



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월29일

(11) 등록번호 10-2814622

(24) 등록일자 2025년05월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/67* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 25/08* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/67* (2013.01)  
*A61K 48/00* (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7012452
- (22) 출원일자(국제) 2019년09월26일  
 심사청구일자 2022년09월26일
- (85) 번역문제출일자 2021년04월26일
- (65) 공개번호 10-2021-0091699
- (43) 공개일자 2021년07월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/053268
- (87) 국제공개번호 WO 2020/069199  
 국제공개일자 2020년04월02일
- (30) 우선권주장  
 62/736,847 2018년09월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 JP2006280250 A  
 US20080254540 A1  
 Plos Biology, Vol.15(5) e2000779, pp.1-29  
 (2017.05.16.)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 케이스 웨스턴 리저브 유니버시티  
 미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900  
 화이트헤드 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치  
 미국 매사추세츠 (우편번호 02142) 캠브리지 메인 스트리트 455
- (72) 발명자  
 콜러 제프리 엠  
 미국, 오하이오 44106, 클리블랜드, 10900 유클리드 애비뉴  
 스위트 토마스  
 미국, 오하이오 44106, 클리블랜드, 10900 유클리드 애비뉴  
 로디쉬 하비  
 미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 455 메인 스트리트
- (74) 대리인  
 특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 12 항

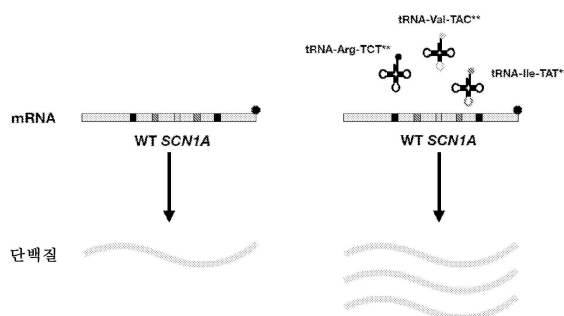
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 단백질 발현 증가용 및/또는 반가불충분성 장애 치료용 방법 및 조성물

## (57) 요약

비-최적 코돈에 혼성화되는 tRNA를 사용하여 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 포유동물 세포에서의 발현을 증가시키거나 비-최적 코돈을 함유하는 반가불충분성 유전자를 갖는 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61P 25/08** (2018.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

반가불충분성(haploinsufficient) 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 3가지 발현 벡터의 조합물로서, 대상체가 제1, 제2, 및 제3 비-최적 코돈을 함유하는 반가불충분성 유전자를 갖고, 각각의 발현 벡터가 대상체에 투여될 때, (i) 제1, 제2, 또는 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 각각 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 tRNA를 발현할 수 있고, 그로써 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는, 조합물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터가 바이러스 벡터인, 조합물.

#### 청구항 3

제2항에 있어, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인, 조합물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인, 조합물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 반가불충분성 유전자가 AGGF1, ARHGAP31, BMPR2, CHD7, COL2A1, COL3A1, CTLA4, CTNNB1, DLL4, EHMT1, ELN, ENG, FAS, FBN1, FOXG1, GATA3, GLI3, GRN, IRF6, JAG1, KCNQ4, LMX1B, MBD5, MED13L, MITF, MNX1, MYCN, NFIA, NFIX, NOTCH1, NSD1, PAX3, PHIP, PRKAR1A, RAI1, RBPJ, RPS14, RUNX2, SALL4, SCN1A, SETBP1, SHANK3, SHH, SHOX, SLC2A1/GLUT1, SOX10, SYNGAP1, TBX1, TBX3, TBX5, TCF4, TCOF1, TGIF1, TNXB, TRPS1, WT1, 및 ZIC2로부터 선택되는, 조합물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 반가불충분성 유전자가 SCN1A인, 조합물.

#### 청구항 7

제4항에 있어서, 반가불충분성 장애가 5q-증후군, 아담스-올리버 증후군 1(Adams-Oliver syndrome 1), 아담스-올리버 증후군 3, 아담스-올리버 증후군 5, 아담스-올리버 증후군 6, 알라질 증후군 1(Alagille syndrome 1), 자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA(Autoimmune lymphoproliferative syndrome type IA), 자가면역 림프증식성 증후군 타입 V, 상염색체 우성 난청-2A(Autosomal dominant deafness-2A), 요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(Brain malformations with or without urinary tract defects: BRMUTD), 카니 복합체 타입 1(Carney complex type 1), CHARGE 증후군, 쇄골두개골 형성이상(Cleidocranial dysplasia), 큐라리노 증후군(Currarino syndrome), 데니스-드래쉬 증후군(Denys-Drash syndrome)/프레이저 증후군(Frasier syndrome), 발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(Developmental delay, intellectual disability, obesity, and dysmorphic features: DIDOD), 디조지 증후군(DiGeorge syndrome)(TBX1-관련), 드라벡 증후군(Dravet syndrome), 듀안-레이디알 레이 증후군(Duane-radial ray syndrome), 엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos syndrome)(유사 고전형), 엘러스-단로스 증후군(혈관 타입), 페인골드 증후군 1(Feingold syndrome 1), TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(Frontotemporal lobar degeneration with TDP43 inclusions: FTLT-TDP), GRN-관련, GLUT1 결핍 증후군, 그리그 다증 증후군(Greig cephalopolysyndactyly syndrome), 유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1(Hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1), 전전뇌증 3(Holoprosencephaly 3), 전전뇌증 4, 전전뇌증 5, 홀트-오람 증후군(Holt-Oram syndrome), 부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(Hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal disease, HDR), 클리프스트라 증후군 1(Kleefstra syndrome 1), 클리펠-트레노네이 증후군(Klippel-Trenaunay syndrome)(AAGF-관련), 레리-웨일 연골골형성이상

(Leri-Weill dyschondrosteosis), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(Mental retardation and distinctive facial features with or without cardiac defects: MRFACD), 정신 지체, 상염색체 우성 1(mental retardation, autosomal dominant 1), 정신 지체, 상염색체 우성 19(mental retardation, autosomal dominant 19), 정신 지체, 상염색체 우성 29(mental retardation, autosomal dominant 29), 손발톱-슬개골 증후군(Nail-patella syndrome: NPS), 펠랑-맥더미드 증후군(Phelan-McDermid syndrome), 피트-홉킨스 증후군(Pitt-Hopkins syndrome), 원발성 폐동맥 고혈압 1, 레트 증후군(Rett syndrome)(선천적 변이체), 스미스-마제니스 증후군(Smith-Magenis syndrome)(RAI1-관련), 소토스 증후군 1(Sotos syndrome 1), 소토스 증후군 2, 스틱클러 증후군 타입 I(Stickler syndrome type I), 대동맥 판막 상부 협착증(Supravalvular aortic stenosis), SYNGAP1-관련 지적 장애, 트레처 콜린스 증후군(Treacher Collins syndrome), 모발비지절증후군 타입 I(Trichorhinophalangeal syndrome type I), 척골-유선 증후군(Ulnar-mammary syndrome), 반더 우드 증후군 1(van der Woude syndrome 1), 바르덴부르크 증후군 타입 1(Waardenburg syndrome type 1), 바르덴부르크 증후군 타입 2A(Waardenburg syndrome type 2A) 및 바르덴부르크 증후군 타입 4C로부터 선택되는, 조합물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 반가불충분성 장애가 드라벡 증후군인, 조합물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 방법이 대상체에게 스티리펜톨, 카나비디올, 케톤형성 식이, 클로바잠, 토피라메이트 또는 발 프로산을 투여하는 단계를 더 포함하는, 조합물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈이 ATA, GTA 및 AGA로부터 선택되는, 조합물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 제1, 제2 및/또는 제3 tRNA가 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된 tRNA로부터 선택되는, 조합물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터가 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 및 서열번호 9로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 조합물.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제



청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2018년 9월 26일자로 출원된 미국 임시 출원 제62/736,847호의 우선권을 주장하며, 이의 주제는 그 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 대상체에서 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 발현을 증가시키 고/거나 반가불충분성 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0005] 반가불충분성은, 하나의 유전자 대립유전자가 불활성되어, 남아있는 활성 대립유전자로부터 발현된 유전자 산물의 양이 적절한 유전자 기능에 불충분한 경우 발생한다. 다수의 장애가 반가불충분성과 연관되거나, 이에 의해서 유발된다.
- [0006] 반가불충분성 장애는 드라벡 증후군이다. 드라벡 증후군은 유아기에 시작되는 회귀하고, 치명적인 형태의 난치성 간질이다. 초기에, 환자는 장기간 발작을 경험한다. 두 번째 해에, 추가 유형의 발작이 발생하기 시작하는데, 이는 일반적으로 반복되는 뇌 저산소증으로 인한 발달 감소와 일치한다. 이것은 언어와 운동 능력의 발달 저하로 이어진다. SCN1A(전압-게이팅형 나트륨 채널  $\alpha$  소단위 암호화), SCN1B(전압-게이팅형 나트륨 채널  $\beta 1$  소단위 암호화), SCN2A, SCN3A, SCN9A, GABRG2( $\gamma$ -아미노부티르산 수용체  $\gamma 2$  소단위 암호화), GABRD( $\gamma$ -아미노부티르산 수용체  $\Delta$  소단위) 및/또는 PCDH19 유전자에서의 돌연변이가 드라벡 증후군과 관련되어 있다.
- [0007] 예를 들어, 드라벡 증후군은 하나의 SCN1A 유전자 대립유전자의 불활성화 및 기능성 SCN1A 유전자 산물의 양의 감소를 초래하는 SCN1A 유전자에서의 돌연변이에 의해서 유발될 수 있다. SCN1A 유전자는 일반적으로 뉴런 전압-게이팅형 나트륨 채널  $\alpha$  소단위, Na(V)1.1을 암호화한다. 마우스 모델에서, SCN1A에서의 기능 손실 돌연변이는 나트륨 전류의 감소 및 해마의 GABAergic 개재뉴런(interneuron)의 흥분 손상을 유발하는 것으로 관찰되었다.
- [0008] 따라서, 단백질 발현을 증가시키고, 드라벡 증후군을 포함하는 반가불충분성에 의해서 매개되는 질환을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법이 당업계에 필요하다.

### 발명의 내용

- [0009] 본 개시내용은 대상체에서 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 발현을 증가시키고/거나 반가불충분성 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 관심대상 유전자에서의 비-최적 코돈의 존재는 유전자로부터 전사되는 mRNA의 탈안정화를 초래하는데, 이것은 유전자에 의해서 암호화된 기능성 단백질의 생산에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 상황에서, mRNA 전사체의 탈안정화는, 예를 들어, 비-최적 코돈에 혼성화되는 특정 아미노아실화된 tRNA 분자의 풍부도가 동일한 아미노산과 아미노아실화된 세포에서 이용 가능한 다른, 상이한 tRNA보다 낮을 때 발생할 수 있다. 놀랍게도, 다른, 자연적으로 더 풍부한 tRNA에 비해서 세포에서 이러한 tRNA의 풍부도는 세포에서 생산되는 기능성 단백질의 발현 및/또는 양을 촉진시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 유전자 산물, 예를 들어, 단백질의 발현은 유전자에서 비-최적 코돈을 해독하는 tRNA의 최소 수(예를 들어, 1, 2 또는 3)의 도입에 의해서 증가될 수 있고/있거나 선택적으로 증가될 수 있다(즉, 유전자 산물의 발현은 또 다른 유전자 산물보다 더 많이 또는 임의의 다른 유전자 산물보다 더 많이 증가될 수 있다).
- [0010] 유사하게, 비-최적 코돈을 함유하는 유전자를 갖는 대상체의 경우, 대상체에게 유효량의 비-최적 코돈을 해독하는 tRNA를 투여하면 대상체에서 유전자로부터의 유전자 산물의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 대상체에게 tRNA를 투여하여 유전자 산물의 불충분한 발현에 의해서 매개되는 대상체에서의 질환, 예를 들어, 반가불충분성 장애를 치료할 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 특징은 이들을 인간 대상체에서 장애, 예를 들어, 반가불충분성 장애의 치료에 사용에 바람직하게 만든다. 예를 들어, tRNA는 비교적 작은 크기이고, 재조합에 의해서 생산될 수 있고, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 대립유전자가 불활성화된 돌연변이 또는 기전에 관계없이 반가불충분성 장애를 치료할 수 있다.
- [0011] 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 포유동물 세포에서의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 외인성 tRNA를 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 내로의 제1 외인성 tRNA의 도입은 제1 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0012] 특정 실시형태에서, 유전자는 제2 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제2 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 외인성 tRNA를 도입하는 단계를 더 포함하며, 여기서 세포 내로의 제2 외인성 tRNA의 도입은 제2 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 유전자는 제3 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제3 외인성 tRNA를 도입하는 단계를 더 포함하며, 세포 내로의 제3 외인성 tRNA의 도입은 제3 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.

- [0013] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 제1 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 포유 동물 세포에서의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 외인성 tRNA를 발현할 수 있는 제1 발현 벡터를 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 세포에서 제1 외인성 tRNA의 발현은 제1 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0014] 특정 실시형태에서, 유전자는 제2 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제2 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 외인성 tRNA를 발현할 수 있는 제2 발현 벡터를 도입하는 단계를 더 포함하며, 여기서 세포에서 제2 외인성 tRNA의 발현은 제2 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 유전자는 제3 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제3 외인성 tRNA를 발현할 수 있는 제3 발현 벡터를 도입하는 단계를 더 포함하며, 여기서 세포에서 제3 외인성 tRNA의 발현은 제3 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0015] 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터는 동일하다. 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다.
- [0016] 상기 발현을 증가시키는 방법 중 임의의 것의 특정 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, 세포는 중추 신경계 세포, 예를 들어, 뉴런이다.
- [0017] 특정 실시형태에서, 유전자는 AGGF1, ARHGAP31, BMPR2, CHD7, COL2A1, COL3A1, CTLA4, CTNNB1, DLL4, EHMT1, ELN, ENG, FAS, FBN1, FOXG1, GATA3, GLI3, GRN, IRF6, JAG1, KCNQ4, LMX1B, MBD5, MED13L, MITF, MNX1, MYCN, NFIA, NFIX, NOTCH1, NSD1, PAX3, PHIP, PRKAR1A, RAI1, RBPJ, RPS14, RUNX2, SALL4, SCN1A, SETBP1, SHANK3, SHH, SHOX, SLC2A1/GLUT1, SOX10, SYNGAP1, TBX1, TBX3, TBX5, TCF4, TCOF1, TGIF1, TNXB, TRPS1, WT1 및 ZIC2로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 유전자는 SCN1A이다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 반가불충분성 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 제1 비-최적 코돈을 함유하는 반가불충분성 유전자를 갖는다. 이 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 tRNA를 투여하여, 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료한다.
- [0019] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 제2 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제2 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 tRNA를 투여하는 단계를 더 포함한다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 제3 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제3 tRNA를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 반가불충분성 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 제1 비-최적 코돈을 함유하는 반가불충분성 유전자를 갖는다. 이 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 tRNA를 발현할 수 있는 제1 발현 벡터를 투여하여, 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료한다.
- [0021] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 제2 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제2 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 tRNA를 발현할 수 있는 제2 발현 벡터를 투여하는 단계를 더 포함한다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 제3 비-최적 코돈을 함유하고, 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제3 tRNA를 발현할 수 있는 제3 발현 벡터를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0022] 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터는 동일하다. 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다.
- [0023] 상기 치료 방법 중 임의의 것의 특정 실시형태에서, 대상체는 인간이다.
- [0024] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 5q-중후군, 아담스-올리버 증후군 1(Adams-Oliver syndrome 1), 아담

스-올리버 증후군 3, 아담스-올리버 증후군 5, 아담스-올리버 증후군 6, 알라질 증후군 1(Alagille syndrome 1), 자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA(Autoimmune lymphoproliferative syndrome type IA), 자가면역 림프증식성 증후군 타입 V, 상염색체 우성 난청-2A(Autosomal dominant deafness-2A), 요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(Brain malformations with or without urinary tract defects: BRMUTD), 카니 복합체 타입 1(Carney complex type 1), CHARGE 증후군, 쇄골두개골 형성이상(Cleidocranial dysplasia), 큐라리노 증후군(Currarino syndrome), 데니스-드래쉬 증후군(Denys-Drash syndrome)/프레이저 증후군(Frasier syndrome), 발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(Developmental delay, intellectual disability, obesity, and dysmorphic features: DIDOD), 디조지 증후군(DiGeorge syndrome)(TBX1-관련), 드라벡 증후군(Dravet syndrome), 듀안-레이디알 레이 증후군(Duane-radial ray syndrome), 엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos syndrome)(유사 고전형), 엘러스-단로스 증후군(혈관 타입), 페인골드 증후군 1(Feingold syndrome 1), TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(Frontotemporal lobar degeneration with TDP43 inclusions: FTLTDP), GRN-관련, GLUT1 결핍 증후군, 그리그 다중 증후군(Greig cephalopolysyndactyly syndrome), 유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1(Hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1), 전전뇌증 3(Holoprosencephaly 3), 전전뇌증 4, 전전뇌증 5, 홀트-오람 증후군(Holt-Oram syndrome), 부갑상선기능저하증(Hypoparathyroidism), 감각신경성 난청(sensorineural deafness), 및 신장 질환(HDR), 클리프스트라 증후군 1(Kleefstra syndrome 1), 클리펠-트레노네이 증후군(Klippel-Trenaunay syndrome)(AAGF-관련), 레리-웨일 연골골형성이상(Leri-Weill dyschondrosteosis), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(Mental retardation and distinctive facial features with or without cardiac defects: MRFACD), 정신 지체(Mental retardation), 상염색체 우성 1(autosomal dominant 1), 정신 지체, 상염색체 우성 19, 정신 지체, 상염색체 우성 29, 손발톱-슬개골 증후군(Nail-patella syndrome: NPS), 펠랑-맥더미드 증후군(Phelan-McDermid syndrome), 피트-홉킨스 증후군(Pitt-Hopkins syndrome), 원발성 폐동맥 고혈압 1, 레트 증후군(Rett syndrome)(선천적 변이체), 스미스-마제니스 증후군(Smith-Magenis syndrome)(RAI1-관련), 소토스 증후군 1(Sotos syndrome 1), 소토스 증후군 2, 스틱클러 증후군 타입 I(Stickler syndrome type I), 대동맥 판막 상부 협착증(Supravalvular aortic stenosis), SYNGAP1-관련 지적 장애, 트레처 콜린스 증후군(Treacher Collins syndrome), 모발비지절증후군 타입 I(Trichorhinophalangeal syndrome type I), 척골-유선 증후군(Ulnar-mammary syndrome), 반더 우드 증후군 1(van der Woude syndrome 1), 바르덴부르크 증후군 타입 1(Waardenburg syndrome type 1), 바르덴부르크 증후군 타입 2A(Waardenburg syndrome type 2A) 및 바르덴부르크 증후군 타입 4C로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 드라벡 증후군이다.

- [0025] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 AGGF1, ARHGAP31, BMP2, CHD7, COL2A1, COL3A1, CTLA4, CTNNB1, DLL4, EHMT1, ELN, ENG, FAS, FBN1, FOXG1, GATA3, GLI3, GRN, IRF6, JAG1, KCNQ4, LMX1B, MBD5, MED13L, MITF, MNX1, MYCN, NFIA, NFIX, NOTCH1, NSD1, PAX3, PHIP, PRKAR1A, RAI1, RBPJ, RPS14, RUNX2, SALL4, SCN1A, SETBP1, SHANK3, SHH, SHOX, SLC2A1/GLUT1, SOX10, SYNGAP1, TBX1, TBX3, TBX5, TCF4, TCOF1, TGIF1, TNXB, TRPS1, WT1 및 ZIC2로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 유전자는 SCN1A이다.
- [0026] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 하기 표 1 또는 표 2에 열거된 장애이고, 반가불충분성 유전자는 하기 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 유전자이다.
- [0027] 특정 실시형태에서, 방법은 대상체에게 DIACOMIT<sup>®</sup>(스티리펜톨), EPIODOLEX<sup>®</sup>(카나비디올), 케톤형성 식이(ketogenic diet), ONFI<sup>®</sup>(클로바잠), TOPAMAX<sup>®</sup>(토피라메이트) 또는 발프로산을 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0028] 상기 방법 중 임의의 것의 특정 실시형태에서, 유전자는 하기 표 1 또는 표 2에 열거된 유전자이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 하기 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 코돈이다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 하기 표 1 또는 표 2에 열거된 장애이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 하기 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 코돈이다.
- [0029] 상기 방법 중 임의의 것의 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 ATA, GTA 및 AGA로부터 선택된다.
- [0030] 상기 방법 중 임의의 것의 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 tRNA는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 tRNA로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 발현 벡터는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 (i) 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1, 제2 및/또는 제3 tRNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 및/또는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, DNA 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 발현 벡터 중 임의의 것 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 이들 및 다른 양태 및 특징은 하기 상세한 설명 및 청구범위에 기재되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명은 하기 도면을 참고로 보다 완전하게 이해될 수 있다.

**도 1**은 mRNA 전사체를 탈안정화시키는 비-최적 코돈을 함유하는 SCN1A mRNA 전사체의 개략적인 표현. 비-최적 코돈은 다른 회색 전사체 내의 더 어두운 영역으로서 제시된다. 제시된 tRNA의 발현은 mRNA 전사체를 안정화시키고, 단백질의 발현 증가를 가능하게 한다.

**도 2a**는 공통(consensus) tRNA 2차 구조이다. 잔기의 넘버링은 문헌[Steinberg *et al.* (1993) NUCLEIC ACIDS RES. 21:3011-15]에 기재된 tRNA 넘버링 체계에 기초한다. **도 2b**는 특정 진핵 유기체의 사이토솔로부터의 tRNA 서열의 변형 프로파일을 나타낸 표이다. 표의 비는 **도 2a**에 제시된 넘버링 위치에서 열거된 뉴클레오티드의 발생 빈도를 나타낸다. 변형된 잔기에 대한 약어는 문헌[Motorin *et al.* (2005) "Transfer RNA Modification," *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, John Wiley & Sons, Inc]에 정의되어 있다.

**도 3**은 tRNA<sup>ATA</sup>, tRNA<sup>GTA</sup> 및 tRNA<sup>AGA</sup>의 발현 후 HEK293 세포에서 SCN1A 및 GAPDH mRNA의 정량을 나타낸 도면이다. 제시된 값은  $\Delta\Delta Ct$  방법에 의해서 tRNA가 아닌 SCN1A를 발현하는 세포와 비교하여 계산되었다. +는, 각각의 tRNA의 경우 100 ng DNA를 나타내고; ++는 각각의 tRNA의 경우 200 ng DNA를 나타내고; +++는 각각의 tRNA의 경우 300 ng DNA를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 개시내용은 대상체에서 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 발현을 증가시키고/거나 반가불충분성 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 관심대상 유전자에서의 비-최적 코돈의 존재는 유전자로부터 전사되는 mRNA의 탈안정화를 초래하는데, 이것은 유전자에 의해서 암호화된 기능성 단백질의 생산에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 상황에서, mRNA 전사체의 탈안정화는, 예를 들어, 비-최적 코돈에 혼성화되는 특정 아미노아실화된 tRNA 분자의 풍부도가 동일한 아미노산과 아미노아실화된 세포에서 이용 가능한 다른, 상이한 tRNA보다 낮을 때 발생할 수 있다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 특정 tRNA의 더 낮은 풍부도를 고려할 때, 다른 더 풍부한 tRNA보다 사용 가능한 tRNA가 단백질 합성 동안 리보솜에 도달하고, 리보솜에 의해서 흡수되는데 더 오랜 시간이 걸릴 수 있는데, 이는 그 다음 그 위치에서 필수 아미노산의 혼입 동안 단백질의 합성에서 지연을 일으킬 수 있다. 단백질 합성 속도에서의 지연은 mRNA 전사체의 상응하는 탈안정화를 유도한다고 여겨지는데, 이것은 mRNA 전사체에 의해서 암호화된 단백질의 생산 감소를 초래할 수 있다. 다른, 자연적으로 더 풍부한 tRNA에 비해서 관심대상 세포에서 이러한 tRNA의 풍부도는 세포에서 생산되는 기능성 단백질의 발현 및/또는 양을 촉진시킬 수 있다는 것을 발견하였다.

[0035] 유전자 산물, 즉, 유전자의 발현의 결과인 산물, 예를 들어, 유전자에 의해서 암호화된 mRNA 전사체, 유전자에 의해서 암호화된 단백질 등의 발현은 유전자에서 비-최적 코돈을 해독하는 tRNA의 최소 수(예를 들어, 1, 2 또는 3)의 도입에 의해서 증가될 수 있고/있거나 선택적으로 증가될 수 있다(예를 들어, 유전자 산물의 발현은 또 다른 유전자 산물보다 더 많이 또는 임의의 다른 유전자 산물보다 더 많이 증가될 수 있다).

[0036] 유사하게, 비-최적 코돈을 함유하는 유전자를 갖는 대상체의 경우, 대상체에게 유효량의 비-최적 코돈을 해독하는 tRNA를 투여하면 대상체에서 유전자로부터의 유전자 산물의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 대상체에게 tRNA를 투여하여 유전자 산물의 불충분한 발현에 의해서 매개되는 대상체에서의 질환, 예를 들어, 반가불충분성 장애를 치료할 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 특징은 이들을 인간 대상체에서 장애, 예를 들어, 반가불충분성 장애의 치료에 사용에 바람직하게 만들 수 있다. 예를 들어, tRNA는 비교적 작은 크기이고, 제조함에 의해서 생산될 수 있고, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 대립유전자가 불활성화된 돌연변이



또는 기전에 관계없이 반가불충분성 장애를 치료할 수 있다.

- [0037] 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 포유동물 세포에서의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 외인성 tRNA를 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 내로의 제1 외인성 tRNA의 도입은 제1 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 제1 비-최적 코돈을 함유하는 유전자에 의해서 암호화된 유전자 산물의 포유동물 세포에서의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제1 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제1 외인성 tRNA를 발현할 수 있는 제1 발현 벡터를 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 세포에서 제1 외인성 tRNA의 발현은 제1 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0039] 상기 방법 중 임의의 것에서, 유전자는 추가 비-최적 코돈(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 비-최적 코돈)을 함유할 수 있고, 방법은 세포에 유효량의 추가 외인성 tRNA 또는 발현 벡터(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 외인성 tRNA 또는 발현 벡터)를 도입하여 유전자 산물의 발현을 증가시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 예를 들어, 특정 실시형태에서, 유전자가 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈을 함유는 경우, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA를 도입하는 단계를 더 포함하며, 여기서 세포 내로의 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA의 도입은 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 유전자가 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈을 함유는 경우, 방법은 세포 내에 유효량의 (i) 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함하고, (ii) 아미노산과 아미노아실화될 수 있는 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA를 발현할 수 있는 제2 및/또는 제3 발현 벡터를 도입하는 단계를 더 포함하며, 여기서 세포에서 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA의 발현은 제2 및/또는 제3 외인성 tRNA가 결여된 유사한 세포에 비해서 유전자 산물의 발현을 증가시킨다.
- [0041] 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결여된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 유전자 산물의 발현을 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 약 150%, 약 160%, 약 170%, 약 180%, 약 190%, 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 450%, 약 500%, 약 600%, 약 700%, 약 800%, 약 900%, 약 1000% 또는 그 초과만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결여된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 유전자 산물의 발현을 약 20% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 180%, 약 20% 내지 약 160%, 약 20% 내지 약 140%, 약 20% 내지 약 120%, 약 20% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 200%, 약 40% 내지 약 180%, 약 40% 내지 약 160%, 약 40% 내지 약 140%, 약 40% 내지 약 120%, 약 40% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 200%, 약 60% 내지 약 180%, 약 60% 내지 약 160%, 약 60% 내지 약 140%, 약 60% 내지 약 120%, 약 60% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 200%, 약 80% 내지 약 180%, 약 80% 내지 약 160%, 약 80% 내지 약 140%, 약 80% 내지 약 120%, 약 80% 내지 약 100%, 약 100% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 180%, 약 100% 내지 약 160%, 약 100% 내지 약 140%, 약 100% 내지 약 120%, 약 120% 내지 약 200%, 약 120% 내지 약 180%, 약 120% 내지 약 160%, 약 120% 내지 약 140%, 약 140% 내지 약 200%, 약 140% 내지 약 180%, 약 140% 내지 약 160%, 약 160% 내지 약 200%, 약 160% 내지 약 180% 또는 약 180% 내지 약 200%만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결여된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 유전자 산물의 발현을 약 100% 내지 약 1000%, 약 100% 내지 약 900%, 약 100% 내지 약 800%, 약 100% 내지 약 700%, 약 100% 내지 약 600%, 약 100% 내지 약 500%, 약 100% 내지 약 400%, 약 100% 내지 약 300%, 약 100% 내지 약 200%, 약 200% 내지 약 1000%, 약 200% 내지 약 900%, 약 200% 내지 약 800%, 약 200% 내지 약 700%, 약 200% 내지 약 600%, 약 200% 내지 약 500%, 약 200% 내지 약 400%, 약 200% 내지 약 300%, 약 300% 내지 약 1000%, 약 300% 내지 약 900%, 약 300% 내지 약 800%, 약 300% 내지 약 700%, 약 300% 내지 약 600%, 약 300% 내지 약 500%, 약 300% 내지 약 400%, 약 400% 내지 약 1000%, 약 400% 내지 약 900%, 약 400% 내지 약 800%, 약 400% 내지 약 700%, 약 400% 내지 약 600%, 약 400% 내지 약 500%, 약 500% 내지 약 1000%, 약 500% 내지 약 900%, 약 500% 내지 약 800%, 약 500% 내지 약 700%, 약 500% 내지 약 600%, 약 600% 내지 약 1000%, 약 600% 내지 약 900%, 약 600% 내지 약 800%, 약 600% 내지 약 700%, 약 700% 내지 약 1000%, 약 700% 내지 약 900%, 약

700% 내지 약 800%, 약 800% 내지 약 1000%, 약 800% 내지 약 900% 또는 약 900% 내지 약 1000%만큼 증가시킨다. 유전자 산물 또는 단백질 발현은 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 ELISA에 의해서 측정될 수 있다.

[0042] 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결합된 유사한 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 유전자에 의해서 암호화된 유전자 전사체(mRNA)의 안정성을 증가시킨다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결합된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 mRNA 안정성을 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 약 150%, 약 160%, 약 170%, 약 180%, 약 190%, 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 450%, 약 500%, 약 600%, 약 700%, 약 800%, 약 900%, 약 1000% 또는 그 초과만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결합된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 mRNA 안정성을 약 20% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 180%, 약 20% 내지 약 160%, 약 20% 내지 약 140%, 약 20% 내지 약 120%, 약 20% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 200%, 약 40% 내지 약 180%, 약 40% 내지 약 160%, 약 40% 내지 약 140%, 약 40% 내지 약 120%, 약 40% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 200%, 약 60% 내지 약 180%, 약 60% 내지 약 160%, 약 60% 내지 약 140%, 약 60% 내지 약 120%, 약 60% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 200%, 약 80% 내지 약 180%, 약 80% 내지 약 160%, 약 80% 내지 약 140%, 약 80% 내지 약 120%, 약 80% 내지 약 100%, 약 100% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 180%, 약 100% 내지 약 160%, 약 100% 내지 약 140%, 약 100% 내지 약 120%, 약 120% 내지 약 200%, 약 120% 내지 약 180%, 약 120% 내지 약 160%, 약 120% 내지 약 140%, 약 140% 내지 약 200%, 약 140% 내지 약 180%, 약 140% 내지 약 160%, 약 160% 내지 약 200%, 약 160% 내지 약 180% 또는 약 180% 내지 약 200%만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결합된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 mRNA 안정성을 약 100% 내지 약 1000%, 약 100% 내지 약 900%, 약 100% 내지 약 800%, 약 100% 내지 약 700%, 약 100% 내지 약 600%, 약 100% 내지 약 500%, 약 100% 내지 약 400%, 약 100% 내지 약 300%, 약 100% 내지 약 200%, 약 200% 내지 약 1000%, 약 200% 내지 약 900%, 약 200% 내지 약 800%, 약 200% 내지 약 700%, 약 200% 내지 약 600%, 약 200% 내지 약 500%, 약 200% 내지 약 400%, 약 200% 내지 약 300%, 약 300% 내지 약 1000%, 약 300% 내지 약 900%, 약 300% 내지 약 800%, 약 300% 내지 약 700%, 약 300% 내지 약 600%, 약 300% 내지 약 500%, 약 300% 내지 약 400%, 약 400% 내지 약 1000%, 약 400% 내지 약 900%, 약 400% 내지 약 800%, 약 400% 내지 약 700%, 약 400% 내지 약 600%, 약 400% 내지 약 500%, 약 500% 내지 약 1000%, 약 500% 내지 약 900%, 약 500% 내지 약 800%, 약 500% 내지 약 700%, 약 500% 내지 약 600%, 약 600% 내지 약 1000%, 약 600% 내지 약 900%, 약 600% 내지 약 800%, 약 600% 내지 약 700%, 약 700% 내지 약 1000%, 약 700% 내지 약 900%, 약 700% 내지 약 800%, 약 800% 내지 약 1000%, 약 800% 내지 약 900% 또는 약 900% 내지 약 1000%만큼 증가시킨다. 유전자 전사체 또는 mRNA 안정성은 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 노던 블롯에 의해서 측정될 수 있다.

[0043] 특정 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, 세포는 중추 신경계 세포, 예를 들어, 뉴런이다.

[0044] 특정 실시형태에서, 유전자는 AGGF1, ARHGAP31, BMPR2, CHD7, COL2A1, COL3A1, CTLA4, CTNNB1, DLL4, EHMT1, ELN, ENG, FAS, FBN1, FOXG1, GATA3, GLI3, GRN, IRF6, JAG1, KCNQ4, LMX1B, MBD5, MED13L, MITF, MNX1, MYCN, NFIA, NFIX, NOTCH1, NSD1, PAX3, PHIP, PRKAR1A, RAI1, RBPJ, RPS14, RUNX2, SALL4, SCN1A, SETBP1, SHANK3, SHH, SHOX, SLC2A1/GLUT1, SOX10, SYNGAP1, TBX1, TBX3, TBX5, TCF4, TCOF1, TGIF1, TNXB, TRPS1, WT1 및 ZIC2로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 유전자는 SCN1A이다.

[0045] 특정 실시형태에서, 방법은 기준 유전자로부터의 유전자 산물의 발현을 실질적으로 증가시키지 않는다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 방법은 유전자 산물의 발현을 기준 유전자로부터 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40% 또는 약 50% 미만만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 기준 유전자의 발현에서 증가는 검출 가능하지 않다. 특정 실시형태에서, 기준 유전자는 GAPDH, BAD 및 TRAPPC6A로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 기준 유전자는 GAPDH이다.

[0046] 특정 실시형태에서, 유전자가 SCN1A 유전자인 경우, 방법은 외인성 tRNA가 결합된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 전압-게이팅형 나트륨 채널 활성을 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 약 150%, 약 160%, 약 170%, 약 180%, 약 190%, 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 450%, 약 500%, 약 600%, 약 700%, 약 800%, 약 900%, 약 1000% 또는 그 초과만큼 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 외인성 tRNA가 결

여된 세포, 조직 또는 대상체에 비해서 세포, 조직 또는 대상체에서 전압-게이팅형 나트륨 채널 활성을 약 20% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 180%, 약 20% 내지 약 160%, 약 20% 내지 약 140%, 약 20% 내지 약 120%, 약 20% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 200%, 약 40% 내지 약 180%, 약 40% 내지 약 160%, 약 40% 내지 약 140%, 약 40% 내지 약 120%, 약 40% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 200%, 약 60% 내지 약 180%, 약 60% 내지 약 160%, 약 60% 내지 약 140%, 약 60% 내지 약 120%, 약 60% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 200%, 약 80% 내지 약 180%, 약 80% 내지 약 160%, 약 80% 내지 약 140%, 약 80% 내지 약 120%, 약 80% 내지 약 100%, 약 100% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 180%, 약 100% 내지 약 160%, 약 100% 내지 약 140%, 약 100% 내지 약 120%, 약 120% 내지 약 200%, 약 120% 내지 약 180%, 약 120% 내지 약 160%, 약 120% 내지 약 140%, 약 140% 내지 약 200%, 약 140% 내지 약 180%, 약 140% 내지 약 160%, 약 160% 내지 약 200%, 약 160% 내지 약 180% 또는 약 180% 내지 약 200%만큼 증가시킨다. 전압-게이팅형 나트륨 채널 활성은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해서, 예를 들어, 문헌[Kalume *et al.* (2007) *J. Neurosci.* 27(41):11065-74, Yu *et al.* (2007) *Nat. Neurosci.* 9(9): 1142-9 및 Han *et al.* (2012) *Nature* 489(7416): 385-390]에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0047] 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 표 1 또는 표 2에 열거된 장애이고, 반가불충분성 유전자는 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 유전자이다. 특정 실시형태에서, 유전자는 표 1 또는 표 2에 열거된 유전자이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 코돈이다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 표 1 또는 표 2에 열거된 장애이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 표 1 또는 표 2에 상응하는 행에 열거된 코돈이다.



표 1

표 1

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	GGT(Gly), CGC(Arg), ACC(Thr), CTC(Leu), CCT(Pro)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	TCA(Ser), GAG(Glu), AGC(Ser), CCC(Pro), CCT(Pro), CTC(Leu)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	ACA(Thr), TCA(Ser), TTT(Phe), CTT (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC(Pro), CTG(Leu), GGC(Gly), TGC(Cys), CTC(Leu)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CGC(Arg), CTG(Leu), ACC(Thr), CCC(Pro), TGT(Cys), TGC(Cys)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT(Cys), GAT(Asp), CCC(Pro), TGC(Cys)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	CAT(His), AGA(Arg), GAA(Glu), CTT(Leu)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	TTT(Phe), CTC(Leu), CCA(Pro), CTT (Leu), TAT (Tyr)
상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CGC(Arg), CTG(Leu), TCC(Ser), CTC(Leu), CCC(Pro)
요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	AGT(Ser), CCA(Pro), ACA(Thr), CCC(Pro), CTC(Leu), CCA(Pro)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	GAT(Asp), TTT(Phe), GAG(Glu), AGA(Arg), CTC(Leu), CTT(Leu)
CHARGE 증후군	CHD7	GAT(Asp), TCA(Ser), GAA(Glu), CCT(Pro), AGA(Arg), CTC(Leu)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC(Pro), CCG(Pro), TCC(Ser), CTC(Leu), CCT(Pro)
큐라리노 증후군	MNX1	GCG (Ala), GGC (Gly), CCG (Pro), CCC(Pro), CTC(Leu)
테니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC(Pro), CCG(Pro), AGC(Ser), AGA(Arg)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	GAT(Asp), TCA(Ser), AGT(Ser), AGA (Arg), ATA (Ile), CTT (Leu)
디조지 증후군(TBX1-관련)	TBX1	CCG (Pro), CCC (Pro), GCG (Ala) GCC (Ala)

[0048]

드라벡 증후군	SCN1A	TTT(Phe), CTA(Leu), GAT(Asp), ATA (Ile), AGA (Arg), CTT (Leu)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	ACC(Thr), AGC(Ser), TCC(Ser), CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
엘리스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC(Pro), CGC(Arg), GAG(Glu), CTC(Leu), CCT(Pro)
엘리스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	GGT(Gly), GGA(Gly), CCT(Pro), CCC(Pro)
페인골드 증후군 1	MYCN	CCC(Pro), CCG(Pro), GAG(Glu), CTC(Leu)
TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD-TDP), GRN-관련	GRN	CCC(Pro), ACC(Thr), CAC(His), TGC(Cys), TGT(Cys)
GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTG(Leu), TTC(Phe), CCC(Pro), CTC (Leu), ATC (Ile)
그리그 다증 증후군	GLI3	AGC(Ser), TCC(Ser), CAT(His), CCC(Pro), CTC(Leu)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	AGC(Ser), CTG(Leu), CTC(Leu), CCC(Pro), TCC(Ser)
전전뇌증 3	SHH	CTG (Leu), CGC (Arg), GCG (Ala), CTC(Leu), CCC(Pro)
전전뇌증 4	TGIF1	TCC(Ser), CCA(Pro), CTA(Leu), CTC(Leu), CCC(Pro)
전전뇌증 5	ZIC2	GCG (Ala), CAC (His), GGC (Gly), CCC(Pro), CTC(Leu)
홀트-오람 증후군	TBX5	TCC(Ser), CCC(Pro), CAT(His), CCT(Pro), CTC(Leu)
부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	TCC(Ser), CCC(Pro), CAC(His), CTC(Leu)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	GAG(Glu), CTG(Leu), AGC(Ser), CCC(Pro), CTC(Leu)
클리펠-트레노네이 증후군(AAGF-관련)	AGGF1	GAT(Asp), AGT(Ser), GAA(Glu), AGA (Arg), TAT (Tyr)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTG(Leu), CGC(Arg), GAG(Glu), CTC(Leu), CCC(Pro)
마르판 증후군	FBN1	GAT(Asp), TGT(Cys), GGA(Gly), TGC(Cys), CCC(Pro)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	GAT(Asp), AGT(Ser), TCA(Ser), CTC(Leu), CCC(Pro), CCT(Pro)
정신 지체, 상염색체 우성 1	MBD5	AGT(Ser), TCA(Ser), CCA(Pro),

[0049]

		CCT(Pro), AGA(Arg), CCC(Pro)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	GAT(Asp), GGT(Gly), CAT(His), CTT (Leu), CTC (Leu), TAT (Tyr)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	AGT(Ser), CCA(Pro), CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	TCC(Ser), CTG(Leu), GAG(Glu), CCC(Pro), CTC(Leu)
펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CGC(Arg), CCC(Pro), CTG(Leu), CTC(Leu)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), CCT(Pro), CTC(Leu), AGA(Arg)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	ACA(Thr), TCA(Ser), GAT(Asp), AGA (Arg), CTT (Leu), ATA (Ile)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXG1	CCG(Pro), CCC(Pro), CAC(His), CTC(Leu)
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser), CTC(Leu)
소토스 증후군 1	NSD1	TCA(Ser), GAT(Asp), AGT(Ser), CCT(Pro), AGA(Arg), CCC(Pro)
소토스 증후군 2	NFIX	TCC(Ser), CTG(Leu), TCA(Ser), CCC(Pro), CCT(Pro)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	GGT(Gly), CCT(Pro), GGA(Gly), CCC(Pro)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA (Gly), GGT (Gly), GCA (Ala), CCT(Pro), CCC(Pro)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CTG(Leu), GAG(Glu), CGG(Arg), CCC(Pro), CTC(Leu)
트레치 콜린스 증후군	TCOF1	TCA(Ser), GAG(Glu), AGT(Ser), CCC(Pro), CCT(Pro)
모발비지질증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGT(Ser), TCA(Ser), CAT(His), AGA(Arg), CCT(Pro), CCC(Pro)
척골-유선 증후군	TBX3	TCC (Ser), GCG (Ala), CCG (Pro), CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC(Pro), CTG(Leu), GAT(Asp), CTC(Leu), CCT(Pro)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	AGC(Ser), ACC(Thr), CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	TCC(Ser), CAT(His), CAA(Gln), CCC(Pro), CTC(Leu), CTT(Leu)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC(Pro), GAG(Glu), TCA(Ser), CTC(Leu)

[0050]

표 2

표 2

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	GGT (Gly), CGC (Arg), ACC (Thr), GTC (Val), GAT (Asp), GGA (Gly), TTT (Phe), GAA (Glu), CAT (His), AGG (Arg), CTC (Leu), CCT (Pro), CCC (Pro), ATC (Ile), CTT (Leu), AAG (Lys), GCC (Ala)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	TCA (Ser), GAG (Glu), AGC (Ser), CCA (Pro), CTG (Leu), CCC (Pro), CCT (Pro), ACC (Thr), TCC (Ser), AGG (Arg), CTC (Leu), AGA (Arg), CTT (Leu), GAA (Glu), GCA (Ala)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	ACA (Thr), TCA (Ser), TTT (Phe), GAT (Asp), AGT (Ser), CCA (Pro), CGA (Arg), CAT (His), GTA (Val), GGA (Gly), CTT (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr), ATA (Ile), AGA (Arg), GCA (Ala), CTC (Leu), GAA (Glu)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC (Pro), CTG (Leu), GGC (Gly), ACC (Thr), CGC (Arg), GAG (Glu), AGC (Ser), GAC (Asp), TCC (Ser), CCG (Pro), TGC (Cys), CTC (Leu), TGT (Cys), TAC (Tyr), AAC (Asn), GCC (Ala)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CGC (Arg), CTG (Leu), ACC (Thr), GGC (Gly), CCC (Pro), TCC (Ser), AGC (Ser), CGG (Arg), TGT (Cys), CCA (Pro), TGC (Cys), CTC (Leu), CCT (Pro), TAC (Tyr), TAT (Tyr), GAG (Glu)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT (Cys), GAT (Asp), CCC (Pro), AGT (Ser), ACC (Thr), TCC (Ser), GGC (Gly), GAC (Asp), GAG (Glu), TCA (Ser), TGC (Cys), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), TAT (Tyr), AAC (Asn), AAT (Asn)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	CAT (His), AGA (Arg), GAA (Glu), ACA (Thr), CAA (Gln), ACC (Thr), TTG (Leu), ACT (Thr), CTA (Leu), GTT (Val), CTT (Leu), TGT (Cys), CTC (Leu), AAT (Asn), TGC (Cys), ATA (Ile), CCT (Pro)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	TTT (Phe), CTC (Leu), CCA (Pro), ACC (Thr), ACA (Thr), AGC (Ser), TAT (Tyr), CTA (Leu), CTG (Leu), GAT (Asp), CTT (Leu), CCC (Pro), CCT (Pro), GCA (Ala), TAC (Tyr), TGC (Cys)

[0051]

상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CGC (Arg), CTG (Leu), TCC (Ser), CGG (Arg), AGC (Ser), CCC (Pro), GGC (Gly), ACC (Thr), GTC (Val), GAG (Glu), CTC (Leu), TAC (Tyr), ATC (Ile), GCC (Ala), CCT (Pro)
요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	AGT (Ser), CCA (Pro), ACA (Thr), TCA (Ser), CAT (His), CCC (Pro), TTT (Phe), TCC (Ser), CGC (Arg), GAT (Asp), CTC (Leu), CCT (Pro), CTT (Leu), GCA (Ala), AGA (Arg)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	GAT (Asp), TTT (Phe), GAG (Glu), AGA (Arg), TCA (Ser), GAA (Glu), AGT (Ser), CGA (Arg), GCA (Ala), CGT (Arg), CTC (Leu), CTT (Leu), TAT (Tyr), CCT (Pro), CCC (Pro)
CHARGE 증후군	CHD7	GAT (Asp), TCA (Ser), GAA (Glu), TTT (Phe), CCA (Pro), AGT (Ser), GAG (Glu), CTA (Leu), CAT (His), CAA (Gln), CCT (Pro), AGA (Arg), CTC (Leu), CCC (Pro), CTT (Leu), ATA (Ile), GCA (Ala)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC (Pro), CCG (Pro), TCC (Ser), ACC (Thr), GCG (Ala), CGC (Arg), CTG (Leu), CGG (Arg), AGC (Ser), AGT (Ser), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), GCA (Ala)
큐라리노 증후군	MNX1	GCG (Ala), GGC (Gly), CCG (Pro), CTG (Leu), CGC (Arg), CCC (Pro), TCG (Ser), GCC (Ala), AGC (Ser), GAG (Glu), CTC (Leu), TCC (Ser)
데니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC (Pro), CCG (Pro), AGC (Ser), CAC (His), GCG (Ala), CTG (Leu), ACC (Thr), TCC (Ser), CAT (His), GGT (Gly), AGA (Arg), TAC (Tyr), TGT (Cys), CTC (Leu), CCT (Pro)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	GAT (Asp), TCA (Ser), AGT (Ser), AGA (Arg), CAT (His), ATA (Ile), TTT (Phe), CTA (Leu), GAA (Glu), CAA (Gln), CTT (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr), GCA (Ala), CCC (Pro)
디조지 증후군(TBX1- 관련)	TBX1	CCG (Pro), CCC (Pro), GCG (Ala), GCC (Ala), CAC (His), CTG (Leu), GGC (Gly), CGC (Arg), AGC (Ser), CGG (Arg), CTC (Leu), TAC (Tyr), TAT (Tyr), GAG (Glu), TTC (Phe)
드라벡 증후군	SCN1A	TTT (Phe), CTA (Leu), GAT (Asp), AGT (Ser), GAA (Glu), ATA (Ile), TCA (Ser), ACA (Thr), TTC (Phe), TAT (Tyr), AGA (Arg), CTT (Leu), CTC (Leu), AAT (Asn), CCT (Pro)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	ACC (Thr), AGC (Ser), TCC (Ser), CCC (Pro), GAG (Glu), GGT (Gly), GAT (Asp), CTC (Leu), CAC (His), CAG (Gln), CCT (Pro), TGT (Cys), ATC (Ile), CTT (Leu)

[0052]



엘리스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC (Pro), CGC (Arg), GAG (Glu), ACC (Thr), CTG (Leu), ACA (Thr), GGG (Gly), TCC (Ser), GGC (Gly), GTG (Val), CTC (Leu), CCT (Pro), TAC (Tyr)
엘리스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	GGT (Gly), GGA (Gly), CCT (Pro), CCA (Pro), GAT (Asp), AGT (Ser), GAA (Glu), CCC (Pro), GGC (Gly), AGA (Arg), CTT (Leu), CTC (Leu), GCA (Ala)
페인폴드 증후군 1	MYCN	CCC (Pro), CCG (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg), TCC (Ser), AGC (Ser), GCC (Ala), ACC (Thr), CTG (Leu), GAT (Asp), CTC (Leu), GCG (Ala), CTT (Leu), AAG (Lys)
TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD- TDP), GRN-관련	GRN	CCC (Pro), ACC (Thr), CAC (His), TCC (Ser), GAT (Asp), TGC (Cys), CTG (Leu), TGT (Cys), AGC (Ser), CGC (Arg), CCT (Pro), CTC (Leu), AGA (Arg), GCC (Ala)
GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTG (Leu), TTC (Phe), CCC (Pro), TCC (Ser), GGC (Gly), CGC (Arg), ACC (Thr), ATC (Ile), CTC (Leu), GTG (Val), GAG (Glu), TAT (Tyr), GCC (Ala)
그리그 다중 증후군	GLI3	AGC(Ser), TCC(Ser), CAT(His), CCC(Pro), TCA(Ser), CCG(Pro), ACC(Thr), CCA(Pro), CTC(Leu), CTG(Leu), CCT(Pro), AGA(Arg), CTT(Leu), GAG(Glu)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	AGC (Ser), CTG (Leu), CTC (Leu), ACC (Thr), CCC (Pro), TCC (Ser), GTC (Val), GAG (Glu), TCA (Ser), GGC (Gly), CTT (Leu), ATC (Ile), GCC (Ala)
전전뇌증 3	SHH	CTG (Leu), CGC (Arg), GCG (Ala), TCG (Ser), ACC (Thr), GGC (Gly), GAG (Glu), CTC (Leu), GAC (Asp), CAC (His), CCC (Pro), TAC (Tyr), GCC (Ala), AGA (Arg)
전전뇌증 4	TGIF1	TCC(Ser), CCA(Pro), CTA(Leu), CCG(Pro), TCA(Ser), CGC(Arg), CCC(Pro), ACA(Thr), TCT(Ser), CTC(Leu), CTT(Leu), CCT(Pro), AGA(Arg)
전전뇌증 5	ZIC2	GCG (Ala), CAC (His), GGC (Gly), TCC (Ser), CCG (Pro), CCC (Pro), AGC (Ser), CGC (Arg), TCG (Ser), TTC (Phe), CTC (Leu), GAG (Glu)
홀트-오람 증후군	TBX5	TCC (Ser), CCC (Pro), CAT (His), ACC (Thr), AGC (Ser), CAC (His), CTA (Leu), TTT (Phe), CCT (Pro), GAG (Glu), CTC (Leu), TAC (Tyr), AGA (Arg), CCA (Pro)

[0053]

부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	TCC (Ser), CCC (Pro), CAC (His), CCG (Pro), ACC (Thr), TCG (Ser), AGC (Ser), CTG (Leu), CTC (Leu), AGG (Arg), TAC (Tyr), AGA (Arg)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	GAG (Glu), CTG (Leu), AGC (Ser), CCC (Pro), GAC (Asp), CTC (Leu), ACC (Thr), TCC (Ser), AGG (Arg), TCA (Ser), GCA (Ala), TGC (Cys), GCC (Ala), AGA (Arg), CTT (Leu), CCT (Pro)
클리펠-트레노네이 증후군(AAGF-관련)	AGGF1	GAT (Asp), AGT (Ser), GAA (Glu), TCA (Ser), CAT (His), ACA (Thr), TAT (Tyr), CAA (Gln), TTT (Phe), ACT (Thr), AGA (Arg), CCT (Pro), CTT (Leu), CTC (Leu), AAT (Asn), GAG (Glu), GCA (Ala)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTG (Leu), CGC (Arg), GAG (Glu), GCG (Ala), CTC (Leu), CAC (His), TCC (Ser), AGC (Ser), CGG (Arg), GCC (Ala), CCC (Pro), AGA (Arg), CCG (Pro)
마르판 증후군	FBN1	GAT (Asp), TGT (Cys), GGA (Gly), GAA (Glu), AGT (Ser), ACA (Thr), ACC (Thr), TTT (Phe), CCA (Pro), AAT (Asn), TGC (Cys), CCC (Pro), CCT (Pro), AGA (Arg), CTC (Leu), TAT (Tyr)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	GAT (Asp), AGT (Ser), TCA (Ser), CCA (Pro), TTT (Phe), ACA (Thr), CCC (Pro), CAT (His), CCT (Pro), CTA (Leu), CTC (Leu), CTT (Leu), AGA (Arg), ATA (Ile), GCA (Ala), TAT (Tyr), TCC (Ser)
정신 지체, 상염색체 우성 1	MBD5	AGT (Ser), TCA (Ser), CCA (Pro), CTA (Leu), CAT (His), ACA (Thr), CCT (Pro), TTA (Leu), GGA (Gly), CAA (Gln), AGA (Arg), CCC (Pro), CTC (Leu), CTT (Leu), ATA (Ile), AAT (Asn), GCA (Ala)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	GAT (Asp), GGT (Gly), CAT (His), ACA (Thr), CTT (Leu), CAA (Gln), CTG (Leu), CTA (Leu), GAA (Glu), TCT (Ser), CTC (Leu), TAT (Tyr), CCT (Pro), AGA (Arg), GCA (Ala), ATA (Ile), GGA (Gly)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	AGT (Ser), CCA (Pro), CCC (Pro), TCC (Ser), AGC (Ser), TCA (Ser), ACC (Thr), GAG (Glu), CTG (Leu), AGG (Arg), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), CTT (Leu), GCA (Ala), AAG (Lys)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	TCC (Ser), CTG (Leu), GAG (Glu), CCC (Pro), AGC (Ser), CGG (Arg), CAG (Gln), CGC (Arg), CTC (Leu), GAC (Asp), TGC (Cys), TAC (Tyr), AAG (Lys), AGA (Arg), CCG (Pro)

[0054]

펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CGC (Arg), CCC (Pro), CTG (Leu), CCG (Pro), GAG (Glu), AGC (Ser), TCC (Ser), CGG (Arg), CTC (Leu), GGC (Gly), CCT (Pro), GCC (Ala), GCG (Ala)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	TCA (Ser), CAT (His), AGT (Ser), TCC (Ser), CCA (Pro), AGC (Ser), TCT (Ser), GGA (Gly), GAT (Asp), CCT (Pro), CTC (Leu), AGA (Arg), CCC (Pro), TAT (Tyr), CTT (Leu)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	ACA (Thr), TCA (Ser), GAT (Asp), CAT (His), AGT (Ser), GAA (Glu), CCA (Pro), CTA (Leu), ATA (Ile), ACT (Thr), AGA (Arg), CTT (Leu), CCC (Pro), CCT (Pro), TAT (Tyr), CTC (Leu), GCA (Ala), AAT (Asn)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXG1	CCG (Pro), CCC (Pro), CAC (His), TCC (Ser), CTG (Leu), TCG (Ser), GGC (Gly), CGC (Arg), AGC (Ser), ACC (Thr), CTC (Leu), TAC (Tyr), GCC (Ala), GAG (Glu), GCG (Ala),
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC (Pro), TCC (Ser), AGC (Ser), CTG (Leu), ACC (Thr), GAG (Glu), CTC (Leu), CCG (Pro), CGG (Arg), CCA (Pro), CCT (Pro), GCC (Ala), AAG (Lys)
소토스 증후군 1	NSD1	TCA (Ser), GAT (Asp), AGT (Ser), CCA (Pro), TTT (Phe), CTA (Leu), GAA (Glu), TCT (Ser), CAT (His), GAG (Glu), CCT (Pro), AGA (Arg), CCC (Pro), CTT (Leu), CTC (Leu), TGT (Cys), ATA (Ile)
소토스 증후군 2	NFIX	TCC (Ser), CTG (Leu), TCA (Ser), CCC (Pro), CGG (Arg), CCG (Pro), ACC (Thr), CGC (Arg), GAT (Asp), TTT (Phe), CCT (Pro), CTC (Leu), ATC (Ile), TAC (Tyr), AGA (Arg), GCA (Ala)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	GGT(Gly), CCT(Pro), GGA(Gly), CCC(Pro), GGC(Gly), GAT(Asp), CCA(Pro), GAG(Glu), GAA(Glu), AGA(Arg), CTC(Leu)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA (Gly), GGT (Gly), GCA (Ala), CCA (Pro), GGG (Gly), CCT (Pro), GTT (Val), CCC (Pro), GTC (Val), GGC (Gly), CTC (Leu), CTT (Leu), GCT (Ala)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CTG (Leu), GAG (Glu), CGG (Arg), CCC (Pro), TCC (Ser), AGC (Ser), AGT (Ser), CCA (Pro), GGT (Gly), TCA (Ser), CTC (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr), CGC (Arg), CTA (Leu)
트레처 콜린스 증후군	TCOF1	TCA (Ser), GAG (Glu), AGT (Ser), ACC (Thr), AGC (Ser), GGG (Gly), CCA (Pro), GCA (Ala), CCC (Pro), TCC (Ser), CCT (Pro), AGA (Arg),

[0055]



		GCC (Ala), AAG (Lys)
모발비지절증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGT (Ser), TCA (Ser), CAT (His), GAT (Asp), CAA (Gln), ACA (Thr), CTA (Leu), CCA (Pro), GGA (Gly), TCC (Ser), AGA (Arg), CCT (Pro), CCC (Pro), TAT (Tyr), CTC (Leu), CTT (Leu), AAT (Asn), TGT (Cys), GAA (Glu), GCA (Ala)
척골-유선 증후군	TBX3	TCC (Ser), GCG (Ala), CCG (Pro), CCC (Pro), CTG (Leu), AGC (Ser), ACC (Thr), GCC (Ala), CTC (Leu), TCG (Ser), AGA (Arg), CCT (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC (Pro), CTG (Leu), GAT (Asp), CCA (Pro), GAG (Glu), TTT (Phe), ACC (Thr), TGG (Trp), AGC (Ser), CAG (Gln), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), ATC (Ile), GAA (Glu), TAT (Tyr), TAC (Tyr)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	AGC (Ser), ACC (Thr), CCC (Pro), CTG (Leu), GAG (Glu), AGT (Ser), CCG (Pro), CAA (Gln), CGC (Arg), TCC (Ser), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), TAC (Tyr), TAT (Tyr)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	TCC (Ser), CAT (His), CAA (Gln), CCC (Pro), AGT (Ser), AGC (Ser), GAT (Asp), ACC (Thr), GAA (Glu), GAG (Glu), CTC (Leu), CTT (Leu), AGA (Arg), ATA (Ile), TAT (Tyr), GCA (Ala)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC (Pro), GAG (Glu), TCA (Ser), CAC (His), AGC (Ser), TCC (Ser), GGC (Gly), CTG (Leu), TCG (Ser), CGC (Arg), CTC (Leu), TAC (Tyr), TAT (Tyr), GCC (Ala), CCA (Pro), GGG (Gly)

[0056]

[0057]

특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 각각의 장애와 연관된 반가불충분성 유전자와 함께, 하기 표 4, 5, 6 또는 7 중 어느 하나에 열거된 장애이다. 특정 실시형태에서, 유전자는 표 4, 5, 6 또는 7에 열거된 유전자이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 표 4, 5, 6 또는 7에 상응하는 행에 열거된 코돈이다. 특정 실시형태에서, 반가불충분성 장애는 표 4, 5, 6 또는 7에 열거된 장애이고, 제1, 제2 및/또는 제3 비-최적 코돈은 표 4, 5, 6 또는 7에 상응하는 행에 열거된 코돈이다. 표 4 및 표 5는 각각 코돈 사용률 및 tRNA 적응 지수 (tRNA adaptive index: tAI)에 기초하여 계산된 바와 같은 제시된 유전자에서 3개 및 10개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 나타낸다. 표 6 및 표 7은 각각, tRNA 유전자 카피 수에 기초한 tRNA 수준의 추정치라기 보다는, HEK293 세포에서 tRNA 수준의 직접 정량화에 기초하여 코돈 사용 백분율 및 변형된 tAI 값을 기초로 계산된 바와 같은, 표시된 유전자에서 3개 및 10개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 나타낸다.

[0058]

## II. 비-최적 코돈을 해독하는 운반 RNA

[0059]

### A. 운반 RNA

[0060]

단백질 합성 동안, tRNA는 성장하는 단백질(폴리펩티드) 쉘에 삽입하기 위해 리보솜에 아미노산을 전달한다. tRNA는 일반적으로 길이가 약 70 내지 100개 뉴클레오티드이다. 활성 tRNA는 합성 중에 tRNA로 전사되거나 전사 후 가공 중에 추후에 추가될 수 있는 3' CCA 서열을 포함한다. 아미노아실화 동안, 주어진 tRNA 분자에 부착된 아미노산은 3'-말단 리보스의 2' 또는 3' 히드록실기에 공유 부착되어 아미노아실-tRNA(aa-tRNA)를 형성한다. 아미노산은 2'-히드록실 기로부터 3'-히드록실 기로 자발적으로 이동할 수 있고, 그 역도 가능하지만, 3'-OH 위치에서 리보솜의 성장하는 단백질 쉘에 통합된다. 접힌 aa-tRNA 분자의 다른 단부의 루프는 안티코돈이라고 알려진 3개의 염기 서열을 포함한다. 이러한 안티코돈 서열이 리보솜-결합된 mRNA 전사체에서 상보적인 3-염기 코돈 서열과 혼성화하거나 염기쌍을 이루는 경우, aa-tRNA는 리보솜에 결합하고, 이의 아미노산은 리보솜에 의해 합성될 폴리펩티드 사슬에 혼입된다. 특정 코돈과 염기쌍을 이루는 모든 tRNA는 단일 특정 아미노산과 아미노아실화되기 때문에, 유전자 암호의 번역은 tRNA에 의해 영향을 받는다. mRNA 내의 61개의 비-종결 코돈 각각은 동족 aa-tRNA의 결합 및 리보솜에 의해 합성될 성장하는 단백질 또는 폴리펩티드 쉘에 단일 특정 아미노산의 첨가를 지시한다.

[0061]

tRNA는 일반적으로 고도로 보존되고, 종에 걸쳐 기능하는 종종 기능한다. 따라서, 박테리아 tRNA, 비-포유동물 진핵 tRNA 또는 포유동물(예를 들어, 인간) tRNA로부터 유래된 tRNA는 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법의 실

시에 유용할 수 있다. 자연 발생 인간 tRNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 공지되어 있으며, Genbank와 같은 공급원을 통해 당업자에게 일반적으로 입수 가능하다. 또한 문헌[Sprinzl *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D139-40; Buckland *et al.* (1996) *Genomics* 35(1):164-71; Schimmel *et al.* (Eds.) (1979) "Transfer-RNA: Structure, Properties, and Recognition," Cold Spring Harbor Laboratory; Agris (1983) "The Modified Nucleosides of Transfer RNA, II," Alan R. Liss Inc] 참고. tRNA는 일반적으로 고도로 보존되고, 종에 걸쳐 기능하는 종종 기능한다.

[0062] 특정 실시형태에서, tRNA는 아미노아실화되거나, 임의의 자연 아미노산과 아미노아실화될 수 있다. 예를 들어, tRNA는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 아미노아실화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 아미노산은 세린 및 아르기닌으로부터 선택된다.

[0063] 특정 실시형태에서, tRNA는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열과 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0064] 서열 동일성은 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx에 의해서 사용된 알고리즘을 사용한 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 분석(문헌 [Karlin *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268; Altschul, (1993) *J. Mol. Evol.* 36, 290-300; Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402], 참고로 포함됨)은 서열 유사성 탐색을 위해서 조정된다. 서열 데이터베이스의 탐색에서의 기본적인 이슈의 논의에 대해서는 참고로 완전히 포함된 문헌[Altschul *et al.*, (1994) *Nature Genetics* 6:119-129]을 참고하기 바란다. 당업자는 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 히스토그램, 설명, 정렬, 예상(즉, 데이터베이스 서열에 대한 매치를 보고하기 위한 통계적 유의성 임계값), 컷오프, 매트릭스 및 필터에 대한 검색 파라미터가 디폴트 설정에 존재한다. blastp, blastx, tblastn 및 tblastx에서 사용되는 디폴트 점수 매트릭스는 BLOSUM62 매트릭스이다(참고로 완전히 포함된 문헌[Henikoff *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919]). 다음과 같이 4개의 blastn 파라미터를 조정할 수 있다: Q=10(갭 생성 페널티); R=10(갭 연장 페널티); wink=1(쿼리를 따라 모든 wink.sup.th 위치에서 단어 히트를 생성함); 및 gapw=16(갭이 있는 정렬 내의 윈도우 폭이 생성됨). 등가의 Blastp 파라미터 설정은 Q=9; R=2; wink=1; 및 gapw=32일 수 있다. 탐색은 또한 NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST Advanced Option parameter(예를 들어: -G, 갭 오픈 코스트(Cost to open gap)[정수]: 디폴트 = 뉴클레오타이드의 경우 5/ 단백질의 경우 11; -E, 갭 연장 코스트(Cost to extend gap)[정수]: 디폴트 = 뉴클레오타이드의 경우 2/ 단백질의 경우 1; -q, 뉴클레오타이드 미스매치 페널티[정수]: 디폴트 = -3; -r, 뉴클레오타이드 매치 리워드[정수]: 디폴트 = 1; -e, 예측값[Real]: 디폴트 = 10; -W, 단어 크기[정수]: 디폴트 = 뉴클레오타이드의 경우 11/ 메가블러스트의 경우 28/ 단백질의 경우 3; -y, 비트 단위의 블라스트 연장에 대한 드랍오프(X): 디폴트 = blastn의 경우 20/ 기타의 경우 7; -X, 갭이 있는 정렬의 경우 X 드랍오프 값(비트 단위): 디폴트 = blastn에 적용 가능하지 않은 모든 프로그램의 경우 15; -Z, 갭이 있는 정렬의 경우 최종 X 드랍오프 값(비트 단위): blastn의 경우 50, 기타의 경우 25)를 사용하여 수행할 수 있다. 쌍별 단백질 정렬의 경우 ClustalW를 또한 사용할 수 있다(디폴트 파라미터는 예를 들어, Blosum62 매트릭스 및 Gap 오픈링 페널티 = 10 및 Gap 연장 페널티 = 0.1을 포함한다). GCG 패키지 버전 10.0으로 입수 가능한 서열 간의 Bestfit 비교는 DNA 파라미터 GAP=50(갭 생성 페널티) 및 LEN=3(갭 연장 페널티)을 사용하고, 단백질 비교의 동등한 설정은 GAP=8 및 LEN=2이다.

[0065] tRNA는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 tRNA의 예는 아실화된 tRNA; 알킬화된 tRNA; 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실 이외의 하나 이상의 염기를 함유하는 tRNA; 특이적 리간드 또는 항원성, 형광성, 친화성, 반응성, 스펙트럼 또는 다른 프로브 모이어티의 부착에 의해서 공유적으로 변형된 tRNA; 메틸화되거나 달리 변형된 하나 이상의 리보스 모이어티를 함유하는 tRNA; 시약, 특이적 리간드를 위한 담체로서 또는 항원성, 형광성, 반응성, 친화성, 스펙트럼 또는 다른 프로브로서 기능하는 비자연 아미노산을 비롯한, 20개의 자연 아미노산 이외의 아미노산과 아미노아실화된 aa-tRNA를 포함한다. 변형된 tRNA 분자의 예는 문헌[Soll *et al.* (1995) "tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function," ASM Press]; 문헌[El Yacoubi *et al.* (2012) *Annu. Rev. Genet.* 46:69-95]; 문헌[Grosjean *et al.* (1998) "Modification and Editing of RNA," ASM Press]; 문헌[Hendrickson *et al.* (2004) *Annu. Rev. Biochem.* 73:147-176, 2004]; 문헌[Ibba *et al.* (2000) *Annu. Rev.*

Biochem. 69:617-650]; 문헌[Johnson *et al.* (1995) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 60:71-82]; 문헌[Johnson *et al.* (1982) J. Mol. Biol. 156:113-140]; 문헌[Crowley *et al.* (1994) Cell 78:61-71]; 문헌[Beier *et al.* (2001) Nucleic Acids Res. 29:4767-4782]; 문헌[Torres *et al.* (2014) Trends Mol. Med. 20:306-314]; 및 문헌[Bjork *et al.* (1987) Annu. Rev. Biochem. 56:263-287]에 기재되어 있다.

[0066] 특정 실시형태에서, tRNA는 자연 발생 뉴클레오타이드 변형을 포함한다. 자연 발생 tRNA는 전사 후 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는데, 이것은 예를 들어, 문헌[Machnicka *et al.* (2014) RNA Biology 11(12): 1619-1629]에 기재되어 있고, 도 2b에 제시된 바와 같은 잔기 중 하나 이상을 포함한다. 특정 실시형태에서, tRNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 잔기 중 하나 이상을 포함한다: 위치 0에서의 2'-O-메틸구아노신 또는 G; 위치 1에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 4에서의 2'-O-메틸아데노신, A, 2'-O-메틸우리딘, U, 2'-O-메틸시티딘, C, 2'-O-메틸구아노신, 또는 G; 위치 6에서의 N2-메틸구아노신 또는 G; 위치 7에서의 N2-메틸구아노신 또는 G; 위치 9에서의 1-메틸아데노신, A, 1-메틸구아노신, G, 또는 변형된 G; 위치 10에서의 N2-메틸구아노신 또는 G; 위치 12에서의 N4-아세틸시티딘 또는 C; 위치 13에서의 슈도우리딘, U, 2'-O-메틸시티딘, 또는 C; 위치 14에서의 1-메틸아데노신, A, 또는 변형된 A; 위치 16에서의 디히드로우리딘(D) 또는 U; 위치 17에서의 D 또는 U; 위치 18에서의 2'-O-메틸구아노신 또는 G; 위치 20에서의 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, D, 또는 U; 위치 20a에서의 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘, D, 슈도우리딘, U, 또는 변형된 U; 위치 20b에서의 D, 슈도우리딘, 또는 U; 위치 25에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 26에서의 슈도우리딘, U, N2,N2-디메틸구아노신, N2-메틸구아노신, G, 또는 변형된 G; 위치 27에서의 슈도우리딘, U, N2,N2-디메틸구아노신, 또는 G; 위치 28에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 30에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 31에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 32에서의 2'-O-메틸슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 슈도우리딘, U, 2'-O-메틸시티딘, 3-메틸시티딘, C, 또는 변형된 C; 위치 34에서의 이노신, A, 2-티오우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 5-(카르복시히드록시메틸)우리딘 메틸 에스터, 5-카르바모일 메틸우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸우리딘, 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오우리딘, 5-메톡시카르보닐메틸우리딘, 슈도우리딘, U, 변형된 U, 2'-O-메틸시티딘, 5-포르밀-2'-O-메틸시티딘, 5-메틸시티딘, C, 변형된 C, 케오신, 만노실-케오신, 갈락토실-케오신, 2'-O-메틸구아노신, 또는 G; 위치 35에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 36에서의 슈도우리딘, U, 또는 변형된 U; 위치 37에서의 1-메틸이노신, 2-메틸티오-N6-트레오닐카르바모일아데노신, N6-이소펜틸아데노신, N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신, N6-트레오닐카르바모일아데노신, A, 변형된 A, 1-메틸구아노신, 피옥시위부토신, 위부토신, G, 또는 변형된 G; 위치 38에서의 슈도우리딘, U, 5-메틸시티딘, C, 또는 변형된 C; 위치 39에서의 1-메틸슈도우리딘, 2'-O-메틸슈도우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 슈도우리딘, U, 2'-O-메틸구아노신, 또는 G; 위치 40에서의 슈도우리딘, U, 5-메틸시티딘, 또는 C; 위치 44에서의 2'-O-메틸우리딘, U, 또는 변형된 U; 위치 e11에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 e12에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 e14에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 e2에서의 3-메틸시티딘 또는 C; 위치 46에서의 7-메틸구아노신 또는 G; 위치 47에서의 D, U, 또는 변형된 U; 위치 48에서의 D, U, 5-메틸시티딘, C, 또는 변형된 C; 위치 49에서의 A, 변형된 A, 5-메틸시티딘, C, 또는 변형된 C; 위치 50에서의 슈도우리딘, U, 5-메틸시티딘, 또는 C; 위치 54에서의 5,2'-O-디메틸우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 또는 U; 위치 55에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 58에서의 1-메틸아데노신, A, 또는 변형된 A; 위치 64에서의 2'-O-리보실아데노신(포스페이트), A, 2'-O-리보실구아노신(포스페이트), G, 또는 변형된 G; 위치 65에서의 슈도우리딘 또는 U; 위치 67에서의 슈도우리딘, U, N2-메틸구아노신, 또는 G; 위치 68에서의 슈도우리딘 또는 U; 및 위치 72에서의 슈도우리딘, U, 5-메틸시티딘, 또는 C. 잔기의 넘버링은 문헌[Steinberg *et al.*, (1993) Nucleic Acids Res. 21:3011-15]에 기재된 tRNA 넘버링 체계에 기초한다.

[0067] 특정 실시형태에서, tRNA는 5-메틸 우리딘, 슈도우리딘, 디히드로우리딘 및 1-메틸아데노신으로부터 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0068] B. 비-최적 코돈

[0069] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 유용한 tRNA는 비-최적 코돈에 혼성화되는 안티코돈을 포함한다.

[0070] 단백질 합성은 합성되는 단백질에 포함되는 아미노산을 암호화하는 61개의 3-염기-쌍 코돈 및 단백질 합성을 종료하는 3개의 3-염기-쌍 코돈(중지 또는 종결 코돈으로 지칭됨)을 포함하는 유전 암호에 의해 지시된다. 유전 암호의 축되는 20개 아미노산을 암호화하는 61개의 3-염기-쌍 코돈 조합에 기초한 수학적 결과이다. 동의어 코돈은 동일한 아미노산을 암호화하는 3-염기-쌍 코돈을 지칭한다. 일반적으로 동의어 코돈 치환은 침묵하며, 유전자 발현 또는 생성되는 기능적 유전자 산물의 양에 영향을 미치지 않는다고 여겨져 왔다. 그러나, 동의어 코돈은 번역 장치에 의해 차별적으로 인식되는 것으로 보인다. 이러한 개념은 코돈 최적성이라고 지칭된다. 개념적으로, 코돈 최적성은 아미노아실화된 tRNA 분자의 공급과 번역에 관여하는 코돈의 농도에 의해 부과되는 수요

사이의 균형을 반영한다. 따라서, 리보솜은 동족 tRNA가 상대적으로 더 풍부하기 때문에 일부 코돈을 빠르게 해독하는 반면, 다른 코돈은 tRNA 농도가 상대적으로 덜 풍부하기 때문에 더 느리게 관독된다(문헌[Tuller *et al.* (2010) *Cell* 141(2):344-54; Novoa *et al.* (2012) *Trends Genet.* 28(11):574-81]). 또한, 코돈 최적성은 해독 속도에 영향을 미칠 수 있는 tRNA 안티코돈/코돈 상호 작용의 정확도에 어느 정도 기초한다(문헌[Akashi (1994) *Genetics* 136(3):927-35; Drummond *et al.* (2008) *Cell* 134(2):341-52]).

[0071] mRNA 전사체 내 코돈의 최적성은 mRNA 전사체의 안정성 및 mRNA 전사체가 리보솜에 의해 번역되는 속도에 영향을 미치는 것으로 나타났다(문헌[Presnyak *et al.* (2015) *Cell* 160(6):1111-24; Radhakrishnan *et al.* (2016) *Cell* 167(1):122-132]). 따라서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "비-최적 코돈"은 동일한 아미노산에 대해 또 다른 코돈을 인식하는 상이한 tRNA보다 세포에서 덜 풍부한 tRNA에 의해 인식되는 mRNA 전사체의 코돈을 지칭한다. 종종, 비-최적 코돈을 동일한 아미노산(즉, 동의어 코돈)을 암호화하는 다른 코돈으로 대체하지만 세포에 더 풍부한 tRNA에 의해서 관독되면, mRNA 전사체의 안정성 및/또는 mRNA 전사체가 리보솜에 의해 번역되는 속도가 증가한다. 결과적으로, 비-최적 코돈은 동족 tRNA의 과발현이 mRNA 안정성, 풍부도 및 또는 번역 연장을 향상시키는 임의의 코돈이다.

[0072] 코돈-최적성은 tRNA 적응 지수(tRNA adaptation index: tAI), 정규화된 번역 효율(normalized translational efficiency: nTE), 종 특이적 tRNA 적응 지수(species specific tRNA adaptation index: sTAI), 코돈 적응 지수(codon adaptation index: CAI), gCAI 및 mRNA 안정성 상관 계수에 대한 코돈 발생(codon occurrence to mRNA stability correlation coefficient: CSC)을 포함하는 다음 접근법 중 하나 이상에 의해 측정되거나 정량될 수 있다.

[0073] tAI는 (tRNA 유전자 카피 수에 기초한) tRNA의 세포 농도 추정치 및 해독 효율을 고려하는 각각의 코돈에 대한 코돈 최적성 추정치이다. tAI는 예를 들어 문헌[dos Reis *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(17): 5036-5044] 및 문헌[Mahlab *et al.* (2014) *PLoS Comput. Biol.* 10(1):e1003294]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 주어진 종, 예를 들어 인간에 대한 모든 코돈의 중앙 tAI 값보다 작은 tAI 값을 갖는다.

[0074] 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 tAI에 의해서 결정되는 경우 0.47 또는 그 미만의 값을 갖는다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 CTA(Leu), TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TTA(Leu), GTA(Val), ATA(Ile), CGC(Arg), TCG(Ser), TTT(Phe), AGA(Arg), CGA(Arg), ACA(Thr), CCG(Pro), GGT(Gly), AGG(Arg), CGG(Arg), CAA(Gln), CGT(Arg), GAT(Asp), TAT(Tyr), ACC(Thr), TCC(Ser), ACG(Thr), CCC(Pro), CTC(Leu), GTC(Val), TGG(Trp), CCA(Pro), GCG(Ala), TTG(Leu), AGC(Ser), GGA(Gly), CTG(Leu), ACT(Thr), CAC(His), TCT(Ser), GCA(Ala), CCT(Pro), CTT(Leu), GTT(Val), GGG(Gly), GAA(Glu), TTC(Phe), GAG(Glu), TGT(Cys), TAC(Tyr), GGC(Gly), AAT(Asn), GAC(Asp) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다.

[0075] 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 tAI에 의해서 결정되는 경우 0.25 또는 그 미만의 값을 갖는다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 CTA(Leu), TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TTA(Leu), GTA(Val), ATA(Ile), CGC(Arg), TCG(Ser), TTT(Phe), AGA(Arg), CGA(Arg), ACA(Thr), CCG(Pro), GGT(Gly), AGG(Arg), CGG(Arg), CAA(Gln), CGT(Arg), GAT(Asp), TAT(Tyr), ACC(Thr), TCC(Ser), ACG(Thr), CCC(Pro), CTC(Leu), GTC(Val), TGG(Trp), CCA(Pro), GCG(Ala), TTG(Leu), AGC(Ser) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다.

[0076] 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 CTA(Leu), TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TTA(Leu), GTA(Val), ATA(Ile), CGC(Arg), TCG(Ser), TTT(Phe), AGA(Arg), CGA(Arg), ACA(Thr), CCG(Pro), GGT(Gly), AGG(Arg), CGG(Arg), CAA(Gln), CGT(Arg), GAT(Asp) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, a 비-최적 코돈은 CTA(Leu), TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TTA(Leu), GTA(Val), ATA(Ile), CGC(Arg), TCG(Ser), TTT(Phe) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 CTA(Leu), TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TTA(Leu) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다.

[0077] 코돈 최적성은 또한 tRNA 유전자 카피 수에 기초한 추정치 대신에 주어진 세포에서 tRNA 수준의 직접적인 정량에 기초하는 tAI의 변형 버전에 의해서 측정될 수 있다. tRNA 수준은 예를 들어, 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 문헌[Zheng *et al.* (2015) *NAT. METHODS.* 12(9): 835-837]에 의해서 결정될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 AGA(Arg), CTC(Leu), ATA(Ile), CCC(Pro), CTA(Leu), CTT(Leu), TAT(Tyr), CCT(Pro), TGT(Cys), CGC(Arg), GCA(Ala), TCC(Ser), TAC(Tyr), GCG(Ala), AGG(Arg), CGT(Arg), CCG(Pro), GGA(Gly), CCA(Pro), TGC(Cys), TCT(Ser), TCG(Ser), TTG(Leu), AGT(Ser), TTT(Phe), ACG(Thr), AAT(Asn), ACA(Thr), GAA(Glu), ATC(Ile), TGG(Trp) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 AGA(Arg), CTC(Leu), ATA(Ile), CCC(Pro), CTA(Leu), CTT(Leu), TAT(Tyr), CCT(Pro), TGT(Cys),



CGC(Arg), GCA(Ala), TCC(Ser), TAC(Tyr), GCG(Ala), AGG(Arg), CGT(Arg), CCG(Pro), GGA(Gly), CCA(Pro), TGC(Cys) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 AGA(Arg), CTC(Leu), ATA(Ile), CCC(Pro), CTA(Leu), CTT(Leu), TAT(Tyr), CCT(Pro), TGT(Cys), CGC(Arg) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 AGA(Arg), CTC(Leu), ATA(Ile), CCC(Pro), CTA(Leu) 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다.

[0078] 특정 실시형태에서, 유전자 내의 코돈의 평균 tAI 값은 약 0.15 내지 약 0.5, 약 0.15 내지 약 0.45, 약 0.15 내지 약 0.4, 약 0.15 내지 약 0.35, 약 0.15 내지 약 0.3, 약 0.15 내지 약 0.25, 약 0.15 내지 약 0.2, 약 0.2 내지 약 0.5, 약 0.2 내지 약 0.45, 약 0.2 내지 약 0.4, 약 0.2 내지 약 0.35, 약 0.2 내지 약 0.3, 약 0.2 내지 약 0.25, 약 0.25 내지 약 0.5, 약 0.25 내지 약 0.45, 약 0.25 내지 약 0.4, 약 0.25 내지 약 0.35, 약 0.25 내지 약 0.3, 약 0.3 내지 약 0.5, 약 0.3 내지 약 0.45, 약 0.3 내지 약 0.4, 약 0.3 내지 약 0.35, 약 0.35 내지 약 0.5, 약 0.35 내지 약 0.45, 약 0.35 내지 약 0.4, 약 0.4 내지 약 0.5, 약 0.4 내지 약 0.45, 및 약 0.45 내지 약 0.5이다. 특정 실시형태에서, 유전자 내의 코돈의 평균 tAI 값은 약 0.15, 약 0.2, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.35, 약 0.4, 약 0.45 또는 약 0.5 미만이다.

[0079] stAI는 tRNA의 세포 농도 및 해독 효율성에 대한 추정치를 고려한 각각의 코돈에 대한 코돈 최적성 추정치이며, 종 특이적 방식으로 해독 효율에 가중치를 부여한다. stAI는 예를 들어, 문헌[Sabi *et al.* (2014) DNA Res. 21(5): 511-525]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 주어진 종, 예를 들어 인간에 대한 모든 코돈의 중앙 stAI 값보다 작은 stAI 값을 갖는다.

[0080] nTE는 tRNA의 세포 농도, 해독 효율 및 세포 mRNA 풀에서 코돈의 사용을 고려한 각 코돈에 대한 코돈 최적성의 추정치이다. nTE는 예를 들어 문헌[Pechman *et al.* (2013) Nat. Struct. Mol. Biol. 20(2):237-43]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 주어진 종, 예를 들어 인간에 대한 모든 코돈의 중앙 nTE 값보다 작은 nTE 값을 갖는다.

[0081] CAI는 고도로 발현된 유전자에서 코돈 빈도를 평가하여 코돈 최적성을 추정한다. 따라서, CAI에 의해 추정된 코돈 최적성은 고도로 발현된 것으로 지정된 유전자 세트에 따라 달라질 수 있다. CAI는 예를 들어, 문헌[Sharp *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15(3):1281-95]에 기재되어 있다. gCAI는 CAI와 유사하지만, 주어진 세포에서 발현된 전체 전사체를 사용한다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 주어진 종, 예를 들어 인간에 대한 모든 코돈의 중앙 CAI 값보다 작은 CAI 값을 갖는다.

[0082] CSC는 코돈 발생을 mRNA 반감기 측정과 상관시킴으로써 코돈 최적성을 추정한다. CSC는 예를 들어, 문헌[Presnyak *et al.* (2015) Cell 160(6):1111-24]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 주어진 종, 예를 들어 인간에 대한 모든 코돈의 중앙 CSC 값보다 작은 CSC 값을 갖는다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 CSC에 의해서 결정되는 경우 0 또는 그 미만의 값을 갖는다.

[0083] 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 ATA, GTA 및 AGA 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 ATA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 GTA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 AGA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 ATA 및 GTA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 ATA 및 AGA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 GTA 및 AGA이다. 특정 실시형태에서, 비-최적 코돈은 ATA, GTA, 및 AGA이다.

[0084] 특정 실시형태에서, 유전자 내의 코돈 중 약 20% 내지 약 70%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 70%, 약 30% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 70%, 약 40% 내지 약 60%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 70%, 약 50% 내지 약 60% 또는 약 60% 내지 약 70%는 비-최적 코돈이다. 특정 실시형태에서, 유전자 내의 코돈 중 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60% 또는 약 70% 초과가 비-최적 코돈이다. 특정 실시형태에서 유전자 내의 코돈 중 약 40% 또는 약 50%가 비-최적 코돈이다.

### [0085] III. 운반 RNA의 제조 방법

[0086] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법의 실시예 유용한 tRNA 분자는 합성 화학적 방법에 의한 세포의 생산, 재조합 DNA 방법에 의한 세포내 생산 또는 자연 공급원으로부터의 정제를 포함하는 당업계에 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다고 고려된다.

[0087] 예를 들어, tRNA를 암호화하는 DNA 분자는 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, tRNA의 서열은 적절한 합성 핵산 프라이머를 사용하여 기존의 혼성화 기술 또는 중합 효소 연쇄 반응(PCR)

기술에 의해 라이브러리로부터 합성되거나 클로닝될 수 있다. tRNA를 암호화하는 생성된 DNA 분자는 예를 들어, tRNA를 암호화하는 통상적인 유전자 발현 작제물(즉, 발현 벡터)을 생성하기 위해 발현 제어 서열을 포함하는 다른 적절한 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있다. 정의된 유전자 작제물의 생산은 당업계의 일상적인 기술 내에 있다. 목적하는 tRNA를 암호화하는 핵산은 하기 섹션에 설명된 발현 벡터와 같은 발현 벡터에 혼입(결찰)될 수 있으며, 이는 통상적인 형질감염 또는 형질전환 기술을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 숙주 세포의 예는 *이. 콜라이* 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장 293(HEK 293) 세포, HeLa 세포, 아기 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2) 및 골수종 세포이다. 형질전환된 숙주 세포는 숙주 세포가 tRNA를 암호화하는 유전자를 발현하도록 허용하는 조건 하에서 성장할 수 있다. 특정 발현 및 정제 조건은 사용되는 발현 시스템에 따라 달라질 것이다.

[0088] 대안적으로, tRNA는 당업계에 공지된 방법에 의해 자연 공급원으로부터 화학적으로 합성되거나 정제될 수 있다. tRNA가 세포에 도입되거나 대상체에게 투여되기 전에 아미노아실화될 때, tRNA는 화학적 또는 효소적 아미노아실화를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 원하는 아미노산과 아미노아실화될 수 있다.

#### [0089] IV. 발현 벡터

[0090] 관심대상 tRNA는 관심대상 tRNA를 암호화하는 유전자를 발현 벡터에 혼입함으로써 관심대상 세포에서 발현될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하며; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 혼입한 당업계에 공지된 것 모두, 예컨대, 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드 또는 리포솜에 포함됨), 레트로트랜스포존(예를 들어, 피기백, 슬리펩 뷰티) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)를 포함한다.

[0091] 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 용어 "바이러스"는 단백질 합성 또는 에너지 생성 기전이 없는 절대 세포내 기생충을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터), 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 엡스타인-바 바이러스(EBV) 벡터, 폴리오마바이러스 벡터(예를 들어, 유인원 공포 바이러스 40(SV40) 벡터), 폭스바이러스 벡터 및 유사형 바이러스 벡터를 포함한다.

[0092] 바이러스는 RNA 바이러스(RNA로 구성된 계놈을 가짐) 또는 DNA 바이러스(DNA로 구성된 계놈을 가짐)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 DNA 바이러스 벡터이다. 예시적인 DNA 바이러스는 파코바이러스(예를 들어, 아데노 관련 바이러스), 아데노바이러스, 아스파바이러스, 헤르페스 바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스 1 및 2(HSV-1 및 HSV-2), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 거대 세포 바이러스(CMV)), 유두종 바이러스(예를 들어, HPV), 폴리오마바이러스(예를 들어, 유인원 공포 바이러스 40(SV40)) 및 폭스 바이러스(예를 들어, 우두 바이러스, 우두 바이러스, 천연두 바이러스, 계두 바이러스, 양두 바이러스, 점액종 바이러스)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 RNA 바이러스 벡터이다. RNA 바이러스의 예는 부나바이러스(예를 들어, 한타 바이러스), 코로나바이러스, 에볼라바이러스, 플라비바이러스(예를 들어, 황열병 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 뎅기 바이러스), 간염 바이러스(예를 들어, A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스), 인플루엔자 바이러스(예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A형, 인플루엔자 바이러스 B형, 인플루엔자 바이러스 C형), 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 노로 바이러스(예를 들어, 노르윙크 바이러스), 폴리오마바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 레트로바이러스(예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스-1(HIV-1)) 및 토로 바이러스를 포함한다.

[0093] 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 tRNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 서열 또는 프로모터를 포함한다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기능적 관계에서 폴리뉴클레오타이드 요소의 연결을 의미한다. 핵산 서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 유전자의 전사에 영향을 미치는 경우 유전자에 작동 가능하게 연결된다. 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열은 일반적으로 연속적이다. 그러나 인핸서는 일반적으로 프로모터로부터 몇 킬로베이스에 의해 분리될 때 기능하고 인트론 서열은 가변 길이일 수 있기 때문에, 일부 폴리뉴클레오타이드 요소는 작동 가능하게 연결될 수 있지만, 직접 측정되지 않을 수 있고, 심지어는 다른 대립 유전자 또는 염색체의 트랜스에서 기능할 수도 있다.

[0094] tRNA 유전자는 바람직하게는 다양한 세포 유형에서 활성인 강력한 프로모터를 갖는다. 진핵 tRNA 유전자의 프로모터는 일반적으로 tRNA 분자 자체를 암호화하는 구조적 서열 내에 존재한다. 5' 상류 영역 내에서 전사 활성을

조절하는 요소가 존재하지만, 활성 전사 단위의 길이는 500개 염기쌍보다 상당히 적을 수 있다.

- [0095] 사용될 수 있는 프로모터의 추가 예는 레트로바이러스 LTR, SV40 프로모터, 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터, U6 프로모터 또는 임의의 다른 프로모터(예를 들어, 세포 프로모터, 예컨대, 히스톤, pol III 및  $\beta$ -액틴 프로모터를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 진핵 세포 프로모터)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 다른 바이러스 프로모터는 아데노바이러스 프로모터, TK 프로모터 및 B19 파보 바이러스 프로모터를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 프로모터의 선택은 본 명세서에 포함된 교시로부터 당업자에게 명백할 것이다.
- [0096] 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열과 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 tRNA 암호 서열을 포함한다.
- [0097] 특정 실시형태에서, tRNA 암호 서열 이외에, 발현 벡터는 상응하는 야생형 tRNA 유전자에 측접한 게놈 DNA 서열에 상응하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열과 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0098] 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터
- [0099] 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터이다. AAV는 데펜도파보바이러스(Dependoparvovirus) 속 및 파보바이러스 계열의 작고 외피가 없는 20면체 바이러스이다. AAV는 약 4.7 kb의 단일 가닥 선형 DNA 게놈을 갖는다. AAV는 여러 조직 유형의 분열 세포 및 정지 세포를 모두 감염시킬 수 있으며, 상이한 AAV 혈청형은 상이한 조직 주성을 나타낸다.
- [0100] AAV는 혈청형 AAV-1 내지 AAV-12뿐만 아니라 비인간 영장류로부터의 100개 이상의 혈청형을 포함하는 수많은 혈청학적으로 구별 가능한 유형을 포함한다(예를 들어, 문헌[Srivastava (2008) J. Cell Biochem., 105(1): 17–24] 및 문헌[Gao *et al.* (2004) J. Virol., 78(12), 6381–6388] 참고). 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 사용된 AAV 벡터의 혈청형은 전달 효율, 조직 주성 및 면역원성에 기초하여 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, AAV-1, AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-8 및 AAV-9는 중추 신경계로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-1, AAV-8 및 AAV-9는 심장으로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-2는 신장으로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-7, AAV-8 및 AAV-9는 간으로의 전달에 사용할 수 있고; AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-9는 폐로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-8은 췌장으로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-2, AAV-5 및 AAV-8은 광 수용체 세포로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-1, AAV-2, AAV-4, AAV-5 및 AAV-8은 망막 색소 상피로의 전달에 사용될 수 있고; AAV-1, AAV-6, AAV-7, AAV-8 및 AAV-9는 골격근으로의 전달에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드 단백질은 미국 특허 제7,198,951호에 개시된 바와 같은 서열, 예컨대, 비제한적으로, AAV-9(미국 특허 제7,198,951호의 서열번호 1 내지 3), AAV-2(미국 특허 제7,198,951호의 서열번호 4), AAV-1(미국 특허 제7,198,951호의 서열번호 5), AAV-3(미국 특허 제7,198,951호의 서열번호 6) 및 AAV-8(미국 특허 제7,198,951호의 서열번호 7)을 포함한다. 레서스 원숭이로부터 확인된 AAV 혈청형, 예를 들어 rh.8, rh.10, rh.39, rh.43 및 rh.74도 고려된다. 천연 AAV 혈청형 외에도 전달 효율, 조직 친화성 및 면역원성을 개선하기 위해 변형된 AAV 캡시드가 개발되었다. 천연 및 변형 AAV 캡시드의 예는 미국 특허 제7,906,111호, 제9,493,788호 및 제7,198,951호 및 PCT 공개 WO2017189964A2호에 개시되어 있다.
- [0101] 야생형 AAV 게놈은 AAV 복제, 게놈 캡슐화 및 통합을 지시하는 신호 서열을 포함하는 2개의 145개의 뉴클레오티드 역방향 말단 반복부(ITR)를 포함한다. ITR 외에도, 3개의 AAV 프로모터, p5, p19 및 p40은 rep 및 cap 유전자를 암호화하는 2개의 오픈 리딩 프레임의 발현을 유도한다. 단일 AAV 인트론의 차동 스플라이싱과 결합된 2개의 rep 프로모터는 rep 유전자로부터 4개의 rep 단백질(Rep 78, Rep 68, Rep 52 및 Rep 40)을 생성한다. Rep 단백질은 게놈 복제를 담당한다. Cap 유전자는 p40 프로모터에서 발현되며 cap 유전자의 스플라이스 변이체인 3개의 캡시드 단백질(VP1, VP2 및 VP3)을 암호화한다. 이 단백질은 AAV 입자의 캡시드를 형성한다.
- [0102] 복제, 캡슐화 및 통합을 위한 시스-작용 신호가 ITR 내에 포함되어 있기 때문에 4.3 kb 내부 게놈의 일부 또는 전부가 외래 DNA, 예를 들어, 관심대상 외인성 유전자용 발현 카세트에 대체될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태

에서, AAV 벡터는 5' ITR 및 3' ITR이 축적된 외인성 유전자에 대한 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함한다. ITR은 캡시드 또는 이의 유도체와 동일한 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, ITR은 캡시드와 다른 혈청형일 수 있으며, 이에 따라 슈도타입 AAV를 생성한다. 특정 실시형태에서, ITR은 AAV-2로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, ITR은 AAV-5로부터 유래된다. ITR 중 적어도 하나를 수정하여 말단 분해 부위를 돌연변이 또는 결실시켜 자기 상보적 AAV 벡터를 생성할 수 있다.

[0103] rep 및 cap 단백질은 AAV 벡터를 생성하기 위해 예를 들어, 플라스미드 상에서 트랜스로 제공될 수 있다. AAV 복제를 허용하는 숙주 세포주는 rep 및 cap 유전자, ITR 축적 발현 카세트, 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 유전자 E1a, E1b55K, E2a, E4orf6 및 VA)가 제공하는 헬퍼 기능을 발현해야 한다(문헌[Weitzman *et al.*, Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols, pp. 1-23, 2011]). AAV 벡터를 생성하고 정제하는 방법은 자세히 설명되어 있다(예를 들어, 문헌[Mueller *et al.*, (2012) Current Protocols in Microbiology, 14D.1.1-14D.1.21, Production and Discovery of Novel Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors] 참고). HEK293 세포, COS 세포, HeLa 세포, BHK 세포, Vero 세포뿐만 아니라 곤충 세포를 포함한 AAV 벡터를 생산하는 데에는 수많은 세포 유형이 적합하다(예를 들어, 미국 특허 제6,156,303호, 제5,387,484호, 제5,741,683호, 제5,691,176호, 제5,688,676호 및 제8,163,543호, 미국 특허 공개 제20020081721호 및 PCT 공개 W000/47757호, W000/24916호 및 W096/17947호 참고). AAV 벡터는 일반적으로 ITR 축적 발현 카세트를 포함하는 하나의 플라스미드 및 추가 AAV 및 헬퍼 바이러스 유전자를 제공하는 하나 이상의 추가 플라스미드에 의해 이러한 세포 유형에서 생산된다.

[0104] 임의의 혈청형의 AAV가 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. 유사하게, 임의의 아데노바이러스 유형이 사용될 수 있고, 당업자는 목적하는 재조합 AAV 벡터(rAAV)의 생산에 적합한 AAV 및 아데노바이러스 유형을 확인할 수 있을 것이라고 고려된다. AAV 입자는 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 아이오딕손 구배 또는 CsCl 구배에 의해 정제될 수 있다.

[0105] AAV 벡터는 크기가 4.7 kb이거나 4.7 kb보다 크거나 작은 단일 가닥 게놈을 가질 수 있으며, 5.2 kb만큼 크거나 3.0 kb만큼 작은 크기가 큰 게놈을 포함한다. 따라서, AAV 벡터로부터 발현되는 관심대상 외인성 유전자가 작은 경우, AAV 게놈은 스테퍼(stuffer) 서열을 포함할 수 있다. 또한, 벡터 게놈은 실질적으로 자기 상보적일 수 있으므로 세포에서 빠른 발현이 가능하다. 특정 실시형태에서, 자기-상보성 AAV 벡터의 게놈은 5'에서 3'로: 5' ITR; 관심대상 유전자의 암호 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 및/또는 인핸서를 포함하는 제1 핵산 서열; 기능적 말단 분해 부위를 갖지 않는 변형된 ITR; 제1 핵산 서열에 상보적이거나 실질적으로 상보적인 제2 핵산 서열; 및 3' ITR을 포함한다. 모든 유형의 게놈을 함유하는 AAV 벡터는 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기에 적합하다.

[0106] AAV 벡터는 pAAV-MCS(Agilent Technologies), pAAV-EF1 $\alpha$ -MCS(System Bio Catalog # AAV502A-1), pAAV-EF1 $\alpha$ -MCS1-CMV-MCS2(System Bio Catalog # AAV503A-1), pAAV-ZsGreen1(Clontech Catalog #6231), pAAV-MCS2(Addgene Plasmid #46954), AAV-Stuffer(Addgene Plasmid #106248), pAAVscCBPIGpluc(Addgene Plasmid #35645), AAVS1-Puro\_PGK1\_3xFLAG\_Twin\_Strep(Addgene Plasmid #68375), pAAV-RAM-d2TTA::TRE-MCS-WPRE-pA(Addgene Plasmid #63931), pAAV-UbC(Addgene Plasmid #62806), pAAVS1-P-MCS(Addgene Plasmid #80488), pAAV-Gateway(Addgene Plasmid #32671), pAAV-Puro\_siKD(Addgene Plasmid #86695), pAAVS1-Nst-MCS(Addgene Plasmid #80487), pAAVS1-Nst-CAG-DEST(Addgene Plasmid #80489), pAAVS1-P-CAG-DEST(Addgene Plasmid #80490), pAAVf-EnhCB-lacZnls(Addgene Plasmid #35642) 및 pAAVS1-shRNA(Addgene Plasmid #82697)를 포함한다. 이러한 벡터는 치료 용도에 적합하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 관심대상 외인성 유전자는 다중 클로닝 부위에 삽입될 수 있고, 선택 마커(예를 들어, 푸로 또는 형광 단백질을 암호화하는 유전자)는 결실되거나 관심대상의 다른(동일하거나 다른) 외인성 유전자로 대체될 수 있다. AAV 벡터의 추가 예는 미국 특허 제5,871,982호, 제6,270,996호, 제7,238,526호, 제6,943,019호, 제6,953,690호, 제9,150,882호 및 제8,298,818호, 미국 특허 공개 제2009/0087413호 및 PCT 공개 W02017075335A1호, W02017075338A2호 및 W02017201258A1에 개시되어 있다.

[0107] 특정 실시형태에서, 발현 벡터는 대상체, 예를 들어, 인간 대상체에서 신경계, 예를 들어 중추 신경계를 표적화할 수 있는 AAV 벡터이다. 신경계를 표적화할 수 있는 예시적인 AAV 벡터는 AAV9 변이체 AAV-PHP.B(예를 들어, 문헌[Deverman *et al.* (2016) Nat. Biotechnol. 34(2):204-209] 참고), AAV-AS(예를 들어, 문헌[Choudhury *et al.* (2016) Mol. Ther. 24:726-35] 참고) 및 AAV-PHP.eB(예를 들어, 문헌[Chan *et al.* (2017) Nat. Neurosci. 20:1172-79] 참고)를 포함한다. 신경계를 표적화하기 위한 추가적인 예시적인 AAV 기반 전략은 문헌



[Bedrook *et al.* (2018) *Annu Rev Neurosci.* 41:323-348]에 기재되어 있다.

[0108] 렌티바이러스 벡터

[0109] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 벡터의 예는 폴로니 무린 백혈병 바이러스 벡터, 비장 괴사 바이러스 벡터 및 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스, 골수 증식 육종 바이러스 및 유방 종양 바이러스와 같은 레트로 바이러스로부터 유래된 벡터를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 진핵 세포로의 레트로바이러스 매개 유전자 전달을 매개하는 작용제로 유용하다.

[0110] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 벡터의 예로는 인간 면역 결핍 바이러스-1(HIV-1), 인간 면역 결핍 바이러스-2(HIV-2), 유인원 면역 결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역 결핍 바이러스(FIV), 소 면역 결핍 바이러스(BIV), 켈브라나 질환 바이러스(JDV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV) 및 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)로부터 유래된 벡터를 포함한다.

[0111] 레트로바이러스 벡터는 전형적으로 바이러스의 구조적 유전자를 암호화하는 서열의 대부분이 결실되고 관심대상 유전자(들)로 대체되도록 구성된다. 더 자주, 구조적 유전자(즉, gag, pol 및 env)는 당업계에 공지된 유전 공학 기술을 사용하여 레트로바이러스 골격으로부터 제거된다. 이는 적절한 제한 엔도뉴클레아제 또는 일부 경우에 Bal 31 엑소뉴클레아제로 분해하여 패키징 신호의 적절한 부분을 포함하는 단편을 생성하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 최소 레트로바이러스 벡터는 5'에서부터 3'로: 5' 긴 말단 반복부(LTR), 패키징 신호, 선택적인 외인성 프로모터 및/또는 인핸서, 관심대상 외인성 유전자 및 3' LTR을 포함한다. 외인성 프로모터가 제공되지 않은 경우, 유전자 발현은 약한 프로모터인 5' LTR에 의해 구동되며, 발현을 활성화시키기 위해서 Tat의 존재가 필요하다. 구조적 유전자는 렌티바이러스의 제조를 위해 별도의 벡터로 제공될 수 있고, 생성된 비리온을 복제 결합으로 만든다. 특히, 렌티바이러스와 관련하여 패키징 시스템은 Gag, Pol, Rev 및 Tat 유전자를 암호화하는 단일 패키징 벡터와 외피 단백질 Env를 암호화하는 제3의 별도의 벡터로 구성될 수 있다(일반적으로 광범위한 감염성으로 인해 VSV-G). 패키징 시스템의 안전성을 개선시키기 위해, 패키징 벡터를 분할하여 하나의 벡터로부터는 Rev를 발현하고, 또 다른 벡터로부터는 Gag 및 Pol를 발현할 수 있다. Tat는 또한 키메라 5' LTR을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 패키징 시스템에서 제거될 수 있으며, 여기서 5' LTR의 U3 영역은 이중 조절 요소로 대체된다.

[0112] 이들 새로운 유전자는 몇 가지 일반적인 방식으로 프로바이러스 결합에 통합될 수 있다. 가장 간단한 구조는 레트로바이러스의 구조적 유전자가 단일 유전자로 대체된 다음 LTR 내의 바이러스 조절 서열의 제어 하에 전사되는 구조이다. 하나 이상의 유전자를 표적 세포에 도입할 수 있는 레트로바이러스 벡터가 또한 작제되어 있다. 일반적으로 이러한 벡터에서 하나의 유전자는 바이러스 LTR의 제어 하에 있는 반면, 두 번째 유전자는 스플라이싱된 메시지에서 발현되거나 자체 내부 프로모터의 조절 하에 있다.

[0113] 따라서, 새로운 유전자(들)는 각각 비리온 RNA의 전사 및 폴리아데닐화를 촉진시키는 역할을 하는 5' 및 3' LTR이 측정된다. 용어 "긴 말단 반복부" 또는 "LTR"은 자연 서열 맥락에서 직접 반복이고 U3, R 및 U5 영역을 포함하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치한 염기쌍의 도메인을 지칭한다. LTR은 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현(예를 들어, 유전자 전사체의 촉진, 개시 및 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 기본적인 기능을 제공한다. LTR은 전사 제어 요소, 폴리아데닐화 신호, 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함한 수많은 조절 신호를 포함한다. U3 영역은 인핸서 및 프로모터 요소를 포함한다. U5 영역은 프라이머 결합 부위와 R 영역 사이의 서열이며 폴리아데닐화 서열을 포함한다. R(반복) 영역은 U3 및 U5 영역이 측정되어 있다. 특정 실시형태에서, R 영역은 트랜스-활성화 반응(TAR) 유전자 요소를 포함하는데, 이는 트랜스-활성화제(tat) 유전자 요소와 상호작용하여 바이러스 복제를 향상시킨다. 이 요소는 5' LTR의 U3 영역이 이중 프로모터로 대체된 실시형태에서는 필요하지 않다.

[0114] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. 바이러스 복제 결합을 만들어 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 향상시키기 위해 3' LTR의 변형이 종종 만들어진 다. 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 자가 불활성화(self-inactivating: SIN) 벡터이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, SIN 레트로바이러스 벡터는 3' LTR U3 영역이 바이러스 복제의 첫 번째 라운드를 넘어서는 바이러스 전사를 방지하기 위해 (예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형된 복제 결합 레트로바이러스 벡터를 지칭한다. 이는 바이러스 복제 과정에서 3' LTR U3 영역이 5' LTR U3 영역의 주형으로 사용되어 U3 인핸서-프로모터 없이는 바이러스 전사체를 만들 수 없기 때문이다. 추가 실시형태에서, 3' LTR은 U5 영역이 예를 들어, 이 상적인 폴리아데닐화 서열로 대체되도록 변형된다. 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 다에 대한 변형과 같

은 LTR에 대한 변형이 또한 본 명세서에서 기재된다는 점을 주목해야 한다.

- [0115] 특정 실시형태에서, 5' LTR의 U3 영역은 바이러스 입자의 생산 동안 바이러스 게놈의 전사를 유도하기 위해 이중 프로모터로 대체된다. 사용될 수 있는 이중 프로모터의 예는 예를 들어, 바이러스 유인원 바이러스 40(SV40)(예를 들어, 초기 또는 후기), 거대 세포 바이러스(CMV)(예를 들어, 그 초기), 모로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 단순 포진 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터를 포함한다. 전형적인 프로모터는 Tat 독립적인 방식으로 높은 수준의 전사를 유도할 수 있다. 이러한 대체는 바이러스 생산 시스템에 완전한 U3 서열이 없기 때문에 복제-적격 바이러스를 생성하기 위한 재조합 가능성을 감소시킨다.
- [0116] 5' LTR에 인접하여 게놈(tRNA 프라이머 결합 부위)의 역전사 및 바이러스 RNA를 입자로 효율적으로 패키징하는 데 필요한 서열(Psi 부위)이 존재한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "패키징 신호" 또는 "패키징 서열"은 바이러스 입자 형성 동안 레트로바이러스 RNA 가닥의 캡슐화에 필요한 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 지칭한다(예를 들어, 문헌[Clever *et al.*, 1995 J. Virology, 69(4):2101-09] 참고). 패키징 신호는 바이러스 게놈의 캡슐화에 필요한 최소 패키징 신호(psi[Ψ] 서열이라고도 함)일 수 있다.
- [0117] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 FLAP를 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "FLAP"은 서열이 레트로바이러스, 예를 들어 HIV-1 또는 HIV-2의 중앙 폴리퓨린 관 및 중앙 종결 서열(cPPT 및 CTS)을 포함하는 핵산을 지칭한다. FLAP 요소의 예는 미국 특허 제6,682,907호 및 문헌[Zennou *et al.* (2000) Cell 101:173]에 기재되어 있다. 역전사 동안, cPPT에서 플러스 가닥 DNA의 중앙 개시와 CTS에서 중앙 종결은 3 가닥 DNA 구조, 즉 중앙 DNA 플랩의 형성으로 이어진다. 이론에 얽매고자 하는 것은 아니지만, DNA 플랩은 렌티바이러스 게놈 핵 내수송의 시스 활성 결정자 역할을 할 수 있고/있거나 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터 골격은 벡터에서 관심대상 이중 유전자의 상류 또는 하류에 하나 이상의 FLAP 요소를 포함한다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 전달 플라스미드는 FLAP 요소를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 HIV-1로부터 단리된 FLAP 요소를 포함한다.
- [0118] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 외수송 인자를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 하나 이상의 외수송 요소를 포함한다. 용어 "외수송 요소"는 RNA 전사체의 핵으로부터 세포질로의 수송을 조절하는 시스-작용 전사 후 조절 요소를 지칭한다. RNA 외수송 요소의 예는 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) RRE(예를 들어, 문헌[Cullen *et al.*, (1991) J. Virol. 65: 1053; 및 Cullen *et al.*, (1991) Cell 58: 423] 참고) 및 B형 간염 바이러스 변역후 조절 요소(hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element: HPRE)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, RNA 외수송 요소는 유전자의 3' UTR 내에 위치하며 하나 또는 여러 개의 카피로 삽입될 수 있다.
- [0119] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 다양한 전사 후 조절 요소, 예를 들어 우드릭 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE; 문헌[Zufferey *et al.*, (1999) J. Virol., 73:2886] 참고); B형 간염 바이러스(HPRE)에 존재하는 전사 후 조절 요소(문헌[Huang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:3864]); 및 그와 같은 것(문헌[(Liu *et al.*, (1995), Genes Dev., 9:1766]))이 이중 핵산의 발현을 증가시킬 수 있다. 전사후 조절 요소는 일반적으로 이중 핵산 서열의 3' 말단에 위치한다. 이 구성은 5' 부분이 이중 핵산 암호 서열을 포함하고, 3' 부분이 전사 후 조절 요소 서열을 포함하는 mRNA 전사체의 합성을 초래한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사후 조절이 결여되거나, 이를 포함하지 않는데, 이는 일부 경우에 이들 요소가 세포 형질 전환의 위험을 증가시키고/거나 mRNA 전사체의 양을 실질적으로 또는 유의하게 증가시키지 않거나 또는 mRNA 안정성을 증가시키기 때문이다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 추가된 안전 조치로서 WPRE 또는 HPRE가 결여되거나 이를 포함하지 않는다.
- [0120] 이중성 핵산 전사체의 효율적인 종결 및 폴리아데닐화를 지시하는 요소는 이중성 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 신호는 일반적으로 폴리아데닐화 신호의 하류에서 발견된다. 따라서, 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "폴리아데닐화 신호" 또는 "폴리아데닐화 서열"은 RNA 중합 효소 II에 의한 초기 RNA 전사체의 종결 및 폴리아데닐화 둘 다를 지시하는 DNA 서열을 나타낸다. 재조합 전사체의 효율적인 폴리아데닐화가 바람직한데, 그 이유는 폴리아데닐화 신호가 결여된 전사체는 불안정하여, 빠르게 분해되기 때문이다. 본 명세서에 기재된 벡터에서 사용될 수 있는 폴리아데닐화 신호의 예시적인 예는 이상적인 폴리아데닐화 서열(예를 들어, AATAAA, ATATAA AGTAAA), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열(BGHpA), 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 서열(r

$\beta$  gpA) 또는 당업계에 공지된 다른 적합한 이중 또는 내인성 폴리아데닐화 서열을 포함한다.

[0121] 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 절연체 요소를 추가로 포함한다. 절연체 요소는 통합 부위 효과로부터 레트로바이러스 발현 서열, 예를 들어, 치료용 유전자를 보호하는 데 기여할 수 있는데, 이는 게놈 DNA에 존재하는 시스-작용 요소에 의해 매개될 수 있고, 전달된 서열의 비조절된 발현으로 이어질 수 있다(즉, 위치 효과; 예를 들어, 문헌[Burgess-Beusse *et al.*, (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433]; 및 문헌[Zhan *et al.*, 2001, Hum. Genet., 109:471] 참고). 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 LTR 중 하나 또는 둘 다에 또는 세포 게놈으로 통합되는 벡터 영역의 다른 곳에 절연체 요소를 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 사용하기 위한 절연체의 예는  $\beta$ -글로빈 절연체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌[Chung *et al.*, (1993). Cell 74:505]; 문헌[Chung *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:575]; 및 문헌[Bell *et al.*, 1999. Cell 98:387] 참고). 절연체 요소의 예는  $\beta$ -HS4와 같은  $\beta$ -글로빈 유전자좌로부터의 절연체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0122] 렌티바이러스 벡터의 비제한적인 예는 pLVX-EF1alpha-AcGFP1-C1(Clontech Catalog #631984), pLVX-EF1alpha-IRES-mCherry(Clontech Catalog #631987), pLVX-Puro(Clontech Catalog #632159), pLVX-IRES-Puro(Clontech Catalog #632186), pLenti6/V5-DEST<sup>TM</sup>(Thermo Fisher), pLenti6.2/V5-DEST<sup>TM</sup>(Thermo Fisher), pLKO.1(Addgene의 Plasmid #10878), pLKO.3G(Addgene의 Plasmid #14748), pSico(Addgene의 Plasmid #11578), pLJM1-EGFP(Addgene의 Plasmid #19319), FUGW(Addgene의 Plasmid #14883), pLVTHM(Addgene의 Plasmid #12247), pLVUT-tTR-KRAB(Addgene의 Plasmid #11651), pLL3.7(Addgene의 Plasmid #11795), pLB(Addgene의 Plasmid #11619), pWPXL(Addgene의 Plasmid #12257), pWPI(Addgene의 Plasmid #12254), EF.CMV.RFP(Addgene의 Plasmid #17619), pLenti CMV Puro DEST(Addgene의 Plasmid #17452), pLenti-puro(Addgene의 Plasmid #39481), pULTRA(Addgene의 Plasmid #24129), pLX301(Addgene의 Plasmid #25895), pHIV-EGFP(Addgene의 Plasmid #21373), pLV-mCherry(Addgene의 Plasmid #36084), pLionII(Addgene의 Plasmid #1730), pInducer10-mir-RUP-PheS(Addgene의 Plasmid #44011)를 포함한다. 이러한 벡터는 치료 용도에 적합하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 선택 마커(예를 들어, puro, EGFP 또는 mCherry)는 결실되거나 관심대상 제2 외인성 유전자로 대체될 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 추가 예는 미국 특허 제7,629,153호, 제7,198,950호, 제8,329,462호, 제6,863,884호, 제6,682,907호, 제7,745,179호, 제7,250,299호, 제5,994,136호, 제6,287,814호, 제6,013,516호, 제6,797,512호, 제6,544,771호, 제5,834,256호, 제6,958,226호, 제6,207,455호, 제6,531,123호 및 제6,352,694 및 PCT 공개 WO2017/091786호에 개시되어 있다.

[0123] 아데노바이러스 벡터

[0124] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 아데노바이러스는 중형(90 내지 100 nm), 비-외피(네이키드), 20면체 바이러스로 뉴클레오캡시드와 이중 가닥 선형 DNA 게놈으로 구성된다. 용어 "아데노바이러스"는 인간, 소, 양, 말, 개, 돼지, 무린 및 유인원 아데노바이러스 아속을 포함하지만 이들로 제한되지 않은 아데노비리드 속의 임의의 바이러스를 지칭한다. 전형적으로, 아데노바이러스 벡터는 예를 들어, 유전자 전달을 위해서 비-네이티브 핵산 서열을 아데노바이러스에 삽입부를 수용하도록 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 결실, 삽입 또는 치환)를 아데노바이러스의 아데노바이러스 게놈에 도입함으로써 생성된다.

[0125] 인간 아데노바이러스는 아데노바이러스 벡터를 위한 아데노바이러스 게놈의 공급원으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스는 A(예를 들어, 혈청형 12, 18, 및 31), 하위군 B(예를 들어, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 및 50), 하위군 C(예를 들어, 혈청형 1, 2, 5, 및 6), 하위군 D(예를 들어, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 내지 30, 32, 33, 36 내지 39, 및 42 내지 48), 하위군 E(예를 들어, 혈청형 4), 하위군 F(예를 들어, 혈청형 40 및 41), 미분류 혈청군(예를 들어, 혈청형 49 및 51) 또는 임의의 다른 아데노바이러스 혈청군 또는 혈청형일 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 1 내지 51은 American Type Culture Collection(ATCC, 미국 버지니아주 매나서스 소재)으로부터 입수 가능하다. 비-군 C 아데노바이러스 벡터, 비-군 C 아데노바이러스 벡터의 생산 방법 및 비-군 C 아데노바이러스 벡터의 사용 방법은 예를 들어, 미국 특허 제5,801,030호, 제5,837,511호, 제5,849,561호, PCT 공개 WO1997/012986호 및 WO1998/053087호에 개시되어 있다.

[0126] 비-인간 아데노바이러스(예를 들어, 유인원, 유인원, 조류, 개, 양 또는 소 아데노바이러스)를 사용하여 아데노바이러스 벡터를 생성할 수 있다(즉, 아데노바이러스 벡터에 대한 아데노바이러스 게놈의 공급원으로서). 예를 들어, 아데노바이러스 벡터는 신세계 원숭이와 구세계 원숭이를 모두 포함하는 유인원 아데노바이러스를 기반으로 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Virus Taxonomy: VHIth Report of the International Committee on Taxonomy

of Viruses (2005)] 참고). 영장류를 감염시키는 아데노바이러스의 계통 발생 분석은 예를 들어 문헌[Roy *et al.* (2009) PLoS Pathog. 5(7):e1000503]에 개시되어 있다. 고릴라 아데노바이러스는 아데노바이러스 백터를 위한 아데노바이러스 계놈의 공급원으로 사용될 수 있다. 고릴라 아데노바이러스 및 아데노바이러스 백터는 예를 들어, PCT 공개 W02013/052799호, W02013/052811호 및 W02013/052832호에 기재되어 있다. 아데노바이러스 백터는 또한 하위 유형의 조합물을 포함할 수 있으며, 이에 따라 "키메라" 아데노바이러스 백터일 수 있다.

[0127] 아데노바이러스 백터는 복제-적격, 조건부 복제-적격 또는 복제-결핍일 수 있다. 복제-적격 아데노바이러스 백터는 전형적인 숙주 세포, 즉, 일반적으로 아데노바이러스에 감염될 수 있는 세포에서 복제할 수 있다. 조건부 복제 아데노바이러스 백터는 미리 결정된 조건에서 복제하도록 설계된 아데노바이러스 백터이다. 예를 들어, 복제-필수 유전자 기능, 예를 들어, 아데노바이러스 초기 영역에 의해 암호화된 유전자 기능은 유도성, 억제성 또는 조직 특이적 전사 조절 서열, 예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 조건부 복제 아데노바이러스 백터는 미국 특허 제5,998,205호에 추가로 기재되어 있다. 복제-결핍 아데노바이러스 백터는 예를 들어, 하나 이상의 복제-필수 유전자 기능의 결핍으로 인해 복제에 필요한 하나 이상의 유전자 기능 또는 아데노바이러스 계놈 영역의 보안을 필요로 하여, 아데노바이러스 백터가 전형적인 숙주 세포, 특히 아데노바이러스 백터에 의해 감염될 인간의 세포에서 복제되지 않는 아데노바이러스 백터이다.

[0128] 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 백터는 복제-결핍 아데노바이러스 백터가 증식을 위해 (예를 들어, 형성하기 위해) 아데노바이러스 계놈의 하나 이상의 영역의 적어도 하나의 복제-필수 유전자 기능의 보안을 필요로 한다. 아데노바이러스 백터는 단지 아데노바이러스 계놈의 초기 영역(즉, E1-E4 영역), 아데노바이러스 계놈의 후기 영역(즉, L1-L5 영역), 아데노바이러스 계놈의 초기 영역 및 후기 영역 둘 다 또는 모든 아데노바이러스 유전자(즉, 고용량 아데노 백터(HC-Ad))의 하나 이상의 복제-필수 유전자 기능이 결핍될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Morsy *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 965-976, Chen *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1645-1650, and Kochanek *et al.* (1999) Hum. Gene Ther. 10(15):2451-9]을 참고하기 바란다. 복제-결핍 아데노바이러스 백터의 예는 미국 특허 제5,837,511호, 제5,851,806호, 제5,994,106호, 제6,127,175호, 제6,482,616호 및 제7,195,896호 및 PCT 공개 W01994/028152호, W01995/002697호, W01995/016772호, W01995/034671호, W01996/022378호, W01997/012986호, W01997/021826호 및 W02003/022311호에 개시되어 있다.

[0129] 본 명세서에 기재된 복제-결핍 아데노바이러스 백터는 높은 역가의 바이러스 백터 스톱을 생성하기 위해 적절한 수준에서 복제-결핍 아데노바이러스 백터에 존재하지 않지만, 바이러스 증식에 필요한 유전자 기능을 제공하는 보완 세포주에서 생산될 수 있다. 이러한 보완 세포주는 공지되어 있으며, 293세포(예를 들어, 문헌[Graham *et al.* (1977) J. Gen. Virol. 36: 59-72]에 기재됨), PER.C6 세포(예를 들어, PCT 공개 W01997/000326호 및 미국 특허 제5,994,128호 및 제6,033,908호에 기재됨), 및 293-ORF6 세포(예를 들어, PCT 공개 W01995/034671호 및 문헌[Brough *et al.* (1997) J. Virol. 71: 9206-9213]에 기재됨)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 복제-결핍 아데노바이러스 백터를 생산하기 위한 보완 세포주의 다른 예는 발현이 숙주 세포에서 바이러스 성장을 저해하는 트랜스진을 암호화하는 아데노바이러스 백터를 증식하도록 생성된 보완 세포를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 공개 제2008/0233650호 참고). 보완 세포의 추가 예는 미국 특허 제6,677,156호 및 제6,682,929호 및 PCT 공개 W02003/020879에 기재되어 있다. 아데노바이러스 백터-함유 조성물에 대한 제형은 예를 들어 미국 특허 제6,225,289호 및 제6,514,943호 및 PCT 공개 W02000/034444호에 추가로 기재되어 있다.

[0130] 아데노바이러스 백터 및/또는 아데노바이러스 백터의 제조 또는 증식을 위한 추가 예는 미국 특허 제5,559,099호, 제5,837,511호, 제5,846,782호, 제5,851,806호, 제5,994,106호, 제5,994,128호, 제5,965,541호, 제5,981,225호, 제6,040,174호, 제6,020,191호, 제6,083,716호, 제6,113,913호, 제6,303,362호, 제7,067,310호 및 제9,073,980호에 기재되어 있다.

[0131] 상업적으로 이용 가능한 아데노바이러스 백터 시스템은 Thermo Fisher Scientific에서 입수 가능한 ViraPower™ Adenoviral Expression System, Agilent Technologies에서 입수 가능한 AdEasy™ 아데노바이러스 백터 시스템 및 Takara Bio USA, Inc.에서 입수 가능한 Adeno-X™ Expression System 3을 포함한다.

[0132] 기타 바이러스 백터

[0133] 특정 실시형태에서, 바이러스 백터는 단순 포진 바이러스 플라스미드 백터일 수 있다. 단순 포진 바이러스 타입-1(HSV-1)은 유전자 치료를 위한 잠재적인 유용한 유전자 전달 백터 시스템으로 입증되어 있다. HSV-1 백터는 유전자를 근육으로 전달하는 데 사용되었으며 무린 뇌종양 치료에 사용되었다. 보다 쉬운 작동과 더 큰 삽입부(최대 140 kb) 용량을 위해 헬퍼 바이러스 의존성 미니 바이러스 백터가 개발되었다. 복제-부적격 HSV 앰플리콘이 당업계에 작제되어 있다. 이러한 HSV 앰플리콘은 외인성 DNA 삽입을 위한 공간을 제공하기 위해 HSV 계놈의



큰 결실을 포함한다. 일반적으로 이들은 HSV-1 패키징 부위, HSV-1 "ori S" 복제 부위 및 IE 4/5 프로모터 서열을 포함한다. 이러한 비리온은 전파를 위해 헬퍼 바이러스에 의존한다.

[0134] 바이러스 벡터 생산

[0135] 바이러스 벡터를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 개시된 바이러스는 감염성 바이러스 입자의 생산을 허용하도록 적합한 조건 하에서 형질감염되거나 감염된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 통상적인 기술을 사용하여 적합한 숙주 세포주에서 생산된다. 바이러스 유전자 및/또는 tRNA를 암호화하는 핵산은 플라스미드에 통합되고 기존의 형질 감염 또는 형질전환 기술을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 개시된 바이러스의 생산을 위한 숙주 세포의 예는 HeLa, HeLa-S3, HEK293, 911, A549, HER96 또는 PER-C6 세포와 같은 인간 세포주를 포함한다. 특정 생산 및 정제 조건은 사용된 바이러스 및 생산 시스템에 따라 달라진다.

[0136] 특정 실시형태에서, 생산자 세포는 대상체에게 직접 투여될 수 있지만, 다른 실시형태에서, 생산 후 감염성 바이러스 입자는 배양물로부터 회수되고 선택적으로 정제된다. 전형적인 정제 단계는 플라크 정제, 원심분리, 예를 들어, 염화세슘 구배 원심 분리, 정화, 효소 처리, 예를 들어, 벤조나제 또는 프로테아제 처리, 크로마토그래피 단계, 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피 또는 여과 단계를 포함할 수 있다.

[0137] IV. 약제학적 조성물

[0138] 치료 용도를 위해서, tRNA 및/또는 발현 벡터가 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 건전한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 합리적인 이익/위험 비율에 상응하게 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0139] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 합리적인 이익/위험 비율에 상응하게 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 완충제, 담체 및 부형제를 의미한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 인산염 완충 식염수 용액, 물, 에멀전(예를 들어, 오일/물 또는 물/오일 에멀전) 및 다양한 유형의 습윤제와 같은 표준 약제학적 담체 중 임의의 것을 포함한다. 조성물은 또한 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있다. 담체, 안정화제 및 보존제의 예에 대해서는 문헌[Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]]을 참고하기 바란다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 약제학적 투여에 적합한 완충제, 용매, 분산 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다.

[0140] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 조성물의 pH, 삼투물농도, 점도, 투명도, 색, 등장성, 냄새, 무균상태, 안정성, 용해율 및 방출률, 흡착률 또는 투과율을 변형시키거나 유지하거나 또는 보존하기 위한 제형 물질을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 제형 물질은 하기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 아미노산(예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신); 항미생물제; 항산화제(예를 들어, 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 황산수소나트륨); 완충용액(예를 들어, 붕산염, 중탄산염, Tris-HCl, 시트르산염, 인산염 또는 다른 유기산); 증강제(예를 들어, 만니톨 또는 글리신); 킬레이트제[에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)]; 착화제(예를 들어, 카페인, 폴리비닐피롤리돈,  $\beta$ -사이클로덱스트린 또는 히드록시프로필- $\beta$ -사이클로덱스트린); 충전제; 단당류; 이당류; 및 다른 당(예를 들어, 글루코스, 만노스, 텍스트린); 단백질(예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 향미료 또는 희석화제(diluting agent); 유화제; 친수성고분자(예를 들어, 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩티드; 염-형성 반대이온(예를 들어, 나트륨); 방부제(예를 들어, 염화벤잘코늄, 벤조산, 살리실산, 타이메로살, 펜에틸알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예를 들어, 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜); 당알코올(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁화제; 계면활성제 또는 습윤제(예를 들어, 플루로닉, PEG, 소르비탄에스테르, 폴리소르베이트 20과 같은 폴리소르베이트, 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사폴); 안정성 증강제(예를 들어, 수크로스 또는 소르비톨); 긴장도 증강제(알칼리 금속 할로겐화물, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 수송 매개체; 희석제; 부형제 및/또는 약제학적 아주반트(문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990) 참고]).

[0141] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 나노 입자, 예를 들어 중합체 나노입자, 리포솜 또는 미셀을 함유할 수 있다(문헌[Anselmo *et al.* (2016) Bioeng. Transl. Med. 1: 10-29] 참고). 특정 실시형태에서, 조성물은 예를 들어, 미국 특허 공개 제2017/0354672에 기재된 바와 같이 나노입자 또는 아미노지질 전달 화합물을 포함하지

않는다. 특정 실시형태에서, 세포 내로 도입되거나 대상체에게 투여되는 tRNA 또는 발현 벡터는 다른 모이어티, 예를 들어 담체 입자, 예를 들어, 아미노 지질 입자에 접합되거나 결합되지 않는다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "접합된"은 둘 이상의 모이어티와 관련하여 사용되는 경우 모이어티가 직접적으로 또는 연결제 역할을 하는 하나 이상의 추가 모이어티를 통해 서로 물리적으로 결합되거나 연결되어, 구조가 사용되는 조건, 예를 들어, 생리 조건 하에서 모이어티가 물리적으로 결합된 상태로 유지되도록 충분히 안정적인 구조를 형성하는 것을 의미한다. 일반적으로 모이어티는 하나 이상의 공유 결합 또는 특이적 결합을 포함하는 기전에 의해 부착된다. 대안적으로, 충분한 수의 더 약한 상호작용은 모이어티가 물리적으로 결합된 상태로 유지되기에 충분한 안정성을 제공할 수 있다.

[0142] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 지속 전달형 제형 또는 제어 전달형 제형을 함유할 수 있다. 리포솜 담체, 생체 침식성 마이크로 입자 또는 다공성 비드 및 데포 주사와 같은 지속 전달형 또는 제어 전달형 수단을 제형화하는 기술이 또한 당업자에게 공지되어 있다. 지속 방출형 제제는 예를 들어, 다공성 중합체 마이크로 입자 또는 성형 물품, 예를 들어 필름 또는 마이크로 캡슐 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 지속 방출형 매트릭스는 폴리에스테르, 히드로겔, 폴리락티드, L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 폴리(2-히드록시에틸-인에타크릴레이트), 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함할 수 있다. 지속 방출형 조성물은 또한 당업계에 공지된 임의의 여러 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다.

[0143] 본 명세서에 개시된 tRNA 및/또는 발현 벡터를 함유하는 약제학적 조성물은 투여 단위 형태로 제공될 수 있고 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로와 양립할 수 있도록 제형화될 수 있다. 투여 경로의 예는 정맥내(IV), 피부내, 흡입, 경피, 국소, 경 점막, 척수강 내 및 직장 투여이다. 특정 실시형태에서, tRNA 및/또는 발현 벡터는 척수강 내로 투여된다. 특정 실시형태에서, tRNA 및/또는 발현 벡터는 주사로 투여된다. 제형은 제약 분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)]을 참고. 비경구 투여용 제형 성분은 주사용수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 향균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 인산염과 같은 완충액; 및 강장 조절제, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스를 포함한다.

[0144] 정맥내 투여의 경우, 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor ELTM(BASF, 미국 뉴저지주 파시파니 소재) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 담체는 제조 및 보관 조건 하에서 안정적일 수 있으며 미생물에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0145] 일반적으로, 핵산 분자를 전달하는 임의의 방법은 tRNA와 함께 사용하기 위해 조정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Akhtar *et al.* (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144] 및 PCT 공개 W094/02595호 참고). tRNA는 생체내에서 엔도- 및 엑소-뉴클레아제에 의한 tRNA의 빠른 분해를 방지하기 위해 약물 전달 시스템을 사용하여 변형되거나 대안적으로 전달될 수 있다. tRNA 분자는 콜레스테롤과 같은 친유성 기에 대한 화학적 접합에 의해 변형되어 세포 흡수를 향상시키고 분해를 방지할 수 있다. tRNA 분자는 또한 압타머에 접합되거나 다른 방식으로 회합될 수 있다. tRNA는 또한 나노입자, 덴드리머, 중합체, 리포솜 또는 양이온 전달 시스템과 같은 약물 전달 시스템을 사용하여 전달될 수 있다. 양전하 양이온 전달 시스템은 tRNA 분자(음전하)의 결합을 촉진하고 음전하 세포막에서의 상호 작용을 향상시켜 세포에 의한 tRNA의 효율적인 흡수를 허용한다. 양이온성 지질, 덴드리머 또는 중합체는 RNA, 예를 들어, tRNA에 결합되거나 유도되어 소포 또는 미셀을 형성할 수 있다(예를 들어, 문헌[Kim *et al.* (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116] 참고). 양이온성-RNA 복합체의 제조 및 투여 방법은 당업자의 능력 범위 내에 있다(예를 들어, 문헌[Sorensen *et al.* (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma *et al.* (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold *et al.* (2007) J. Hypertens. 25:197-205] 참고). RNA, 예를 들어 tRNA의 전신 전달에 유용한 약물 전달 시스템의 일부 비제한적인 예는 DOTAP(상기 문헌[Sorensen *et al.* (2003)]; 상기 문헌[Verma *et al.* (2003)]), 올리고펙타민(Oligofectamine), 고체 핵산 지질 입자(문헌[Zimmermann *et al.* (2006) Nature 441:111-114]), 카르디올리핀(cardiolipin)(문헌[Chien *et al.* (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328]; 문헌[Pal *et al.* (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091]), 폴리에틸렌 이민([Bonnet *et al.* (2008) Pharm. Res. 25(12):2972-82]; 문헌[Aigner (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659]), Arg-Gly-Asp(RGD) 펩티드(문헌[Liu (2006) Mol. Pharm. 3:472-487]) 및 폴리아미도아민(문헌[Tomalia *et al.* (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67]; 문헌[Yoo *et al.* (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804])을 포함

한다. 특정 실시형태에서, tRNA는 전신 투여를 위해 시클로텍스트린과 복합체를 형성한다. RNA 및 시클로텍스트린의 투여 방법 및 약제학적 조성물은 미국 특허 제7,427,605호에서 찾을 수 있다.

[0146] 약제학적 제형은 바람직하게는 무균이다. 멸균은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결 건조되는 경우, 동결 건조 및 재구성 전 또는 후에 필터 살균을 수행할 수 있다.

[0147] 본 명세서에 기재된 조성물은 국부적으로 또는 전신으로 투여될 수 있다. 투여는 일반적으로 비경구 투여이다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 피하로 투여되고, 더욱 바람직한 실시형태에서 정맥내로 투여된다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비 수성 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다.

[0148] 일반적으로, 활성 성분, 예를 들어 tRNA 및/또는 발현 벡터의 치료적 유효량은 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 예를 들어, 1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 1 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위이다. 특정 실시형태에서, 바이러스 발현 벡터의 치료적 유효량은  $10^2$  to  $10^{15}$  플라크 형성 단위(pfu), 예를 들어,  $10^2$  내지  $10^{10}$ ,  $10^2$  내지  $10^5$ ,  $10^5$  내지  $10^{15}$ ,  $10^5$  내지  $10^{10}$ , 또는  $10^{10}$  내지  $10^{15}$  플라크 형성 단위이다. 투여되는 양은 치료될 질환 또는 적응증의 유형 및 정도, 환자의 전반적인 건강, 항체의 생체내 효능, 약제학적 제형 및 투여 경로와 같은 변수에 따라 달라진다. 목적하는 혈액 수준 또는 조직 수준을 빠르게 달성하기 위해 초기 복용량을 상위 수준 이상으로 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 초기 투여량은 최적 투여량보다 적을 수 있고, 일일 투여량은 치료 과정 동안 점진적으로 증가할 수 있다. 예를 들어, 0.5 mg/kg에서 20 mg/kg까지 실행되도록 설계된 기존의 1상 용량 증량 연구에서 인간 투여량을 최적화할 수 있다. 투여 빈도는 투여 경로, 투여량, 혈청 반감기 및 치료할 질환과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 투여 빈도의 예는 1일 1회, 주 1회 및 2주에 1회이다. 투여 경로의 한 가지 예는 비경구, 예를 들어 정맥내 주입이다.

#### [0149] V. 치료 용도

[0150] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 반가불충분성 장애는 반가불충분성에 의해 매개되거나, 강화되거나, 달리 촉진되거나, 이와 관련되는 장애, 즉, 이배체 대상체가 유전자의 단일 기능적 카피만을 갖거나, 유전자의 단일 기능적 카피가 적절한 유전자 기능을 위한 유전자 산물(예를 들어, 단백질)을 충분히 생산하지 못하는 장애이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 반가불충분성 유전자는 적절한 유전자 기능을 위한 두 대립유전자 모두를 필요로 하는 유전자를 지칭한다. 반가불충분성 장애의 예는 5q-중후군, 아담스-올리버 중후군 1, 아담스-올리버 중후군 3, 아담스-올리버 중후군 5, 아담스-올리버 중후군 6, 알라질 중후군 1, 자가면역 림프증식성 중후군 타입 IA, 자가면역 림프증식성 중후군 타입 V, 상염색체 우성 난청-2A, 요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD), 카니 복합체 타입 1, CHARGE 중후군, 쇄골두개골 형성이상, 큐라리노 중후군, 테니스-드래쉬 중후군/프레이저 중후군, 발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD), 디조지 중후군(TBX1-관련), 드라벡 중후군, 듀안-레디알 레이 중후군, 엘러스-단로스 중후군(유사 고전형), 엘러스-단로스 중후군(혈관 타입), 페인골드 중후군 1, TDP43이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD-TDP), GRN-관련, GLUT1 결핍 중후군, 그리그 다중 중후군, 유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1, 전전뇌증 3, 전전뇌증 4, 전전뇌증 5, 홀트-오람 중후군, 부갑상선 기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR), 클리프스트라 중후군 1, 클리펠-트레노네이 중후군(AAGF-관련), 레리-웨일 연골골형성이상, 마르판 중후군, 심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD), 정신 지체, 상염색체 우성 1, 정신 지체, 상염색체 우성 19, 정신 지체, 상염색체 우성 29, 손발톱-슬개골 중후군(NPS), 펠랑-맥더미드 중후군, 피트-홉킨스 중후군, 원발성 폐동맥 고혈압 1, 레트 중후군(선천적 변이체), 스미쓰-마제니스 중후군(RAI1-관련), 소토스 중후군 1, 소토스 중후군 2, 스티클러 중후군 타입 I, 대동맥 판막 상부 협착증, SYNGAP1-관련 지적 장애, 트레처 콜린스 중후군, 모발비지절증 후군 타입 I, 척골-유선 중후군, 반더 우드 중후군 1, 바르텐부르크 중후군 타입 1, 바르텐부르크 중후군 타입 2A 및 바르텐부르크 중후군 타입 4C를 포함한다. 관련 반가불충분성 유전자를 포함하는 반가불충분성 장애의 예는 표 1 및 표 2에 제시되어 있다.

[0151] 본 개시내용은 반가불충분성 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 대상체에게 유효량의 tRNA 및/또는 발현 벡터, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 tRNA 및/또는 발현 벡터를 단독으로 또는 또 다른 치료제와 조합하여 투여 대상체에서 반가불충분성 장애를 치료하는 단계를 포함한다.

[0152] 반가불충분성 장애가 드라벡 중후군인 특정 실시형태에서, 방법은 대상체에서 발작 빈도, 발작 중증도 및/또는

인지 장애를 감소시킨다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 방법은 대상체에서 발작 빈도를 예를 들어, 1일, 1주 또는 1개월의 기간에 걸쳐 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 방법은 대상체에서 발작 빈도를 예를 들어, 1일, 1주 또는 1개월의 기간에 걸쳐 50% 감소시킨다.

[0153] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 유익하거나 원하는 결과를 달성하기에 충분한 활성제(예를 들어, 재조합 폴리펩티드 및/또는 다량체 단백질)의 양을 지칭한다. 유효량은 하나 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여될 수 있으며 특정 제형 또는 투여 경로로 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

[0154] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 대상체, 예를 들어 인간에서 질환의 치료를 의미한다. 이것은 하기를 포함한다: (a) 질환 저해, 즉 발병 중지; 및 (b) 질환 완화, 즉, 질환 상태의 회귀를 유발하는 것. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 의해 치료될 유기체를 지칭한다. 이러한 유기체는 바람직하게는 포유동물(예를 들어, 무린, 유인원, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 보다 바람직하게는 인간을 포함한다.

[0155] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제 및/또는 양상과 조합하여 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "조합하여" 투여되는 것은 2개(또는 그 초과) 상이한 치료가 환자에 대한 치료의 효과가 특정 시점에 중첩되도록 대상체가 장애를 겪는 과정 동안 대상체에게 전달된다는 의미하는 것으로 이해된다. 특정 실시형태에서, 하나의 치료의 전달은 두 번째의 전달이 시작될 때 여전히 발생하므로, 투여 측면에서 중첩이 존재한다. 이는 본 명세서에서 "동시"또는 "동반 전달"이라고도 지칭된다. 다른 실시형태에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 두 경우의 특정 실시형태에서, 치료는 병용 투여로 인해 더 효과적이다. 예를 들어, 제2 치료제가 더 효과적이고, 예를 들어, 더 적은 양의 제2 치료제로 동등한 효과가 관찰되거나, 제2 치료제는 제2 치료제가 제1 치료제의 부재 하에서 투여되는 경우 관찰되는 것보다 증상을 더 많이 감소시키거나, 또는 제1 치료제에서 유사한 상황이 관찰된다. 특정 실시형태에서, 전달은 증상 또는 장애와 관련된 다른 파라미터의 감소가 다른 치료제의 부재 하에 전달되는 하나의 치료제로 관찰되는 것보다 더 크도록 하는 것이다. 두 치료제의 효과는 부분적으로 가산되거나, 완전히 가산되거나, 가산보다 클 수 있다. 전달은 전달된 제1 치료제의 효과가 제2 치료제가 전달될 때 여전히 검출 가능하도록 할 수 있다.

[0156] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물은 1종 이상의 추가 요법, 예를 들어, DIACOMIT<sup>®</sup>(스티리펜톨), EPIDOLEX<sup>®</sup>(카나비디올), 케톤형성 식이, ONFI<sup>®</sup>(클로바잠), TOPAMAX<sup>®</sup>(토피라메이트) 또는 발프로산과 조합하여 투여된다. 예를 들어, 드라벡 증후군의 치료 동안 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물은 1종 이상의 추가 요법, 예를 들어, DIACOMIT<sup>®</sup>(스티리펜톨), EPIDOLEX<sup>®</sup>(카나비디올), 케톤형성 식이, ONFI<sup>®</sup>(클로바잠), TOPAMAX<sup>®</sup>(토피라메이트) 또는 발프로산과 조합하여 투여된다.

[0157] 설명 전반에 걸쳐, 조성물이 특정 성분을 갖거나 포함하거나 포함하는 것으로 기술되거나, 공정 및 방법이 특정 단계를 갖거나 포함하거나 포함하는 것으로 기술되는 경우, 언급된 성분으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어지는 본 발명의 조성물이 있고, 언급된 처리 단계로 본질적으로 이루어지거나, 이루어지는 본 발명에 따른 방법 및 방법이 존재한다고 고려된다.

[0158] 본 출원에서, 요소 또는 성분이 언급된 요소 또는 성분의 목록에 포함되고/되거나 그 목록에서 선택되었다고 언급되는 경우, 요소 또는 성분은 언급된 요소 또는 성분 중 어느 하나 일 수 있거나, 요소 또는 성분은 언급된 요소 또는 성분 중 2개 이상으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있음을 이해해야 한다.

[0159] 또한, 본 명세서에 기재된 조성물 또는 방법의 요소 및/또는 특징은 본 명세서에서 명시적이든 묵시적이든 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 방식으로 결합될 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 특정 화합물에 대해서 언급된 경우, 문맥에서 달리 이해되지 않는 한, 그 화합물은 본 발명의 조성물의 다양한 실시형태 및/또는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 즉, 본 출원에서, 실시형태는 명확하고 간결한 적용이 작성되고 도시될 수 있는 방식으로 기재되고 묘사되었지만, 실시형태는 본 교시내용 및 발명(들)에서 분리되지 않고 다양하게 결합되거나 분리될 수 있다는 것이 의도되고 인식될 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 설명되고 도시된 모든 특징은 본 명세서에 설명되고 도시된 본 발명(들)의 모든 측면에 적용될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0160] 표현 "적어도 하나"는 문맥 및 사용으로부터 달리 이해되지 않는 한, 그 표현 다음에 언급된 대상 각각 및 2개 이상의 언급된 대상의 다양한 조합을 개별적으로 포함한다는 것을 이해해야 한다. 3개 이상의 언급된 대상과 관련된 표현 "및/또는"은 문맥에서 달리 이해되지 않는 한 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.

[0161] 용어 "포함하다(include, includes)", "포함하는", "갖다(have, has)", "갖는", "함유하다(contain,



contains)", "함유하는"(이의 문법적 등가물 포함)의 사용은, 달리 구체적으로 언급되거나 문맥으로부터 이해되지 않는 한, 예를 들어 추가의 언급되지 않은 요소 또는 단계를 배제하지 않는 것과 같이 일반적으로 개방적이고 비제한적인 것으로 이해되어야 한다.

[0162] 용어 "약"의 사용이 정량값 앞에 있는 경우, 본 발명은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 특정 정량값 자체도 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 달리 지시되거나 추론되지 않는 한 공칭 값으로부터  $\pm 10\%$  변동을 의미한다.

[0163] 단계의 순서 또는 특정 동작을 수행하는 순서는 본 발명이 작동 가능한 상태로 유지되는 한 중요하지 않다는 것을 이해해야 한다. 또한, 둘 이상의 단계 또는 작업이 동시에 수행될 수 있다.

[0164] 예를 들어, "예컨대" 또는 "포함하는"과 같은 본 명세서의 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 언어의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범주에 대한 제한이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실행에 필수적인 것으로 주장되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0165] 실시예

[0166] 하기 실시예는 단지 예시일 뿐이며 어떤 방식으로든 본 발명의 범주 또는 내용을 제한하려는 의도가 아니다.

[0167] 실시예 1 - 야생형 SCN1A 전사체의 발현을 향상시키기 위한 tRNA 발현

[0168] 본 실시예에서, SCN1A에서 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 결정하였다. 이러한 코돈에 대한 동족 tRNA의 발현은 SCN1A 발현을 향상시키고, 드라벡 증후군을 치료할 수 있다.

[0169] 먼저, SCN1A 유전자의 각각의 코돈에 대한 코돈 사용 백분율을 결정하였다. 다음으로 SCN1A 유전자의 각각의 코돈에 대한 최적성을 tRNA 적응 지수(tAI)를 사용하여 결정하였다. tAI는 (tRNA 유전자 카피 수에 기초한) tRNA의 세포 농도 추정치 및 해독 효율을 고려하는 각각의 코돈에 대한 번역 효율의 추정치이며, tAI 값이 높을수록 더 최적의 코돈을 나타낸다. tAI는 예를 들어 문헌[dos Reis et al. (2004) NUCLEIC ACIDS RES. 32(17): 5036-5044] 및 문헌[Mahlab et al. (2014) PLoS Comput. Biol. 10(1):e1003294]에 기재되어 있다. 본 실시예에서의 계산을 위해서, tRNA 유전자 카피수에 기초한 추정치 대신에 HEK293 세포에서의 tRNA 수준의 직접 정량에 기초한 변형된 tAI 값(문헌[Zheng et al. (2015) Nat. Methods 12(9): 835-837]에 제공된 바와 같음)을 사용하였다.

[0170] 코돈 사용 백분율 값에 tAI 값의 역을 곱하여 SCN1A 유전자의 각각의 코돈에 대한 점수를 제공하였다. 결과의 요약은 표 3에 제시한다. 일반적으로, 가장 높은 점수를 가진 코돈은 전사체에 비해 SCN1A가 가장 적고 가장 풍부하며, 이러한 코돈에 대한 동족 tRNA는 SCN1A 발현을 향상시키는 가장 양호한 후보이다.

표 3

표 3

코돈	코돈 사용 %	tAI	1/tAI	(코돈 사용 %) x (1/tAI)
ATA (Ile)	1.642	0.035	28.663	47.059
AGA(Arg)	1.393	0.03	33.342	46.447
CTT(Leu)	2.04	0.045	22.345	45.58
CTC(Leu)	1.244	0.032	31.035	38.601
TAT (Tyr)	1.841	0.053	18.935	34.856
GAA(Glu)	4.577	0.142	7.047	32.256
CTA(Leu)	1.343	0.043	23.305	31.306
TTT(Phe)	3.632	0.13	7.691	27.931
AAT(Asn)	3.234	0.132	7.575	24.496
CCT(Pro)	1.244	0.055	18.139	22.561
GCA (Ala)	1.841	0.083	11.991	22.072
TGT(Cys)	1.443	0.069	14.399	20.775
CCC(Pro)	0.746	0.04	25.193	18.801
TCC(Ser)	1.642	0.088	11.402	18.72
GGA(Gly)	1.99	0.109	9.16	18.228
ATC (Ile)	2.388	0.149	6.715	16.035
ATT (Ile)	3.284	0.207	4.84	15.893
TTC(Phe)	3.433	0.22	4.537	15.576
CCA(Pro)	1.642	0.117	8.566	14.064
TTG(Leu)	1.741	0.126	7.945	13.835
TAC (Tyr)	1.194	0.089	11.175	13.343
AGT(Ser)	1.692	0.128	7.793	13.183
GAG(Glu)	2.189	0.166	6.008	13.151
ACA(Thr)	1.642	0.133	7.522	12.349
GAT(Asp)	2.786	0.233	4.299	11.978
AAA (Lys)	3.532	0.3	3.338	11.791
TCT(Ser)	1.244	0.122	8.209	10.211
AGG(Arg)	1.045	0.107	9.344	9.763
AAC(Asn)	2.04	0.224	4.469	9.116
ACT(Thr)	1.99	0.218	4.579	9.113

[0171]

CAA(Gln)	1.443	0.163	6.145	8.866
TGG (Trp)	1.343	0.155	6.469	8.69
CTG(Leu)	2.438	0.299	3.34	8.143
AAG (Lys)	2.338	0.287	3.482	8.142
ACC(Thr)	1.194	0.157	6.36	7.594
GCC (Ala)	1.592	0.221	4.518	7.192
GTA(Val)	1.244	0.179	5.572	6.93
AGC(Ser)	1.393	0.217	4.598	6.406
GCT (Ala)	1.841	0.307	3.253	5.987
GAC(Asp)	2.338	0.394	2.537	5.931
TTA(Leu)	1.095	0.187	5.351	5.857
CGC(Arg)	0.448	0.078	12.852	5.755
ATG (Met)	3.483	0.674	1.484	5.167
CGA(Arg)	1.045	0.205	4.867	5.085
GGG(Gly)	0.995	0.201	4.978	4.953
ACG(Thr)	0.597	0.13	7.681	4.586
TCA(Ser)	1.194	0.268	3.731	4.455
GGT(Gly)	0.995	0.25	3.995	3.975
CAG(Gln)	1.642	0.495	2.02	3.316
CAT(His)	0.547	0.169	5.902	3.23
CGT(Arg)	0.348	0.108	9.254	3.223
GTT(Val)	1.741	0.54	1.851	3.223
GTC(Val)	1.244	0.389	2.57	3.197
TGC(Cys)	0.348	0.118	8.496	2.959
GCG (Ala)	0.299	0.104	9.597	2.865
GGC(Gly)	1.194	0.424	2.357	2.815
GTG(Val)	2.637	1	1	2.637
CAC(His)	0.597	0.287	3.482	2.079
CGG(Arg)	0.348	0.198	5.05	1.759
TCG(Ser)	0.199	0.125	7.974	1.587
CCG(Pro)	0.1	0.109	9.204	0.916

[0172]

[0173] 실시예 2 - 야생형 SCN1A 전사체의 발현을 향상시키기 위한 tRNA 발현

[0174] 본 실시예에서, 배양된 세포에서 야생형 SCN1A의 발현을 향상시키는 선별 운반 RNA(tRNA)의 이소성 전달 능력을 평가하였다.

[0175] ATA(Ile), GTA(Val) 및 AGA(Arg)를 SCN1A 유전자에서 예시적인 비-최적 코돈으로 선택하였다. ATA tRNA(tRNA<sup>ATA</sup>)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 1에 도시하고, GTA tRNA(tRNA<sup>GTA</sup>)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 2에 도시하고, AGA tRNA(tRNA<sup>AGA</sup>)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 3에 도시한다.

[0176] SCN1A 오픈 리딩 프레임을 정방향 프라이머에 KpnI 부위를 함유하고, 역방향 프라이머에 NotI 부위를 함유하는 프라이머를 사용하여 인간 뇌 RNA(Clontech)로부터의 RT-PCR에 의해 증폭시켰다. 이어서 KpnI 및 NotI 부위를 사용하여 pTRE-Tight(Clontech)의 프로모터와 SV40 폴리(A) 부위 사이에 SCN1A ORF를 클로닝하였다.

[0177] tRNA<sup>ATA</sup>, tRNA<sup>GTA</sup> 및 tRNA<sup>AGA</sup> 유전자 서열(측접 게놈 DNA 서열의 200개 염기쌍(bp)과 함께 tRNA 암호 서열을 포함)을 5' 단부에 XhoI 부위 및 3' 단부에 PciI 부위가 있는 gBlock(IDT)으로서 정렬시켰다. tRNA<sup>ATA</sup> 유전자 서열(200bp의 측접 게놈 DNA 서열과 함께 tRNA 암호 서열 포함)을 서열번호 6에 도시하고, tRNA<sup>GTA</sup> 유전자 서열(200bp의 측접 게놈 DNA 서열과 함께 tRNA 암호 서열 포함)을 서열번호 7에 도시하고, tRNA<sup>AGA</sup> 유전자 서열(200개 염

기쌍(bp)의 측점 게놈 DNA 서열과 함께 tRNA 암호 서열 포함)을 서열번호 8에 도시한다.

- [0178] 모든 tRNA 유전자 서열을 XhoI 및 PciI 부위를 사용하여 pTRE-Tight(Clontech)에 개별적으로 클로닝하여 암피실린 내성 유전자 및 Col E1 기원만 pTRE-Tight에 남도록 하였다. 전체 tRNA 유전자 서열을 서열결정에 의해서 확인하였다.
- [0179] HEK293 세포를 6-웰 플레이트의 웰당 300,000개 세포로 10% FBS를 함유하는 DMEM에 플레이트하였다. 24시간 후, 각각의 웰을 모의 형질주입(DNA 없음)시키거나, 100 ng의 SCN1A 플라스미드 및 1, 4, 7 또는 10  $\mu$ L의 인헨서 및 10  $\mu$ L의 Effectene(Qiagen)를 사용하여 0, 100, 200 또는 300 ng의 각각의 tRNA로 형질주입시켰다. 형질주입된 세포를 24시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA 준비를 위해 Trizol(ThermoFisher)에 직접 수거하였다. 이어서, 각각의 조건에서 2  $\mu$ g의 총 RNA를 4 U의 Turbo DNase(ThermoFisher)로 처리하고 2.5 M의 염화 리튬으로 침전시켜 세정하였다. cDNA는 제조업체의 지침에 따라 SuperScript III First Strand Synthesis Supermix 및 랜덤 프라이머(ThermoFisher)를 사용하여 10  $\mu$ L 총 반응 부피에서 300 ng의 DNase 처리된 RNA로부터 준비되었다. Step One Real Time PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 SYBR Advantage qPCR Premix(Takara), SCN1A 및 GAPDH용 프라이머, 반응당 20분의 1의 cDNA를 사용하여 총 10  $\mu$ L 반응 부피에서 qPCR을 수행하였다.
- [0180] 도 3에 나타낸 바와 같이, 다양한 용량에 걸쳐 이소성 tRNA 발현은 내인성 전사체인 GAPDH에 최소한의 영향을 미쳤다. 그러나, 이소성 tRNA 발현은 SCN1A 발현의 대략 선형 증가를 초래하였고, 시험된 tRNA의 최고 용량에서 최대 7배까지 증가하였다(도 3). tRNA의 최고 농도를 제외하고는 세포에 대한 명백한 독성은 관찰되지 않았다.
- [0181] 함께, 이들 결과는 mRNA 전사체, 예를 들어 SCN1A 전사체의 발현이 그 전사체 내의 비-최적 코돈에 대한 tRNA 동족체의 이소성 발현에 의해 증가될 수 있음을 나타낸다.
- [0182] 실시예 3 - 반가불충분성 유전자의 발현을 향상시키기 위한 tRNA 발현
- [0183] 본 실시예에서, 일배체불충분증(haploinsufficiency) 장애와 관련된 다양한 유전자에서 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 결정하였다. 이러한 코돈에 대한 동족 tRNA의 발현은 유전자 발현을 향상시키고, 일배체불충분증 장애를 치료할 수 있다.
- [0184] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 유전자의 각각의 코돈에 대한 코돈 사용 백분율을 결정하였다. 다음으로 유전자의 각각의 코돈에 대한 최적성을 tRNA 적응 지수(tAI)를 사용하여 결정하였다. tAI는 (tRNA 유전자 카피 수에 기초한) tRNA의 세포 농도 추정치 및 해독 효율을 고려하는 각각의 코돈에 대한 번역 효율의 추정치이며, tAI 값이 높을수록 더 최적의 코돈을 나타낸다. tAI는 예를 들어 문헌[dos Reis et al. (2004) NUCLEIC ACIDS RES. 32(17): 5036-5044] 및 문헌[Mahlab et al. (2014) PLoS Comput. Biol. 10(1):e1003294]에 기재되어 있다. 코돈 사용 백분율 값에 tAI 값의 역을 곱하여 유전자의 각각의 코돈에 대한 점수를 제공하였다. 일반적으로, 가장 높은 점수를 가진 코돈은 전사체에 비해 유전자가 가장 적고 가장 풍부하며, 이러한 코돈에 대한 동족 tRNA는 유전자 발현을 향상시키는 가장 양호한 후보이다.
- [0185] 제시된 유전자에서 3개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 표 4에 제시하고, 표시된 유전자에서 10개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 표 5에 제시한다.

표 4

표 4

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	GGT(Gly), CGC(Arg), ACC(Thr)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	TCA(Ser), GAG(Glu), AGC(Ser)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	ACA(Thr), TCA(Ser), TTT(Phe)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC(Pro), CTG(Leu), GGC(Gly)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CGC(Arg), CTG(Leu), ACC(Thr)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT(Cys), GAT(Asp), CCC(Pro)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	CAT(His), AGA(Arg), GAA(Glu)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	TTT(Phe), CTC(Leu), CCA(Pro)
상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CGC(Arg), CTG(Leu), TCC(Ser)
요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	AGT(Ser), CCA(Pro), ACA(Thr)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	GAT(Asp), TTT(Phe), GAG(Glu)
CHARGE 증후군	CHD7	GAT(Asp), TCA(Ser), GAA(Glu)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC(Pro), CCG(Pro), TCC(Ser)
큐라리노 증후군	MNX1	GCG (Ala), GGC (Gly), CCG (Pro)
데니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC(Pro), CCG(Pro), AGC(Ser)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	GAT(Asp), TCA(Ser), AGT(Ser)
디조지 증후군(TBX1-관련)	TBX1	CCG (Pro), CCC (Pro), GCG (Ala)
드라벡 증후군	SCN1A	TTT(Phe), CTA(Leu), GAT(Asp)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	ACC(Thr), AGC(Ser), TCC(Ser)
엘러스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC(Pro), CGC(Arg), GAG(Glu)
엘러스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	GGT(Gly), GGA(Gly), CCT(Pro)
페인골드 증후군 1	MYCN	CCC(Pro), CCG(Pro), GAG(Glu)
TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD-TDP), GRN-관련	GRN	CCC(Pro), ACC(Thr), CAC(His)

[0186]



GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTG(Leu), TTC(Phe), CCC(Pro)
그리그 다중 증후군	GLI3	AGC(Ser), TCC(Ser), CAT(His)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	AGC(Ser), CTG(Leu), CTC(Leu)
전전뇌증 3	SHH	CTG (Leu), CGC (Arg), GCG (Ala)
전전뇌증 4	TGIF1	TCC(Ser), CCA(Pro), CTA(Leu)
전전뇌증 5	ZIC2	GCG (Ala), CAC (His), GGC (Gly)
홀트-오람 증후군	TBX5	TCC(Ser), CCC(Pro), CAT(His)
부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	TCC(Ser), CCC(Pro), CAC(His)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	GAG(Glu), CTG(Leu), AGC(Ser)
클리펠-트레노네이 증후군 (AAGF-관련)	AGGF1	GAT(Asp), AGT(Ser), GAA(Glu)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTG(Leu), CGC(Arg), GAG(Glu)
마르판 증후군	FBN1	GAT(Asp), TGT(Cys), GGA(Gly)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	GAT(Asp), AGT(Ser), TCA(Ser)
정신 지체, 상염색체 우성 1	MBD5	AGT(Ser), TCA(Ser), CCA(Pro)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	GAT(Asp), GGT(Gly), CAT(His)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	AGT(Ser), CCA(Pro), CCC(Pro)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	TCC(Ser), CTG(Leu), GAG(Glu)
펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CGC(Arg), CCC(Pro), CTG(Leu)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	ACA(Thr), TCA(Ser), GAT(Asp)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXG1	CCG(Pro), CCC(Pro), CAC(His)
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser)
소토스 증후군 1	NSD1	TCA(Ser), GAT(Asp), AGT(Ser)
소토스 증후군 2	NFIX	TCC(Ser), CTG(Leu), TCA(Ser)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	GGT(Gly), CCT(Pro), GGA(Gly)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA (Gly), GGT (Gly), GCA (Ala)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CTG(Leu), GAG(Glu), CGG(Arg)
트레치 콜린스 증후군	TCOF1	TCA(Ser), GAG(Glu), AGT(Ser)

[0187]

모발비지절증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGT(Ser), TCA(Ser), CAT(His)
척골-유선 증후군	TBX3	TCC (Ser), GCG (Ala), CCG (Pro)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC(Pro), CTG(Leu), GAT(Asp)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	AGC(Ser), ACC(Thr), CCC(Pro)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	TCC(Ser), CAT(His), CAA(Gln)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC(Pro), GAG(Glu), TCA(Ser)

[0188]

표 5

표 5

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	GGT(Gly), CGC(Arg), ACC(Thr), GTC(Val), GAT(Asp), GGA(Gly), TTT(Phe), GAA(Glu), CAT(His), AGG(Arg)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	TCA(Ser), GAG(Glu), AGC(Ser), CCA(Pro), CTG(Leu), CCC(Pro), CCT(Pro), ACC(Thr), TCC(Ser), AGG(Arg)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	ACA(Thr), TCA(Ser), TTT(Phe), GAT(Asp), AGT(Ser), CCA(Pro), CGA(Arg), CAT(His), GTA(Val), GGA(Gly)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC(Pro), CTG(Leu), GGC(Gly), ACC(Thr), CGC(Arg), GAG(Glu), AGC(Ser), GAC(Asp), TCC(Ser), CCG(Pro)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CGC(Arg), CTG(Leu), ACC(Thr), GGC(Gly), CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser), CGG(Arg), TGT(Cys), CCA(Pro)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT(Cys), GAT(Asp), CCC(Pro), AGT(Ser), ACC(Thr), TCC(Ser), GGC(Gly), GAC(Asp), GAG(Glu), TCA(Ser)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	CAT(His), AGA(Arg), GAA(Glu), ACA(Thr), CAA(Gln), ACC(Thr), TTG(Leu), ACT(Thr), CTA(Leu), GTT(Val)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	TTT (Phe), CTC (Leu), CCA (Pro), ACC (Thr), ACA (Thr), AGC (Ser), TAT (Tyr), CTA (Leu), CTG (Leu), GAT (Asp)
상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CGC(Arg), CTG(Leu), TCC(Ser), CGG(Arg), AGC(Ser), CCC(Pro), GGC(Gly), ACC(Thr), GTC(Val), GAG(Glu)

[0189]

요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	AGT(Ser), CCA(Pro), ACA(Thr), TCA(Ser), CAT(His), CCC(Pro), TTT(Phe), TCC(Ser), CGC(Arg), GAT(Asp)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	GAT (Asp), TTT (Phe), GAG (Glu), AGA (Arg), TCA (Ser), GAA (Glu), AGT (Ser), CGA (Arg), GCA (Ala), CGT (Arg)
CHARGE 증후군	CHD7	GAT(Asp), TCA(Ser), GAA(Glu), TTT(Phe), CCA(Pro), AGT(Ser), GAG(Glu), CTA(Leu), CAT(His), CAA(Gln)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC (Pro), CCG (Pro), TCC (Ser), ACC (Thr), GCG (Ala), CGC (Arg), CTG (Leu), CGG (Arg), AGC (Ser), AGT (Ser)
큐라리노 증후군	MNX1	GCG (Ala), GGC (Gly), CCG (Pro), CTG (Leu), CGC (Arg), CCC (Pro), TCG (Ser), GCC (Ala), AGC (Ser), GAG (Glu)
테니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC (Pro), CCG (Pro), AGC (Ser), CAC (His), GCG (Ala), CTG (Leu), ACC (Thr), TCC (Ser), CAT (His), GGT (Gly)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	GAT (Asp), TCA (Ser), AGT (Ser), AGA (Arg), CAT (His), ATA (Ile), TTT (Phe), CTA (Leu), GAA (Glu), CAA (Gln)
디조지 증후군(TBX1- 관련)	TBX1	CCG (Pro), CCC (Pro), GCG (Ala), GCC (Ala), CAC (His), CTG (Leu), GGC (Gly), CGC (Arg), AGC (Ser), CGG (Arg)
드라벡 증후군	SCN1A	TTT (Phe), CTA (Leu), GAT (Asp), AGT (Ser), GAA (Glu), ATA (Ile), TCA (Ser), ACA (Thr), TTC (Phe), TAT (Tyr)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	ACC(Thr), AGC(Ser), TCC(Ser), CCC(Pro), GAG(Glu), GGT(Gly), GAT(Asp), CTC(Leu), CAC(His), CAG(Gln)
엘리스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC(Pro), CGC(Arg), GAG(Glu), ACC(Thr), CTG(Leu), ACA(Thr), GGG(Gly), TCC(Ser), GGC(Gly), GTG(Val)
엘리스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	GGT(Gly), GGA(Gly), CCT(Pro), CCA(Pro), GAT(Asp), AGT(Ser), GAA(Glu), CCC(Pro), GGC(Gly), AGA(Arg)
페인폴드 증후군 1	MYCN	CCC (Pro), CCG (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg), TCC (Ser), AGC (Ser), GCC (Ala), ACC (Thr), CTG (Leu), GAT (Asp)
TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD- TDP), GRN-관련	GRN	CCC(Pro), ACC(Thr), CAC(His), TCC(Ser), GAT(Asp), TGC(Cys), CTG(Leu), TGT(Cys), AGC(Ser), CGC(Arg)

[0190]

GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTG (Leu), TTC (Phe), CCC (Pro), TCC (Ser), GGC (Gly), CGC (Arg), ACC (Thr), ATC (Ile), CTC (Leu), GTG (Val)
그리그 다중 증후군	GLI3	AGC(Ser), TCC(Ser), CAT(His), CCC(Pro), TCA(Ser), CCG(Pro), ACC(Thr), CCA(Pro), CTC(Leu), CTG(Leu)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	AGC(Ser), CTG(Leu), CTC(Leu), ACC(Thr), CCC(Pro), TCC(Ser), GTC(Val), GAG(Glu), TCA(Ser), GGC(Gly)
전전뇌증 3	SHH	CTG (Leu), CGC (Arg), GCG (Ala), TCG (Ser), ACC (Thr), GGC (Gly), GAG (Glu), CTC (Leu), GAC (Asp), CAC (His)
전전뇌증 4	TGIF1	TCC(Ser), CCA(Pro), CTA(Leu), CCG(Pro), TCA(Ser), CGC(Arg), CCC(Pro), ACA(Thr), TCT(Ser), CTC(Leu)
전전뇌증 5	ZIC2	GCG (Ala), CAC (His), GGC (Gly), TCC (Ser), CCG (Pro), CCC (Pro), AGC (Ser), CGC (Arg), TCG (Ser), TTC (Phe)
홀트-오람 증후군	TBX5	TCC(Ser), CCC(Pro), CAT(His), ACC(Thr), AGC(Ser), CAC(His), CTA(Leu), TTT(Phe), CCT(Pro), GAG(Glu)
부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	TCC(Ser), CCC(Pro), CAC(His), CCG(Pro), ACC(Thr), TCG(Ser), AGC(Ser), CTG(Leu), CTC(Leu), AGG(Arg)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	GAG(Glu), CTG(Leu), AGC(Ser), CCC(Pro), GAC(Asp), CTC(Leu), ACC(Thr), TCC(Ser), AGG(Arg), TCA(Ser)
클리펠-트레노네이 증후군 (AAGF-관련)	AGGF1	GAT (Asp), AGT (Ser), GAA (Glu), TCA (Ser), CAT (His), ACA (Thr), TAT (Tyr), CAA (Gln), TTT (Phe), ACT (Thr)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTG (Leu), CGC (Arg), GAG (Glu), GCG (Ala), CTC (Leu), CAC (His), TCC (Ser), AGC (Ser), CGG (Arg), GCC (Ala)
마르판 증후군	FBN1	GAT(Asp), TGT(Cys), GGA(Gly), GAA(Glu), AGT(Ser), ACA(Thr), ACC(Thr), TTT(Phe), CCA(Pro), AAT(Asn)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	GAT(Asp), AGT(Ser), TCA(Ser), CCA(Pro), TTT(Phe), ACA(Thr), CCC(Pro), CAT(His), CCT(Pro), CTA(Leu)
정신 지체, 상염색체	MBD5	AGT(Ser), TCA(Ser), CCA(Pro), CTA(Leu), CAT(His), ACA(Thr), CCT(Pro), TTA(Leu),

[0191]



우성 1		GGA(Gly), CAA(Gln)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	GAT(Asp), GGT(Gly), CAT(His), ACA(Thr), CTT(Leu), CAA(Gln), CTG(Leu), CTA(Leu), GAA(Glu), TCT(Ser)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	AGT(Ser), CCA(Pro), CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser), TCA(Ser), ACC(Thr), GAG(Glu), CTG(Leu), AGG(Arg)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	TCC(Ser), CTG(Leu), GAG(Glu), CCC(Pro), AGC(Ser), CGG(Arg), CAG(Gln), CGC(Arg), CTC(Leu), GAC(Asp)
펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CGC(Arg), CCC(Pro), CTG(Leu), CCG(Pro), GAG(Glu), AGC(Ser), TCC(Ser), CGG(Arg), CTC(Leu), GGC(Gly)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	TCA(Ser), CAT(His), AGT(Ser), TCC(Ser), CCA(Pro), AGC(Ser), TCT(Ser), GGA(Gly), GAT(Asp), CCT(Pro)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	ACA (Thr), TCA (Ser), GAT (Asp), CAT (His), AGT (Ser), GAA (Glu), CCA (Pro), CTA (Leu), ATA (Ile), ACT (Thr)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXG1	CCG(Pro), CCC(Pro), CAC(His), TCC(Ser), CTG(Leu), TCG(Ser), GGC(Gly), CGC(Arg), AGC(Ser), ACC(Thr)
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser), CTG(Leu), ACC(Thr), GAG(Glu), CTC(Leu), CCG(Pro), CGG(Arg), CCA(Pro)
소토스 증후군 1	NSD1	TCA(Ser), GAT(Asp), AGT(Ser), CCA(Pro), TTT(Phe), CTA(Leu), GAA(Glu), TCT(Ser), CAT(His), GAG(Glu)
소토스 증후군 2	NFIX	TCC(Ser), CTG(Leu), TCA(Ser), CCC(Pro), CGG(Arg), CCG(Pro), ACC(Thr), CGC(Arg), GAT(Asp), TTT(Phe)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	GGT(Gly), CCT(Pro), GGA(Gly), CCC(Pro), GGC(Gly), GAT(Asp), CCA(Pro), GAG(Glu), GAA(Glu), AGA(Arg)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA (Gly), GGT (Gly), GCA (Ala), CCA (Pro), GGG (Gly), CCT (Pro), GTT (Val), CCC (Pro), GTC (Val), GGC (Gly)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CTG(Leu), GAG(Glu), CGG(Arg), CCC(Pro), TCC(Ser), AGC(Ser), AGT(Ser), CCA(Pro), GGT(Gly), TCA(Ser)
트레처 콜린스 증후군	TCOF1	TCA (Ser), GAG (Glu), AGT (Ser), ACC (Thr), AGC (Ser), GGG (Gly), CCA (Pro), GCA (Ala), CCC (Pro), TCC (Ser)

[0192]



모발비지절증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGT(Ser), TCA(Ser), CAT(His), GAT(Asp), CAA(Gln), ACA(Thr), CTA(Leu), CCA(Pro), GGA(Gly), TCC(Ser)
척골-유선 증후군	TBX3	TCC (Ser), GCG (Ala), CCG (Pro), CCC (Pro), CTG (Leu), AGC (Ser), ACC (Thr), GCC (Ala), CTC (Leu), TCG (Ser)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC (Pro), CTG (Leu), GAT (Asp), CCA (Pro), GAG (Glu), TTT (Phe), ACC (Thr), TGG (Trp), AGC (Ser), CAG (Gln)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	AGC(Ser), ACC(Thr), CCC(Pro), CTG(Leu), GAG(Glu), AGT(Ser), CCG(Pro), CAA(Gln), CGC(Arg), TCC(Ser)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	TCC(Ser), CAT(His), CAA(Gln), CCC(Pro), AGT(Ser), AGC(Ser), GAT(Asp), ACC(Thr), GAA(Glu), GAG(Glu)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC(Pro), GAG(Glu), TCA(Ser), CAC(His), AGC(Ser), TCC(Ser), GGC(Gly), CTG(Leu), TCG(Ser), CGC(Arg)

[0193]

[0194]

추가로, tRNA 유전자 카피 수에 기초한 tRNA 수준의 추정치라기 보다는, HEK293 세포에서 tRNA 수준의 직접 정량화에 기초한 변형된 tAI 값(문헌[Zheng et al. (2015) Nat. Methods 12(9): 835—837]에 제공된 바와 같음)을 사용한 것을 제외하고는, 상기에 기재된 바와 같이, 제시된 유전자에서 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 계산하였다.

[0195]

제시된 유전자에서 3개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 표 6에 제시하고, 표시된 유전자에서 10개의 최소 최적 및 최대 과발현된 코돈을 표 7에 제시한다.

표 6

표 6

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	CTC(Leu), CCT(Pro), CGC(Arg)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	CCC(Pro), CCT(Pro), CTC(Leu)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	CTT (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC(Pro), TGC(Cys), CTC(Leu)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CCC(Pro), TGT(Cys), TGC(Cys)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT(Cys), CCC(Pro), TGC(Cys)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	AGA(Arg), CTT(Leu), GAA(Glu)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	CTC (Leu), CTT (Leu), TAT (Tyr)
상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CTC(Leu), CCC(Pro), CGC(Arg)
요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	CCC(Pro), CTC(Leu), CCA(Pro)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	AGA(Arg), CTC(Leu), CTT(Leu)
CHARGE 증후군	CHD7	CCT(Pro), AGA(Arg), CTC(Leu)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
큐라리노 증후군	MNX1	CCC (Pro), GCG (Ala), CTC (Leu)
테니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC(Pro), AGA(Arg), CCG(Pro)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	AGA (Arg), ATA (Ile), CTT (Leu)
디조지 증후군(TBX1-관련)	TBX1	CCC (Pro), CCG (Pro), GCC (Ala)
드라벡 증후군	SCN1A	ATA (Ile), AGA (Arg), CTT (Leu)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
엘러스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
엘러스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	CCT(Pro), GGA(Gly), CCC(Pro)
페인골드 증후군 1	MYCN	CCC(Pro), CTC(Leu), GAG(Glu)

[0196]

TDP43 이 포함된 진두측두엽 변성(FTLD-TDP), GRN-관련	GRN	TGC(Cys), CCC(Pro), TGT(Cys)
GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTC (Leu), CCC (Pro), ATC (Ile)
그리그 다중 증후군	GLI3	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	CTC(Leu), CCC(Pro), TCC(Ser)
전전뇌증 3	SHH	CTC (Leu), CCC (Pro), GCG (Ala)
전전뇌증 4	TGIF1	CTC(Leu), CCC(Pro), TCC(Ser)
전전뇌증 5	ZIC2	CCC (Pro), GCG (Ala), CTC (Leu)
홀트-오람 증후군	TBX5	CCC(Pro), CCT(Pro), CTC(Leu)
부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	CCC(Pro), CTC(Leu), GAG(Glu)
클리펠-트레노네이 증후군(AAGF-관련)	AGGF1	AGA (Arg), GAA (Glu), TAT (Tyr)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTC(Leu), CCC(Pro), GAG(Glu)
마르판 증후군	FBN1	TGT(Cys), TGC(Cys), CCC(Pro)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	CTC(Leu), CCC(Pro), CCT(Pro)
정신 지체, 상염색체 우성 1	MBD5	CCT(Pro), AGA(Arg), CCC(Pro)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	CTT (Leu), CTC (Leu), TAT (Tyr)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CCC(Pro), CTC(Leu), CGC(Arg)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	CCT(Pro), CTC(Leu), AGA(Arg)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	AGA (Arg), CTT (Leu), ATA (Ile)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXG1	CCC(Pro), CTC(Leu), CCG(Pro)
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
소토스 증후군 1	NSD1	CCT(Pro), AGA(Arg), CCC(Pro)
소토스 증후군 2	NFIX	CCC(Pro), TCC(Ser), CCT(Pro)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	CCT(Pro), CCC(Pro), GGA(Gly)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA(Gly), CCT(Pro), CCC(Pro)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CCC(Pro), CTC(Leu), GAG(Glu)

트레처 콜린스 증후군	TCOF1	CCC(Pro), CCT(Pro), GAG(Glu)
모발비지절증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGA(Arg), CCT(Pro), CCC(Pro)
척골-유선 증후군	TBX3	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	CCC(Pro), CTC(Leu), CCT(Pro)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	CCC(Pro), CTC(Leu), CTT(Leu)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC(Pro), CTC(Leu), GAG(Glu)

표 7

표 7

장애	유전자	코돈
5q-증후군	RPS14	CTC (Leu), CCT (Pro), CGC (Arg), CCC (Pro), ATC (Ile), GGA (Gly), CTT (Leu), GAA (Glu), AAG (Lys), GCC (Ala)
아담스-올리버 증후군 1	ARHGAP31	CCC (Pro), CCT (Pro), CTC (Leu), GAG (Glu), AGA (Arg), CTT (Leu), CCA (Pro), TCC (Ser), GAA (Glu), GCA (Ala)
아담스-올리버 증후군 3	RBPJ	CTT (Leu), CCT (Pro), TAT (Tyr), ATA (Ile), AGA (Arg), GCA (Ala), CTC (Leu), GAA (Glu), ACA (Thr), GGA (Gly)
아담스-올리버 증후군 5	NOTCH1	CCC (Pro), TGC (Cys), CTC (Leu), GAG (Glu), TGT (Cys), TCC (Ser), TAC (Tyr), CGC (Arg), AAC (Asn), GCC (Ala)
아담스-올리버 증후군 6	DLL4	CCC (Pro), TGT (Cys), TGC (Cys), CTC (Leu), CGC (Arg), TCC (Ser), CCT (Pro), TAC (Tyr), TAT (Tyr), GAG (Glu)
알라질 증후군 1	JAG1	TGT (Cys), CCC (Pro), TGC (Cys), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), TAT (Tyr), AAC (Asn), AAT (Asn), TCC (Ser)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 IA	FAS	AGA (Arg), CTT (Leu), GAA (Glu), TGT (Cys), CTC (Leu), AAT (Asn), TGC (Cys), ATA (Ile), CCT (Pro), TTG (Leu)
자가면역 림프증식성 증후군 타입 V	CTLA4	CTC (Leu), CTT (Leu), TAT (Tyr), CCC (Pro), CCT (Pro), TTT (Phe), CCA (Pro), GCA (Ala), TAC (Tyr), TGC (Cys)
상염색체 우성 난청-2A	KCNQ4	CTC (Leu), CCC (Pro), CGC (Arg), TCC (Ser), TAC (Tyr), ATC (Ile), GAG (Glu), GCC (Ala), CTG (Leu), CCT (Pro)

[0199]



요로 결함이 동반되거나 동반되지 않은 뇌 기형(BRMUTD)	NFIA	CCC (Pro), CTC (Leu), CCA (Pro), CCT (Pro), CTT (Leu), GCA (Ala), AGA (Arg), TCC (Ser), ACA (Thr), AGT (Ser)
카니 복합체 타입 1	PRKAR1A	AGA (Arg), CTC (Leu), CTT (Leu), TAT (Tyr), GCA (Ala), GAA (Glu), GAG (Glu), CCT (Pro), TTT (Phe), CCC (Pro)
CHARGE 증후군	CHD7	CCT (Pro), AGA (Arg), CTC (Leu), CCC (Pro), GAA (Glu), CTT (Leu), ATA (Ile), GAG (Glu), GCA (Ala), CCA (Pro)
쇄골두개골 형성이상	RUNX2	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), TCC (Ser), GCG (Ala), CCG (Pro), AGA (Arg), CGC (Arg), ACC (Thr), GCA (Ala)
큐라리노 증후군	MNX1	CCC (Pro), GCG (Ala), CTC (Leu), CCG (Pro), CGC (Arg), GCC (Ala), GAG (Glu), TCC (Ser), GGC (Gly), CTG (Leu)
테니스-드래쉬 증후군 / 프레이저 증후군	WT1	CCC (Pro), AGA (Arg), CCG (Pro), TAC (Tyr), TGT (Cys), CTC (Leu), GCG (Ala), TCC (Ser), CCT (Pro), AGC (Ser)
발달 지연, 지적 장애, 비만 및 이형 특징(DIDOD)	PHIP	AGA (Arg), ATA (Ile), CTT (Leu), CCT (Pro), GAA (Glu), TAT (Tyr), CTA (Leu), GCA (Ala), CCC (Pro), GGA (Gly)
디조지 증후군(TBX1- 관련)	TBX1	CCC (Pro), CCG (Pro), GCC (Ala), CTC (Leu), GCG (Ala), TAC (Tyr), CGC (Arg), TAT (Tyr), GAG (Glu), TTC (Phe)
드라벡 증후군	SCN1A	ATA (Ile), AGA (Arg), CTT (Leu), CTC (Leu), TAT (Tyr), GAA (Glu), CTA (Leu), TTT (Phe), AAT (Asn), CCT (Pro)
듀안-레디알 레이 증후군	SALL4	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), TCC (Ser), GAG (Glu), ACC (Thr), TGT (Cys), ATC (Ile), CTT (Leu), AGC (Ser)
엘리스-단로스 증후군(유사 고전형)	TNXB	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg), TCC (Ser), TAC (Tyr), ACC (Thr), GGG (Gly), ACA (Thr)
엘리스-단로스 증후군(혈관 타입)	COL3A1	CCT (Pro), GGA (Gly), CCC (Pro), GGT (Gly), CCA (Pro), AGA (Arg), GAA (Glu), CTT (Leu), CTC (Leu), GCA (Ala)
페인폴드 증후군 1	MYCN	CCC (Pro), CTC (Leu), GAG (Glu), TCC (Ser), CCG (Pro), CGC (Arg), GCC (Ala), GCG (Ala), CTT (Leu), AAG (Lys)
TDP43 이 포함된 전두측두엽 변성(FTLD- TDP), GRN-관련	GRN	TGC (Cys), CCC (Pro), TGT (Cys), CCT (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), AGA (Arg), GCC (Ala), ACC (Thr), CGC (Arg)

[0200]

GLUT1 결핍 증후군	SLC2A1	CTC (Leu), CCC (Pro), ATC (Ile), TCC (Ser), TTC (Phe), CTG (Leu), GAG (Glu), CGC (Arg), TAT (Tyr), GCC (Ala)
그리그 다중 증후군	GLI3	CCC(Pro), CTC(Leu), TCC(Ser), CCT(Pro), AGA(Arg), AGC(Ser), CTT(Leu), CCA(Pro), GAG(Glu), CCG(Pro)
유전성 출혈성 모세혈관확장증 타입 1	ENG	CTC (Leu), CCC (Pro), TCC (Ser), AGC (Ser), CTT (Leu), GAG (Glu), ATC (Ile), ACC (Thr), CTG (Leu), GCC (Ala)
전전뇌증 3	SHH	CTC (Leu), CCC (Pro), GCG (Ala), CGC (Arg), TAC (Tyr), GAG (Glu), CTG (Leu), GCC (Ala), AGA (Arg), TCG (Ser)
전전뇌증 4	TGIF1	CTC(Leu), CCC(Pro), TCC(Ser), CTT(Leu), CCT(Pro), CTA(Leu), CCA(Pro), TCT(Ser), AGA(Arg), CCG(Pro)
전전뇌증 5	ZIC2	CCC (Pro), GCG (Ala), CTC (Leu), TCC (Ser), CCG (Pro), CGC (Arg), CAC (His), GAG (Glu), GGC (Gly), TTC (Phe)
홀트-오람 증후군	TBX5	CCC (Pro), CCT (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), TAC (Tyr), AGA (Arg), CTA (Leu), GAG (Glu), ACC (Thr), CCA (Pro)
부갑상선기능저하증, 감각신경성 난청 및 신장 질환(HDR)	GATA3	CCC (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), CCG (Pro), TAC (Tyr), AGA (Arg), ACC (Thr), CAC (His), TCG (Ser), AGC (Ser)
클리프스트라 증후군 1	EHMT1	CCC (Pro), CTC (Leu), GAG (Glu), GCA (Ala), TGC (Cys), TCC (Ser), GCC (Ala), AGA (Arg), CTT (Leu), CCT (Pro)
클리펠-트레노베이 증후군(AAGF-관련)	AGGF1	AGA (Arg), GAA (Glu), TAT (Tyr), CCT (Pro), CTT (Leu), CTC (Leu), GAT (Asp), AAT (Asn), GAG (Glu), GCA (Ala)
레리-웨일 연골골형성이상	SHOX	CTC (Leu), CCC (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg), GCG (Ala), TCC (Ser), GCC (Ala), AGA (Arg), CTG (Leu), CCG (Pro)
마르판 증후군	FBN1	TGT (Cys), TGC (Cys), CCC (Pro), CCT (Pro), AGA (Arg), GGA (Gly), CTC (Leu), GAA (Glu), AAT (Asn), TAT (Tyr)
심장 결함이 동반되거나 동반되지 않은 정신 지체 및 독특한 얼굴 특징(MRFACD)	MED13L	CTC (Leu), CCC (Pro), CCT (Pro), CTT (Leu), AGA (Arg), CCA (Pro), ATA (Ile), GCA (Ala), TAT (Tyr), TCC (Ser)
정신 지체, 상염색체 우성 1	MBD5	CCT (Pro), AGA (Arg), CCC (Pro), CTC (Leu), CTT (Leu), CCA (Pro), CTA (Leu), ATA (Ile),

[0201]

		AAT (Asn), GCA (Ala)
정신 지체, 상염색체 우성 19	CTNNB1	CTT (Leu), CTC (Leu), TAT (Tyr), CCT (Pro), AGA (Arg), GAA (Glu), GCA (Ala), ATA (Ile), GGA (Gly), TCT (Ser)
정신 지체, 상염색체 우성 29	SETBP1	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), CCA (Pro), TCC (Ser), AGA (Arg), CTT (Leu), GCA (Ala), AAG (Lys), GAG (Glu)
손발톱-슬개골 증후군 (NPS)	LMX1B	CCC (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), TGC (Cys), GAG (Glu), TAC (Tyr), CGC (Arg), AAG (Lys), AGA (Arg), CCG (Pro)
펠랑-맥더미드 증후군	SHANK3	CCC (Pro), CTC (Leu), CGC (Arg), CCG (Pro), GAG (Glu), TCC (Ser), CCT (Pro), GCC (Ala), CTG (Leu), GCG (Ala)
피트-홉킨스 증후군	TCF4	CCT (Pro), CTC (Leu), AGA (Arg), CCC (Pro), TCC (Ser), TAT (Tyr), CTT (Leu), CCA (Pro), TCT (Ser), GGA (Gly)
원발성 폐동맥 고혈압 1	BMPR2	AGA (Arg), CTT (Leu), ATA (Ile), CCC (Pro), CCT (Pro), TAT (Tyr), CTC (Leu), GCA (Ala), GAA (Glu), AAT (Asn)
레트 증후군 (선천적 변이체)	FOXP1	CCC (Pro), CTC (Leu), CCG (Pro), TCC (Ser), TAC (Tyr), CGC (Arg), GCC (Ala), GAG (Glu), GCG (Ala), CAC (His)
스미스-마제니스 증후군(RAI1-관련)	RAI1	CCC (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), CCT (Pro), GAG (Glu), GCC (Ala), CCG (Pro), AAG (Lys), CCA (Pro), ACC (Thr)
소토스 증후군 1	NSD1	CCT (Pro), AGA (Arg), CCC (Pro), CTT (Leu), CTC (Leu), TGT (Cys), ATA (Ile), GAA (Glu), CCA (Pro), TCT (Ser)
소토스 증후군 2	NFIX	CCC (Pro), TCC (Ser), CCT (Pro), CTC (Leu), CCG (Pro), ATC (Ile), CGC (Arg), TAC (Tyr), AGA (Arg), GCA (Ala)
스티클러 증후군 타입 I	COL2A1	CCT(Pro), CCC(Pro), GGA(Gly), GGT(Gly), AGA(Arg), CTC(Leu), GAA(Glu), GGC(Gly), GAG(Glu), CCA(Pro)
대동맥 판막 상부 협착증	ELN	GGA (Gly), CCT (Pro), CCC (Pro), GCA (Ala), CTC (Leu), CTT (Leu), CCA (Pro), GGT (Gly), GCT (Ala), GGG (Gly)
SYNGAP1-관련 지적 장애	SYNGAP1	CCC (Pro), CTC (Leu), GAG (Glu), TCC (Ser), CCT (Pro), CCA (Pro), TAT (Tyr), CTG (Leu), CGC (Arg), CTA (Leu)
트레처 콜린스 증후군	TCOF1	CCC (Pro), CCT (Pro), GAG (Glu), GCA (Ala), AGA (Arg), GCC (Ala), TCC (Ser), CCA (Pro), AAG (Lys), GGG (Gly)

[0202]

모발비지절증후군 증후군 타입 I	TRPS1	AGA (Arg), CCT (Pro), CCC (Pro), TAT (Tyr), CTC (Leu), CTT (Leu), AAT (Asn), TGT (Cys), GAA (Glu), GCA (Ala)
척골-유선 증후군	TBX3	CCC (Pro), CTC (Leu), TCC (Ser), GCG (Ala), GCC (Ala), CCG (Pro), AGA (Arg), CCT (Pro), GAG (Glu), CGC (Arg)
반더 우드 증후군 1	IRF6	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), GAG (Glu), CCA (Pro), ATC (Ile), GAA (Glu), TAT (Tyr), TAC (Tyr)
바르텐부르크 증후군 타입 1	PAX3	CCC (Pro), CTC (Leu), CCT (Pro), AGA (Arg), GAG (Glu), TAC (Tyr), TCC (Ser), TAT (Tyr), ACC (Thr), AGC (Ser)
바르텐부르크 증후군 타입 2A	MITF	CCC (Pro), CTC (Leu), CTT (Leu), AGA (Arg), ATA (Ile), TCC (Ser), GAA (Glu), GAG (Glu), TAT (Tyr), GCA (Ala)
바르텐부르크 증후군 타입 4C	SOX10	CCC (Pro), CTC (Leu), GAG (Glu), TCC (Ser), TAC (Tyr), TAT (Tyr), GCC (Ala), CCA (Pro), CGC (Arg), GGG (Gly)

[0203]

[0204]

참고에 의한 포함

[0205]

본 명세서에 언급된 특허 및 과학 문헌 각각의 전체 개시 내용은 모든 목적을 위해 참고로 포함된다.

[0206]

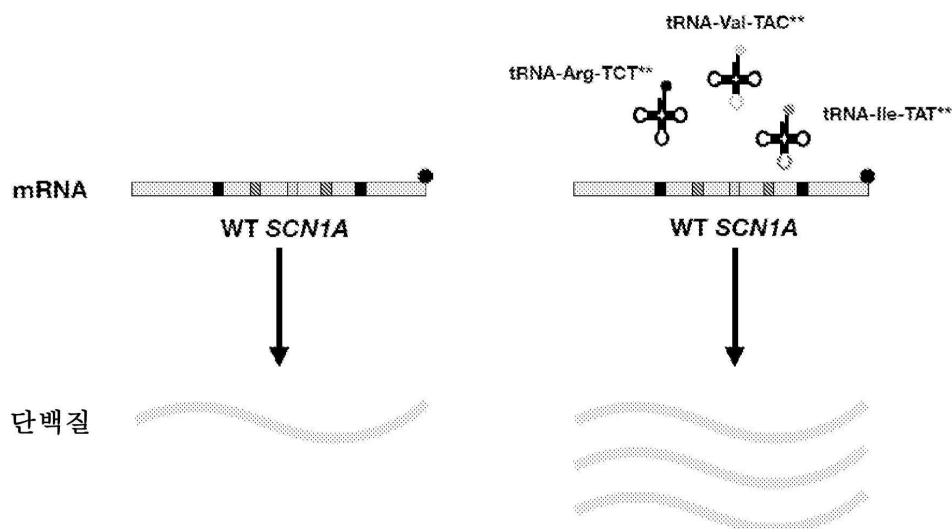
등가물

[0207]

본 발명은 사상 또는 본질적인 특성에서 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 상기 실시형태는 본 명세서에 기재된 발명을 제한하기보다는 예시적인 모든 측면에서 고려되어야 한다. 따라서, 본 발명의 범주는 전술한 설명보다는 첨부된 청구범위에 의해 제시되고, 청구범위와 동등한 의미 및 범주 내에 있는 모든 변형은 본 명세서에 포함되도록 의도된다.

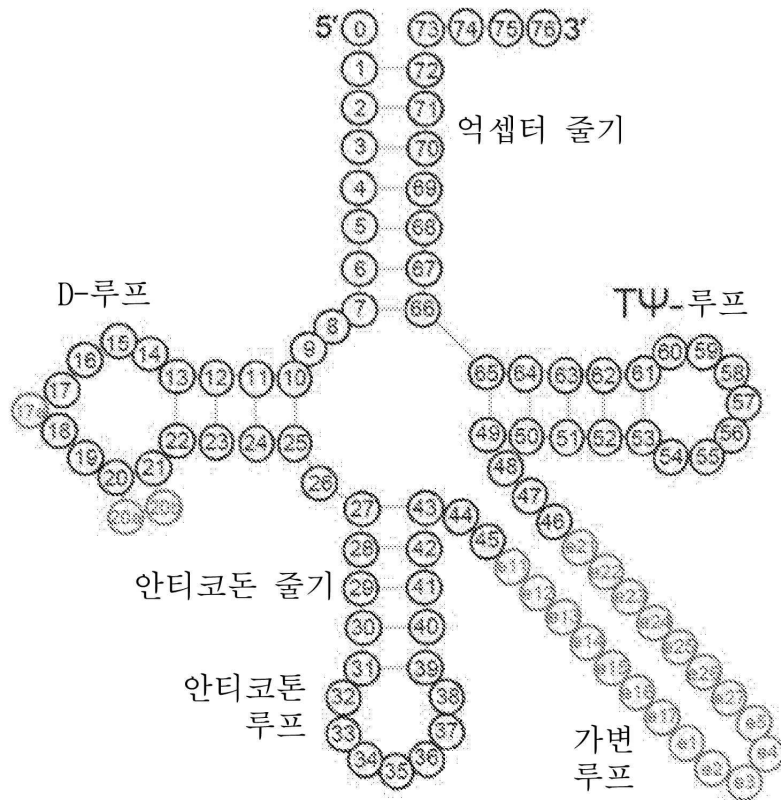
## 도면

### 도면1





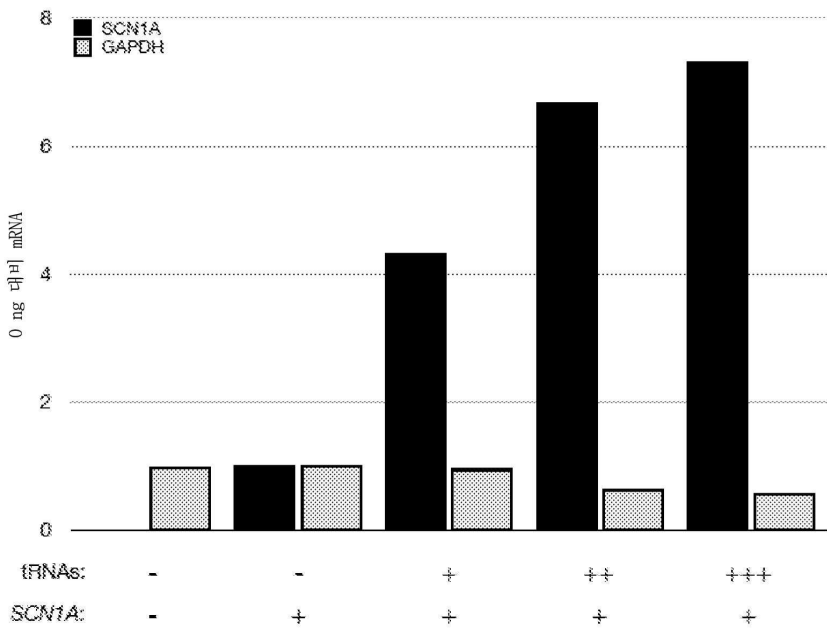
도면2a



도면2b

위치	간기	비율	위치	간기	비율
0	Gm/G	1/4	35	Ψ/U	7/56
1	Ψ/U	3/14	36	Ψ/xU/U	2/3/50
4	Am/A	2/28	37	m <sup>2</sup> Ums <sup>2</sup> FA/FA/	8/2/22/
4	Um/U	5/45		m <sup>2</sup> FA/FA/xA/A	2/48/4/45
4	Cm/C	4/51	37	m <sup>2</sup> G/c2yW/xG/	33/6/2/
4	Gm/G	2/41		yW/G	7/1
6	m <sup>2</sup> G/G	20/38	38	Ψ/U	17/1
7	m <sup>2</sup> G/G	1/59	38	m <sup>2</sup> C/xC/C	10/1/26
9	m <sup>2</sup> A/A	1/59	39	m <sup>2</sup> Ψ/Ψm/	2/6/
9	m <sup>2</sup> G/xG/G	56/1/43	39	Gm/G	4/32
10	m <sup>2</sup> G/G	103/70	40	Ψ/U	6/1
12	ac <sup>2</sup> C/C	32/21	40	m <sup>2</sup> C/G	3/139
13	Ψ/U	47/8	44	Um/xU/U	20/2/18
13	Cm/C	1/83	e11	Ψ/U	2/4
14	m <sup>2</sup> A/xA/A	9/1/165	e12	Ψ/U	5/11
16	D/U	123/25	e14	Ψ/U	2/6
17	D/U	39/0	e2	m <sup>2</sup> C/C	7/7
18	Gm/G	40/138	46	m <sup>2</sup> G/G	86/39
20	acc <sup>2</sup> U/D/U	4/118/11	47	D/xU/U	83/1/16
20a	acc <sup>2</sup> U/DN <sup>2</sup> /xU/U	6/64/2/2/2	48	D/U	1/25
20b	DN <sup>2</sup> /U	8/6/2	48	m <sup>2</sup> C/xC/C	95/1/46
25	Ψ/U	1/28	49	xA/A	1/19
26	Ψ/U	1/24	49	m <sup>2</sup> C/xC/C	64/1/13
26	m <sup>2</sup> G/m <sup>2</sup> G/xG/G	90/16/2/8	50	Ψ/U	4/45
27	Ψ/U	70/10	50	m <sup>2</sup> C/G	15/71
27	m <sup>2</sup> G/G	3/14	54	m <sup>2</sup> Um/m <sup>2</sup> U/Ψ/U	16/111/11/17
28	Ψ/U	37/36	55	Ψ/U	166/12
30	Ψ/U	1/4	58	m <sup>2</sup> A/xA/A	151/1/26
31	Ψ/U	4/2	64	Ar(p)/A	2/43
32	Ψm/Um/Ψ/U	2/6/24/8	64	Gr(p)/xG/G	1/1/87
32	Cm/m <sup>2</sup> C/xC/C	40/16/2/80	65	Ψ/U	1/32
34	xA	32/0	67	Ψ/U	2/63
34	e <sup>2</sup> U/Um/mchm <sup>2</sup> U/	1/3/1/	67	m <sup>2</sup> G/G	2/64
	nem <sup>2</sup> U/chnm <sup>2</sup> Um/	3/1/	68	Ψ/U	1/37
	mcm <sup>2</sup> s <sup>2</sup> U/mcm <sup>2</sup> U/	7/4/	72	Ψ/U	1/16
	Ψ/xU/U	1/11/5	72	m <sup>2</sup> C/G	5/132
34	Cm/m <sup>2</sup> Cm/m <sup>2</sup> C/xC/C	8/1/1/2/44			
34	QIRNA/manQIRNA/	5/4/			
	galQIRNA/Gm/G	3/17/20			

도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR INCREASING PROTEIN EXPRESSION AND/OR  
TREATING A HAPLOINSUFFICIENCY DISORDER

<130> CWR-027998WO ORD

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

gtccagtggt cgcaatcggt tagcgcgagg tacttataga gcagtacatg cagagcaatg 60

ccgaggttgt gagttcgagc ctcacctgga gc 92

<210> 2

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

ggttccatag ttagtggtt atcacgtctg ctttacacgc agaaggtcct gggttcgagc 60

cccagtgga cca 73

<210> 3

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

ggctccgtgg cgcaatggat agcgcatgg acttctagag gctgaaggca ttcaaaggtt 60

ccgggttcga gtcccgccgg agtcg 85

<210> 4

<211> 493

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

aggctaggcg gccctccat ccccgagggc gacactcgca ggcttccccg gctcgatcgg 60

ctgcggaaca gccgggagct cggcgcggaag tcgcagaagg ctcgggcctg ggctcgcgcc 120

gcgaacgcgc atgctctgcc gaggcccgcc gcgggcgcca gcgcaccctg atagagccat 180

cacgaggccc attcagcaga gtcacagtgg cgcaatcggt tagcgcgagg tacttatata 240

gcagtacatg cagagcaatg ccgaggttgt gatttcgagc ctacactgga gcaagaccct 300

tttgatgtt cgcaaccct ttgtgtatc tcgttgccag aagtaaggag tctctcttta 360

gtcttctccc ttctgtttc taactgctct gccgcacgtc cccattggcc gcaagcagga 420

agcagctcgc agtggactct caataccct tttccgagct acttggtgcc accgcgcgac 480

atccagccgc tcg 493

<210> 5

<211> 473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

ggcctcgccc tggccccagg ggccgcgact gtggcgggca gggaagacaa gccgcccaaa 60  
cgccggagcc cgagactcga agccgccgca aactcctcgc ctccggggcg gggtcacggt 120  
ggagaggcgg ggctccggcg gagggaccgg aactgctgtg agtctatgaa taaagtccca 180

acaatattct tcctcgtaga ggttccatag ttagtggtt atcacgtctg ctttacacgc 240  
agaagtcct gggttcgagc cccagtggaa ccatagccgt aaggcggtg tttttgcttt 300  
tatagggttt cgttggttgg gttaaaaaaa aaaaagggtt tgggttaaac aaacaaaaaa 360  
aaccaaaaag cgacaacgaa gtgtttttct ttgtcctttt tttcttttta attttttggc 420  
atgtttttct cgcagaagtg aaatgacaga tacctctcc tatcccacaa ggt 473

<210> 6

<211> 485

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

ctcaactggg tcgccgacct tggtgagggg cgaccactgc ggggagaccg agagcctgcg 60

gctggcgttt gaggcggatg gcagtgcct gagcgcggcg gctgggtctc ggtgacactg 120  
acgacgggag gcgcggtcgg aagagcgcg ggccgtcgcc tctggcttaa catagcagat 180  
gcgctgagac tccaacaggt ggctccgtgg cgcaatggat agcgattgg acttctagag 240  
gctgaaggca ttcaaaggtt ccgggttcga gtcccggcgg agtcgtaacg cttttttccc 300  
tccccctac aatttatatt ctgcctccat catgtctctt atttttttt ttgtctaaac 360  
ggtttaactt ctctctcatt ccctgctctc gcagttcact gcattcggtt cttgcggtcc 420  
tttcttaagc ggctcgcagg gtcccagacc cctcagctcc ccgggcctcg gtggcccagg 480

gcca 485

<210> 7

<211> 185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

gcgccagcgc accctgatag agccatcacg aggccattc agcagagctc cagtggcgca 60  
atcggttagc gcgcggtact tatacagcag tacatgcaga gcaatgccga ggttgtgagt 120  
tcgagcctca cctggagcaa gacccttttg gatgttcgca accccttttg tgtatctcgt 180

tgcca 185

<210> 8

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

gctgtgagtc tatgaataaa gtcccaacaa tattcttctt cgtagagggt ccatagtgtgta 60

gtggttatca cgctcgcttt acacgcagaa ggtcctgggt tcgagcccca gtggaaccat 120

agccgtaagg cggctgtttt tgcttttata gggtttcgtt gtttg 165

<210> 9

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

gtgcctctg gcttaacata gcagatgcgc tgagactcca acaggtggct ccgtggcgca 60

atggatagcg cattggactt ctagaggctg aaggcattca aaggttccgg gttcgagtcc 120

cggcggagtc gtaacgcttt ttccctccc ccctacaatt tattttctgc ctccatc 177