



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0140982  
(43) 공개일자 2019년12월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/22 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 9/64 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 9/22 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7033913
- (22) 출원일자(국제) 2018년04월20일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년11월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/028607
- (87) 국제공개번호 WO 2018/195449  
국제공개일자 2018년10월25일
- (30) 우선권주장  
62/488,403 2017년04월21일 미국(US)  
62/516,966 2017년06월08일 미국(US)

- (71) 출원인  
프리시전 바이오사이언시스 인코포레이티드  
미국 노스캐롤라이나주 27701 스위트 에이-100 더  
램 디브렐 빌딩 302 이스트 페티그루 스트리트
- (72) 발명자  
마체비치, 빅터  
미국 27713 노스캐롤라이나주 더럼 오디세이 드러  
이브 1008  
잔츠, 데릭  
미국 27701 노스캐롤라이나주 더럼 글로리아 애비  
뉴 1011  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이상남

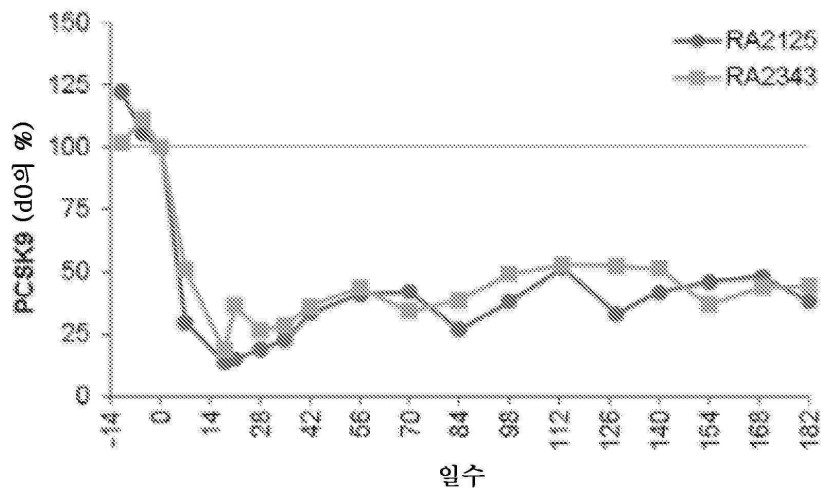
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 PCSK9 유전자 내의 인식 서열에 대해 특이적인 조작된 메가뉴클레아제

(57) 요약

본 발명은 인간 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 포괄한다. 본 발명은 또한 제약 조성물에서 및 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 고콜레스테롤혈증의 증상을 치료하거나 감소시키는 방법에서 이러한 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 방법을 포괄한다. 추가로, 본 발명은 조작된 메가뉴클레아제 단백질 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 포함하는 제약 조성물, 및 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 고콜레스테롤혈증을 치료하기 위한 이러한 조성물의 용도를 포괄한다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

*A61K 48/00* (2013.01)

*C12N 15/86* (2013.01)

*C12N 9/6424* (2013.01)

*C07K 2319/09* (2013.01)

*C07K 2319/80* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

(72) 발명자

**스미스, 제임스, 제퍼슨**

미국 27560 노스캐롤라이나주 모리스빌 위버 포레스트 웨이 1916

**레이프, 재널**

미국 27587 노스캐롤라이나주 웨이크 포레스트 비스타 델 라고 레인 505

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열식별번호: 4를 포함하는 인식 서열을 인식하고 절단하는 조작된 메가뉴클레아제이며, 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 상기 제1 서브유닛은 상기 인식 서열의 제 1 인식 절반-부위에 결합하고, 상기 제1 서브유닛은

- (a) 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 7-153에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및
- (b) 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고;

상기 제2 서브유닛은 상기 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고, 상기 제2 서브유닛은

- (i) 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 198-344에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및

- (ii) 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함하는 것인,

조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열식별번호: 8의 잔기 48, 50, 71 및 73에 상응하는 잔기를 추가로 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR1 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열식별번호: 12의 잔기 258에 상응하는 잔기를 추가로 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HVR2 영역이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 서브유닛이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 서브유닛이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 서브유닛이 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 메가뉴클레아제가 링커를 포함하고, 여기서 상기 링커는 상기 제1 서브유닛과 상기 제2 서브유닛을 공유적으로 연결하는 것인 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 메가뉴클레아제.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 17**

제16항에 있어서, mRNA인 폴리뉴클레오티드.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 mRNA가 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제 및 적어도 1종의 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리시스트론 mRNA인 폴리뉴클레오티드.

**청구항 19**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 구축물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 재조합 DNA 구축물이 프로모터 및 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제 및 적어도 1종의 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함하고, 여기서 상기 프로모터는 표적 세포에서 상기 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 폴리시스트론 mRNA를 생성하는 것인 재조합 DNA 구축물.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 상기 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 코딩하는 재조합 DNA 구축물.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터인 재조합 DNA 구축물.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 재조합 AAV 벡터인 재조합 DNA 구축물.

**청구항 24**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 AAV 벡터인 바이러스 벡터.

**청구항 26**

제24항 또는 제25항에 있어서, 재조합 AAV 벡터인 바이러스 벡터.

**청구항 27**

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 프로모터 및 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제 및 적어도 1종의 추가의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 카세트 를 포함하고, 여기서 상기 프로모터는 표적 세포에서 상기 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 폴리시스트론 mRNA를 생성하는 것인 바이러스 벡터.

**청구항 28**

제약상 허용되는 담체 및

(a) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산; 또는

(b) 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제

를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 상기 핵산이 제17항 또는 제18항의 상기 mRNA인 제약 조성물.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 상기 재조합 DNA 구축물을 포함하는 제약 조성물.

**청구항 31**

제28항에 있어서, 제24항 내지 제27항 중 어느 한 항의 상기 바이러스 벡터를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 32**

제28항에 있어서, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 33**

제28항 또는 제29항에 있어서, 지질 나노입자 내에 캡슐화된 제17항 또는 제18항의 상기 mRNA를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 34**

대상체 내의 표적 세포로

(a) 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 전달하여, 상기 표적 세포에서 상기 조작된 메가뉴클레아제가 발현되는 것; 또는

(b) 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 전달하는 것

을 포함하고, 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제는 상기 표적 세포에서 서열식별번호: 4를 포함하는 인식 서열을 인식하고 절단하여, 대조군 세포와 비교할 때 PCSK9의 발현을 감소시키는 것인,

대상체에서 PCSK9의 발현을 감소시키는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 대상체가 고콜레스테롤혈증을 갖는 것인 방법.

**청구항 36**

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 대상체가 가족성 고콜레스테롤혈증을 갖는 것인 방법.

**청구항 37**

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증을 갖는 것인 방법.

**청구항 38**

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 제28항 내지 제33항 중 어느 한 항의 상기 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 상기 제약 조성물이 제26항의 상기 재조합 AAV 벡터를 포함하는 것인 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 상기 제약 조성물이 지질 나노입자 내에 캡슐화된 제17항 또는 제18항의 상기 mRNA를 포함하는 것인 방법.

**청구항 41**

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 세포가 간 세포인 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 간 세포가 간세포인 방법.

**청구항 43**

제34항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간 또는 비-인간 영장류인 방법.

**청구항 44**

제34항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이가 기준선 LDL 수용체 수준과 비교할 때 간 세포에서 증가되는 것인 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 간 세포의 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이가 상기 간 세포의 기준선 LDL 수용체 수준과 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100% 증가되는 것인 방법.

**청구항 46**

제34항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 총 혈청 콜레스테롤 수준이 상기 대상체에서 PCSK9의 발현 감소 후에 감소되는 것인 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 총 혈청 콜레스테롤 수준이 기준선 총 혈청 콜레스테롤 수준과 비교할 때

(a) 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100%; 또는

(b) 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL, 60-80 mg/dL 또는 70-100 mg/dL만큼

감소되는 것인 방법.

**청구항 48**

제34항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청 LDL 콜레스테롤 수준이 상기 대상체에서 치료 후에 감소되는 것인 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 혈청 LDL 콜레스테롤 수준이 기준선 혈청 LDL 콜레스테롤 수준과 비교할 때

(a) 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100%; 또는

(b) 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL 또는 60-80 mg/dL만큼

감소되는 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 분자 생물학 및 재조합 핵산 기술 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 PCSK9 유전자 내의 인식 서열에 대한 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제에 관한 것이다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제는 심혈관 질환 및 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증을 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법에 유용하다.

[0002] EFS-웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0003] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2018년 4월 20일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P109070022W000-SEQTXT-MJT로 명명되고, 크기가 89,660 바이트이다.

**배경 기술**

[0004] 저밀도 지단백질 콜레스테롤 (LDL-C)의 높은 수준과 관련된 심혈관 질환은 선진국에서 주요 사망 원인이고, LDL-C의 상승된 수준은 관상 동맥 질환 (CHD) 및 아테롬성동맥경화관 발생의 주요 위험 인자이다. 예를 들어, 가족성 고콜레스테롤혈증 (FH)은 높은 콜레스테롤 수준, 특히 높은 수준의 LDL-C, 및 조기-발병 CHD의 발생을 특징으로 하는 유전 장애이다. 이형접합 FH 환자는 전형적으로 총 콜레스테롤 수준 및 구체적으로 LDL-C 수준을 감소시키는 지질 강하제, 예컨대 스타틴으로 치료된다. 실제로, 스타틴의 투여는 특정 환자 집단에서 심혈관 질환의 위험을 크게 감소시켰다. 그러나, 일부 환자 집단, 특히 동형접합 형태의 FH를 갖는 환자는 고용량 스타틴을 포함한 의학적 치료에 반응하여 정상 LDL-C 수준을 달성할 수 없다.

- [0005] 지질-강화 분야에서의 유의한 진전은 전구단백질 컨버타제 서브틸리신/잭신 유형 9 (PCSK9) 표적화 요법의 개발이었다. 인간 PCSK9 유전자는 염색체 1p32.3 상에 위치하고, 25,378 bp 길이다. 이는 692개의 아미노산을 코딩하는 12개의 엑손을 함유한다. PCSK9 단백질은 신호 펩티드, 프로-도메인, 촉매 도메인, 및 3개 모듈 (M1, M2 및 M3)로 구성된 C-말단 시스테인-히스티딘-풍부 도메인을 함유한다.
- [0006] PCSK9가 위장관, 신장 및 중추 신경계 (CNS)에서 낮은 수준으로 발현되긴 하지만, PCSK9의 합성, 분비 및 발현은 주로 간에서 발생한다. PCSK9 전구체 단백질의 분자량은 75 kDa이다. 내형질 세망 (ER)에서의 자가촉매 절단 후에, PCSK9 프로-도메인은 62 kDa 성숙 PCSK9 단백질로부터 분리된다. 분리된 프로-도메인은 성숙 PCSK9 단백질에 비-공유적으로 결합된 채로 유지되어, PCSK9 촉매 도메인을 불활성 입체형태로 강제하는 프로세그먼트-PCSK9 복합체를 형성한다. 이어서, 절단된 복합체는 ER로부터 골지체로 수송되고 방출된다. 간 세포에서, 분비된 PCSK9는 간세포막 상의 LDL 수용체에 결합한다. 이러한 결합은 PCSK9 촉매 도메인 및 프로도메인과 LDL 수용체의 각각 표피 성장 인자-유사 반복 상동성 도메인-A (EGF-A) 및  $\beta$ -프로펠러 도메인과의 상호작용에 의해 매개된다.
- [0007] LDL 수용체는 전형적으로 세포의 유체 (콜레스테롤 포함) 내의 지방 분자를 세포 내로 수송하여, 순환 LDL 농도를 감소시킨다. PCSK9의 부재시, LDL 수용체-리간드 복합체는 LDL의 세포내 전달 및 LDL 수용체의 세포 표면으로의 재순환을 가능하게 하는 입체형태적 변화를 겪는다. 그러나, LDL 수용체에 대한 PCSK9의 결합은 이러한 복합체의 입체형태적 변화를 방지하고, 분해를 위해 수용체를 리소솜으로 인도한다. 그 결과, 보다 적은 LDL 수용체가 세포 표면 상에 제시되고, 이는 차례로 혈류 내의 순환 LDL 콜레스테롤 수준을 증가시킨다. LDL 수용체 이외에, PCSK9는 초저밀도 지단백질 (VLDL) 수용체, 아포지단백질 E 수용체 2 및 LDL 수용체-관련 단백질 1을 포함한 동일한 패밀리 내의 다른 지질 수용체의 분해를 매개하는 것으로 밝혀졌다.
- [0008] PCSK9는 LDL 수용체 및 아포지단백질 B를 코딩하는 유전자와 함께, 상염색체 우성 형태의 FH에 연관되는 제3 유전자였다. 상염색체 우성 FH에서, PCSK9 유전자 내의 기능-획득 돌연변이는 세포 표면에서 LDL 수용체 국제화를 추가로 감소시키고, 상승된 수준의 LDL 콜레스테롤과 상관관계가 있었다. 흥미롭게도, PCSK9 내의 기능-상실 돌연변이가 보다 낮은 LDL 콜레스테롤 수준 및 유의하게 감소된 심혈관 사건 발생률을 가진 대상체에서 발견되는 것으로 관찰되었다. 또한, PCSK9 기능-상실 환자는 스타틴 요법에 대한 고도의 반응을 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0009] 따라서, PCSK9의 표적화는 심혈관 질환 및 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증의 치료를 위한 유망한 치료 접근법이다. 이 분야에서의 연구는 다수의 치료제를 사용하여 PCSK9와 LDL 수용체와의 상호작용을 억제하는 것에 대해 주로 초점을 맞추어 왔다. 이들 차단 접근법은 알리로쿠마 (REGN727/SAR236553), 에블로쿠마 (AMG 145) 및 보코시주마 (RN316)를 포함하는, PCSK9에 대한 모노클로날 항체의 사용을 포함한다. 그러나, 항체 접근법은 신경인지 부작용 뿐만 아니라 과민 반응 및 면역원성을 포함한 항체 요법에 전형적인 문제를 갖고 있다. 애드벡틴 및 모방체 펩티드를 사용하는 차단 접근법이 또한 탐구되어 왔다. 여태까지, 치료 관점에서 바람직한 PCSK9의 소분자 억제제의 사용은 거의 성공적이지 않았다.
- [0010] 추구된 다른 접근법은 PCSK9 발현의 억제를 포함한다. 이러한 전략은 유전자 발현을 하향조절하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA의 사용을 포함한다. 특히, PCSK9 유전자를 영구적으로 변경시키고 단백질 발현을 녹아웃시키기 위해 유전자 편집 접근법이 또한 추구되어 왔다. 예를 들어, 덩(Ding) 등은 마우스 간에서 PCSK9를 표적화하기 위해 아데노바이러스 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하였으며, 마우스 간에서의 PCSK9의 돌연변이유발 비율은 제3일 내지 제4일에 >50%였고, PCSK9 수준은 감소하였고, 간 LDL 수용체 수준은 증가하였고, 혈장 콜레스테롤 수준은 35%-40% 감소한 것으로 발견되었다 (문헌 [Ding et al. (2014), Circ Res 115(5): 488-492]). 키메라 인간화 간을 갖는  $Fah^{-/-} Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}$  (FRG KO) 마우스를 사용한 왕(Wang) 등에 의한 추가의 연구에서, 인간 PCSK9 유전자를 표적화하는 CRISPR-Cas9를 사용한 치료는 PCSK9의 높은 수준의 온-타겟 돌연변이유발을 유도하여, 혈액 내의 인간 PCSK9 단백질 수준의 52% 감소를 유발하였다 (문헌 [Wang et al. (2016), Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 36: 783-786]). 그러나, 현재 관련 기술분야에는, PCSK9에 초점을 맞춘 인간 유전자 요법에 필요한 인간 간을 포함한 영장류 간에서 유전자를 특이적으로 변형 및/또는 녹아웃시키기 위해 CRISPR/Cas 시스템이 성공적으로 이용될 수 있다는 증거가 명백히 부족하다.
- [0011] I-CreI (서열식별번호(SEQ ID NO): 1)는 조류 클라미도모나스 레인하르티이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 염록체 염색체 내의 22개 염기 쌍 인식 서열을 인식하고 절단하는 귀소 엔도뉴클레아제의 LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 패밀리의 구성원이다. 야생형 I-CreI 절단 부위 선호도를 변형시키기 위해 유전자 선택 기술이 사용되어 왔다 (문헌 [Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames et al. (2005), Nucleic Acids

Res. 33: e178; Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58]). 포유동물, 효모, 식물, 박테리아 및 바이러스 계통 내의 부위를 포함한 광범위-분지성 DNA 부위를 표적화하기 위해 I-CreI 및 다른 귀소 엔도뉴클레아제를 포괄적으로 재설계할 수 있는, 모노-LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 귀소 엔도뉴클레아제를 합리적으로 설계하는 방법이 기재되었다 (WO 2007/047859).

[0012] WO 2009/059195에 최초 기재된 바와 같이, I-CreI 및 그의 조작된 유도체는 통상적으로 이량체이지만, 제1 서브 유닛의 C-말단을 제2 서브유닛의 N-말단에 연결하는 짧은 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 융합될 수 있다 (문헌 [Li et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19]). 따라서, 기능적 "단일쇄" 메가뉴클레아제는 단일 전사체로부터 발현될 수 있다.

[0013] 조작된 메가뉴클레아제의 사용은 PCSK9 유전자를 표적화하고 PCSK9 발현을 감소시켜 콜레스테롤-관련 질환을 갖는 환자에서 순환 LDL 및 총 콜레스테롤 수준을 강하시키는 유망한 접근법일 수 있다.

**발명의 내용**

[0014] 본 발명은 부분적으로 PCSK9 유전자 내의 DNA 서열을 인식하도록 조작된 부위-특이적 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 개발에 의존한다. 본 발명자들은 PCSK9의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있고, 후속적으로 영장류, 예컨대 인간에서의 총 및 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시킬 수 있는 PCSK9 유전자 내의 특이적 인식 서열을 확인하였다.

[0015] 따라서, 본원에 개시된 방법 및 조성물은 대상체에서 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증의 증상을 치료하거나 감소시키는데 유용하다. 따라서, 본 발명은 영장류에서 콜레스테롤-관련 장애에 대한 추가의 유전자 요법 접근법에 대한 관련 기술분야에서의 필요성을 충족시킨다.

[0016] 본 발명은 대상체에서 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증의 치료에 유용한 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 PCSK9 유전자 내의 인식 서열 (서열식별번호: 3)을 인식하고 절단한다. 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제에 의한 이러한 인식 서열에서의 절단은 절단 부위에서의 비-상동 말단 연결 (NHEJ)로 인해 PCSK9의 발현 및/또는 활성을 파괴할 수 있다. NHEJ는 삽입, 결실을 유발할 수 있거나, 또는 유전자 발현을 방해할 수 있는 프레임시프트 돌연변이를 유발할 수 있다. 따라서, 정상 유전자 발현을 방해함으로써, PCSK9 발현 및/또는 활성이 본원에 개시된 방법에 따라 감소 또는 제거될 수 있다. 본 발명은 또한 PCSK9 유전자 내에 위치한 인식 서열에 대한 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제를 이용하는 콜레스테롤-관련 장애의 치료를 위한 제약 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 총 콜레스테롤 및/또는 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키고/거나 콜레스테롤-관련 장애와 연관된 증상을 감소시키기 위해 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 콜레스테롤-관련 장애를 갖는 대상체에게 전달하는 방법을 추가로 제공한다.

[0017] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반-부위에 결합하고, 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하고, 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반-부위에 결합하고, 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 인식 서열은 서열식별번호: 4 (즉, PCS 7-8 인식 서열)를 포함할 수 있다. 인식 서열이 서열식별번호: 4를 포함하는 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 8의 잔기 48, 50, 71 및 73에 상응하는 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 24-79를 포함할 수 있다.

[0019] 인식 서열이 서열식별번호: 4를 포함하는 일부 이런 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 12의 잔기 258에

상응하는 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 215-270을 포함할 수 있다.

- [0020] 인식 서열이 서열식별번호: 4를 포함하는 이러한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 7-153에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 198-344에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 위치에서 D, E, Q, N, K, R 및 S 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 위치에서 D, E, Q, N, K, R 및 S 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 7-153을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 198-344를 포함할 수 있다.
- [0021] 인식 서열이 서열식별번호: 4를 포함하는 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함할 수 있고, 여기서 링커는 제1 서브유닛과 제2 서브유닛을 공유적으로 연결한다. 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 임의의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA일 수 있다.
- [0023] 추가 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 1개 이상의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리시스트론 mRNA일 수 있다. 추가 실시양태에서, 본 발명의 폴리시스트론 mRNA는 본원에 기재된 1개 이상의 조작된 메가뉴클레아제 및 콜레스테롤-관련 장애를 갖는 대상체에서 치료상 유의한 효과를 유도하는 1종 이상의 추가의 단백질을 코딩할 수 있다.
- [0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 구축물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다.
- [0025] 다른 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성한다.
- [0026] 특정한 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 본원에 개시된 임의의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 코딩한다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다. 다른 실시양태에서, 바이러스 벡터는 2개 이상의 카세트를 포함하고, 여기서 각각의 카세트는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0028] 다른 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 1개의 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다.
- [0030] 추가 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 1개의 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성한다.

- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 (a) 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산; 또는 (b) 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 단백질을 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 PCSK9 내의 인식 서열, 예컨대 서열식별번호: 4에 대한 특이성을 갖는 것인 제약 조성물을 제공한다.
- [0032] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제약 조성물의 핵산 서열은 본원에 기재된 mRNA일 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA일 수 있고, 이에 따라 본원에 기재된 2개 이상의 조작된 메가뉴클레아제가 생체내 표적 세포에서 발현된다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 재조합 DNA 구축물을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다.
- [0034] 다른 실시양태에서, 제약 조성물의 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 생체내 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성하고, 이에 따라 표적 세포에서 본원에 기재된 2개 이상의 조작된 메가뉴클레아제가 발현된다.
- [0035] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 AAV일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다.
- [0036] 일부 이러한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다.
- [0037] 다른 이러한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 1개의 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 생체내 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성하고, 이에 따라 표적 세포에서 본원에 기재된 2개 이상의 조작된 메가뉴클레아제가 발현된다.
- [0038] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 서열식별번호: 4를 인식하고 절단하는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 지질 나노입자 내에 캡슐화된 본원에 기재된 1개 이상의 mRNA를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 제약 조성물의 지질 나노입자는 본원에 기재된 2개 이상의 mRNA를 포함할 수 있고, 이들 각각은 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 간에서, 구체적으로 간세포 내에서 전달 및 흡수를 증진시키는 조성을 갖는다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 PCSK9의 발현 또는 활성을 감소시키기 위한 치료 방법을 제공한다. 마찬가지로, 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하거나 또는 콜레스테롤-관련 장애와 연관된 증상의 감소시키는 방법이 본원에 제공된다. 방법은 대상체 내의 표적 세포로 (a) 유효량의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 전달하여, 표적 세포에서 조작된 메가뉴클레아제가 발현되는 것; 또는 (b) 유효량의 조작된 메가뉴클레아제 단백질을 전달하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 PCSK9 내의 인식 서열, 예컨대 서열식별번호: 4에 대한 특이성을 갖는다.
- [0041] 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 콜레스테롤-관련 장애를 갖는다. 구체적 실시양태에서, 대상체는 고콜레스테롤혈증을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체의 고콜레스테롤혈증은 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증이다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 인간 또는 비-인간 영장류이다.
- [0042] 방법의 특정한 실시양태에서, 대상체에게 본원에 개시된 제약 조성물을 투여한다. 제약 조성물은 본원에 개시된 재조합 AAV 벡터를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 본원에 개시된 mRNA를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, mRNA는 지질 나노입자 내에 캡슐화될 수 있다.
- [0043] 방법의 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 표적 간 세포로 전달될 수 있다. 표적 간 세포는 간세포 세포, 예컨대 1차 간세포 세포일 수 있다.
- [0044] 방법의 일부 실시양태에서, 대상체에서 간 세포의 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이는 기준선 LDL 수용

체 수준과 비교할 때 치료에 의해 증가된다. 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이는 기준선 LDL 수용체 수준과 비교할 때 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 150%, 250%, 500%, 1000% 또는 그 초과로 증가될 수 있다.

- [0045] 방법의 특정 실시양태에서, 대상체에서의 총 혈청 콜레스테롤 수준은 치료에 의해 감소된다. 총 혈청 콜레스테롤 수준은 기준선 총 혈청 콜레스테롤 수준과 비교할 때 (a) 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100%, 또는 (b) 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL, 60-80 mg/dL 또는 70-100 mg/dL 만큼 감소될 수 있다.
- [0046] 특정 실시양태에서, 대상체에서의 혈청 LDL 콜레스테롤 수준은 치료에 의해 감소된다. 혈청 LDL 콜레스테롤 수준은 기준선 혈청 LDL 콜레스테롤 수준과 비교할 때 (a) 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100%, 또는 (b) 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL 또는 60-80 mg/dL만큼 감소될 수 있다.
- [0047] 방법의 특정한 실시양태에서, 제1 인식 서열은 서열식별번호: 4를 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 4를 인식하고 절단하는 본 발명의 임의의 조작된 메가뉴클레아제일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0048] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 본 발명은 추가로 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하기 위한, PCSK9의 활성 또는 발현을 감소시키기 위한, 또는 콜레스테롤-관련 장애와 연관된 증상을 감소시키기 위한 의약으로서의 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제의 용도를 제공한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 총 콜레스테롤 수준 및/또는 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 의약으로서의 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제의 용도를 제공한다.
- [0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명은 추가로 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하기 위한, PCSK9의 활성 또는 발현을 감소시키기 위한, 또는 콜레스테롤-관련 장애와 연관된 증상을 감소시키기 위한 의약으로서의 단리된 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공하며, 여기서 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 총 콜레스테롤 수준 및/또는 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 의약으로서의 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공한다.
- [0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 재조합 AAV 벡터를 제공하며, 여기서 재조합 AAV 벡터는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명은 추가로 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하기 위한, PCSK9의 활성 또는 발현을 감소시키기 위한, 또는 콜레스테롤-관련 장애와 연관된 증상을 감소시키기 위한 의약으로서의 재조합 AAV 벡터의 용도를 제공하며, 여기서 재조합 AAV 벡터는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명은 추가로 대상체에서 총 콜레스테롤 수준 및/또는 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 의약으로서의 재조합 AAV 벡터의 용도를 제공하며, 여기서 재조합 AAV 벡터는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0051] 본 발명의 상기 및 다른 측면 및 실시양태는 하기 상세한 설명 및 청구범위를 참조함으로써 보다 완전히 이해될 수 있다. 명확성을 위해 문맥상 개별 실시양태로 기재된 본 발명의 특정 특색은 또한 조합되어 단일 실시양태로 제공될 수 있다. 실시양태의 모든 조합은 구체적으로 본 발명에 포함되며, 마치 각각의 및 모든 조합이 개별적으로 및 명확하게 개시된 것과 같이 본원에 개시된다. 반대로, 간결성을 위해 문맥상 단일 실시양태로 기재된 본 발명의 다양한 특색은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위-조합으로 제공될 수 있다. 실시양태에 열거된 특색의 모든 하위-조합은 또한 구체적으로 본 발명에 포함되며, 마치 각각의 및 모든 이러한 하위-조합이 개별적으로 및 명백하게 본원에 개시된 것과 같이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 본 발명의 각각의 측면의 실시양태는 필요한 변경을 가하여 본 발명의 각각의 다른 측면에 적용된다.

**도면의 간단한 설명**

[0052]

도 1. 인간 PCSK9 유전자 내의 조작된 메가뉴클레아제 인식 서열. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 의해 표적화된 인식 서열은 2개의 인식 절반-부위를 포함한다. 각각의 인식 절반-부위는 9개의 염기 쌍을 포함하고, 2개의 절반-부위는 4개의 염기 쌍 중앙 서열에 의해 분리된다. PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)은 PCS7 및 PCS8로 지칭되는 2개의 인식 절반-부위를 포함한다.

도 2. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 2개의 서브유닛을 포함하고, 여기서 HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 제1 인식 절반-부위 (예를 들어, PCS7)에 결합하고, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 제2 인식 절반-부위 (예를 들어, PCS8)에 결합한다. 조작된 메가뉴클레아제가 단일쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치할 수 있다. 마찬가지로, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치할 수 있다.

도 3. PCS 7-8 인식 서열을 표적화하는 조작된 메가뉴클레아제를 평가하기 위한 CHO (차이니스 햄스터 난소) 세포에서의 리포터 검정의 개략도. 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 위해, 리포터 카세트는 세포의 게놈 내로 안정하게 통합시킨 CHO 세포주를 생산하였다. 리포터 카세트는 5'에서 3' 순서로, SV40 초기 프로모터; 5'에 GFP 유전자의 2/3; 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (예를 들어, PCS 7-8 인식 서열); CHO-23/24 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (WO 2012/167192); 및 3'에 GFP 유전자의 2/3를 포함하였다. 이러한 카세트에 안정하게 형질감염된 세포는 DNA 파괴-유도제의 부재 하에 GFP를 발현하지 않았다. 각각의 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA 또는 mRNA의 형질도입에 의해 메가뉴클레아제를 도입하였다. 메가뉴클레아제 인식 서열 중 어느 하나에서 DNA 파괴를 유도하였을 때, GFP 유전자의 중복된 영역은 서로 재조합되어 기능성 GFP 유전자를 생성하였다. 이어서, 유동 세포측정법에 의해 GFP-발현 세포의 백분율을 메가뉴클레아제에 의한 게놈 절단 빈도의 간접적 척도로서 결정할 수 있었다.

도 4. CHO 세포 리포터 검정에서 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. 서열식별번호: 6-14에 제시된 조작된 메가뉴클레아제를 PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 표적화하도록 조작하고, CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 대해 스크리닝하였다. 제시된 결과는 각각의 검정에서 관찰된 GFP-발현 세포의 백분율을 제공하고, 이는 표적 인식 서열 또는 CHO-23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각각의 메가뉴클레아제의 효능을 나타낸다. 음성 대조군 (bs)을 각각의 검정에 추가로 포함시켰다. 도 4A-4C는 PCS 7-8 인식 서열을 표적화하는 메가뉴클레아제를 보여준다. 도 4A는 PCS 7-8x.88 및 PCS 7-8x.66을 보여준다. 도 4B는 PCS 7-8L.197, PCS 7-8L.204, PCS 7-8L.209, PCS 7-8L.261, PCS 7-8L.262 및 PCS 7-8L.268을 보여준다. 도 4C는 PCS 7-8L.197 및 PCS 7-8L.367을 보여준다.

도 5. CHO 세포 리포터 검정에서 인간 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. 서열식별번호: 6-14에 제시된 조작된 메가뉴클레아제를 PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 표적화하도록 조작하고, 뉴클레오펙션 후 11일에 걸쳐 다중 시점에서 CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 대해 스크리닝하였다. 제시된 결과는 11일의 분석 기간에 걸쳐 각각의 검정에서 관찰된 GFP-발현 세포의 백분율을 제공하고, 이는 시간의 함수로서 표적 인식 서열 또는 CHO-23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각각의 메가뉴클레아제의 효능을 나타낸다. 도 5A는 PCS 7-8 인식 서열을 표적화하는 PCS 7-8x.88 및 PCS 7-8x.66 메가뉴클레아제를 보여준다. 도 5B는 PCS 7-8 인식 서열을 표적화하는 PCS 7-8x.88 및 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제를 보여준다. 도 5C는 PCS 7-8 인식 서열을 표적화하는 PCS 7-8L.367 메가뉴클레아제를 보여준다.

도 6. T7 엔도뉴클레아제 I (T7E) 검정. T7E 검정을 수행하여, PCS 7-8 메가뉴클레아제가 HEK 293 세포 내의 그의 인식 부위에서 삽입결실(indel)을 생성하였는지를 결정하였다. T7E 검정에서, PCS 7-8 유전자좌를 PCS 7-8 인식 서열에 플랭킹된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. PCS 7-8 유전자좌 내에 삽입결실 (무작위 삽입 또는 결실)이 존재하는 경우, 생성된 PCR 생성물은 야생형 대립유전자와 돌연변이체 대립유전자의 혼합물로 이루어질 것이다. PCR 생성물을 변성시키고 천천히 재어닐링되도록 하였다. 느린 재어닐링은 야생형 및 돌연변이체 대립유전자로 이루어진 헤테로듀플렉스가 형성되도록 하여 미스매칭된 염기 및/또는 돌출부를 생성한다. T7E1 효소는 미스매치 부위에서 절단하여 겔 전기영동에 의해 가시화될 수 있는 절단 생성물을 생성한다. 뉴클레오펙션 후 제2일 및 제5일에 PCS 7-8x.88 및 PCS 7-8x.66 메가뉴클레아제를 평가하였다.

도 7. 비-인간 영장류에서의 혈청 PCSK9 단백질 수준. AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH로 지칭되는 AAV 벡터를 제조하고, 3 마리의 수컷 및 1 마리의 암컷 레서스 마카크에게 3개의 상이한 용량으로 투여하였다. 동물 RA1866 (수컷)은  $3 \times 10^{13}$  게놈 카피 (GC)/kg의 단일 용량을 받았다. 동물 RA1857 (수컷)은  $6 \times 10^{12}$  GC/kg의 단일

용량을 받았다. 동물 RA1829 (암컷) 및 RA2334 (수컷)는 각각  $2 \times 10^{12}$  GC/kg의 단일 용량을 받았다. ELISA에 의한 혈청 PCSK9 단백질 수준의 분석을 위해 제-3일, 제0일 및 투여후 제168일 (저용량 동물) 또는 제280일 (중간 및 고용량 동물)까지의 다중 시점에서 혈액 샘플을 수집하였다.

도 8. 총 콜레스테롤, LDL, HDL 및 트리글리세리드의 수준을 제-3일, 제0일 및 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제를 코딩하는 AAV의 투여후 다중 시점에서 측정하였다. 도 8A는 각각의 대상체에서 시간 경과에 따라 측정된 LDL 수준을 보여준다. 도 8B는 대상체 RA1866에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다. 도 8C는 대상체 RA1857에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다. 도 8D는 대상체 RA1829에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다. 도 8E는 대상체 RA2334에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다.

도 9. 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT)의 수준을 각각의 대상체에서 제-3일, 제0일 및 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제를 코딩하는 AAV의 투여후 다중 시점에서 측정하였다.

도 10. 생체내 간 세포에서의 PCS 7-8 인식 서열에서 관찰된 삽입 및 결실 (삽입결실)의 빈도. AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH 벡터의 투여후 제17일에 간 생검을 취하고, PCS 7-8 인식 서열에서의 삽입결실의 존재에 대해 검사하였다. 삽입결실은 인식 서열에 플랭킹된 PCR 프라이머, 계놈의 개재 영역의 증폭, 및 생성된 PCR 생성물의 서열분석을 사용하여 검출하였다.

도 11. 생체내 간 세포에서 PCS 7-8 메가뉴클레아제 mRNA를 검출하기 위한 계내 혼성화. AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH 벡터의 투여후 제17일 및 제129일에 수득된 간 생검을 계내 혼성화 (ISH)에 의해 검사하였다. 형광-표지된 올리고 프로브를 설계하고, 이를 각각의 대상체로부터의 생검 간 세포에서 PCS 7-8x.88 mRNA에 결합시켰다. 도 11A는 올리고 프로브가 없는 대조군으로서 수행된 또 다른 대상체 M11657로부터의 생검 세포의 모의 처리를 보여준다. 도 11B는 대상체 RA1866으로부터의 생검 샘플을 보여준다. 도 11C는 대상체 RA1857로부터의 생검 샘플을 보여준다. 도 11D는 대상체 RA1829로부터의 생검 샘플을 보여준다. 도 11E는 대상체 RA2334로부터의 생검 샘플을 보여준다.

도 12. 비-인간 영장류에서의 혈청 PCSK9 단백질 수준 및 혈청 LDL. AAV8.TBG.PI.PCS7-8L.197.WPRE.bGH로 지칭되는 AAV 벡터를 제조하고, 1 마리의 수컷 및 1 마리의 암컷 레서스 마카크 (대상체 RA2125 및 RA2343)에게  $6 \times 10^{12}$  유전자 카피/kg의 용량으로 투여하였다. ELISA에 의한 혈청 PCSK9 단백질 수준의 분석을 위해 투여전 및 투여후 다중 시점에서 혈액 샘플을 수집하였다.

도 13. 총 콜레스테롤, LDL, HDL 및 트리글리세리드의 수준을 투여전 및 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제를 코딩하는 AAV의 투여후 다중 시점에서 측정하였다. 도 13A는 각각의 대상체에서 시간 경과에 따라 측정된 LDL 수준을 보여준다. 도 13B는 대상체 RA2125에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다. 도 13C는 대상체 RA2343에서의 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드 수준을 보여준다.

도 14. 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT)의 수준을 투여전 및 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제를 코딩하는 AAV의 투여후 다중 시점에서 각각의 대상체에서 측정하였다.

도 15. 생체내 간 세포에서 PCS 7-8 메가뉴클레아제 mRNA를 검출하기 위한 계내 혼성화. AAV8.TBG.PI.PCS7-8L.197.WPRE.bGH 벡터의 투여후 제18일 및 제128일에 수득된 간 생검을 계내 혼성화 (ISH)에 의해 검사하였다. 형광-표지된 올리고 프로브를 설계하고, 이를 각각의 대상체로부터의 생검 간 세포에서 PCS 7-8L.197 mRNA에 결합시켰다. 도 15A는 대상체 RA2125로부터의 생검 샘플을 보여준다. 도 15B는 대상체 RA2343으로부터의 생검 샘플을 보여준다.

도 16. 고정된 멀티플렉스 PCR (AMP-seq)에 의한 각각의 대상체에서의 rhPCSK9 표적화된 유전자좌에 대한 삽입결실 분석.

서열의 간단한 설명

서열식별번호: 1은 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 2는 LAGLIDADG의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 3은 인간 PCSK9 유전자의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 4는 PCS 7-8 인식 서열의 핵산 서열 (센스)을 제시한다.

- 서열식별번호: 5는 PCS 7-8 인식 서열의 핵산 서열 (안티센스)을 제시한다.
- 서열식별번호: 6은 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 7은 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 8은 PCS 7-8L.367 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 9는 PCS 7-8L.204 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 10은 PCS 7-8L.209 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 11은 PCS 7-8L.261 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 12는 PCS 7-8L.262 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 13은 PCS 7-8L.268 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 14는 PCS 7-8x.66 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 15는 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 16은 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 17은 PCS 7-8L.367 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 18은 PCS 7-8L.204 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 19는 PCS 7-8L.209 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 20은 PCS 7-8L.261 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 21은 PCS 7-8L.262 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 22는 PCS 7-8L.268 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 23은 PCS 7-8x.66 메가뉴클레아제 PCS7-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 24는 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 25는 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 26은 PCS 7-8L.367 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 27은 PCS 7-8L.204 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 28은 PCS 7-8L.209 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 29는 PCS 7-8L.261 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 30은 PCS 7-8L.262 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 31은 PCS 7-8L.268 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 32는 PCS 7-8x.66 메가뉴클레아제 PCS8-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 33은 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 34는 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 35는 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 36은 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 37은 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 38은 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 39는 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.
- 서열식별번호: 40은 PCS 7-8x.88을 사용한 처리 후에 생체내 관찰된 삼입결실의 핵산 서열을 제시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0053] 1.1 참고문헌 및 정의
- [0054] 본원에 언급된 특허 및 과학 문헌은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이용가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 허여된 미국 특허, 허여된 출원, 공개된 외국 출원, 및 진뱅크 데이터베이스 서열을 포함한 참고문헌은 각각이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 나타내어지는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.
- [0055] 본 발명은 상이한 형태로 구현될 수 있고, 본원에 제시된 실시양태에 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 이들 실시양태는 본 개시내용이 철저하고 완전하며 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 범주를 완전히 전하도록 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태와 관련하여 예시된 특색은 다른 실시양태에 혼입될 수 있으며, 특정한 실시양태와 관련하여 예시된 특색은 그러한 실시양태로부터 삭제될 수도 있다. 또한, 본 발명에서 벗어나지 않는, 본 개시내용에 비추어 본원에 제안된 실시양태에 대한 수많은 변형 및 부가가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이다.
- [0056] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원의 본 발명의 설명에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하지 않는다.
- [0057] 본원에 언급된 모든 공개물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0058] 본원에 사용된 단수 용어는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포는 단일 세포 또는 다수의 세포를 의미할 수 있다.
- [0059] 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 단어 "또는"은 "어느 하나/또는"의 "배타적" 의미가 아닌 "및/또는"의 "포함적" 의미로 사용된다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "뉴클레아제" 및 "엔도뉴클레아제"는 폴리뉴클레오티드 쇠 내에서 포스포디에스테르 결합을 절단하는 자연-발생 또는 조작된 효소를 지칭하는 것으로 상호교환가능하게 사용된다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "메가뉴클레아제"는 12개 초과와 염기 쌍을 갖는 인식 서열에서 이중-가닥 DNA에 결합하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 바람직하게는, 본 발명의 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열은 22개 염기 쌍이다. 메가뉴클레아제는 I-CreI로부터 유래된 엔도뉴클레아제일 수 있고, 예를 들어 DNA-결합 특이성, DNA 절단 활성, DNA-결합 친화도 또는 이량체화 특성과 관련하여 천연 I-CreI에 비해 변형된 I-CreI의 조작된 변이체를 지칭할 수 있다. I-CreI의 이러한 변형된 변이체의 생산 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, WO 2007/047859). 본원에 사용된 메가뉴클레아제는 이중이량체로서의 이중-가닥 DNA에 결합한다. 메가뉴클레아제는 또한 한 쌍의 DNA-결합 도메인이 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 연결된 "단일쇄 메가뉴클레아제"일 수 있다. 용어 "귀소 엔도뉴클레아제"는 용어 "메가뉴클레아제"와 동의어이다. 본 발명의 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 방법을 사용하여 측정할 때 세포 생존율에 대한 유해한 효과 또는 메가뉴클레아제 절단 활성의 유의한 감소가 관찰되지 않으면서 세포에서 발현될 때 실질적으로 비-독성이다.
- [0062] 본원에 사용된 용어 "단일쇄 메가뉴클레아제"는 링커에 의해 연결된 한 쌍의 뉴클레아제 서브유닛을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 단일쇄 메가뉴클레아제는 N-말단 서브유닛 - 링커 - C-말단 서브유닛의 조직을 갖는다. 2개의 메가뉴클레아제 서브유닛은 일반적으로 아미노산 서열이 동일하지 않을 것이고, 동일하지 않은 DNA 서열을 인식할 것이다. 따라서, 단일쇄 메가뉴클레아제는 전형적으로 유사-회문식 또는 비-회문식 인식 서열을 절단한다. 단일쇄 메가뉴클레아제는 사실상 이량체가 아니지만 "단일쇄 이중이량체" 또는 "단일쇄 이중이량체 메가뉴클레아제"로 지칭될 수 있다. 명확하게 하기 위해, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "메가뉴클레아제"는 이량체 또는 단일쇄 메가뉴클레아제를 지칭할 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "링커"는 2개의 메가뉴클레아제 서브유닛을 단일 폴리펩티드로 연결하는데 사용되는 외인성 펩티드 서열을 지칭한다. 링커는 천연 단백질에서 발견되는 서열을 가질 수 있거나, 또는 어떠한 천연 단백질에서도 발견되지 않는 인공 서열일 수 있다. 링커는 가요성일 수 있고, 2차 구조가 없거나 또는 생리학적 조건 하에 특이적 3차원 구조를 형성하는 성향을 가질 수 있다. 링커는 미국 특허 번호 8,445,251 및 미국 특허 번호 9,434,931에 포괄되는 것들을 비제한적으로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 잔기 154-195를 포함하는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

- [0064] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질과 관련하여, 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 단백질을 코딩하는 핵산, 및 단백질을 발현하는 세포 또는 유기체에 대한 유전 공학 기술의 적용의 결과로서 변경된 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. 핵산과 관련하여, 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 유전 공학 기술의 적용의 결과로서 변경된 핵산 서열을 갖는 것을 의미한다. 유전 공학 기술은 PCR 및 DNA 클로닝 기술; 형질감염, 형질전환 및 다른 유전자 전달 기술; 상동 재조합; 부위-지정 돌연변이유발; 및 유전자 융합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 정의에 따르면, 자연-발생 단백질과 동일한 아미노산 서열을 갖지만 이중 숙주에서의 클로닝 및 발현에 의해 생산된 단백질은 재조합으로 간주되지 않는다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "야생형"은 동일한 유형의 유전자의 대립유전자 집단에서 가장 흔한 자연 발생 대립유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드 서열)를 지칭하며, 야생형 대립유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드는 그의 원래의 기능을 갖는다. 용어 "야생형"은 또한 야생형 대립유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 야생형 대립유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드) 및 폴리펩티드는 야생형 서열(들)에 비해 1종 이상의 돌연변이 및/또는 치환을 포함하는 돌연변이체 또는 변이체 대립유전자 및 폴리펩티드와 구별가능하다. 야생형 대립유전자 또는 폴리펩티드는 유기체에서 정상 표현형을 부여할 수 있는 반면, 돌연변이체 또는 변이체 대립유전자 또는 폴리펩티드는 일부 경우에 변경된 표현형을 부여할 수 있다. 야생형 뉴클레아제는 재조합 또는 비-자연-발생 뉴클레아제와 구별가능하다. 용어 "야생형"은 또한 특정한 유전자의 야생형 대립유전자를 보유하는 세포, 유기체 및/또는 대상체, 또는 비교 목적을 위해 사용되는 세포, 유기체 및/또는 대상체를 지칭할 수 있다.
- [0066] 본원에 사용된 용어 "유전자 변형된"은 세포 또는 유기체 또는 그의 조상에서 게놈 DNA 서열이 재조합 기술에 의해 고의적으로 변형된 것을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "유전자 변형된"은 용어 "트랜스제닉"을 포괄한다.
- [0067] 재조합 단백질과 관련하여 본원에 사용된 용어 "변형"은 참조 서열 (예를 들어, 야생형 또는 천연 서열)에 비해 재조합 서열 내의 아미노산 잔기의 임의의 삽입, 결실 또는 치환을 의미한다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "인식 서열" 또는 "인식 부위"는 엔도뉴클레아제에 의해 결합되고 절단되는 DNA 서열을 지칭한다. 메가뉴클레아제의 경우, 인식 서열은 4개의 염기 쌍에 의해 분리된 한 쌍의 역전된 9개의 염기 쌍 "절반 부위"를 포함한다. 단일쇄 메가뉴클레아제의 경우, 단백질의 N-말단 도메인은 단백질의 제1 절반-부위와 접촉하고, 단백질의 C-말단 도메인은 제2 절반-부위와 접촉한다. 메가뉴클레아제에 의한 절단은 4개의 염기 쌍 3' "오버행"을 생성한다. "오버행" 또는 "점착성 말단"은 이중-가닥 DNA 서열의 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성될 수 있는 짧은 단일-가닥 DNA 절편이다. I-CreI로부터 유래된 메가뉴클레아제 및 단일쇄 메가뉴클레아제의 경우에, 오버행은 22개 염기 쌍 인식 서열의 염기 10-13을 포함한다.
- [0069] 본원에 사용된 용어 "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하는 세포의 염색체 DNA의 영역을 지칭한다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "DNA-결합 친화도" 또는 "결합 친화도"는 메가뉴클레아제가 참조 DNA 분자 (예를 들어, 인식 서열 또는 임의적 서열)와 비-공유적으로 회합되는 경향을 의미한다. 결합 친화도는 해리 상수,  $K_d$ 에 의해 측정된다. 본원에 사용된 바와 같이, 뉴클레아제는 참조 인식 서열에 대한 뉴클레아제의  $K_d$ 가 참조 뉴클레아제에 비해 통계적으로 유의한 ( $p < 0.05$ ) 양만큼 증가 또는 감소되는 경우 "변경된" 결합 친화도를 갖는다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "특이성"은 인식 서열로서 지칭되는 특정한 서열의 염기 쌍에서만 또는 특정한 세트의 인식 서열에서만 이중-가닥 DNA 분자를 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제의 능력을 의미한다. 인식 서열 세트는 특정 보존된 위치 또는 서열 모티프를 공유할 것이지만, 1개 이상의 위치에서 축중성일 수 있다. 고도로 특이적인 메가뉴클레아제는 오직 하나 또는 매우 적은 인식 서열만을 절단할 수 있다. 특이성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 메가뉴클레아제는 생리학적 조건 하에 참조 메가뉴클레아제 (예를 들어, 야생형)에 결합되지 않고 이에 의해 절단되지 않는 인식 서열에 결합하고 이를 절단하는 경우, 또는 인식 서열의 절단 비율이 참조 메가뉴클레아제에 비해 생물학적으로 유의한 양 (예를 들어, 적어도 2x, 또는 2x-10x)만큼 증가 또는 감소되는 경우, "변경된" 특이성을 갖는다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "상동 재조합" 또는 "HR"은 복구 주형으로서 상동 DNA 서열을 사용하여 이중-가닥 DNA-파괴가 복구되는 천연 세포 과정을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976] 참조). 상동 DNA 서열은 세포로 전달되는 내인성 염색체 서열 또는 외인성 핵산일 수 있다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "비-상동 말단-연결" 또는 "NHEJ"는 2개의 비-상동 DNA 절편의 직접적인 연결에 의해 이중-

가닥 DNA-파괴가 복구되는 천연 세포 과정을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976] 참조). 비-상동 말단-연결에 의한 DNA 복구는 오류-유발성이고, 빈번하게 복구 부위에서 DNA 서열의 비-주형 부가 또는 결실을 생성한다. 일부 경우에, 표적 인식 서열에서의 절단은 표적 인식 부위에서 NHEJ를 생성한다. 유전자의 코딩 서열 내의 표적 부위의 뉴클레아제-유도된 절단, 이어서 NHEJ에 의한 DNA 복구는 유전자 기능을 파괴하는 돌연변이, 예컨대 프레임시프트 돌연변이를 코딩 서열 내로 도입할 수 있다. 따라서, 조각된 메가뉴클레아제는 세포 집단에서 유전자를 효과적으로 녹-아웃시키는데 사용될 수 있다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "감소된"은 콜레스테롤-관련 질환의 증상 또는 중증도의 임의의 감소, 또는 PCSK9의 단백질 발현 또는 활성의 임의의 감소를 지칭한다. 임의의 상황에서, 이러한 감소는 최대 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100%일 수 있다. 따라서, 용어 "감소된"은 질환 상태, 단백질 발현, 단백질 활성, 또는 LDL 수용체에 대한 PCSK9 결합의 부분적 감소 및 완전한 감소를 둘 다 포괄한다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "증가된"은 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이의 임의의 증가를 지칭한다. 이러한 증가는 최대 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 150%, 250%, 500%, 1000% 또는 그 초과일 수 있다. 임의의 방법을 사용하여 LDL 수용체의 표면 디스플레이의 증가를 측정할 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "고콜레스테롤혈증"은 콜레스테롤 수준이 바람직한 수준 초과로 상승되는 상태를 지칭한다. 특정 실시양태에서, LDL-콜레스테롤 수준은 바람직한 수준 초과로 상승된다. 특정 실시양태에서, 혈청 LDL-콜레스테롤 수준은 바람직한 수준 초과로 상승된다. 본원에 사용된 용어 "가족성 고콜레스테롤혈증" 또는 "FH"는 혈장 내 저밀도 지단백질 (LDL)-연관 콜레스테롤의 상승된 수준을 특징으로 하는 유전 장애를 지칭한다. 정상 환자에서의 LDL 콜레스테롤 수준 (예를 들어, <130 mg/dL)과 비교하여, 이형접합 및 동형접합 FH 환자에서의 수준은 종종 각각 350-550 mg/dL 및 >600 mg/dL로 상승한다. FH를 갖는 환자 또는 대상체에서 이들 수준의 LDL 콜레스테롤의 상승은 조직 내 콜레스테롤 침착 및 어린 연령에서 심혈관 질환에 대한 증가된 위험을 초래한다.

[0077] 아미노산 서열 및 핵산 서열 둘 다와 관련하여 본원에 사용된 용어 "퍼센트 동일성", "서열 동일성", "백분율 유사성", "서열 유사성" 등은 정렬된 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 사이의 유사성을 최대화하고 동일하거나 유사한 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 총 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 및 서열 정렬에서 갭의 존재 및 길이의 함수인 서열의 정렬에 기초한 2개의 서열의 유사성 정도의 척도를 지칭한다. 표준 파라미터를 사용하여 서열 유사성을 결정하기 위해 다양한 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 본원에 사용된 바와 같이, 서열 유사성은 아미노산 서열에 대한 BLASTp 프로그램 및 핵산 서열에 대한 BLASTn 프로그램을 사용하여 측정되고, 이들은 둘 다 국립 생물공학 정보 센터 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))를 통해 이용가능하며, 예를 들어 문헌 [Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden et al. (1996), Meth. Enzymol.266:131-141; Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402]; Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14]에 기재되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 2개의 아미노산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTp 알고리즘에 대한 하기 파라미터를 기초로 한 스코어이다: 워드 크기=3; 갭 개방 페널티=-11; 갭 연장 페널티=-1; 및 스코어링 매트릭스=BLOSUM62. 본원에 사용된 바와 같이, 2개의 핵산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTn 알고리즘에 대한 하기 파라미터를 기초로 한 스코어이다: 워드 크기=11; 갭 개방 페널티=-5; 갭 연장 페널티=-2; 매치 리워드=1; 및 미스매치 페널티=-3.

[0078] 2개의 단백질 또는 아미노산 서열의 변형과 관련하여 본원에 사용된 용어 "상응하는"은, 2개의 단백질이 표준 서열 정렬 (예를 들어, BLASTp 프로그램을 사용함)을 받을 때, 제1 단백질 내의 특정 변형이 제2 단백질 내의 변형과 동일한 아미노산 잔기의 치환이고, 제1 단백질 내의 아미노산 변형 위치가 제2 단백질 내의 아미노산 변형 위치에 상응하거나 그와 정렬되는 것을 나타내기 위해 사용된다. 따라서, 잔기 X 및 Y가 서열 정렬에서 서로 상응하는 경우, X 및 Y가 상이한 수일 수 있다는 사실에도 불구하고, 제1 단백질 내의 아미노산 "A"에 대한 잔기 "X"의 변형은 제2 단백질 내의 아미노산 "A"에 대한 잔기 "Y"의 변형에 상응할 것이다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "인식 절반-부위", "인식 서열 절반-부위", 또는 간단히 "절반-부위"는 동종이량체 또는 이종이량체 메가뉴클레아제의 단량체에 의해 또는 단일쇄 메가뉴클레아제의 하나의 서브유닛에 의해 인식되는 이중-가닥 DNA 분자 내의 핵산 서열을 의미한다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 비교적 높은 가변성을 갖는 아미노산을 포함하는 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛 내의 국제화된 서열을 지칭한다. 초가변 영역은 약 50-60개의 인접 잔기, 약 53-57개의 인접 잔기, 또는 바람직하게는 약 56개 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역의 잔기는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 위치 24-79 또는 위치 215-270에 상응할 수 있다. 초가변 영역은 인식 서열 내의 DNA 염기와 접촉하고, 단량체 또는 서브유닛의 염기 선호도를 변경시키도록 변형될 수 있는 1개 이상의 잔기를 포함

할 수 있다. 초가변 영역은 또한 메가뉴클레아제가 이중-가닥 DNA 인식 서열과 회합할 때 DNA 백본에 결합하는 1개 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 DNA 백본 및 표적 인식 서열에 대한 메가뉴클레아제의 결합 친화도를 변경시키도록 변형될 수 있다. 본 발명의 상이한 실시양태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내고 염기 선호도 및/또는 DNA-결합 친화도에 영향을 주도록 변형될 수 있는 1-20개의 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 위치 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 및 77 중 하나 이상에 상응한다. 특정 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 또한 서열식별번호: 8의 위치 48, 50, 71 및 73 중 하나 이상에 상응한다. 다른 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 6-14 중 어느 하나의 위치 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 및 268 중 하나 이상에 상응한다. 추가 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 또한 서열식별번호: 12의 잔기 258에 상응할 수 있다.

[0081] 용어 "재조합 DNA 구축물", "재조합 구축물", "발현 카세트", "발현 구축물", "키메라 구축물", "구축물" 및 "재조합 DNA 단편"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 핵산 단편이다. 재조합 구축물은 자연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 코딩 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는 핵산 단편의 인공 조합을 포함한다. 예를 들어, 재조합 DNA 구축물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되고 자연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. 이러한 구축물은 그 자체로 사용될 수 있거나 또는 벡터와 함께 사용될 수 있다.

[0082] 본원에 사용된 "벡터" 또는 "재조합 DNA 벡터"는 주어진 숙주 세포 내의 폴리펩티드-코딩 서열의 전사 및 번역이 가능한 복제 시스템 및 서열을 포함하는 구축물일 수 있다. 벡터가 사용되는 경우, 이때 벡터의 선택은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용될 방법에 좌우된다. 벡터는 플라스미드 벡터 및 재조합 AAV 벡터, 또는 본 발명의 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자를 표적 세포로 전달하는데 적합한 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 벡터를 비제한적으로 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 단리된 뉴클레오티드 또는 핵산 서열 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환, 선택 및 증식시키기 위해 벡터 상에 존재해야 하는 유전 요소를 잘 알고 있다.

[0083] 본원에 사용된 "벡터"는 또한 바이러스 벡터를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV)를 비제한적으로 포함할 수 있다.

[0084] 본원에 사용된 "폴리시스트론" mRNA는 2개 이상의 코딩 서열 (즉, 시스트론)을 포함하고 1개 초과 단백질 코딩하는 단일 메신저 RNA를 지칭한다. 폴리시스트론 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소 및 F2A 요소를 포함하나 이에 제한되지 않는, 동일한 mRNA 분자로부터의 2개 이상의 유전자의 번역을 가능하게 하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 "대조군" 또는 "대조군 세포"는 유전자 변형된 세포의 유전자형 또는 표현형의 변화를 측정하기 위한 기준점을 제공하는 세포를 지칭한다. 대조군 세포는 예를 들어: (a) 야생형 세포, 즉, 유전자 변형된 세포를 생성하는 유전자 변형을 위한 출발 물질과 동일한 유전자형의 야생형 세포; (b) 유전자 변형된 세포와 동일한 유전자형의 세포이지만, 널 구축물로 (즉, 관심 형질에 대해 공지된 효과를 갖지 않는 구축물로) 형질전환된 세포; 또는 (c) 유전자 변형된 세포와 유전적으로 동일하지만 변경된 유전자형 또는 표현형의 발현을 유도하는 조건 또는 자극 또는 추가의 유전자 변형에 노출되지 않은 세포를 포함할 수 있다.

[0086] 2개의 단백질 또는 아미노산 서열의 변형과 관련하여 본원에 사용된 용어 "상응하는"은, 2개의 단백질이 표준 서열 정렬 (예를 들어, BLASTp 프로그램을 사용함)을 받을 때, 제1 단백질 내의 특정 변형이 제2 단백질 내의 변형과 동일한 아미노산 잔기의 치환이고, 제1 단백질 내의 아미노산 변형 위치가 제2 단백질 내의 아미노산 변형 위치에 상응하거나 그와 정렬되는 것을 나타내기 위해 사용된다. 따라서, 잔기 X 및 Y가 서열 정렬에서 서로 상응하는 경우, X 및 Y가 상이한 수일 수 있다는 사실에도 불구하고, 제1 단백질 내의 아미노산 "A"에 대한 잔기 "X"의 변형은 제2 단백질 내의 아미노산 "A"에 대한 잔기 "Y"의 변형에 상응할 것이다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "치료" 또는 "대상체를 치료하는"은 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제, 또는 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을, 혈액에서 순환하는 지방 및/또는 콜레스테롤의 증가된 수준을 특징으로 하는 질환, 예컨대 콜레스테롤-관련 장애를 갖는 대상체에게 투여하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 심혈관 질환, 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증, 고트리글리세리드혈증 및 다른 콜레스테롤-관련 장애를 가질 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발을 방지하고, 증상을 경감시키고, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과를 감소시키고, 질환 진행 속도를 감소시키고, 질환 상태를 호전 또는 완화시키고, 예후를 완화 또는 개선시키는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 질환 및/또는 장애

의 치료는 질환 및/또는 장애의 진행을 변경 (예를 들어, 저속화)시키고, 총 콜레스테롤 및/또는 저밀도 지단백질 (LDL) 콜레스테롤 수준을 감소시키고, 크리글러-나자르 증후군을 개선시키고, 헵시딘 및/또는 혈액색소증 유형 2 기능을 회복시켜 철 흡수를 조절하고, 담즙산 대사를 회복시키고, 가족성 고콜레스테롤혈증에 대한 관상동맥 심장 질환 위험을 감소시키고, 과다각화판 및 각막 혼탁을 예방하여 손 및/또는 발 상의 과다각화판을 치유할 수 있는 것을 지칭한다. 일부 측면에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제 또는 이를 코딩하는 핵산은 본 발명의 제약 조성물의 형태로 치료 동안 투여된다.

[0088] 본원에 사용된 "콜레스테롤-관련 장애"는 하기 중 어느 하나 이상을 포함한다: 고콜레스테롤혈증, 심장 질환, 대사 증후군, 당뇨병, 관상동맥 심장 질환, 졸중, 심혈관 질환, 알츠하이머병, 및 일반적으로 이상지혈증 - 이들은 예를 들어 상승된 총 혈청 콜레스테롤, 상승된 LDL, 상승된 트리글리세리드, 상승된 VLDL 및/또는 저 HDL 에 의해 나타날 수 있다. 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 단독으로 또는 1종 이상의 다른 작용제와 조합으로 사용하여 치료할 수 있는 원발성 및 속발성 이상지혈증의 일부 비제한적 예는 대사 증후군, 당뇨병, 가족성 복합 고지혈증, 가족성 고트리글리세리드혈증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 예를 들어 이형접합 고콜레스테롤혈증, 동형접합 고콜레스테롤혈증, 가족성 결손 아포지단백질 B-100; 다유전자성 고콜레스테롤혈증; 잔유물 제거 질환, 간 리파제 결핍; 식상(dietary indiscretion), 갑상선기능저하증, 에스트로겐 및 프로게스틴 요법, 베타-차단제 및 티아지드 이뇨제를 포함한 약물 중 임의의 것에 속발성인 이상지혈증; 신증후군, 만성 신부전증, 쿠싱 증후군, 원발성 담즙성 간경변증, 글리코겐 축적 질환, 간세포암, 담즙정체, 선단비대증, 인슐린중, 고립성 성장 호르몬 결핍 및 알콜-유발 고트리글리세리드혈증을 포함한다. 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 또한 아테롬성동맥경화성 질환, 예컨대, 예를 들어 관상동맥 심장 질환, 관상 동맥 질환, 말초 동맥 질환, 졸중 (허혈성 및 출혈성), 협심증, 또는 뇌혈관 질환 및 급성 관상동맥 증후군, 심근경색을 예방하거나 치료하는데 유용할 수 있다.

[0089] 용어 "전구단백질 컨버타제 서브틸리신 핵신 유형 9" 또는 "PCSK9"는 PCSK9 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 예컨대 서열식별번호: 3에 제시된 인간 PCSK9 유전자 (및 활성 PCSK9 폴리펩티드를 코딩하는 그의 변이체), 또는 그의 단편, 뿐만 아니라 대립유전자 변이체, 스플라이스 변이체, 유도체 변이체, 치환 변이체, 결실 변이체, 및/또는 N-말단 메티오닌의 부가를 포함한 삽입 변이체, 융합 폴리펩티드, 및 중간 상동체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 폴리펩티드를 지칭한다. 특정 실시양태에서, PCSK9 폴리펩티드는 말단 잔기, 예컨대 비제한적으로 리더 서열 잔기, 표적화 잔기, 아미노 말단 메티오닌 잔기, 리신 잔기, 태그 잔기 및/또는 융합 단백질 잔기를 포함한다. "PCSK9"는 또한 FH3, NARC1, HCHOLA3, 전구단백질 컨버타제 서브틸리신/핵신 유형 9, 및 신경 아포토시스 조절된 컨버타제 1로서 지칭되었다. PCSK9 유전자는 분비 서브틸라제 패밀리의 프로테이나제 K 서브패밀리에 속하는 전구단백질 컨버타제 단백질을 코딩한다. 용어 "PCSK9"는 전구단백질, 및 전구단백질의 자가촉매작용 후에 생성된 생성물 둘 다를 나타낸다. 오직 자가촉매된 생성물만이 언급되는 경우, 단백질은 "성숙", "절단된", "프로세싱된" 또는 "활성" PCSK9로 지칭될 수 있다. 오직 불활성 형태만이 언급되는 경우, 단백질은 "불활성", "전구-형태" 또는 "프로세싱되지 않은" 형태의 PCSK9로 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 용어 PCSK9는 또한 자연 발생 대립유전자, 예컨대 돌연변이 D374Y, S127R 및 F216L을 포함한다. 용어 PCSK9는 또한 PCSK9 아미노산 서열의 번역후 변형을 포함하는 PCSK9 분자, 예컨대 글리코실화된, PEG화된 PCSK9 서열, 신호 서열이 절단된 PCSK9 서열, 프로도메인이 촉매 도메인으로부터 절단되었으나 촉매 도메인으로부터 분리되지는 않은 PCSK9 서열을 포괄한다.

[0090] 용어 "PCSK9 활성"은 PCSK9의 임의의 생물학적 효과를 포함한다. 특정 실시양태에서, PCSK9 활성은 기질 또는 수용체와 상호작용하거나 그에 결합하는 PCSK9의 능력을 포함한다. 일부 실시양태에서, PCSK9 활성은 LDL 수용체 (LDLR)에 결합하는 PCSK9의 능력에 의해 나타난다. 일부 실시양태에서, PCSK9는 LDLR에 결합하여 그를 수반하는 반응을 촉매한다. 예를 들어, PCSK9 활성은 LDLR의 이용률을 변경시키는 (예를 들어, 감소시키는) PCSK9의 능력을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, PCSK9 활성은 대상체에서 LDL의 양을 증가시키는 PCSK9의 능력을 포함한다. 특정한 실시양태에서, PCSK9 활성은 LDL에 결합하는데 이용가능한 LDLR의 양을 감소시키는 PCSK9의 능력을 포함한다. 따라서, PCSK9 활성을 감소시킴으로써, 표면 상에 디스플레이되고 대상체에서 LDL을 발견할 수 있는 LDLR의 양이 증가된다. 일부 실시양태에서, "PCSK9 활성"은 PCSK9 신호전달로부터 생성되는 임의의 생물학적 활성을 포함한다. 예시적인 활성은 LDLR에 대한 PCSK9 결합, LDLR 또는 다른 단백질을 절단하는 PCSK9 효소 활성, PCSK9 작용을 용이하게 하는 LDLR 이외의 단백질에 대한 PCSK9 결합, APOB 분비를 변경시키는 PCSK9 (문헌 [Sun et al. (2005), Human Molecular Genetics 14: 1161-1169] 및 [Ouguerram et al. (2004), Arterioscler thromb Vasc Biol. 24: 1448-1453]), 간 재생 및 뉴런 세포 분화에서 PCSK9의 역할 (문헌 [Seidah et al., PNAS 100: 928-933, 2003]), 및 간 글루코스 대사에서 PCSK9의 역할 (문헌 [Costet et al.

(2006), J. Biol. Chem. 281(10):6211-18])을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0091] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 유익한 또는 바람직한 생물학적 및/또는 임상 결과의 달성에 충분한 양을 지칭한다. 치료 유효량은 메가뉴클레아제 제제 또는 조성물, 질환 및 그의 중증도, 및 치료될 대상체의 연령, 체중, 신체 상태 및 반응성에 따라 달라질 것이다. 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 또는 제약 조성물의 유효량은 대상체에서 총 콜레스테롤 또는 LDL 콜레스테롤 (즉, 혈청 LDL)의 수준을 감소 시킴으로써, 고콜레스테롤혈증 또는 다른 콜레스테롤-관련 장애 및/또는 이상지혈증, 아테롬성동맥경화증, 심혈관 질환 (CVD) 또는 관상동맥 심장 질환의 적어도 1종의 증상을 치료 또는 예방한다.
- [0092] 용어 "지질 나노입자"는 10 내지 1000 나노미터의 평균 직경을 갖는 전형적으로 구형 구조를 갖는 지질 조성물을 지칭한다. 일부 제제에서, 지질 나노입자는 적어도 1종의 양이온성 지질, 적어도 1종의 비-양이온성 지질, 및 적어도 1종의 접합된 지질을 포함할 수 있다. 핵산, 예컨대 mRNA를 캡슐화하기에 적합한 관련 기술분야에 공지된 지질 나노입자가 본 발명에서 사용하기 위해 고려된다.
- [0093] 본원에 사용된 바와 같이, 변수에 대한 수치 범위의 설명은 본 발명이 그 범위 내의 어떤 값과 동일한 변수로 수행될 수 있다는 것을 전하도록 의도된다. 따라서, 본질적으로 이산 변수의 경우, 변수는 범위의 중점을 포함한 수치 범위 내의 임의의 정수 값과 동일할 수 있다. 유사하게, 본질적으로 연속 변수의 경우, 변수는 범위의 중점을 포함한 수치 범위 내의 임의의 실수 값과 동일할 수 있다. 예로서, 및 비제한적으로, 0 내지 2의 값을 갖는 것으로 기재된 변수는 변수가 본질적으로 이산 변수이면 값 0, 1 또는 2를 취할 수 있고, 변수가 본질적으로 연속 변수이면 값 0.0, 0.1, 0.01, 0.001, 또는  $\geq 0$  및  $\leq 2$ 의 임의의 다른 실수 값을 취할 수 있다.
- [0094] 2.1 본 발명의 원리
- [0095] 본 발명은, 부분적으로, PCSK9의 발현을 감소시켜 혈액으로부터 지방 및/또는 콜레스테롤의 제거를 증가시키기 위해 조작된 메가뉴클레아제가 사용될 수 있다는 가설을 기초로 한다. PCSK9의 발현을 감소시키는 것은 세포 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이를 증가시켜 혈류로부터의 지질의 제거를 증가시킬 수 있다. 따라서, PCSK9 유전자 내의 인식 서열에 특이적인 조작된 메가뉴클레아제를 전달함으로써, PCSK9의 발현이 감소될 수 있고, 이는 후속적으로 대상체의 혈액 내의 총 콜레스테롤 (예를 들어, 혈청 LDL)을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법 및 조성물은 적절한 대조군에서의 PCSK9 발현의 수준과 비교하여 PCSK9 발현의 증가에 의해 야기되는 콜레스테롤-관련 장애를 치료하는데 특정한 용도가 발견된다.
- [0096] 따라서, 본 발명은 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 포괄한다. 본 발명은 또한 제약 조성물에서 및 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법에서 이러한 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 방법을 포괄한다. 추가로, 본 발명은 조작된 메가뉴클레아제 단백질 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 포함하는 제약 조성물, 및 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 고콜레스테롤혈증의 치료를 위한 이러한 조성물의 용도를 포괄한다.
- [0097] 2.2 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 인식하고 절단하기 위한 메가뉴클레아제
- [0098] 부위-특이적 뉴클레아제는 PCSK9 유전자에 파괴를 도입하는데 사용될 수 있고, 이러한 파괴의 복구는 활성 PCSK9 유전자가 더 이상 발현되지 않도록 NHEJ를 통한 유전자의 영구적 변형을 유발할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 조작된 재조합 메가뉴클레아제를 사용하여 실시될 수 있다.
- [0099] 바람직한 실시양태에서, 본 발명을 실시하기 위해 사용되는 뉴클레아제는 단일쇄 메가뉴클레아제이다. 단일쇄 메가뉴클레아제는 링커 펩티드에 의해 연결된 N-말단 서브유닛 및 C-말단 서브유닛을 포함한다. 각각의 2개의 도메인은 인식 서열의 절반 (즉, 인식 절반-부위)을 인식하고, DNA 절단 부위는 2개의 서브유닛의 계면 근처의 인식 서열의 중간에 있다. DNA 가닥 파괴는 메가뉴클레아제에 의한 DNA 절단이 한 쌍의 4개의 염기 쌍, 3' 단말-가닥 오버행을 생성하도록 4개의 염기 쌍에 의해 오프셋된다.
- [0100] 일부 예에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 인식하고 절단하도록 조작되었다. PCS 7-8 인식 서열은 서열식별번호: 3에 제시된 PCSK9 유전자 내에 위치한다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제는 집합적으로 본원에서 "PCS 7-8 메가뉴클레아제"로 지칭된다. 예시적인 PCS 7-8 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 6-14에 제공된다.
- [0101] 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하는 제1 서브유닛, 및 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함하는 제2 서브유닛을 포함한다. 추가로, 제1 서브유닛은 인식 서열 내의 제1 인식 절반-부위 (예를 들어, PCS7 절반-부위)에 결합하고, 제2 서브유닛은 인식 서열 내의 제2 인식 절반-부위 (예를 들어, PCS7 절반

-부위)에 결합한다. 조작된 메가뉴클레아제가 단일쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, 제1 및 제2 서브유닛은, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위에 결합하는 제1 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치하고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위에 결합하는 제2 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치하도록 배향될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 제1 및 제2 서브유닛은, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반-부위에 결합하는 제1 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치하고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반-부위에 결합하는 제2 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치하도록 배향될 수 있다. 본 발명의 예시적인 PCS 7-8 메가뉴클레아제가 표 1에 제공된다.

[0102] 표 1. PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 인식하고 절단하도록 조작된 예시적인 조작된 메가뉴클레아제

메가뉴클레아제	AA SEQ ID	PCS7 서브유닛 잔기	PCS7 서브유닛 SEQ ID	*PCS7 서브유닛 %	PCS8 서브유닛 잔기	PCS8 서브유닛 SEQ ID	*PCS8 서브유닛 %
PCS 7-8L.197	6	7-153	15	100	198-344	24	100
PCS 7-8x.88	7	7-153	16	98.64	198-344	25	99.32
PCS 7-8L.367	8	7-153	17	95.92	198-344	26	100
PCS 7-8L.204	9	7-153	18	98.64	198-344	27	99.32
PCS 7-8L.209	10	7-153	19	99.32	198-344	28	100
PCS 7-8L.261	11	7-153	20	98.64	198-344	29	98.64
PCS 7-8L.262	12	7-153	21	98.64	198-344	30	98.64
PCS 7-8L.268	13	7-153	22	99.32	198-344	31	100
PCS 7-8x.66	14	7-153	23	93.2	198-344	32	99.32

[0103] \*"PCS7 서브유닛 %" 및 "PCS8 서브유닛 %"는 각각의 메가뉴클레아제의 PCS7-결합 및 PCS8-결합 서브유닛 영역과 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제의 각각 PCS7-결합 및 PCS8-결합 서브유닛 영역 사이의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0105] 2.3 엔도뉴클레아제의 전달 및 발현 방법

[0106] 대상체에서 고콜레스테롤혈증 및 심혈관 질환을 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 마찬가지로, 제약상 허용되는 담체 및 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 (또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산)를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 고콜레스테롤혈증 및 심혈관 질환의 증상을 감소시키는 방법이 제공된다. 추가로, 대상체 내의 표적 세포로 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 전달하는 것을 포함하는, 대상체에서 PCSK9의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 방법에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 표적 세포로 전달되고/거나 표적 세포에서 DNA/RNA로부터 발현될 수 있다.

[0107] 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 세포 내로 단백질 형태로 또는 바람직하게는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산으로서 전달될 수 있다. 이러한 핵산은 DNA (예를 들어, 원형 또는 선형화된 플라스미드 DNA 또는 PCR 생성물) 또는 RNA (예를 들어, mRNA) 일 수 있다. 조작된 메가뉴클레아제 코딩 서열이 DNA 형태로 전달되는 실시양태의 경우, 이는 뉴클레아제 유전자의 전사를 용이하게 하기 위해 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 본 발명에 적합한 포유동물 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 시토메갈로바이러스 초기 (CMV) 프로모터 (문헌 [Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA, 81(3):659-63]) 또는 SV40 초기 프로모터 (문헌 [Benoist and Chambon (1981), Nature 290(5804):304-10]) 뿐만 아니라 유도성 프로모터, 예컨대 테트라시클린-유도성 프로모터 (문헌 [Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45])를 포함한다. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 또한 합성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 합성 프로모터는 JeT 프로모터 (WO 2002/012514)를 비제한적으로 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 간-특이적 프로모터 또는 간세포-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 간-특이적 프로모터의 예는 인간 알파-1 항트립신 프로모터, 하이브리드 간-특이적 프로모터 (ApoE 유전자로부터의 간 유전자좌 제어 영역 (ApoE-HCR) 및 간-특이적 알파-1-항트립신 프로모터), 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 및 아포지단백질 A-II 프로모터를 비제한적으로 포함한다.

[0108] 구체적 실시양태에서, 적어도 1종의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 재조합 DNA 구축물 또는 발현 카세트 상에서 전달된다. 예를 들어, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트 (즉, "카세트")를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 2개 이상의 카세트를 포함하고, 여기서 각각의 카세트는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 2개의 카세트, 3개의 카세트, 4개 또는 그 초과 카세트를 포함할 수 있다.

[0109] 다른 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함하고,

여기서 프로모터는 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 본원에 기재된 폴리시스트론 mRNA를 생성한다.

- [0110] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA가 세포로 전달되며, 이는 이것이 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자가 세포의 게놈 내로 통합될 가능성을 감소시킬 것이기 때문이다. 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 이러한 mRNA는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 시험관내 전사를 사용하여 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 7-메틸-구아노신, ARCA, 클린캡을 사용하여 캡핑되거나, 또는 백시니아 캡핑 효소 또는 유사한 것을 사용하여 효소적으로 캡핑된다. 일부 실시양태에서, mRNA는 폴리아데닐화될 수 있다. mRNA는 코딩된 조작된 메가뉴클레아제의 발현 및/또는 mRNA 자체의 안정성을 증진시키기 위해 다양한 5' 및 3' 비번역 서열 요소를 함유할 수 있다. mRNA는 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 슈도우리딘, 5-메틸시티딘, N6-메틸아데노신, 5-메틸우리딘 또는 2-티오우리딘을 함유할 수 있다.
- [0111] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 세포에서 동시에 발현되는 2개 이상의 뉴클레아제를 코딩하는 폴리시스트론 mRNA일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리시스트론 mRNA는 본원에 기재된 2개 이상의 메가뉴클레아제 및 세포에서 치료상 유의한 효과를 유도하는 적어도 1종의 추가의 단백질을 코딩할 수 있다. 본 발명의 폴리시스트론 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소 및 F2A 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 동일한 mRNA 분자로부터의 2개 이상의 유전자의 번역을 가능하게 하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 폴리시스트론 mRNA는 본원에 기재된 2개의 메가뉴클레아제를 코딩하는 비시스트론 mRNA, 본원에 기재된 3개의 메가뉴클레아제를 코딩하는 트리시스트론 mRNA이다.
- [0112] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 단일-가닥 DNA 주형으로서 표적 세포로 전달될 수 있다. 단일-가닥 DNA는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' AAV 역전된 말단 반복부 (ITR)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 단일-가닥 DNA는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' 상동성 아암을 추가로 포함할 수 있다.
- [0113] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자는 선형화된 DNA 주형으로서 표적 세포로 전달될 수 있다. 일부 예에서, 엔도뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA는 원형 플라스미드 DNA가 표적 세포로의 전달 전에 선형화되도록 1종 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.
- [0114] 정제된 뉴클레아제 단백질은 본원 하기에 추가로 상술되는 것을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 다양한 상이한 메카니즘에 의해 게놈 DNA를 절단하기 위해 세포로 전달될 수 있다.
- [0115] 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제의 전달을 위한 표적 조직(들)은 간의 세포, 예컨대 간세포 세포 또는 바람직하게는 1차 간세포, 보다 바람직하게는 인간 간세포 또는 인간 1차 간세포, HepG2.2.15 또는 HepG2-hNTCP 세포를 비제한적으로 포함한다. 특정한 실시양태에서, 세포는 영장류 간세포, 예컨대 영장류 1차 간세포의 세포이다. 논의된 바와 같이, 본 발명의 메가뉴클레아제는 정제된 단백질로서 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 RNA 또는 DNA로서 전달될 수 있다. 한 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 엔도뉴클레아제를 코딩하는 mRNA 또는 DNA 벡터는 표적 조직에의 직접 주사를 통해 표적 세포 (예를 들어, 간 내의 세포)로 공급된다. 대안적으로, 메가뉴클레아제 단백질, mRNA 또는 DNA는 순환계를 통해 전신 전달될 수 있다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 공지된 기술에 따라 제약상 허용되는 담체 중에 전신 투여 또는 표적 조직에의 투여를 위해 제제화된다. 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21<sup>st</sup> ed. 2005)]을 참조한다. 본 발명에 따른 제약 제제의 제조에서, 단백질/RNA/mRNA는 전형적으로 제약상 허용되는 담체와 혼합된다. 담체는, 당연히, 제제 중의 임의의 다른 성분과 혼화성인 관점에서 허용되어야 하며 환자에게 유해하지 않아야 한다. 담체는 고체 또는 액체 또는 둘 다일 수 있고, 단위-용량 제제로서 화합물과 함께 제제화될 수 있다.
- [0117] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 세포 관통 펩티드 또는 표적화 리간드에 커플링되어 세포 흡수를 용이하게 한다. 관련 기술분야에 공지된 세포 관통 펩티드의 예는 폴리-아르기닌 (문헌 [Jearawiriyapaisarn et al. (2008), Mol Ther. 16:1624-9]), HIV 바이러스로부터의 TAT 펩티드 (문헌 [Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736]), MPG (문헌 [Simeoni et al. (2003), Nucleic Acids Res. 31:2717-2724]), Pep-1 (문헌 [Deshayes et al. (2004), Biochemistry 43: 7698-7706]), 및 HSV-1 VP-22 (문헌 [Deshayes et al. (2005), Cell Mol Life Sci. 62:1839-49])를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 표적 세포 상에서 발현되는 특

이적 세포-표면 수용체를 인식하는 항체에 공유적으로 또는 비-공유적으로 커플링되어, 메가뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA가 표적 세포에 결합하고 그에 의해 내재화된다. 대안적으로, 메가뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA는 이러한 세포-표면 수용체에 대한 천연 리간드 (또는 천연 리간드의 일부분)에 공유적으로 또는 비-공유적으로 커플링될 수 있다. (문헌 [McCall et al. (2014), Tissue Barriers 2(4):e944449; Dinda et al. (2013), Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang et al. (2014), Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30; Qian et al. (2014), Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10(11):1491-508]).

- [0118] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 간의 목적하는 영역 내의 주사 또는 이식을 위해 생분해성 히드로겔 내에 캡슐화된다. 히드로겔은 빈번한 주사를 필요로 하지 않으면서 표적 조직의 목적하는 영역에 치료 페이로드의 지속적이고 조정가능한 방출을 제공할 수 있고, 자극-반응성 물질 (예를 들어, 온도- 및 pH-반응성 히드로겔)은 환경 또는 외부적으로 가해진 신호에 반응하여 페이로드를 방출하도록 설계될 수 있다 (문헌 [Kang Derwent et al. (2008), Trans Am Ophthalmol Soc. 106:206-214]).
- [0119] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 공유적으로 또는 바람직하게는 비-공유적으로 나노입자에 커플링되거나 또는 이러한 나노입자 내에 캡슐화된다 (문헌 [Sharma et al. (2014), Biomed Res Int. 2014:327950]). 나노입자는 길이 규모가 <math>< 1 \mu\text{m}</math>, 바람직하게는 <math>< 100 \text{ nm}</math>인 나노규모 전달 시스템이다. 이러한 나노입자는 금속, 지질, 중합체 또는 생물학적 거대분자로 구성된 코어를 사용하여 설계될 수 있고, 메가뉴클레아제 단백질, mRNA 또는 DNA의 다중 카피는 나노입자 코어에 부착되거나 캡슐화될 수 있다. 이는 각각의 세포로 전달되는 단백질/mRNA/DNA의 카피수를 증가시키고, 따라서 각각의 메가뉴클레아제의 세포내 발현을 증가시켜 표적 인식 서열이 절단될 가능성을 최대화한다. 이러한 나노 입자의 표면은 중합체 또는 지질 (예를 들어, 키토산, 양이온성 중합체 또는 양이온성 지질)을 사용하여 추가로 변형되어, 그 표면이 페이로드의 세포 전달 및 흡수를 증진시키는 추가의 가능성을 부여하는 코어-셸 나노입자를 형성할 수 있다 (문헌 [Jian et al. (2012), Biomaterials 33(30): 7621-30]). 추가적으로 유리하게는 나노입자를 표적화 분자에 커플링시켜 나노입자를 적절한 세포 유형으로 인도하고/거나 세포 흡수 가능성을 증가시킬 수 있다. 이러한 표적화 분자의 예는 세포-표면 수용체에 대해 특이적인 항체 및 세포 표면 수용체에 대한 천연 리간드 (또는 천연 리간드의 부분)를 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 리포솜 내에 캡슐화되거나 양이온성 지질을 사용하여 복합체화된다 (예를 들어, 문헌 [LIPOFECTAMINE transfection reagent, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA]; [Zuris et al. (2015), Nat Biotechnol 33: 73-80]; [Mishra et al. (2011), J Drug Deliv. 2011:863734] 참조). 리포솜 및 리포플렉스 제제는 페이로드를 분해로부터 보호하고, 표적 부위에서의 축적 및 보유를 증진시키고, 표적 세포의 세포 막과의 융합 및/또는 파괴를 통해 세포 흡수 및 전달 효율을 용이하게 할 수 있다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 중합체 스캐폴드 (예를 들어, PLGA) 내에 캡슐화되거나 또는 양이온성 중합체 (예를 들어, PEI, PLL)를 사용하여 복합체화된다 (문헌 [Tamboli et al. (2011), Ther Deliv 2(4): 523-536]). 중합체 담체는 중합체 침식 및 약물 확산의 제어를 통해 조정가능한 약물 방출 속도를 제공하도록 설계될 수 있고, 높은 약물 캡슐화 효율은 목적하는 표적 세포 집단으로의 세포내 전달까지 치료 페이로드의 보호를 제공할 수 있다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 미셀로 자기-조립되는 친양쪽성 분자와 조합된다 (문헌 [Tong et al. (2007), J Gene Med 9(11): 956-66]). 중합체 미셀은 응집을 방지하고, 전하 상호작용을 차폐하고, 비특이적 상호작용을 감소시킬 수 있는 친수성 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌글리콜)로 형성된 미셀 셸을 포함할 수 있다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 표적 세포에 투여 및/또는 전달하기 위해 에멀전 또는 나노에멀전 (즉, 평균 입자 직경이 <math>< 1\text{nm}</math>인 것)으로 제제화된다. 용어 "에멀전"은 수불혼화성 상이 수성 상과 혼합될 때 비극성 잔기 (예를 들어, 긴 탄화수소 쇄)를 물로부터 떨어지게, 그리고 극성 머리 기를 물을 향해 구동하는 소수성 힘의 결과로서 형성될 수 있는 지질 구조를 포함한, 임의의 수중유, 유중수, 수중유중수 또는 유중수중유 분산액 또는 액적을 비제한적으로 지칭한다. 이들 다른 지질 구조는 단층, 포시라멜라(paucilamellar) 및 다층 지질 소포, 미셀, 및 라멜라 상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 에멀전은 수성 상 및 친지성 상 (전형적으로 오일 및 유기 용매를 함유함)으로 구성된다. 에멀전은 또한 빈번하게 1종 이상의 계면활성제를 함유한다. 나노에멀전 제제는, 예를 들어 미국 특허 출원 번호 2002/0045667 및 2004/0043041, 및 미국 특허 번호 6,015,832, 6,506,803, 6,635,676 및 6,559,189에 기재된

바와 같이 널리 공지되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0124] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 다기능성 중합체 접합체, DNA 덴드리머 및 중합체 덴드리머에 공유적으로 부착되거나 또는 비-공유적으로 회합된다 (문헌 [Mastorakos et al. (2015), *Nanoscale* 7(9): 3845-56]; [Cheng et al. (2008), *J Pharm Sci* 97(1): 123-43])). 덴드리머 생성은 페이로드 용량 및 크기를 제어할 수 있고, 높은 약물 페이로드 용량을 제공할 수 있다. 또한, 다중 표면 기의 디스플레이는 안정성을 개선시키고, 비특이적 상호작용을 감소시키고, 세포-특이적 표적화 및 약물 방출을 증진시키도록 영향을 줄 수 있다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자는 바이러스 벡터를 사용하여 전달된다. 이러한 벡터는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터를 포함한다 (문헌 [Vannucci et al. (2013), *New Microbiol* 36:1-22]에서 검토됨). 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 표적 조직 (예를 들어, 간 조직)으로 직접 주사된다. 대안적 실시양태에서, 바이러스 벡터는 순환계를 통해 전신 전달된다. 상이한 AAV 벡터가 상이한 조직에 국제화되는 성향이 있다는 것은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 간 표적 조직에서, 간세포의 효과적인 형질도입은, 예를 들어 AAV 혈청형 2, 8 및 9에서 밝혀졌다 (문헌 [Sands (2011), *Methods Mol Biol* 807:141-157]; 국제 출원 공개 번호 WO 2003/052051). AAV 벡터는 또한 이들이 숙주 세포에서 제2-가닥 DNA 합성을 필요로 하지 않도록 자기-상보적일 수 있다 (문헌 [McCarty et al. (2001), *Gene Ther* 8:1248-54])).
- [0126] 한 실시양태에서, 엔도뉴클레아제 유전자 전달을 위해 사용되는 바이러스 벡터는 자기-제한 바이러스 벡터이다. 자기-제한 바이러스 벡터는 벡터 내 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열의 존재로 인해 세포 또는 유기체에서 제한된 지속 시간을 가질 수 있다. 따라서, 자기-제한 바이러스 벡터는 프로모터, 본원에 기재된 엔도뉴클레아제, 및 ITR 내의 엔도뉴클레아제 인식 부위를 코딩하는 것을 제공하도록 조작될 수 있다. 자기-제한 바이러스 벡터는 엔도뉴클레아제 유전자를 세포, 조직 또는 유기체로 전달하여, 엔도뉴클레아제가 발현되고, 게놈 내의 내인성 인식 서열에서 세포의 게놈을 절단할 수 있도록 한다. 전달된 엔도뉴클레아제는 또한 자기-제한 바이러스 벡터 자체 내에서 그 표적 부위를 발견하고, 이 표적 부위에서 벡터를 절단할 것이다. 일단 절단되면, 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단이 엑소뉴클레아제에 노출되고 그에 의해 분해될 것이며, 따라서 바이러스를 사멸시키고, 엔도뉴클레아제의 생산을 중단시킬 것이다.
- [0127] 엔도뉴클레아제 유전자가 DNA 형태 (예를 들어, 플라스미드)로 및/또는 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV)를 통해 전달되는 경우, 이는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 바이러스 프로모터, 예컨대 바이러스 벡터로부터의 내인성 프로모터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터의 LTR) 또는 널리 공지된 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 메가뉴클레아제 유전자는 표적 세포에서 우선적으로 유전자 발현을 구동하는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 간-특이적 프로모터의 예는 인간 알파-1 항트립신 프로모터, 하이브리드 간-특이적 프로모터 (ApoE 유전자로부터의 간 유전자좌 제어 영역 (ApoE-HCR) 및 간-특이적 알파-1-항트립신 프로모터), 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 및 아포지단백질 A-II 프로모터를 비제한적으로 포함한다.
- [0128] 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카세트를 포함한다. 바이러스 벡터는 또한 2개 이상의 카세트를 포함할 수 있고, 여기서 각각의 카세트는 프로모터 및 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 프로모터 및 폴리시스트론 핵산 서열을 포함하는 1개의 카세트를 포함하고, 여기서 프로모터는 표적 세포에서 폴리시스트론 핵산 서열의 발현을 구동하여 폴리시스트론 mRNA, 예컨대 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리시스트론 mRNA를 생성한다.
- [0129] 본원에 개시된 메가뉴클레아제를 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체의 간에 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 한 실시양태에서, 포유동물로부터 제거된 천연 간세포는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 벡터로 형질도입될 수 있다. 대안적으로, 대상체의 천연 간세포는 조작된 메가뉴클레아제 및/또는 간 재생을 자극하는 분자, 예컨대 간독소를 코딩하는 아데노바이러스 벡터로 생체외에서 형질도입될 수 있다. 바람직하게는, 간독소는 uPA이고, 이는 바이러스 벡터에 의해 발현되면 간세포로부터 그의 분비를 억제하도록 변형되었다. 또 다른 실시양태에서, 벡터는 tPA를 코딩하고, 이는 신생 간세포 재생을 자극할 수 있다. 이어서, 포유동물로부터 제거된 형질도입된 간세포는, 조작된 메가뉴클레아제의 발현에 도움이 되는 조건이 제공되는 포유동물로 복귀될 수 있다. 전형적으로, 형질도입된 간세포는 비장 또는 문맥 혈관계를 통한 주입에 의해 환자로 복귀될 수 있고, 투여는 1일 내지 5일 또는 그 초과 기간에 걸쳐 단일

또는 다중일 수 있다.

- [0130] 본 발명의 방법의 생체내 측면에서, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하고 대상체에게 투여되는 레트로바이러스, 유사형 또는 아데노바이러스 연관 벡터가 구축된다. 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 벡터의 투여는 분비-손상된 간독소를 코딩하거나 또는 tPA를 코딩하는 아데노바이러스 벡터의 투여와 함께 이루어질 수 있고, 이는 간독소로서 작용하지 않으면서 간세포 재생을 자극한다.
- [0131] 적절한 용량은 다른 인자 중에서도, 사용되는 리포솜 제제, 선택된 임의의 AAV 벡터의 특이성 (예를 들어, 혈청형 등), 투여 경로, 치료되는 대상체 (즉, 대상체의 연령, 체중, 성별 및 일반적인 상태), 및 투여 방식에 좌우될 것이다. 따라서, 적절한 투여량은 환자에 따라 상이할 수 있다. 적절한 유효량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여 치료는 단일 용량 스케줄 또는 다중 용량 스케줄일 수 있다. 또한, 대상체에게 적절한 만큼의 많은 용량이 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 적절한 수의 용량을 용이하게 결정할 수 있다. 그러나, 투여량은 대체 투여 경로, 또는 임의의 부작용에 대한 치료 이익의 균형을 고려하여 조정될 필요가 있을 수 있다.
- [0132] 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제, 또는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체에게 전달하는 것은 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 치료하거나 그의 증중도를 감소시킬 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체에게 전달하는 것은 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증의 적어도 1종의 증상을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 유효량으로 대상체에게 전달된다. 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 또는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산이 전달되는 대상체는 임의의 포유동물일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 가축 동물 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 비-인간 영장류 또는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 콜레스테롤-관련 장애를 갖는다. 예를 들어, 대상체는 고콜레스테롤혈증, 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증을 가질 수 있다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 170 mg/dL 또는 200 mg/dL 초과, 예컨대 170-200 mg/dL 또는 200-250 mg/dL, 200-300 mg/dL, 200-350 mg/dL, 200-400 mg/dL, 200-450 mg/dL, 200-500 mg/dL 또는 200-600 mg/dL의 총 콜레스테롤 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 110 mg/dL 초과 또는 130 mg/dL 초과, 예컨대 110-120 mg/dL, 110-130 mg/dL, 130-150 mg/dL, 130-180 mg/dL, 130-200 mg/dL, 130-250 mg/dL, 130-300 mg/dL, 130-350 mg/dL, 130-400 mg/dL, 130-450 mg/dL, 130-500 mg/dL 또는 130-600 mg/dL의 LDL 콜레스테롤 수준을 갖는다.
- [0133] 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 메가뉴클레아제 또는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체에게 전달하는 것은 PCSK9의 발현을 감소시키고/거나 PCSK9 활성을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, PCSK9의 발현 또는 활성은 대조군 세포 또는 기준선 PCSK9 활성과 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100% 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, PCSK9의 발현 및/또는 활성은 대조군 세포 또는 기준선 PCSK9 활성과 비교할 때 약 5-10%, 5-20%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90% 또는 80-100% 감소된다. PCSK9 활성은 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 대조군 세포는 본원에 개시된 제약 조성물, 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산의 전달 전의 대상체로부터의 세포와 같은 임의의 적절한 대조군일 수 있다. 구체적 실시양태에서, 대조군 세포는 본원에 개시된 제약 조성물, 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 전달하지 않는 대상체의 간 세포 또는 1차 간세포이다. 본원에 사용된 바와 같이, 대상체에서의 "기준선" 수준 (예컨대 PCSK9 발현 또는 활성 또는 총 또는 LDL 콜레스테롤 수준에 대한 기준선 수준)은 본원에 기재된 제약 조성물을 개체에 투여하기 전의 수준을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 기준선은 본원에 기재된 제약 조성물의 투여 전 획득된 2개 이상의 측정치의 평균일 수 있다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 메가뉴클레아제, 또는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체 내의 표적 세포로 전달하는 것은 세포의 표면 상의 LDL 수용체의 디스플레이를 증가시키거나 또는 LDL 수용체의 수준을 증가시킬 수 있다. LDL 수용체의 수준은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예컨대 대상체의 간에서 LDL 수용체 또는 아포지단백질 B (APOB) 수용체의 수준을 측정하는 것에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, LDL 수용체의 디스플레이 또는 수준은 대조군 세포 또는 세포 표면 상의 LDL 수용체의 기준선 수준과 비교할 때, 본원에 개시된 메가뉴클레아제, 또는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을

표적 세포로 전달한 후, 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 150%, 250%, 500%, 1000% 또는 그 초과로 증가할 수 있다.

[0135] 본원에 개시된 제약 조성물, 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체 내의 표적 세포로 전달하는 것은 전달 전의 대상체에서의 총 콜레스테롤 수준과 비교할 때 대상체에서의 총 콜레스테롤 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 총 콜레스테롤 수준은 치료 전의 대상체와 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100% 감소될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물을 전달한 대상체에서의 총 콜레스테롤 수준은 최종 투여 후 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월 또는 3개월 동안 제약 조성물의 전달 전의 총 콜레스테롤 수준과 비교하여 감소를 유지한다.

[0136] 특정한 실시양태에서, 총 콜레스테롤 수준은 대상체에게 본원에 개시된 제약 조성물을 전달하기 전의 콜레스테롤 수준과 비교할 때 약 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL, 20 mg/dL, 25 mg/dL, 30 mg/dL, 40 mg/dL, 50 mg/dL, 60 mg/dL, 70 mg/dL, 80 mg/dL, 90 mg/dL, 100 mg/dL, 110 mg/dL, 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL, 60-80 mg/dL, 70-100 mg/dL 또는 그 초과만큼 감소된다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 140 mg/dL, 150 mg/dL, 160 mg/dL, 170 mg/dL, 175 mg/dL, 180 mg/dL, 185 mg/dL, 190 mg/dL, 195 mg/dL, 200 mg/dL, 205 mg/dL, 210 mg/dL, 215 mg/dL, 220 mg/dL, 225 mg/dL, 230 mg/dL, 235 mg/dL, 240 mg/dL, 250 mg/dL, 260 mg/dL, 270 mg/dL, 280 mg/dL, 290 mg/dL, 300 mg/dL 또는 그 초과인 기준선 총 콜레스테롤 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, 총 콜레스테롤 수준은 혈청 콜레스테롤 수준 또는 총 신체 콜레스테롤 수준이다.

[0137] 본원에 개시된 제약 조성물, 조작된 메가뉴클레아제, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 대상체 내의 표적 세포로 전달하는 것은 전달 전의 대상체에서의 LDL 콜레스테롤 수준과 비교할 때 대상체에서의 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, LDL 콜레스테롤 수준은 치료 전의 대상체와 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 100% 감소될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물을 전달한 대상체에서의 LDL 콜레스테롤 수준은 최종 투여 후 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월 또는 3개월 동안 제약 조성물의 전달 전의 총 콜레스테롤 수준과 비교하여 감소를 유지한다.

[0138] 특정한 실시양태에서, LDL 콜레스테롤 수준은 대상체에게 본원에 개시된 제약 조성물을 전달하기 전의 LDL 콜레스테롤 수준과 비교할 때 약 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL, 20 mg/dL, 25 mg/dL, 30 mg/dL, 40 mg/dL, 50 mg/dL, 60 mg/dL, 70 mg/dL, 80 mg/dL, 90 mg/dL, 5-15 mg/dL, 10-20 mg/dL, 10-30 mg/dL, 15-30 mg/dL, 20-30 mg/dL, 25-35 mg/dL, 25-40 mg/dL, 25-50 mg/dL, 40-60 mg/dL, 50-70 mg/dL, 60-80 mg/dL, 70-100 mg/dL 또는 그 초과만큼 감소된다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 100 mg/dL, 110 mg/dL, 115 mg/dL, 120 mg/dL, 125 mg/dL, 130 mg/dL, 135 mg/dL, 140 mg/dL, 145 mg/dL, 150 mg/dL, 155 mg/dL, 160 mg/dL, 165 mg/dL, 170 mg/dL, 175 mg/dL, 180 mg/dL, 185 mg/dL, 190 mg/dL, 195 mg/dL, 200 mg/dL 또는 그 초과인 기준선 LDL 콜레스테롤 수준을 갖는다. 일부 실시양태에서, LDL 콜레스테롤 수준은 혈청 LDL 콜레스테롤 수준 또는 총 신체 LDL 콜레스테롤 수준이다.

[0139] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 본원에 개시된 제약 조성물을 대상체에게 전달하기 전의 아테롬성동맥경화판의 초기 크기와 비교하여 대상체에서 아테롬성동맥경화판 크기를 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% 또는 60% 또는 훨씬 더 초과로 감소시키는데 효과적일 수 있다. 아테롬성동맥경화판 크기는 약 19%-24%, 14%-29%, 12%-35%, 10-40%, 8%-45%, 5%-50%, 2%-60% 또는 1%-70% 감소될 수 있다.

[0140] 2.4 제약 조성물

[0141] 일부 실시양태에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제, 또는 제약상 허용되는 담체 및 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 표적 조직으로 전달될 수 있는 본 발명의 세포를 포함하는 제약 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 발현한다. 본 발명의 제약 조성물은 심혈관 질환 및 상염색체 우성 FH를 포함한 고콜레스테롤혈증을 갖는 대상체를 치료하거나 또는 PCSK9의 발현 및/또는 활성을 감소시키는데 유용할 수 있다.

- [0142] 이러한 제약 조성물은 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21<sup>st</sup> ed. 2005)]을 참조한다. 본 발명에 따른 제약 제제의 제조에서, 메가뉴클레아제 폴리펩티드 (또는 이를 코딩하는 DNA/RNA)를 전형적으로 제약상 허용되는 담체와 혼합하고, 생성된 조성물을 대상체에게 투여한다. 담체는, 당연히, 제제 중의 임의의 다른 성분과 혼화성인 관점에서 허용되어야 하며 대상체에게 유해하지 않아야 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 대상체에서 질환의 치료에 유용한 1종 이상의 추가의 작용제 또는 생물학적 분자를 추가로 포함할 수 있다. 마찬가지로, 추가의 작용제(들) 및/또는 생물학적 분자(들)는 개별 조성물로서 공-투여될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 본원의 다른 곳에 기재된 지질 나노입자 내에 캡슐화된 본원에 기재된 1개 이상의 mRNA를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 지질 나노입자는 본원에 기재된 1개 이상의 폴리시스트론 mRNA를 포함할 수 있고, 여기서 각각의 폴리시스트론 mRNA는 본 발명의 2개 이상의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩한다. 특정한 실시양태에서, 지질 나노입자는 본원에 기재된 2, 3 또는 4개의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리시스트론 mRNA를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시양태에서, 지질 나노입자는 본 발명의 2개 이상의 조작된 메가뉴클레아제를 각각 코딩하는 본원에 기재된 2개 이상의 폴리시스트론 mRNA를 포함할 수 있다.
- [0144] 본 발명에서 사용하기 위해 고려되는 일부 지질 나노입자는 적어도 1종의 양이온성 지질, 적어도 1종의 비-양이온성 지질, 및 적어도 1종의 접합된 지질을 포함한다. 보다 특정한 예에서, 지질 나노입자는 약 40 mol % 내지 약 85 mol %의 양이온성 지질, 약 13 mol % 내지 약 49.5 mol %의 비-양이온성 지질, 및 약 0.5 mol % 내지 약 10 mol %의 지질 접합체를 포함할 수 있고, 비-층상 (즉, 비-이중층) 형태를 갖는 방식으로 생성된다.
- [0145] 양이온성 지질은, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 팔미토일-올레오일-노르-아르기닌 (PONA), MC3, LenMC3, CP-LenMC3,  $\gamma$ -LenMC3, CP- $\gamma$ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, MC3 에테르, MC4 에테르, MC3 아마이드, Pan-MC3, Pan-MC4 및 Pan MC5, 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLinDMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C2-DMA; "XTC2"), 2,2-디리놀레일-4-(3-디메틸아미노프로필)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C3-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(4-디메틸아미노부틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-C4-DMA), 2,2-디리놀레일-5-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥산 (DLin-K6-DMA), 2,2-디리놀레일-4-N-메틸피페라지노-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-MPZ), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA), 1,2-디리놀레일카르바모일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-C-DAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-(디메틸아미노)아세톡시프로판 (DLin-DAC), 1,2-디리놀레일옥시-3-모르폴리노프로판 (DLin-MA), 1,2-디리놀레오일-3-디메틸아미노프로판 (DLinDAP), 1,2-디리놀레일티오-3-디메틸아미노프로판 (DLin-S-DMA), 1-리놀레오일-2-리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판 (DLin-2-DMAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TMA.Cl), 1,2-디리놀레오일-3-트리메틸아미노프로판 클로라이드 염 (DLin-TAP.Cl), 1,2-디리놀레일옥시-3-(N-메틸피페라지노)프로판 (DLin-MPZ), 3-(N,N-디리놀레일아미노)-1,2-프로판디올 (DLinAP), 3-(N,N-디올레일아미노)-1,2-프로판디올 (DOAP), 1,2-디리놀레일옥소-3-(2-N,N-디메틸아미노)에톡시프로판 (DLin-EG-DMA), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드 (DODAC), 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DSDMA), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 (DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP), 3-(N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일)콜레스테롤 (DC-Chol), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드 (DMRIE), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민-카르복시아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄트리플루오로아세테이트 (DOSPA), 디옥타데실마이도글리실 스페르민 (DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판 (CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시]-3-디메틸-1-(시스,시스-9',1-2'-옥타데카디엔옥시)프로판 (CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민 (DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카르바미-3-디메틸아미노프로판 (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카르바미-3-디메틸아미노프로판 (DLincarbdAP), 또는 그의 혼합물. 양이온성 지질은 또한 DLinDMA, DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), MC3, LenMC3, CP-LenMC3,  $\gamma$ -LenMC3, CP- $\gamma$ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, MC3 에테르, MC4 에테르, MC3 아마이드, Pan-MC3, Pan-MC4, Pan MC5, 또는 그의 혼합물일 수 있다.
- [0146] 다양한 실시양태에서, 양이온성 지질은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 40 mol % 내지 약 90 mol %, 약 40 mol % 내지 약 85 mol %, 약 40 mol % 내지 약 80 mol %, 약 40 mol % 내지 약 75 mol %, 약 40 mol % 내지 약 70 mol %, 약 40 mol % 내지 약 65 mol % 또는 약 40 mol % 내지 약 60 mol %를 구성할 수 있다.

- [0147] 비-양이온성 지질은, 예를 들어 1종 이상의 양이온성 지질 및/또는 중성 지질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 비-양이온성 지질은 하기 중성 지질 성분 중 하나를 포함한다: (1) 콜레스테롤 또는 그의 유도체; (2) 인지질; 또는 (3) 인지질 및 콜레스테롤 또는 그의 유도체의 혼합물. 콜레스테롤 유도체의 예는 콜레스타놀, 콜레스타논, 콜레스테논, 코프로스타놀, 콜레스테릴-2'-히드록시에틸 에테르, 콜레스테릴-4'-히드록시부틸 에테르 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜글리세롤 (POPG), 디팔미토일-포스파티딜에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일-포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민, 디메틸-포스파티딜에탄올아민, 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민 (DEPE), 스테아로일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 에그 포스파티딜콜린 (EPC) 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 중성 지질일 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 인지질은 DPPC, DSPC, 또는 그의 혼합물이다.
- [0148] 일부 실시양태에서, 비-양이온성 지질 (예를 들어, 1종 이상의 인지질 및/또는 콜레스테롤)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 10 mol % 내지 약 60 mol %, 약 15 mol % 내지 약 60 mol %, 약 20 mol % 내지 약 60 mol %, 약 25 mol % 내지 약 60 mol %, 약 30 mol % 내지 약 60 mol %, 약 10 mol % 내지 약 55 mol %, 약 15 mol % 내지 약 55 mol %, 약 20 mol % 내지 약 55 mol %, 약 25 mol % 내지 약 55 mol %, 약 30 mol % 내지 약 55 mol %, 약 13 mol % 내지 약 50 mol %, 약 15 mol % 내지 약 50 mol % 또는 약 20 mol % 내지 약 50 mol %를 구성할 수 있다. 비-양이온성 지질이 인지질 및 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체의 혼합물인 경우, 혼합물은 입자 내에 존재하는 총 지질의 최대 약 40, 50 또는 60 mol %를 구성할 수 있다.
- [0149] 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질은, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 폴리에틸렌글리콜 (PEG)-지질 접합체, 폴리아미드 (ATTA)-지질 접합체, 양이온성-중합체-지질 접합체 (CPL) 또는 그의 혼합물. 하나의 바람직한 실시양태에서, 핵산-지질 입자는 PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체를 포함한다. 특정 실시양태에서, PEG-지질 접합체 또는 ATTA-지질 접합체는 CPL과 함께 사용된다. 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질은, 예를 들어 PEG-디아실글리세롤 (DAG), PEG 디알킬옥시프로필 (DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드 (Cer) 또는 그의 혼합물을 포함한 PEG-지질일 수 있다. PEG-DAA 접합체는 PEG-디라우틸옥시프로필 (C12), PEG-디미리스틸옥시프로필 (C14), PEG-디팔미틸옥시프로필 (C16), PEG-디스테아릴옥시프로필 (C18) 또는 그의 혼합물일 수 있다.
- [0150] 본 발명에서 사용하기에 적합한 추가의 PEG-지질 접합체는 mPEG2000-1,2-디-O-알킬-sn3-카르보모일글리세리드 (PEG-C-DOMG)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. PEG-C-DOMG의 합성은 PCT 출원 번호 PCT/US08/88676에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 다른 추가의 PEG-지질 접합체는 1-[8'-(1,2-디미리스토일-3'-프로판옥시)-카르복스아미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일- $\omega$ -메틸-폴리(에틸렌 글리콜) (2KPEG-DMG)을 비제한적으로 포함한다. 2KPEG-DMG의 합성은 미국 특허 번호 7,404,969에 기재되어 있다.
- [0151] 일부 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 0.1 mol % 내지 약 2 mol %, 약 0.5 mol % 내지 약 2 mol %, 약 1 mol % 내지 약 2 mol %, 약 0.6 mol % 내지 약 1.9 mol %, 약 0.7 mol % 내지 약 1.8 mol %, 약 0.8 mol % 내지 약 1.7 mol %, 약 1 mol % 내지 약 1.8 mol %, 약 1.2 mol % 내지 약 1.8 mol %, 약 1.2 mol % 내지 약 1.7 mol %, 약 1.3 mol % 내지 약 1.6 mol %, 약 1.4 mol % 내지 약 1.5 mol %, 또는 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 mol % (또는 그의 임의의 분획 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우에, PEG 모이어티는 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. 다른 경우에, 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질 (예를 들어, PEG-지질 접합체)은 입자 내에 존재하는 총 지질의 약 5.0 mol % 내지 약 10 mol %, 약 5 mol % 내지 약 9 mol %, 약 5 mol % 내지 약 8 mol %, 약 6 mol % 내지 약 9 mol %, 약 6 mol % 내지 약 8 mol %, 또는 약 5 mol %, 6 mol %, 7 mol %, 8 mol %, 9 mol % 또는 10 mol % (또는 그의 임의의 분획 또는 그 내의 범위)를 구성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 경우, PEG 모이어티는 약 750 달톤의 평균 분자량을 갖는다.
- [0152] 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 간에서, 구체적으로 간세포 내에서 전달 및 흡수를 특이적으로 증진시키는 조성을 갖는다.
- [0153] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체, 및 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 재조합 DNA 구축물을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 이러한 재조합 DNA 구축물은 지질 나노입자 내에 캡슐화될 수 있거나, 또는 표적 세포 (예를 들어, 간 세포, 특히 간세포)로의 전

달에 적합한, 관련 기술분야에 공지된 다른 전달 비히클 내에 패키징될 수 있다.

[0154] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체 및 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 바이러스 벡터를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 표적 세포, 특히 간 세포, 예컨대 간세포로의 전달에 적합한 AAV 벡터일 수 있다. 이러한 AAV 벡터는 캡시드, 예를 들어 AAV8, AAV2, AAV9, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 간-표적화 캡시드를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, AAV 캡시드는 5' 역전된 말단 반복부, 간-특이적 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 인트론, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 우드척 간염 바이러스 (WHV) 전사후 조절 요소, 및 3' 역전된 말단 반복부를 포함하는 카세트를 포함하는 AAV8 캡시드이다.

[0155] 특정 실시양태에서, 치료 유효량의 본원에 개시된 제약 조성물을 또 다른 치료제와 함께 투여하는 것을 포함하는, 콜레스테롤-관련 장애, 예컨대 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법이 제공된다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 단독으로 투여된다.

[0156] 본 발명의 제약 조성물은 조합 요법으로, 즉, 다른 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 적어도 1종의 다른 치료제의 투여 전에 전달된다. 본원에 개시된 제약 조성물은 적어도 1종의 다른 치료제의 투여와 동시에 전달될 수 있거나, 또는 적어도 1종의 다른 치료제의 투여에 후속하여 전달될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조합 요법은 본원에 개시된 제약 조성물을 적어도 1종의 항-콜레스테롤 작용제와 조합하여 포함한다. 작용제는 시험관내에서 합성적으로 제조된 화학적 조성물, 항체, 항원 결합 영역 및 그의 조합물 및 접합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 작용제는 효능제, 길항제, 알로스테릭 조절제 또는 독소로서 작용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용제는 그의 표적을 억제하거나 자극하는 (예를 들어, 수용체 또는 효소 활성화 또는 억제) 작용을 하여, LDLR의 증가된 발현을 촉진하거나 PCSK9 발현 또는 혈청 콜레스테롤 수준을 감소시킬 수 있다.

[0157] 치료제 (본원에 개시된 제약 조성물 제외)는 적어도 1종의 다른 콜레스테롤 (혈청 및/또는 총 신체 콜레스테롤)-강하제 또는 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 작용제는 LDLR의 발현을 증가시키고, 혈청 HDL 수준을 증가시키거나, LDL 수준을 강하시키거나, 트리글리세리드 수준을 강하시키는 것으로 관찰되었다. 예시적인 작용제는 스타틴 (아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴), 니코틴산 (니아신) (니아코르, 니아스판 (느린 방출 니아신), 슬로-니아신 (느린 방출 니아신)), 피브린산 (로피드 (겔피브로질), 트리코르 (페노피브레이트), 담즙산 격리제 (퀘스트란 (콜레스티라민), 콜레세벨람 (웰콜), 콜레스티드 (콜레스티폴)), 콜레스테롤 흡수 억제제 (제티아 (에제티미브)), 니코틴산과 스타틴의 조합 (아드비코르 (로바스타틴 및 니아스판), 스타틴과 흡수 억제제의 조합 (비토린 (조코르 및 제티아) 및/또는 지질 변형제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 PPAR 감마 효능제, PPAR 알파/감마 효능제, 스쿠알렌 신타제 억제제, CETP 억제제, 항고혈압제, 항당뇨병제 (예컨대 술폰닐 우레아, 인슐린, GLP-1 유사체, DDPIV 억제제), ApoB 조절제, MTP 억제제 및/또는 폐쇄성 동맥경화증 치료제와 조합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 대상체에서 LDLR 단백질의 수준을 증가시키는 작용제, 예컨대 스타틴, 특정 시토키인, 예컨대 운코스타틴 M, 에스트로겐, 및/또는 특정 허브 성분, 예컨대 베르베린과 조합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 대상체에서 혈청 콜레스테롤 수준을 증가시키는 작용제 (예컨대 특정 항정신병제, 특정 HIV 프로테아제 억제제, 식이 인자, 예컨대 고 프룩토스, 수크로스, 콜레스테롤 또는 특정 지방산 및 RXR, RAR, LXR, FXR에 대한 특정 핵 수용체 효능제 및 길항제)와 조합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 대상체에서 PCSK9의 수준을 증가시키는 작용제, 예컨대 스타틴 및/또는 인슐린과 조합된다. 둘의 조합은 다른 작용제의 바람직하지 않은 부작용이 본원에 개시된 제약 조성물에 의해 완화되도록 할 수 있다.

[0158] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 콜레스테롤 (혈청 및/또는 총 콜레스테롤)-강하제를 사용한 치료 전에, 그와 동시에 및 그 후에 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 고콜레스테롤혈증, 심장 질환, 당뇨병 및/또는 임의의 콜레스테롤-관련 장애의 발병을 예방 또는 완화시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 기존의 고콜레스테롤혈증 상태의 치료를 위해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 콜레스테롤-관련 장애 및/또는 증상의 발병을 지연시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제약 조성물은 콜레스테롤-관련 장애 중 어느 하나의 임의의 증상이 없는 대상체에게 제공된다.

[0159] 2.5 재조합 AAV 벡터의 생산 방법

[0160] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 재조합 AAV 벡터를 제공한다. 재조합 AAV 벡터

는 전형적으로 포유동물 세포주, 예컨대 HEK-293에서 생산된다. 바이러스 cap 및 rep 유전자가 그의 자기-복제를 방지하기 위해 벡터로부터 제거되어 전달될 치료 유전자(들) (예를 들어, 메가뉴클레아제 유전자)를 위한 공간을 만들기 때문에, 이들을 패키징 세포주에 트랜스로 제공하는 것이 필요하다. 또한, 복제를 지원하는데 필요한 "헬퍼" (예를 들어, 아데노바이러스) 성분을 제공할 필요가 있다 (문헌 [Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) *Curr. Gene Ther.* 13(5): 370-81]). 빈번하게, 재조합 AAV 벡터는 세포주가 "헬퍼" 성분을 코딩하는 제1 플라스미드, cap 및 rep 유전자를 포함하는 제2 플라스미드, 및 바이러스 내로 패키징될 개체 DNA 서열을 함유하는 바이러스 ITR을 포함하는 제3 플라스미드로 형질감염되는 삼중-형질감염을 사용하여 생산된다. 이어서, 캡시드 내에 싸여진 게놈 (ITR 및 관심 개체 유전자(들))을 포함하는 바이러스 입자가 동결-해동 사이클, 초음파처리, 세제, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 수단에 의해 세포로부터 단리된다. 이어서, 입자가 세슘-클로라이드 밀도 구배 원심분리 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되고, 후속적으로 세포, 조직 또는 유기체, 예컨대 인간 환자에게 관심 유전자(들)이 전달된다.

[0161] 재조합 AAV 입자는 전형적으로 세포에서 생산 (제조)되기 때문에, 부위-특이적 메가뉴클레아제가 패키징 세포에서 발현되지 않도록 보장하기 위해 본 발명을 실시하는데 주의를 기울여야 한다. 본 발명의 바이러스 게놈은 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하기 때문에, 패키징 세포주에서 발현되는 임의의 메가뉴클레아제는 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있기 전에 바이러스 게놈을 절단할 수 있을 것이다. 이는 감소된 패키징 효율 및/또는 단편화된 게놈의 패키징을 유발할 것이다. 패키징 세포에서의 메가뉴클레아제 발현을 방지하기 위해 하기를 포함한 여러 접근법이 사용될 수 있다:

[0162] 1. 메가뉴클레아제는 패키징 세포에서 활성이 아닌 조직-특이적 프로모터의 제어 하에 위치할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터가 근육 조직으로의 메가뉴클레아제 유전자(들)의 전달을 위해 개발되는 경우, 근육-특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 근육-특이적 프로모터의 예는 C5-12 (문헌 [Liu et al. (2004), *Hum Gene Ther* 15:783-92]), 근육-특이적 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터 (문헌 [Yuasa et al. (2002), *Gene Ther* 9:1576-88]), 또는 평활근 22 (SM22) 프로모터 (문헌 [Haase et al. (2013), *BMC Biotechnol* 13:49-54])를 포함한다. CNS (뉴런)-특이적 프로모터의 예는 NSE, 시냅신 및 MeCP2 프로모터를 포함한다 (문헌 [Lentz et al. (2012), *Neurobiol Dis* 48:179-88]). 간-특이적 프로모터의 예는 알부민 프로모터 (예컨대, Palb), 인간  $\alpha$ 1-항트립신 (예컨대, PalAT), 및 헤모팩신 (예컨대, Phpx)을 포함한다 (문헌 [Kramer et al. (2003), *Mol Therapy* 7:375-85]). 눈-특이적 프로모터의 예는 옵신 및 각막 상피-특이적 K12 프로모터를 포함한다 (문헌 [Martin et al. (2002), *Methods* 28(2): 267-75) (Tong et al. (2007), *J Gene Med* 9:956-66]). 이들 프로모터, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 조직-특이적 프로모터는 HEK-293 세포에서 고효율이지 않고, 따라서 본 발명의 바이러스 벡터 내로 혼입될 때 패키징 세포에서 유의한 수준의 메가뉴클레아제 유전자 발현을 생성할 것으로 예상되지는 않을 것이다. 유사하게, 본 발명의 바이러스 벡터는 비상용성 조직 특이적 프로모터를 사용하는 다른 세포주 (즉, 널리 공지된 HeLa 세포주 (인간 상피 세포))의 사용 및 간-특이적 헤모팩신 프로모터의 사용을 고려한다. 조직 특이적 프로모터의 다른 예는 활막 육종 PDZD4 (소뇌), C6 (간), ASB5 (근육), PPP1R12B (심장), SLC5A12 (신장), 콜레스테롤 조절 APOM (간), ADPRHL1 (심장) 및 단일유전자 기형 증후군 TP73L (근육)을 포함한다 (문헌 [Jacox et al. (2010), *PLoS One* 5(8):e12274]).

[0163] 2. 대안적으로, 벡터는 메가뉴클레아제가 발현될 가능성이 없는 상이한 종으로부터의 세포에 패키징될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 입자는 포유동물 프로모터, 예컨대 비-포유동물 패키징 세포에서 활성이 아닌 널리 공지된 시토크로마바이러스- 또는 SV40 바이러스-초기 프로모터를 사용하여 미생물, 곤충 또는 식물 세포에서 생산될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스 입자는 가오(Gao) 등의 문헌 [Gao et al. (2007), *J Biotechnol* 131(2):138-43]에 기재된 바와 같이 바콜로바이러스 시스템을 사용하여 곤충 세포에서 생산된다. 포유동물 프로모터의 제어 하의 메가뉴클레아제는 이들 세포에서 발현될 가능성이 없다 (문헌 [Airenne et al. (2013), *Mol Ther* 21(4):739-49]). 또한, 곤충 세포는 포유동물 세포와는 상이한 mRNA 스플라이싱 모티프를 이용한다. 따라서, 포유동물 인트론, 예컨대 인간 성장 호르몬 (HGH) 인트론 또는 SV40 대형 T 항원 인트론을 메가뉴클레아제의 코딩 서열 내로 혼입시키는 것이 가능하다. 이들 인트론은 곤충 세포에서 프리-mRNA 전사체로부터 효율적으로 스플라이싱되지 않기 때문에, 곤충 세포는 기능성 메가뉴클레아제를 발현하지 않을 것이고 전장 게놈을 패키징할 것이다. 대조적으로, 생성된 재조합 AAV 입자가 전달되는 포유동물 세포는 프리-mRNA를 적절하게 스플라이싱하고, 기능성 메가뉴클레아제 단백질을 발현할 것이다. 하이펑 첸(Haifeng Chen)은 곤충 패키징 세포에서 독성 단백질인 바르나제 및 디프테리아 독소 단백 A의 발현을 약화시키기 위한 HGH 및 SV40 대형 T 항원 인트론의 사용으로, 이들 독소 유전자를 보유하는 재조합 AAV 벡터의 생산이 가능하였다는 것을 보고하였다 (문헌 [Chen (2012), *Mol Ther Nucleic Acids* 1(11): e57]).

[0164] 3. 메가뉴클레아제 유전자는 메가뉴클레아제 발현에 소분자 유도제가 필요하도록 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 Tet-On 시스템 (클론테크(Clontech); 문헌 [Chen et al. (2015), BMC Biotechnol 15(1):4]) 및 레오스위치(RheoSwitch) 시스템 (인터렉손(Intrexon); 문헌 [Sowa et al. (2011), Spine 36(10): E623-8])을 포함한다. 두 시스템 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 유사한 시스템은 소분자 활성화제 (각각 독시시클린 또는 엑디손)에 반응하여 전사를 활성화시키는 리간드-유도성 전사 인자 (각각 Tet 리프레서 및 엑디손 수용체의 변이체)에 의존한다. 이러한 리간드-유도성 전사 활성화제를 사용하는 본 발명의 실시는 다음을 포함한다: 1) 상응하는 전사 인자에 반응하는 프로모터의 제어 하에, 전사 인자를 위한 결합 부위(들)를 갖는 메가뉴클레아제 유전자를 위치시키는 단계; 및 2) 패키징된 바이러스 게놈에 전사 인자를 코딩하는 유전자를 포함시키는 단계. 후자의 단계는 전사 활성화제가 동일한 세포에 제공되지 않을 경우 메가뉴클레아제가 재조합 AAV 전달 후에 표적 세포 또는 조직에서 발현되지 않을 것이기 때문에 필요하다. 이어서, 전사 활성화제는 동족 소분자 활성화제로 처리된 세포 또는 조직에서만 메가뉴클레아제 유전자 발현을 유도한다. 이러한 접근법은 소분자 유도제가 전달되는 시기 및 조직을 선택함으로써 메가뉴클레아제 유전자 발현이 공간-시간 방식으로 조절되도록 할 수 있기 때문에 유리하다. 그러나, 유의하게 제한된 운반 용량을 갖는 유도제를 바이러스 게놈에 포함시켜야 하는 요건은 이러한 접근법에 대한 결점을 생성한다.

[0165] 4. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 재조합 AAV 입자는 메가뉴클레아제의 발현을 방지하는 전사 리프레서를 발현하는 포유동물 세포주에서 생산된다. 전사 리프레서는 관련 기술분야에 공지되어 있고, Tet-리프레서, Lac-리프레서, Cro 리프레서 및 람다-리프레서를 포함한다. 많은 핵 호르몬 수용체, 예컨대 엑디손 수용체는 또한 그의 동족 호르몬 리간드의 부재 하에 전사 리프레서로서 작용한다. 본 발명을 실시하기 위해, 패키징 세포는 전사 리프레서를 코딩하는 벡터로 형질감염/형질도입되고, 바이러스 게놈 (패키징 벡터) 내의 메가뉴클레아제 유전자는 리프레서를 위한 결합 부위를 포함하도록 변형된 프로모터에 작동가능하게 연결되어 리프레서가 프로모터를 침묵시킨다. 전사 리프레서를 코딩하는 유전자는 다양한 위치에 위치할 수 있다. 이는 별개의 벡터 상에 코딩될 수 있거나; ITR 서열 외부의 패키징 벡터 내로 혼입될 수 있거나; cap/rep 벡터 또는 아데노바이러스 헬퍼 벡터 내로 혼입될 수 있거나; 또는 가장 바람직하게는 구성적으로 발현되도록 패키징 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 전사 리프레서 부위를 혼입시키기 위해 통상의 포유동물 프로모터를 변형시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 창(Chang) 및 로닌슨(Roninson)은 강한 구성적 CMV 및 RSV 프로모터를 Lac 리프레서를 위한 오퍼레이터를 포함하도록 변형시켰고, 변형된 프로모터로부터의 유전자 발현이 리프레서를 발현하는 세포에서 크게 약화되었음을 보여주었다 (문헌 [Chang and Roninson (1996), Gene 183:137-42]). 비-인간 전사 리프레서의 사용은 메가뉴클레아제 유전자의 전사가 리프레서를 발현하는 패키징 세포에서만 억제되고 생성된 재조합 AAV 벡터로 형질도입된 표적 세포 또는 조직에서는 억제되지 않을 것임을 보장한다.

[0166] 2.6 조작된 메가뉴클레아제 변이체

[0167] 본 발명의 실시양태는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 그의 변이체를 포괄한다. 본 발명의 추가 실시양태는 본원에 기재된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포괄한다.

[0168] 본원에 사용된 "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 의미하는 것으로 의도된다. "변이체" 폴리펩티드는 천연 단백질 내의 1개 이상의 내부 부위에서 1개 이상의 아미노산의 결실 또는 부가 및/또는 천연 폴리펩티드 내의 1개 이상의 부위에서 1개 이상의 아미노산의 치환에 의해 "천연" 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드를 의미하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 "천연" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 변이체가 유래되는 모 서열을 포함한다. 실시양태에 의해 포괄된 변이체 폴리펩티드는 생물학적으로 활성이다. 즉, 이들은 천연 단백질의 목적하는 생물학적 활성, 즉, PCSK9 유전자 내의 인식 서열, 예를 들어 PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 인식하고 절단하는 능력을 계속적으로 보유한다. 이러한 변이체는, 예를 들어 인간 조작으로부터 생성될 수 있다. 실시양태의 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성 변이체 (예를 들어, 서열식별번호: 6-14), 또는 본원에 기재된 인식 절단-부위 결합 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정시, 천연 폴리펩티드 또는 천연 서브유닛의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%의 서열 동일성을 가질 것이다. 실시양태의 폴리펩티드 또는 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 적게는 약 1-40개 아미노산 잔기, 적게는 약 1-20개, 적게는 약 1-10개, 적게는 약 5개, 적게는 4개, 3개, 2개 또는 심지어 1개 아미노산 잔기가 폴리펩티드 또는 서브유닛과 상이할 수 있다.

[0169] 실시양태의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 말단절단 및 삽입을 포함한 다양한 방식으로 변경될 수 있다.

이러한 조작 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변이체는 DNA에서의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 폴리뉴클레오티드 변경 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel (1985), Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492]; [Kunkel et al. (1987), Methods in Enzymol 154:367-382]; 미국 특허 번호 4,873,192; [Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York)] 및 그에 인용된 참고문헌을 참조한다. 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침은 본원에 참조로 포함된 문헌 [Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 찾을 수 있다. 보존적 치환, 예컨대 한 아미노산을 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산과 교환하는 것이 최적일 수 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 개시된 HVR1 및 HVR2 영역의 변이체를 포함할 수 있다. 모 HVR 영역은, 예를 들어 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270을 포함할 수 있다. 따라서, 변이체 HVR은 본원에 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하여, 변이체 HVR 영역이 조작된 메가뉴클레아제의 생물학적 활성 (즉, 인식 서열에 결합하고 절단하는 것)을 유지할 수 있다. 추가로, 본 발명의 일부 실시양태에서, 변이체 HVR1 영역 또는 변이체 HVR2 영역은 모 HVR 내의 특정 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, "에 상응하는"은 변이체 HVR 내의 아미노산 잔기가 모 HVR 서열 내의 동일한 상대 위치 (즉, 모 서열 내의 나머지 아미노산과 관련하여)에 존재하는 동일한 아미노산 잔기 (즉, 별개의 동일한 잔기)인 것을 의미한다. 예로서, 모 HVR 서열이 위치 26에서 세린 잔기를 포함하는 경우, 잔기 26"에 상응하는 잔기를 포함하는" 변이체 HVR은 또한 모 위치 26에 대응하는 위치에서 세린을 포함할 것이다.

[0171] 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 DNA 인식 도메인에 대한 상당수의 아미노산 변형이 이전에 확인되었고 (예를 들어, 미국 8,021,867), 이는 단독으로 또는 조합되어, DNA 인식 서열 절반-부위 내의 개별 염기에서 변경된 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제를 생성하여, 생성된 합리적으로 설계된 메가뉴클레아제가 야생형 효소와 상이한 절반-부위 특이성을 갖도록 한다. 표 2는 인식 절반-부위의 각각의 절반-부위 위치 (-1 내지 -9)에 존재하는 염기에 기초하여 특이성을 증진시키기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛에서 이루어질 수 있는 잠재적인 치환을 제공한다.

[0172] 표 2.

선호되는 센스-가닥 염기											
위치	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	<b>R70*</b> H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				<b>T46*</b>			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	<b>Q44*</b>	C44*						
-3	Q68 C24* <b>I24*</b>	E68 F68 K24* R24*	<b>R68</b>	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 <b>Q26*</b>			S26*
-5		E42	R42			<b>K28*</b>	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						<b>S40</b> S28*
-7	<b>N30*</b> <b>Q38</b>	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*

[0173]

선호되는 센스-가닥 염기											
-8	F33 <b>Y33</b>	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			<b>S32</b> N32 H32 Q32 T32

[0174]

[0175]

볼드체 항목은 야생형 접촉 잔기이고, 본원에 사용된 바와 같은 "변형"을 구성하지 않는다. 별표는 잔기가 안티센스 가닥 상의 염기와 접촉한다는 것을 나타낸다.

- [0176] 폴리뉴클레오티드의 경우, "변이체"는 천연 폴리뉴클레오티드 내의 1개 이상의 부위에서 1개 이상의 뉴클레오티드의 결실 및/또는 부가를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 실시양태의 핵산의 변이체가 오픈 리딩 프레임이 유지되도록 구축될 것임을 인식할 것이다. 폴리뉴클레오티드의 경우, 보존적 변이체는 유전자 코드의 축중성 때문에 실시양태의 폴리펩티드 중 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 변이체 폴리뉴클레오티드는 합성적으로 유래된 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발을 사용하여 생성되지만 실시양태의 조작된 메가뉴클레아제를 여전히 코딩하는 것들을 포함한다. 일반적으로, 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드의 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정시, 그러한 특정한 폴리뉴클레오티드에 대해 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 가질 것이다. 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드 (즉, 참조 폴리뉴클레오티드)의 변이체는 또한 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 참조 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 사이의 퍼센트 서열 동일성의 비교에 의해 평가될 수 있다.
- [0177] 본원에 포괄된 단백질 서열의 결실, 삽입 및 치환은 폴리펩티드의 특징에 있어서 급진적인 변화를 생성하는 것으로 예상되지는 않는다. 그러나, 이를 수행하기 전에 치환, 결실 또는 삽입의 정확한 효과를 예측하는 것이 어려운 경우에, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 인간 PCSK9 유전자 내의 인식 서열을 우선적으로 인식하고 절단하는 능력에 대해 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 효과가 평가될 것임을 인지할 것이다.
- [0178] 실시예
- [0179] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여 본원에 기재된 특정 물질 및 절차에 대한 수많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 실시예 뒤에 나오는 청구범위의 범주에 포괄되는 것으로 의도된다.
- [0180] 실시예 1
- [0181] PCSK9 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제의 특징화
- [0182] 1. PCS 7-8 인식 서열을 인식하고 절단하는 메가뉴클레아제
- [0183] 본원에서 집합적으로 "PCS 7-8 메가뉴클레아제"로 지칭되는 조작된 메가뉴클레아제 (서열식별번호: 6-14)를, PCSK9 유전자 내에 위치하는 PCS 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 인식하고 절단하도록 조작하였다. 각각의 PCS 7-8 조작된 메가뉴클레아제는 SV40으로부터 유래된 N-말단 뉴클레아제-국재화 신호, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각각의 PCS 7-8 메가뉴클레아제 내의 제1 서브유닛은 서열식별번호: 4의 PCS7 인식 절반-부위에 결합하는 한편, 제2 서브유닛은 PCS8 인식 절반-부위에 결합한다 (도 2 참조).
- [0184] PCS7-결합 서브유닛 및 PCS8-결합 서브유닛 각각은 각각 HVR1 및 HVR2로 지칭되는 56개 염기 쌍 초가변 영역을 포함한다. PCS7-결합 서브유닛은 HVR1 영역의 외부에서 고도로 보존된다. 유사하게, PCS8-결합 서브유닛은 또한 HVR2 영역의 외부에서 고도로 보존된다. 서열식별번호: 6-14의 PCS7-결합 영역은 각각 서열식별번호: 15-23 으로서 제공된다. 각각의 서열식별번호: 15-23은 메가뉴클레아제 PCS 7-8L.197 (서열식별번호: 6)의 PCS7-결합 영역인 서열식별번호: 15에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 공유한다. 서열식별번호: 6-14의 PCS8-결합 영역은 각각 서열식별번호: 24-32로서 제공된다. 각각의 서열식별번호: 24-32는 메가뉴클레아제 PCS 7-8L.197 (서열식별번호: 6)의 PCS8-결합 영역인 서열식별번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 공유한다.
- [0185] 2. CHO 세포 리포터 검정에서 PCSK9 인식 서열의 절단
- [0186] PCS 7-8 메가뉴클레아제가 그의 각각의 인식 서열 (서열식별번호: 4)을 인식하고 절단할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 각각의 조작된 메가뉴클레아제를 이전에 기재된 CHO 세포 리포터 검정 (WO2012/167192 및 도 3 참조)을 사용하여 평가하였다. 검정을 수행하기 위해, 세포의 게놈 내로 통합된 비-기능성 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 발현 카세트를 보유하는 CHO 리포터 세포주를 생산하였다. 각각의 세포주 내의 GFP 유전자에 한 쌍의 인식 서열이 개재되어, 메가뉴클레아제에 의한 어느 하나의 인식 서열의 세포내 절단이 기능성 GFP 유전자를 생성하는 상동 재조합 사건을 자극할 것이다.
- [0187] 본 연구를 위해 개발된 CHO 리포터 세포주에서, GFP 유전자 내로 삽입된 하나의 인식 서열은 PCS 7-8 인식 서열 (서열식별번호: 4)이었다. GFP 유전자 내로 삽입된 제2 인식 서열은 CHO-23/24 인식 서열이었고, 이는 "CHO-

23/24"로 불리는 대조군 메가뉴클레아제에 의해 인식되고 절단된다. PCS 7-8 인식 서열 및 CHO-23/24 인식 서열을 포함하는 CHO 리포터 세포는 "PCS 7-8 세포"로 지칭한다.

[0188] CHO 리포터 세포를 그의 상응하는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA로 형질감염시키거나 (예를 들어, PCS 7-8 세포를 PCS 7-8 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA로 형질감염시킴), 또는 CHO-23/34 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 각각의 검정에서,  $4e^5$ 개의 CHO 리포터 세포를 리포펙타민 2000 (써모피셔(ThermoFisher))을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 96-웰 플레이트에서 50 ng의 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에, 세포를 유동 세포측정법에 의해 평가하여 형질감염되지 않은 음성 대조군 (PCS bs)과 비교한 GFP-양성 세포의 백분율을 결정하였다. 도 4A-4C에 제시된 바와 같이, 모든 PCS 7-8 메가뉴클레아제는 그의 상응하는 인식 서열을 포함하는 세포주에서 음성 대조군을 유의하게 초과하는 빈도로 GFP-양성 세포를 생산하는 것으로 밝혀졌다.

[0189] 또한, 메가뉴클레아제를 CHO 리포터 세포 내로 도입한 후 시간-의존성 방식으로 PCS 7-8 메가뉴클레아제의 효능을 결정하였다. 본 연구에서, PCS 7-8 세포 ( $1.0 \times 10^6$ 개)를 바이오라드 진 펄서 엑스셀을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 세포당 메가뉴클레아제 mRNA의  $1 \times 10^6$  카피로 전기천공하였다. 형질감염 후 지정된 시점에, 세포를 유동 세포측정법에 의해 평가하여 GFP-양성 세포의 백분율을 결정하였다. CHO-23/24 메가뉴클레아제를 또한 양성 대조군으로서 각각의 시점에 포함시켰다.

[0190] 도 5A-5C에 제시된 바와 같이, 상이한 PCS 7-8 메가뉴클레아제에 의해 생산된 %GFP는 연구의 시간 경과에 걸쳐 일관되었고, 이는 세포에서 지속적인 절단 활성 및 임의의 실질적인 독성의 결여를 나타낸다.

[0191] 3. 결론

[0192] 이들 연구는, 본 발명에 의해 포괄되는 PCS 7-8 메가뉴클레아제가 세포에서 그의 각각의 인식 서열을 효율적으로 표적화하고 절단할 수 있고, 이러한 효과가 시간 경과에 따라 일관되며, 뉴클레아제가 세포에 비-독성이라는 것을 입증하였다.

[0193] 실시예 2

[0194] HEK 293 세포에서 PCS 7-8 인식 서열의 절단

[0195] 1. 실험 프로토콜 및 T7E 검정

[0196] 본 연구는 본 발명에 의해 포괄되는 PCS 7-8 메가뉴클레아제가 HEK293 세포에서 PCS 7-8 인식 서열을 절단할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0197]  $2e^6$ 개의 293 세포를 바이오라드 진 펄서 엑스셀을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 2.7ug의 주어진 PCS 메가뉴클레아제 mRNA로 전기천공하였다. 형질감염 후 제2일 및 제5일에, 게놈 DNA (gDNA)를 세포로부터 수거하고, T7 엔도뉴클레아제 I (T7E) 검정을 수행하여 내인성 PCS 7-8 인식 서열에서 유전자 변형을 추정하였다 (도 6). T7E 검정에서, PCS 7-8 유전자좌를 PCS 7-8 인식 서열에 플랭킹된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. PCS 7-8 유전자좌 내에 삽입결실 (무작위 삽입 또는 결실)이 존재하는 경우, 생성된 PCR 생성물은 야생형 대립 유전자와 돌연변이체 대립유전자의 혼합물로 이루어질 것이다. PCR 생성물을 변성시키고 천천히 재어닐링되도록 하였다. 느린 재어닐링은 야생형 및 돌연변이체 대립유전자로 이루어진 헤테로듀플렉스가 형성되도록 하여 미스매칭된 염기 및/또는 돌출부를 생성한다. T7E1 효소는 미스매치 부위에서 절단하여 겔 전기영동에 의해 가시화될 수 있는 절단 생성물을 생성한다.

[0198] 2. 결과

[0199] 형질감염 후 제2일 및 제5일에, PCS 7-8x.66 및 PCS 7-8x.88을 받은 세포에서 저분자량 DNA 단편을 관찰하였고, 반면에 GFP 대조군을 코딩하는 mRNA로 모의 형질감염 또는 형질감염된 세포는 전장 PCR 생성물만을 디스플레이 하였다 (도 6). 이들 저분자량 DNA 단편은 PCS 인식 부위에 대한 메가뉴클레아제의 활성에 의해 야기된 미스매칭된 DNA에서의 T7 엔도뉴클레아제 I 절단에 의해 생산된다.

[0200] 3. 결론

[0201] T7 엔도뉴클레아제 I 검정은 PCS 7-8 메가뉴클레아제로 처리된 HEK293 세포에서 PCS 7-8 메가뉴클레아제 인식 부위 주위의 삽입결실의 존재를 검출하였고, 이는 표적 부위의 절단 및 비-상동 말단 연결 (NHEJ)에 의한 부위

의 오류-유발 복구를 나타낸다.

[0202] 실시예 3  
 [0203] PCS 7-8 인식 서열에서의 삽입결실을 관찰하기 위한 심층 서열분석

[0204] 1. 심층 서열분석 프로토콜

[0205] 의도된 PCS 7-8 메가뉴클레아제 표적 부위에서 삽입 또는 결실을 직접 관찰하기 위해, 심층 서열분석 프로토콜을 사용하였다. 2e<sup>6</sup> 개의 HEK 293 세포를 바이오라드 진 펄서 엑스셀을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 5ug의 PCS 7-8 메가뉴클레아제 mRNA로 전기천공하였다. mRNA가 없는 모의 전기천공을 또한 수행하였다. 형질감염 후 48시간에, 게놈 DNA (gDNA)를 세포로부터 수거하였다. PCS 7-8 인식 서열에 플랭킹된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 PCS 7-8 유전자좌를 증폭시켰다. 이 앰플리콘을 시각적 확인을 위해 아가로스 겔 상에서 실행시키고, 마슈레-나겔 뉴클레오스핀 겔 및 PCR 클린-업 키트를 사용하여 추출하고, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)로부터의 일루미나에 대한 NEBNext 울트라 II DNA 라이브러리 키트를 사용하여 서열분석 라이브러리를 제조하였다. 쌍형성된-말단 서열분석 라이브러리를 일루미나 Miseq DNA 서열분석기 상에서 관독하였다. 맞춤형 스크립트를 사용하여 서열분석 데이터를 분석하였다. 전장 앰플리콘의 25bp 이내가 아닌 출발점 또는 종점을 갖는 관독물을 제거하였다. 인식 서열의 중간 8bp 중 적어도 하나에 혼입된 삽입결실을 갖는 전장 관독물의 수를 전장 관독물의 총수로 나눔으로써 삽입결실을 갖는 관독물의 퍼센트를 계산하였다.

[0206] 2. 결과

[0207] 표 3에 제시된 바와 같이, 심층 서열분석에 의해 평가된 각각의 PCS 7-8 메가뉴클레아제는 모의 처리와 비교하여 그의 의도된 인식 부위에서 퍼센트 삽입결실의 적어도 100배 증가를 보였다.

[0208] 표 3.

메가뉴클레아제	% 삽입결실
모의	0.40%
PCS 7-8x.88	53.98%
PCS 7-8L.209	53.16%
PCS 7-8L.268	52.51%
PCS 7-8L.261	55.35%
PCS 7-8L.204	58.36%
PCS 7-8L.197	56.53%
PCS 7-8L.262	53.45%

[0209] 3. 결론

[0210] 이들 실험은 HEK293 세포에서 그의 의도된 표적 부위 (즉, PCS 7-8 인식 서열)를 절단하고 비-상동 말단 연결에 의한 오류-유발 복구를 통해 삽입결실의 출현을 유도하는 본 발명의 PCS 7-8 메가뉴클레아제의 능력을 명확하게 입증한다.

[0211] 실시예 4

[0212] PCS 7-8 메가뉴클레아제를 사용한 생체내 영장류 간의 유전자 편집

[0213] 1. 방법 및 물질

[0214] 비-인간 영장류 모델에서 생체내 간 세포에서 PCS 7-8 인식 부위를 편집하는 PCS 7-8 메가뉴클레아제의 능력을 평가하고, 대상체에서의 PCSK9의 혈청 수준에 대한 이러한 편집의 효과를 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

[0215] PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제를 제조함 AAV 벡터를 통해 도입하였다. AAV 벡터는 AAV8 캡시드를 가졌고 5'로부터 3'로, 5' 역전된 말단 반복부, 간-특이적 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 인트론, PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 우드척 간염 바이러스 (WHP) 전사후 조절 요소, 및 3' 역전된 말단 반복부를 포함하였다. 벡터는 AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH로 지칭된다.

[0216] AAV 벡터를 제약 조성물로 제조하고, 각각 체중이 대략 6.5 kg인 4 마리의 상이한 레서스 마카크에게 제0일에

단일 주입으로서 투여하였다. 동물 (수컷) RA1866은 이들 연구에서 평가된 최고 용량을 나타내는  $3 \times 10^{13}$  GC/kg의 단일 용량을 받았다. 동물 RA1857 (수컷)은  $6 \times 10^{12}$  게놈 카피 (GC)/kg의 단일 용량을 받았다. 동물 RA1829 (암컷) 및 동물 RA2334 (수컷)는 각각  $2 \times 10^{12}$  게놈 카피 (GC)/kg의 단일 용량을 받았다. ELISA에 의한 혈청 PCSK9 단백질 수준의 분석, 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드의 분석, 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 수준의 분석을 위해 제-3일 및 제0일 및 투여후 168일 (저용량 동물) 또는 280일 (고용량 및 중간 용량 동물)까지의 다중 시점에서 혈액 샘플을 수집하였다. 추가적으로, PCS 7-8 인식 서열에서의 삽입 및 결실 (삽입결실)의 PCR 분석을 위해, 및 계내 혼성화 (ISH)에 의한 간 세포에서의 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제 발현의 분석을 위해 투여후 제17일에 간 생검 샘플을 수득하였다.

[0218] 2. 혈청 PCSK9 단백질 수준의 변화

[0219] 혈청 PCSK9 단백질 수준을 제-3일, 제0일 및 AAV 벡터의 투여후 다중 시점에서 ELISA에 의해 결정하였다. 고용량 및 중간 용량 동물을 투여후 280일 동안 추적한 반면, 저용량 동물은 168일 동안 추적하였다.

[0220] 도 7에 제시된 바와 같이, 제0일에 메가뉴클레아제 AAV의 단일 투여는 제7일까지 대상체 RA1866, RA1857 및 RA1829에서, 및 제14일까지 모든 군에서 혈청 PCSK9 수준의 극적인 용량-의존성 감소를 유도하였다. 보다 높은 용량의  $3 \times 10^{13}$  GC/kg를 받은 대상체 RA1866은 제7일까지 대략 84% 및 제20일까지 대략 91%의 감소를 나타냈다.  $6 \times 10^{12}$  GC/kg의 용량을 받은 대상체 RA1857은 제7일까지 대략 46% 및 제20일까지 대략 77%의 감소를 나타냈다.  $2 \times 10^{12}$  GC/kg의 용량을 받은 대상체 RA1829는 제7일까지 대략 35% 및 제20일까지 대략 70%의 감소를 나타냈다. 또한,  $2 \times 10^{12}$  GC/kg의 용량을 받은 대상체 RA2334는 제14일까지 대략 35%의 감소를 나타냈고, 이는 제20일까지 기준선에 더 가까이 복귀하였고, 여기서 대략 10%의 감소가 관찰되었다.

[0221] 추가의 시점을 평가하여 연구 과정 전반에 걸친 단백질 억제제의 지속성을 결정하였다. 혈청 PCSK9 수준의 용량-의존성 감소는 측정된 최종 시점까지 계속 관찰되었다. 저용량 동물 (RA1829 및 RA2334) 둘 다에서, 대략 25%의 감소가 제168일에 계속 관찰되었다. 중간 용량 동물 (RA1857)에서, 대략 50%의 감소가 제280일에 계속 관찰되었다. 고용량 동물 (RA1866)에서, 대략 85%의 감소가 제280일에 계속 관찰되었다.

[0222] 종합하면, 관찰 과정 전반에 걸친 혈청 PCSK9 수준의 감소는 용량-의존적인 것으로 보였고, 각각의 대상체에 대해 연구의 종료까지 감소가 지속되었다.

[0223] 3. 혈청 콜레스테롤, LDL, HDL 및 트리글리세리드 수준의 변화

[0224] 혈청 콜레스테롤, LDL, HDL 및 트리글리세리드 수준에 대한 PCS 7-8 메가뉴클레아제 처리의 효과를 또한 제-3일, 제0일 및 AAV 벡터의 투여후 다중 시점에서 결정하였다.

[0225] 유의하게는, PCS 7-8 메가뉴클레아제를 사용한 처리에 의해 총 LDL 수준이 4 마리의 동물 모두에서 감소되었다 (도 8A). 4 마리의 동물 모두 제20일까지 혈청 LDL의 실질적인 감소를 나타냈고, 감소는 용량-의존성 방식으로 연구 과정 전반에 걸쳐 지속되었다. 동물 RA2334는 제168일까지 대략 25%의 감소를 나타낸 반면, 다른 저용량 동물 RA1829는 동일한 시점에서 대략 35%의 더 큰 감소를 나타냈다. 동물 RA1857 (중간 용량) 및 RA1866 (최고 용량)은 각각 연구의 제268일에 측정하였을 때 대략 70%의 감소를 나타냈다.

[0226] 특히, 각각의 동물에서 연구 제28일 내지 제42일에 LDL 수준의 일시적인 증가가 관찰되었다. 이는 동일한 시점에서 ALT 수준에서 관찰된 변화와 일치하고 (도 9), 메가뉴클레아제 또는 벡터 캡시드에 대한 T 세포의 활성화로부터 유발되었을 수 있다.

[0227] 연구 과정 동안 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드의 변화가 도 8B-8E에서 각각의 동물에 대해 제시된다. 제시된 바와 같이, 총 콜레스테롤 수준은 고용량 (RA1866) 및 중간 용량 (RA1857) 동물에서 명확하게 감소된 반면, 저용량 동물에서는 더 크지 않은 효과가 관찰된다. HDL은 고용량 동물에서 또한 다소 감소되지만, 다른 3개에서는 비교적 안정하다. 각각의 동물에 대해 연구의 시간 경과 동안 트리글리세리드 수준의 일시적인 변화가 관찰되지만, 측정된 마지막 시점에서는 대략 기준선 수준으로 유지된다.

[0228] 4. 생체내 간 세포의 메가뉴클레아제 발현 및 유전자 편집

[0229] 간 생검을 제17일에 취하고, PCS 7-8 인식 서열에서 삽입 또는 결실 (삽입결실)의 존재에 대해 검사하였다. 인식 서열에 플랭킹된 PCR 프라이머, 게놈의 개재 영역의 증폭, 및 생성된 PCR 생성물의 서열분석을 사용하여 삽

입결실을 검출하였다. 상이한 길이의 삽입 및 결실 둘 다의 다양한 삽입결실이 PCS 7-8 인식 서열에서 다양한 빈도로 검출되었다. 도 10은 대상체 RA1857 및 RA1866에서 8개의 가장 빈번하게 관찰된 삽입결실 및 그의 각각의 빈도를 제공한다. 이들 8개의 삽입결실은 대상체 RA1857에서 관찰된 삽입결실의 73% 및 대상체 RA1866에서 관찰된 삽입결실의 66%를 차지하였다.

[0230] PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제가 실제로 생체내 간 세포에서 발현되었다는 것을 확인하기 위해, 제17일 및 제129일에 수득된 간 생검을 계내 혼성화 (ISH)에 의해 검사하였다. 형광-표지된 올리고 프로브를 설계하고, 이를 각각의 대상체로부터의 생검 간 세포에서 PCS7-8x.88 mRNA에 결합시켰다. 대조군으로서 올리고 프로브 없이 또 다른 대상체 M11657로부터의 생검 세포의 모의 처리를 수행하였다. 도 11에 제시된 바와 같이, 모의 처리된 세포에서는 형광 신호가 관찰되지 않았다 (도 11A). 그러나, 제17일에 처리된 대상체의 간 세포에서는 유의한 형광이 관찰되었다 (도 11B-E). 따라서, 처리된 대상체에서 초기 시점 동안 삽입결실 형성이 관찰되고 혈청 PCSK9 및 혈청 지질의 감소가 검출되었을 때 PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제 mRNA가 강하게 발현되었다는 것은 명확하였다. 도 11은 추가로 연구 제129일에 제2 간 생검을 수득하였을 때 메가뉴클레아제 mRNA의 발현이 더 이상 관찰되지 않았다는 것을 보여준다.

[0231] 5. PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제를 사용한 처리

[0232] 최적화된 제2 세대 PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제의 유효성을 결정하기 위해 추가의 연구를 수행하였다. 연구 프로토콜은 이전에 기재된 것과 유사하였다. PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제를 제조함 AAV 벡터를 통해 도입하였다. AAV 벡터는 AAV8 캡시드를 가졌고 5'에서 3'로, 5' 역전된 말단 반복부, 간-특이적 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 인트론, PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제에 대한 코딩 서열, 우드릭 간염 바이러스 (WHV) 전사후 조절 요소, 및 3' 역전된 말단 반복부를 포함하였다. AAV 벡터를 제약 조성물로 제조하고, 각각 체중이 대략 6.5 kg인 1 마리의 수컷 및 1 마리의 암컷 레서스 마카크에게 제0일에 단일 주입으로서  $6 \times 10^{12}$  게놈 카피 (GC)/kg의 단일 용량으로 투여하였다. ELISA에 의한 혈청 PCSK9 단백질 수준의 분석 및 총 LDL 수준의 분석을 위해 투여후 제0일 및 제7일에 초기 혈액 샘플을 수집하였다.

[0233] 도 12에 제시된 바와 같이, PCSK9 혈청 수준은 연구 제7일까지 두 대상체에서 신속하게 극적으로 감소되었다. 대상체 RA2125에서, PCSK9 수준은 제0일에 대략 180 ng/mL로부터 제7일에 대략 55 ng/mL로 감소하였다 (~70% 감소). 대상체 RA2343에서, PCSK9 수준은 제0일에 대략 245 ng/mL로부터 제7일에 대략 125 ng/mL로 감소하였다 (~49% 감소). PCSK9 수준의 감소는 메가뉴클레아제 AAV의 투여후 제182일까지 지속되었고, 각각의 대상체는 대략 60%의 감소를 계속 나타냈다.

[0234] 도 13A는 혈청 PCSK9 수준의 감소가 치료 7일 이내에 혈청 LDL 수준의 실질적인 감소를 동반하였다는 것을 보여준다. 대상체 RA2125에서, 혈청 LDL 수준은 제0일에 대략 40 mg/dL로부터 제7일에 대략 25 mg/dL로 감소하였다 (~38% 감소). 대상체 RA2343에서, 혈청 LDL 수준은 제0일에 대략 75 mg/dL로부터 제7일에 대략 55 mg/dL로 감소하였다 (~27% 감소). 혈청 LDL 수준은 제21일 및 제28일까지 계속 감소하였고, 기준선과 비교하여 대략 65% 감소하였다. 혈청 LDL의 감소는 연구 제168일까지 지속되었고, 이 시점에 대상체 RA2125 및 RA2343은 각각 대략 35% 및 50%의 대체로 안정한 감소를 나타냈다.

[0235] 연구 과정 동안 총 콜레스테롤, HDL, LDL 및 트리글리세리드의 변화가 도 13B 및 13C에서 각각의 동물에 대해 제시된다. 제시된 바와 같이, 총 콜레스테롤 수준은 각각의 대상체에서 연구 전반에 걸쳐 보통 정도로 감소되며, 대상체 RA2343에서는 더 많이 감소된다. HDL 및 트리글리세리드 수준은 각각의 대상체에서 연구 과정 전반에 걸쳐 본질적으로 변화되지 않는다. PCS 7-8x.88 AAV의 투여와 유사하게, 대상체 RA2125에서 제28일 내지 제42일에 혈청 지질의 일시적인 증가가 관찰되며, 이는 ALT의 상승과 일치하고 (도 14), 메가뉴클레아제 또는 AAV 캡시드에 반응한 T 세포 활성화로부터 유발될 수 있다.

[0236] PCS 7-8L.197 메가뉴클레아제가 생체내 간 세포에서 발현되었다는 것을 확인하기 위해, 제18일 및 제129일에 수득된 간 생검을 계내 혼성화 (ISH)에 의해 검사하였다. 형광-표지된 올리고 프로브를 설계하고, 이를 각각의 대상체로부터의 생검 간 세포에서 PCS 7-8L.197 mRNA에 결합시켰다. 도 15에 제시된 바와 같이, 제18일에 처리된 대상체의 간 세포에서 유의한 형광이 관찰되었다. 따라서, 처리된 대상체에서 초기 시점 동안 혈청 PCSK9 및 혈청 지질의 감소가 검출되었을 때 PCS7-8L.197 메가뉴클레아제 mRNA가 강하게 발현되었다는 것은 명확하였다. 도 15는 추가로 연구 제128일에 제2 간 생검을 수득하였을 때 메가뉴클레아제 mRNA의 발현이 더 이상 관찰되지 않았다는 것을 보여준다.

[0237] 6. 온-타겟 게놈 편집의 분자 평가

[0238] 간 생검 샘플로부터 단리된 DNA를 고정된 멀티플렉스 PCR 서열분석 (AMP-seq)에 의해 생성된 앰플리콘의 심층 서열분석에 의해 지정된 rhPCSK9 엑손 7 표적 부위에서의 온-타겟 편집에 대해 특징화하였다. 정방향 프라이머가 표적화된 메가뉴클레아제 절단 부위의 50 bp 상류의 고정된 위치에 혼성화되고 앰플리콘의 3' 말단이 증폭 전에 게놈 DNA의 무작위 절단 후에 DNA 단편 길이에 의해 규정되는 네스티드 유전자좌-특이적 프라이머를 사용하여 AMP 앰플리콘을 생성하였다.

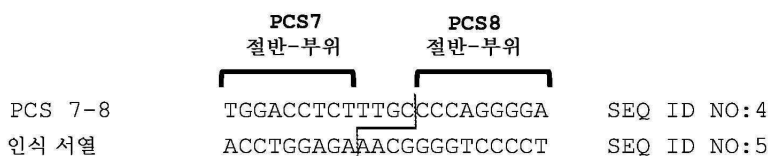
[0239] 모든 간 샘플에서, AMP 서열분석에 의해 관찰된 짧은 삽입 및 결실의 빈도는 음성 대조군 (즉, 나이브 동물로부터의 PBMC 샘플)에서 관찰된 것보다 더 높은 것으로 밝혀졌다 (도 16). PCS 7-8x.88 메가뉴클레아제의 경우, 제129일에 AMP-seq에 의해 검출된 삽입결실 빈도는 고용량에서 46%였고, 저용량에서 13% (평균, n=2)까지 용량에 비례하여 감소하였다. AAV8 혈청형 및 TBG 프로모터의 사용으로 인해 1차 간세포만이 선택적으로 편집된다는 것을 고려할 때, AMP-seq는 간 생검 샘플 내에 존재하는 편집되지 않은 오염성 비-실질 세포의 존재로 인해 온-타겟 게놈 편집의 총 빈도를 과소추정할 가능성이 있다. 편집 사건의 전체 수는 증가가 일어난 고용량을 제외하고는 모든 동물에서 2개의 시점 (즉, 제17일 및 제129일) 사이에 약간 감소하였다. 삽입의 총수는, 시간 경과에 따라 정도가 가변적이었지만, 각각의 샘플 내의 결실의 총수를 초과하였다. 결실 빈도는 고용량 및 중간 용량 동물 둘 다에 대해 시간 경과에 따라 증가하는 것으로 밝혀졌고, 저용량 동물에서 시간 경과에 따라 감소한 반면, 삽입은 분석된 각각의 샘플에 대해 시간 경과에 따라 일관되게 감소되었다. PCS 7-8L.197 AAV로 처리된 대상체로부터 수득된 샘플의 유사한 온-타겟 분자 분석은 AAV의 중간 용량을 받은 대상체 RA1857에서 관찰된 것과 유사한 삽입결실의 스펙트럼 및 빈도를 입증하였다.

[0240] 7. 결론

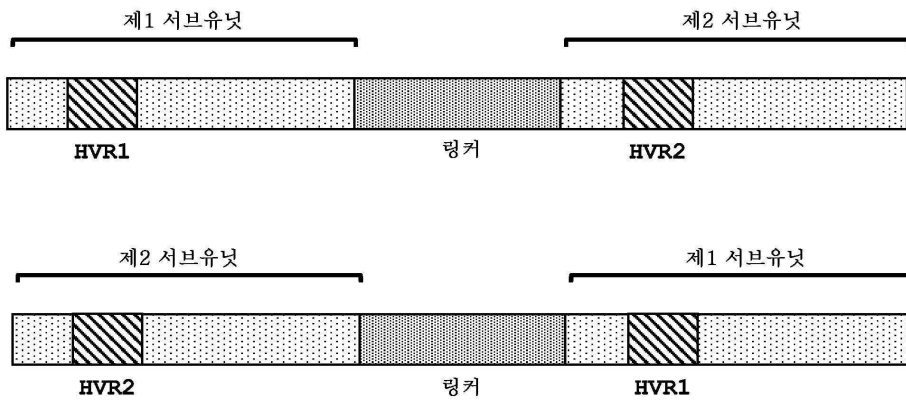
[0241] 이들 연구로부터, PCS 7-8 메가뉴클레아제가 ISH에 의해 관찰된 바와 같이 생체내 영장류 간 세포에서 성공적으로 발현되고, 후속적으로 PCS 7-8 인식 서열에서 절단 부위를 생성하였다는 것이 명확하였다. 이어서, 절단 부위에서의 오류-유발 비-상동 말단 연결은 해당 부위의 PCR 분석 및 AMP-seq 분석에 의해 관찰된 바와 같이 수많은 삽입결실을 생성하였고, 이는 ELISA에 의해 관찰된 바와 같이 PCSK9 단백질 발현을 억제하였다. 이들 연구는 본 발명자들이 알고 있는 영장류 간에서의 유전자 편집의 최초 보고된 관찰이다. 또한, 이는 영장류에서 PCSK9 유전자에 대한 유전자 편집의 최초 관찰이고, 이는 혈청 PCSK9 단백질 수준, 혈청 LDL 수준 및 총 콜레스테롤 수준의 실질적이고 지속적인 감소를 동반하였다. 본 발명자들은 이들 실험에서 투여되는 AAV의 용량이 비교적 높다는 것을 인지하고 있으며, 효능 및 안전성 프로파일 둘 다를 결정하기 위해 실질적으로 더 낮은 용량으로, 및 추가의 PCS 7-8 메가뉴클레아제를 사용하여 추가 실험을 수행할 것이다. 콜레스테롤을 강하시키는 이러한 방법의 전-임상 검증을 위해 총 혈청 콜레스테롤 수준, 혈청 LDL 수준 및 간 세포 LDL 수준의 추가 분석을 또한 수행할 것이다.

도면

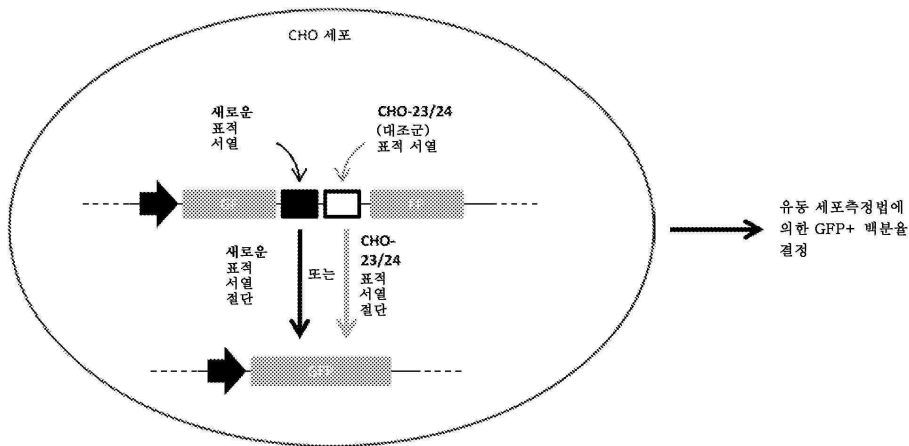
도면1



도면2

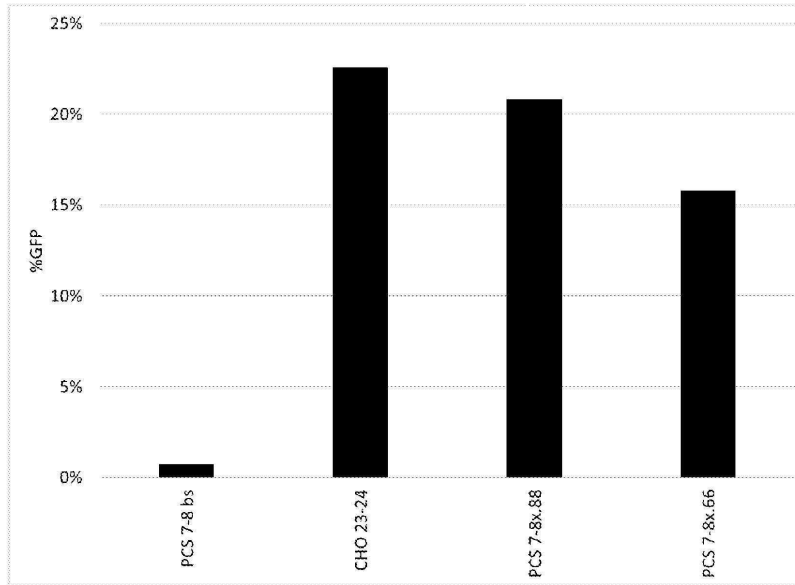


도면3

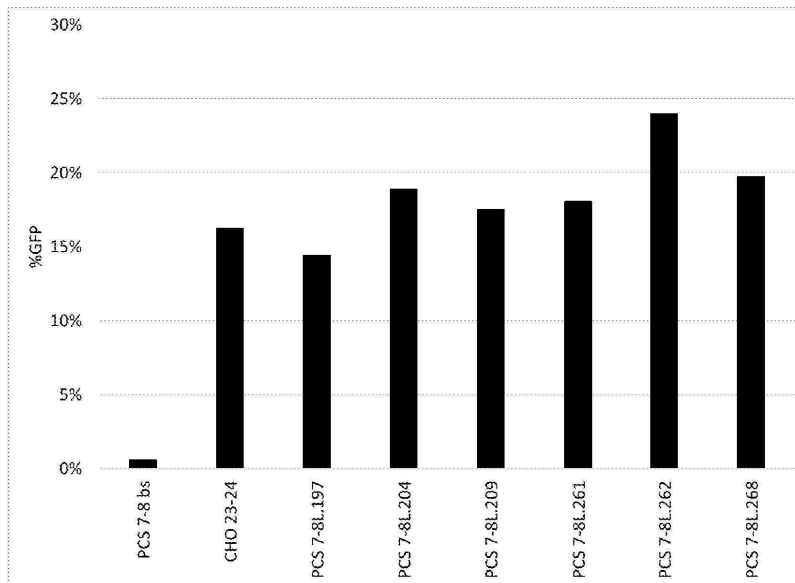


도면4i

**A.**

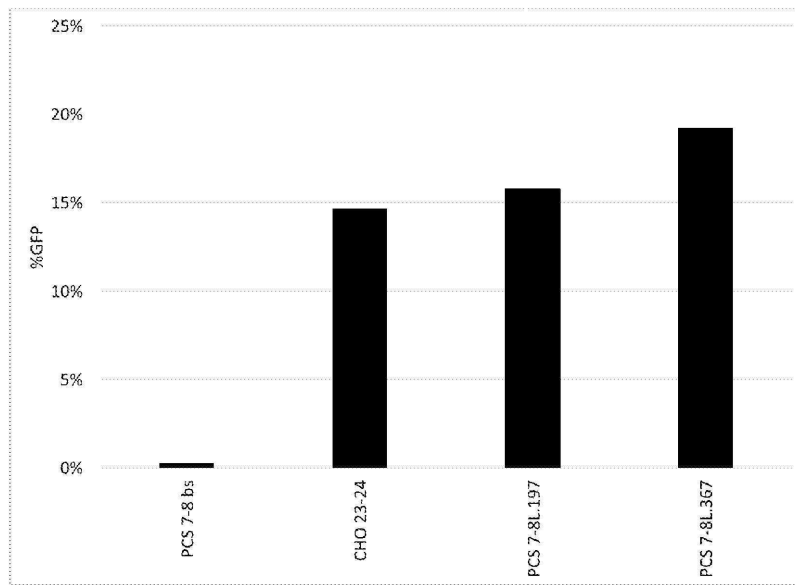


**B.**



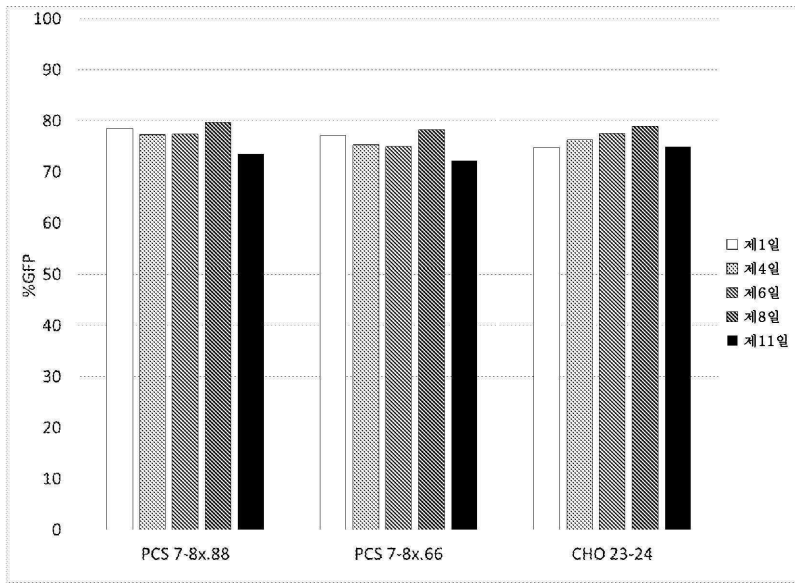
도면4ii

C.

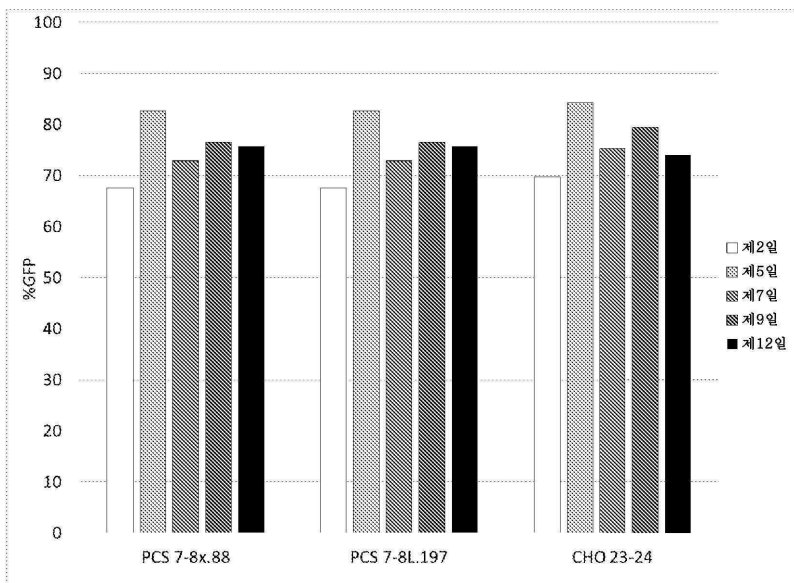


도면5i

A.

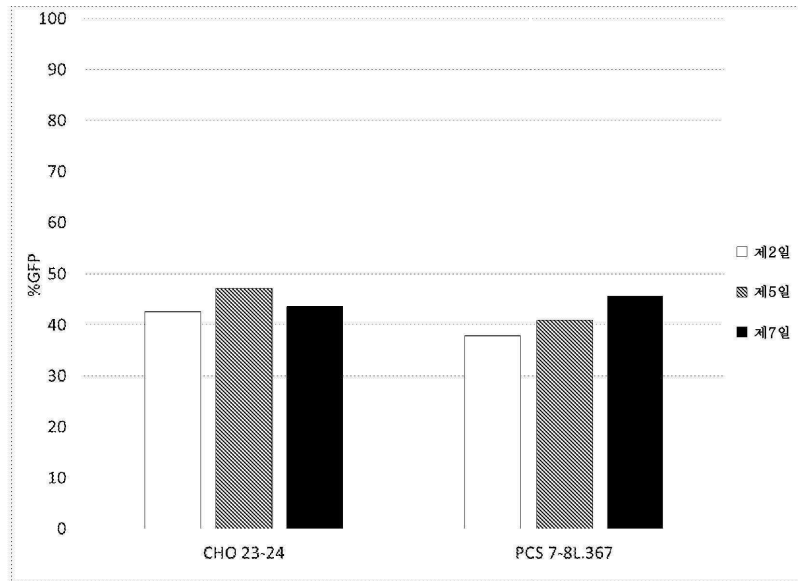


B.



도면5i

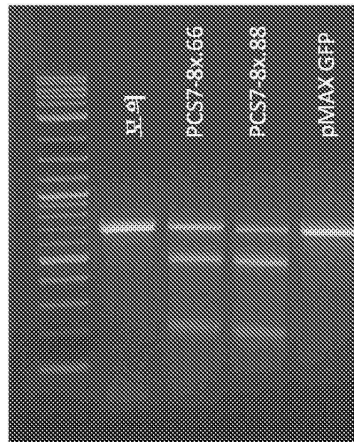
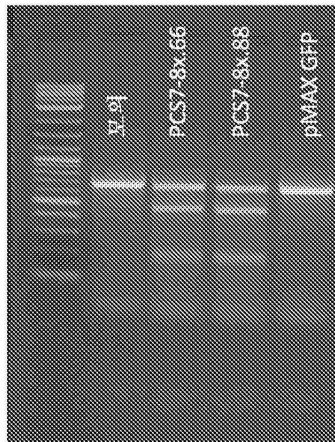
C.



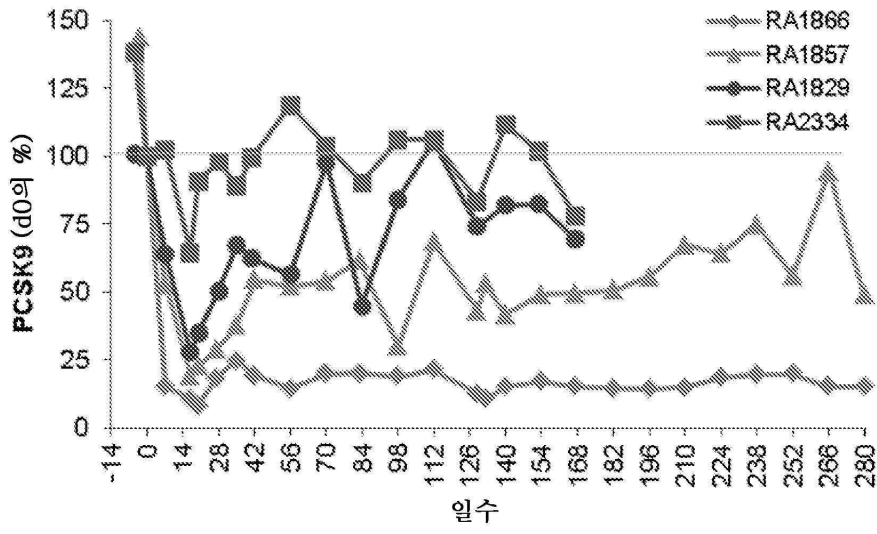
도면6

제2일

제5일

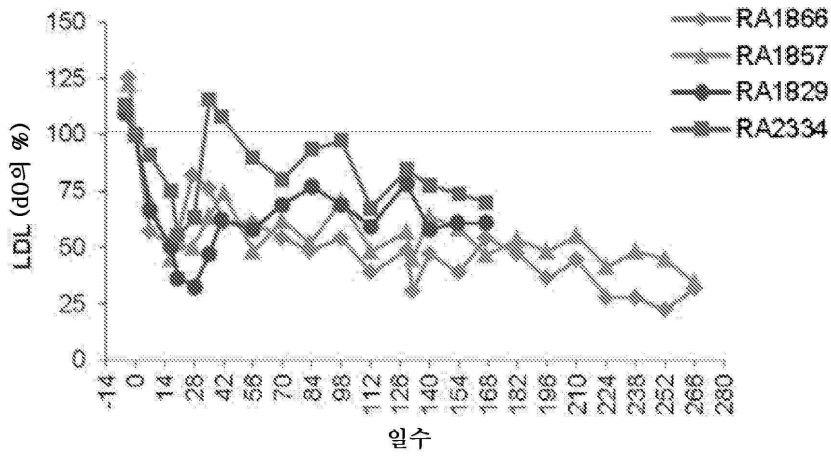


도면7

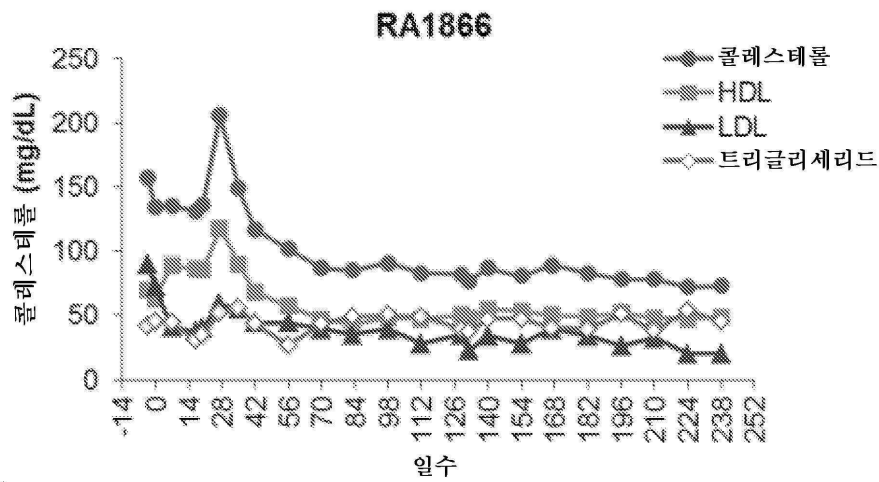


도면8i

A.

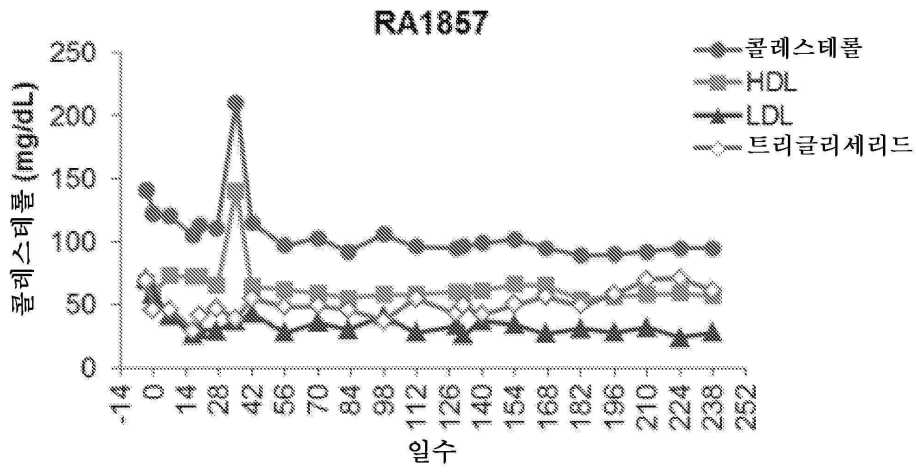


B.

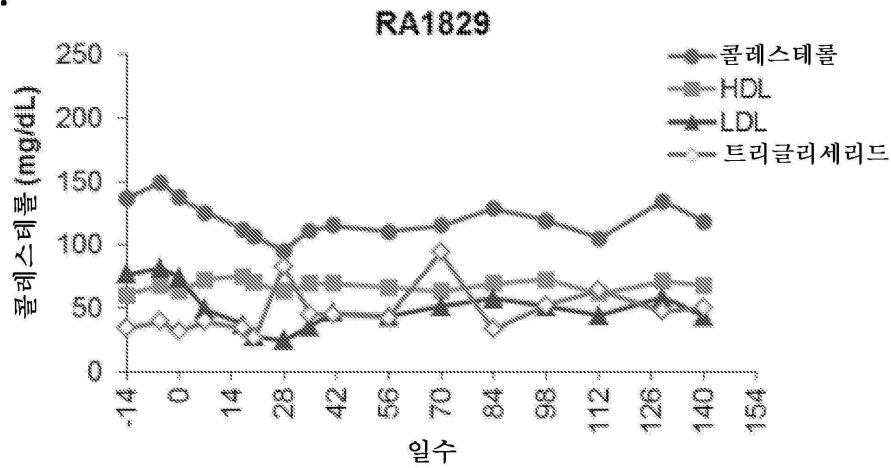


도면8ii

C.

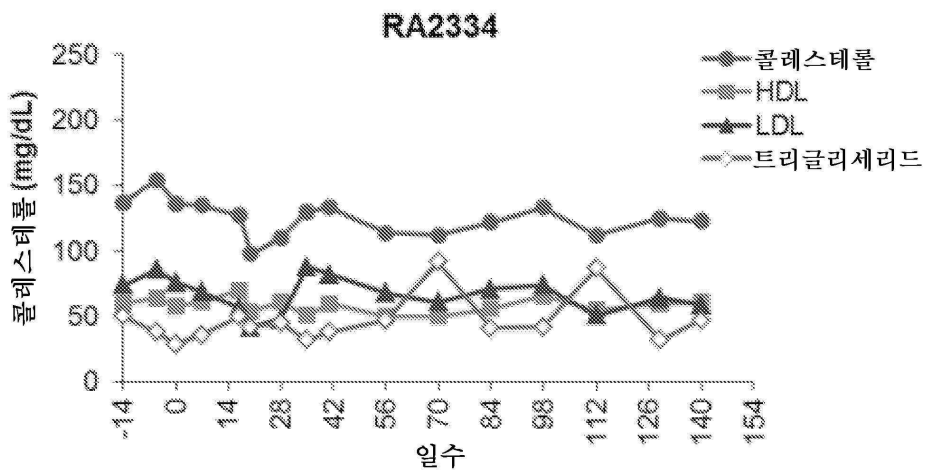


D.

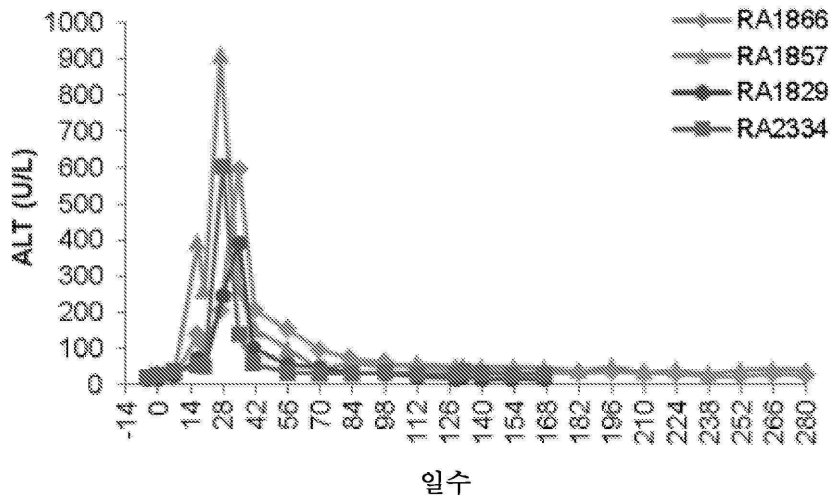


도면8iii

E.



도면9

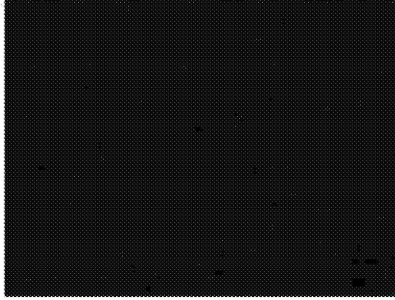


도면10

	야생형 또는 삽입결실 서열	SEQ ID NO:	삽입결실 빈도	
			RA1857	RA1866
야생형	TGGACCTCTTT-GCCCCAGGGGA	4	-	-
상위 8개의 가장 빈번한 삽입결실 서열	TGGACCTCTTT-G---CAGGGGA	33	3.41	1.88
	TGGACC-CTTT-GCCCCAGGGGA	34	1.83	1.45
	TGGACCTCTTT-GC-CCAGGGGA	35	1.73	1.03
	TGGACCTCTTTTGCCCCAGGGGA	36	1.46	0.84
	TGGACCTCTTT-GC--CAGGGGA	37	1.1	0.71
	TGGACCTCTT----CCCAGGGGA	38	0.98	0.64
	TGGACCTCTTT----CCAGGGGA	39	0.49	0.32
	TGGACCTCTT-----CCAGGGGA	40	0.4	0.29

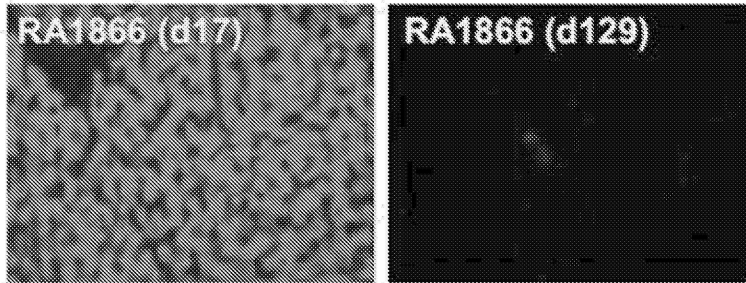
도면11i

A.

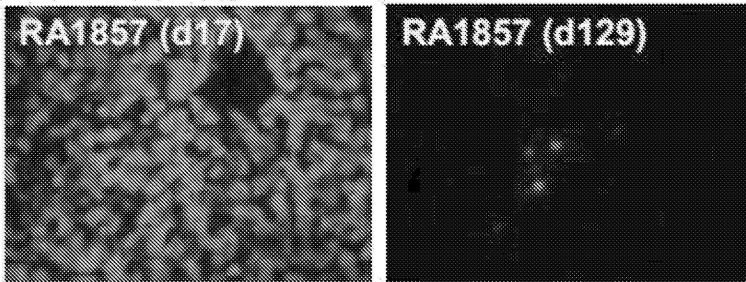


M11657 (대조군)

B.

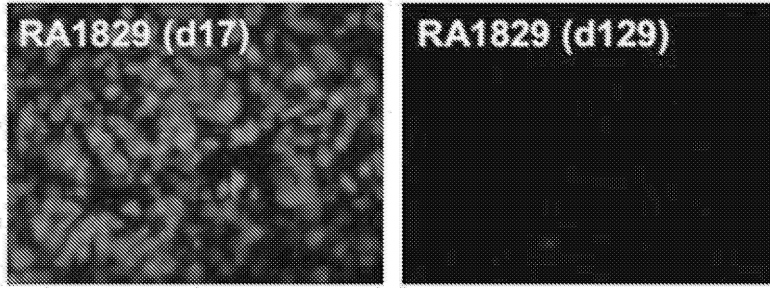


C.

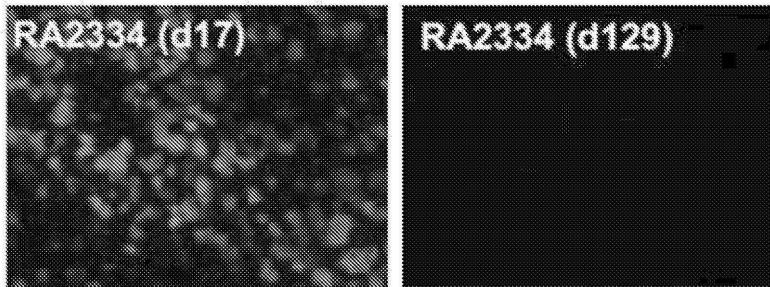


도면11i

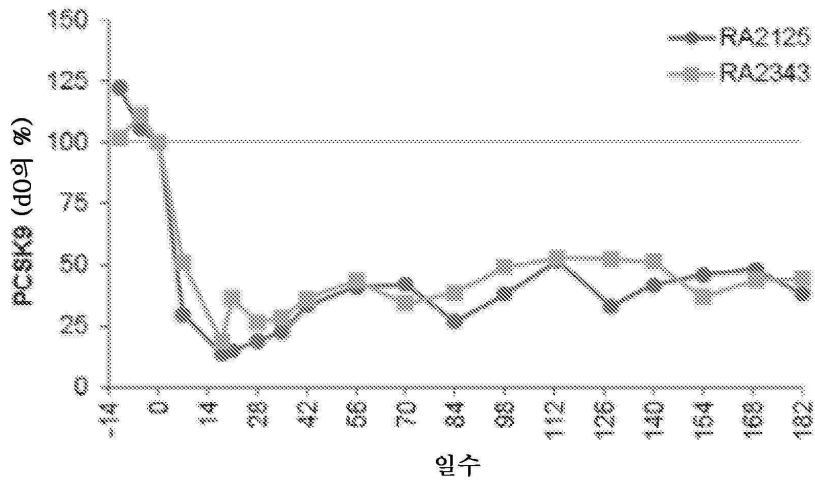
D.



E.

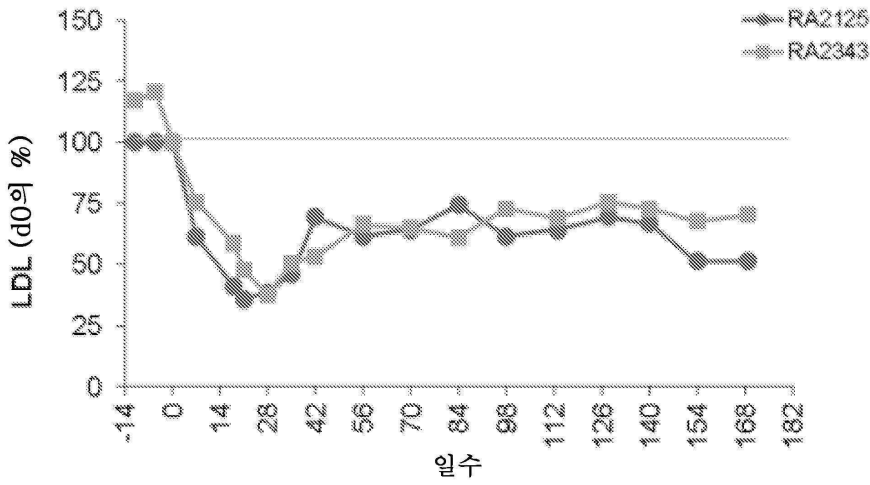


도면12

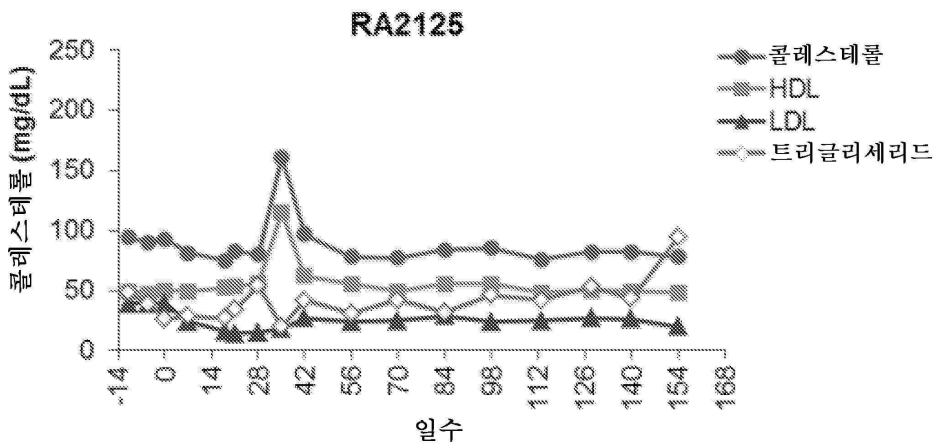


도면13i

A.

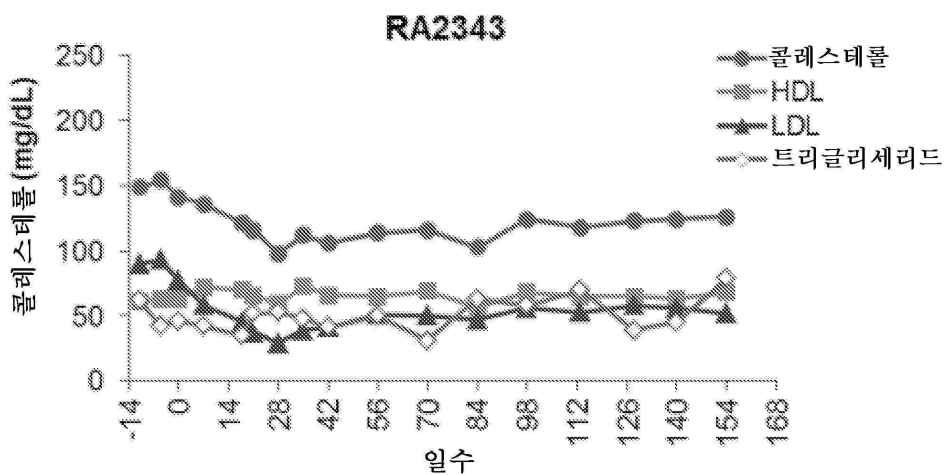


B.

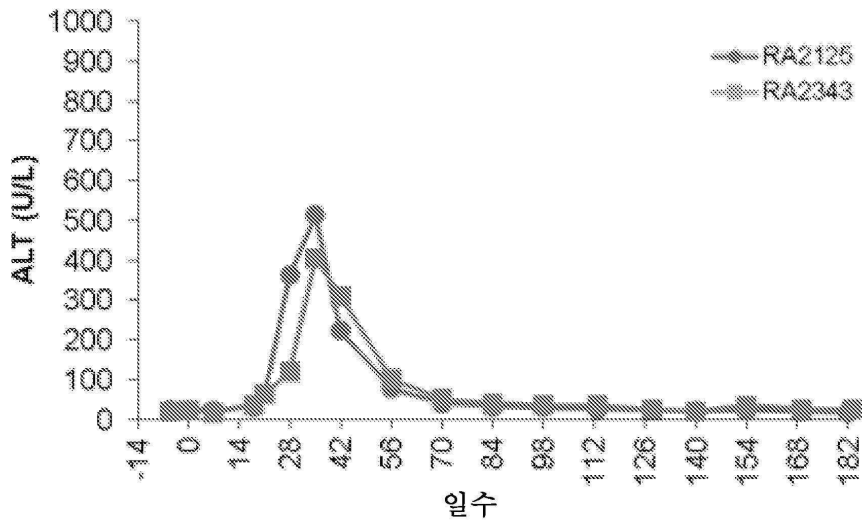


도면13ii

C.

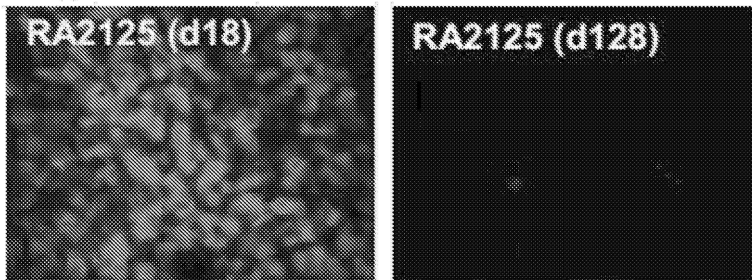


도면14

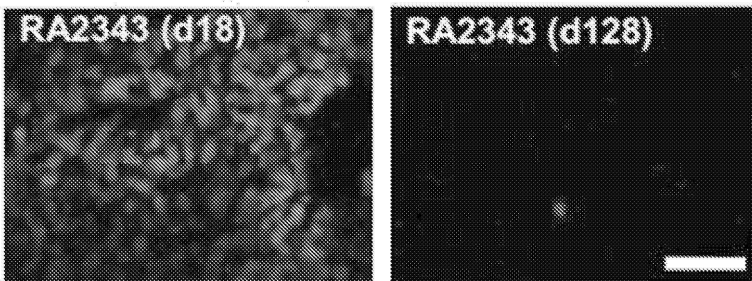


도면15

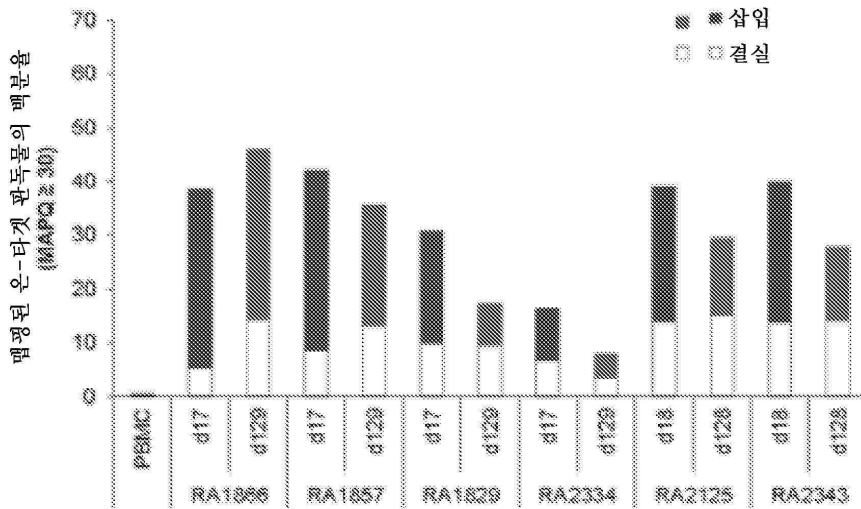
A.



B.



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> PRECISION BIOSCIENCES, INC.
- <120> ENGINEERED MEGANUCLEASES SPECIFIC FOR RECOGNITION SEQUENCES IN THE PCSK9 GENE
- <130> P1090.70022W000
- <140> Not Yet Assigned
- <141> Concurrently Herewith
- <150> US 62/488,403
- <151> 2017-04-21
- <150> US 62/516,966
- <151> 2017-06-08
- <160> 40
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 163
- <212> PRT
- <213> Chlamydomonas reinhardtii
- <400> 1

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1                    5                    10                    15  
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser  
                   20                    25                    30  
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys  
                   35                    40                    45  
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val  
                   50                    55                    60  
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu  
  
 65                    70                    75                    80  
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys  
                   85                    90                    95  
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu  
                   100                    105                    110  
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp  
                   115                    120                    125  
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr  
  
                   130                    135                    140  
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Ser Pro

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 2

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1                    5

<210> 3

<211> 25378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtccgatggg gctctgggtgg cgtgatctgc gcgccccagg cgtcaagcac ccacacccta 60

gaaggtttcc gcagcgactg cgagcgctc atggttgcag gcgggcgccc ccgttcagtt 120

cagggctctga gacctggagga gtgagccagg cagtgcagact ggctcgggcg ggcccgggacg 180

cgctcgttga gcagcggctc ccagctccca gccaggattc cgcgcgcccc ttcacgcgcc 240

ctgctcctga acttcagctc ctgcacagtc ctccccaccg caaggctcaa ggcgcccggc 300

gcgtggaccg cgcacggcct ctaggtctcc tcgccaggac agcaacctct cccctggccc 360

tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgctg ctgctgctgc 420

tgctgctcct gggccccg cgcgcccgtg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg 480

agctggtgct agccttgctg tccgaggagg acggcctggc cgaagcaccc gagcacggaa 540

ccacagccac ctccaccgc tgcgccaagg tgcgggtgta gggatgggag gccggggcga 600

accgcagcc gggacggctg ggtgctgttt cctctcgggc ctacagttcc ccccatgtaa 660

gagaggaagt ggagtgcagg tcgccagggg ctcttcgctt ggcacgatct tggggactgc 720

aggcaaggcg gcgggggagg acgggtagtg gggagcacgg tggagagcgg ggacggccgg 780

ctctttgggg acttgctggg gcgtgcggct gcgctattca gtgggaaggt tcgccccggt 840

gggagacccc gaggccgagg aaggccgagc agagcactgc caggatatcc tgcccagatt 900

tcccagtttc tgcctcgcgg cggcacaggt ggtgaagga gtgaatgcct ggaacgtact 960

gggaactgca ccaggcacag agaaagcggg cttgccatta tagtgggttc cgatttggtt 1020

tggaaaacat gggcagcggg ggggtggagg cctggagaga aggcctacc cgagacaggg 1080

gcggggtggg aaggacggca gatgctggga gcacgaggca atttctttat gacacagaac 1140

tcatgctcta gtattccatc tgtttcagcc gaagaaaaga accagctgaa ggggcagggg 1200

agaaggggcg gaggtattct cgaggcccat tggcgtcctt taggactcag gcaggaagg 1260

gcccttgggt ctctggagcc ggaggtggtg cgcctggtac tgggacccc gagctgagcc 1320

cggcgcctca gcccacctgg ctgtctgccg accgtgtgcg gggcgagttt gctcaacaac 1380

tctgccagct tctggccctc aggtctgagg aagcttcttc ccggggcgag accactagct 1440

ttttctaagt attaccagcc caggacttgg ctgaggttct gtgtcccga gcttggagtc 1500

agatgtgggg ttgaatctg gcttctctc actagctgtg gtgcttgaca agtcacttat 1560

ccttgagcct ccattgccta atctttaaaa gggaggtagc aatcgtccct acggctcagt 1620

ggcagcagat ggggagatga agggaaagt ctgttgacca tgagtgaact tacaatgcaa 1680

gccccggggg gatcacttgc agttttgtcc ctgtctgcag tgtgacctgt tggtagacatt 1740

gtctttgctc caaaccacag ctcttggggc agaggggaaa attctgccac tcacagctgc 1800  
 ctgccacgc tctgtctga gtgtctggg tggcaggatg gcaagtcctt actcagctca 1860  
 gtatagccct cttccttgtt ccctgagcct ttgactttct cgagggatgt tgtggggttg 1920  
 tggccaggat aagaaagggc atttcaagtt accactgctc caaaacaact gttctggaaa 1980  
 tagtgagtac cccatctga gaggtgagta agcagaggct gtatgaccac ctgaaccaag 2040  
 cccttgagga tgtttctct ctggtggaag tttggaacag gagcctctc aagttcattt 2100  
 attcattcat tcaatggta ttttgtggga atcgaattta gaatgaaaat attttttggc 2160  
  
 aagcagaaaa taattttag accaatcctt tcttttagt catgagaaac tgaggcccag 2220  
 agagaggagg tcaccccagg tgcattagaa ctgggtttcc agaactgaca ctccactgca 2280  
 cagagtactc tccaattca ttcaattttt atttagcgga aggcattttc agatgggtct 2340  
 ttgaagcatt agtaggagtt cagcgatgat ggtgtcatga gaattttatt ctaggattag 2400  
 gaggtacat gaacaaagat acagagctgg gaaaaccaga ggtggaagat aaggagcaca 2460  
 tgtccacagt tcttttctt tttttttga gatggagttt cgctcttgtt gcccaggctg 2520  
 gagtgcaatg gtgcagtctc agctcactgc aacatctgct tcccgggttc aagtggttct 2580  
  
 cctgcctcag cctccaaga agctgggatt acaggtacct gccaccacgc cggctaatt 2640  
 tttgtatfff tagtagagaa ggggtttcac cacgttggcc aggctagtct caaactcctg 2700  
 acctcctcag tggatecgag gaggtgatcc tcccgcctca gcctccaaa gtgctcgaat 2760  
 tacaggtgtg agccaccacg cctggcctcc acagttcttt atccaccgtc tgaatgtaa 2820  
 aatgttacga aaaccaaag tttttttgt gatattttg atggtagcac ctgacgtgaa 2880  
 ctgacatgag attatffff atttagttgt gtgaatatgc atattcatat attttctgctc 2940  
 atagattaca gtatgcagct ccagattctt ccaagcagac tctgattgcc cattactgcc 3000  
  
 tttctaaaat ccaacaagt tctgaggttc aaaaccgttt tggccctaag getttgggta 3060  
 aaggggttg actctgttct actctgactg gactccaaga tgcatatata cagagatatg 3120  
 ggtgatgggg ctgcaaggta ggttaggta gggccaagg aggagcatgg agtttggact 3180  
 tgattcatga ggctgtgggg agccagtga ggttcttaag caggtatgtc tgcctgagag 3240  
 cagttggagc agacaagagc taaaaccaa acaaatcacc atagatagt gctgctataa 3300  
 tttgtttgtc cctccaat ctcatgtgga aatttggctc tcagtgttgg aagtggggcc 3360  
 taatgggagg tgttgggtc atgggggagg aaccctgtg aaaggcttgg tgccgtcctt 3420  
  
 gigataatga gtaagtctc ccgctatgat tcccttgaa ggctgattat taaaagagc 3480  
 ttggcacctc cctctctct ctcttcttct tctcttggcc atgtgattga tctctgcaca 3540  
 tgtaggctcc cctcacctt ctgcatcag tgaagcagc ttaaggcct caccagaagc 3600

agatgctggg gccatgcttc ctggagagct tgcagaatca tgagctgaat aaatcccttt 3660  
 tccttgtaaa ttactcacct tcaggtattc ctttatatag caacacaaaa ggactaagac 3720  
 agtggccttg acttttctct ctctttaaga agtgttgcct ttgctcactt agtcatcct 3780  
 tctgcctgca ttigttagagc atctggatgg gagatttata taaccgtcac tcttgacttt 3840  
  
 cccagcagge ctatgtcata ggtactgtgg tctctacaat acagcagagg tatctgagge 3900  
 tccgagaggt tgagtgactt gctcatggct gcacaaccag taaatattgg agctggaatt 3960  
 caggtccacg gtttctggc tccaaagccc atgatttttt ccctcaattt attctgactg 4020  
 gggcatgggg gaggggggtgg cctttgggca gggccaccag gagcgaccag gccctgtagag 4080  
 agctgggtgc aggtacagag gaaaacctgt tgcgagtggt ggcccgtagt tcccattttt 4140  
 gcctgaatgg cacatttgaa agtgttata aaccatgtga ataataatag ttggcctata 4200  
 tgagttcttt aatttgcttt ttggtcgca ttggtaact tctttatcat ctactatact 4260  
  
 ctgttggtgc tctttgttg taattttaa gtaggggtga gataaagtac acctagggtt 4320  
 tgctgggttt cttccatgac atcatgttcc tccttgcag gggccaggat ccgtggaggt 4380  
 tgctggcac ctacgtgggt gtgctgaagg aggagacca cctctcgag tcagagcgca 4440  
 ctgccgccg cctgcagcc caggctgcc gccgggata cctcaccaag atcctgcatg 4500  
 tcttccatgg ctttcttct ggcttcttg tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg 4560  
 tgagccacce tttttggaa tggcacttcc tgatagggtt gggccactgc atatactg 4620  
 gggactgtgc ttagtaggcc cattgtgaa aatcagaagg ggacagcaag tatgtattga 4680  
  
 gcacttatcg ggtaccaagc acagtaacta ctggctttct gtatagaatt cctttaagc 4740  
 ctggccatgc ccagtggtg cgtctatctt catttgaaag acgaggagac tgaagttcag 4800  
 aggggaccac acagacagct aggggtagag cctggatcaa acccattggt ctgcctgcca 4860  
 gccattcttg tgccaatgca tctgctgctt acggaaacct gtagggacaa ggccctggga 4920  
 tgttcagtgg agcctgagtc attttataaa aaagcatgac tctagggtcc aaaattcctt 4980  
 tgaagctgtt gctatccaga gtgaagtcct tcttttagga cagggtggcc ctctccctc 5040  
 ctggatgca catcttcggt ggaggggcag aaaggggact gggatttctc ctaccctgg 5100  
  
 ccctagtgtc tcaaatctta aaaaaagtt tttatttgg cttctgcacc accttctagc 5160  
 ccacctggt tctggcctc taacttgatg agagcgtgtg tcattttcac actgattctc 5220  
 cacatggcag gcggtgcttc ttagcctcct gcagacagtg aggccccacg gtcttgcaca 5280  
 aggtcacaca gcgtgtaatg ggcaggttca gactctggag tctggacctg ggtctcctag 5340  
 ctgcaactgca ctgctgcccc atgggttaat cagctcagca taccgtggct gaacagctac 5400  
 ctcataccaa ggctgtggc gccatgacag ggattgacag ggtccctgcc ttggaaccc 5460

gtagtctaag tagaggagac tgacaagtca atgccttcca tcagtctgct caacacacgt 5520  
  
 ttaccaagtg cctactgtgt gctgcagagg cgaagatgac acagctcagg cctttccctt 5580  
 gagcttacag ttcaggagga gagactgacc agtgactgcc agtacagtgg actatgggac 5640  
 aatgtgctca gccttgggga gagacgaaga aggtaccctg atagcaccag atgacaggca 5700  
 cgagccccac aggccagggc agctgctcag aggagagtag gccaagcaga aggcaaacag 5760  
 aaggctgcag gcatttgcca tcgagagctg gacttcaaac tgggcatcat accagcctgg 5820  
 gttcagatcc tgcccagccc cttattggct gtctaaccct gagcaaatcc cttcacctct 5880  
 ctgagcctca ttctctatc tgtaaaccag ttataataat tggaacattc atttaaggac 5940  
  
 taaatgaggt cgigaagcat tcagcagatg ctaggtacgg aaactcgctg aagtgggggc 6000  
 aggttaagaa gcctctgggg atacgaaggc atccagggac tagttgtggc aggaggctgt 6060  
 taccacttag gtctgaaggg taaggagagg gaatagettt ccctctgccc agttggagcc 6120  
 ggtggcatgg aggagagctt gcctgtgggg aatcacccga gggttcaccg ctgccatgca 6180  
 cagggagtca ggaggtaggg agggagtggg gcagatgcac accatTTTTT tTTTTTTTg 6240  
 agactctgtt gccagactg gagtgactg gtgccatata tgcacctctg cctccccggg 6300  
 tcaagctcac tgcaacctct gcctccccgg ttcaagcgat tctctgcct cagcctcccg 6360  
  
 agtagctggg actacaggtg tgtgccacca tgectggcta atttttgtat ttttaataga 6420  
 gatggggttt caccatgttg gccaggctgg tctcgaactc tcgacctcag gtgatcccc 6480  
 acctcggcct cccaaagtc tgggattaca ggcgtgagtc accgctcca gctgctgatg 6540  
 cactcttgte cttctaactc ctgctagtgc ctccattgg ctgagcccaa ctggaagctt 6600  
 tgcaagggag ctggtgctgc agtttgact gaggcaggctg gagaaggctg gagaatagac 6660  
 taggggacaa accgaattgc cagtctgtt atgtcatgat ttaggcatgg agtccagggc 6720  
 ctgagcttca ctccatgtcc atcctgcca gagccttggc acagcctggc tccagacaa 6780  
  
 gatgtcaagt tcagaatcct tcctaaaagg aatcctctat gccagaccgt gttgcaggga 6840  
 tatgggagtg ctgggctccc agcctgatca aggagcgaga aaactcaggc tcctagtctg 6900  
 tcctccgggg cactagcagg gacaagggtg gaggctgctg ggctgggatg tggggacagg 6960  
 tttgatcagg taaggccagg ctgtggctgt gtttgctgct gtccaaatgg cttaaagcaga 7020  
 gtcccccgcc ctctctggct tctgcaggcc ttgaagtgc cccatgtcga ctacatcgag 7080  
 gaggactcct ctgtctttgc ccagagcatc ccgtggaacc tggagcggat taccctcca 7140  
 cggtagcggg cggatgaata ccagccccc ggtaagacc ccatctgtgc cctgccccac 7200

cccatctgag ctgaatccat ttgctctgcc ctggcctggc ctcctctgtg gtggtttcca 7260  
 cttctcgggg ggctttggga ctcagcacct ccaactgacc ctttttttct gtccatccc 7320  
 catcccctgc agccccact gcctgccttc ctgttgcccc acaaatgcaa aagtcttgcc 7380  
 ttaaattgac ctcttttct tcttttctct tgttttctt ttctcaccaat ttggaatggc 7440  
 ccagcaggct gcacttacct tgggaaggagg gttcatctga tgggtactct acctagggcc 7500  
 cccaggcctc tataactccc agtgcctgc agactggacc agatccttta atgggataga 7560  
 cacaaccctg tctgggatgc ctctgcctac cttctgttt tgctgctcca cctgcctcca 7620  
  
 gctccgtttg gcttctctggg gctccctgcc tgggccactt tgtgtcttcc ctctaggcct 7680  
 ttctttccac tgttccctct gcctgggtgtg gcctggctat ggaagggagg gaggaggagc 7740  
 ggccatggaa aacggtctgc attctagcag ggacttgacg gtggcaattc agtcggggaa 7800  
 gactctagat gcacctggcc tgaggagaga atgaagggtt ctagtggac tgtgttaagt 7860  
 ttgaggtgcc catgggtgga ggtctggagc tcagcgcaga gatgatgcaa tgtggtgggt 7920  
 ccatgcaaca tggtgccagg acgcagagct tggggtgaac tcagcttca cccttaccg 7980  
 gtctctgtgg gatcttggga agccactttc ttctatgagc tttgtcttc ttgtctgtaa 8040  
  
 aatgggcaca taaccctgtc cctgtccttc tcacaggttg ctgtgagact ccaatgagtt 8100  
 gaaggatgtg cagatgcttt tggaaagtga aagtggggg gctactgtgt gactttgcat 8160  
 acacccaac tigtgacct tgcatatgtc tgagttgctg ccattgcaac agatcagagc 8220  
 tgggtggcctg ggtgtggaga aagggtttgt gtgggggaca tcctctggca agggtggcag 8280  
 cagcagaagt gaggggcctg gtcggtcatg tgtgctgacc cggcctgggc agcctgtggc 8340  
 cagggagagg acagctctc tgtaggaaga gcctgttctt ttccaaccag gtgagacctc 8400  
 ttcagtggag ccctggagcc ccctgtactc cacatcagtg cctcaggac ctcccggagc 8460  
  
 aggctaatat cagagaccaa gagggacact ggcagaggat cacagagacc ccagtccagg 8520  
 cagggactga gaagatcttg ccccctaagt tagtttcta gcaactgtgt gacaaattac 8580  
 caccctctg gttggaacaa gttgattctc tgcagtctg gaggccagaa gcctgaatca 8640  
 gtgtcggcag gaccactttc tccccggggg ctccaggag aagcttctct tgcctcttc 8700  
 gtgtcccaac agcggcagca caccaatccc agcctctgtc ttcacacagc cttctctgtg 8760  
 tctctctct cttcattgtc tcataaggac acttgtcatt ggatttaggg cccactggat 8820  
 cctccaggat gatctcatgt ggggaacctt aaccacatct gcaaggacc tttttccaaa 8880  
  
 taaggtcaca gccacaggtt gtgggggtta ggatgtgagt gtatctctt ggcagccact 8940  
 gtccctctct ctcccttggg ccagaagcag acgtggggcc ctttcttccc cataggatgc 9000  
 ccatggattg cccccctcc cgcttcccc gagtgtctgt gggaggtggc aggaatggca 9060

ggcaggggtg tggAACcct tctggagtca tatcaagggc ttggctggag gaagtctcc 9120  
 tggagctgtt gggctggcat ggggcaggct ggctgggccc agcagcagct tcttcattca 9180  
 tggggaggcc acaagcatgg gccctagagc tggctgccgc cctcaaacc agacctgca 9240  
 ctcttaactg tggaccttg catacgtcac tcacctctc tgatcttcag gttcctctgc 9300

aaaaggaggg taatgataac cctcactctg gggggctgtt tggagggtta aatcagttat 9360  
 tgctgtagca tgcatttctc tgtcaggat tgagtgggt gctgtgatt tagccctgca 9420  
 ttttctttt cttaccattc aataataacg tttgagcac ccactgtgcg ccaggcacca 9480  
 tattagtgtc tggggataca aatgtgaatg aaatgaatgt ggtctcttcc cccaacagtg 9540  
 tatccagaag attaatccat tccttaaaca aatgctactt gacacagatt agttctggat 9600  
 aggctgagag ctctgaagga gtgcaggcag ctgcgacct gtgtatccag cagaaggatc 9660  
 aggaaaggat tcctggagga agcgtgttc tagccaagac ctacgggggc attattaacc 9720

aggcaaaggg gacggtgtcc aagcagtga atgaactgg attgaagctg tgaggcagga 9780  
 gggagtgtgg cctgtgcaga agggaccgag gctggtgaga ccaggagggc ctgggtggcc 9840  
 tccaggtcag atgtgaaagg aagaacttgg ccacagtctg agcttctcag gcgtatggca 9900  
 gggctgcctg gtgagagga atgagctccc tgctctggag gtatgcaagc aggactgggc 9960  
 tctcacctgc cagaggccac agagcttcc agaggctgga agaggccact ccaaggctc 10020  
 tttgccctg agagtgtgg ctcttcttga ggccacctg ccacgtgtc acaggaact 10080  
 agcagccct gcctcacccg ggggtttgga agatagaggg aggcctagga agggcctgt 10140

gtctcatccg agctgggccc ctttcagcc tctcactgga aggaagcca aggatgttc 10200  
 tgtggggct ttiaccaggc ccacctgcc tctgtggcc atgcttgag cctcctgacc 10260  
 ctgtcccagc aggacagtgg gctggtgtga gcgggcagga accgcctgca cttagaaggt 10320  
 gtggggctgc ctcccagc ttcactctgc cgtggggcc acacccagg cccagggatg 10380  
 ggacccaca gtggtcacat catcttgag cagaaccag gtacagctcc tggagcagat 10440  
 ggtggtcca agcacgggtg ggaccagaaa ggactctcac ctgggctaac tcagctgcag 10500  
 cctcagtcc ctctcacac acgacgagga acatggactg gaagcctgcc cagcaggcct 10560

tctgctgat gtgcgttgtg tggcttacgt ccaggaggg aagcagctc tgtgctgtct 10620  
 tctagataag cctgtattcc ccggctgtc tccaatgta tccagttgtc cgtcagcct 10680  
 ggaagctctg agggaaaacc ttggctgct tcctgagcac ctgtatcccc tgcagccagc 10740  
 ccggggcctc tgctaggagc agactgagca tggcttatgg gcctggcacc atctggcctc 10800  
 tgcccactt gctgacctg tcttgtgtct gcccttca cattccatag cccagctcaa 10860  
 tatctagtgg ttctctagg gtggcgagca ctgtttgtc tccagatgtc ttcaggtcgg 10920

agctcacagc gctctcagcc accccttccc agtgtagcac cgggcacatg gtagatgcct 10980  
  
 attgatgagt gaaagctcct aacacactca gagagcaagg actccgcctc atcccacagc 11040  
 ctgggaggag aggcagactg ccaaggacct gctcagcatg ctacagaaga aaccaaagtg 11100  
 cccacgggac tgatcagtgg agcttcctgc cgagactgga ggccttaggg cagggtagac 11160  
 agtgtgtgtg caggctgggg actcacagtt cggactgtgc ccagacctac tagcatagtg 11220  
 ggtgggtggg aggatgcggg actgggggcc gaccttgcct gaaattcatg tgggatctca 11280  
 gagcagccac tgaattgctc tgtagggggc taaatagtgg ccccccacaga tacacacacc 11340  
 cagacagagc ctgtgagcca gacctattt ggagaaaagg tctttgtaga tgtaattaag 11400  
  
 catctcaaga tggcatcatc tggattatgc ggtgggctgt aagtcctgtg atgtgcttt 11460  
 atgagagaaa ggcagagggg gatttgacac acacaggagg ggccacgtgg agacagaggt 11520  
 ggagattgga gaaatgtggc cacaagccag ggaacaccag cagccaccag aagccggaag 11580  
 acgtgaggca gggttcttcc cagagccttc gctgctgagt ctgggaattt gtgaccgaag 11640  
 ccataagaag tgggtacacg ccctgagcct cccacacttg ctcacctgic ctgagatgag 11700  
 aatctctact ctgcagcata tttggaggat cactgcgggg gccacagagg tgctgttcag 11760  
 atggcacttc agaagactca ggagaccctg gggcaggagc agtttgactg acagcccaga 11820  
  
 gggctgcctt ctgattccac ctgaggcctt gcttttctg gctgcagggg ttccagggcc 11880  
 aggccatttc cgctggcgca ggactctgct agcagcaacc tgcctgaagt cttcctttgg 11940  
 cctggctgag agtttctgag acctgcgctg gacggagggt gcttccttcc ttgcttctt 12000  
 tcttctctc tccttctcc atccagcagg ctggacctgc ctggcatctg tgagctctcc 12060  
 ctactttctc ctatacceta acctttgtcc tgcatgggcg actccccag tgagtctctt 12120  
 gcagctttta cccagtgcc tgcttcttgg agaatccaaa ctgatccagt tagggatgat 12180  
 aaagttagg gtaggcgctc ggtgactgtt ttctctgagg ttgtgactcg tgtgaggcag 12240  
  
 aagcagtccc cgtgagccct cctggtatct tgtggagtgg agaacgcttg gacctggagc 12300  
 caggaggccc agacatacat cctgtccgag ctgcagcttc ctgtctctaa aatgagccgg 12360  
 ccagcgcagg tggccagaca tcactgttat tctccttga gcttttaaat cttgttgtct 12420  
 ttcttgcaga ctcggtgagc tgtgaaaggc tataataggg gctttatfff acacttgat 12480  
 actatfffft gaacattcat attattgtta gatattgata ttcatatgaa ggagcaggat 12540  
 gacttgggtc ctcttggca gtagcattgc cagctgatgg ccttggacag ttacctgccc 12600  
 tctctaggcc tcctttctt tgtctatgaa atacattata gaataggatg tagtgtgtga 12660

ggattttttg gaggttaaac gagtgaatat atttaaggcg ctttcaccag tgcctgggat 12720  
 gtgctctgta gtttctgtgt gttaactata aggttgactt tatgctcatt ccctcctctc 12780  
 ccacaaatgt cgccttggaa agacggaggc agcctggtgg aggtgtatct cctagacacc 12840  
 agcatacaga gtgaccaccg ggaaatcgag ggcagggtca tggtcaccga cttcgagaat 12900  
 gtgcccagg aggacgggac ccgcttccac agacaggtaa gcacggcct ctgatgggag 12960  
 ggctgcctct gcccataatcc ccatcctgga ggtgggtggg gactgccacc ccagagcgtt 13020  
 gcagctgtac tctgggttg cacccecccc agctgtcact gtcccctccc tgccatcagt 13080  
  
 tgtgggaagg gcgttcatcc atccagccac ctgctgattt gttatagggt ggaggggggg 13140  
 tctttctcat gtggtccttg tgttcgtcga gcaggccagc aagtgtgaca gtcattggcac 13200  
 ccacctggca ggggtgtca gcggccggga tgccgctg gccaagggtg ccagcatgcg 13260  
 cagcctgcgc gtgctcaact gcccaaggaa gggcacggtt agcggcaccc tcataggtaa 13320  
 gtgatggccc cagacgctgg tctctctcca tctggacctg gcctgggagg tgcttgggc 13380  
 tggcccagg gagagctaat gtctcctaac caagaatgct gtggcagcct ctgccgaga 13440  
 gccagagaac cagagtgcc aagctggcag ggttcccagt ggccacgagt gcagatgaag 13500  
  
 aaaccaggc cccaagagg tcatgcaggt agcccaggga gttcagcctt gaccctgggt 13560  
 caatgacctt tccacagttc cacactgctc cctttttaa atccggtgat gtctttatgt 13620  
 cttttgttat gttatctca atgtggaggg actcgagggt atctaagcaa actttttcta 13680  
 tcttctgctt gcatacctct gagaccaggg gactcactca cttgcatgac tgggccctgc 13740  
 aggtcacact ggccaggcag atgtggtgga ggaactggca gaggactttt tctagactgt 13800  
 gactacattt agtccacca gcggcecccc tatgaagtcc agttgagaac taggactctg 13860  
 gggccgggtg gacagagaag agggagggtt ctctccctta ctgacttctt tctgtggcca 13920  
  
 gacattgagc aaggcctctg tacagcatgt cctggggctg gccttgccgt agctgctaaa 13980  
 tagttgacga aaccagtcca gagaggggag gtgactgcca gggctgcaca gctcaagctg 14040  
 gggaactcgc tgggaaaact gtcagctctg ggcagcagct tgacttccac tgtaagcccc 14100  
 agccccagg gtcaaacact ggctctggtg ctggcagagg cagcccacta gectgtttea 14160  
 aaggctgaga aggccaggga gtctgccctg tgctccacca gttctgcct gagactttcc 14220  
 tacaggtac aggttttgat gttcagttt aaaggcaaga atcaataacc ttctgcecca 14280  
 tcaggtgacc cctgtgct gtcccaccc tttattgact gacctcggt cagtcaggtc 14340  
  
 agttcctgaa ggtcagtggt tggaggggag gctgttcttt cccagaaagg ccttccccag 14400  
 gcctggtgct ctggcctctg gaggacttcc tggagaagtc ccttctttgg ggtcccagtc 14460  
 agtgtatggg aagcccttat tgcattgacct ggcacggggc aggggctcaa cagtcactat 14520

tgccttcctt gccactgcca tttcctcctc tgtaagcagg tgattgtgtg tccagictga 14580  
 gcacagagat aagcacacag caggtgctta ataactagca gctgtaggct gggcgcggtg 14640  
 gctcatgcct gtaatccag cactttggga ggccgaggtg ggcagatcac ctgaggtcag 14700  
 gagttcgaga ccagcctggt caacatgggt aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 14760  
  
 tagccaggca tgggtgtggg tgtctgtatc ccagctactt gggaggctaa ggcaggagaa 14820  
 tcgcttgaac ccaggagggt gaggttgcag tgagctgaga tcgtgccact gcaatccagc 14880  
 ctgagtgata gagcgagatt ccatctcaaa aataaataag taaataacta gcagctgtaa 14940  
 atgtggctgt tgttcttcac ctccacactc agtgccactc cactccctcc ctccgtggtg 15000  
 tgaggggctt cactagctgt ctctaggag gagcatggct gtgagattcc agctccatcc 15060  
 ttggccacgg ctctggaga catcttagag gccaggatcc agaaggctcc cacacctcat 15120  
 ttgacagggg agaagctgtc agttccaggt cccttgcac atcagggcca gagctgcgtt 15180  
  
 aggcctccag tctccagcc actgggccag agctcacagg ctggcagagg gttagaactg 15240  
 ttactggtgg ctgggtgcag tggctcacgc ctgtaatctt agcactttgg gagggcaagg 15300  
 cgggaggate ataggtcag gacatcgaga ccatccttgc taacacgggt aagccccgtc 15360  
 tctactaaaa ctacaaaaa ttagccgggc gtggtggcag gcgcctgtag tcccagctac 15420  
 tcaggaggct gaggcaggag aatggcgtga acccgggagg cggagcttgc agtgagccga 15480  
 gattgcgcca ctgcactcca gcctgggcaa tagagcgaga ctccgtctgg aaagaaaaaa 15540  
 aaaaaaaga gctgttactg ttgacagtag catgaggtag accatggcct gcacaaaaat 15600  
  
 gggggagtgg agtgccactg aggccagaag gaaccacacc ctcaagggtg gggagtatg 15660  
 gtatgggggg tcctagcat ggagtccttt aattctttag acaatcctgg gagcaactgt 15720  
 ccctgtttca cagagggcgg gccacacag ctggtgagtg ggcagccaag actctgttca 15780  
 agtttgtgtg ggtccaacac ttgcccacac ggtggagggg catctgagcc aggcctcaga 15840  
 gagtggcggg ggaagtggg tggggaagtg tgcccttctc attcctctga ggctcatcct 15900  
 cttggtgcct ctctttcatg gaaaggata ataaggttat tgtgagatc ccctgagttc 15960  
 gtatattcag acgcttagac agagccaggc acagagaagg gcccggggtt ggctagtttg 16020  
  
 attgctggtg taattgctaa tatcttcag ttigtattgg tcaagttct gcagagaagc 16080  
 agaaccagta ggatgtatat attaagagt tcaagctcat gtgaccgtgc gggctggcaa 16140  
 gtctgaaatc cgcagggcag gccaggcagg ctggcaattc ctgcagaatt tgatgttgca 16200  
 atactgagtc ctaaggcagt cctggggcag aattccttct tccctgggag gcctcagttc 16260  
 gttctcttaa ggcttcaac tgattaaatg aggcctgccc aagttataga gagtaacctg 16320  
 ccttactccg tcttctgatt taaatgtag tcacatctaa aaaatatttt cgcagcagca 16380

ttccactgg cttttgacca aacatcaggc cacaaagtgg atccccaaaa ttaacatca 16440  
  
 ctctgtgcct gtaagggagg ggctgggaaa ggggagcagg tctcccaag gggtgacctt 16500  
 ggctttgttc ctcccaggcc tggagtttat tcggaaaagc cagctggtcc agcctgtggg 16560  
 gccactggtg gtgctgctgc ccctggcggg tgggtacagc cgcgtcctca acgccgctg 16620  
 ccagcgctg gcgagggctg gggctgtgct ggtcaccgct gccggcaact tccgggacga 16680  
 tgctgcctc tactccccag cctcagctcc cgaggtaggt gctggggctg ctgcccgaag 16740  
 gcgcgggtag ggggaggagg gcggagggcg gagggagggc gggcgggcag gcgggcttct 16800  
 tgtggcacgt gggcttcttg tggcacgttc ctggaggccg aacccttctg gctttggaag 16860  
  
 gagtctcag agacccccgc catgcgggag gctggggagg aaggggctcg aaacctccat 16920  
 catcgagag tctgaatagc agtggccccg ccatgcgcc acgtagcggc gcctacgtag 16980  
 ccacgcccc acacccgctc ctggccactc tcctctga aggtcttctg gtaccgccc 17040  
 cctccccatc tccatccca ggccctgct cctctgcca atactcttg gcctcctg 17100  
 ttgtccagct ctctccgcg ctccatgact gacaactga gcaaggctaa tgtgaatggg 17160  
 agcggttgag ggctcagacc tctcaccega ggaacatcca cagagtgtgc cgcagcccc 17220  
 gtgcagtgtg gctgcgggga cacagacacg gacccctggc cctgaggagc tggggggcag 17280  
  
 tgaccgtccc tctctgacc caccactcct ccagtgtcag gacactgcgg gtatctaggg 17340  
 gaaggaaatct tgttccactt caagctgga acttcaagtc tgtgtgtgtg cgtgcgcgcg 17400  
 cgcgcttgg ggggtgggggt tgcagagcag atgcgtacct gacagcgta acctaggtcc 17460  
 cccctggcct atcaaggctt ccctggcggc cgaatttaa ggcatcaagc aaacaaagcc 17520  
 caacacatct ctgccttctc ctctcagttt cccccgtgg cacttagaac cacttgatac 17580  
 accgaatagt ttctatctc cccactagg atgtaaactc cacaggggca ttgggaatgc 17640  
 tgcttgcta tggtagggac agaggggagc accagggcgg ggcaggggtg ccagattct 17700  
  
 gcctgggcag tcagatttc cttaggaggg gacatttgag tgggaccaa acaggtgtat 17760  
 agcagttgtc cagcccagct ggcaaggcct gactctgct ctgcaacccc tctcttgggc 17820  
 tctttctct gccaccacc tctcacctt tccaggcat cacagttggg gccaccaatg 17880  
 cccaagacca gccggtgacc ctggggactt tggggaccaa ctttggccgc tgtgtggacc 17940  
 tctttgccc aggggaggac atcattggtg cctccagcga ctgcagcacc tgctttgtgt 18000  
 cacagatgg gacatcacag gctgtgccc acgtggctgg taagtcacca cccactgcc 18060  
 tcggccaccg tgatgctaac agccccttg gcagtcaggg tctgtgccg gacctccagt 18120

gccaggctct gtgcaggggg accagagatg aagtaggcct gatggcgcct tcaaggacac 18180  
 tcagtctgat gaggaggcgg agtgcacaga gaaacacga ggtcaggcct gtattagagg 18240  
 gagcccagag gaggcacctg cccagcccga gggcagaga aggcattctg gaggaggac 18300  
 atttgatcgg gagcttgatg gatgaatagg agttcacctg gccgataaga cagcaactac 18360  
 caaggcttag aggtgtgaga ggagctgtc ttacctact gagtaaggac tgcaggcggc 18420  
 ttaccttca gaagagagct tagtgtctgt gtgcacgtgt gtttgtgtgt atgtgtgtgc 18480  
 gtgtgtgcac tggcaggagt cccctgctgg ggcaggaggg ccgggccatc accatcttc 18540  
  
 accattcacc cctgcaccag gcattgcagc catgatgctg tctgccgagc cggagctcac 18600  
 cctggccgag ttgaggcaga gactgatcca cttctctgcc aaagatgtca tcaatgaggc 18660  
 ctggttcctt gaggaccagc gggactgac cccaacctg gtggccgcc tccccccag 18720  
 cacccatggg gcaggaagc aggatggcag ggtgggcaag tccaggctgg ggcttgggag 18780  
 gtctgtgtga ccttgacagt ctctccctc tccttgtct gtgtaaggag gatgaccca 18840  
 ccttaaatag gattaaatga gaatgggct ctgaaaggc tgtgcaatat ttcataacg 18900  
 tgttttata gagacagtg agtatgtct ttaagcctc ctctctcta ccatgaacta 18960  
  
 aagatttctg tggaggtccc ctactcca gcacccctc ctcatcccag gcctttttg 19020  
 caggttgga gctgtttgc aggactgtat ggtcagcaca ctggggcct acacggatgg 19080  
 ccacagccgt cgcccgtgc gcccagatg aggagctgct gagctgctcc agtttctca 19140  
 ggagtgggaa gcggcggggc gagcgcattg aggtgactgt accctcctt cgtgtgtgtg 19200  
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcagtgtg gggccctcag 19260  
 ggacccccag caagccctc catctccag actccagctc ttctgtaagc ttacaggcct 19320  
 ggccagacca ggagtggggc actcctcact tcacggcct gggggctgct ggagagagcc 19380  
  
 acagcgggaa gggtttcta gaggetgcag gacagtgctg gatggattt caatgctcac 19440  
 ctgggtgtga gcgtgcgga gggcccgctg aggtcagcg atctgctact ctggactcag 19500  
 ccatctctag gccctctca ctcaggtgct ccatggtct gggagctgag aaatctcaa 19560  
 ccagcaaaaa agtggaatg atgttgatgc tacaggatag tgcacagatg ccatctggtt 19620  
 gcagcattt ggtggaaggc cagtcccag ctaggagagt gaggaggggc aggcatttct 19680  
 ggcttgagga gatggggtct taatgctcgt gtgagaggca gagtgggtgg agtggagctg 19740  
 gctggatcct tgetttggcc tcctggattt ctctctatct ccattttgaa accactctgt 19800  
  
 gtttgaaga acttttagt attcagagct gccactggc agaacagtct tccttgggca 19860  
 ggagtgagct cctgtcccc agaaggctgg gctggtctgg cccctggcag ggacactgat 19920  
 gagggtgctt gattgatcc tgtctagtc cttctgtgt tttcaaagcc cattttaaag 19980

cagattccca tticcgtctt tgactctaag gcccaagggg gcaagctggt ctgccgggcc 20040  
 cacaacgctt ttgggggtga ggggtgtctac gccattgccca ggtgtctgcct gctaccccag 20100  
 gcccaactgca gcgtccacac agctccacca gctgaggcca gcatggggac ccgtgtccac 20160  
 tgccaccaac agggccacgt cctcacaggt aggaggctgg gcttgcctg gggtagaggag 20220  
  
 gggctctctt ctccttatgc acccactgcc cgcgaggctt ggtcctcaca agtgtgatcc 20280  
 atgagactca agcctgactt gcagttccat actctggttc tgccacttcc atgccccttg 20340  
 agcctgggca ggtgacctta cttctcctca tctcagcttc ctctccata agagggaaaa 20400  
 aggtattacc tgcctcattg tgttgcaagg agatgggcag catctagggc actggcctgg 20460  
 agtatcgag gtgctttgcc taagggtgtg cagtccagga gaggcagctc cagagagagg 20520  
 cccccggctg gggctgaaag gagggcagac ctcggtttga attcacct gccgctctat 20580  
 agctgtgtga cttgggcaaa ttacttaaca tctctgtatg aggaaatgat gagtgtctaa 20640  
  
 cacttagctt agtcccggga caatataaat tctagctatc gttactattg tttcatcac 20700  
 ccgttgcttt aaaatccagc ctctgggata ggcaactatt gacgggctac cctgtgtcga 20760  
 aaacatgccc aggcaggtag caggaagtca cagatgggga cctcttgggg catcaaggga 20820  
 tgggtgcctg aggctgagct gttctggttg ggtggagcat gagaggtctg ggaagacagt 20880  
 gggactccag cctggaataa gaggctcaga gttgatctc gtctgagcac gtccagggga 20940  
 accactgagg gtttgggaac aggagagtga gggtgagaac ctggttctgg gcacagcagg 21000  
 ctggcatgta ggatggatgt tcaggaaaga tgagcatagt caggtaggctg gtgcccttgt 21060  
  
 ccaggggaga ggcctcgtca ggttcagggg tcttggttgg gagggaagtc cgccatgctc 21120  
 taatcacgct cccctttgga agtgctcagc cgatgagctc acaggcacat gtcagtttga 21180  
 agtcatgga tctgactcca tgaagcgcac ctcaaagagc accattttgc agctaaggga 21240  
 actgcaggct ggacatgctg agtggtctgc ccgagccctt gcagctagga catagagaat 21300  
 gctagtaacc acaaccctac catgttcaga gcacatgcca ggctccatgc tggggcttcg 21360  
 cacgtgtcat cttcacagt tccctgtgag taggtgtggt ttctctttcc atcttcaaaa 21420  
 tgagtaaaca ggcctcagt gtagetaagt aaccactatt ttaggtttct tagccaatgg 21480  
  
 gigtgtctga ctctaagcc catggagggc attctgaggt ggttcagaca gaccccggct 21540  
 tacccttgaa ctctgcctg ctggctgcat agggaggggc tggggggagt ttgagcatct 21600  
 caggccatag agcccctgcc tcactgtctc catctctggg tggaaagatg gtgttttccc 21660  
 tgagaaacta aggctcagag aggttgaatg gctctccaa ggtcacacag ctggtcagct 21720  
 gcagagtga gaacacagga gtccctgggtc tcaggccagc atctcttttt ttctttgagt 21780  
 tgtttctagg tttcctagct cttgcctcag accttaaga gagagggtct gatggggatg 21840

ggcaactggag acggagcatc ccagcatttc acatctgagc tggctttcct ctgccccagg 21900  
  
 ctgcagctcc cactgggagg tggaggacct tggcacccac aagccgcctg tgctgaggcc 21960  
 acgaggtcag cccaaccagt gcgtgggcca cagggaggcc agcatccacg cttcctgctg 22020  
 ccatgcccc ggtctggaat gcaaagtcaa ggagcatgga atcccggccc ctgaggagca 22080  
 ggtgaagagg cccgtgaggc cgggtgggtg gggtgctgcg tgtctctcct gcacagcttt 22140  
 tctgtgtcag tttgtgccac caccataaccg ccatgcatca ggggtggcgtg ttgccaggtg 22200  
 gatgctgtgg gcagcttccg ccattgtgtg gacagcatgt atatgtgtct ctgtgtggct 22260  
 gggctctgtt ttgcttttgt ccagatcagt aaggtttgct acctgggtac cccactccac 22320  
  
 ttggagtaga atgtgcataa atatggcata aagaaatgca atatgcatgc atttattgat 22380  
 tgatctatit ttttctgaga tgggtcttctg ctgtgttggc caggctggtc tcaaattcct 22440  
 gggctcaage aatcctctgg tctcagcctc cccaagtgtt gggattatag gcatgagccg 22500  
 ctgcacctgg cctctctgat ctatttaaca aacctgctgg gaggtctca gggtcaggag 22560  
 cagcaactgg ctctgaggac acagagctca ctgagccgtg acccagaggg ggtgcctgag 22620  
 ctgcatgctg aaggttgtta gcatgaccag caaggcaaga aaaggccctg ccgagattag 22680  
 caaggcatgt gccaaagcct ggaatgtgac agccgggcct tctagaaacc tgagtgtata 22740  
  
 actctcctta aaagccagta ggagctctc aaaaggcagc cctaaggagt ccaactctta 22800  
 atgaactcag agtcagtttt aaaatgcaag tctgtgttga ttctggctctg gatggatgat 22860  
 tcctcgagag caaaagacag tcttggctct ggatccactt gccctgggta cactgagggc 22920  
 tgctaggctc caggtgctct tcttggcact ggggagggat acaggcccaa gagacatgct 22980  
 gttctccctc ctggagcatc tattttagt gaggaagaca gaaaacaac cattaatata 23040  
 gactactgaa aagatgcgat ggagaaaact atagcaagga agggaatggg gtgggagaga 23100  
 ggtcaggaga ggtctcgtctg acaaggtgga cgaaacaggc catgaggcag agaacatgtt 23160  
  
 ccaggcaaag caaaggcccc caggtgggga tgtgcaggga gtaccaggaa accagagagg 23220  
 tgggaatagt tatgagatgg ggggtgcctc agaggggaca gggccaagtc aggtgagacc 23280  
 tgagggtcac agtcagcagt gagctgggac catgcagggg tctggcctca gaggagtgtg 23340  
 gtctggcctg gatctgaacc tctcactgtg gcctagctgc tgagctgaga agagatgaca 23400  
 aggaccttgg gcagaagcag ggagactgga gggaggcggg ggagggtcca ggcgttgggg 23460  
 cggggctcag gctggagtct gaaggagacc tgcaggcctg gtgggtggat gtgggtggga 23520  
 gagggggagg atggcaccaa ggctcgggcc cctggacaga tggagtgtcc attaagtggg 23580

atggggcagg ctatggggcc atcagtttca gagggatgag tttggcactg gcatgtagg 23640  
 catctgtcta tctccacggc cctcaacca ggcatgaagc aggagctcac gtgtttggc 23700  
 agccatggtg cagaaccgcc tgggtgggag gtgcgggggtg ggagatacac ggttgtgtcc 23760  
 caaatgggct ctgagccagc gagggccgtc tgcactttgg cctcacagaa ggatgtcgga 23820  
 gggagaaatg aagtgtgggt gggggctccg ggccacgcta gacatgtgct ttcttttct 23880  
 cgggctctgg caggtgaccg tggcctgcca ggagggctgg accctgactg gctgcagtgc 23940  
 cctccctggg acctcccagc tcttgggggc ctacgccgta gacaacacgt gtgtagttag 24000  
  
 gagccgggac gtcagcacta caggcagcac cagcgaaggg gccgtgacag ccgttgccat 24060  
 ctgctgccgg agccggcacc tggcgcaggc ctcccaggag ctccagtac agccccatcc 24120  
 caggatgggt gtctggggag ggtcaagggc tggggctgag ctttaaatg gttccgactt 24180  
 gtccctctct cagccctcca tggcctggca cgaggggatg gggatgcttc cgctttccg 24240  
 gggctgctgg cctggccctt gagtggggca gcctccttgc ctggaactca ctcaacttgg 24300  
 gtgcctctc cccaggtgga ggtgccagga agctccctcc ctcaacttgg ggcatttcac 24360  
 cattcaaca ggtcgagctg tgctcgggtg ctgccagctg ctccaatgt gccgatgtcc 24420  
  
 gtgggcagaa tgacttttat tgagctcttg ttccgtgcca ggcatccaat cctcaggtct 24480  
 ccaccaagga ggcaggattc ttccatgga taggggaggg ggcggtaggg gctgcaggga 24540  
 caaacatcgt tggggggtga gtgtgaaagg tgctgatggc cctcatctcc agctaactgt 24600  
 ggagaagccc ctgggggctc cctgattaat ggaggcttag ctttctggat ggcacttagc 24660  
 cagaggctgg agacaggtgc gccctgggtg gtcacaggct gtgccttggg ttctgagcc 24720  
 acctttactc tgctctatgc caggctgtgc tagcaacacc caaaggtggc ctgcggggag 24780  
 ccatcaccta ggactgactc ggcagtgtgc agtgggtgcat gcactgtctc agccaaccg 24840  
  
 ctccactacc cggcagggta cacattcgca ccctacttc acagaggaag aaacctggaa 24900  
 ccagaggggg cgctcctgcc aagctcacac agcaggaact gagccagaaa cgcagattgg 24960  
 gctggctctg aagccaagcc tcttcttact tcaccggct gggctctca tttttacggg 25020  
 taacagttag gctgggaagg ggaacacaga ccaggaagct cggtagtga tggcagaacg 25080  
 atgcctgcag gcatggaact ttttccgta tcaccaggc ctgattcact ggctggcgg 25140  
 agatgcttct aaggcatggt cgggggagag ggccaacaac tgtccctcct tgagaccag 25200  
 cccacccaa gcaagcagac atttatcttt tgggtctgtc ctctctgtg ctttttaca 25260  
  
 gccaaacttt ctagacctgt tttgcttttg taacttgaag atatttatc tgggtttgt 25320  
 agcattttta ttaatatggt gactttttaa aataaaaaca acaaacgtt gtcctaac 25378

<210> 4

<211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 tggacctctt tgccccaggg ga 22  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 acctggagaa acggggtccc ct 22  
 <210> 6  
 <211> 354  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <  
 220><223> Synthesized  
 <400> 6  
 Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg  
 20 25 30  
 Ser Lys Phe Lys His Lys Leu His Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys  
 35 40 45  
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val  
 50 55 60  
 Gly Tyr Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys  
 85 90 95  
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu  
 100 105 110  
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp



<210> 7

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 7

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe  
 1                    5                    10                    15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Arg Ile Leu Pro Ser Gln Arg  
                   20                    25                    30

Ser Lys Phe Lys His Lys Leu Arg Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys  
                   35                    40                    45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val  
                   50                    55                    60

Gly Tyr Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu  
 65                    70                    75                    80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys  
                   85                    90                    95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu  
                   100                    105                    110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp  
                   115                    120                    125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr  
                   130                    135                    140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly  
 145                    150                    155                    160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser  
                   165                    170                    175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser  
                   180                    185                    190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val



Ser Lys Phe Lys His Lys Leu His Leu Val Phe Cys Val Tyr Gln His  
 35 40 45  
 Thr Gly Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val  
 50 55 60  
 Gly Tyr Val Ile Asp Ser Trp Ser Cys Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys  
 85 90 95  
  
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu  
 100 105 110  
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp  
 115 120 125  
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr  
 130 135 140  
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly  
 145 150 155 160  
  
 Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val  
 195 200 205  
 Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala  
 210 215 220  
  
 Lys Phe Lys His Glu Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr  
 225 230 235 240  
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly  
 245 250 255  
 Tyr Val Tyr Asp Lys Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile  
 260 265 270  
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu



Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp  
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr  
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser  
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val  
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala  
 210 215 220

Lys Phe Lys His Glu Leu Arg Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr  
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly  
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Lys Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile  
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu  
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro  
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val  
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser  
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser  
 340 345 350

Ser Pro

<210> 10

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<

400> 10

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1                    5                    10                    15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg

                  20                    25                    30

Ser Lys Phe Lys His Lys Leu Leu Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys

                  35                    40                    45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

                  50                    55                    60

Gly Tyr Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu

65                    70                    75                    80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

                  85                    90                    95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

                  100                    105                    110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

                  115                    120                    125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

                  130                    135                    140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145                    150                    155                    160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

                  165                    170                    175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

                  180                    185                    190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val





Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro  
 290 295 300  
 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val  
 305 310 315 320  
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser  
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser  
 340 345 350  
 Ser Pro

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 12

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Arg Ile Val Pro Ser Gln Arg  
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Lys Leu Arg Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys  
 35 40 45  
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val  
 50 55 60  
 Gly Tyr Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys  
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu  
 100 105 110  
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp  
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr  
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser  
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val  
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Arg Ile Arg Pro Val Gln Arg Ala  
 210 215 220

Lys Phe Lys His Glu Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr  
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly  
 245 250 255

Tyr Ala Tyr Asp Lys Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile  
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu  
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro  
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val  
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser  
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser  
 340 345 350

Ser Pro

<210> 13

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 13

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1                    5                    10                    15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg

                  20                    25                    30

Ser Lys Phe Lys His Lys Leu Asn Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys

                  35                    40                    45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

                  50                    55                    60

Gly Tyr Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu

65                    70                    75                    80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

                  85                    90                    95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

                  100                    105                    110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

                  115                    120                    125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr

                  130                    135                    140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145                    150                    155                    160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

                  165                    170                    175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

                  180                    185                    190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

                  195                    200                    205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala







130

135

140

Val Leu Asp

145

<210> 16

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 16

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ile Phe Ala Arg Ile Leu Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys

20                    25                    30

Leu Arg Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Leu Asp Ser

50                    55                    60

Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65                    70                    75                    80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85                    90                    95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115                    120                    125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130                    135                    140

Val Leu Asp

145

<210> 17

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 17

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys  
                   20                    25                    30

Leu His Leu Val Phe Cys Val Tyr Gln His Thr Gly Arg Arg Trp Phe  
                   35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ile Asp Ser  
                   50                    55                    60

Trp Ser Cys Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65                    70                    75                    80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
                   85                    90                    95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
                   100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
                   115                    120                    125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
                   130                    135                    140

Val Leu Asp

145

<210> 18

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 18

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Ile Phe Ala Arg Ile Val Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys

20 25 30  
 Leu Arg Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Leu Asp Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 19

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 19

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys  
 20 25 30

Leu Leu Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Leu Asp Ser  
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn



Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 21

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 21

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Arg Ile Val Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys

20 25 30

Leu Arg Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Leu Asp Ser

50 55 60

Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 22

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 22

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ile Phe Ala Arg Ile Lys Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys

                  20                    25                    30

Leu Asn Leu Val Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

                  35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Leu Asp Ser

                  50                    55                    60

Gly Ser Val Ser Phe Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65                    70                    75                    80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

                  85                    90                    95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

                  100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

                  115                    120                    125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

                  130                    135                    140

Val Leu Asp

145

<210> 23

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 23

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ile Phe Ala Arg Ile Val Pro Lys Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Ser

                         20                    25                    30

Leu Arg Leu Phe Phe Ala Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

                         35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Gln Asp Ser

                         50                    55                    60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Asn Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65                    70                    75                    80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

                         85                    90                    95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

                         100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

                         115                    120                    125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

                         130                    135                    140

Val Leu Asp

145

<210> 24

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 24

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu

                         20                    25                    30

Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

                         35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
 50                      55                      60  
 Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
                                  85                      90                      95  
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
                                  100                      105                      110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
                                  115                      120                      125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
                                  130                      135                      140

Val Leu Asp

145

<210> 25

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 25

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1                      5                      10                      15

Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
                                  20                      25                      30

Leu Ala Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
                                  35                      40                      45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
                                  50                      55                      60

Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65                      70                      75                      80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
                                  85                      90                      95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110  
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 26

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 26

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
 20 25 30  
 Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
 50 55 60  
 Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 27

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1                    5                    10                    15

Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu

                  20                    25                    30

Leu Arg Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

                  35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys

                  50                    55                    60

Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65                    70                    75                    80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

                  85                    90                    95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

                  100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

                  115                    120                    125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

                  130                    135                    140

Val Leu Asp

145

<210> 28

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 28

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
                   20                    25                    30  
 Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
                   35                    40                    45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
                   50                    55                    60  
 Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
                   85                    90                    95  
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
                   100                    105                    110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
                   115                    120                    125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
                   130                    135                    140  
 Val Leu Asp

145

<210> 29

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 29

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Tyr Ala Arg Ile Arg Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
                   20                    25                    30

Leu Arg Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45  
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
 50 55 60  
 Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110  
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125  
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp  
 145

<210> 30

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 30

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Tyr Ala Arg Ile Arg Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
 20 25 30  
 Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Ala Tyr Asp Lys  
 50 55 60  
 Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp  
 145

<210> 31

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 31

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser  
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu  
 20 25 30

Leu Val Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe  
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys  
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn  
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala  
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser  
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala  
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala  
 130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 32

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 32

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Val Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Glu

20 25 30

Leu Ala Leu Gly Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Lys

50 55 60

Gly Ser Val Ser Ala Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 33

<211> 19

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence  
 <400> 33  
 tggacctctt tgcagggga 19  
 <210> 34  
 <211  
 > 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence  
 <400> 34  
 tggacccttt gccccagggg a 21  
 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence  
 <400> 35  
 tggacctctt tgcccagggg a 21  
 <210> 36  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence  
 <400> 36  
  
 tggacctctt ttgccccagg gga 23  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence  
 <400> 37  
 tggacctctt tgccagggga 20

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence

<400> 38

tggacctctt cccagggga

19

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence

<400> 39

tggacctctt tccagggga

19

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene-edited Homo sapiens sequence

<400> 40

tggacctctt ccagggga

18