga agcttggatg gtcacccaaa ccgggagggg attttggcac	7440
agcattccct gagatccccg tggagtccct ccaggaaaag gaagtcctta aggagtcat	7500
ctaccgcatc aacacactag gctggaccag tcgtactcag tttgaagaaa ctggggccac	7560
cctccttggg gtccctggga cgcagcccct cgtgatggag caggaggaga gccaccaga	7620
agaagacaca gagaggacc agatcaacgt cctggccgtg caggccatca cctactggt	7680
gctcagtga atgactgtgc ctgtggccgg caaccagct gtaagctgct tggagcagca	7740
gccccggaac aagcctctga aagctctga caccagttt gggaggaagc tgagcattat	7800
cagagggatt gtggagcaag agattcaagc aatggtttca aagagagaga atattgccac	7860
ccatcattta tatcaggcat gggatcctgt cctttctctg tctccggcta ctacaggtgc	7920
cctcatcagc cagagaagc tgctgtaca gatcaacccc gagcgggagc tggggagcat	7980
gagctacaaa ctggccagg tgtccataca ctccgtgtgg ctggggaaca gcatcacacc	8040
cctgaggag gaggaatggg acgaggaaga ggaggaggag gccgacgcc ctgcaccttc	8100
gtcaccacc acgtctccag tcaactccag gaaacaccgg gctggagtgt acatccactc	8160
ctgttcgcag tttttgcttg agttgtacag ccgttgatc ctgccgtcca gctcagccag	8220
gaggacccc gccatcctga tcagttaggt ggtcagatcc cttctagtgg tctcagactt	8280
gttcaccgag cgcaaccagt ttgagctgat gtatgtgacg ctgacagAAC tgcgaagggt	8340
gcaccttca gaagacgaga tcctcgctca gtacctgggt cctgccacct gcaaggcagc	8400
tgccgtcctt gggatggaca aggccgtggc ggagcctgtc agccgcctgc tggagagcac	8460
gctcaggagc agccacctgc ccagcagggt tggagccctg cacggcgtcc tctatgtgt	8520
ggagtgcgac ctgctggacg aactgccaa gcagctcatc ccggtcatca gcgactatct	8580
cctctccaac ctgaaaggga tcgcccactg cgtgaacatt cacagccagc agcacgtact	8640
ggtcattgtt gccactgcgt tttaacctat tgagaactat cctctggacg tagggccgga	8700
atcttcagca tcaataatac agatgtgtgg ggtgatgctg tctggaagtg aggagtccac	8760
ccctccatc atttaccact gtgccctcag aggcctggag cgcctcctgc tctctgagca	8820
gctctccgc ctggatgcag aatcgctggt caagctgagt gtggacagag tgaacgtgca	8880
cagcccgcac cgggccatgg cggctctggg cctgatgctc acctgcatgt acacaggaaa	8940

ggagaaagtc agtccgggta gaacttcaga ccctaactct gcagccccg acagcgagtc	9000
agtgattgtt gctatggagc gggatatctgt tctttttgat aggatcagga aaggctttcc	9060
tttgtgaagcc agagtgggtg ccaggatcct gccccagttt ctagacgact tcttcccacc	9120
ccaggacatc atgaacaaag tcatcggaga gtttctgtcc aaccagcagc cataccccca	9180
gttcatggcc accgtgggtg ataaggtgtt tcagactctg cacagcaccg ggcagtcgtc	9240
catggtcagg gactgggtca tgctgtccct ctccaacttc acgcagaggg ccccggtcgc	9300
catggccacg tggagcctct cctgcttctt tgcagcgcg tccaccagcc cgtgggtcgc	9360
ggcgatcctc ccacatgtca tcagcaggat gggcaagctg gagcaggtgg acgtgaacct	9420
tttctgcctg gtcgccacag acttctacag acaccagata gaggaggagc tcgaccgcag	9480
ggccttccag tctgtgcttg aggtgggttc agccccagga agcccatatc accggtcgt	9540
gacttgctta cgaaatgtcc acaaggtcac cacctgtga ggcctatgtt gggagagact	9600
gtgaggcggc agctggggcc ggagcctttg gaagtctgcg cccttggtcc ctgcctccac	9660
cgagccagct tggctcctat gggcttccgc acatgccgcg ggcggccagg caacgtcgt	9720
gtctctgcca tgtggcagaa gtgctctttg tggcagtggc caggcaggga gtgtctgcag	9780
tcctgggtggg gctgagcctg aggccttcca gaaagcagga gcagctgtgc tgcacccat	9840
gtgggtgacc aggtccttcc tctgatagt cacctgtctg ttgttgccag gttgcagctg	9900
ctcttgcatc tgggccagaa gtcctccctc ctgcaggctg gctgttgcc cctctgtctg	9960
cctgcagtag aaggtgccgt gagcaggctt tgggaacct ggcctgggtc tccttggtgg	10020
ggtgtcatg ccacgccccg tgtctggatg cacagatgcc atggcctgtg ctgggccagt	10080
ggctgggggt gctagacacc cggcaccatt ctcccttctc tctttcttc tcaggattta	10140
aaatttaatt atatcagtaa agagattaat tttaacgtaa ctctttctat gcccgtgtaa	10200
agtatgtgaa tcgcaaggcc tgtgtgcat gcgacagcgt ccgggggtgt ggacagggcc	10260
cccggccacg ctccctctcc ttagccact ggcatagccc tctgagcac ccgtgacat	10320
ttccgttgta catgttcctg tttatgcatt cacaagtgta ctgggatgta gagaggcgtt	10380
agtgggcagg tggccacagc aggactgagg acaggcccc attatcctag gggtagcgtc	10440
acctgcagcc cctcctctc gggcacagac gactgtcgtt ctccaccac cagtcaggga	10500
cagcagctc cctgtcactc agctgagaag gccagccctc cctggctgtg agcagcctcc	10560
actgtgtcca gagacatggg cctccactc ctgttcttg ctagccctgg ggtggcgtct	10620
gcctaggagc tggctggcag gtgttgggac ctgctgtcc atggatgcat gccctaagag	10680

tgctactgag ctgtgttttg tctgagcctc tctcggtcaa cagcaaagct tgggtgtcttg	10740
gcactgttag tgacagagcc cagcatcctt tctgcccccg ttccagctga catcttgac	10800
ggtgaccctt tttagttagg agagtgcaga tctgtgtctc tcggagactg cccacaggcc	10860
ctgtcagagc cgccactcct atccccaggc cagggtccctg gaccagcctc ctgtttgcag	10920
gcccagagga gccaagtcac taaaatggaa gtggattctg gatggccggg ctgctgctga	10980
tgtaggagct ggatttggga gctctgcttg ccgactggct gtgagacgag gcaggggctc	11040
tgcttctca gccctagagg cgagccaggc aagggtggcg actgtcatgt ggcttggttt	11100
ggtcatgccc gtcgatgttt tgggtattga atgtggttaag tggaggaaat gttggaactc	11160
tgtgcagggt ctgccttgag accccaagc ttccacctgt cctctccta tgtggcagct	11220
ggggagcagc tgagatgtgg acttgtatgc tgcccacata cgtgaggggg agctgaaagg	11280
gagccctcc tctgagcagc ctctgccagg cctgtatgag gcttttccca ccagctccca	11340
acagaggcct cccccagca ggaccacctc gtcctcgtgg cggggcagca ggagcggtag	11400
aaaggggtcc gatgtttgag gaggccctta agggaagcta ctgaattata acacgtaaga	11460
aaatcaccat tccgtattgg ttgggggctc ctgtttctca tctagcttt ttcctggaaa	11520
gcccgtaga aggtttggga acgaggggaa agttctcaga actgttggt gctccccacc	11580
cgctcccgc ctccccgca ggttatgtca gcagctctga gacagcagta tcacaggcca	11640
gatgttgttc ctggctagat gtttacattt gtaagaaata aactgtgaa tgtaaaacag	11700
agccattccc ttggaatgca tatcgtggg ctcaacatag agtttgtctt cctctgttt	11760
acgacgtgat ctaaacagct ccttagcaag gggtcagaa caccgcctc tggcagtagg	11820
tgtccccac ccccaaagac ctgcctgtgt gtcgggaga tgaatatgag ctcatagta	11880
aaaatgactt caccacgca tatacataaa gtatccatgc atgtcatat agacacatct	11940
ataattttac acacacacct ctcaagacgg agatgcatgg cctctaagag tgcccgtgtc	12000
ggttcttctt ggaagttagc ttctcttaga cccgcagggt caagttagcc gcgtgacgga	12060
catccaggcg tgggacgtgg tcagggcagg gctcattcat tgcccactag gatccactg	12120
gcgaagatgg tctccatctc agctctctgc agaaggagg aagactttat catgttctta	12180
aaaatctgtg gcaagcacc atcgtattat ccaaattttg ttgcaaatgt gattaatttg	12240
gttgtcaagt tttgggggtg ggctgtgggg agattgcttt tgttttctg ctggtaatat	12300
cgggaaagat tttaatgaaa ccagggtaga attgtttggc aatgcactga agcgtgtttc	12360
tttccaaaa tgtgcctccc ttccgtgcg ggcccagctg agtctatgta ggtgatgttt	12420
ccagctgcca agtgctcttt gttactgtcc accctcatit ctgccagcgc atgtgtcctt	12480
tcaaggggaa aatgtgaagc tgaacccct ccagacaccc agaattgtagc atctgagaag	12540

gccctgtgcc ctaaaggaca cccctcgccc ccatcttcat ggagggggtc atttcagagc 12600
 cctcggagcc aatgaacagc tctctctctt ggagctgaga tgagcccccac gtggagctcg 12660
 ggacggatag tagacagcaa taactcgggtg tgtggccgcc tggcaggtgg aacttcctcc 12720
 cgttgcgggg tggagtgagg ttagttctgt gtgtctggtg ggtggagtca ggcttctctt 12780

gctacctgtg agcatccttc ccagcagaca tctcatcgg gctttgtccc tccccgctt 12840
 cctccctctg cggggaggac ccgggaccac agctgctggc cagggtagac ttggagctgt 12900
 cctccagagg ggtcacgtgt aggagtgaga agaaggaaga tcttgagagc tgctgaggga 12960
 ccttgagag ctcaggatgg ctcagacgag gacactcgt tgcggggcct gggcctcctg 13020
 ggaaggaggg agctgctcag aatgccgcat gacaactgaa ggcaacctgg aaggttcagg 13080
 ggccgctctt ccccatgtg cctgtcacgc tctggtgcag tcaaaggaac gccttccct 13140
 cagttgtttc taagagcaga gtctcccgct gcaatctggg tggtaactgc cagccttgga 13200

ggatcgtggc caacgtggac ctgcctacgg aggggtgggt ctgaccaag tggggcctcc 13260
 ttgtccaggt ctactgctt tgcaccgtgg tcagagggac tgtcagctga gcttgagctc 13320
 ccctggagcc agcagggtgt tgatgggcga gtcccggagc cccaccaga cctgaatgct 13380
 tctgagagca aagggaagga ctgacgagag atgtatatatt aattttttaa ctgctgcaaa 13440
 cattgtacat ccaaattaaa ggaaaaaat ggaaaccatc aaaaaaaaa aaaaaaaa 13498

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 2

taaatgtgcc tgttgaaggg c 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

aagagtgca gattcatcat c 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 4
 ttctggagga catcaaacca t 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 5
 tgaactggcc cacttcaatg t 21

 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 6
 ttccattggc aactgggccca t 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 7
 taagcatgga gctagcaggc t 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 8
 tagcgttgaa gtactgtccc c 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 9
 ttgaggcagc agcggctgtg c 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 10
 ttcacacagct tttccagggt c 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 11
 tggaattctc ggggtgccaag g 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 12
 ccttggcacc cgagaattcc a 21
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 13

gcagagcaca gccgacgac 19

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 14

aatgatacgg cgaccaccga gatctacacg ttcagagttc tacagtccga 50

<210> 15

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 15

caagcagaag acggcatacg agatnnnnnn gtgactggag ttccttgga cccgagaatt 60

cca 63

<210> 16

<211> 5483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 16

gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct 60

aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg 120

cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgtacac ttgccagcgc 180

cctagcgccc gtccttttcg cttttctccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc 240

ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct 300

cgaccccaaa aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac 360

ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gtcttttaat agtggactct tgttccaaac 420

tggaacaaca ctcaacccta tctcgggtcia ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat	480
ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa	540
aatattaacg cttacaattt aaatatitgc ttatacaatc ttectgtttt tggggctttt	600
ctgattatca accgggggtac atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcacgc	660
cctgcgcgct cgtcgcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt	720
tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggat tcacgcgtgg	780
atctgaattc aattcacgcg tggtagctct ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc	840
gcctggctga ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	900
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagiatttac ggtaaactgc	960
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatai gccaagtacg cccctattg acgtcaatga	1020
cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg	1080
gcagtacatc tactcgaggc cacgttctgc ttactctcc ccatctccc cccctccca	1140
cccccaattt tgtatttatt tatttttta ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg	1200
gggggggggc gcgcgccagg cggggcgagg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg	1260
agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttcttt tatggcgagg	1320
cggcgcgggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagc gggatcagcc	1380
accgcggtgg cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaagtta actggtaagt	1440
ttagtctttt tctcttttat ttcaggtccc ggatccggtg gtgttgcaaa tcaaagaact	1500
gtctctcagt ggatgttgcc ttacttcta ggctgtacg gaagtgttac ttctgtcta	1560
aaagtgcgg aattgtacc gcggccgatc caccggtcgc caccatggtg agcaaggcgc	1620
aggagctgtt caccgggtg gtgcccaccc ttgtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc	1680
acaagttcag cgtgtccgcg gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga	1740
agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga	1800
cctacggcgt gcagtgttc agccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttttca	1860
agtccccat gccgaaggc tacgtccagg agcgacccat cttcttcaag gacgacggca	1920
actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc	1980
tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca acatctggg gcacaagctg gagtacaact	2040
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact	2100
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga	2160

acaccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccacaa ccactacctg agcaccagtt 2220

ccgccttag caaagacccc aacgagaagc gcatcacat ggtcctgctg gagttcgtga 2280

ccgccgccgg gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaaagcggc cctagcgttt 2340

ccggcgacgg tgctagcgtc gaccagtggg tcttgaggc ttgctgaagg ctgtatgctg 2400

taagcatgga gctagcaggc tgttttgcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac 2460

aggacacaag gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggcccagatc tggccgcaact 2520

cgaacacggg ccctctagac tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgacttttt 2580

tcctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagccctt gagcatctga cttctggcta 2640

ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctactcgg 2700

aagcaattcg ttgatctgaa ttctgaccac ccataatacc cattaccctg gtagataagt 2760

agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg aacccctagt gatggagtgg gccactccct 2820

ctctgcgcgc tcgtcgcgtc actgaggccg ggcgacaaa ggtcgccga cggcgggct 2880

ttgccgggc gccctcagtg agcgagcgag cgcgcagcct taattaacct aattcactgg 2940

ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgcttg 3000

cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggccgcacc gatcgccctt 3060

cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg 3120

cggcgggtgt ggtggttacg gcgcagctga ccgtacact tgccagcgcc ctagegcccg 3180

ctcctttcgc tttcttccct tcttttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 3240

taaatcgggg gtcctcttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa 3300

aacttgatta gggatgatgt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 3360

ctttgacgtt ggagtccagc ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 3420

tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt 3480

ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcga ttttaacaaa atattaacgc 3540

ttacaattta ggtggcactt ttccgggaaa tgtgcgcgga accctattt gttattttt 3600

ctaaatacat tcaaatatgt atccgtcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata 3660

atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcgt gtcgccctta ttccctttt 3720

tgcggcattt tgccttctg tttttgctca ccagaaaac ctggtgaaag taaaagatgc 3780

tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcgtaagat 3840

ccttgagagt tttgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 3900

atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 3960

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacgatgg 4020

catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 4080
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 4140
ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 4200
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 4260

cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 4320
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 4380
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 4440
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 4500
gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 4560
atataactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 4620
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 4680

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 4740
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 4800
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct 4860
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 4920
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 4980
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cgggggggttc 5040
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 5100

gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 5160
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 5220
tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gtcgtcagg 5280
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 5340
ctggcctttt gtcacatgt tctttcctgc gttatccct gattctgtgg ataaccgtat 5400
taccgccttt gagttagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 5460
agtgagcgag gaagcgggaag agc 5483

<210> 17

<211> 5686

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 17

gcccataacg caaacgcctt ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct 60
aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg 120
cgcatlaagc gcggcgggtg tggtaggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc 180
cctagcgcgc gctcctttcg cttttttccc ttcttttctc gccacgttcg cgggctttcc 240
ccgtcaagct ctaaatecgg ggctcccttt aggggttccga tttagtgtt tacggcacct 300
cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac 360

ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac 420
tggacaaca ctaacccta tctcgttcta tttttttgat ttataaggga ttttgccgat 480
ttcgccctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa 540
aatattaacg cttacaattt aaatatgtgc ttatacaatc ttcctgtttt tggggctttt 600
ctgattatca accggggtag atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcacgc 660
cctgcgcgt cgtcgtca ctgagccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 720
tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggat tctataaagg 780

tccggcagga agaggcccta tttcccatga ttctttcata tttgcatata cgatacaagg 840
ctgttagaga gataattaga attaatgtga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata 900
cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt agtttgagtt tttaaaatta tgttttaaaa 960
tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa agtatttcga tttcttggct ttatatatct 1020
tgtggaaagg acgaaacacc gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga 1080
gctagcaggc tgttttgcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag 1140
gcctgttact agcactcaca tggacaacat ggcccttttt tctagtggta cctctggtcg 1200

ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgeccattga 1260
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat 1320
gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 1380
gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc ctggcattat gccagtaga 1440
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctactc gaggccacgt tctgcttcac 1500
tctcccatc tccccccct cccaccccc aattttgtat ttatttttt ttttaattatt 1560
ttgtgcagc atgggggcgg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1620

cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgt 1680
ccgaaagttt cttttatgg cgaggcggcg gcggcggcg ccctataaaa agcgaagcgc 1740
gcggcggcg ggagcgggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga 1800
aaaaccagaa agttaactgg taagttagt ctttttgtct tttatttcag gtcccggatc 1860

cggtggtggt gcaaatcaaa gaactgctcc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct	1920
gtacggaagt gttacttctg ctctaaaagc tgcggaattg taccgcggc cgatccaccg	1980
gtgccacca tggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg gggtagtgcc catcctggtc	2040
gagctggacg gcgacgtaaa cgccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgaggcgcat	2100
gccacctacg gcaagctgac cctgaagtgc atctgcacca ccgcaagct gcccggtccc	2160
tggccacccc tegtgaccac cctgacctac ggcggtgcagt gcttcagccg ctaccccgac	2220
cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc	2280
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc	2340
gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc	2400
ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag	2460
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg	2520
cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc	2580
gacaaccact acctgagcac ccagtcgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat	2640
cacatggtcc tgetggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat ggacgagctg	2700
tacaagtaaa gcggccctag cgtttccggc gacggtgcta gactcgagga cggggtgaac	2760
tacgcctgag gatccgatct ttttcctct gccaaaaatt atggggacat catgaagccc	2820
cttgagcatc tgacttctgg ctaataaagg aaatttatit tcattgcaat agtgtgttgg	2880
aattttttgt gtctctcact cggaagcaat tcgttgatct gaatttcgac caccataat	2940
accatttacc ctggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca aggaaccct	3000
agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc	3060
aaagtgccc cgacgccgg gctttgccg ggcgccctca gtgagcgagc gagcgcgcag	3120
ccttaattaa cctaattcac tggccgtcgt tttaaacgt cgtgactggg aaaaccctgg	3180
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga	3240
agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc	3300
gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgtac	3360
acttgccagc gccctagcgc ccgtccttt cgctttcttc ccttccttc tcgccagtt	3420
cgccgcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc	3480
tttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttagggatgat ggttcacgta gtgggccatc	3540
gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact	3600
cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg	3660

gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc	3720
gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc	3780
ggaaccacct tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa	3840
taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	3900
cgtgtcgcgc ttattccctt ttttcgggca ttttccttc ctgtttttgc tcaccagaa	3960
acgctggatga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	4020
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg	4080
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	4140
gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	4200
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	4260
atgagtata acactgcgcg caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	4320
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	4380
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca	4440
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca acaattaata	4500
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc	4560
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	4620
ctggggccag atggtaagcc ctccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtccagca	4680
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg	4740
taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	4800
tttaaaagga tctaggigaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat ccctaacgt	4860
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	4920
cccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg	4980
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga	5040
gcgcagatac caaataactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	5100
tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	5160
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag	5220
cggtcgggct gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc	5280
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag	5340
gcggacaggt atccggttaag cggcaggggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	5400

gggggaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 5460
 cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 5520
 tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 5580
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 5640
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagc 5686
 <210> 18
 <211> 5155
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 18
 ctgcgcgtc gtcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
 ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagttagcc atgctctagg 120
 aagatcaatt caattcacg gtcgacattg attattgact agctctggtc gttacataac 180
 ttacgtaaa tggcccgct ggctgaccgc ccaacgacc ccgccattg acgtcaataa 240
 tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 300
 atttacgga aactgccac ttggcagtac atcaagtga tcatatgcca agtccgcccc 360
 ctattgacgt caatgacgtt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttac 420
 gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtcgagg 480
 tgagccccc gttctgcttc actctcccca tctcccccc ctcgccacc ccaattttgt 540
 atttatttat tttttaatta ttttgtcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg 600
 cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg 660
 cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttcttttat ggcgagggcg cgcgggcggc 720
 ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgtgc cttcgccccg 780
 tgccccgtc cgccgccgcc tcgcgccgcc cggcccggct ctgactgacc gcgttactcc 840
 cacaggttag cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat 900
 gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt 960
 tgtgcggggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg tgtgcgtggg gagcgcgcgc 1020
 tgcggctccg cgctgcccg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg gctttgtgcg 1080
 ctccgcagtg tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg ccccgcggtg cggggggggc 1140
 tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg gggggtgagc agggggtgtg 1200
 ggcgcgctcg tcgggtgca accccccctg cccccctc cccgagttgc tgagcacggc 1260

ccggcttcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgagg ggctcgccgt gccgggagg 1320

gggtggcggc aggtgggggt gccgggagg gcggggccgc ctggggagg ggagggtcg 1380

ggggaggggc gcggggggc ccggagcgcc ggaggctgtc gaggcgggc gagccgcagc 1440

cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcaggagc ttctttgtc ccaaattgt 1500

gcggagccga aatctgggag gcgccgggc accccctcta gcggcgagg gcgaagcgg 1560

tgcggcgagg gcaggaagga aatgggagg gagggccttc gtgcgtcgcc gcgccggcgt 1620

cccccttcc ctctccagcc tcggggctgt ccggggggg acggctgcct tcggggggga 1680

cggggcaggg cgggggtcgg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc ctctgctaac 1740

catgttcatt cctctctctt ttctctacag ctctgggca acgtgctgtt tattgtgtg 1800

tctcatcatt ttggcaaga attcatgat accgtcgagc atctagcgtc gaccagtga 1860

tcctggaggc ttgtgaagg ctgtatgtg taagcatgga gctagcaggc tgttttgcc 1920

actgactgac agcctgtctt ccatgcttac aggacacaag gcctgttact agcactcaca 1980

tggaacaaat ggcccagatc cgatctttt cctctgcca aaaattatgg ggacatcatg 2040

aagcccttg agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagt 2100

tgttggaatt ttttgtgtc ctactcgat cagatctgag gaaccctag tgatggagt 2160

ggccactccc tctctgcgg ctcgtcgtc cactgaggc gccgggcaa agccgggag 2220

tcggcgaggc ttgtgcggc cggcctcagt gagcgagca gcgcgagag agggagtggc 2280

ccccccccc cccccctt gcattctaga gagctccaat tcgccctata gtgagtcgt 2340

ttacgcggc tcaactggcg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac 2400

ccaactaat cgcttgagc cacatcccc ttctgccagc tggcgtaata gcgaaggagc 2460

ccgcaccgat cgccttccc aacagtgcg cagcctgaat ggcaaatgga aattgtaagc 2520

gttaatattt ttttaaaat cgcgttaat tttgttaaa tcagctcatt ttttaacca 2580

taggccgaaa tcggcaaaat ccttataaa tcaaaagaat agaccgagat agggttgagt 2640

gttgttcag tttggaaca gagtccacta ttaaagaacg tggactcaa cgtcaaagg 2700

cgaaaaaccg tctatcaggc cgatggccca ctacgtgaac catcacccta atcaagttt 2760

ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaaacct aaggagccc ccgatttaga 2820

gcttgacggg gaaagccgc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagc 2880

ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgtgcgcg taaccaccac acccgccgcg 2940

cttaatgcgc cgctacaggc cgcgtcaggc ggcaatttc ggggaaatgt gcgcggaacc 3000

cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 3060
 tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 3120
 gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc cttctgtttt ttgctcacc agaaacgctg 3180
 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 3240
 ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 3300
 acttttaag tttctgtatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa 3360
 ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 3420

aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctagagt 3480
 gataaactg cggccaactt acttttgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 3540
 tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgcttgatc gttgggaacc ggagctgaat 3600
 gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 3660
 cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 3720
 atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcggc tggctggttt 3780
 attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg 3840

ccagatggta agccctcccg tatcgtagt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 3900
 gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 3960
 tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa 4020
 aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 4080
 tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 4140
 tttctgcgcg taatctgtg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 4200
 ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag 4260

ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 4320
 gcaccgccta catacctgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 4380
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataagc gcagcggtcg 4440
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacct caccgaactg 4500
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgctt ccgaaggag aaaggcggac 4560
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga 4620
 aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 4680

ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 4740
 cggttctcgg ctttttctg gccttttct cacaatttct tttctgctt atccctgat 4800
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg 4860

accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct 4920
ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa 4980
gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct 5040
ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac 5100

acaggaaca gctatgacca tgattacgcc agatttaatt aaggccttaa ttagg 5155

<210> 19
<211> 5223
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 19

gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct 60
aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg 120
cgcatlaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc 180
cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc 240
ccgtcaagct ctaaactcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct 300

cgaccccaaa aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac 360
ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac 420
tgaacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat 480
ttcggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa 540
aatattaacg cttacaattt aaatatgtgc ttatacaatc ttctgtttt tggggctttt 600
ctgattatca accgggggtac atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcacgc 660
cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 720

tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggaa tctataaagg 780
tcgggcagga agagggccta tttcccatga ttcttcata tttgcatata cgatacaagg 840
ctgttagaga gataattaga attaatgtga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata 900
cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt agtttgagc tttaaaatta tgttttaaaa 960
tggaactatca tatgcttacc gtaacttgaa agtatttcga tttcttggt ttatatatct 1020
tgtggaaagg acgaaacacc gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga 1080
gctagcaggc tgttttggcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag 1140

gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggcccttttt tctagtggta cctctggctc 1200

ttacataact tacggtaaat ggcccgccctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga	1260
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	1320
gggtggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa	1380
gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccg cttggcattat gcccagtaca	1440
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctactc gagggcacgt tctgtttcac	1500
tctccccatc tccccccct ccccacccc aattttgtat ttattttatt tttaattatt	1560
ttgtgcagcg atggggcgcg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg	1620
cgaggggcg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct	1680
ccgaaagt ttttttatgg cgaggcgcg gcggcgcg ccctataaaa agcgaagcg	1740
gcggcgggcg ggagcgggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga	1800
aaaaccagaa agttaactgg taagttagt cttttgtct tttatttcag gtcccgatc	1860
cgggtggtgt gcaaatcaaa gaactgctc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct	1920
gtacggaagt gttacttctg ctctaaaagc tgcggaattg taccgcggc cgcgtttaa	1980
ccctgcaggt ctagaaagt tatcgatacc gtcgactaga gtcgctgat cagcctcgac	2040
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	2100
ggaaggtgcc actcccactg tcccttcta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct	2160
gagtaggtgt cattctatc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg	2220
ggaagacaat agcagggtag aagtaaagcg gccctagcgt ttccggcgac ggtgctagac	2280
tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgatcttt tccctctgcc aaaaattatg	2340
gggacatcat gaagcccct gagcatctga ctctggcta ataaaggaaa tttattttca	2400
ttgcaatagt gtgttgaat tttttgtgc tctcactcg aagcaattcg ttgatctgaa	2460
tttcgaccac ccataatacc cattaccctg gtagataagt agcatggcg gttaatcatt	2520
aactacaagg aaccctagt gatggagt ggcactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc	2580
actgaggccg ggcgacaaa ggtcgcccga cggccgggct ttgcccgggc ggccctcagt	2640
agcgagcgag cgcgcagcct taattaacct aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt	2700
gactgggaaa accctggcgt taccacactt aatcgcttg cagcacatcc ccttttcgcc	2760
agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccct cccaacagt gcgcagcctg	2820
aatggcgaat gggacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg	2880
cgcagcgtga ccgtacact tgccagcgcc ctagcggcg ctcttttcgc tttcttcct	2940
tctttctcgc ccacgttcgc cggttttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta	3000
gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta ggtgatggt	3060

tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg	3120
ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat	3180
tcttttgatt tataagggat ttgcccatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt	3240
taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta ggtggcactt	3300
ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt	3360
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	3420
tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg	3480
tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	3540
gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt tttcgccccg	3600
aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc	3660
gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg	3720
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	3780
gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg	3840
gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg	3900
atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	3960
ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt	4020
cccggaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct	4080
cggcccttcc ggctggctgg tttattgtcg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc	4140
gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	4200
cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggcct	4260
cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt	4320
taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ctttttgat aatctcatga	4380
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca	4440
aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac	4500
caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	4560
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagttag ccgtagttag	4620
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	4680
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	4740
taccggataa ggcgacgagg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg	4800
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc	4860

ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc 4920

gcacgaggga gcttcaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc 4980

acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa 5040

acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt 5100

tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gattgagctg 5160

ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag 5220

agc 5223

<210> 20

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

 435 440 445
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

 500 505 510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser

 565 570 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met

 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 21

<211> 137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 21

gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga gctagcaggc tgttttggcc 60

actgactgac agcctgctct cctagcttac aggacacaag gcctgttact agcactcaca 120

taacaaatgg ccctttt 137

<210> 22

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 22

gctcgagtga ggcgagcctg ctagctccat gcttactgta aagccaccag atgggtaagc 60

atggagctag caggcttcgc ctactagttt t 91

<210> 23

<211> 139

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 23

gccuggaggc uugcugaagg cuguauugcug uaagcaugga gcuagcaggc uguuuuggcc 60

acugacugac agccugcucu ccuagcuuac aggacacaag gccuguuacu agcacucaca 120

uggaacaaaau ggcccuuuu 139

<210> 24

<211> 91

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 24

gcucgaguga ggcgagccug cuagcuccau gcuuacugua aagccaccag auggguaagc 60

auggagcuag caggcuucgc cuacuaguuu u 91

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 25

uaagcaugga gcuagcaggc u 21