



등록특허 10-2584873



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월10일  
(11) 등록번호 10-2584873  
(24) 등록일자 2023년09월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/7105* (2006.01) *A61K 38/46* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)  
*C12N 15/113* (2010.01) *C12N 15/90* (2006.01)  
*C12N 9/22* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*A61K 31/7088* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7036029
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월15일  
 심사청구일자 2021년04월15일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월14일
- (65) 공개번호 10-2018-0008641
- (43) 공개일자 2018년01월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/027987
- (87) 국제공개번호 WO 2016/186772  
 국제공개일자 2016년11월24일
- (30) 우선권주장  
 62/162,720 2015년05월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Edward M. Kennedy 등, *Virology*, 479(2015), 폐  
 이지213-220 (2015.02.06.)\*  
 Elena Senis 등, *Biotechnol. J.*, 9(11),  
 폐이지1402-1412, 2014.\*  
 Morgan L. Maeder 등, *Molecular Therapy*,  
 23(1), 폐이지S273-274, 2015.\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 19 항

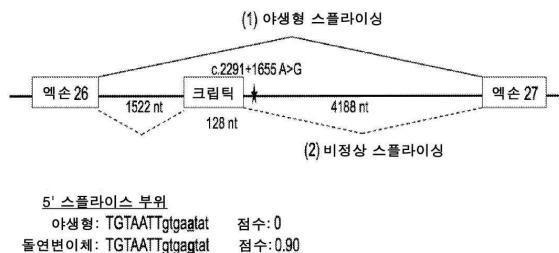
심사관 : 이재영

## (54) 발명의 명칭 심부 인트론 돌연변이의 유전자 편집

## (57) 요약

본원에서는, 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 사용하여 심부 인트론 돌연변이(deep intronic mutation)와 연관된 질병 또는 장애를 치료하기 위한 조성물, 방법, 키트 및 바이러스 입자가 제공된다. 일부 양태에서, 본원은 자가-제한 CRISPER-Cas 시스템을 제공한다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 31/7105* (2013.01)

*A61K 38/465* (2013.01)

*A61K 48/00* (2013.01)

*C12N 15/102* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*C12N 15/907* (2013.01)

*C12N 9/22* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2023.05)

*C12N 2310/10* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및

b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및

ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위

를 포함하는 Cas 발현 카세트

를 포함하는, 개체의 *CEP290* 유전자 내 돌연변이와 연관된 레베르 선천성 흑암시(Leber congenital amaurosis)의 치료를 위한 조성물로서,

제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 표적 DNA의 반대 가닥에 혼성화하고, 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA는 *CEP290* 유전자 서열에서의 돌연변이를 포함하며;

제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며;

Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며;

Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 상기 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고;

Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시키는, 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

Cas 발현 카세트가

iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위

를 추가로 포함하며,

제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA가 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고;

Cas 단백질이 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시키며,

제1 가이드 RNA가 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하거나,

제2 가이드 RNA가 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하거나, 또는

제1 가이드 RNA가 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA가 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하는, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

Cas 발현 카세트가 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 아데닐중합체형성(polyA) 서열을 추가로 포함하며, Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단이 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해하는, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

심부 인트론 돌연변이가

- (i) SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이이거나;
  - (ii) c.2991+1655A>G 돌연변이이거나;
  - (iii) 핵산의 5' 스플라이스 공여체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치하거나;
  - (iv) 핵산의 3' 스플라이스 수용체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치하거나; 또는
  - (v) 핵산에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입하는 것인,
- 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

하기 특징 중 적어도 하나를 포함하는 조성물:

- (i) CEP290 유전자가 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함함;
- (ii) 제1 가이드 RNA가 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 또는 SEQ ID NO:52의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩됨;
- (iii) 제2 가이드 RNA가 SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:53 또는 SEQ ID NO:54의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩됨;
- (iv) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 중 적어도 하나가 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합됨;
- (v) 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질이 전핵 세포에서 발현됨;
- (vi) 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산 중 적어도 하나가 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결됨;
- (vii) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 중 적어도 하나가 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결됨; 및
- (viii) Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결됨.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

Cas 단백질이 Cas9 단백질인, 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

CRISPR-Cas 시스템이 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산이 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치하는, 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

벡터가 재조합 AAV(rAAV) 벡터이며, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산이 1개, 2개 또는 그 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITS; inverted terminal repeat) 서열의 측면에 존재하는, 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

AAV ITR의 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR이며, AAV 입자가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함하거나, 또는 티로신 돌연변이 또는 해파란 결합 돌연변이를 포함하는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및 AAVrh10 캡시드 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 개체의 눈에 투여되도록 제형화되는, 조성물.

**청구항 12**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 키트.

**청구항 13**

제10항에 있어서, 벡터가 자가-상보적 벡터인, 조성물.

**청구항 14**

제6항에 있어서, Cas9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질, 스트렙토코쿠스 씨모필루스(*Streptococcus thermophilus*) Cas9 단백질, 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) Cas9 단백질 또는 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*) Cas9 단백질인, 조성물.

**청구항 15**

제5항에 있어서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 중 적어도 하나가 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합되고, tracr 서열이 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 16**

제5항에 있어서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 RNA 종합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되고, 여기서 RNA 종합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최초기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1 $\alpha$  프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 읍신 프로모터, 추상체 읍신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP; interphotoreceptor retinoid-binding protein gene) 프로모터인, 조성물.

**청구항 17**

제7항에 있어서, Cas 단백질이 하나 이상의 NLS를 포함하는, 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서, NLS가 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함하는, 조성물.

**청구항 19**

제8항에 있어서, 백터가 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 백터, 재조합 아데노바이러스 백터, 재조합 렌티바이러스 백터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 백터인, 조성물.

**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

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

청구항 245

삭제

청구항 246

삭제

청구항 247

삭제

청구항 248

삭제

청구항 249

삭제

청구항 250

삭제

청구항 251

삭제

청구항 252

삭제

청구항 253

삭제

청구항 254

삭제

청구항 255

삭제

청구항 256

삭제

청구항 257

삭제

청구항 258

삭제

청구항 259

삭제

청구항 260

삭제

청구항 261

삭제

청구항 262

삭제

청구항 263

삭제

청구항 264

삭제

청구항 265

삭제

청구항 266

삭제

청구항 267

삭제

청구항 268

삭제

청구항 269

삭제

청구항 270

삭제

청구항 271

삭제

청구항 272

삭제

청구항 273

삭제

청구항 274

삭제

청구항 275

삭제

청구항 276

삭제

청구항 277

삭제

청구항 278

삭제

청구항 279

삭제

청구항 280

삭제

청구항 281

삭제

청구항 282

삭제

청구항 283

삭제

청구항 284

삭제

청구항 285

삭제

청구항 286

삭제

청구항 287

삭제

청구항 288

삭제

청구항 289

삭제

청구항 290

삭제

청구항 291

삭제

청구항 292

삭제

청구항 293

삭제

청구항 294

삭제

청구항 295

삭제

청구항 296

삭제

청구항 297

삭제

청구항 298

삭제

청구항 299

삭제

청구항 300

삭제

청구항 301

삭제

청구항 302

삭제

청구항 303

삭제

청구항 304

삭제

청구항 305

삭제

청구항 306

삭제

청구항 307

삭제

청구항 308

삭제

청구항 309

삭제

청구항 310

삭제

청구항 311

삭제

청구항 312

삭제

청구항 313

삭제

청구항 314

삭제

청구항 315

삭제

청구항 316

삭제

청구항 317

삭제

청구항 318

삭제

청구항 319

삭제

청구항 320

삭제

청구항 321

삭제

청구항 322

삭제

청구항 323

삭제

청구항 324

삭제

청구항 325

삭제

청구항 326

삭제

청구항 327

삭제

청구항 328

삭제

청구항 329

삭제

청구항 330

삭제

청구항 331

삭제

청구항 332

삭제

청구항 333

삭제

청구항 334

삭제

청구항 335

삭제

청구항 336

삭제

청구항 337

삭제

청구항 338

삭제

청구항 339

삭제

청구항 340

삭제

청구항 341

삭제

청구항 342

삭제

청구항 343

삭제

청구항 344

삭제

청구항 345

삭제

청구항 346

삭제

청구항 347

삭제

청구항 348

삭제

청구항 349

삭제

청구항 350

삭제

청구항 351

삭제

청구항 352

삭제

청구항 353

삭제

청구항 354

삭제

청구항 355

삭제

청구항 356

삭제

청구항 357

삭제

청구항 358

삭제

청구항 359

삭제

청구항 360

삭제

청구항 361

삭제

청구항 362

삭제

청구항 363

삭제

청구항 364

삭제

청구항 365

삭제

청구항 366

삭제

청구항 367

삭제

청구항 368

삭제

청구항 369

삭제

청구항 370

삭제

청구항 371

삭제

청구항 372

삭제

청구항 373

삭제

청구항 374

삭제

청구항 375

삭제

청구항 376

삭제

청구항 377

삭제

청구항 378

삭제

청구항 379

삭제

청구항 380

삭제

청구항 381

삭제

청구항 382

삭제

청구항 383

삭제

청구항 384

삭제

청구항 385

삭제

청구항 386

삭제

청구항 387

삭제

청구항 388

삭제

청구항 389

삭제

청구항 390

삭제

청구항 391

삭제

청구항 392

삭제

청구항 393

삭제

청구항 394

삭제

청구항 395

삭제

청구항 396

삭제

청구항 397

삭제

청구항 398

삭제

청구항 399

삭제

청구항 400

삭제

청구항 401

삭제

청구항 402

삭제

청구항 403

삭제

청구항 404

삭제

청구항 405

삭제

청구항 406

삭제

청구항 407

삭제

청구항 408

삭제

청구항 409

삭제

청구항 410

삭제

청구항 411

삭제

청구항 412

삭제

청구항 413

삭제

청구항 414

삭제

청구항 415

삭제

청구항 416

삭제

청구항 417

삭제

청구항 418

삭제

청구항 419

삭제

청구항 420

삭제

청구항 421

삭제

청구항 422

삭제

청구항 423

삭제

청구항 424

삭제

청구항 425

삭제

청구항 426

삭제

청구항 427

삭제

청구항 428

삭제

청구항 429

삭제

청구항 430

삭제

청구항 431

삭제

청구항 432

삭제

청구항 433

삭제

청구항 434

삭제

청구항 435

삭제

청구항 436

삭제

청구항 437

삭제

청구항 438

삭제

청구항 439

삭제

청구항 440

삭제

청구항 441

삭제

청구항 442

삭제

청구항 443

삭제

청구항 444

삭제

청구항 445

삭제

청구항 446

삭제

청구항 447

삭제

청구항 448

삭제

청구항 449

삭제

청구항 450

삭제

청구항 451

삭제

청구항 452

삭제

청구항 453

삭제

청구항 454

삭제

청구항 455

삭제

청구항 456

삭제

청구항 457

삭제

청구항 458

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

관련 출원의 전후 참조

[0002]

본 출원은 2015년 5월 16일에 출원된 미국 가출원 62/162,720의 우선권 이익을 주장하며, 이의 내용은 그 전체가 모든 목적을 위해 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003]

ASCII 텍스트 파일 형식의 서열 목록의 제출

[0004]

ASCII 텍스트 파일 형식의 하기 제출의 내용물은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능한 형태(CRF)(파일명: 159792013440SEQLIST.TXT, 기록일: 2016년 4월 14일, 크기: 49 KB).

[0005]

기술분야

[0006]

본 발명은 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR–Cas) 시스템을 사용한, 심부 인트론 돌연변이(deep intronic mutation)와 연관된 질병 또는 장애의 치료 방법, 뿐만 아니라 이와 관련된 조성물, 키트 및 바이러스 입자에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0007]

비-코딩 서열, 예컨대 인트론에서의 돌연변이는 광범위한 질병에 관여해 왔다. 인간 유전체는 다른 유기체, 예

컨대 벌레 및 파리보다 더 긴 인트론을 더 높은 비율로 함유하며; 인간 인트론의 90% 초과는 길이가 100개 초과의 뉴클레오티드이고, 모든 인트론 중 1/3 초과는 길이가 2,000개 이상의 뉴클레오티드이다(*Molecular Biology of the Cell*, 6<sup>th</sup> ed. (Alberts, B. et al. eds., 2014)). 또한, 질병-연관 돌연변이를 확인하려는 대부분의 노력이 코딩 서열에 초점을 맞춰 왔기 때문에, 심부 인트론 돌연변이는 인간 질병의 중요하지만 잠재적으로 무시된 원인으로 확인되어 왔다(Homolova, K. et al. (2010) *Hum. Mutat.* 31:437-444). 인간에서 mRNA 스플라이싱의 복잡성으로 인해, 이들 심부 인트론 돌연변이는 잠재적으로는, 특히 mRNA 탈안정화, 분해 및 미스-스플라이싱(예를 들어, 크립틱 스플라이스 부위(cryptic splice site)를 형성함)을 포함한 메커니즘으로 인해 여러 가지 병리학적 질환을 유발할 수 있다. 사실상, 일부는, 인간에서 5% 이하의 멘델 질병이 심부 인트론 돌연변이와 연관이 있을 수 있을 것으로 추정한 바 있다(Cooper, D.N. et al. (2010) *Hum. Mutat.* 31:631-655).

[0008] 일부 경우, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 장애의 예시적인 예로서, 레베르 선천성 흑암시(LCA; Leber congenital amaurosis)는 생후 1년 이내에 증상이 개시되는 가장 심각한 형태의 유전성 망막 이영양증(retinal dystrophy)이다(Leber, T.K.G.v. (1869) *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 15:1-25). LCA 환자에서 시력은 드물게 20/400보다 양호하다(Cremers, F.P. et al. (2002) *Human molecular genetics* 11:1169-1176). LCA는 일반적인 집단에서 30,000명 당 약 1명에서 발병하고, 모든 유전성 망막 이영양증의 5%를 차지한다(Koenekoop, R.K. (2004) *Survey of ophthalmology* 49:379-398). 유럽 국가들 및 미국에서 모든 LCA 사례의 약 15%를 차지하는 LCA의 가장 흔한 유전적 원인은 *CEP290* 유전자의 인트론 26에서의 심부 인트론 돌연변이 c.2991+1655A>G로서, 이러한 돌연변이는 크립틱 스플라이스 공여체 부위를 형성하여, 미성숙 정지 코돈(p.C998X)을 함유하는 비정상 엑손(aberrant exon)을 *CEP290* mRNA에 포함시킨다(den Hollander, A.I. et al. (2006) *Am. J. Hum. Genet.* 79:556-561; Perrault, I. et al. (2007) *Hum. Mutat.* 28:416; Stone, E.M. (2007) *Am. J. Ophthalmol.* 144:791-811; Wiszniewski, W. et al. (2011) *Hum. Genet.* 129:319-327). *CEP290* 돌연변이에 의해 유발된 LCA 질병은 LCA10으로 공지되어 있다. *CEP290* mRNA 내로의 크립틱 엑손의 대안적인 스플라이싱은 영향을 받는 동형접합성 개체에서 전부는 아니지만 일부 mRNA 전사체에서 발생하여(den Hollander, A.I. et al. (2006) *Am. J. Hum. Genet.* 79:556-561), 이러한 인트론 돌연변이의 기능저하(hypomorphic) 성질을 강조한다.

[0009] 인간 *CEP290* 유전자는 2479개의 아미노산 단백질을 인코딩하는 54개의 엑손을 포함한다. *CEP290*은 섬모 조립 및 섬모 단백질 왕래(trafficking) 둘 모두에 중요한 역할을 하는 중심체 단백질이다(Barbelanne, M. et al. (2013) *Hum. Mol. Genet.* 22:2482-2494; Craige, B. et al. (2010) *J. Cell Biol.* 190:927-940). 광수용체에서, 망막 세포가 *CEP290* 돌연변이에 의해 가장 영향을 많이 받으며, *CEP290*은 광수용체의 내분절과 외분절을 연결하는 연결 섬모에 국소화되어 있다(Chang, B. et al. (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15:1847-1857).

[0010] 현재로서는 *CEP290* 돌연변이-유발 LCA에 대한 치료법이 존재하지 않는다. 이 질병을 해결하기 위한 2가지 예비 임상적 접근법으로는 유전자 증대 및 안티센스 올리고뉴클레오티드(AON)이다. 인간 *CEP290* 상보적 DNA(cDNA)의 크기는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 수송 크기(약 4.8 kb)를 초과한다. 렌티바이러스 벡터 시스템은 전장 *CEP290* cDNA를 수용할 수 있으나; 이 시스템은 *CEP290*의 발현 수준을 정밀하게 조절할 수는 없다. 이전의 보고들은, 광수용체가 트랜스진(transgene) 발현 수준에 민감하고, *CEP290*의 과발현이 세포독성이라고 언급하였다(Burnight, E.R. et al. (2014) *Gene Ther.* 21:662-672; Tan, E. et al. (2001) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:589-600). 대안적인 전략은 *CEP290*의 비정상 스플라이싱을 방해하기 위해 AON을 사용하는 것이다(Collin, R.W. et al. (2012) *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1:e14; Gerard, X. et al. (2012) *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1:e29). 그러나, 이러한 접근법은 망막 전문가에 의해 수년 동안 매주 또는 매달 망막하 주사를 받을 것을 필요로 한다.

[0011] 이에, 심부 인트론 돌연변이, 예컨대 *CEP290* 돌연변이-유발 LCA10과 연관된 장애의 치료를 위한 개선된 치료학적 접근법이 긴급하게 요구되고 있다.

### 발명의 내용

[0012] 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드

RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 문자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증(afibrinogenemia), 알포트 증후군(Alport syndrome), 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 모세혈관화장성 운동실조(ataxia telangiectasia), 상염색체 열성 다낭포신(Autosomal recessive polycystic kidney disease), 바쓰 증후군(Barth syndrome), 베타-탈라세미아(beta-thalassemia), 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군(congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome), 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병(Fabry disease), 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈(Fanconi anemia), 지텔만 증후군(Gitelman syndrome), 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1(hereditary megaloblastic anaemia 1), 헤르만스키-푸드락 증후군(Hermansky-Pudlak syndrome), 호모시스틴뇨증(homocystinuria), 단풍시럽뇨병(maple syrup urine disease), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 메티오닌 신타제 결핍증(methionine synthase deficiency), 메틸말론산혈증(methylmalonic academia), 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증(mitochondrial trifunctional protein deficiency), 뮤코다당질축적증 유형 II(mucopolysaccharidoses type II), 다발미세핵심병(multi-minicore disease), 근이영양증(muscular dystrophy), 신경섬유종증 유형 I(neurofibromatosis type I), 니이먼-푀병 유형 C(Niemann-Pick disease type C), 눈 백색증 유형 I(ocular albinism type I), 오르니틴 텔타-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인(predisposition to systemic lupus erythematosus), 프로파온산혈증(propionic academia), 횡문근양종양(rhabdoid tumor), 슈발츠-암펠 증후군(Schwartz-Jampel syndrome), 스티클러 증후군(Stickler syndrome), 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증(tuberous sclerosis), 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M(X-linked hyperimmunoglobulinemia M) 또는 X-연관 저인산혈증(X-linked hypophosphatemia)이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0013]

일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구(ocular) 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 문자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 문자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병(Stargardt disease), 어셔 증후군(Usher syndrome) 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0014]

상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9

에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0015] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0016] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질(SEQ ID NO:40), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질(SEQ ID NO: 55), 스트렙토코쿠스 씨모필루스(*Streptococcus thermophilus*) Cas9 단백질, 나이제리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) Cas9 단백질 또는 트레포네마 덴티콜라(*Treponema dentiscola*) Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다.

[0017] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 NLS를 포함한다. 일부 실시형태에서, NLS는 SV40 라지 T-항원(Large T-antigen) 내 C-말단 서열이다. 일부 실시형태에서, NLS는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다.

[0018] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0019] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템(예를 들어, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질)은 핵산 및/또는 단백질의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온(polycation) 또는 제제와 복합체를 형성한다.

[0020] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최조기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터(minimal promoter) 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1 $\alpha$  프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 읍신 프로모터, 추상체 읍신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP; interphotoreceptor retinoid-binding protein gene) 프로모터이다.

[0021] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전달 시스템과 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 핵산의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.

[0022] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스

벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다.

[0023] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV; vesicular stomatitis virus), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV; lymphocytic choriomeningitis virus), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된(pseudotyped) 렌티바이러스로부터 유래된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.

[0025] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITR) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITR의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR이다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다.

[0026] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3 유래의 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.

[0027] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.

[0028] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0029] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 클레이드(Clade) A 내지 F 유래의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0030] 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA

는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위축성 측삭경화증, 모세혈관화장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스턴뇨증, 단풍시럽뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 니이먼-피병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스페라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-얌펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0031]

양태들에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0032]

상기 방법의 일부 실시형태에서, 개체는 포유류이다. 일부 실시형태에서, 포유류는 인간이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개체의 눈에 투여된다. 일부 실시형태에서, 투여는 망막하 또는 유리체내 투여이다.

[0033]

상기 방법의 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시

형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

- [0034] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.
- [0035] 상기 방법의 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오게네스 Cas9 단백질, 스태필로코쿠스 아우레우스 Cas9 단백질, 스트렙토코쿠스 씨모필루스 Cas9 단백질, 나이제리아 메닌지티디스 Cas9 단백질 또는 트레포네마 텐티콜라 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다.
- [0036] 상기 방법의 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 NLS를 포함한다. 일부 실시형태에서, NLS는 SV40 라지T-항원 내 C-말단 서열이다. 일부 실시형태에서, NLS는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다.
- [0037] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0038] 상기 방법의 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템(예를 들어, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질)은 핵산 및/또는 단백질의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.
- [0039] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최조기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1  $\alpha$  프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 옵신 프로모터, 추상체 옵신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.
- [0040] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전달 시스템과 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 핵산의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.
- [0041] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수

포성 구내염 바이러스(VSV), 램프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이들의 변이체와 위형화된 렌티바이러스로부터 유래된다.

[0043] 일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.

[0044] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITR) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITR의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR이다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다.

[0045] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3 유래의 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.

[0046] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 램프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.

[0047] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0048] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 클레이드 A 내지 F 유래의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0049] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적 조성물이다.

[0050] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 장애의 치료를 위한, 상기 실시형태들 중 임의의 실시형태의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 장애의 치료용 약제의 제조에서, 상기 실시형태들 중 임의의 실시형태의 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위축성 측삭 경화증, 모세혈관화장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-틸라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대직혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스틴뇨증, 단풍시립뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 니이먼-娉병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타

-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-얌펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 안구 질병이다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어서 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 개체는 포유류이다. 일부 실시형태에서, 포유류는 인간이다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다.

[0051] 상기 용도의 일부 실시형태에서, 조성물은 개체의 눈에 투여되도록 제형화된다. 일부 실시형태에서, 투여물은 망막하 또는 유리체내 투여용으로 제형화된다.

[0052] 상기 용도의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0053] 상기 용도의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0054] 일부 양태에서, 본 발명은 상기 실시형태들 중 임의의 실시형태의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에 사용하기 위한, 상기 실시형태들 중 임의의 실시형태의 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 사용 설명서를 추가로 포함한다.

[0055] 일부 양태에서, 본 발명은 바이러스 백터를 포함하는 바이러스 입자를 제공하며, 여기서, 바이러스 백터는 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된 (Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위축성 측삭 경화증, 모세혈관확장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스틴뇨증, 단풍시립뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 니이면-핀병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-얌펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증과 연관이 있다. 일부 실시형태에서, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시

된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0056] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위축성 측삭 경화증, 모세혈관화장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리터타제 결핍증, 파브리병, 급성 끌수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스틴뇨증, 단풍시럽뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 니이먼-娉병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스파라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-암펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증을 앓고 있는 개체의 치료에 사용된다.

[0057] 일부 양태에서, 본 발명은 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 제공하며, 여기서, 바이러스 벡터는 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된 (Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 안구 질병 또는 장애와 연관된 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 안구 질병 또는 장애는 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염의 치료에 사용된다.

[0058] 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0059] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0060] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오게네스 Cas9 단백질, 스타필로코쿠스 아우레우스 Cas9 단백질, 스트렙토코쿠스 씨모필루스 Cas9 단백질, 나이제리아 매닌지티디스 Cas9 단백질 또는 트레포네마 텐티콜라 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다.

[0061] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로

포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 NLS를 포함한다. 일부 실시형태에서, NLS는 SV40 라지T-항원 내 C-말단 서열이다. 일부 실시형태에서, NLS는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다.

[0062] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0063] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최조기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hTAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1a 프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 읍신 프로모터, 추상체 읍신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.

[0064] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전달 시스템과 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 핵산의 세포 내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.

[0065] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3 유래의 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 립프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이들의 변이체와 위형화된 렌티바이러스로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 립프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.

[0067] 일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0068] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA

또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITS) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITS의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, AAV ITS은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITS이다. 일부 실시형태에서, AAV ITS은 AAV2 ITS이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 클레이드 A 내지 F 유래의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITS 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV2 ITS을 포함한다.

[0069] 상기 바이러스 입자의 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 약제학적 조성물에 존재한다.

[0070] 일부 양태에서, 본 발명은 a) CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 진핵 세포에 도입하는 단계; 및 b) 유전자 내에 혼입된 돌연변이를 포함하는 세포를 단리하는 단계를 포함하는, 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병의 시험관내 모델의 생성 방법을 제공하며, 여기서, CRISPR-Cas 시스템은 i) 유전자 내 인트론의 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하는 단일 가이드 RNA, ii) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, iii) 요망되는 인트론 돌연변이 및 프로토스페이서 인접 모티프(PAM; protospacer adjacent motif)의 측면에 존재하는 상동성 아암(homology arm)을 포함하는 상동성 인도 복구(HDR; homology directed repair) 주형을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0071] 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0072] 일부 실시형태에서, PAM은 세포에서 발현된 Cas 단백질에 의한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 절단을 피하기 위해 돌연변이를 포함한다.

[0073] 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오제네스 Cas9 단백질, 스태필로코쿠스 아우레우스 Cas9 단백질, 스트렙토코쿠스 씨모필루스 Cas9 단백질, 나이세리아 메닌지티디스 Cas9 단백질 또는 트레포네마 텐티콜라 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 안구 세포이다. 일부 실시형태에서, 안구 세포는 망막 세포이다.

[0074] 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 NLS를 포함한다. 일부 실시형태에서, NLS는 SV40 라지 T-항원 내 C-말단 서열이다. 일부 실시형태에서, NLS는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다.

[0075] 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0076] 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터

에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최초기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1a 프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 읍신 프로모터, 추상체 읍신 프로모터, 베타 포스포다이에스테라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.

[0077] 일부 실시형태에서, 단일 가이드 RNA, Cas 단백질 또는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트 병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트 병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염의 치료에 사용된다.

[0079] 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0080] 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는 유효량의 조성물을 세포에 전달하는 단계를 포함하는, 세포에서 표적 핵산의 절단 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는, 개체의 핵산 내 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는

치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 핵산 내 돌연변이와 연관된 암구 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0081]

상기 방법의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 아데닐중합체형성(polyA) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, polyA 서열은 SV40 polyA 서열이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결되어, Cas 발현 카세트로부터 발현된 Cas 단백질은 하나 이상의 NLS(들)와 인-프레임(in-frame) 융합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아데닐중합체형성(polyA) 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위는 하나 이상의 NLS(들)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)는 SV40 라지 T-항원 내 C-말단 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산 및/또는 Cas 발현 카세트는 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 조절 제어 요소와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동적 연결을 방해한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위는 프로모터와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 존재한다.

[0082]

상기 방법의 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질에 특이적인 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접해 있으며; Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 조절 제어 요소와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질에 의한 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질의 발현 및 표적 DNA 서열의 절단 시, Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과, 이러한 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 사이에 존재하며; 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과, 이러한 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 polyA 서열 사이에 존재하고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0083]

상기 방법의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증, 알포트증후군, 근위축성 측삭 경화증, 모세혈관확장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선

천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스틴뇨증, 단풍시럽뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축 적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유증증 유형 I, 니이먼-팍병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-암펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0084] 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0085] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0086] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0087] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 퍼오게네스 Cas9 단백질(SEQ ID NO:40), 스태필로코쿠스 아우레우스 Cas9 단백질(SEQ ID NO: 55), 스트렙토코쿠스 씨모필루스 Cas9 단백질, 나이제리아 메닌지티디스 Cas9 단백질 또는 트레포네마 텐티콜라 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다.

- [0088] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0089] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템(예를 들어, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질)은 핵산 및/또는 단백질의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.
- [0090] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최초기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1 a 프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 옵신 프로모터, 추상체 옵신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 막막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.
- [0091] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전달 시스템과 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 핵산의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.
- [0092] 상기 실시형태 중 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다.
- [0093] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이들의 변이체와 위형화된 렌티바이러스로부터 유래된다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.
- [0095] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITR) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITR의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR이다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17,

19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3 유래의 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 백터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 립프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 백터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0099] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 백터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 클레이드 A 내지 F 유래의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 백터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0100] 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는, 세포에서 표적 핵산의 절단을 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는, 개체의 핵산 내 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 (CRISPR)–CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) i) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 ii) 제1 가이드 RNA 표적 부위를 포함하는 Cas 발현 카세트를 포함하는, 개체의 핵산 내 돌연변이와 연관된 암과 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하며; Cas 단백질은 Cas 발현 카세트로부터 발현되며; Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라내고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트의 일부를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적

부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0101] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 아데닐중합체형성(polyA) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, polyA 서열은 SV40 polyA 서열이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결되어, Cas 발현 카세트로부터 발현된 Cas 단백질은 하나 이상의 NLS(들)와 인-프레임 융합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아데닐중합체형성(polyA) 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위는 하나 이상의 NLS(들)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)는 SV40 라지 T-항원 내 C-말단 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NLS(들)는 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산 및/또는 Cas 발현 카세트는 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위 또는 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 조절 제어 요소와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동적 연결을 방해한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현 및 표적 DNA 서열의 절단 시, Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질에 특이적인 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접해 있으며; Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 조절 제어 요소와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질에 의한 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질의 발현 및 표적 DNA 서열의 절단 시, Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0102] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질에 특이적인 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접해 있으며; Cas 단백질에 의한 제1 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 조절 제어 요소와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질에 의한 제2 가이드 RNA 표적 부위의 절단은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 polyA 서열 사이의 작동적 연결을 방해하고; Cas 단백질의 발현 및 표적 DNA 서열의 절단 시, Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 iii) 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고; 제1 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과, 이러한 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 사이에 존재하며; 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과, 이러한 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 polyA 서열 사이에 존재하고; Cas 단백질은 제1 가이드 RNA 표적 부위 및 제2 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단하여, Cas 발현 카세트의 절단 전 Cas 단백질의 발현과 비교하여 Cas 단백질의 발현을 감소시킨다.

[0103] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위축성 측삭 경화증, 모세혈관화장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스틴뇨증, 단풍시럽뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 니이먼-匹병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-얌펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변

이이다.

[0104] 일부 양태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물을 제공하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트병, 어서 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0105] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(CEP290) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 제2 가이드 RNA는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, CEP290은 인간 CEP290이다. 일부 실시형태에서, CEP290은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0106] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위의 약 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 약 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입한다.

[0107] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오케네스 Cas9 단백질(SEQ ID NO:40), 스타필로코쿠스 아우레우스 Cas9 단백질(SEQ ID NO: 55), 스트렙토코쿠스 씨모필루스 Cas9 단백질, 나이세리아 메닌지티디스 Cas9 단백질 또는 트레포네마 텐티콜라 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9은 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 인간 세포이다.

[0108] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 SEQ ID NO:25에 의해 인코딩되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0109] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템(예를 들어, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질)은 핵산 및/또는 단백질의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.

[0110] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산들은 하나 이상의 조절 제어 요소에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는

제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, 7SK 또는 H1 프로모터이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 II 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 최초기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hTERT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, EF1 $\alpha$  프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG) 프로모터, 간상체 옵신 프로모터, 추상체 옵신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.

- [0111] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전달 시스템과 복합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 핵산의 세포내 흡수를 증강시키는 지질, 양이온성 지질, 리포솜, 다가양이온 또는 제제와 복합체를 형성한다.
- [0112] 상기 조성물의 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이들의 변이체와 위형화된 렌티바이러스로부터 유래된다.
- [0114] 일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, rHSV 벡터는 rHSV-1 또는 rHSV-2로부터 유래된다.
- [0115] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITR) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITR의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 혈청형 ITR이다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다.
- [0116] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3 유래의 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.
- [0117] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 벡터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.
- [0118] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부

실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0119] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 백터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 클레이드 A 내지 F 유래의 AAV 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 ITR 및 캡시드는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 백터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0120] 특히 출원 및 간행물을 포함하는 본원에 인용된 모든 참고문헌은 이들의 전체내용이 원용에 의해 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 *CEP290* 유전자에서 인트론 c.2291+1655 A>G 돌연변이의 도식도이다. A>G 돌연변이는 인트론 26 내에 위치한 크립틱 엑손의 5' 스플라이스 부위의 위치 +5에서 발생한다. *CEP290* 엑손 26 내지 엑손 27 영역의 엑손-인트론 구조는, 야생형(실선) 및 돌연변이체(파선) 전사체에 대한 스플라이싱 패턴과 함께 각각 상자 및 선으로 표시되어 있다. 돌연변이화된 뉴클레오티드는 굵고 밀줄이 그어져 있으며, 채워진 별표 기호로 표시되어 있다. 크립틱 엑손의 5' 스플라이스 부위 서열들은 BDGP: 신경망에 의한 스플라이스 부위 예측에 의해 계산된 바와 같이, 이들의 스플라이스 부위 강도 점수와 함께 제시되어 있다(예를 들어, [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) 및 문헌[Reese, M.G. et al. (1997) *J. Comput. Biol.* 4:311-323] 참조). 엑손 뉴클레오티드는 대문자로 나타나 있다. 엑손 및 인트론 크기는 도면 아래에 주석이 달려 있다.

도 2는 *CEP290*의 c.2991+1655 A>G 돌연변이의 측면에 존재하는 인트론 영역을 결실시키기 위한 전략을 보여주는 도면이다. 상류 sgRNA는 인트론 돌연변이의 상류에 위치한 제1 Cas9 절단을 인도하고, 하류 sgRNA는 돌연변이의 하류에 위치한 제2 Cas9 절단을 인도한다. 상류 표적 유전자좌는 크립틱 엑손의 상류, 또는 크립틱 엑손 내에 위치할 수 있음을 주지한다. 2개의 절단 말단들은 비-상동성 말단-접합(NHEJ; non-homologous end-joining) 공정을 통해 직접 연결되며, 이때, c.2991+1655 A>G 돌연변이의 측면에 존재하는 인트론 단편이 결실된다. 인트론 26은 mRNA 가공 동안 RNA 스플라이싱에 의해 추가로 제거된다.

도 3a 내지 도 3c는 상이한 세포주들에서 mRNA(도 3a 및 도 3b) 및 단백질(도 3c) 발현 수준을 보여준다. 도 3a 및 도 3b는 RT-qPCR에 의해 확인된 바와 같이, 야생형 세포(흰색 막대), c.2991+1655A>G 및 c.2991+1666C>G 돌연변이를 가진 염색체에 대해 이종성인 세포(회색 막대), 및 동형접합성 c.2991+1655A>G 및 c.2991+1666C>G 세포(돌연변이체 세포; 검은색 막대)에서, 야생형(도 3a) 및 돌연변이체(도 3b) mRNA의 기저 발현 수준의 그래프를 보여준다. 데이터는 3개의 독립적인 형질감염 유래의 시료들(n=3)의 평균 ± 표준 편차로서 제시되어 있다. 원-웨이 ANOVA, 및 후속해서 Tukey's HSD 포스트 흑 테스트(post hoc test)를 사용하여 비교를 수행하였다. \* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\* = p<0.001. 도 3c는 야생형 세포(WT), 이종성 세포(Het) 및 돌연변이체 세포(MT)로부터 제조된 용해질의 면역블롯이다. 막을 CEP290(상부), 및 로딩 대조군으로서  $\beta$ -액틴(하부)에 대해 프로브하였다.

도 4a 및 도 4b는 PCR(도 4a) 및 차세대 서열분석(도 4b)에 의해 확인된 바와 같이, 페어드(paired) sgRNA 및 SpCas9를 이용한 표적화된 결실 효율을 보여준다. 도 4a에서, 예상된 결실 영역 외부의 프라이머가 사용되었다. 상위 밴드는 야생형 *CEP290*의 인트론 26으로부터 증폭된 PCR 생성물인 반면, 하위 밴드는 예상된 유전체 결실 후 *CEP290* 대립유전자로부터 증폭된 PCR 생성물이다(각각 "Wt" 및 "Trunc"로 표지되어 있음). M, 1 kb DNA 사다리. 도 4b는 차세대 서열분석(NGS)에 의해 확인된 바와 같이, 페어드 sgRNA 및 SpCas9에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포에서 야생형 및 절단된 DNA의 백분율을 보여준다.

도 5a 내지 도 5c는 페어드 sgRNA 및 SpCas9를 이용한 *CEP290* 발현의 구제(rescue)를 보여준다. 도 5a 및 도 5b는 RT-qPCR에 의해 확인된 바와 같이, 야생형 세포(흰색 막대), 이종성(회색 막대), 및 페어드 sgRNA 및 SpCas9에 의해 형질감염된 돌연변이체(검은색 막대) 세포에서, 야생형(도 5a) 및 돌연변이체(도 5b) mRNA의 발현 수준의 그래프를 보여준다. 데이터는 2개의 독립적인 형질감염 유래의 시료들(n=2)의 평균 ± 표준 편차로서 제시되어 있다. 원-웨이 ANOVA, 및 후속해서 Tukey's HSD 포스트 흑 테스트를 사용하여 비교를 수행하였다. \* =

$p<0.05$ ,  $** = p<0.01$ . 도 5c는 페어드 sgRNA 및 SpCas9에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포로부터 제조된 용해질의 면역블롯이다. 막을 CEP290(상부), 및 로딩 대조군으로서  $\beta$ -액틴(하부)에 대해 프로브하였다.

도 6a 내지 도 6e는 자가-제한 CRISPR-SpCas9 시스템을 보여준다. 도 6a는 자가-제한 CRISPR-SpCas9 시스템에 사용된 pAAV-SpCas9 벡터의 도식도이다. SpCas9 뉴클레아제에 대한 인지 서열(sgRNA 표적 서열 + PAM 모티프)를 삽입 부위 1(minCMV 프로모터와 SpCas9 사이) 및/또는 삽입 부위 2(SpCas9-NLS와 SV40 pA 사이) 내에 훈입한다. NLS, 핵 국소화 신호, SV40 pA, 원숭이 바이러스 40 아데닐중합체형성 신호. 도 6b는 U1D3 sgRNA 쌍을 발현시키는 제1 AAV 패키징 플라스미드 및 SpCas9을 발현시키는 제2 AAV 패키징 플라스미드를 이용하여 형질감염된 돌연변이체 세포로부터 제조된 용해질의 면역블롯이다. SpCas9 플라스미드는 2개의 삽입 부위에 U1 sgRNA 인지 서열(U1T) 및/또는 D3 sgRNA 인지 서열(D3T)을 함유한다. U1D3 플라스미드 단독에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포는 여기서 대조군으로서 역할을 하였다. 막을 SpCas9(상부), 및 로딩 대조군으로서  $\beta$ -액틴(하부)에 대해 프로브하였다. 도 6c는, PCR에 의해 확인된 바와 같이, 돌연변이체 세포를 U1D3 sgRNA 쌍 및 자가-제한 SpCas9을 이용하여 형질감염시킨 후, 표적화된 결실을 보여준다. 상위 밴드는 야생형 CEP290 인트론 26으로부터 증폭된 PCR 생성물인 반면, 하위 밴드는 U1 및 D3 sgRNA-가이드 유전체 결실 후, CEP290 대립유전자로부터 증폭된 PCR 생성물이다. M, 1 kb DNA 사다리. 도 6d 내지 도 6e는 RT-qPCR에 의해 확인된 바와 같이, U1D3 sgRNA 쌍 및 자가-제한 SpCas9을 이용하여 형질감염된 돌연변이체 세포에서 야생형(도 6d) 및 돌연변이체(도 6e) mRNA의 발현 수준을 보여준다. 데이터는 3개의 독립적인 형질감염 유래의 시료들( $n=3$ )의 평균  $\pm$  표준 편차로서 제시되어 있다. 원-웨이 ANOVA, 및 후속해서 Tukey's HSD 포스트 흑 테스트를 사용하여 비교를 수행하였다. U1D3 sgRNA 쌍 단독을 이용하여 형질감염된 세포와 비교하여  $* = p<0.05$ ,  $** = p<0.01$ ,  $*** = p<0.001$ .

도 7a 및 도 7b는 이중 AAV 시스템에 의한 마우스 망막 내 *Cep290* 유전자의 인트론 25 내 영역의 결실을 보여준다. 도 7a는 망막하 주사에 사용된 이중 AAV의 도식도이다. 도 7b는 PCR에 의해 확인된 바와 같이, (1) AAV5-RK-EGFP(대조군) 또는 AAV5-U11D11 sgRNA 쌍-RK-EGFP 및 (2) AAV5-SpCas9를 이용한 표적화된 결실을 보여준다. 상위 밴드는 야생형 마우스 *Cep290* 인트론 25로부터 증폭된 PCR 생성물인 반면, 하위 밴드는 U11 및 D11 sgRNA-가이드 유전체 결실 후, *Cep290* 대립유전자로부터 증폭된 PCR 생성물이다. M, 1 kb DNA 사다리.

도 8a 내지 도 8c는 PCR(도 8a) 및 RT-qPCR(도 8b 및 도 8c)에 의해 확인된 바와 같이, *에스. 아우레우스(S. aureus)* Cas9(SaCas9) 및 SpCas9를 이용한 표적화된 결실을 보여준다. 돌연변이체 세포는, SaCas9 또는 SpCas9과 함께 페어드 sgRNA 쌍에 의해 형질감염되었다. 페어드 sgRNA 및 SaCas9이 하나의 AAV 패키징 플라스미드에 존재하는 반면, 페어드 sgRNA 및 SpCas9이 2개의 별도의 AAV 패키징 플라스미드에 존재함을 주지한다. 도 8a에서, 상위 밴드는 야생형 CEP290의 인트론 26으로부터 증폭된 PCR 생성물인 반면, 하위 밴드는 예상된 유전체 결실 후 CEP290 대립유전자로부터 증폭된 PCR 생성물이다(각각 "Wt" 및 "Trunc"로 표지되어 있음). M, 1 kb DNA 사다리. 도 8a 및 도 8b는 RT-qPCR에 의해 확인된 바와 같이, SaCas9(흰색 막대) 또는 SpCas9(회색 막대)와 함께 페어드 sgRNA에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포에서 야생형(도 8a) 및 돌연변이체(도 8b) mRNA의 발현 수준을 보여준다. 데이터는 3개의 독립적인 형질감염 유래의 시료들( $n=3$ )의 평균  $\pm$  표준 편차로서 제시되어 있다. 원-웨이 ANOVA, 및 후속해서 Tukey's HSD 포스트 흑 테스트를 사용하여 비교를 수행하였다. U1D3 sgRNA 쌍 단독을 이용하여 형질감염된 세포와 비교하여  $* = p<0.05$ ,  $** = p<0.01$ ,  $*** = p<0.001$ . # = SaCas9 단독에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포와 비교하여  $p<0.05$ .

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0122] 본 발명은 심부 인트론 돌연변이의 편집을 위한 조성물, 방법 및 바이러스를 제공한다. 일부 실시형태에서, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 다른 실시형태에서, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료를 위한 조성물은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA, 및 b) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하

고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다.

[0123] 일부 양태에서, 본 발명은 안구 질병의 치료를 위한 조성물, 방법 및 바이러스 입자를 제공한다. 상기 기재된 바와 같이, LCA의 가장 흔한 유전적 원인은 *CEP290* 유전자의 인트론 26에서의 심부 인트론 돌연변이 c.2991+1655A>G로서, 이러한 돌연변이는 크립틱 스플라이스 공여체 부위를 형성하여, 미성숙 정지 코돈(p.C998X)을 함유하는 비정상 엑손을 *CEP290* mRNA에 포함시킨다(도 1). 본 발명자들은, 한 쌍의 단일 가이드 RNA(sgRNA) 및 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR) 및 CRISPR-연관 단백질(Cas) 시스템에 의한 인간 세포에서의 표적화된 유전체 DNA 결실을 통한, *CEP290* 유전자에 인트론 c.2991+1655 A>G 돌연변이를 갖는 LCA 환자의 간단하고 효율적인 치료 방법을 설계하였다(도 2). 이러한 접근법은 인트론 c.2991+1655 A>G 돌연변이를 효과적이고 영구적으로 결실시켜, *CEP290* mRNA 내에 삽입된 크립틱 엑손의 스플라 이싱을 방지하고, 한편 내인성 유전적 조절 요소를 본래대로 유지시킨다.

## [0124] I. 일반 기술

본원에 기재되거나 참조된 기술 및 절차는 일반적으로 널리 이해되어 있으며, 당업자에 의해 통상적인 방법, 예를 들어, 문헌 [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6<sup>th</sup> ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011)]에 기재된 널리 이용되는 방법을 이용하여 보통 이용된다.

## [0126] II. 정의

본원에 사용된 바와 같이, "CRISPR-Cas"는 가이드 RNA 및 Cas 엔도뉴클레아제를 포함하는 2-성분 리보뉴클레오 단백질 복합체를 지칭한다. CRISPR는 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열 유형 II 시스템을 지칭한다. CRISPR가 박테리아 및 고세균이 외래 핵산(예를 들어, 바이러스 또는 플라스미드로부터 유래됨)을 검출하고 침목화시킬 수 있는 적응 방어 시스템으로서 발견된 한편, CRISPR는 폴리뉴클레오티드 편집을 서열-특이적 방식으로 할 수 있도록 여러 가지 세포 유형들에서 사용되기 위해 개조되어 왔다(예를 들어, 문헌 [Jinek, M. *et al.* (2012) *Science* 337:816-821] 및 [Ran, F.A. *et al.* (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308] 참조). 유형 II 시스템에서, 가이드 RNA는 Cas와 상호작용하고, Cas 효소의 뉴클레아제 활성을 가이드 RNA 가이드 서열과 동일한 표적 DNA 서열로 인도한다. 가이드 RNA 엔기는 표적 서열의 반대 가닥과 쌍을 이룬다. 그런 다음, Cas 뉴클레아제 활성이 표적 DNA에서 이중 가닥 절단부를 형성한다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다.

본원에 사용된 바와 같이, "CRISPR-Cas 단일 가이드 RNA"(용어 "단일 가이드 RNA" 및 "sgRNA"가 본원에서 상호 호환적으로 사용될 수 있음)는 표적 DNA의 Cas-매개 절단을 인도할 수 있는 단일 RNA 화학종을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 단일 가이드 RNA는 Cas(예를 들어, Cas9) 뉴클레아제 활성에 필요한 서열, 및 관심 표적 DNA와

동일한 가이드 서열을 함유할 수 있다.

[0129] 용어 "키메라 RNA", "키메라 가이드 RNA", "가이드 RNA", "단일 가이드 RNA" 및 "합성 가이드 RNA"는 본원에서 상호호환적으로 사용될 수 있고, 가이드 서열, tracr 서열 및 tracr 메이트(mate) 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "가이드 서열"은 표적 부위에 특이적인 가이드 RNA 내 약 20 bp 서열을 지칭하고, 용어 "가이드", "스페이서" 또는 "프로토스페이서(protospacer)"와 상호호환적으로 사용될 수 있다. 용어 "tracr 메이트 서열" 또한, 용어 "인도 반복부(direct repeat)(들)"와 상호호환적으로 사용될 수 있다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같이, "sgRNA 가이드 서열"은 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 결합하고 Cas(예를 들어, Cas9) 뉴클레아제 활성을 해당 유전자좌에 인도하는 sgRNA의 뉴클레오티드 서열을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, sgRNA 가이드 서열은 표적 서열과 동일하다. 완전 동일성(full identity)이 본질적으로 필요한 것은 아니되, 단, 혼성화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기 위해서는 충분한 유사성이 있어야 한다. 가이드 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0131] 본원에 사용된 바와 같이, "Cas" 폴리펩타이드는, 가이드 RNA, 예를 들어 sgRNA와 복합체를 형성한 경우, 뉴클레아제로서 작용하는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, Cas 폴리펩타이드는 Cas9 폴리펩타이드(CRISPR-연관 9이며, Csn1로도 공지되어 있음)이다. crRNA:tracrRNA 가이드 또는 단일 가이드 RNA에 결합된 경우, Cas 폴리펩타이드(예를 들어, Cas9)는, sgRNA 가이드 서열과 동일하고 PAM 모티프와 인접한 서열에서 표적 DNA를 절단할 수 있다. 다른 Cas 폴리펩타이드와는 달리, Cas9 폴리펩타이드는 유형 II CRISPR-Cas 시스템의 특징을 갖고 있다(상이한 CRISPR-Cas 시스템의 Cas 단백질의 설명에 대해서는, 문헌[Makarova, K.S., et al. (2011) *Nat. Rev. Microbiol.* 9(6):467-77] 참조). 본원에 사용된 바와 같이, "Cas"는 명시되지 않는 한, sgRNA와의 리보뉴클레오단백질 복합체, 또는 이러한 복합체의 폴리펩타이드 구성성분을 지칭할 수 있다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CRIPSR RNA(crRNA)"는 표적 DNA 서열에 대한 절단을 인도하기 위해 CRISPR-Cas 시스템에 의해 사용되는 가이드 서열을 포함하는 RNA를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)"는 DNA 절단을 매개하는 CRISPR-Cas 효과기 복합체에 필요한 구조를 형성하는 서열을 포함하는 RNA를 지칭한다. 내인성 박테리아 및 고세균 유형 II CRISPR-Cas 시스템에서, 효과기 CRISPR-Cas 복합체는 2개의 폴리리보뉴클레오티드 분자: crRNA 및 tracrRNA와 복합체를 형성한 Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)을 포함한다. crRNA는, 표적 인지를 매개하는 약 20개의 뉴클레오티드 가이드 서열, 및 tracrRNA와 듀플렉스를 형성하는 서열을 함유한다. crRNA:tracrRNA 듀플렉스는 Cas 단백질에 결합하고, CRISPR-Cas 효과기 복합체 기능에 필요하다. 일부 실시형태에서, crRNA 및 tracrRNA 기능은, 표적 인지를 매개하는 서열 및 CRISPR-Cas 효과기 복합체에 필요한 구조를 형성하는 서열을 둘 모두 함유하는 단일 RNA(단일 가이드 RNA 또는 sgRNA)에 의해 수행될 수 있다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "심부 인트론 돌연변이"는 야생형 스플라이스 수용체 및 스플라이스 공여체 서열의 외부 영역에 존재하는 인트론 서열 내에서의 돌연변이를 지칭한다. 일부 경우, 심부 인트론 돌연변이는 연관된 유전자의 변경된 스플라이싱, 예를 들어 성숙한 mRNA에 인트론 서열이 포함되는 상황을 초래할 수 있다. 비제한적인 예에서, 심부 인트론 돌연변이는, 엑손에 대해 약 100 bp 초과의 하류(즉, 3'), 엑손에 대해 약 100 bp 초과의 상류(즉, 5'), 또는 제1 엑손의 약 100 bp 초과의 하류 및 제2 엑손의 약 100 bp 초과의 상류에 존재한다.

[0134] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "레베르 선천성 흑암시(LCA)"는 시력 손실, 망막 기능장애 및 안구진탕증(nystagmus)을 특징으로 하는 조기-개시 장애 그룹을 지칭한다. 여러 가지 돌연변이들이 LCA에 관여되어 있지만, LCA는 전형적으로, 상염색체 열성 장애로서 유전성이다. 보다 상세한 설명 및 예시적인 LCA 질병 유전자 및 유전자좌에 대해서는, 예를 들어 OMIM Entry 204000을 참조한다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CEP290"은 *MKS4*, *CT87*, *POC3*, *rd16*, *BBS14*, *LCA10*, *JBTS5*, *NPHP6*, *SLSN6* 및 *3H114g*로도 공지되어 있는, 섬모발생에 관여하는 중심체 단백질을 인코딩하는 유전자를 지칭한다. CEP290에서의 돌연변이는 LCA에 관여되어 있다. 이러한 돌연변이의 일례는, 크립틱 스플라이스 공여체 부위를 도입하여 미성숙 정지 코돈을 가진 비정상 엑손을 포함시키는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 예를 들어, 예시적인 인간 유전자 및 단백질 서열에 대해 각각 NCBI 유전자 ID No. 80184 및 UniProt ID No. 015078을 참조한다. CEP290 유전자의 다른 예로는 제한없이, 마우스 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 216274), 래트 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 314787), 레서스 원숭이 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 708286), 제브라피쉬 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 560588), 개 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 482591), 침팬지

CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 452113), 고양이 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 100113471), 닭 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 417887) 및 소 CEP290(예를 들어, NCBI 유전자 ID No. 282707)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CEP290 유전자는 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0136] 본원에서 사용되는 "벡터"는 시험관내 또는 생체내로 숙주 세포로 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 나타낸다.

[0137] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드인 임의의 길이의 뉴클레오티드의 다형태 형태를 나타낸다. 따라서, 이러한 용어는 단일-가닥, 이중 가닥 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 유전체 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기를 포함하는 중합체, 또는 다른 천연 뉴클레오티드 염기, 화학 또는 생화학적으로 변형된 뉴클레오티드 염기, 비천연 뉴클레오티드 염기, 또는 유도체화 뉴클레오티드 염기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드의 백본은 당 및 포스페이트기(RNA 또는 DNA에서 통상적으로 발견될 수 있는 바와 같음), 또는 변형되거나 치환된 당 또는 포스페이트기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 백본은 합성 서브유닛의 중합체, 예를 들어, 포스포라미데이트를 포함할 수 있고, 따라서 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이트(P-NH<sub>2</sub>) 또는 혼합된 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 또한, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 상보성 가닥을 합성하고 적절한 조건하에서 가닥을 어닐링시키거나, 적절한 프라이머와 함께 DNA 중합효소를 이용하여 상보성 가닥을 새로이 합성함으로써 화학적 합성의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 생성물로부터 획득될 수 있다.

[0138] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 아미노산 잔기의 상기 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있으며, 이는 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이합체, 삼합체, 및 다합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편 둘 모두가 상기 정의에 포함된다. 상기 용어는 또한 폴리펩티드의 발현후 변형, 예를 들어, 당화, 시알화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 요망되는 활성을 유지하는 한 천연 서열에 대한 변형, 예를 들어, 결실, 첨가, 및 치환(일반적으로, 사실상 보존성 치환)을 포함하는 단백질을 나타낸다. 이들 변형은 부위-특이적 돌연변이유발을 통하는 것과 같이 계획적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통하는 것과 같이 우연적일 수 있다.

[0139] "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 벡터를 나타낸다. 재조합 AAV 벡터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나의 역방위 말단 반복 서열(ITR)의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 재조합 핵산은 2개의 ITR의 측면에 존재한다.

[0140] "재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 적어도 하나의 AAV 역방위 말단 반복 서열(ITR)의 측면에 존재하는 하나 이상의 이종성 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 나타낸다. 상기 rAAV 벡터는 적합한 헬퍼 바이러스로 감염되었고(또는 적합한 헬퍼 기능을 발현하거나), AAV rep 및 cap 유전자 생성물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 숙주 세포에 제공되는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 염색체 또는 또 다른 벡터, 예를 들어, 클로닝 또는 형질감염을 위해 사용되는 플라미드)로 포함되는 경우, rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적합한 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 언급될 수 있다. rAAV 벡터는 지질과 복합체화되고, 리포솜 내에 캡슐화되고, 바이러스 입자, 예를 들어, AAV 입자 내에 캡시드화된 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 형태 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. rAAV 벡터는 "재조합 아데노-관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성시키기 위해 AAV 바이러스 캡시드로 패키징될 수 있다.

[0141] "rAAV 바이러스" 또는 "rAAV 바이러스 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질 및 캡시드화된 rAAV 벡터 유전체로 구성된 바이러스 입자를 나타낸다.

[0142] "재조합 아데노바이러스 벡터"는 적어도 하나의 아데노바이러스 역방위 말단 반복 서열(ITR)의 측면에 존재하는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 아데노바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 재조합 핵산은 2개의 역방위 말단 반복 서열(ITR)의 측면에 존재한다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는, 재조합 바이러스 유전체로부터 결실된 필수적인 아데노바이러스 유전자(예를 들어, E1 유전자, E2 유전자, E4 유전자 등)를 발현하고 있는 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자내로 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 염색체 또는 또 다른

벡터, 예컨대 클로닝 또는 형질감염에 사용되는 플라스미드 내에 존재함) 내로 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있으며, 이러한 벡터는 아데노바이러스 패키징 기능의 존재 시 복제 및 캡시드화로부터 "구제"될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는, 비제한적으로, 지질과 복합체화된, 리포솜 내에서 캡슐화된, 및 바이러스 입자, 예를 들어 아데노바이러스 입자 내에 캡시드화된, 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함한 수많은 형태들 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 바이러스 캡시드 내로 패키징되어, "재조합 아데노바이러스 입자"를 형성할 수 있다.

[0143] "재조합 렌티바이러스 벡터"는 적어도 하나의 렌티바이러스 말단 반복 서열(LTR)의 측면에 존재하는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 렌티바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 재조합 핵산은 2개의 렌티바이러스 말단 반복 서열(LTR)의 측면에 존재한다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는, 적합한 헬퍼 기능에 의해 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 캡시드 내로 패키징되어, "재조합 렌티바이러스 입자"를 형성할 수 있다.

[0144] "재조합 단순포진 벡터(재조합 HSV 벡터)"는 HSV 말단 반복 서열의 측면에 존재하는 하나 이상의 이종성 서열(즉, HSV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는, 적합한 헬퍼 기능에 의해 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 염색체 또는 또 다른 벡터, 예컨대 클로닝 또는 형질감염에 사용되는 플라스미드 내에 존재함) 내로 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있으며, 이러한 벡터는 HSV 패키징 기능의 존재 시 복제 및 캡시드화로부터 "구제"될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는, 비제한적으로, 지질과 복합체화된, 리포솜 내에서 캡슐화된, 및 바이러스 입자, 예를 들어 HSV 입자 내에 캡시드화된, 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함한 수많은 형태들 중 임의의 형태로 존재할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 HSV 캡시드 내로 패키징되어, "재조합 단순포진 바이러스 입자"를 형성할 수 있다.

[0145] "이종성"은 비교되거나, 도입되거나 포함되는 존재물의 나머지의 것과 유전자형적으로 별개의 존재물로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 상이한 세포 유형으로 유전 공학 기술에 의해 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종성 폴리뉴클레오티드(발현시, 이종성 폴리펩티드를 인코딩할 수 있음)이다. 유사하게, 바이러스 벡터로 포함되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 일부)은 벡터와 관련하여 이종성 뉴클레오티드 서열이다.

[0146] 용어 "트랜스진"은 세포로 도입되고, RNA로 전사될 수 있고, 임의로, 적절한 조건하에서 변역되고/되거나 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 양태에서, 이는 도입된 세포에 요망되는 특성을 부여하거나, 그렇지 않은 경우 요망되는 치료 또는 진단 결과를 발생시킨다. 또 다른 양태에서, 이는 RNA 간섭을 매개하는 분자, 예를 들어, miRNA, siRNA, 또는 shRNA로 전사될 수 있다.

[0147] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 용어 "유전체 입자(gp)", "유전체 당량" 또는 "유전체 카피"는 감염성 또는 기능성과 상관 없이 재조합 AAV DNA 유전체를 함유하는 비리온의 수를 나타낸다. 특정 벡터 제조물 내의 유전체 입자의 수는 본원의 실시예, 또는, 예를 들어, 문헌[Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278]에 기재된 것과 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.

[0148] 본원에서 사용되는 용어 "벡터 유전체(vg)"는 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터의 한 세트의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 나타낼 수 있다. 벡터 유전체는 바이러스 입자 내에 캡시드화될 수 있다. 특정 바이러스 벡터에 따라, 벡터 유전체는 단일-가닥 DNA, 이중 가닥 DNA, 또는 단일-가닥 RNA, 또는 이중 가닥 RNA를 포함할 수 있다. 벡터 유전체는 특정 바이러스 벡터와 관련된 내인성 서열 및/또는 재조합 기술을 통해 특정 바이러스 벡터로 삽입되는 임의의 이종성 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터 유전체는 프로모터에 측접한 적어도 하나의 ITR 서열, 스터퍼(stuffer), 관심 서열(예를 들어, RNAi), 및 아데닐중합체형성 서열을 포함할 수 있다. 완전한 벡터 유전체는 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열의 완전한 세트를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터의 핵산 역가는 vg/ml로 측정될 수 있다. 이러한 역가를 측정하기에 적합한 방법은 당 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 정량 PCR).

[0149] 바이러스 역가에 관하여 사용되는 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자" 또는 "복제 단위"는, 예를 들어, 문헌 [McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973]에 기재된 바와 같이 복제 센터 검정으로도 공지된 감염성 센터 검정에 의해 측정되는 감염성 및 복제-적격 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 나타낸다.

[0150] 바이러스 역가에 관하여 사용되는 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본원의 실시예, 또는, 예를 들어, 문헌[Xiao *et*

al. (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; 또는 Fisher et al. (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU assay)]에 기재된 것과 같은 기능 검정에서 측정되는 기능성 트랜스진 생성물의 생성을 발생시키는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 나타낸다.

[0151] "역방위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 당 분야에서 널리 이해되어 있는 용어이며, 반대 방향으로 존재하는 바이러스 유전체의 말단에서 발견되는 비교적 짧은 서열을 나타낸다.

[0152] 당 분야에서 널리 이해되어 있는 용어인 "AAV 역방위 말단 반복(ITR)" 서열은 천연 단일-가닥 AAV 유전체의 양 말단에 존재하는 약 145개의 뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 2개의 택일적 방향 중 어느 하나에 존재하여 다양한 AAV 유전체 사이 및 단일 AAV 유전체의 2개의 말단 사이에 이질성을 발생시킬 수 있다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 또한 자가-상보성의 여러 더 짧은 영역(A, A', B, B', C, C" 및 D 영역으로 지정됨)을 함유하여, ITR의 상기 부분 내에서 가닥내 염기쌍 형성이 발생하는 것을 가능케 한다.

[0153] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 동안 AAV rep 단백질에 의해 분해되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의해 분해되기 어렵다.

[0154] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 AAV(결손 파르보바이러스임)가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징되는 것을 가능케 하는 바이러스를 나타낸다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예를 들어, 우두를 포함하는 다수의 상기 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 다수의 상이한 서브그룹을 포함하나, 서브그룹 C의 아데노바이러스 타입 5(Ad5)가 가장 일반적으로 사용된다. 인간, 비-인간 포유동물 및 조류 기원의 다수의 아데노바이러스가 공지되어 있으며, 기탁기관, 예를 들어, ATCC로부터 이용 가능하다. 기탁기관, 예를 들어, ATCC로부터 또한 이용 가능한 헤르페스과의 바이러스는, 예를 들어, 단순포진 바이러스(HSV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 거짓광견병 바이러스(PRV)를 포함한다.

[0155] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열에 관한 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬시키고, 필요시, 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 캡을 도입시키고, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 치환을 고려하지 않은 후에 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 정의된다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 백분율을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당 분야의 기술 내인 다양한 방식, 예를 들어, 공적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 포함하는 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1]에 기재된 것을 이용하여 달성될 수 있다. 정렬 프로그램의 예는 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, 미국 펜실베니아 소재)이다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본원의 목적상, 제공된 아미노산 서열 B에 대한, 제공된 아미노산 서열 B와, 또는 제공된 아미노산 서열 B에 관한 제공된 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %(이는 제공된 아미노산 서열 B에 대한, 제공된 아미노산 서열 B와, 또는 제공된 아미노산 서열 B에 관한 특정 %의 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 제공된 아미노산 서열 A로 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{\text{분획 } X/Y}{\text{분획 } X/Y}$ , 여기서 X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B 내의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것이 인지될 것이다. 본원의 목적상, 제공된 핵산 서열 D에 대한, 제공된 핵산 서열 D와, 또는 제공된 핵산 서열 D에 관한 제공된 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성 %(이는 제공된 핵산 서열 D에 대한, 제공된 핵산 서열 D와, 또는 제공된 핵산 서열 D에 관한 특정 %의 핵산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 제공된 핵산 서열 C로 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{\text{분획 } W/Z}{\text{분획 } W/Z}$ , 여기서 W는 C 및 D의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D 내의 뉴클레오티드의 전체 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것이 인지될 것이다.

[0156] "단리된" 문자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 이것이 확인되고, 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되고/되거나 회수된 것을 의미한다.

[0157] "유효량"은 임상 결과를 포함하는 이롭거나 요망되는 결과(예를 들어, 증상의 개선, 임상 종점의 달성 등)를 발생시키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질병 상태에 관하여, 유효량은 질병을

개선하거나, 안정시키거나, 질병의 발달을 자연시키기에 충분한 양이다.

[0158] "개체" 또는 "피험자"는 포유동물이다. 포유동물은 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예를 들어, 원숭이), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시형태에서, 개체 또는 피험자는 인간이다.

[0159] 본원에서 사용되는 "치료"는 이롭거나 요망되는 임상 결과를 획득하기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적상, 이롭거나 요망되는 임상 결과는 검출 가능하거나 검출 가능하지 않거나, 증상의 경감, 질병 정도의 감소, 질병의 안정화된(예를 들어, 악화되지 않은) 상태, 질병의 확산(예를 들어, 전이) 예방, 질병 진행의 자연 또는 완화, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 진정(부분적 또는 전체적)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "치료"는 또한 치료 받지 않은 경우의 예상 생존에 비한 연장된 생존을 의미할 수 있다.

[0160] 본원에서 사용되는 용어 "예방적 치료"는 치료를 나타내며, 여기서 개체는 장애를 갖거나 장애를 가질 위험이 있는 것으로 공지되거나 의심되나, 장애의 증상 또는 최소 증상을 나타내지 않은 개체이다. 예방적 치료를 받는 개체는 증상의 발생 전에 치료될 수 있다.

[0161] 본원에서 사용되는 "치료"제(예를 들어, 치료 폴리펩티드, 핵산, 또는 트랜스진)는 이롭거나 요망되는 임상 결과, 예를 들어, 상기 기재된 예시적 임상 결과를 제공하는 것이다. 이와 같이, 치료제는 상기 기재된 바와 같은 치료에서 이용될 수 있다.

[0162] 본원에서 사용되는 용어 "망막 중심"은 외부 황반 및/또는 내부 황반 및/또는 중심와(fovea)를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "망막 중심 세포 유형"은 망막 중심의 세포 유형, 예를 들어, RPE 및 광수용체 세포를 나타낸다.

[0163] 용어 "황반"은 말초 망막에 비해 더 높은 상대 농도의 광수용체 세포, 특히 간상체 및 추상체를 함유하는 영장류의 망막 중심 영역을 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "외부 황반"은 또한 "말초 황반"으로 언급될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "내부 황반"은 또한 "중심 황반"으로 언급될 수 있다.

[0164] 용어 "중심와"는 말초 망막 및 황반과 비교하는 경우 더 높은 상대 농도의 광수용체 세포, 특히 추상체를 함유하는 약 0.5 mm 이하의 직경의 영장류의 망막 중심 내의 작은 영역을 나타낸다.

[0165] 본원에서 사용되는 용어 "망막하 공간"은 광수용체 세포와 망막 색소 상피 세포 사이의 망막 내의 위치를 나타낸다. 망막하 공간은, 예를 들어, 유체의 임의의 망막하 주사 전에 전위 공간일 수 있다. 망막하 공간은 또한 전위 공간으로 주사되는 유체를 함유할 수 있다. 이러한 경우, 유체는 "망막하 공간과 접촉"된다. "망막하 공간과 접촉"되는 세포는 망막하 공간에 접한 세포, 예를 들어, RPE 및 광수용체 세포를 포함한다.

[0166] 본원에서 사용되는 용어 "수포"는 눈의 망막하 공간 내의 유체 공간을 나타낸다. 본 발명의 수포는 단일 공간으로의 유체의 단일 주사, 동일 공간으로의 하나 이상의 유체의 다수의 주사, 또는 다수의 공간으로의 다수의 주사에 의해 생성될 수 있으며, 이는 재위치되는 경우 망막하 공간의 요망되는 부분에 결친 치료 효과를 달성하기에 유용한 전체 유체 공간을 생성시킨다.

[0167] 본원의 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 특이적인 실시형태를 포함(및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다.

[0168] 본원에서 사용되는 항목의 단수 형태는 달리 지정하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.

[0169] 본원에 기재된 본 발명의 양태 및 실시형태는 상기 양태 및 실시형태를 "포함하고/하거나", 이로 "구성되고/되거나", 이를 "필수적으로 함유하는" 것을 포함하는 것이 이해된다.

### III. CRISPR-Cas

[0171] 본 발명의 소정의 양태들은 조작된, 비-천연 발생의 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(CRISPR)-CRISPR 연관된(Cas)(CRISPR-Cas) 시스템에 관한 것이다. 이를 시스템은 특히, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애, 예를 들어, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 암과 질병 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA; 및 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하고, Cas 단백질은 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다.

[0172] 상기 기재된 바와 같이, CRISPR-Cas 시스템은 본래 박테리아 및 고세균에서 외래 핵산에 대한 적응 방어로서 발견되었다. 사실상, CRISPR 유전자좌는 비제한적으로 *애로피룸(Aeropyrum)*, *피로바클룸(Pyrobaculum)*, *설플로부스(Sulfolobus)*, *아케오글로부스(Archaeoglobus)*, *할로카르쿨라(Halocarcula)*, *메타노박테리움(Methanobacterium)*, *메타노콕커스(Methanococcus)*, *메타노사르시나(Methanosarcina)*, *메타노피루스(Methanopyrus)*, *피로콕커스(Pyrococcus)*, *피크로필루스(Picrophilus)*, *서르니오플라스니아(Thernioplasmia)*, *코리네박테리움(Corynebacterium)*, *미코박테리움(Mycobacterium)*, *스트렙토마이세스(Streptomyces)*, *아퀴프루스(Aquifex)*, *포르피브로모나스(Porphromonas)*, *클로로비움(Chlorobium)*, *서무스(Thermus)*, *바실러스(Bacillus)*, *리스테리아(Listeria)*, *스테필로코쿠스(Staphylococcus)*, *클로스트리듐(Clostridium)*, *서모아내로박터(Thermoanaerobacter)*, *미크플라즈마(Mycoplasma)*, *푸소박테리움(Fusobacterium)*, *아자르쿠스(Azarcus)*, *크로모박테리움(Chromobacterium)*, *나이세리아(Neisseria)*, *니트로소모나스(Nitrosomonas)*, *데술포비브리오(Desulfovibrio)*, *게오박터(Geobacter)*, *미로콕커스(Myrococcus)*, *캄필로박터(Campylobacter)*, *윌리넬라(Wolinella)*, *악시네토박터(Acinetobacter)*, *에르위니아(Erwinia)*, *에스케리키아(Escherichia)*, *레지오넬라(Legionella)*, *메틸로콕커스(Methylococcus)*, *파스테우렐라(Pasteurella)*, *포토박테리움(Photobacterium)*, *살로넬라(Salmonella)*, *크산토모나스(Xanthomonas)*, *예르시니아(Yersinia)*, *트레포네마(Treponema)* 및 *서모토가(Thermotoga)*를 포함하여 40개 초파의 원핵생물에서 확인되었다(예를 들어, 문헌[Jansen, R. et al. (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575] 및 [Mojica, F.J. et al. (2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-182] 참조).

[0173] 박테리아에서, Cas(예를 들어, Cas9) 단백질은 2개의 상이한 가이드 RNA: CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)에 결합한다. crRNA 및 tracrRNA 리보뉴클레오티드 염기는 쌍을 이루고, 표적 DNA의 Cas-매개 절단에 필요한 구조를 형성한다. 그러나, 최근, 단일 가이드 RNA(sgRNA)가 crRNA:tracrRNA 구조를 형성하고 표적 DNA의 Cas-매개 절단을 인도하도록 조작될 수 있는 것으로 언급된 바 있다(Jinek, M., et al. (2012) *Science* 337(6096):816-21). Cas 뉴클레아제 활성의 특이성이 가이드 RNA에 의해 결정되기 때문에, CRISPR-Cas 시스템은 이종성 세포에서 이중 가닥 DNA 절단부를 인도하여, 맞춤형 유전체 편집을 가능하게 하는 툴로서 이용되어 왔다(Mali, P., et al. (2013) *Science* 339(6121):823-6). 예시적인 CRISPR-Cas 시스템 및 이와 관련된 사용 방법에 관한 추가의 상세한 설명은 특히 미국 특히 8,697,359에서 찾을 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 가이드 RNA(예를 들어, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA)는 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)를 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 가이드 RNA(예를 들어, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA)는 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, 트랜스-활성화 cr(tracr) 서열은 SEQ ID NO: 25의 서열을 포함한다.

[0174] 이와 같이, 본원에 기재된 CRISPR-Cas 시스템은 많은 이유에서 자연 발생 CRISPR-Cas 시스템과 대조적일 수 있다. 예를 들어 특히, 본 개시내용의 CRISPR-Cas 시스템은 비-천연 서열(예를 들어, 진핵 인트론)에 혼성화하는 하나 이상의 가이드 RNA를 포함할 수 있다. 자연 발생 CRISPR-Cas 시스템은, 박테리아 및 고세균이 전형적으로 노출되는 서열, 예컨대 플라스미드 또는 파지 서열을 인지한다. 또한, 본 개시내용의 많은 CRISPR-Cas 시스템은 단일 가이드 RNA를 포함하는 반면, 자연 발생 CRISPR-Cas 시스템은 전형적으로 별개의 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)를 포함한다.

[0175] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CRISPR-Cas 시스템은 자가-제한적일 수 있다. 예를 들어 하기 기재된 바와 같이, CRISPR-Cas 시스템은, 시스템 자체 내의 표적 서열(들), 예를 들어 서열(들)의 절단이 시스템 구성성분, 예컨대 Cas 단백질의 발현 수준에 영향을 미치는 서열(들)에 혼성화하는 하나 이상의 가이드 RNA를 포함할 수 있다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, CRISPR-Cas 시스템은 숙주 세포 내에서 지속적으로 발현될 필요가 없기 때문에, 이러한 시스템을 "자가-제한"(예를 들어, 감소된 지속성 및/또는 발현을 특징으로 함)이 되도록 조작하는 것은, 예를 들어 표적외(off-target) 효과를 감소시키며, 원치 않는 면역 반응에 대한 잠재성 및/또는 안전성 문제 등을 감소시키는 데 있어서 유리할 수 있는 것으로 생각된다.

[0176] 자가-제한 CRISPR-Cas 시스템에서, CRISPR-Cas 복합체는, 복합체 자체의 하나 이상의 구성성분을 발현시키는 데 사용되는 벡터 내의 하나 이상의 부위를 표적화한다. 따라서, 가이드 RNA(들) 및 Cas 단백질의 발현 시, CRISPR-Cas 시스템은 관심 유전자좌(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 돌연변이의 부위)뿐만 아니라 Cas 벡터 내의 하나 이상의 표적(들)을 표적화하여, 결국에는 (관심 유전자좌에서의 절단 후) Cas 벡터의 절단 및 Cas 단백질 발현의 감소 또는 제거를 초래한다. 하기 실시예 3은, 이러한 자가-제한 CRISPR-Cas 시스템이, 관심 표적 서열(들)에서의 유효 절단(예를 들어 심부 인트론 돌연변이를 잘라냄)을 여전히 허용하면서도 감소된 Cas 지속 시간을 특징으로 한다고 언급하고 있다.

[0177] 본 개시내용의 소정의 양태들은 자가-제한 CRISPR-Cas 시스템을 사용한, 개체의 유전자 내 돌연변이와 연관된

질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 돌연변이는, CRISPR-Cas 시스템에 의해 개체의 유전자로부터 잘리는 원치 않는 서열(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이)일 수 있다. 다른 실시형태에서, 돌연변이는 CRISPR-Cas 시스템(예를 들어, 특히 상동성 주형이 포함된 경우, 절단된 DNA 서열에서의 상동성 DNA 복구)에 의해 교정되는 미스센스 돌연변이, 점 돌연변이 또는 다른 돌연변이일 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 조성물 내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 개체에게 치료적 유효량으로 투여된다.

[0178] 일부 실시형태에서, 조성물은 a) 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산; 및 b) Cas 발현 카세트를 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 관심 돌연변이(비제한적으로 본원에 기재된 심부 인트론 돌연변이를 포함)의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 가이드 RNA 표적 부위를 포함한다. 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하여, CRISPR-Cas 시스템이 가이드 RNA 표적 부위에서의 절단을 촉매하도록 할 수 있다. 가이드 RNA 표적 부위는 또한, 가이드 RNA에 혼성화하는 서열에 인접한, Cas 단백질에 특이적인 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)를 포함할 수 있다. Cas 단백질의 발현 시, Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. Cas 단백질의 발현 시, Cas 단백질은 또한, 가이드 RNA 표적 부위에서 Cas 발현 카세트를 절단함으로써, Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 이와 같이, Cas 발현 카세트가 세포 내에 도입된 후 Cas 발현이 처음에는 증가하지만, Cas 단백질이 세포 내에 축적됨에 따라 Cas 단백질은 Cas 발현 카세트를 절단한다. 더 많은 Cas 발현 카세트가 Cas 단백질에 의해 방해를 받음에 따라, 부가적인 Cas 단백질의 발현이 감소된다(즉, Cas는 발현 카세트 그 자체의 발현을 제한하고, 자가-제한 Cas 발현 카세트로서 간주될 수 있음). 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현은 초기 증가, 및 후속해서 가이드 RNA 표적 부위에서의 절단 후 발현의 저하를 특징으로 한다. 본원에 기재된 바와 같이, Cas 단백질의 발현을 감소시키는 것은 Cas 단백질의 양 및/또는 지속성을 감소시키는 것을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현은 Cas 발현 카세트의 절단 전과 비교하여(예를 들어, Cas의 초기 발현과 비교하여) 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현은, 가이드 RNA 표적 부위가 결여된 Cas 발현 카세트의 사용과 비교하여 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 자가-제한 Cas 발현 카세트를 포함하는 조성물은 표적 핵산을 절단하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 시험관내에서 또는 생체내에서 표적 핵산을 절단하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 돌연변이(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이)를 포함하는 표적 핵산을 절단하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 자가-제한 Cas 발현 카세트는 핵산 내 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료에 사용된다.

[0179] 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 제2 가이드 RNA 표적 부위를 추가로 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 또는 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화하고, 제2 가이드 RNA 표적 부위는 Cas 단백질에 특이적인 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접해 있다. Cas 단백질의 발현 시, Cas 단백질은 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열을 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 나아가 Cas 단백질의 발현 시, Cas 단백질은 2개 가이드 RNA 표적 부위 모두에서 Cas 발현 카세트를 절단함으로써, Cas 단백질의 발현을 감소시킨다. 하기 예시된 바와 같이, 하나의 가이드 RNA는 2개의 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화할 수 있으며; 제1 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화할 수 있고, 제2 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화할 수 있거나; 또는 제2 가이드 RNA는 제1 가이드 RNA 표적 부위에 혼성화할 수 있고, 제1 가이드 RNA는 제2 가이드 RNA 부위에 혼성화할 수 있다.

[0180] 일부 실시형태에서, Cas 발현 카세트는 Cas 단백질의 발현을 인도/촉진하는 데 유용한 하나 이상의 프로모터, 인핸서, 인트론, 아데닐중합체형성(polyA) 서열, 종결자, 5' 또는 3' 비번역 영역에 존재하는 조절 요소 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 표적 부위는 프로모터와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 존재하여, 절단 시 Cas 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현은 프로모터와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이의 작동성 연결의 절단에 의해 감소된다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 polyA 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 표적 부위는 polyA 서열과 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 존재하여, 절단 시 Cas 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질의 발현은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아데닐중합체형성 서열 사이의 작동성 연결의 절단에 의해 감소된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 표적 부위는 프로모터와 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 존재할 수 있고, 제2 가이드 RNA 표적 부위는 polyA 서열과 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 존재할 수 있으며, 따라서 절단 시 Cas 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 NLS(들)에 인-프레임 융합될 수 있고, 가이드 RNA 표적 부위는 하나 이상의 NLS(들)를 인코딩하는 서

열과 polyA 서열 사이에 존재하여(특히 NLS(들)가 Cas 단백질의 C-말단에 융합된 경우), 절단 시 NLS-융합된 Cas 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0181] 본원에 기재된 바와 같이, CRISPR-Cas 시스템, 예컨대 자가-제한 CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 벡터, 예컨대 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 벡터/입자 중 임의의 것 상에서 인코딩될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산은 Cas 발현 카세트와 동일한 벡터 상에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산은 Cas 발현 카세트와 상이한 벡터 상에 존재할 수 있다. 예를 들어, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 제1 rAAV 벡터에 의해 인코딩될 수 있고, Cas 발현 카세트는 제2 rAAV 벡터에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포는 2개 벡터 모두에 의해 형질감염될 수 있으며, 따라서 자가-제한 CRISPR-Cas 시스템의 발현을 초래할 수 있다.

[0182] 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 돌연변이(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이)의 측면에 존재하는 부위에서 표적 DNA 분자를 절단하여, 이러한 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낸다. 예를 들어, DNA 복구 과정, 예컨대 비-상동성 말단 접합(NHEJ)은 절단된 말단들을 접합함으로써, 절단된 DNA 서열을 복구할 수 있으며, 이로써 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 표적 DNA의 일부를 잘라낼 수 있다. 다른 예에서, 상동성 DNA 복구는, 특히 상동성 주형이 포함된 경우, 절단된 DNA 서열을 복구할 수 있다. 본원에 기재되고 예시된 바와 같이, 표적 DNA 서열(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이를 갖는 서열)의 측면에 존재하는 2개의 가이드 RNA의 사용은 표적 DNA 서열, 예컨대 심부 인트론 돌연변이를 갖는 서열의 일부가 잘릴 수 있게 한다(또한, CRISPR-Cas 시스템을 사용한 예시적인 유전자 결실 전략의 상세한 설명에 대해서는 문헌[Brandl, C. et al. (2014) *FEBS Open Bio.* 5:26-35; Zheng, Q. et al. (2014) *Biotechniques* 57:115-124] 참조). 일부 실시형태에서, 표적 DNA 서열 중 잘린 부분은 인트론 DNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 DNA 서열 중 잘린 부분은 오로지 인트론 DNA로만 구성된다.

[0183] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 돌연변이(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이)의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이로부터 임의의 거리만큼 떨어진 인트론 내에 위치한 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화할 수 있는 것으로 생각된다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이로부터 약 1개 염기쌍 내지 약 10,000개 염기쌍의 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 (뉴클레오티드 내에서) 심부 인트론 돌연변이로부터 하기 거리를 중 약 임의의 거리 미만에 위치한 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다: 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 95; 90; 85; 80; 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4; 3; 2; 또는 이들 사이의 임의의 값. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 (뉴클레오티드 내에서) 심부 인트론 돌연변이로부터 하기 거리를 중 약 임의의 거리 초과에 위치한 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600; 650; 700; 750; 800; 850; 900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 또는 이들 사이의 임의의 값. 즉, 제1 및/또는 제2 가이드 RNA는 (뉴클레오티드 내에서) 하기의 상한: 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 95; 90; 85; 80; 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4; 3; 2; 또는 이들 사이의 임의의 값, 및 하기의 독립적으로 선택된 하한: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600; 650; 700; 750; 800; 850; 900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 또는 이들 사이의 임의의 값을 가진 거리 범위들 중 임의의 범위일 수 있는 심부 인트론 돌연변이로부터의 거리에 위치한 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화하며, 여기서, 하한은 상한보다 작다.

[0184] Cas 단백질의 비제한적인 예로는, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9(Csn1 및 Csn12로도 공지되어 있음), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 이들의 호모로그 또는 이들의 변형된 버전 등이 있다. 이들 효소

는 당업계에 보편적으로 공지되어 있다.

[0185]

일부 실시형태에서, Cas 단백질(예를 들어 CRISPR 효소)은 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, 비변형된 CRISPR 효소는 DNA 절단 활성, 예컨대 Cas9을 가진다. 예시적인 Cas9 단백질로는 비제한적으로, 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) Cas9(예를 들어, SwissProt 데이터베이스 기탁 번호 Q99ZW2 참조), 에스. 아우레우스 Cas9(예를 들어, GenBank 기탁 번호 CCK74173 참조), 에스. 씨모필루스(*S. thermophilus*) Cas9(예를 들어, SwissProt 데이터베이스 기탁 번호 G3ECR1 참조), 엔. 메닌지티디스(*N. meningitidis*) Cas9(예를 들어, UniProt 기탁 번호 C9X1G5 참조) 및 텐. 텐티콜라(*T. dentiscola*) Cas9(예를 들어, GenBank 기탁 번호 EMB41078 참조) 등이 있다. 일부 실시형태에서, Cas9은 에스. 피오게네스 또는 에스. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 유래이다. 일부 실시형태에서, CRISPR 효소는 표적 서열의 위치에서, 예컨대 표적 서열 내에서 및/또는 표적 서열의 상보물(complement) 내에서 1개 또는 2개 가닥의 절단을 인도한다. 일부 실시형태에서, CRISPR 효소는 표적 서열의 처음 뉴클레오티드 또는 마지막 뉴클레오티드로부터 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500개 이상의 염기쌍 내에서 1개 또는 2개 가닥의 절단을 인도한다.

[0186]

일부 실시형태에서, 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 효소 코딩 서열은 특정 세포, 예컨대 진핵 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 진핵 세포는 특정 유기체, 예컨대 비제한적으로 인간, 마우스, 래트, 토끼, 개 또는 비-인간 영장류를 포함하는 포유류의 것이거나 이로부터 유래된 것일 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는, 천연 아미노산 서열을 유지시키면서도, 천연 서열의 적어도 하나의 코돈을, 해당 숙주 세포의 유전자에서 보다 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써, 관심 숙주 세포에서의 증강된 발현을 위해 핵산 서열을 변형시키는 과정을 지칭한다. 다양한 화학종들이 특정 아미노산의 소정의 코돈에 대한 특정한 편향(bias)을 나타낸다. 코돈 사용 표는 예를 들어 "코돈 사용 데이터베이스(Codon Usage Database)"에서 쉽게 입수 가능하고, 이를 표는 다수의 방식으로 맞춰질 수 있다(예를 들어 문헌[Nakamura, Y. et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:292] 참조). 특정 숙주 세포에서의 발현을 위해 특정 서열을 최적화하는 코돈에 대한 컴퓨터 알고리즘 또한 입수 가능하며, 예컨대 Gene Forge(Aptagen; Jacobus, Pa.)가 또한 입수 가능하다.

[0187]

일부 실시형태에서, Cas 단백질은 하나 이상의 이종성 단백질 도메인(예를 들어, CRISPR 효소 외에도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 도메인)을 포함하는 융합 단백질이다. Cas 융합 단백질은 임의의 부가적인 단백질 서열, 및 선택적으로 임의의 2개 도메인들 사이의 링커 서열을 포함할 수 있다. Cas 단백질에 융합될 수 있는 단백질 도메인의 예로는 비제한적으로, 하기 활성들: 메틸라제 활성, 데메틸라제(demethylase) 활성, 전사 활성화 활성, 전사 억제 활성, 전사 방출 인자 활성, 히스톤 변형 활성, RNA 절단 활성 및 핵산 결합 활성 중 하나 이상을 갖는 에피토프 태그, 리포터 유전자 서열, 및 단백질 도메인 등이 있다. 에피토프 태그의 예로는 비제한적으로, 히스티딘(His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 해마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그 및 티오레독신(Trx; thioredoxin) 태그 등이 있다. 리포터 유전자의 예로는 비제한적으로, 글루타티온-5-트랜스퍼라제(GST), 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 베타-갈اكت시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제 및 형광 단백질(예를 들어, GFP, CFP, YFP, BFP 등) 등이 있다. Cas 단백질은, 비제한적으로 말토스 결합 단백질(MBP), S-태그, Lex A DNA 결합 도메인(DBD) 융합물, GAL4A DNA 결합 도메인 융합물 및 단순포진 바이러스(HSV) BP16 단백질 융합물을 포함하여, DNA 분자에 결합하거나 다른 세포성 분자에 결합하는 단백질 또는 단백질 단편을 인코딩하는 유전자 서열에 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 증강된 기능을 위해 변형된다.

[0188]

일부 실시형태에서, Cas 단백질은 돌연변이체 Cas 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)은 낙카제(nickase) 돌연변이체이다(Ran et al., 2013 *Cell* 156(6):1380-9). 일부 실시형태에서, Cas9 낙카제 돌연변이체는 가이드 RNA 쌍과 함께 사용되어, 감소된 표적외 DNA 절단과 더불어 표적화된 이중 가닥 절단부를 도입한다.

[0189]

일부 실시형태에서, Cas 단백질은, 아미노산 변경을 가지며 강력한 표적상(on-target) 활성을 나타내지만 무시 할만한 표적외 절단을 나타내는 하이-피델리티(high-fidelity) Cas 단백질 변이체이다(Slaymaker, I.M. et al. (2016) *Science* 351(6268):84-88; Kleinstiver, B.P. et al. (2016) *Nature* 529:490-495).

[0190]

일부 실시형태에서, CRISPR-Cas 시스템은 하나 이상의 핵 국소화 신호(들)(NLS)를 추가로 포함한다. 예를 들어, Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)은 하나 이상의 NLS(들)를 포함할 수 있다. NLS와 함께 Cas9을 포함하는 예시적인 플라스미드는 문헌[Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308]에서 찾을 수 있다. 광범위한 숙주 세포에 적합한 여러 가지 NLS들이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 비제한적으로, NLS는 SV40 NLS(예를 들어, 문헌[Mali, P., et al. (2013) *Science* 339(6121):823-6]에 기재된 바와 같음), SV40 라지 T-항원 모노

파타이트(monopartite) NLS, 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin) NLS 및 hnRNP A1 NLS일 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 NLS 서열로는, 비제한적으로 PKKKRKV(SEQ ID NO:26) 또는 PKKKRKVEDPKKKRKV(SEQ ID NO:27) 등이 있다(예를 들어, 문헌[Jinek, M. et al. (2013) *eLife* 2:e00471] 참조).

[0191] CRISPR 복합체(표적 서열의 반대 가닥에 혼성화되고 하나 이상의 Cas 단백질과 복합체를 형성하는 가이드 서열을 포함함)의 형성은 전형적으로, 내인성 CRISPR 시스템 내의 표적 서열 내에서 또는 부근에서(예를 들어 표적 서열로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 이상의 염기쌍 내에서) 1개 또는 2개 가닥의 절단을 초래한다. 야생형 tracr 서열의 모두 또는 일부를 포함할 수 있는 tracr 서열 또한, 예컨대 tracr 서열의 적어도 일부를 따라 tracr 메이트 서열, 예를 들어 가이드 서열에 작동적으로 연결된 tracr 메이트 서열의 모두 또는 일부에 혼성화함으로써 CRISPR 복합체의 일부를 형성할 수 있는 것으로 생각된다.

[0192] 일반적으로, tracr 메이트 서열은, 상응하는 tracr 서열을 함유하는 세포에서 tracr 메이트 서열의 측면에 존재하는 가이드 서열의 절제; 표적 서열에서 tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열을 포함하는 CRISPR 복합체의 형성; 또는 둘 모두를 촉진하기 위해 tracr 서열과 충분한 상보성을 가진 임의의 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 CRISPR 복합체에 혼성화하고 이의 형성에 참여하기 위해 tracr 메이트 서열과 충분한 상보성을 가진다. 표적 서열에 대하여 하기 기재된 바와 같이, 적어도 기능성이 되기에 충분한 상보성이 필요한 것으로 여겨진다(즉, tracr 서열과 tracr 메이트 서열 사이에 완전한 상보성이 필요한 것은 아님).

[0193] 일반적으로, 상보성 정도(degree of complementarity)는 tracr 메이트 서열과 tracr 서열 중 더 짧은 서열의 길이를 따라 상기 2개 서열들의 최적의 정렬을 지칭한다. 최적의 정렬은 임의의 적합한 정렬 알고리즘(예를 들어 본원에 기재된 바와 같음)에 의해 확인될 수 있고, 2차 구조, 예컨대 tracr 서열 또는 tracr 메이트 서열 내에서의 자가-상보성을 추가로 설명할 수 있다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 길이가 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50개 이상 뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, tracr 서열은 최적으로 정렬된 경우 tracr 메이트 서열의 길이를 따라 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 상보성을 가진다(예를 들어, 본원에 기재된 예시적인 정렬 방법들 중 임의의 방법에 의해 확인된 바와 같음).

[0194] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 임의의 요망되는 관심 표적 DNA 서열은 sgRNA 가이드 서열에 의해 표적화될 수 있고, 표적 DNA 서열에 대한 유일한 요건은 sgRNA 표적 서열에 인접한 프로토스페이서-인접한 모티프(PAM)의 존재인 것으로 생각된다(Mali, P., et al. (2013) *Science* 339(6121):823-6). 상이한 Cas 복합체들이 상이한 PAM 모티프들을 가진 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 스트렙토코쿠스 피오케네스 유래의 Cas9은 GG 다이뉴클레오티드 PAM 모티프를 가진다. 추가의 예로서, 애스. 아우레우스 Cas9의 PAM 모티프는 GRRT이며, 여기서, R은 퓨린(A 또는 G)이며, 엔. 메닌지티디스 Cas9의 PAM 모티프는 GATT이며, 애스. 씨모필루스 Cas9의 PAM 모티프는 AGAA이고, 티. 텐티콜라 Cas9의 PAM 모티프는 AAAAC이다.

[0195] 일반적으로, 가이드 서열은, 표적 서열의 반대 가닥과 혼성화하고 표적 서열에의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 인도하기 위해 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 충분한 유사성을 가진 임의의 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열 사이의 동일성 정도(degree of identity)는 적합한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬된 경우, 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 최적의 정렬은 서열을 정렬시키기 위한 임의의 적합한 알고리즘의 사용에 의해 확인될 수 있으며; 비제한적인 예로는, 스미스-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘, 니들만-원취(Needleman-Wunsch) 알고리즘, 뷔로우스-휠러 트랜스폼(Burrows-Wheeler Transform)(예를 들어 Burrows Wheeler Aligner)을 기반으로 한 알고리즘, ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign(Novocraft Technologies, ELAND(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Illumina), SOAP([soap.genomics.org.cn](http://soap.genomics.org.cn)에서 입수 가능함), Maq([maq.sourceforge.net](http://maq.sourceforge.net)에서 입수 가능함) 등이 있다.

[0196] 일부 실시형태에서, 가이드 서열은 길이가 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 이상 뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 미만 뉴클레오티드이다. 표적 서열에의 CRISPR 복합체의 서열-특이적인 결합을 인도하는 가이드 서열의 능력을 확인하기 위한 검정법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 시험되는 가이드 서열을 포함하여, CRISPR 복합체를 형성하기에 충분한 CRISPR 시스템의 구성성분은, 예를 들어 미국 특히 8,697,359에 기재된 바와 같이 예컨대 CRISPR 서열의 구성성분을 인코딩하는 백터에 의한 형질감염에 의해 상응하는 표적 서열을 가진 숙주 세포에 제공된 다음, 표적 서열 내에서의 선호적인 절단이 평가될 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 가이드 RNA(예를 들어, 제1 가이드 RNA)는 SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 가이드 RNA(예를 들어, 제1 가이드 RNA)는 SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는, CEP290 유전자의 Cas 절단에 대한 가이드 RNA로서의 이의 기능을 유지시키면서도, SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 서열의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는, CEP290 유전자의 Cas 절단에 대한 가이드 RNA로서의 기능이 증강된, SEQ ID NO:41(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:45(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:46(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:47(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:19(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:50(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:51(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:52(SaCas9에 대해)의 가이드 RNA의 변이체이다.

[0198] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 가이드 RNA(예를 들어, 제2 가이드 RNA)는 SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 가이드 RNA(예를 들어, 제2 가이드 RNA)는 SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는, CEP290 유전자의 Cas 절단에 대한 가이드 RNA로서의 이의 기능을 유지시키면서도, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18의 서열의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는, CEP290 유전자의 Cas 절단에 대한 가이드 RNA로서의 기능이 증강된, SEQ ID NO:42(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:43(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:44(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:48(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:49(SaCas9에 대해), SEQ ID NO:20(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:21(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:22(SpCas9에 대해), SEQ ID NO:53(SaCas9에 대해) 또는 SEQ ID NO:54(SaCas9에 대해)의 가이드 RNA의 변이체이다.

[0199] 일부 실시형태에서, tracr 서열 및 tracr 메이트 서열은 단일 전사체 내에 함유되어 있어서, 2개 서열들 사이의 혼성화는 2차 구조(예를 들어 헤어핀)를 가진 전사체를 생성한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 구조에 사용되기 위한 루프 형성 서열은 길이가 4개 뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 루프 형성 서열은 서열 GAAA를 가진다. 그러나, 더 긴 루프 서열 또는 더 짧은 루프 서열이 사용될 수 있으므로, 대안적인 서열일 수 있다. 다른 루프 형성 서열의 예로는 비제한적으로, CAAA 및 AAAG가 있다. 일부 실시형태에서, 전사체 또는 전사된 폴리뉴클레오티드 서열은 적어도 2개 이상의 헤어핀, 예를 들어 2개, 3개, 4개 또는 5개의 헤어핀을 가진다. 일부 실시형태에서, 단일 전사체는 전사 종결 서열, 예를 들어 polyT 서열, 예컨대 6개의 T 뉴클레오티드를 추가로 포함한다.

#### IV. 심부 인트론 돌연변이

[0200] 본 개시내용의 소정의 양태들은 심부 인트론 돌연변이에 관한 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 심부 인트론 돌연변이는 인트론 서열을 성숙한(예를 들어, 스플라이싱된) mRNA 내에 비정상적으로 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 심부 인트론 돌연변이는 스플라이스 공여체 부위, 스플라이스 수용체 부위 또는 스플라이싱 인핸서 부위를 유전자에 도입할 수 있다. 그 결과, 인트론 서열은 크립틱 엑손으로서 포함될 수 있다. 이는 전형적으로, 특히 크립틱 엑손이 프레임시프트 돌연변이 또는 미성숙 정지 코돈을 포함하는 경우, 돌연변이화된 폴리펩타이드를 초래한다.

[0202] 상기 기재된 바와 같이, 심부 인트론 돌연변이는 야생형 스플라이스 수용체 및 스플라이스 공여체 서열의 외부에 존재하는 돌연변이, 즉 내인성 스플라이스 수용체 또는 스플라이스 공여체에서의 돌연변이와 반대되는 돌연변이를 지칭한다. 전형적으로, 심부 인트론 돌연변이는 내인성 스플라이스 수용체/스플라이스 공여체 부위로부터 어느 정도 떨어진 거리에서 발생한다.

[0203] 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위로부터 적어도 약 100개 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 3' 스플라이스 수용체 부위로부터 적어도 약 100개 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 유전자의 5' 스플라이스 공여체 부위로부터 적어도 약 100개 뉴클레오티드 및 3' 스플라이스 수용체 부위로부터 적어도 약 100개 뉴클레오티드에 위치한다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 내인성 스플라이스 수용체 및/또는 스플라

이스 공여체 부위(예를 들어, 5' 스플라이스 공여체 및/또는 3' 스플라이스 수용체 부위)로부터 약 100개 초과 뉴클레오티드, 약 150개 초과 뉴클레오티드, 약 200개 초과 뉴클레오티드, 약 250개 초과 뉴클레오티드, 약 300개 초과 뉴클레오티드, 약 350개 초과 뉴클레오티드, 약 400개 초과 뉴클레오티드, 약 450개 초과 뉴클레오티드, 약 500개 초과 뉴클레오티드, 약 550개 초과 뉴클레오티드, 약 600개 초과 뉴클레오티드, 약 650개 초과 뉴클레오티드, 약 700개 초과 뉴클레오티드, 약 750개 초과 뉴클레오티드, 약 800개 초과 뉴클레오티드, 약 850개 초과 뉴클레오티드, 약 900개 초과 뉴클레오티드, 약 950개 초과 뉴클레오티드, 약 1,000개 초과 뉴클레오티드, 약 1,500개 초과 뉴클레오티드, 약 2,000개 초과 뉴클레오티드, 약 2,500개 초과 뉴클레오티드, 약 3,000개 초과 뉴클레오티드, 약 3,500개 초과 뉴클레오티드, 약 4,000개 초과 뉴클레오티드, 약 4,500개 초과 뉴클레오티드, 약 5,000개 초과 뉴클레오티드, 약 5,500개 초과 뉴클레오티드, 약 6,000개 초과 뉴클레오티드, 약 6,500개 초과 뉴클레오티드, 약 7,000개 초과 뉴클레오티드, 약 7,500개 초과 뉴클레오티드, 약 8,000개 초과 뉴클레오티드, 약 8,500개 초과 뉴클레오티드, 약 9,000개 초과 뉴클레오티드, 약 9,500개 초과 뉴클레오티드, 약 10,000개 초과 뉴클레오티드, 약 15,000개 초과 뉴클레오티드, 약 20,000개 초과 뉴클레오티드, 약 25,000개 초과 뉴클레오티드, 약 30,000개 초과 뉴클레오티드, 약 35,000개 초과 뉴클레오티드, 약 40,000개 초과 뉴클레오티드, 약 45,000개 초과 뉴클레오티드, 약 50,000개 초과 뉴클레오티드, 약 55,000개 초과 뉴클레오티드, 약 60,000개 초과 뉴클레오티드, 약 65,000개 초과 뉴클레오티드, 약 70,000개 초과 뉴클레오티드, 약 75,000개 초과 뉴클레오티드, 약 80,000개 초과 뉴클레오티드 또는 약 85,000개 초과 뉴클레오티드에서 발생한다.

[0204] 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 내인성 스플라이스 수용체 및/또는 스플라이스 공여체 부위(예를 들어, 5' 스플라이스 공여체 부위 또는 3' 스플라이스 수용체)로부터 하기 거리들 중 약 임의의 거리에서 발생한다(뉴클레오티드에서): 85,000; 80,000; 75,000; 70,000; 65,000; 60,000; 55,000; 50,000; 45,000; 40,000; 35,000; 30,000; 25,000; 20,000; 15,000; 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 또는 150. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 내인성 스플라이스 수용체 및/또는 스플라이스 공여체 부위로부터 하기 거리들 중 약 임의의 거리 초과의 거리에서 발생한다(뉴클레오티드에서): 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 10,000; 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 55,000; 60,000; 65,000; 70,000; 75,000; 또는 80,000. 즉, 심부 인트론 돌연변이로부터 내인성 스플라이스 수용체 및/또는 스플라이스 공여체 부위(예를 들어, 5' 스플라이스 공여체 부위)까지의 거리는 85,000; 80,000; 75,000; 70,000; 65,000; 60,000; 55,000; 50,000; 45,000; 40,000; 35,000; 30,000; 25,000; 20,000; 15,000; 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 또는 150의 상한, 및 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 10,000; 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 55,000; 60,000; 65,000; 70,000; 75,000; 또는 80,000의 독립적으로 선택되는 하한을 가진 거리 범위들 중 임의의 범위일 수 있으며(뉴클레오티드에서); 하한은 상한보다 더 작다.

[0205] 본 개시내용의 소정의 양태들은 예를 들어 개체의 유전자 내에서 특히 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료에 사용될 수 있는 방법, 키트, 조성물 및 바이러스 입자에 관한 것이다. 여러 가지 심부 인트론 돌연변이들이 당업계에 공지되어 있다. 질병과 연관된 예시적인 심부 인트론 돌연변이는 하기 표 1에 제공되어 있다(표 1에 제공된 특정한 돌연변이, 유전자 및 인트론 크기가 참조로서 인간 DNA 서열을 지칭함을 주지함).

## 표 1

심부 인트론 돌연변이와 연관된 예시적인 질병.

표현형	유전자	돌연변이	인트론 크기	Pub Med 논문 번호
무피브리노겐혈증	<i>FGB</i>	IVS1+2076A>G	2675	18853456
알포트 증후군	<i>COL4A5</i>	IVS6+1873G>A	2591	12436246
알포트 증후군	<i>COL4A5</i>	IVS29+2750A>G	8019	12436246
근위축성 측삭 경화증	<i>SOD1</i>	IVS4+792C>G	1095	19847927
모세혈관확장성 운동실조	<i>ATM</i>	IVS26+2968A>G	3126	15643608
모세혈관확장성 운동실조	<i>ATM</i>	IVS37+1126A>G	2175	8755918
상염 색체 열성 다낭포신	<i>PKHD1</i>	IVS46+653A>G	12453	19021639
바쓰 증후군	<i>TAZ</i>	IVS3+110G>A	229	11735032
베타-탈라세미아	<i>HBB</i>	IVS2+645C>T	850	6585831
베타-탈라세미아	<i>HBB</i>	IVS2+705T>G	850	6298782
베타-탈라세미아	<i>HBB</i>	IVS2+745C>G	850	6188062
선천성 무피브리노겐혈증	<i>FGG</i>	IVS6+660A>T	979	17854317
선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군	<i>CTDP1</i>	IVS6+389C>T	2505	14517542
선천성 당화 장애 유형 Ia	<i>PMM2</i>	IVS7+19139C>T	34617	17307006
선천성 당화 장애 유형 II	<i>SLC35A1</i>	IVS6+286insCACT	444	15576474
낭포성 섬유증	<i>CFTR</i>	IVS12+1634A>G	2519	7534040
낭포성 섬유증	<i>CFTR</i>	IVS19+11505C>G	12808	11134243
낭포성 섬유증	<i>CFTR</i>	IVS22+12191C>T	14967	1384328
다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증	<i>QDPR</i>	IVS3+2552A>G	9078	9341885
파브리병	<i>GLA</i>	IVS4+919G>A	1719	11828341
가족성 흑색종	<i>CDKN2A</i>	IVS2-105A>G	2659	11726555
급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애	<i>CYBB</i>	IVS5+979G>T	2140	11566256

[0206]

표현형	유전자	돌연변이	인트론 크기	Pub Med 논문 번호
급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애	<i>CYBB</i>	IVS6+1657A>G	2803	16516412
관코니 빈혈	<i>BRIP1</i>	IVS11+2767A>T	3264	16116423
지텔만 증후군	<i>SLC12A3</i>	IVS13+1361C>T	1551	19668106
성장 호르몬 둔감증	<i>GHR</i>	IVS6+792A>G	11204	11468686
프리드리히 운동실조	<i>FXN</i>	GAA 삼중 반복	10437	9259271
난청	<i>MYO6</i>	IVS23+2321T>G	4185	18212818
혈우병 A	<i>F8</i>	IVS1+1567A>G	22809	18160816
혈우병 A	<i>F8</i>	IVS10+325A>G	3903	15284851
혈우병 A	<i>F8</i>	IVS18+530C>T	1738	23809411
혈우병 A	<i>F8</i>	IVS18+941C>T	1738	23809411
유전성 거대적 혈모구 빈혈 1	<i>CUBN</i>	IVS23+881C>G	1320	10080186
헤르만스키-푸드락 증후군	<i>HPS3</i>	IVS16+2499G>A	4111	7901342
호모시스틴뇨증	<i>MTRR</i>	IVS6+469T>C	2420	20120036
단풍시럽뇨병	<i>DBT</i>	IVS8-550A>G	4057	9621512
마르판 증후군	<i>FBN1</i>	IVS63+375G>T	2793	18795226
메티오닌 신타제 결핍증	<i>MTR</i>	IVS3+2305A>G	2470	9683607
메티오닌 신타제 결핍증	<i>MTR</i>	IVS6+1088G>A	2759	9683607
메틸말론산혈증	<i>MUT</i>	IVS11+3691C>A	7582	17966092
미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증	<i>HADHB</i>	IVS7+615A>G	1453	18693053
류코다당질축적증 유형 II	<i>IDS</i>	IVS7+3083A>G	3215	8940265
다발미세핵심병	<i>RYR1</i>	IVS100+2990A>G	4438	12719381
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS1+36846G>A	191081	14659407
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS1+36947G>A	191081	17041906
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS2+5591T>A	170318	12522557
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS9+46806C>T	52717	14659407
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS25+2036A>G	8606	12754707
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS25+2240A>G	8606	10094556

표현형	유전자	돌연변이	인트론 크기	Pub Med 논문 번호
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS27+6298C>A	7141	20485447
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS60+80228G>T	95846	14659407
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS62+62296A>G	62581	12754707
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS65+1215A>G	2830	17041906
근이영양증	<i>DMD</i>	IVS67+2714C>T	21056	20485447
신경섬유종증 유형 I	<i>NF1</i>	IVS3+2025T>G	4092	19241459
신경섬유종증 유형 I	<i>NF1</i>	IVS39+332A>G	4339	8829638
신경섬유종증 유형 I	<i>NF1</i>	IVS39+4060A>G	4339	16470740
신경섬유종증 유형 I	<i>NF1</i>	IVS54+790C>G	1110	19241459
나이먼-푀병 유형 C	<i>NPC1</i>	IVS9+2021G>A	3030	19718781
눈 백색증 유형 I	<i>GPR143</i>	IVS7+748G>A	1618	16550551
오르니틴 엘타-아미노트랜스퍼라제 결핍증	<i>OAT</i>	IVS3+303C>G	3007	1992472
전신 홍반성 루프스 소인	<i>IRF5</i>	IVS1+198G>T	4021	16642019
프로피온산혈증	<i>PCCA</i>	IVS14+2778A>G	4193	17966092
프로피온산혈증	<i>PCCB</i>	IVS6+462A>G	9808	17966092
횡문근양 종양	<i>SNF5/INI1</i>	IVS1+559A>G	4493	10556283
슈발츠-얌펠 증후군	<i>HSPG2</i>	IVS6+481C>T	1914	16927315
스티클러 증후군	<i>COL2A1</i>	IVS23+135G>A	371	16752401
전신 홍반성 루프스	<i>MFGE8</i>	IVS6+936A>G	1739	20213738
결절성 경화증	<i>TSC2</i>	IVS8+281C>T	1568	11068191
베르너 증후군	<i>WRN</i>	IVS18+7636A>G	10659	17478382
X-연관 과면역글로불린혈증 M	<i>CD40L</i>	IVS3+1011A>T	1925	15358621
X-연관 저인산혈증	<i>PHEX</i>	IVS7+1268G>T	2855	11502821

[0208]

일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 무피브리노겐혈증, 알포트 증후군, 근위 축성 측삭 경화증, 모세혈관확장성 운동실조, 상염색체 열성 다낭포신 질병, 바쓰 증후군, 베타-탈라세미아, 선천성 무피브리노겐혈증, 선천성 백내장 안면 기형 신경병증 증후군, 선천성 당화 장애 유형 Ia, 선천성 당화 장애 유형 II, 낭포성 섬유증, 다이하이드로프테리딘 리덕타제 결핍증, 파브리병, 급성 골수성 백혈병의 소인이 있는 가족성 혈소판 장애, 판코니 빈혈, 지텔만 증후군, 성장 호르몬 둔감증, 프리드리히 운동실조, 혈우병 A, 유전성 거대적혈모구 빈혈 1, 헤르만스키-푸드락 증후군, 호모시스턴뇨증, 단풍시럽뇨병, 마르판 증후군, 메티오닌 신타제 결핍증, 메틸말론산혈증, 미토콘드리아 삼중기능 단백질 결핍증, 뮤코다당질축적증 유형 II, 다발 미세핵심병, 근이영양증, 신경섬유종증 유형 I, 나이먼-푀병 유형 C, 눈 백색증 유형 I, 오르니틴 엘타-아미노트랜스퍼라제 결핍증, 전신 홍반성 루프스 소인, 프로피온산혈증, 횡문근양 종양, 슈발츠-얌펠 증후군, 스티클러 증후군, 전신 홍반성 루프스, 결절성 경화증, 베르너 증후군, X-연관 과면역글로불린혈증 M 또는 X-연관 저인산혈증이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 1에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0209]

일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애는 안구 질병이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "안구 질병"은 광범위한 의미로 사용되고, 비제한적으로 각막, 홍채, 수정체, 망막, 시신경, 수양액, 결막, 하나 이상의 안근(ocular muscle), 공막, 유리체, 황반, 중심화, 섬모체, 하나 이상의 인대 또는 또는 현수 인대 소대(suspensory ligament zonule), 동공, 전방(anterior chamber) 및/또는 후방을 포함하여 눈의 임의의 구조의 병리학적 상태에서 기원하거나 초래하는 질병을 지칭할 수 있다. 안구 질병과 연관된 예시

적인 심부 인트론 돌연변이는 하기 표 2에 제공되어 있다(표 2에 제공된 특정한 돌연변이, 유전자 및 인트론 크기가 참조로서 인간 DNA 서열을 지칭함을 주지함).

## 표 2

심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병.

표현형	유전자	돌연변이	인트론 크기	Pub Med 논문 번호
레베르 선천성 흑암시	<i>CEP290</i>	IVS26+1655A>G	5838	16909394
시신경 위축	<i>OPA1</i>	IVS4b+364G>A	1031	24970096
색소성 망막염	<i>PRPF31</i>	IVS13+654C>G	1992	19618371
망막아종	<i>RB1</i>	IVS23+6594A>G	7991	17299438
스타르가르트병	<i>ABCA4</i>	IVS30+2001G>A	4396	23918662
어셔 증후군	<i>USH1C</i>	인트론 5에서 VNTR	182	10973247
어셔 증후군	<i>USH2A</i>	IVS40+8877A>G	11020	23924366
X-연관 색소성 망막염	<i>OFD1</i>	IVS9+706A>G	1715	22619378
X-연관 색소성 망막염	<i>RPGR</i>	IVS9+363G>A	2105	17405150

[0211]

[0212] 일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시, 시신경 위축, 색소성 망막염, 망막아종, 스타르가르트 병, 어셔 증후군 또는 X-연관 색소성 망막염이다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 표 2에 제시된 심부 인트론 돌연변이이다.

[0213]

일부 실시형태에서, 안구 질병은 레베르 선천성 흑암시이다. 레베르 선천성 흑암시(LCA)는 중상, 예컨대 중증의 시력 손실, 안구진탕증, 망막 기능장애, 광선공포증, 눈을 찌르는 징후(oculodigital sign)(예를 들어, 눈의 문지름, 쿡 찌름 및 압박) 및 원추 각막을 특징으로 하는 안구 장애 그룹을 지칭한다. LCA는 전형적으로 태어날 때 존재하며, 극심한 시력 손실 및 안구진탕증을 동반한다. LCA의 예들이 전형적으로 상염색체 열성 장애로서 유전성이긴 하지만, 여러 가지 유전적 유전자좌에서의 돌연변이들이 관여되어 왔다. 예를 들어, 표 3은 LCA 형태들에 관여하는 유전자좌들 중 일부를 열거하고 있다.

## 표 3

LCA 질병 유전자좌.

LCA의 유형	돌연변이화된 유전자	인간에서 유전자 좌
LCA1	<i>GUCLY2D</i>	17p13.1
LCA2	<i>RPE65</i>	1p31
LCA3	<i>SPATA7</i>	14q31.3
LCA4	<i>AIP1</i>	17p13.1
LCA5	<i>LCA5</i>	6q14.1
LCA6	<i>RPGRIPI</i>	14q11
LCA7	<i>CRX</i>	19q13.3
LCA8	<i>CRB1</i>	1q31-32
LCA9	<i>NMNAT1</i>	1p36
LCA10	<i>CEP290</i>	12q21
LCA11	<i>IMPDH1</i>	7q31.3-q32
LCA12	<i>RD3</i>	1q32.3
LCA13	<i>RDH12</i>	14q24.1
LCA14	<i>LRAT</i>	4q31
LCA15	<i>TULP1</i>	6p21.3
LCA16	<i>KCNJ13</i>	4q31
LCA17	<i>GDF6</i>	8q22
LCA18	<i>PRPH2</i>	6p21

[0214]

가장 흔한 유형의 LCA는 *CEP290*에서의 돌연변이에 의해 유발되며, *CEP290*은 중심체 및 섬모 발달에 중요한 역할을 하는 중심체 단백질을 인코딩한다(예를 들어, 예시적인 인간 유전자 및 단백질 서열에 대해 각각 NCBI 유전자 ID No. 80184 및 UniProt ID No. 015078 참조). *CEP290*은 신체의 망막 뒤쪽, 및 신장, 뇌 및 많은 다른 기관들의 광수용체에서 중요한 역할을 하는 세포막 상의 1차 섬모의 형성에 필수적이다. *CEP290*은 또한, *MKS4*, *CT87*, *POC3*, *rd16*, *BBS14*, *LCA10*, *JBTS5*, *NPHP6*, *SLSN6* 및 *3H11Ag*로도 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 원인이 되는 돌연변이는, 크립틱 스플라이스 공여체 부위를 도입하여 미성숙 정지 코돈을 가진 비정상 엑손을 포함시키는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA 가이드 서열은 중심체 단백질 290 kDa(*CEP290*) 유전자의 심부 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 소정의 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이는 c.2991+1655A>G 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, *CEP290*은 인간 *CEP290*이다(예를 들어, NCBI 참조 서열 NG\_008417에 따른 인간 *CEP290* 서열을 참조함). 일부 실시형태에서, *CEP290*은 SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이를 포함한다.

[0216]

본 개시내용의 소정의 양태들은 추가로, 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병의 시험관내 모델의 생성 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 전해 세포에 도입하는 단계; 및 유전자 내에 혼입된 돌연변이를 포함하는 세포를 단리하는 단계를 포함하며, 여기서, CRISPR-Cas 시스템은 i) 유전자 내 인트론의 표적 DNA 서열에 대한 단일 가이드 RNA, ii) Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, iii) 요망되는 인트론 돌연변이 및 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)의 측면에 존재하는 상동성 아암을 포함하는 상동성 인도 복구(HDR) 주형을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 전략과 관련된 예시적인 방법은 하기 실시예에 예시되어 있다. 상기 기재된 바와 같이, CRISPR-Cas-매개 DNA 절단은 예를 들어 표적 DNA 서열의 절제를 초래하는, NHEJ에 의해 복구될 수 있다. 그러나, CRISPR-Cas-매개 DNA 절단은 또한, 예를 들어 HDR 주형에 존재하는 서열의 도입(예를 들어, 도입된 심부 인트론 돌연변이)을 초래하는, 상동성 인도 복구(HDR)에 의해 복구될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308]을 참조한다. 이를 방법은 치료 방법, 바이러스 입자, 조성물 및 키트와 관련하여 본원에 기재된 임의의 특징, 양태 또는 요소들을 포함할 수 있다.

[0217]

상동성 인도 복구(HDR) 주형은 여러 가지 형태들, 예컨대 이중 가닥 DNA 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드(ssODN)를 취할 수 있다. HDR 주형은 요망되는 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 하나 이상의 상동성 아암을 포함할 수 있다. 이를 상동성 아암은 표적 유전자좌에 대하여 센스 방향 또는 안티센스 방

향으로 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 상동성 아암은 표적 유전자좌로부터 적어도 약 40개 염기쌍, 적어도 약 50개 염기쌍, 적어도 약 60개 염기쌍, 적어도 약 70개 염기쌍, 적어도 약 80개 염기쌍, 적어도 약 90개 염기쌍 또는 적어도 약 100개 염기쌍만큼 떨어져서 존재할 수 있다.

[0218] HDR 주형은 또한, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, PAM은 세포 내에서 발현된 Cas 단백질에 의한 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 절단을 피하기 위해 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, PAM은, 발현된 특정한 Cas 단백질이 HDR 주형을 절단하지 않도록 돌연변이화될 수 있거나, 확인 서열(예를 들어, 하기 실시예에 예시된 바와 같이 독특한 제한효소 부위)이 유전체 유전자와의 CRISPR-Cas-매개 편집 시도입되도록 돌연변이화될 수 있다.

[0219] 임의의 적합한 진핵 세포가 시험관내 모델에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 포유류 또는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 세포주, 예컨대 인간 세포주(예를 들어, HeLa, A549, 293 등), 포유류 세포주, 척추동물 세포주 또는 곤충 세포주(예를 들어, Sf9 또는 S2)이다. 일부 실시형태에서, 진핵 세포는 망막 세포(예를 들어, WERI 세포), 예컨대 광수용체 세포이다.

## V. 전달 방법

[0221] 본 개시내용의 소정의 양태들은 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 개시내용의 조성물, 예를 들어 본 개시내용의 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 유전자 내 심부 인트론 돌연변이와 연관된 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 단백질로서 전달된다.

### 벡터

[0223] 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 시스템의 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에 위치한다. 일부 실시형태에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 구동하는 하나 이상의 벡터는, CRISPR 시스템의 요소의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 인도하도록 세포 내에 도입된다. 예를 들어, Cas 효소, tracr 메이트 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열은 각각, 별도의 벡터 상의 별도의 조절 요소에 작동적으로 연결될 수 있다. 대안적으로, 상기 기재된 2개 이상의 요소들은 동일하거나 상이한 조절 요소들로부터 발현될 수 있고/거나 선택적으로 제1 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 구성성분을 제공하는 하나 이상의 부가적인 벡터와 함께 단일 벡터 내에서 조합될 수 있다. 벡터 내에서 조합되는 CRISPR 시스템 요소는 임의의 적합한 배향으로 배열될 수 있다. 예를 들어, 1개의 요소의 코딩 서열은 제2 요소의 코딩 서열과 동일한 가닥 또는 반대 가닥 상에 위치할 수 있고/거나 동일한 방향 또는 반대 방향으로 배향될 수 있다.

[0224] 일부 실시형태에서, 단일 프로모터는 하나 이상의 인트론 서열 내에 포매된 Cas 단백질을 인코딩하는 전사체 및 하나 이상의 가이드 서열, tracr 메이트 서열(선택적으로 가이드 서열에 작동적으로 연결됨) 및 tracr 서열의 발현을 구동한다(예를 들어 상이한 인트론 내에서 각각, 적어도 하나의 인트론 내에서 2개 이상, 또는 단일 인트론 내에서 모두). 일부 실시형태에서, Cas 단백질, 가이드 서열, tracr 메이트 서열 및 tracr 서열은 동일한 프로모터에 작동적으로 연결되어 있고 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 조절 제어 요소 및/또는 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다.

[0225] 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드이다.

[0226] 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 진핵 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 진핵 세포에서 발현될 수 있도록 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 진핵 세포에서 발현되는 여러 가지 프로모터들은 당업계에 공지되어 있다. 예시적인 프로모터는 하기에 비제한적으로 제공되어 있다.

[0227] 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. RNA 중합효소 III 프로모터는 RNA 중합효소 III에 의한 전사를 구동하기에 충분한 전장 프로모터 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. RNA 중합효소 III 프로모터 유형, 구조적 특징 및 RNA 중합효소 III와의 상호작용, 뿐만 아니라 적합한 RNA 중합효소 III 프로모터의 보다 상세한 설명에 대해서는, 문헌[Schramm, L. and Hernandez, N. (2002) *Gene Dev.* 16:2593-620]을 참조한다. 비제한적으로 tRNA, 5S RNA, U6 snRNA, H1, 7SK, RNase P, 신호 인지 입자의 RNA 구성성분 및 snoRNA에 대한 프로모터를 포함하여 당업계에 공지된 임의의

적합한 RNA 중합효소 III 프로모터가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ma, H. et al. (2014) *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3:e161] 참조). 일부 실시형태에서, RNA 중합효소 III 프로모터는 U6, H1 또는 7SK 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA 및/또는 제2 가이드 RNA는 RNA 중합효소 III 종결자에 작동적으로 연결되어 있다. RNA 중합효소 III 종결자의 예로는 비제한적으로, 길이가 적어도 5개 내지 6개 염기인 우리딘 뉴클레오티드의 스트링 등이 있을 수 있다(RNA 중합효소 III 종결자에 대한 더 많은 정보에 대해서는 문헌[Marck, C., et al. (2006) *Nucleic Acids Res* 34(6):1816-35] 참조).

[0228]

일부 실시형태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 RNA 중합효소 II 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. RNA 중합효소 II 프로모터는 RNA 중합효소 II의 전사를 구동하기에 충분한 전장 프로모터 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 비제한적으로, 사이토메갈로바이러스(CMV) 최초기 프로모터, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hTERT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로메라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG 프로모터; 문헌[Niwa et al., 유전자, 1991, 108(2):193-9] 및 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터(문헌[Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23] 및 [Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10])를 포함하여 당업계에 공지된 임의의 적합한 RNA 중합효소 II 프로모터가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간  $\beta$ -글루쿠로니다제 프로모터, 또는 닭  $\beta$ -액틴(CBA) 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함한다. 프로모터는 항시성, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 눈의 세포에서 이종성 핵산을 발현시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 광수용체 세포 또는 RPE에서 이종성 핵산을 발현시킬 수 있다. 실시형태에서, 프로모터는 로돕신 키나제(RK) 프로모터; 예를 들어, 인간 RK 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 옵신 프로모터; 예를 들어, 인간 옵신 프로모터 또는 마우스 옵신 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 간상체 옵신 프로모터, 추상체 옵신 프로모터, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 색소성 망막염(RP1) 프로모터 또는 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 유전자(IRBP) 프로모터이다.

[0229]

유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능케 하며, 외인적으로 공급된 화합물, 환경 요인, 예를 들어, 온도, 또는 특정 생리학적 상태의 존재, 예를 들어, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제하는 세포에서만 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 상업적 공급처로부터 이용 가능하다. 많은 다른 시스템이 기재되어 있으며, 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인적으로 공급된 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex)-유도성 마우스 유암 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088); 탈피호르몬 곤충 프로모터(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), 테트라사이클린-억제성 시스템(Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), 테트라사이클린-유도성 시스템(Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995), 또한 Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998) 참조), RU486-유도성 시스템(Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) 및 Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) 및 라파마이신-유도성 시스템(Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))을 포함한다. 이러한 상황에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터의 또 다른 유형은 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의하거나, 복제하는 세포에서만 조절되는 유도성 프로모터이다.

[0230]

또 다른 실시형태에서, 트랜스진에 대해 천연 프로모터, 또는 이의 단편이 이용될 것이다. 천연 프로모터는 트랜스진의 발현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요망되는 경우에 이용될 수 있다. 천연 프로모터는 트랜스진의 발현이 시간적 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 이용될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 다른 천연 발현 조절 요소, 예를 들어, 인핸서 요소, 아데닐중합체형성 부위 또는 코작(Kozak) 컨센서스(consensus) 서열이 또한 천연 발현을 모방하기 위해 이용될 수 있다.

[0231]

일부 실시형태에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에서, 조직-특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 결합한다. 이러한 조직-특이적 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등)은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예시적인 조직-특이적 조절 서열은 다음과 같은 조직 특이적 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 신경세포, 예를 들어, 신경세포-특이적 애놀라제(NSE) 프로모터(Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경미세섬유 경쇄 유전

자 프로모터(Piccioli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), 및 신경세포-특이적 vgf 유전자 프로모터(Piccioli *et al.*, *Neuron*, 15:373-84 (1995)). 일부 실시형태에서, 조직-특이적 프로모터는 신경세포 핵(NeuN), 아교 섬유 산성 단백질(GFAP), 선종성 결장폴립증(APC), 및 이온화 칼슘-결합 어댑터 분자 1(Iba-1)로부터 선택된 유전자의 프로모터이다. 다른 적절한 조직 특이적 프로모터는 당업자에게 명백할 것이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 닫 베타-액틴 프로모터이다.

[0232] 본 발명은 바이러스 입자, 예를 들어 하기 기재된 바이러스 입자 내로의 패키징을 위한 하나 이상의 핵산 서열(예를 들어, 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열)의 도입을 위한 재조합 바이러스 유전체의 용도를 고려한다. 재조합 바이러스 유전체는 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 구축하기 위한 임의의 요소, 예를 들어, 프로모터, ITR, 리보솜 결합 요소, 종결자, 인핸서, 선별 마커, 인트론, polyA 신호 및/또는 복제 기원을 포함할 수 있다. 광범위한 바이러스 입자들에 대한 예시적인 바이러스 유전체 요소 및 전달 방법은 하기에 보다 상세히 기재되어 있다.

#### 비-바이러스 전달 시스템

[0234] 종래의 비-바이러스 유전자 트랜스퍼 방법 또한, 핵산을 세포 또는 표적 조직 내에 도입하는 데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은, 전달 시스템과 복합체를 형성한 DNA 플라스미드, RNA(예를 들어, 가이드 RNA 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열), 네이키드(naked) 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA) 및 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA)을 포함한다. 예를 들어, 벡터는 핵산의 세포내 흡수를 증강시키는 지질(예를 들어, 양이온성 또는 중성 지질), 리포솜, 다가양이온, 나노입자 또는 제제와 복합체를 형성할 수 있다. 벡터는 본원에 기재된 임의의 전달 방법에 적합한 제제와 복합체를 형성할 수 있다.

[0235] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 리포펙션, 뉴클레오펙션, 마이크로인젝션, 바이올리스틱스(biolistics), 나노입자(예를 들어, 문헌[Jin, S. *et al.* (2009) *Methods Mol. Biol.* 544:547-557] 참조), 비로솜(virosome), 리포솜, 면역리포솜, 다가양이온 또는 지질:핵산 컨쥬게이트, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 흡수 증강 제제를 포함한다. 리포펙션은 예를 들어 미국 특허 5,049,386, 4,946,787 및 4,897,355에 기재되어 있고, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매되고 있다(예를 들어, Lipofectamine®, Transfectam™ 및 Lipofectin™). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인지 리포펙션에 적합한 양이온성 지질 및 중성 지질은 Felgner, WO 91/17424; WO 91/16024의 것들을 포함한다.

[0236] 표적화된 리포솜을 포함하는 지질:핵산 복합체, 예컨대 면역지질 복합체의 제조는 당업자에게 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Crystal, *Science* 270:404-410 (1995)]; [Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995)]; [Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994)]; [Remy *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994)]; [Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2:710-722 (1995)]; [Ahmad *et al.*, *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992)]; 미국 특허 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 및 4,946,787 참조).

[0237] 본 개시내용의 벡터와 복합체를 형성할 수 있는 다른 화합물은 비제한적으로 양이온성 펩타이드(예를 들어, 폴리-L-라이신), 염(예를 들어, 칼슘 포스페이트), DEAE 텍스트란, 텐드리머(예를 들어, 폴리아미도아민 또는 PAMAM), 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민(PEI) 및 이들의 컨쥬게이트 등을 포함한다. 이러한 제제의 보다 상세한 고찰에 대해서는 예를 들어, 문헌[Luo, D. and Saltzman, W.M. (2000) *Nature Biotechnology* 18:33-37]을 참조한다.

[0238] 일부 실시형태에서, 핵산은 약제학적 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 제형은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 이러한 담체는 당업계에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 핵산 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 인도 주사에 적합하다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 미네랄 오일 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들일 수 있다. 식염수 및 수성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액 또한, 특히 주사용 액체 담체로서 이용될 수 있다. 약제학적 조성물은 부가적인 성분, 예를 들어 방부제, 완충제, 등장성 제제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤 또는 정화 제제, 점도-증가 제제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 약제학적 조성물은 단일 단위 용량 또는 다용량 형태로 패키징될 수 있다. 조성물은 일반적으로, 멸균되고 실질적으로 등장성인 용액으로서 제형화된다.

#### 바이러스 입자

- [0240] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 재조합 단순포진 바이러스(HSV) 벡터이다.
- [0241] rAAV 입자
- [0242] 일부 실시형태에서, 벡터는 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 AAV 역방위 말단 반복(ITR) 서열의 측면에 존재한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 1개 또는 2개의 ITR의 측면에 존재하는 트랜스진을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV 입자이다. 일부 실시형태에서, 제1 가이드 RNA, 제2 가이드 RNA 또는 Cas 단백질 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산은 2개의 AAV ITR의 측면에 존재한다.
- [0243] 일부 실시형태에서, 핵산은 전사 방향으로 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 구성성분, 전사 개시 및 종결 서열을 포함한 적어 서열을 포함하여, 별현 카세트를 형성한다. 별현 카세트는 적어도 하나의 기능성 AAV ITR 서열에 의해 5' 말단 및 3' 말단의 측면에 존재한다. "기능성 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 구체, 복제 및 폐기징에 대해 의도된 바와 같이 기능하는 것을 의미한다. 모든 전체내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된 문헌 [Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; 및 Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16]을 참조한다. 본 발명의 일부 양태의 실시를 위해, 재조합 벡터는 적어도 캡시드화 및 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조에 필수적인 AAV의 서열 모두를 포함한다. 본 발명의 벡터에서 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열을 가질 필요는 없고(예를 들어, 문헌[Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801]에 기재된 바와 같음), 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 유래될 수 있다. AAV의 40개 초과의 혈청형이 현재 공지되어 있으며, 새로운 혈청형 및 혼존하는 혈청형의 변이체가 지속적으로 확인되고 있다. 문헌[Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; 및 Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810]을 참조한다.
- [0244] 임의의 AAV 혈청형의 용도가 본 발명의 범위 내로 간주된다. 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터이며, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV ITR 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, AAV 내 핵산은 ITR을 포함하며, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV 또는 마우스 AAV 등이다. 소정의 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다.
- [0245] 일부 실시형태에서, 벡터는 스터퍼 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질을 인코딩할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 프로모터와, 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상 사이에 위치할 수 있다.
- [0246] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가-상보적 유전체를 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자가-상보적 벡터이다. 자가-상보적 유전체를 포함하는 AAV 바이러스 입자, 및 자가-상보적 AAV 유전체의 사용 방법은 미국 특허 6,596,535; 7,125,717; 7,765,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 및 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있으며, 이들은 각각 그 전체가 원용에 의해 본 명에서에 포함된다. 자가-상보적 유전체를 포함하는 rAAV는 이의 부분적인 상보적 서열(예를 들어, 트랜스진의 상보적 코딩 및 비-코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 AAV 유전체를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공하며, 여기서, rAAV 유전체는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열) 및 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 비코딩 또는 안티센스 가닥)을 포함하고, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 이의 길이의 대부분 또는 전체를 따라 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다.
- [0247] 일부 실시형태에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 가닥내 염기쌍 형성을 촉진하는 서열; 예를 들어 헤어핀 DNA 구조에 의해 연결된다. 헤어핀 구조는 예를 들어 siRNA 분자에서 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이화된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 돌연변이화된 ITR은 말단 분해(resolution) 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 그 결과, AAV 바이러스 유전체의 복제 시, rep 단백

짙은 돌연변이화된 ITR에서 바이러스 유전체를 절단하지 않을 것이며, 이와 같이 AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이화된 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드에 대해 리버스 배향으로 존재하는 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR를 5'으로부터 3' 방향으로 포함하는 재조합 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다.

[0248] 일부 실시형태에서, 제1 이종성 핵산 서열 및 제2 이종성 핵산 서열은 돌연변이화된 ITR(예를 들어, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CACTCCCTCTCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCACGCCGGGCTTGCCCGGGCG - 3'(SEQ ID NO:24)를 포함한다. 돌연변이화된 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 그 결과, AAV 바이러스 유전체의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이화된 ITR에서 바이러스 유전체를 절단하지 않을 것이며, 이와 같이 AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이화된 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오티드에 대해 리버스 배향으로 존재하는 제2 이종성 폴리뉴클레오티드 및 제3 AAV ITR를 5'으로부터 3' 방향으로 포함하는 재조합 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다.

[0249] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화시키거나, 특정 표적 조직(예를 들어, CNS(안구) 조직) 내의 특정 세포 유형을 표적화하기 위해 상이한 AAV 혈청형들이 사용된다. rAAV 입자는 동일한 혈청형 또는 혼합된 혈청형의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 본 발명의 AAV2 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV2 ITR을 포함할 수 있거나, rAAV 입자는 AAV2 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV1 ITR을 포함할 수 있다. rAAV 입자의 생성을 위한 AAV 혈청형의 임의의 조합은 각각의 조합이 명백히 본원에 언급된 것처럼 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 AAV2 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 AAVrh8R 캡시드를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다.

[0250] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 변이체 AAV6 캡시드, 예컨대 U.S. PG Pub. 2012/0164106에 기재된 바와 같은 ShH10), AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAVrh8R 캡시드, AAV9 캡시드(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드 또는 U.S. PG Pub. 2013/0323226에 기재된 바와 같은 변형된 AAV9 캡시드), AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤어핀 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 U.S. PG Pub. 2012/0066783에 기재된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 미국 특허 8,283,151 또는 국제 공개 WO/2003/042397에 기재된 AAV 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 캡시드 단백질은 AAV 캡시드 형성 능력을 유지한다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV5 티로신 돌연변이체 캡시드를 포함한다(Zhong L. et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832). 추가의 실시형태에서, rAAV 입자는 클레이드 A 내지 F 유래의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다(Gao, et al., *J. Virol.* 2004, 78(12):6381). 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV1 캡시드 단백질 또는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV2 캡시드 단백질 또는 이의 돌연변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 또는 AAVrh10이다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV 혈청형 1(AAV1) 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV 혈청형 2(AAV2) 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 AAV 바이러스 입자는 AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV1, AAV2, AAV8, AAVrh8R, AAV9 및/또는 AAVrh10 캡시드는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 티로신 돌연변이 또는 혼파란 결합 돌연변이를 포함한다.

[0251] AAV(예를 들어, AAV2, AAVrh8R 등)의 캡시드는 3개의 캡시드 단백질 VP1, VP2, 및 VP3을 포함하는 것으로 공지되어 있다. 이를 단백질은 유의한 양의 중첩 아미노산 서열 및 독특한 N-말단 서열을 함유한다. AAV2 캡시드는 정20면체 대칭에 의해 배열된 60개의 서브유닛을 포함한다(Xie, Q., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(16):10405-10). VP1, VP2, 및 VP3은 1:1:10 비로 존재하는 것으로 밝혀졌다.

[0252] AAV2 캡시드 단백질과 HSPG 사이의 결합은 염기성 AAV2 캡시드 단백질 잔기와 음성으로 하전된 글리코사미노글리칸 잔기 사이의 정전기적 상호작용을 통해 발생하는 것으로 공지되어 있다(Opie, SR et al., (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A et al., (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081). 이를 상호작용과 관련된 특정 캡시드 잔기는 R484, R487, K532, R585, 및 R588을 포함한다. 이를 잔기에서의 돌연변이는 Hela 세포 및 혼파란 자

체로의 AAV2 결합을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(Opie, SR et al., (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A et al., (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081; WO 2004/027019 A2, 미국 특허 7,629,322). 추가로, 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, AAV2의 VP1 네모링을 기초로 하여 네모링되는 아미노산 484, 487, 532, 585 또는 588에 해당하는 잔기 중 하나 이상에서의 아미노산 치환(들)이 HSPG에 결합하지 않는 AAV 캡시드 유형의 형질도 입 특성을 조정할 수 있거나, HSPG에 결합하는 이들의 능력과 독립적으로 AAV 캡시드 유형의 형질도입 특성을 조정할 수 있는 것으로 생각된다.

[0253] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 HSPG와 상호작용하는 잔기에서, 또는 AAV2의 VP1 네모링을 기초로 하여 네모링된 아미노산 484, 487, 532, 585 또는 588에 상응하는 하나 이상의 잔기에서, 캡시드 단백질에 돌연변이를 갖는다. 이에, 일부 실시형태에서, 전달 시, rAAV 벡터에 의해 인코딩된 이종성 핵산은 참조 rAAV 캡시드 단백질(예를 들어, 야생형 rAAV 캡시드 단백질)을 포함하는 rAAV 캡시드를 포함하는 rAAV 입자의 이종성 핵산의 발현 수준에 의해 증가된 발현 수준으로 발현된다. 일부 실시형태에서, 핵산의 발현은 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 100%만큼 증가된다. 일부 실시형태에서, 전달 시, rAAV 입자는 참조 rAAV 캡시드 단백질(예를 들어, 야생형 rAAV 캡시드 단백질)을 포함하는 rAAV 입자에 의해 감소된 신경염증을 야기시킨다. 일부 실시형태에서, 신경염증은 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 100%만큼 감소된다. 적합한 참조 rAAV 캡시드 단백질은 혈관 세포에 대한 결합을 포함할 수 있다(따라서, 참조 캡시드는 HSPG에 대한 결합을 변경시키지 않는 하나 이상의 "백그라운드" 치환을 함유할 수 있다).

[0254] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 a) 혈관 세포에 대한 결합을 포함하는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 rAAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 캡시드, 및 b) 이종성 핵산 및 적어도 하나의 AAV 역방위 말단 반복을 포함하는 rAAV 벡터를 포함한다.

[0255] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100%만큼 감소(야생형 캡시드를 포함하는 rAAV 입자의 결합에 비함)시킨다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 약 10% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 100%, 약 40% 내지 약 100%, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 90%, 약 30% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 90%, 약 10% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 80%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 80%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 80%, 약 90% 내지 약 80%, 약 10% 내지 약 70%, 약 20% 내지 약 70%, 약 30% 내지 약 70%, 약 40% 내지 약 70%, 약 50% 내지 약 70%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 70%, 약 80% 내지 약 70%, 약 90% 내지 약 70%, 약 10% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 60%, 약 40% 내지 약 60%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 60%, 약 70% 내지 약 60%, 약 80% 내지 약 60%, 약 90% 내지 약 60%, 또는 약 10% 내지 약 20% 중 어느 하나까지 감소(야생형 캡시드를 포함하는 rAAV 입자의 결합에 비함)시킨다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 야생형 rAAV 입자의 결합에 의해 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 가능하게 하는 위치에 대한 결합을 발생시키지 않는다. HSPG에 대한 AAV 입자의 결합, 예를 들어, 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 측정하는 수단은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Opie, SR et al., (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006 및 Kern, A et al., (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081]을 참조한다.

[0256] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 혈관 세포에 대한 rAAV 입자의 결합을 감소시키거나 제거하는 캡시드 단백질의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고/거나, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAV2의 VP1 네모링을 기초로 하여 네모링되는 위치 484, 487, 532, 585 또는 588에 존재한다. 본원에 사용된 바와 같이, "AAV2의 VP1을 기초로 하여 네모링"은 AAV2의 VP1의 언급된 아미노산에 상응하는 언급된 캡시드 단백질의 아미노산을 지칭한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAV2의 VP1을 기초로 하여 네모링되는 위치 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 및/또는 588에 존재하는 경우, 하나 이상의 아미노산 치환

은 AAV2의 VP1의 아미노산 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 및/또는 588에 상응하는 언급된 캡시드 단백질의 아미노산(들)에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAV2의 VP1의 위치 484, 487, 532, 585 또는 588에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAV2의 VP1을 기초로 하여 넘버링되는, AAV3의 VP1의 위치 484, 487, 532, 585 또는 588에 존재한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAVrh8R의 VP1 넘버링을 기초로 하여 넘버링되는 위치 485, 488, 528, 533, 586 또는 589에 존재한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 585 및/또는 588(AAV2의 VP1을 기초로 하여 넘버링됨)에 상응하는 위치(들)에서의 하나 이상의 아미노산은 아르기닌 잔기에 의해 대체된다(예를 들어, AAV1 또는 AAV6에 대해 S586 및/또는 T589; AAV9에 대해 S586 및/또는 A589; AAVrh8R에 대해 A586 및/또는 T589; AAV8에 대해 Q588 및/또는 T591; 및 AAVrh10에 대해 Q588 및/또는 A591). 다른 실시형태에서, 아미노산 484, 487, 527 및/또는 532(AAV2의 VP1을 기초로 하여 넘버링됨)에 상응하는 위치(들)에서의 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 아르기닌 또는 리신)은 알라닌과 같은 양성으로 하전되지 않은 아미노산(들)에 의해 대체된다(예를 들어, AAV1 또는 AAV6에 대해 R485, R488, K528, 및/또는 K533; AAV9 또는 AAVrh8R에 대해 R485, R488, K528, 및/또는 R533; 및 AAV8 또는 AAVrh10에 대해 R487, R490, K530, 및/또는 R535).

#### [0257] 다른 바이러스 입자

[0258] 일부 실시형태에서, 백터는 재조합 아데노바이러스 백터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 입자, 예를 들어, 2개의 ITR 사이에 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 백터이다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 입자는 하나 이상의 E1 유전자의 결함성(defective) 카피를 갖지 않거나 함유하며, 이는 아데노바이러스 복제-결함성으로 만든다. 아데노바이러스는 큰(약 950Å), 비-피복된 정20면체 캡시드 내에 선형의 이중 가닥 DNA 유전체를 포함한다. 아데노바이러스는 30 kb 초파의 이종성 서열을 (예를 들어, E1 및/또는 E3 영역 대신에) 혼입할 수 있는 큰 유전체를 가져서, 이들을 더 큰 이종성 유전자와 함께 사용되도록 독특하게 만든다. 이들 아데노바이러스는 또한, 분열 세포 및 비-분열 세포를 감염시키는 것으로 공지되어 있고, 숙주 유전체 내에 자연적으로 통합되지 않는다(하이브리드 변이체가 이러한 능력을 가질 수 있더라도). 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 백터는 E1 대신에 이종성 서열을 가진 제1 세대 아데노바이러스 백터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 백터는 E2A, E2B 및/또는 E4에 부가적인 돌연변이 또는 결실을 가진 제2 세대 아데노바이러스 백터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 백터는 모든 바이러스 코딩 유전자들이 결여되고 ITR 및 패키징 신호만 보유하고 복제 및 패키징을 위해 인 트랜스(*in trans*) 헬퍼 아데노바이러스를 필요로 하는 제3 세대 또는 거티드(gutted) 아데노바이러스 백터일 수 있다. 아데노바이러스 입자는 포유류 세포의 일시적인 형질감염용 백터뿐만 아니라 유전자 요법용 백터로서 사용되도록 조사되어 왔다. 추가의 설명에 대해서는, 예를 들어 문헌[Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14] 및 [Tatsis, N. and Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29]를 참조한다.

[0259] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 임의의 아데노바이러스 혈청형의 용도는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 백터는 비제한적으로, 아데노바이러스 혈청형 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3을 포함한 아데노바이러스 혈청형 유래의 백터이다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 백터는 아데노바이러스 혈청형 2, 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 변이체로부터 유래된다.

[0260] 일부 실시형태에서, 백터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 아데노바이러스 백터를 캡시드화하는 재조합 아데노바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 바이러스 입자는 아데노바이러스 입자를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 위형화된 재조합 아데노바이러스 입자로서 지정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 위형화된 재조합 아데노바이러스 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스 또는 또 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 비제한적으로 레오바이러스 유형 3으로부터 유래된다. 위형화된 아데노바이러스 입자에 사용되는 백터 및 캡시드 단백질 조합의 예는 하기 참조에서 찾을 수 있다(문헌[Tatsis, N. et al. (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629] 및 [Ahi, Y. et al. (2011) *Curr. Gene*

*Ther.* 11(4):307-320]). 상이한 아데노바이러스 혈청형들이 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병에 걸린 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 특정한 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화되는 조직 또는 세포는 비제한적으로, 폐(예를 들어 HuAd3), 비장 및 간(예를 들어 HuAd37), 평활근, 활막세포, 수지상세포, 심혈관 세포, 종양 세포주(예를 들어 HuAd11) 및 수지상세포(예를 들어 레오바이러스 유형 3과 위형화된 HuAd5, HuAd30 또는 HuAd35)를 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌 [Ahi, Y. et al. (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320], [Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40] 및 [Tatsis, N. et al. (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629]를 참조한다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 비제한적으로 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 유형 3, 개 Ad 유형 2, 양 Ad 또는 돼지 Ad 유형 3을 포함한 아데노바이러스 혈청형 유래의 캡시드를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 2 캡시드, 또는 아데노바이러스 혈청형 5 캡시드의 변이체를 포함한다.

[0261]

일부 실시형태에서, 백터는 재조합 렌티바이러스 백터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 입자, 예를 들어, 2개의 LRT 사이에 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 백터이다. 렌티바이러스는 유전체 크기가 대략 10 kb인 양성-센스 ssRNA 레트로바이러스이다. 렌티바이러스는 분열 세포 및 비-분열 세포의 유전체 내로 통합되는 것으로 공지되어 있다. 렌티바이러스 입자는 예를 들어, 다수의 플라스미드들(전형적으로, 렌티바이러스 유전체 및 복제 및/또는 패키징에 필요한 유전자는 바이러스 복제를 방지하기 위해 분리됨)을 패키징 세포주에 감염시킴으로써 생성될 수 있으며, 이러한 패키징 세포주는 변형된 렌티바이러스 유전체를 렌티바이러스 입자 내로 패키징한다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 입자는 외피 단백질이 결여된 제1 세대 백터를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 입자는 gag/pol 및 tat/rev 영역을 제외한 모든 유전자들이 결여된 제2 세대 백터를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 입자는 오로지 내인성 rev, gag 및 pol 유전자만 함유하고 tat 유전자 없이 형질도입을 위한 키메라 LTR을 가진 제3 세대 백터를 지칭할 수 있다(문헌 [Du11, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 추가의 설명에 대해서는, 문헌 [Durand, S. and Cimarelli, A. (2011) 바이러스 3:132-59]를 참조한다.

[0262]

일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 임의의 렌티바이러스 백터의 용도는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 백터는 비제한적으로, 인간 면역결핍 바이러스-1(HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스-2(HIV-2), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 젬브라나(Jembrana) 질병 바이러스(JDV), 비스나 바이러스(VV) 및 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)를 포함한 렌티바이러스로부터 유래된다.

[0263]

일부 실시형태에서, 백터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 렌티바이러스 백터를 캡시드화하는 재조합 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 바이러스 입자는 렌티바이러스 백터를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자로서 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 유비퀴터스(ubiquitous) 세포 수용체와 상호작용하여, 광범위한 조직 향성을 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자에 제공한다. 또한, VSV-GP는 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 생각된다. 다른 실시형태에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 비제한적으로, 칸디푸라(Chandipura) 바이러스, 광견병 바이러스, 모콜라(Mokola) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 신드비스(Sindbis) 바이러스, 셈리키 삼림열 바이러스(SFV; Semliki Forest virus), 베네수엘라 말 뇌척수염 바이러스, 에볼라 바이러스 레스틴, 에볼라 바이러스 자이르, 마르부르그 바이러스, 라사(Lassa) 바이러스, 닭 백혈병 바이러스(ALV; Avian leukosis virus), 야그지크테 양 레트로바이러스(JSRV; Jaagsiekte sheep retrovirus), 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(MLV; Moloney Murine leukemia virus), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GALV; Gibbon ape leukemia virus), 고양이 내인성 레트로바이러스(RD114), 인간 T-림프친화성 바이러스 1(HTLV-1), 인간 거품형성 바이러스, 매디-비스나 바이러스(MVV), SARS-CoV, 센다이(Sendai) 바이러스, 호흡기

세포융합 바이러스(RSV; Respiratory syncytia virus), 인간 파라인플루엔자 바이러스 유형 3, C형 간염 바이러스(HCV), 인플루엔자 바이러스, 가금 역병 바이러스(FPV; Fowl plague virus) 또는 오토그라파 칼리포니카 다중 핵 다각체병 바이러스(AcMNPV; *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus) 등으로부터 유래된다.

[0264]

일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 렌티바이러스로부터 유래된다. 위형화된 렌티바이러스 입자에 사용되는 벡터와 캡시드 단백질 조합의 예는 예를 들어, 문헌[Cronin, J. et al. (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398]에서 찾을 수 있다. 상이한 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자들이 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병에 걸린 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정한 위형화된 재조합 렌티바이러스 입자에 의해 표적화된 조직은 비제한적으로, 간(예를 들어 VSV-G, LCMV, RRV 또는 SeV F 단백질과 위형화됨), 폐(예를 들어 에볼라, 마르부르그, SeV F 및 HN 또는 JSRV 단백질과 위형화됨), 췌장 소도 세포(예를 들어 LCMV 단백질과 위형화됨), 중추신경계(예를 들어 VSV-G, LCMV, 광견병 또는 모콜라 단백질과 위형화됨), 망막(예를 들어 VSV-G 또는 모콜라 단백질과 위형화됨), 단핵구 또는 근육(예를 들어 모콜라 또는 에볼라 단백질과 위형화됨), 조혈계(예를 들어 RD114 또는 GALV 단백질과 위형화됨) 또는 암세포(예를 들어 GALV 또는 LCMV 단백질과 위형화됨)를 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Cronin, J. et al. (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398] 및 [Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114 또는 이들의 변이체와 위형화된 캡시드를 포함한다.

[0265]

일부 실시형태에서, 벡터는 rHSV 벡터이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 단순포진 바이러스(HSV) 입자이다. 일부 실시형태에서, HSV 입자는 예를 들어, 2개의 TR 사이에 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 포함하는 rHSV 입자이다. HSV는 유전체 크기가 대략 152 kb이며 외피를 가진 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 유리하게는, 이의 유전자 중 대략 1/2은 비필수적이고, 이종성 서열을 수용하기 위해 결실될 수 있다. HSV 입자는 비-분열 세포를 감염시킨다. 또한, 이러한 HSV 입자들은 자연적으로 신경세포에서 잠복기를 구축하며, 후방 수송에 의해 이동하고, 시냅스를 가로질러 트랜스페릴 수 있어서, 신경세포의 형질감염 및/또는 신경계를 수반한 유전자 요법 접근법에 유리하게 될 수 있다. 일부 실시형태에서, HSV 입자는 복제-결합성 또는 복제-적임성(competent)일 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 후기(late) 유전자의 비활성화를 통해 단일 복제 주기에 적임임). 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. et al. (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56]을 참조한다.

[0266]

일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 본 개시내용의 1개 또는 2개의 가이드 RNA 및/또는 본 개시내용의 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 rHSV 입자이다. 임의의 HSV 벡터의 용도는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, HSV 벡터는 비제한적으로, HSV-1 및 HSV-2를 포함한 HSV 혈청형으로부터 유래된다.

[0267]

일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 HSV 벡터를 캡시드화하는 재조합 HSV 입자이다. 일부 실시형태에서, 재조합 바이러스 입자는 HSV 벡터를 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질과 조합하여 포함한다. 이러한 조합은 위형화된 rHSV 입자로서 지정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 위형화된 rHSV 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 또는 또 다른 HSV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 위형화된 rHSV 입자에 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 유비쿼터스 세포 수용체와 상호작용하여, 광범위한 조직 향성을 위형화된 rHSV 입자에 제공한다. 또한, VSV-GP는 위형화된 rHSV 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 생각된다. 다른 실시형태에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 상이한 HSV 혈청형들로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, HSV-1 벡터는 하나 이상의 HSV-2 캡시드 단백질을 함유할 수 있다. 상이한 HSV 혈청형들은 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 질병에 걸린 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 특정한 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화된 조직 또는 세포는 비제한적으로, 중추신경계 및 신경세포(예를 들어 HSV-1)를 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. et al. (2010) *Open Virol. J.* 4:123-156], [Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40] 및 [Meignier, B. et al. (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 재조합 HSV 입자는 rHSV-1 입자 또는 rHSV-2 바이러스 입자이다.

[0268] 바이러스 입자의 생성

[0269] 다수의 방법들이 아데노바이러스 벡터 입자의 생성에 대해 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 거티드 아데노바이러스 벡터의 경우, 아데노바이러스 벡터 유전체 및 헬퍼 아데노바이러스 유전체가 패키징 세포주(예를 들어, 293 세포주) 내에 형질감염될 수 있다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 아데노바이러스 유전체는 이의 패키징 신호의 측면에 존재하는 재조합 부위를 함유할 수 있고, 두 유전체 모두 재조합효소(예를 들어, Cre/loxP 시스템이 사용될 수 있음)를 발현하는 패키징 세포주 내로 형질감염될 수 있어서, 관심 아데노바이러스 벡터는 헬퍼 아데노바이러스보다 더 효율적으로 패키징된다(예를 들어, 문헌[Alba, R. et al. (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27] 참조). 아데노바이러스 벡터는 본원에 기재된 것들과 같은 표준 방법을 사용하여 수합 및 정제될 수 있다.

[0270] 다수의 방법들이 렌티바이러스 벡터 입자의 생성에 대해 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 제3 세대 렌티바이러스 벡터의 경우, 관심 렌티바이러스 유전체를 gag 및 pol 유전자와 함께 함유하는 벡터가 rev 유전자를 함유하는 벡터와 함께 패키징 세포주(예를 들어, 293 세포주) 내에 공동-형질감염될 수 있다. 관심 렌티바이러스 유전체는 또한, Tat의 부재 시 전사를 촉진하는 키메라 LTR을 함유한다(문헌[Dull, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 렌티바이러스 벡터는 본원에 기재된 방법을 사용하여 수합 및 정제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Segura MM, et al., (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011] 참조).

[0271] 다수의 방법들이 HSV 입자의 생성에 대해 당업계에 공지되어 있다. HSV 벡터는 본원에 기재된 것과 같은 표준 방법을 사용하여 수합 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 복제-결합성 HSV 벡터의 경우, 최초기(IE) 유전자가 모두 결여된 관심 HS 유전체가, 바이러스 생성에 필요한 유전자, 예컨대 ICP4, ICP27 및 ICP0을 제공하는 상보적 세포주 내에 형질감염될 수 있다(예를 들어, 문헌[Samaniego, L.A. et al. (1998) *J. Virol.* 72:3307-20] 참조). HSV 벡터는 본원에 기재된 방법을 사용하여 수합 및 정제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Goins, WF et al., (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79]).

[0272] 형질감염, 안정적 세포주 생성, 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드(Conway, JE et al., (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) 및 배콜로바이러스-AAV 하이브리드를 포함하는 감염성 하이브리드 바이러스 생성 시스템을 포함하는 rAAV 벡터의 생성을 위한 다수의 방법들이 당 분야에 공지되어 있다. rAAV 바이러스 입자의 생성을 위한 rAAV 생성 배양물은 모두; 1) 적합한 숙주 세포, 2) 적합한 헬퍼 바이러스 기능, 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 생성물; 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열(예를 들어, 오버사이즈 rAAV 벡터 유전체)의 측면에 존재하는 핵산(예컨대 치료용 핵산); 및 5) rAAV 생성을 지지하기에 적합한 배지 및 배지 구성성분을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 적합한 숙주 세포는 영장류 숙주 세포이다. 일부 실시형태에서, 적합한 숙주 세포는 인간-유래 세포주, 예컨대 HeLa, A549, 293 또는 Perc.6 세포이다. 일부 실시형태에서, 적합한 헬퍼 바이러스 기능은 헬퍼 기능을 제공하는 야생형 또는 돌연변이체 아데노바이러스(예컨대 온도 민감성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스(HSV), 배콜로바이러스 또는 플라스미드 구축물에 의해 제공된다. 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자 생성물은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 일반적으로, 필수적인 것은 아니지만, AAV rep 유전자 생성물은, 이러한 rep 유전자 생성물이 복제되고 rAAV 유전체를 패키징하는 작용을 할 수 있는 한, rAAV 벡터 유전체의 ITR과 동일한 혈청형으로부터 유래된다. 당업계에 공지된 적합한 배지는 rAAV 벡터의 생성에 사용될 수 있다. 이들 배지는 Hyclone Laboratories 및 JRH에 의해 생산되는 배지, 예를 들어, 변형 이글 배지(MEM; Modified Eagle Medium), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium), 맞춤 제형, 예를 들어, 미국 특히 6,566,118에 기재된 맞춤 제형, 및 미국 특히 6,723,551에 기재된 Sf-900 II SFM 배지를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 이들은 각각 특히 재조합 AAV 벡터의 생성에서 사용하기 위한 맞춤 배지 제형과 관련하여 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일부 실시형태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 실시형태에서, AAV 헬퍼 기능은 배콜로바이러스에 의해 제공되고, 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 세포)이다. AAV의 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능의 예로는, E1A 기능, E1B 기능, E2A 기능, VA 기능 및 E4orf6 기능 등이 있다. 기탁업체로부터 입수 가능한 배콜로바이러스는 오토그라파 칼리포니카 핵 다각체병 바이러스를 포함한다.

[0273] rAAV 입자는 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특히 6,566,118; 6,989,264; 및 6,995,006을 참조한다. 본 발명의 실시에서, rAAV 입자를 생성시키기 위한 숙주 세포는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 미생물 및 효모를 포함한다. 숙주 세포는 또한 AAV 벡터 유전체가 안정적으로 유지되는 숙주 세포 또는 생산자 세포에서 AAV rep 및 cap 유전자가 안정적으로 유지되는 패키징 세포일 수 있다. 예시적 패키징 및 생산자 세포는 293, A549 또는 HeLa 세포로부터 유래된다. AAV 벡터는 당 분야에 공지된 표준 기술을 이

용하여 정제되고 제형화된다.

- [0274] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 삼중 형질감염 방법, 예를 들어, 하기 제공되는 예시적 삼중 형질감염 방법에 의해 생성될 수 있다. 간단히, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께 rep 유전자 및 캡시드 유전자를 함유하는 플라스미드가 세포주(예를 들어, HEK-293 세포)로 형질감염(예를 들어, 칼슘 포스페이트 방법을 이용함)될 수 있고, 바이러스는 수합되고, 임의로 정제될 수 있다.
- [0275] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 생산자 세포주 방법에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269] 참조). 간단히, 세포주(예를 들어, HeLa 세포주)는 rep 유전자, 캡시드 유전자, 및 프로모터-트랜스진 서열을 함유하는 플라스미드를 이용하여 안정적으로 형질감염될 수 있다. 세포주는 rAAV 생성을 위한 선도 클론을 선택하기 위해 스크리닝될 수 있고, 이는 이후 생산 바이오리액터로 확장될 수 있고, rAAV 생성을 개시시키기 위한 헬퍼로서 아데노바이러스(예를 들어, 야생형 아데노바이러스)에 의해 감염될 수 있다. 후속해서, 바이러스가 수합될 수 있고, 아데노바이러스는 비활성화(예를 들어, 열에 의함)되고/되거나 제거될 수 있고, rAAV 입자는 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 HeLa, 293, A549 또는 Perc.6 세포로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 혼탁액에서 성장되도록 적응된다. 일부 실시형태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스, HSV 또는 배콜로바이러스에 의해 제공된다.
- [0276] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 헬퍼 기능의 제공 후 약 48시간 내지 약 96시간째에 수합된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 헬퍼 기능의 제공 후 약 48시간, 약 60시간, 약 72시간, 약 84시간 또는 약 96시간째에 수합된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 헬퍼 기능의 제공 후 약 48시간 내지 약 96시간, 약 48시간 내지 약 84시간, 약 48시간 내지 약 72시간, 약 48시간 내지 약 60시간, 약 60시간 내지 약 96시간, 약 60시간 내지 약 84시간, 약 60시간 내지 약 72시간, 약 72시간 내지 약 96시간, 약 72시간 내지 약 84시간, 또는 약 84시간 내지 약 96시간째에 수합된다.
- [0277] 본 발명의 적합한 rAAV 생성 배양 배지는 0.5% 내지 20%(v/v 또는 w/v)의 수준으로 혈청 또는 혈청-유래 재조합 단백질이 보충될 수 있다. 대안적으로, 당 분야에 공지된 바와 같이, rAAV 벡터는 동물-유래 생성물을 갖지 않는 배지로도 지정될 수 있는 혈청-무함유 조건에서 생성될 수 있다. 당업자는 생성 배양물 내의 rAAV의 역ガ를 증가시키기 위해, rAAV 벡터의 생성을 지지하도록 설계된 상업적 배지 또는 맞춤 배지에 글루코스, 비타민, 아미노산, 및/또는 성장 인자를 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 분야에 공지된 하나 이상의 세포 배양 성분이 또한 보충될 수 있음을 인지할 수 있다.
- [0278] rAAV 생성 배양물은 이용되는 특정 숙주 세포에 적합한 다양한 조건(다양한 기간 동안 광범위한 온도 범위 등) 하에서 성장될 수 있다. 당 분야에 공지된 바와 같이, rAAV 생성 배양물은 적합한 부착-의존성 용기, 예를 들어, 회전 병, 중공 섬유 필터, 미세담체, 및 패킹-베드 또는 유체화-베드 바이오리액터에서 배양될 수 있는 부착-의존성 배양물을 포함한다. rAAV 벡터 생성 배양물은 또한, 예를 들어, 교반 플라스크, 교반 탱크 바이오리액터, 및 일회용 시스템, 예를 들어, 웨이브 백(Wave bag) 시스템을 포함하는 다양한 방식으로 배양될 수 있는 혼탁-적합화 숙주 세포, 예를 들어, HeLa, 293, 및 SF-9 세포를 포함할 수 있다.
- [0279] 본 발명의 rAAV 벡터 입자는 생성 배양물의 숙주 세포의 용해에 의해 또는 생성 배양물로부터의 소모된 배지의 수합에 의해 rAAV 생성 배양물로부터 수합될 수 있으나, 단, 세포는 미국 특허 6,566,118에 더욱 충분히 기재된 바와 같이 온전한 세포로부터 배지로의 rAAV 입자의 방출을 야기시키는 당 분야에 공지된 조건 하에서 배양되어야 한다. 세포를 용해시키는 적합한 방법은 또한 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 다수의 동결/해동 주기, 음파처리, 미세유체화, 및 화학물질, 예를 들어, 세제 및/또는 프로테아제를 이용한 처리를 포함한다.
- [0280] 추가의 실시형태에서, rAAV 입자는 정제된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "정제된"은, 바이러스 입자가 천연 발생하거나 이로부터 최초로 제조되는 경우에 또한 존재할 수 있는 다른 구성성분들 중 적어도 일부가 결여된 바이러스 입자의 제조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 바이러스 입자는 공급원 혼합물, 예를 들어 배양 용해질 또는 생성 배양 상층액으로부터 상기 바이러스 입자를 농화시키는 정제 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 농화는 다양한 방식, 예를 들어, 용액에 존재하는 DNase-내성 입자(DRP) 또는 유전체 카피(gc)의 비율, 또는 감염성에 의해 측정될 수 있거나, 이는 공급원 혼합물에 존재하는 이차의 잠재적 방해 성분, 예를 들어, 생성 배양 오염물질 또는 헬퍼 바이러스를 포함하는 공정중(in-process) 오염물질을 포함하는 오염물질, 배지 성분 등과 관련하여 측정될 수 있다.
- [0281] 일부 실시형태에서, 바이러스 생성 배양 수합물은 숙주 세포 조직파편을 제거하기 위해 정화된다. 일부 실시형태에서, 생성 배양 수합물은, 예를 들어, 등급 DOHC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 등급 A1HC Millipore

Millistak+ HC Pod 필터, 및  $0.2 \mu\text{m}$  Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC 친수성 막 필터를 포함하는 일련의 심층 필터를 통한 여과에 의해 정화된다. 정화는 또한, 당 분야에 공지된 다양한 다른 표준 기술, 예를 들어 원심분리 또는 당 분야에 공지된  $0.2 \mu\text{m}$  이상의 포어 크기의 임의의 셀룰로스 아세테이트 필터를 통한 여과에 의해 달성될 수 있다.

[0282] 일부 실시형태에서, 바이러스 생성 배양 수거물은 생성 배양물에 존재하는 임의의 고분자량 DNA를 분해하기 위해 Benzonase<sup>®</sup>로 추가로 처리된다. 일부 실시형태에서, Benzonase<sup>®</sup> 분해는, 예를 들어, 주위 온도 내지  $37^\circ\text{C}$  범위의 온도에서 30분 내지 수시간의 기간 동안  $1 \text{ 유닛}/\text{ml}$  내지  $2.5 \text{ 유닛}/\text{ml}$ 의 Benzonase<sup>®</sup>의 최종 농도를 포함하는 당 분야에 공지된 표준 조건 하에서 수행된다.

[0283] rAAV 입자는 평형 원심분리; 유통 음이온 교환 여과; rAAV 입자의 농축을 위한 접선 유동 여과(TFF); 아파타이트 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 헬퍼 바이러스의 열 비활성화; 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완충액 교환; 나노여과; 및 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획의 정제 단계 중 하나 이상을 이용하여 분리되거나 정제될 수 있다. 이들 단계는 단독으로, 다양한 조합으로, 또는 다양한 순서로 이용될 수 있다. rAAV 입자의 정제 방법은, 예를 들어, 문헌[Xiao et al., (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232]; 미국 특허 6,989,264 및 8,137,948; 및 WO 2010/148143에서 발견된다. 아데노바이러스 입자의 정제 방법은 예를 들어, 문헌[Bo, H et al., (2014) *Eur. J. Pharm. Sci.* 67C:119-125]에서 발견된다. 렌티바이러스 입자의 정제 방법은 예를 들어, 문헌[Segura MM, et al., (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011]에서 발견된다. HSV 입자의 정제 방법은 예를 들어, 문헌[Goins, WF et al., (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79]에서 발견된다.

[0284] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 약제학적 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 제형은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 이러한 담체는 당업계에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 바이러스 입자 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 안내 주사(ocular injection)에 적합하다. 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일, 예를 들어, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 낙화생유, 대두유, 광유 등일 수 있다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체, 특히 주사용 용액을 위한 액체 담체로서 이용될 수 있다. 약제학적 조성물은 추가 성분, 예를 들어, 보존제, 완충제, 긴장성 작용제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤제 또는 정화제, 점도-증가제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 약제학적 조성물은 단일 단위 투여량 또는 다중투여량 형태로 패키징될 수 있다. 조성물은 일반적으로 멸균 및 실질적으로 등장성 용액으로 제형화된다.

## VI. 치료 방법

[0285] 본 개시내용의 소정의 양태들은 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0286] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 양태는 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 Cas 단백질, 및 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 하나 이상의 핵산(들)을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서, 제1 가이드 RNA 및 제2 가이드 RNA는 심부 인트론 돌연변이를 포함하는 돌연변이의 측면에 존재하는 표적 DNA 서열의 반대 가닥에 혼성화한다. 즉, 본 개시내용의 방법, 조성물 및 키트 중 임의에 대해, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 폴리펩타이드로서 공급될 수 있다. 비제한적인 예로서, Cas 단백질은 양이온성 지질-매개 전달을 사용하여 하나 이상의 가이드 RNA(예를 들어, sgRNA)와 함께 투여될 수 있다(예를 들어, 문헌[Zuris, J.A. et al. *Nat Biotechnol.* 33:73-80] 참조). 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 예를 들어, CRISPR-Cas 효과기 복합체에서와 같이 하나 이상의 가이드 RNA와의 복합체로 투여될 수 있다. 하기 기재된 전달 및/또는 투여 방법 중 임의의 방법은 하나 이상의 가이드 RNA와 함께 투여되는 Cas 단백질의 전달에 사용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시형태에서, Cas 단백질은 상기 기재된 바와 같이 자가-제한 발현 카세트로부터 발현된다.

[0287] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물(또는 본 개시내용의 Cas 단백질 및 본 개시내용의 하나 이상의 가이드 RNA를 포함하는 조성물)은 정맥내,

근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식에 의해, 흡입에 의해, 경막내, 뇌실내 또는 비내 투여된다.

[0289] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물(또는 본 개시내용의 Cas 단백질 및 본 개시내용의 하나 이상의 가이드 RNA를 포함하는 조성물)은 망막하 또는 유리체내로 투여된다. 망막 질병, 예컨대 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 질병에 대한 유전자 요법 프로토콜은 망막 내 세포로의 핵산의 국소화된 전달을 필요로 한다. 이들 질병에서 치료 표적이 될 세포는 망막내의 광수용체 세포 또는 신경감각 망막 밑에 있는 RPE의 세포이다. 이들 세포로의 핵산 전달은 망막과 RPE 사이의 망막하 공간으로의 주사를 필요로 한다.

[0290] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산들 중 임의의 핵산을 선택적으로 허용 가능한 부형제 내에 포함하는 조성물을 제공한다. 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 약제학적으로 허용되는 부형제는 약리학적으로 효과적인 물질의 투여를 촉진하는 비교적 비활성인 물질이며, 액체 용액 또는 혼탁액, 에멀젼, 또는 사용 전에 액체 중의 용해 또는 혼탁에 적합한 고체 형태로 공급될 수 있다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 일관성을 제공할 수 있거나, 희석제로 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 안정제, 습윤제 및 에멀젼화제, 오스몰농도를 변화시키기 위한 염, 캡슐화 작용제, pH 완충 물질, 및 완충제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 부형제는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 눈으로의 직접 전달에 적합한 임의의 약제학적 작용제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 소르비톨, 다양한 TWEEN 화합물 중 임의의 TWEEN 화합물, 및 액체, 예를 들어, 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 그 안에, 예를 들어, 광산염, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 살레이트 등; 및 유기산의 염, 예를 들어, 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등이 포함될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제의 충분한 논의는 문현[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에서 이용 가능하다.

[0291] 일반적으로, 이들 조성물은 망막하 주사에 의한 투여용으로 제형화된다. 따라서, 이들 조성물은 약제학적으로 허용되는 비히클, 예를 들어, 염수, 링거 평형 염 용액(pH 7.4) 등과 조합될 수 있다. 요구되는 것은 아니지만, 조성물은 임의로 정확한 양의 투여에 적합한 단위 투여 형태로 공급될 수 있다.

#### 망막하 전달 방법

[0293] 망막하 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO 2009/105690을 참조하며 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 간단히, 황반 및 중심와의 망막하로 조성물(예를 들어, 본 개시내용의 조작된, 비-천연 발생 CRISPR-Cas 시스템을 인코딩하는 핵산으로서, 이는 상기 기재된 바와 같이 바이러스 전달 또는 비-바이러스 전달을 통해 전달될 수 있음)을 전달하기 위한 일반적인 방법은 하기의 개요에 의해 예시될 수 있다. 이러한 예는 단지 방법의 소정의 특징을 예시하는 것을 의미하며, 제한하려는 것을 의미하는 것이 결코 아니다.

[0294] 일반적으로, 벡터는 수술현미경을 사용하여 직접 관찰하면서 안내(망막하) 주사되는 조성물의 형태로 전달될 수 있다. 이러한 시술은 유리체 절제(vitrectomy) 후, 망막하 공간으로의 하나 이상의 작은 망막절개를 통한 미세 삽입관을 사용한 벡터 혼탁액의 주사를 수반할 수 있다.

[0295] 간단히, 주입 삽입관은 수술 전체에 걸친 주입(예를 들어, 염수의 주입)에 의해 정상의 구형 부피를 유지시키기 위해 적소에 봉합될 수 있다. 유리체절제는 적절한 구멍 크기(예를 들어, 20 내지 27 게이지)의 삽입관을 이용하여 수행되며, 제거되는 유리질 젤의 부피는 주입 삽입관으로부터의 염수 또는 다른 등장성 용액의 주입에 의해 대체된다. 유리체절제는 (1) 유리체 피질(후유리체막)의 제거가 삽입관에 의한 망막의 침투를 촉진하고, (2) 유리체의 제거 및 유체(예를 들어, 염수)에 의한 대체가 벡터의 안구내 주사를 수용하는 공간을 발생시키고, (3) 유리체의 조절된 제거가 망막 째짐 및 계획되지 않은 망막박리의 가능성을 감소시키므로 유리하게 수행된다.

[0296] 일부 실시형태에서, 벡터 조성물은 적절한 구멍 크기(예를 들어, 27-45게이지)의 삽입관을 이용하여, 이에 따라 망막하 공간내 수포를 발생시킴으로써 망막 중심 외부의 망막하 공간으로 직접 주사된다. 다른 실시형태에서, 벡터 조성물의 망막하 주사에 앞서 망막 중심 외부의 망막하 공간으로의 적은 부피(예를 들어, 약 0.1 내지 약 0.5 ml)의 적절한 유체(예를 들어, 염수 또는 링거액)의 망막하 주사가 선행된다. 망막하 공간으로의 이러한 최초 주사는 망막하 공간 내에 최초 유체 수포를 확립시켜, 최초 수포 위치에 국소화된 망막박리를 야기시킨다. 이러한 최초 유체 수포는 망막하 공간으로의 벡터 조성물의 표적화된 전달(벡터 전달 전 주사면을 규정함에의 함)을 촉진할 수 있으며, 맥락막으로의 가능한 벡터 투여 및 유리체강으로의 벡터 주사 또는 역류의 가능성을

최소화시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 최초 유체 수포에 동일하거나 추가의 미세 구멍 삽입관에 의해 최초 유체 수포로의 직접적인 하나 이상의 백터 조성물 및/또는 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 유체의 투여에 의해 이를 유체가 추가로 주사될 수 있다.

[0297] 백터 조성물 및/또는 최초 적은 부피의 유체의 앤구내 투여는 주사기에 부착된 미세 구멍 삽입관(예를 들어, 27 내지 45 케이지)을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 주사기의 플런저는 기계화된 장치, 예를 들어, 풋 페달의 누름에 의해 구동될 수 있다. 미세 구멍 삽입관은 표적화되는 망막의 영역에 따라 각각의 피험자에서 미리 결정된 부위(그러나, 망막 중심 외부)에서 유리체강을 통과하여 망막으로 공막절개술을 통해 전진된다. 직접 가시화 하에서, 백터 혼탁액은 감각신경 망막 하에서 기계적으로 주사되며, 이는 자가-밀봉 비-확장 망막절개와 함께 국소화된 망막박리를 야기시킨다. 상기 기재된 바와 같이, 백터 조성물은 망막하 공간으로 직접 주사되어 망막 중심 외부에 수포를 생성시킬 수 있거나, 백터가 망막 중심 외부의 최초 수포에 주사되어 수포를 확장(및 망막박리 영역 확장)시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물의 주사에 이어 수포로의 또 다른 유체의 주사가 후속된다.

[0298] 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 망막하 주사(들)의 속도 및 위치는 황반, 중심과 및/또는 밑에 있는 RPE 세포를 손상시킬 수 있는 국소화된 전단력을 발생시킬 수 있다. 망막하 주사는 전단력을 최소화시키거나 회피하는 속도로 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 15 내지 17분에 걸쳐 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터는 약 17 내지 20분에 걸쳐 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 20 내지 22분에 걸쳐 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 35 내지 약 65  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 35  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 40  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 45  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 50  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 55  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 60  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 백터 조성물은 약 65  $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주사된다. 일부 실시형태에서, 당업자는 수포의 주사 속도 및 시간이, 예를 들어, 망막 중심의 세포를 평가하기에 충분한 망막박리를 생성시키는데 필요한 백터 조성물의 부피 또는 수포의 크기, 백터 조성물을 전달하기 위해 이용되는 삽입관의 크기, 및 본 발명의 삽입관의 위치를 안전하기 유지시키는 능력에 의해 유도될 수 있음을 인지할 것이다.

[0299] 본 발명의 일부 실시형태에서, 망막의 망막하 공간에 주사되는 조성물의 부피는 약 1  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 6  $\mu\text{l}$ , 7  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{l}$ , 9  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 15  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 75  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 600  $\mu\text{l}$ , 700  $\mu\text{l}$ , 800  $\mu\text{l}$ , 900  $\mu\text{l}$ , 또는 1  $\text{mL}$  초과, 또는 이를 사이의 임의의 양 중 어느 하나이다.

[0300] 일부 실시형태에서, 본 방법은 유효량의, 본 개시내용의 백터를 포함하는 재조합 바이러스 입자를 눈에 투여(예를 들어, 망막하 및/또는 유리체내 투여에 의함)하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$ ,  $11 \times 10^{12}$ ,  $15 \times 10^{12}$ ,  $20 \times 10^{12}$ ,  $25 \times 10^{12}$ ,  $30 \times 10^{12}$ , 또는  $50 \times 10^{12}$  유전체 카피/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$  내지  $6 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$  내지  $7 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$  내지  $8 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  내지  $9 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$  내지  $10 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$  내지  $11 \times 10^{12}$ ,  $11 \times 10^{12}$  내지  $15 \times 10^{12}$ ,  $15 \times 10^{12}$  내지  $20 \times 10^{12}$ ,  $20 \times 10^{12}$  내지  $25 \times 10^{12}$ ,  $25 \times 10^{12}$  내지  $30 \times 10^{12}$ ,  $30 \times 10^{12}$  내지  $50 \times 10^{12}$ , 또는  $50 \times 10^{12}$  내지  $100 \times 10^{12}$  유전체 카피/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$  내지  $10 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$  내지  $25 \times 10^{12}$ , 또는  $25 \times 10^{12}$  내지  $50 \times 10^{12}$  유전체 카피/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$ ,  $11 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$ ,  $20 \times 10^9$ ,  $25 \times 10^9$ ,  $30 \times 10^9$ , 또는  $50 \times 10^9$  형질도입 단위/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$  내지  $6 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  내지  $7 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$  내지  $8 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$  내지  $9 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$  내지  $10 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$  내지  $11 \times 10^9$ ,  $11 \times 10^9$  내지  $15 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$  내지  $20 \times 10^9$ ,  $20 \times 10^9$  내지  $25 \times 10^9$ ,  $25 \times 10^9$  내지  $30 \times 10^9$ ,  $30 \times 10^9$  내지  $50 \times 10^9$ , 또는  $50 \times 10^9$  내지  $100 \times 10^9$  형질도입 단위/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$  내지  $10 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$  내지  $15 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$  내지  $25 \times 10^9$ ,  $25 \times 10^9$  내지  $50 \times 10^9$ , 또는  $25 \times 10^9$  내지  $50 \times 10^9$  형질도입 단위/ $\text{mL}$  중 임

의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$ ,  $11 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$ ,  $20 \times 10^{10}$ ,  $25 \times 10^{10}$ ,  $30 \times 10^{10}$ ,  $40 \times 10^{10}$ , 또는  $50 \times 10^{10}$  감염성 단위/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$  내지  $6 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$  내지  $8 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$  내지  $9 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$  내지  $10 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$  내지  $11 \times 10^{10}$ ,  $11 \times 10^{10}$  내지  $15 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$  내지  $20 \times 10^{10}$ ,  $20 \times 10^{10}$  내지  $25 \times 10^{10}$ ,  $25 \times 10^{10}$  내지  $30 \times 10^{10}$ ,  $30 \times 10^{10}$  내지  $40 \times 10^{10}$ ,  $40 \times 10^{10}$  내지  $50 \times 10^{10}$ , 또는  $50 \times 10^{10}$  내지  $100 \times 10^{10}$  감염성 단위/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$  내지  $10 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$  내지  $15 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$  내지  $25 \times 10^{10}$ , 또는  $25 \times 10^{10}$  내지  $50 \times 10^{10}$  감염성 단위/ $\text{mL}$  중 임의의 역가이다.

[0301]

일부 실시형태에서, 본 방법은 유효량의, 본 개시내용의 벡터를 포함하는 재조합 바이러스 입자를 개체(예를 들어, 인간)의 눈에 투여(예를 들어, 망막하 및/또는 유리체내 투여에 의함)하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 적어도 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  유전체 카피/kg 체중 중 임의의 용량이다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  유전체 카피/kg 체중 중 임의의 용량이다.

[0302]

하나 또는 다수(예를 들어, 2개, 3개, 또는 그 초과)의 수포가 생성될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 시스템에 의해 생성되는 수포 또는 수포들의 전체 부피는 눈의 유체 부피, 예를 들어, 통상적인 인간 피험자에서의 약 4  $\text{mL}$ 를 초과할 수 없다. 각각의 개별적 수포의 전체 부피는 망막 중심의 세포 유형에 노출시키기에 충분한 크기의 망막박리를 촉진하고, 최적 조작을 위한 충분한 의존성의 수포를 생성시키기 위해 적어도 약 0.3  $\text{mL}$ , 또는 적어도 약 0.5  $\text{mL}$ 일 수 있다. 당업자는 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 수포를 생성시키는데 있어서 안구 구조에 대한 손상을 피하기 위해 적절한 안압이 유지되어야 하는 것을 인지할 것이다. 각각의 개별적 수포의 크기는, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 1.2  $\text{mL}$ , 약 0.8 내지 약 1.2  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 1.2  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 1.0  $\text{mL}$ , 약 1.0 내지 약 2.0  $\text{mL}$ , 약 1.0 내지 약 3.0  $\text{mL}$ 일 수 있다. 따라서, 일례에서, 전체 3  $\text{mL}$ 의 벡터 조성물 혼탁액을 주사하기 위해, 각각 약 1  $\text{mL}$ 의 3개의 수포가 확립될 수 있다. 조합된 모든 수포의 전체 부피는, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 3.0  $\text{mL}$ , 약 0.8 내지 약 3.0  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 3.0  $\text{mL}$ , 약 1.0 내지 약 3.0  $\text{mL}$ , 약 0.5 내지 약 1.5  $\text{mL}$ , 약 0.5 내지 약 1.2  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 3.0  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 2.0  $\text{mL}$ , 약 0.9 내지 약 1.0  $\text{mL}$ 일 수 있다.

[0303]

수포의 본래 위치 가장자리 외부의 표적 망막의 영역(예를 들어, 망막 중심)을 안전하고 효과적으로 형질도입시키기 위해, 수포는 형질도입을 위한 표적 영역으로 수포가 재위치하도록 조작될 수 있다. 수포의 조작은 수포의 부피, 수포를 함유하는 눈의 재위치화, 하나 이상의 수포를 함유하는 눈 또는 눈들을 갖는 인간의 머리의 재위치화, 및/또는 유체-공기 교환 수단에 의해 생성되는 수포의 의존성에 의해 발생할 수 있다. 이는 망막 중심과 특히 관련이 있는데, 이는 이러한 영역이 통상적으로 망막하 주사에 의한 박리에 저항하기 때문이다. 일부 실시형태에서, 수포의 재위치화를 위해 유체-공기 교환이 이용되며, 주입 삽입관으로부터 유체가 공기, 예를 들어, 망막의 표면 상으로 분출되는 공기에 의해 일시적으로 대체된다. 공기의 부피가 망막의 표면으로부터 유리체강 유체를 대체함에 따라, 유리체강 내의 유체가 삽입관으로 흘러나올 수 있다. 유리체강 유체로부터의 압력의 일시적 결핍은 수포를 눈의 종속 부분으로 이동시키고 끌리게 한다. 안구를 적절히 위치시킴으로써, 망막하 벡터 조성물의 수포는 인접한 영역(예를 들어, 황반 및/또는 중심와)을 수반하도록 조작된다. 일부 경우에, 수포의 질량은 유체-공기 교환의 이용 없이도 이를 끌리게 하기에 충분하다. 요망되는 위치로의 수포의 이동은 눈 내의 요망되는 위치로 수포가 끌리도록 하기 위해 피험자의 머리의 위치를 변경시킴으로써 추가로 촉진될 수 있다. 수포의 요망되는 형태가 달성된 후, 유체는 유리체강으로 복구된다. 유체는 적절한 유체, 예를 들어, 신선한 염수이다. 일반적으로, 망막하 벡터 조성물은 망막절개에 대한 망막유착 및 안구내 탐폰삽입 없이 제자리에 남겨질 수 있으며, 망막은 약 48시간 이내에 자연스럽게 재부착할 것이다.

[0304]

안구 세포(예를 들어 황반 및/또는 중심와의 예를 들어 RPE 및/또는 광수용체 세포)에 본 개시내용의 벡터를 안전하고 효과적으로 형질도입함으로써, 본 발명의 방법은 개체; 예를 들어 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 장애를 가진 인간을 치료하는 데 사용될 수 있으며, 여기서, 형질도입된 세포는 안구 장애를 치료하는 데 충분한 양의 CRISPR-Cas 시스템을 생성한다.

- [0305] 치료 목적에 따라 유효량의 백터(일부 실시형태에서, 바이러스 입자의 형태)가 투여된다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입이 요망되는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료 목적은 일반적으로 상기 형질도입 수준을 충족하거나 초과하는 것이다. 일부 예에서, 상기 형질도입 수준은 표적 세포의 단지 약 1% 내지 5%의 형질도입, 일부 실시형태에서, 요망되는 조직 유형의 세포의 적어도 약 20%, 일부 실시형태에서, 요망되는 조직 유형의 세포의 적어도 약 50%, 일부 실시형태에서, 적어도 약 80%, 일부 실시형태에서, 적어도 약 95%, 일부 실시형태에서, 적어도 약 99%의 형질도입에 의해 달성될 수 있다. 지침으로서, 1회 주사 당 투여되는 바이러스 입자의 수는 일반적으로 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^{14}$  개의 입자, 약  $1 \times 10^7$  내지  $1 \times 10^{13}$  개의 입자, 약  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{12}$  개의 입자 또는 약  $1 \times 10^{11}$  개의 입자이다. 백터 조성물은 동일한 시술 동안 또는 수일, 수주, 수개월, 또는 수년 동안 떨어진 간격으로 1회 이상의 망막하 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 다수의 백터가 인간을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0306] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 유효량의 백터 또는 핵산을 망막에 투여하면 투여 부위에서 또는 그 부근에서 광수용체 세포를 형질도입시킨다. 일부 실시형태에서, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 100% 초과의 광수용체 세포가 형질도입된다. 일부 실시형태에서, 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 25% 내지 약 75%, 약 25% 내지 약 50%, 또는 약 30% 내지 약 50%의 광수용체 세포가 형질도입된다. 형질도입된 광수용체 세포의 확인 방법은 당업계에 공지되어 있으며; 예를 들어, 면역조직화학 또는 마커, 예컨대 증강된 녹색 형광 단백질의 사용이 형질도입을 검출하는 데 사용될 수 있다.
- [0307] 본 발명의 일부 실시형태에서, 본 방법은 안구 장애를 가진 개체; 예를 들어 심부 인트론 돌연변이와 연관된 안구 장애를 가진 인간을 치료하기 위해 유효량의 본 개시내용의 백터 또는 핵산을 포유류의 망막하(예를 들어, 망막하 공간)에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 광수용체 세포에서 핵산이 발현될 수 있도록 망막하의 하나 이상의 위치에 주사된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 망막하의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 10개 초과의 위치들 중 임의의 하나의 위치 내에 주사된다.
- [0308] 일부 실시형태에서, 조성물은 1개 초과의 위치에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 주사는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 9시간, 12시간 또는 24시간의 간격을 두고 수행된다. 일부 실시형태에서, 다중 주사는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 15일, 20일, 25일 또는 30일의 간격을 두고 수행된다. 일부 실시형태에서, 다중 주사는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 10개월 또는 11개월의 간격을 두고 수행된다. 일부 실시형태에서, 다중 주사는 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 8년, 9년, 10년, 15년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 45년, 50년, 55년 또는 60년의 간격을 두고 수행된다.
- [0309] 유리체내 주사 방법
- [0310] 유리체내 주사를 위한 일반 방법은 하기의 개요에 의해 예시될 수 있다. 이러한 예는 단지 방법의 특정 특징을 예시하는 것을 의미하며, 이로 제한되는 것을 의미하는 것이 결코 아니다. 유리체내 주사를 위한 절차는 당 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Peyman, G.A., et al. (2009) *Retina* 29(7):875-912] 및 [Fagan, X.J. and Al-Qureshi, S. (2013) *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41(5):500-7] 참조).
- [0311] 간단히, 유리체내 주사를 위한 피험자는 동공 확장, 눈의 살균, 및 마취제의 투여에 의한 절차에 대해 준비될 수 있다. 당 분야에 공지된 임의의 적합한 산동제가 동공 확장에 이용될 수 있다. 적절한 동공 확장이 처리 전에 확인될 수 있다. 살균은 눈 살균 처리, 예를 들어, 아이오다이드-함유 용액, 예를 들어, 포비돈-아이오딘(BETADINE®)을 적용시킴으로써 달성될 수 있다. 눈꺼풀, 속눈썹, 및 임의의 다른 가까운 조직(예를 들어, 피부)를 세정하기 위해 유사한 용액이 또한 이용될 수 있다. 임의의 적합한 농도의 임의의 적합한 마취제, 예를 들어, 리도카인 또는 프로파라카인이 이용될 수 있다. 마취제는 국소 점적, 젤 또는 젤리, 및 마취제의 결막하 적용을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0312] 주사 전, 상기 영역으로부터 속눈썹을 세정하기 위해 살균된 눈꺼풀 검경이 이용될 수 있다. 주사 부위는 주사 기로 표시될 수 있다. 주사 부위는 환자의 수정체를 기초로 하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 주사 부위는 인공 수정체 또는 무수정체 환자에서 가장자리로부터 3 내지 3.5 mm에 위치할 수 있고, 유수정체 환자에서 가장자리로부터 3.5 내지 4 mm에 위치할 수 있다. 환자는 주사 부위 반대 방향으로 속을 들여다볼 수 있다.
- [0313] 일부 실시형태에서, 본 방법은 유효량의, 본 개시내용의 백터를 포함하는 재조합 바이러스 입자를 눈에 투여(예를 들어, 망막하 및/또는 유리체내 투여에 의함)하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스

역가는 적어도 약  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$ ,  $11 \times 10^{12}$ ,  $15 \times 10^{12}$ ,  $20 \times 10^{12}$ ,  $25 \times 10^{12}$ ,  $30 \times 10^{12}$ , 또는  $50 \times 10^{12}$  유전체 카페/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$  내지  $6 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$  내지  $7 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$  내지  $8 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  내지  $9 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$  내지  $10 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$  내지  $11 \times 10^{12}$ ,  $11 \times 10^{12}$  내지  $15 \times 10^{12}$ ,  $15 \times 10^{12}$  내지  $20 \times 10^{12}$ ,  $20 \times 10^{12}$  내지  $25 \times 10^{12}$ ,  $25 \times 10^{12}$  내지  $30 \times 10^{12}$ ,  $30 \times 10^{12}$  내지  $50 \times 10^{12}$ , 또는  $50 \times 10^{12}$  내지  $100 \times 10^{12}$  유전체 카페/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$  내지  $10 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$  내지  $25 \times 10^{12}$ , 또는  $25 \times 10^{12}$  내지  $50 \times 10^{12}$  유전체 카페/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$ ,  $11 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$ ,  $20 \times 10^9$ ,  $25 \times 10^9$ ,  $30 \times 10^9$ , 또는  $50 \times 10^9$  형질도입 단위/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$  내지  $6 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  내지  $7 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$  내지  $8 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$  내지  $9 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$  내지  $10 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$  내지  $11 \times 10^9$ ,  $11 \times 10^9$  내지  $15 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$  내지  $20 \times 10^9$ ,  $20 \times 10^9$  내지  $25 \times 10^9$ ,  $25 \times 10^9$  내지  $30 \times 10^9$ ,  $30 \times 10^9$  내지  $50 \times 10^9$  또는  $50 \times 10^9$  내지  $100 \times 10^9$  형질도입 단위/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$  내지  $10 \times 10^9$ ,  $10 \times 10^9$  내지  $15 \times 10^9$ ,  $15 \times 10^9$  내지  $25 \times 10^9$ , 또는  $25 \times 10^9$  내지  $50 \times 10^9$  형질도입 단위/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$ ,  $11 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$ ,  $20 \times 10^{10}$ ,  $25 \times 10^{10}$ ,  $30 \times 10^{10}$ ,  $40 \times 10^{10}$ , 또는  $50 \times 10^{10}$  감염성 단위/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$  내지  $6 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$  내지  $8 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$  내지  $9 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$  내지  $10 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$  내지  $11 \times 10^{10}$ ,  $11 \times 10^{10}$  내지  $15 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$  내지  $20 \times 10^{10}$ ,  $20 \times 10^{10}$  내지  $25 \times 10^{10}$ ,  $25 \times 10^{10}$  내지  $30 \times 10^{10}$ ,  $30 \times 10^{10}$  내지  $40 \times 10^{10}$ ,  $40 \times 10^{10}$  내지  $50 \times 10^{10}$ , 또는  $50 \times 10^{10}$  내지  $100 \times 10^{10}$  감염성 단위/mL 중 임의의 역가이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$  내지  $10 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$  내지  $15 \times 10^{10}$ ,  $15 \times 10^{10}$  내지  $25 \times 10^{10}$ , 또는  $25 \times 10^{10}$  내지  $50 \times 10^{10}$  감염성 단위/mL 중 임의의 역가이다.

[0314]

일부 실시형태에서, 본 방법은 본 개시내용의 벡터를 포함하는 유효량의 재조합 바이러스 입자를 개체(예를 들어, 인간)의 눈에 투여하는 단계(예를 들어, 망막하 및/또는 유리체내 투여에 의해)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 적어도 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  유전체 카페/kg 체중 중 임의의 용량이다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{13}$  유전체 카페/kg 체중 중 임의의 용량이다.

[0315]

주사 동안, 바늘이 공막과 수직으로 삽입될 수 있고, 눈의 중심을 향할 수 있다. 바늘은 첨단이 망막하 공간이 아니라 유리체 내에서 중단되도록 삽입될 수 있다. 주사를 위해 당분야에 공지된 임의의 적합한 부피가 이용될 수 있다. 주사 후, 눈은 살균제, 예를 들어, 항생제로 처리될 수 있다. 눈은 또한 과량의 살균제를 제거하기 위해 헹구어질 수 있다.

[0316]

망막의 구조 및 혼산 전달의 효과를 확인하기 위한 수단

[0317]

망막은 다수의 층을 함유하는 것으로 공지되어 있다. 망막 내의 세포층은 내경계막, 신경 섬유, 신경절 세포, 내망상, 내핵, 외망상, 외핵, 외경계막, 광수용체, 및 망막 색소 상피층을 포함할 수 있다. 유리체에 대해 가장 가까운 층은 내경계층이다. 이러한 층은 신경아교세포의 한 부류인 렐리 세포를 함유할 수 있다. 신경 섬유층은 시각 신경을 형성하는 신경절 세포로부터의 축삭을 함유할 수 있다. 신경절 세포층은 신경절 세포 및 무축삭 세포를 포함할 수 있다. 내망상층은 신경절의 가지돌기와 무축삭 세포 및 두극 세포의 축삭 사이의 시냅스를 함유할 수 있다. 내핵층은 무축삭 세포, 두극 세포, 및 수평 세포의 세포핵을 함유할 수 있다. 외망상층은 수평 세포 가지돌기와 광수용체 세포 돌기 사이에 시냅스를 함유할 수 있다. 외핵층은 광수용체 세포체를 함유할 수 있

다. 외경계막은 뭘러 세포 첨단 돌기 사이 및 이들 돌기와 광수용체 세포 내부 세그먼트 사이에 세포 연결부, 예를 들어, 유착 접합부 및 부착반점을 포함할 수 있다. 간상체 및 추상체 및 재흡막의 층으로도 공지된 광수용체 층은 간상체 및 추상체를 포함하는 광수용체 세포를 함유할 수 있다. 유리체에 대해 가장 멀리 있는 망막 층은 색소 파립을 함유하는 육각 상피 세포의 층을 포함할 수 있는 망막 색소 상피(RPE)이다.

[0318] 망막은 또한 많은 다양한 세포층을 함유하는 것으로 공지되어 있다. 망막 신경세포는 광수용체 세포, 두극 세포, 신경절 세포, 무축삭 세포, 및 수평 세포를 포함할 수 있다. 광수용체 세포는 빛에 민감하다. 이들은 빛을 감지할 수 있고, 두극 세포 및 신경절 세포를 통해 시각 신경으로 신호를 전달함으로써 반응할 수 있다. 광수용체 세포는 일반적으로 빛이 적은 조건에서 빛을 감지하는 간상체, 및 일반적으로 색 및 더 밝은 빛 지각을 감지하는 추상체를 포함할 수 있다. 두극 세포는 광수용체 세포 및 시냅스로부터 무축삭 세포 또는 신경절 세포로의 입력을 수용할 수 있다. 신경절 세포는 무축삭 세포 또는 수평 세포로부터의 정보를 수용할 수 있고, 이들의 축삭은 시각 신경을 형성한다. 수평 세포는 다수의 광수용체로부터의 입력을 통합시킬 수 있고, 빛 수준에 대한 조정을 도울 수 있다. 무축삭 세포는 두극 세포를 조절하는 것을 돋고, 신경절 세포로 입력을 제공하는 사 이신경세포이다. 망막의 신경아교세포는 뭘러 세포, 별아교세포, 및 미세아교세포를 포함할 수 있다.

[0319] 망막하 또는 유리체내 주사에 의한 핵산 전달의 효능은 본원에 기재된 바와 같은 몇몇 기준들에 의해 모니터링 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 효능은, 핵산(들)이 전달되었던 하나 이상의 세포를 포함하는 시료에서 심부 인트론 돌연변이 및/또는 측면 서열의 결실을 검출함으로써 검정된다. 결실은 비제한적으로 서던 블로팅, PCR, qPCR, DNA 서열분석(예를 들어, Sanger 서열분석 및 차세대 서열분석), 인 시추 혼성화, DNA 마이크로어레이 및 Surveyor 뉴클레아제 검정법을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 검출될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308] 참조). 예시적인 방법은 하기 실시예에 예시되어 있다.

[0320] 일부 실시형태에서, 효능은 기능적으로 검정된다. 예를 들어, 본 발명의 방법을 이용한 피험자의 치료 후, 피험자는, 하나 이상의 임상 파라미터에 의해 질병 상태의 하나 이상의 정후 또는 증상의 개선 및/또는 안정화 및/또는 진행에서의 지연에 대해 평가될 수 있다. 상기 시험의 예는 당 분야에 공지되어 있으며, 객관적뿐만 아니라 주관적(예를 들어, 피험자 보고) 측정을 포함한다. 예를 들어, 피험자의 시각 기능에 대한 치료의 효과를 측정하기 위해, 다음 중 하나 이상이 평가될 수 있다: 피험자의 주관적인 시력의 질 또는 개선된 중추 시각 기능(예를 들어, 술술 읽고 안면을 인식하는 피험자의 능력에서의 개선), 피험자의 시각 이동(예를 들어, 미로를 통과하는데 필요한 시간에서의 감소), 시력(예를 들어, 피험자의 LogMAR 스코어에서의 개선), 미세시야검사(예를 들어, 피험자의 dB 스코어에서의 개선), 암-순응 시야측정법(예를 들어, 피험자의 dB 스코어에서의 개선), 미세 매트릭스 맵핑(fine matrix mapping)(예를 들어, 피험자의 dB 스코어에서의 개선), 골드만 동적시야계(Goldmann perimetry)(예를 들어, 암점성 영역(즉, 시각상실 영역)의 감소된 크기 및 더 작은 표적을 분리하는 능력의 개선), 폴리카 민감성(예를 들어, 헤르츠에서의 개선), 자가형광, 및 전기생리학 측정(예를 들어, ERG에서의 개선). 일부 실시형태에서, 시각 기능은 피험자의 시각 이동에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 시각 기능은 피험자의 시력에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 시각 기능은 미세시야검사에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 시각 기능은 암-순응 시야측정법에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 시각 기능은 ERG에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, 시각 기능은 피험자의 주관적인 시력의 질에 의해 측정된다.

[0321] 진행성인 변성 시각 기능을 발생시키는 질병의 경우, 이를 연령에 피험자를 치료하는 것은 질병의 진행의 둔화 또는 정지를 발생시킬 수 있을 뿐만 아니라, 이는 또한 후천 약시로 인한 시각 기능 상실을 개선하거나 예방할 수 있다. 약시는 2개 유형의 약시가 존재할 수 있다. 출생으로부터 수개월의 연령까지 완전히 어두운 곳에서 유지되는 비인간 영장류 및 새끼고양이의 연구에서, 이후에 빛에 노출되는 경우에도 상기 동물은 망막에 의해 보내진 기능적 신호에도 불구하고 기능적으로 비가역적으로 실명 상태이다. 상기 실명은 자극 정지로 인해 신경 연결 및 피질의 "교육"이 출생으로부터 발달적으로 정지되기 때문에 발생한다. 이러한 기능이 회복될 수 있는지의 여부는 공지되어 있지 않다. 망막 변성의 질병의 경우, 정상 시각 피질 회로는 처음에는 "학습"되거나, 변성이 유의한 기능이상을 발생시키는 시점까지 발달적으로 적절하다. 기능이상 눈에서의 신호전달과 관련한 시각 자극의 상실은 "후천" 또는 "학습" 기능이상("후천 약시")를 발생시키고, 이는 뇌가 신호를 해석하거나, 눈을 "이용"하지 못하게 한다. 약시 눈의 유전자 요법의 결과로서 망막으로부터의 개선된 신호전달이 질병 상태의 진행의 둔화 또는 안정화에 더하여 더욱 정상의 기능의 획득을 발생시킬 수 있는지의 여부는 상기 "후천 약시"의 경우에서 공지되어 있지 않다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 30세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 20세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 18세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 15세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 14세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 13세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 12세 미

만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 10세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 8세 미만 연령이다. 일부 실시형태에서, 치료되는 인간은 6세 미만 연령이다.

[0322] 일부 안구 장애에서, 한 유형의 세포의 기능을 개선하는 것이 또 다른 유형의 세포의 기능을 개선하는 "너스 세포(nurse cell)" 현상이 존재한다. 예를 들어, 본 발명의 핵산에 의한 망막 중심의 RPE의 형질도입은 이후 간상체의 기능을 개선시킬 수 있고, 차례로 개선된 간상체 기능은 개선된 추상체 기능을 발생시킨다. 따라서, 한 유형의 세포의 치료는 또 다른 유형의 세포에서의 개선된 기능을 발생시킬 수 있다.

[0323] 특정 박터 및 조성물의 선택은 개별적 인간 병력 및 질환의 특징 및 치료되는 개체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다수의 다양한 요인에 좌우된다. 상기 특징의 평가 및 적절한 치료 요법의 계획은 궁극적으로 처방의의 책임이다.

[0324] 일부 실시형태에서, 치료를 받는 인간은 유전적 안구 장애(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이와 연관이 있음)를 갖고 있지만, 임상적 징후 또는 증상을 아직 나타내지 않고 있다. 일부 실시형태에서, 치료를 받는 인간은 안구 장애(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이와 연관이 있음)를 갖고 있다. 일부 실시형태에서, 치료를 받는 인간은 안구 장애(예를 들어, 심부 인트론 돌연변이와 연관이 있음)의 하나 이상의 징후 또는 증상을 나타내고 있다. 일부 실시형태에서, 심부 인트론 돌연변이가 치료를 받는 인간에서 확인되고 있다.

[0325] 본 발명의 조성물은 안구 장애의 치료를 위해 단독으로 또는 하나 이상의 부가적인 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 순차적인 투여 사이의 간격은 적어도 수분, 수시간 또는 수일(또는 대안적으로 이보다 미만)일 수 있다.

[0326] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가 치료제가 망막 또는 유리체에 투여(예를 들어, 유리체내 투여를 통함)될 수 있다. 추가 치료제의 비제한적인 예는 폴리펩티드 신경영양 인자(예를 들어, GDNF, CNTF, BDNF, FGF2, PEDF, EPO), 폴리펩티드 항-혈관신생 인자(예를 들어, sFlt, 안지오스탁틴, 엔도스탁틴), 항-혈관신생 핵산(예를 들어, siRNA, miRNA, 리보자임), 예를 들어, VEGF에 대한 항-혈관신생 핵산, 항-혈관신생 모르풀리노(morpholino), 예를 들어, VEGF에 대한 항-혈관신생 모르풀리노, 항-혈관신생 항체 및/또는 항체 단편(예를 들어, Fab 단편), 예를 들어, VEGF에 대한 항-혈관신생 항체 및/또는 항체 단편을 포함한다.

## VII. 키트

[0328] 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 핵산 및 바이러스 입자는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법들 중 일 방법에 사용되기 위해 설계된 키트 내에 함유될 수 있다.

[0329] 본 발명의 조성물, 핵산 및 바이러스 입자는 추가로 키트 내에 패키징될 수 있으며, 여기서, 이러한 키트는 사용 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 사용 설명서는 본원에 기재된 방법들 중 일 방법에 따른 지시사항을 포함한다.

[0330] 일부 실시형태에서, 키트는 완충제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 함유한다. 당 분야에 널리 공지된 바와 같이, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 약리학적으로 효과적인 물질의 투여를 촉진하는 비교적 비활성인 물질이며, 액체 용액 또는 혼탁액, 에멀젼, 또는 사용 전에 액체 중의 용해 또는 혼탁에 적합한 고체 형태로 공급될 수 있다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 일관성을 제공할 수 있거나, 희석제로 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 안정제, 습윤제 및 에멀젼화제, 오스몰농도를 변화시키기 위한 염, 캡슐화 작용제, pH 완충 물질, 및 완충제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 부형제는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 눈으로의 직접 전달에 적합한 임의의 약제학적 작용제를 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 소르비톨, 다양한 TWEEN 화합물 중 임의의 TWEEN 화합물, 및 액체, 예를 들어, 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 그 안에, 예를 들어, 광산염, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 설페이트 등; 및 유기산의 염, 예를 들어, 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등이 포함될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제의 충분한 논의는 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에서 이용 가능하다.

[0331] 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일, 예를 들어, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 낙화생유, 대두유, 광유 등일 수 있다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체, 특히 주사용 용액을 위한 액체 담체로서 이용될 수 있다. 추가 성분, 예를 들어, 보존제, 완충제, 진장성 작용제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤제 또는 정화제, 점도-증가제 등이 또한 이용될 수 있다. 본원에 기재된 키트는 단일 단위 투여량 또는 다중투여량 형태로 패키징될 수

있다. 키트의 함유물은 일반적으로 멸균 및 실질적으로 등장성 용액으로 제형화된다.

[0332] 실시예

[0333] 본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 더욱 충분히 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시 목적을 위한 것으로, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 암시될 것이고, 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되는 것이 이해된다.

[0334] 실시예 1: Crispr-Cas9 기술을 사용한 페베르 선천성 흑암시의 시험관내 모델의 생성

[0335] 방법

[0336] 플라스미드

[0337] SpCas9을 발현하는 pSpCas9 플라스미드를 Sigma(카탈로그 번호: CAS9P-1EA)사로부터 구매하였다. BGH polyA 내의 BbsI 제한효소 부위를, QuikChange Lightning 부위-특이적 돌연변이유발 키트(Stratagene) 및 한 쌍의 돌연변이유발 프라이머(SEQ ID NO: 28-29)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 제거하였다. U6 프로모터-BbsI:BbsI-sgRNA 스캐폴드-U6 종결자 카세트(SEQ ID NO: 30)를 GeneArt(Life Technologies)에 의해 합성하고, pSpCas9-BbsI 널(null) 플라스미드의 PciI 및 NruI 제한효소 부위 내에 삽입하여, pSpCas9(BB) 플라스미드를 생성하였다. 그런 다음, sgRNA 올리고(SEQ ID NO: 1-2)를 이전에 기재된 프로토콜에 따라 pSpCas9(BB) 플라스미드의 2개의 BbsI 제한효소 부위를 내로 서브클로닝하였다(Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308).

[0338] 뉴클레오팩션

[0339] pSpCas9(BB)-U6-sgRNA 플라스미드 DNA 2.5  $\mu$ g 및 ssODN(10 마이크로몰)(SEQ ID NO: 3) 5  $\mu$ l를, 4D-Nucleofector 시스템(Lonza) 내에서 Amaxa SF 세포주 4D-Nucleofector X 키트 L(Lonza) 및 프로그램 CM-130을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여  $1 \times 10^6$  개의 HEK 293FT 세포 내로 공동-형질감염시켰다.

[0340] 스크리닝

[0341] CEP290의 c.2991+1655A>G 돌연변이를 가진 클론을 확인하기 위해, 세포를, 공동-형질감염 후 48시간째에 단일 세포로 해리시키고, 0.5개 세포/100  $\mu$ l의 최종 농도까지 연속해서 희석시켜, 1개 웰 당 다수의 세포들이 존재할 가능성을 감소시켰다. 희석된 세포 100  $\mu$ l를 9개의 96웰 플레이트의 각각의 웰에 평판배양하였다. 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 인큐베이터에서 2주 동안 증식시켰다.

[0342] 235개의 단일 세포 클론을 확인하고, CEP290의 c.2991+1655A>G 돌연변이에 대해 스크리닝하였다. 유전체 DNA를, QuickExtract DNA 추출 용액(Epicentre)을 사용하여 추출하고, GoTaq Hot Start 그린 마스터 믹스(Promega) 및 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 PCR 프라이머(SEQ ID NO: 4-5)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물의 증폭을 하기 주기 파라미터를 이용하여 달성하였다: 2분 동안 95°C에서 1 주기; 30초 동안 95°C, 30초 동안 60°C, 및 3분 동안 72°C에서 35 주기; 15분 동안 72°C에서 1 주기. PCR 생성물을 SnaBI 분해 처리하고, 서열분석 프라이머(SEQ ID NO: 6)를 이용하여 Sanger 서열분석하였다.

[0343] RT-qPCR

[0344] mRNA를 WT, Het 및 MT 세포로부터 RNeasy Plus Mini 키트(Qiagen)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 추출하였다. 총 RNA 1  $\mu$ g을, iScript cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 cDNA를 합성하는 데 사용하였다. cDNA를, ABI Prism 7500 Real Time PCR 시스템(Applied Biosystem) 상에서, Fast Plus Evagreen qPCR 마스터 믹스를 저(low) ROX(Biotium), 및 각각 야생형 CEP290 mRNA(SEQ ID NO: 7 및 8) 및 돌연변이체 CEP290 mRNA(SEQ ID NO: 9 및 10)를 특이적으로 검출하는 프라이머와 함께 함유하는 완충제 내에서 실시간 PCR 증폭시켰다. 하기 조건을 사용하였다: 2분 동안 50°C에서 1 주기; 10분 동안 95°C에서 1 주기; 15초 동안 95°C 및 60초 동안 60°C에서 40 주기. 증폭 생성물의 특이성을, 15초 동안 95°C, 60초 동안 60°C, 15초 동안 95°C, 및 15초 동안 60°C에서의 주기를 사용한 각각의 진행의 종료 시 수행된 용융 곡선 분석으로부터 확인하였다. 데이터를 SDS 2.3 소프트웨어(Applied Biosystem)를 사용하여 분석하였다. CEP290 발현 수준을 PPIA mRNA(프라이머 서열에 대해서는 SEQ ID NO: 31 및 32 참조)의 발현 수준에 대해 정상화하였다.

[0345] 웨스턴 블로트 분석

[0346]

세포를, 1 밀리몰/리터의 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF; Cell Signaling Technology) 및 1X 프로테아제 저해제 카테일(Cell Signaling Technology)이 보충된 RIPA 용해 완충제(Cell Signaling Technology)에서 얼음 상에서 용해시켰다. 그런 다음, 세포를 긁어 내고, 에펜도르프 튜브에 수합한 다음, 용해질을 4°C, 13,000 rpm에서 6분 동안 원심분리에 의해 정화시켰다. 시료를, NuPage 4X LDS 시료 완충제 및 NuPage 10X 환원제(둘 모두 Life Technologies사 제품)를 첨가하고, 70°C에서 10분 동안 가열한 다음, 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 함으로써 제조하였다. 단백질 시료를 NuPAGE 3-8% Tris-아세테이트 겔 상에 HiMark 예비-염색된 단백질 표준(둘 모두 Life Technologies사 제품)과 함께 로딩하였다. 시료를 180 볼트에서 1시간 동안 겔 전기영동을 통해 분해시켰다. 사용된 러닝 완충제는 Tris-아세테이트 SDS 러너 완충제(Life Technologies)이었다. 트랜스퍼를 위해, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막을 메탄올에서 간단히 처리하고, 물로 헹구어서, 친수성으로 만들었다. 트랜스퍼 개재물(sandwich)을, XCell II Blot Module(Life Technologies)에서 PVDF 막 및 겔을 필터 페이퍼와 스펜지 사이에 개재함으로써 제조하였다. 사용된 트랜스퍼 완충제는 20% 메탄올을 함유하는 NuPage 20X 트랜스퍼 완충제(Life Technologies)이었다. 트랜스퍼를 XCell SureLock Mini-Cell(Life Technologies)에서 30 볼트에서 2시간 동안 수행하였다. 트랜스퍼 후, PVDF 막을, 1% 탈지 분유를 함유하는 Pierce TBST 완충제(Tween 20 세제를 포함하는 Tris-완충 식염수; Thermo Fisher Scientific)에서 블록킹(blocking)시키고, 실온에서 1시간 동안 진탕시켰다. 그런 다음, 블록을 4°C에서 밤새 요동시키면서, 블록(block) 용액중에 제조된 1차 항체에서 인큐베이션시켰다. 사용된 1차 항체는 토키 폴리클로날 항-CEP290 항체(미국 우스터 소재의 메사추세츠 대학교의 하먼트 칸나(Hemant Khanna) 교수로부터 친절하게 제공받음), 마우스 모노클로날 항-Cas9 항체(클론 7A9; Millipore), HRP 컨쥬게이트된 토키 모노클로날 항-β-액틴 항체(클론 13E5; Cell Signaling Technology)이다. 결합되지 않은 1차 항체를 매회 TBST로 10분 동안 3회 세척하였다. 그런 다음, 블록 용액 중 2차 항체(Alexa Fluor 647 컨쥬게이트된 항-토끼 또는 항-마우스 IgG; Cell Signaling Technology)를 막에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 진탕기 상에서 유지시켰다. 막을 매회 TBST로 10분 동안 3회 세척하여, 비-특이적 백그라운드를 감소시켰다. 막을 Pierce 증강 화학발광(ECL) 웨스턴 블롯 기질(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 4분 동안 발색시켰다. 필름을 Kodak X-OMAT 2000 프로세서에서 다양한 시간 간격 동안 노출시킴으로써 블롯 내의 단백질 밴드를 최종적으로 가시화하였다. 항-β-액틴 항체에 대한 블록을 재탐침(reprobe)하기 위해, 막을 우선 Restore 웨스턴 블롯 스트라이핑 완충제(Thermo Fisher Scientific)에서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시킴으로써 벗겨 낸 다음, 항-β-액틴 항체를 이용하여 재탐침하였다. 이 작업에서 나타난 블로팅 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험들을 대표한다.

[0347]

## 결과

[0348]

우선, CRISPR-Cas9 유전체 편집 기술을 사용하여, CEP290에 인트론 스플라이스 돌연변이 c.2991+1655 A>G를 운반하는 세포 모델을 생성하였다. 이 세포 모델은 CEP290에 c.2991+1655 A>G 돌연변이를 가진 LCA 환자의 치료를 위한 치료제를 평가하기 위한 중요한 툴이다.

[0349]

박테리아 유형 II CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 유전체 편집은, sgRNA 표적 서열 및 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 의해 한정된 표적화된 유전체 유전자좌에서 이중 가닥 절단부(DSB)의 도입, 및 후속해서 상동성 인도복구(HDR) 또는 비-상동성 말단-접합(NHEJ)을 통한 DSB의 복구에 의해 개시된다(Jinek, M. et al. (2012) *Science* 337:816-821; Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308). HDR 주형의 존재 시, CRISPR-Cas9 시스템은 HDR 공정을 통해 표적화된 유전자좌에 정확하고 한정된 변형을 발생시키는 데 사용될 수 있다.

[0350]

표적화된 유전체 DNA 대체를 수득하기 위해, 선형 HDR 주형과 함께 sgRNA 및 애스. 피오게네스 Cas9(SpCas9)을 둘 모두 발현하는 플라스미드를 뉴클레오팩션을 통해 293FT 세포 내에 도입하였다. HDR 주형은 돌연변이화된 PAM(c.2991+1666C>G)과 함께 c.2991+1655A>G 돌연변이의 측면에 존재하는 75 bp의 상동성 아암을 함유하는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드(ssODN; SEQ ID NO: 3)이다. 돌연변이화된 PAM은 세포에서 공여체 ssODN이 Cas9에 의해 분해되는 것을 피하고, 한편으로는 독특한 SnaBI 제한효소 부위를 CEP290의 인트론 26에 도입할 것이다.

[0351]

CEP290의 c.2991+1655A>G 돌연변이를 운반하는 세포를 수득하기 위해, 235개의 단일 세포 클론을 단리하고, sgRNA/SpCas9 및 ssODN 공동-형질감염된 세포로부터 스크리닝하였다. 유전체 DNA를 추출하고, 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 PCR 프라이머(SEQ ID NO: 4-5)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물을 SnaBI 분해 처리하고, 서열분석 프라이머(SEQ ID NO: 6)를 이용하여 Sanger 서열분석하였다.

[0352]

235개의 단일 세포 클론 중에서, 하나의 클론은 CEP290 대립유전자 둘 모두 상에 c.2991+1655A>G 및 c.2991+1666C>G 돌연변이를 함유하였다(이하 "돌연변이체 세포" 또는 "MT 세포"로 지칭됨). 또 다른 클론은 하

나의 *CEP290* 대립유전자 상에 2개의 돌연변이, 및 또 다른 대립유전자 상에 내인성 야생형 *CEP290* DNA를 함유하였다(이하 "이종성 세포" 또는 "Het 세포"로 지칭됨). 내인성 야생형 *CEP290*의 2개의 대립유전자를 함유한 세포는 이하 "야생형 세포" 또는 "WT 세포"로 지칭된다.

[0353] 야생형 세포, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* mRNA 및 돌연변이체 *CEP290* mRNA의 발현 수준을, 야생형 *CEP290* mRNA(SEQ ID NO: 7 및 8) 및 돌연변이체 *CEP290* mRNA(SEQ ID NO: 9 및 10)를 각각 특이적으로 검출하는 프라이머를 사용하여 리버스 전사 정량적 PCR (RT-qPCR)에 의해 측정하였다. 결과를 *PPIA* mRNA(SEQ ID NO: 31 및 32)의 발현 수준에 대해 정상화하였다.

[0354] 야생형 세포와 비교하여, 야생형 *CEP290*의 mRNA 수준은 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 각각 27% 및 48%만큼 감소하였다(도 3a). 예상된 바와 같이, 야생형 세포는 돌연변이체 *CEP290* mRNA를 발현하지 않은 반면, 이의 수준은 이종성 세포에서보다 돌연변이체 세포에서 24% 더 높았다(도 3b). 이종성 세포와 비교하여, 돌연변이체 세포는 상당히 더 낮은 수준의 야생형 *CEP290* mRNA 및 상당히 더 높은 수준의 돌연변이체 *CEP290* mRNA를 발현하였다. 따라서, 이러한 세포 모델은 c.2991+1655 A>G 돌연변이를 운반하는 LCA 환자에서 표현형을 반복하는데 (recapitulate), 이들 환자가 약 50% 감소된 수준의 야생형 *CEP290* mRNA를 발현하기 때문이다(den Hollander, A.I. et al. (2006) *Am. J. Hum. Genet.* 79:556-561).

[0355] 야생형 세포, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 *CEP290*의 단백질 수준을 웨스턴 블로트 분석에 의해 검사하였다. 야생형 세포와 비교하여, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 *CEP290* 단백질 수준은 크게 감소되었다(도 3c). 돌연변이체 세포는 이종성 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 *CEP290* 단백질을 발현하였다(도 3c). 따라서, 면역블로트 데이터는 RT-qPCR 데이터와 일치한다.

[0356] 실시예 2: c.2991+1655 A>G 돌연변이의 표적화된 결실

방법

플라스미드

[0359] 올-인-원 발현 벡터를, 이전에 기재된 바와 같이 골든 게이트(Golden Gate) 클로닝 방법에 의해 구축하였다 (Sakuma, T. et al. (2014) *Sci. Rep.* 4:5400). 간단히, U6 프로모터-BbsI:BbsI-sgRNA 스캐폴드-U6 종결자-CMV 프로모터(SEQ ID NO: 33)를 함유하는 DNA 단편을 GeneArt(Life Technologies)에 의해 합성하고, 상기 기재된 pSpCas9-BbsI 널 플라스미드의 PciI 및 NheI 제한효소 부위 내에 삽입하여, pSpCas9(BBU) 플라스미드를 생성하고, 이 플라스미드를 상류 sgRNA 가이드 서열을 서브클로닝하는 데 사용한다. 하류 sgRNA 가이드 서열을 서브클로닝하는 데 사용되는 pSpCas9(BBD) 플라스미드를 구축하기 위해, 퓨전 하이-피밸리티 DNA 중합효소(New England BioLabs Inc)를 DNA 주형으로서 pSpCas9(BB) 플라스미드 DNA 및 한 쌍의 PCR 프라이머(SEQ ID NO: 34-35)와 함께 사용함으로써 PCR 반응을 수행하였다. 주기 파라미터는 다음과 같았다: 1분 동안 98°C에서 1 주기; 20초 동안 98°C 및 30초 동안 72°C에서 35 주기; 5분 동안 72°C에서 1 주기. PCR 생성물을 pSpCas9(BBU) 플라스미드의 PciI 및 KpnI 부위 내에 삽입하였다. 이러한 pSpCas9(BBD) 플라스미드에서, 2개의 BsaI 부위는 U6 프로모터-구동 sgRNA의 측면에 존재한다. 이전에 기재된 프로토콜에 따라, U1 sgRNA 올리고(SEQ ID NO: 11-12)를 어닐링한 다음, pSpCas9(BBU) 플라스미드의 2개의 BbsI 제한효소 부위 내로 서브클로닝하고, D1, D2 및 D3 sgRNA 올리고(SEQ ID NO: 13-18)를 어닐링한 다음, pSpCas9(BBD) 플라스미드의 2개의 BbsI 제한효소 부위 내에 서브클로닝하였다(Ran, F.A. et al. (2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308). 생성된 D1-D3 sgRNA를 U6 프로모터와 함께, 제한 효소 BsaI를 사용하여 pSpCas9(BBD) 플라스미드로부터 추가로 절단한 다음, pSpCas9(BBU)-U1 sgRNA 플라스미드 내의 2개의 BsaI 부위 내에 서브클로닝하였다. 생성된 pSpCas9(BBUD) 플라스미드는 2개의 U6 프로모터-구동 sgRNA 및 1개의 CMV 프로모터-구동 SpCas9를 발현한다. 2개의 대조군 sgRNA에 대한 올리고(SEQ ID NO: 36-39)를, 상기 기재된 방법을 사용하여 대조군 플라스미드와 동일한 올-인-원 발현 벡터의 BbsI 제한효소 부위 내에 서브클로닝하였다.

[0360] 형질감염 및 PCR 분석

[0361] 페어드 sgRNAs-SpCas9 플라스미드를 Lipofectamine 3000 형질감염 시약(Life Technologies)을 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 야생형 세포, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포 내에 형질감염시켰다.

[0362] 형질감염 후 48시간째에, 유전체 DNA를 QuickExtract DNA 추출 용액(Epicentre)을 사용하여 세포로부터 추출하고, GoTaq Hot Start 그린 마스터 믹스(Promega) 및 인트론 돌연변이의 측면에 존재하는 PCR 프라이머(SEQ ID NO: 4-5)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물의 증폭을 하기 주기 파라미터를 이용하여 달성하였다: 2분 동안 95°C에서 1 주기; 30초 동안 95°C, 30초 동안 60°C, 및 3분 동안 72°C에서의 35 주기; 15분 동안 72°C에서 1 주

기. 그런 다음, PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동 처리하였다.

[0363] **차세대 서열분석(NGS)**

상기에서 획득된 PCR 생성물을 NGS 서열분석을 위해 ACGT(Wheeling, IL)에 보냈다. 시료 DNA를 초음파처리에 의해 평균 350 bp의 표적 단편 크기로 단편화하고, Illumina TruSeq DNA PCR-무함유 시료 제조 키트를 사용하여 서열분석 라이브러리를 구축하는 데 사용하였다. 이러한 라이브러리를 Qubit 및 2100 Bioanalyzer를 통해 정량화하고, Illumina 플랫폼 상에 로딩하여, PE150 판독물을 생성하였다. 1개 시료 당 대략 150 K 판독물(±20%)이 생성되었다. 무가공(raw) Illumina를 텔-멀티플렉스(de-multiplexed)시키고, .fastq 포맷으로 전환한 다음, 저품질(Q<20) 및 짧은 판독(N<50)을 여과하였다. 여과된 판독물을 Bowtie2를 사용하여 참조 서열(야생형 DNA 및 절단형 DNA)에 대해 정렬하였다. 정량화를 위해, 야생형 DNA 또는 절단형 DNA에 독특한 U1 sgRNA 절단 부위(절단 부위 앞 20 bp 및 절단 부위 뒤 20 bp)의 측면에 존재하는 40 bp 서열에 정렬된 판독물의 수를 사용하여, 각각의 시료 내 야생형 DNA 및 절단형 DNA의 백분율을 계산하였다.

[0365] **결과**

[0366] 다음, 상기 기재된 모델을 사용하여, c.2991+1655 A>G 돌연변이의 표적화된 결실을 생성하기 위한 접근법을 시험하였다.

[0367] 크립틱 엑손 내 유전자좌를 표적화하는 1개의 상류 sgRNA(U1, SEQ ID NO: 19)를, SpCas9과 동일한 벡터 내에서 3개의 하류 sgRNA(D1, D2, D3; SEQ ID NO: 20-22) 각각과 함께 발현시켰다. 상류 및 하류 sgRNA의 쌍은 모두 c.2991+1655A>G 돌연변이의 측면에 존재하고, 이전의 연구들이 페어드 sgRNA-유도 유전체 결실의 복구가 대체로 정확한 말단 접합에 의해 달성된다고 언급하였으므로 각각 283 bp, 187 bp 및 231 bp의 유전체 결실을 생성하는 것으로 예측된다(Brandl, C. et al. (2014) *FEBS Open Bio.* 5:26-35; Zheng, Q. et al. (2014) *Biotechniques* 57:115-124). 2개의 대조군 sgRNA를 대조군과 동일한 플라스미드 내에 서브클로닝하였다.

[0368] 페어드 sgRNAs-SpCas9 플라스미드를 상기 기재된 바와 같이 야생형 세포, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포 내에 형질감염시킨 다음, 결실 영역의 측면에 존재하는 프라이머(SEQ ID NO: 4-5)를 사용하여 PCR 분석하였다. 야생형 및 절단형 유전체 단편들을 겔 전기영동에 의해 분해하였다. 모든 3개의 시험된 상류/하류 sgRNA 쌍들에 대해 PCR 생성물이 검출되었으며, 상기 검출은 예상된 유전체 결실의 존재를 가리키며, 이러한 유전체 결실은 대조군 sgRNA-형질감염된 세포에서는 존재하지 않았다(도 4a). 이들 결과는, 페어드 sgRNA 및 SpCas9이 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거할 수 있음을 나타낸다. 돌연변이체 세포로부터 제조된 4개의 PCR 시료들의 차세대 서열분석(NGS) 분석은, 60.7%, 65.9% 및 72.4% NGS 판독물이 각각 U1D1-형질감염된 세포, U1D2-형질감염된 세포 및 U1D3-형질감염된 세포에서 절단형 DNA와 정렬되었음을 추가로 보여주었다. 따라서, 3개의 sgRNA 쌍들 및 SpCas9은 모두 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거하는 데 고도로 효율적이다.

[0369] 페어드 sgRNA가 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* 발현 수준을 구제할 수 있었음을 확인하기 위해, 야생형 세포, 이종성 세포 및 돌연변이체 세포를, 페어드 sgRNA 및 SpCas9을 발현하는 플라스미드를 이용하여 형질감염시킨 다음, 상기 기재된 바와 같이 *CEP290* mRNA에 대해 RT-qPCR 분석하였다. 결과를 *PPIA* mRNA의 발현 수준에 대해 정상화하였다.

[0370] 대조군 sgRNA와 비교하여, sgRNA 쌍, 특히 U1D3 쌍은 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 크게 구제하였으며(도 5a), 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 감소시켰다(도 5b). 중요하게는, 3개의 sgRNA 쌍들 중 어느 것도 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 유의하게 변화시키지 않았으며(도 5a), 이는, 표적화된 유전체 결실이 *CEP290* 전사체의 정상적인 스플라이싱을 방해하지 않았음을 제시한다. U1D3 sgRNA 쌍은 이종성 세포 및 돌연변이체 세포에서의 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 야생형 세포에서의 수준과 유사한 수준까지 크게 구제하였다(도 5a). U1D2 sgRNA 쌍은 또한, 이종성 세포에서 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 증가시켰다(도 5a). 3개의 sgRNA 쌍들은 모두 이종성 세포에서 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 감소시켰다(도 5b). U1D2 및 U1D3 sgRNA의 쌍은 MT 세포에서 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 감소시켰다(도 5b).

[0371] 페어드 sgRNA가 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* 단백질 발현을 구제할 수 있었는지 확인하기 위해, 돌연변이체 세포를 페어드 sgRNA 및 SpCas9을 이용하여 형질감염시킨 다음, 상기 기재된 바와 같이 웨스턴 블로트 분석 처리하였다. 대조군 sgRNA와 비교하여, 3개의 sgRNA 쌍들은 모두 *CEP290* 단백질 발현을 구제하였다(도 5c).

[0372] 종합하자면, 이들 데이터는, 상류/하류 sgRNA 쌍, 특히 U1D3 쌍이 돌연변이체 크립틱 엑손의 스플라이싱을 방지하고 야생형 *CEP290* 발현을 복구시키는 데 고도로 효율적임을 나타낸다. 이들 결과는, Cas9과 커플링된 가이드 RNA의 쌍이, *CEP290* mRNA 내에 삽입된 크립틱 엑손의 스플라이싱을 방지하기 위해 *CEP290*의 c.2991+1655 A>G

돌연변이의 측면에 존재하는 인트론 영역을 영구적으로 결실시킬 수 있음을 나타낸다.

[0373] **실시예 3: SpCas9 지속 시간을 제한하기 위한 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템의 개발**

[0374] **방법**

[0375] **플라스미드**

[0376] AAV 패키징 플라스미드 pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA를 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템에 대해 구축하였다. 간단히, CMV 프로모터로부터 유래된 최소 프로모터 단편(minCMV 프로모터)(SEQ ID NO: 56)을 함유하는 DNA 단편을 GeneArt(Life Technologies)에 의해 합성하고, 상기 기재된 Sigma pSpCas9 플라스미드의 MluI 및 ApoI 제한 효소 부위 내에 삽입하여, pminCMV-SpCas9-NLS-BGH pA 플라스미드를 생성하였다. 이후, SV40 조기 poly(A) 신호(SV40 pA)(SEQ ID NO: 57)를 함유하는 DNA 단편을 GeneArt(Life Technologies)에 의해 합성하고, 상기 플라스미드의 XhoI 및 BbsI 제한효소 부위 내에 삽입하여, pminCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA 플라스미드를 생성하였다. 마지막으로, minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA 단편을 AAV 패키징 플라스미드 내로 서브클로닝하여, pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA를 생성하였다.

[0377] 자가-제한 pSpCas9 플라스미드를 구축하기 위해, SpCas9 뉴클레아제에 대한 인지 서열(U1 및 D3 sgRNA 표적 서열 + 상응하는 PAM 모티프; SEQ ID NO: 58 및 59)을 삽입 부위 1(minCMV 프로모터와 SpCas9 사이) 및/또는 삽입 부위 2(SpCas9-핵 국소화 신호(NLS)와 SV40 poly(A) 신호 사이) 내에 서브클로닝하였다.

[0378] 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템에 대한 제2 AAV 패키징 플라스미드는 pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA-BGH pA이다. 이 플라스미드를 구축하기 위해, U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA 단편을 제한 효소 PciI 및 KpnI를 사용하여 pSpCas9(BBUD)-U1D3 플라스미드로부터 절단한 다음, AAV 패키징 플라스미드의 EcoRV 및 KpnI 부위 내로 서브클로닝하여, pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA 플라스미드를 생성하였다. AAV 역가 확인을 위해, BGH pA 단편(SEQ ID NO: 60)을 이 플라스미드의 SpeI 및 HindIII 부위 내로 클로닝하였다.

[0379] **결과**

[0380] CRISPR-Cas9은 유전체 편집에 강력한 툴이지만, 박테리아 단백질 Cas9의 발현이 어떻게 환자에서 관용적일지는 명확하지 않다. CRISPR-Cas9은 신속하게(수시간 내지 수일) 작용하고, 세포에서의 이의 연장된 존재는 필요하지 않다. 원치 않는 면역 반응 및 잠재적인 안전성 문제점은 외인성 단백질의 연장된 발현에 의해 유발될 수 있다. 예를 들어, 외인성 마커 단백질인 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현은 실질적인 원치 않는 면역학적 반응을 야기할 수 있다(Stripecke R *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:1305-1312). 또한, 최근의 보고는, CRISPR-Cas9의 생체내 전달 후, Cas9에 대한 체액성 면역반응 및 Cas9-특이적 세포성 면역 반응의 잠재적인 존재의 유도가 존재한다고 제시하였다(Wang, D. *et al.* (2015) *Hum. Gene Ther.* 26:432-442). 따라서, Cas9 단백질에의 노출이 제한되는 "히트 앤드 고우(hit and go)" 접근법은 CRISPR-Cas9의 생체내 전달에 유익할 수 있다. 이러한 "히트 앤드 고우" 접근법은 또한, 이러한 접근법이 Cas9과 의도치 않은 표적 사이의 상호작용 시간을 감소시킬 것이기 때문에 표적외 효과를 감소시킬 수 있다.

[0381] 이를 위해, 본 발명자들은, sgRNA(들)에 대한 인지 부위(들)를 SpCas9 벡터 자체 내에 혼입시켜 SpCas9 발현이 시작한 후 얼마 지나지 않아 벡터가 절단되고 파괴되게 함으로써, SpCas9 지속 시간을 제한하기 위해 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템을 개발하였다. 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템은 2개의 벡터: sgRNA 쌍 U1 및 D3를 발현하는 pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA 벡터, 및 minCMV 프로모터-구동 SpCas9을 발현하는 pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA 벡터를 포함한다. U1 및/또는 D3 sgRNA에 대한 인지 서열(표적 서열 + 상응하는 PAM 모티프)은 제2 벡터 내의 2개의 삽입 부위들 중 1개 또는 2개 내에 혼입된다. 삽입 부위 1은 minCMV 프로모터와 SpCas9 코딩 서열 사이에 위치하고, 삽입 부위 2는 핵 국소화 신호(NLS)와 SV40 poly(A) 신호 사이에 위치한다(도 6a). 따라서, 이러한 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템에서, U1 및 D3 sgRNA는 자가-제한 SpCas9 벡터 자체의 표적화된 유전체 결실 및 절단 둘 모두를 위해 SpCas9 단백질을 가이드할 것이며, 이는 벡터가 과량의 SpCas9 단백질을 제조하는 것을 방지할 것이다.

[0382] 시험관내에서 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템을 시험하기 위해, 돌연변이체 세포를 상기 기재된 2개의 벡터를 이용하여 형질감염시킨 다음, 상기 기재된 바와 같이 CEP290 mRNA에 대해 웨스턴 블롯 분석(도 6b), 유전체 DNA PCR(도 6c) 및 RT-qPCR 분석(도 6d 및 도 6e)을 수행하였다.

[0383] 단일 sgRNA 인지 서열(U1T 또는 D3T; SEQ ID NO: 58 및 59)을 자가-제한 SpCas9 벡터 내에 삽입하였을 때, SpCas9 단백질 수준은 sgRNA 인지 서열을 함유하지 않는 대조군 SpCas9 벡터와 비교하여 크게 감소되었다(도

6b). 2개의 U1T, 2개의 D3T 또는 조합된 D3T 및 U1T를 자가-제한 SpCas9 벡터 내에 삽입하였을 때, SpCas9 단백질 수준은 대체로 폐지되었다(도 6b). 따라서, 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템은 SpCas9 발현을 효과적으로 제한할 수 있다.

[0384] 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템이 여전히, 표적화된 유전체 결실을 유도하고 LCA10 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거할 수 있는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 이중 벡터-형질감염된 돌연변이체 세포에서 유전체 DNA PCR 분석을 수행하였다(도 6c). 절단형 DNA에 상응하는 PCR 랜드는 대조군 SpCas9 벡터-형질감염된 세포 및 자가-제한 SpCas9 벡터-형질감염된 세포 둘 모두에 존재하였으며, 이는, 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템이 SpCas9의 짧은 지속 시간에도 불구하고 여전히 LCA10 인트론 돌연변이를 제거할 수 있음을 제시한다. 도 6c에서 관찰된 유전체 결실이 도 4a에서 관찰된 결실만큼 강력하지 않았다는 것은 주목할 만하다. 이는 이들 2개의 연구에서 상이한 실험 조건들로 인한 것일 수 있었다. 우선, 본 발명자들은 도 4a에서 올-인-원 벡터를 사용하였으며, 도 6c에서 이중 벡터를 사용하였다. 둘째로, SpCas9 발현은 도 4a에서 CMV 프로모터에 의해 구동되었으며, 도 6c에서 minCMV 프로모터에 의해 구동되었다.

[0385] 다음, 본 발명자들은 이중 벡터에 의해 형질감염된 돌연변이체 세포에서 야생형 및 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 검사하였다. U1D3 sgRNA 단독(대조군)과 비교하여, 대조군 SpCas9 벡터는 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 구제하였다(도 6d). 유사하게는, 삽입 부위에 D3 sgRNA 인지 서열을 함유하는 SpCas9 벡터는 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 증가시켰다(도 6d). 다른 자가-제한 SpCas9 벡터 또한, 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 증가시켰지만, 대조군과 비교하여 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다(도 6d). 또한, 모든 자가-제한 SpCas9 벡터 및 대조군 SpCas9 벡터들은 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 감소시켰다(도 6e).

[0386] 종합하자면, 이들 데이터는, 자가-제한 Crispr-Cas9 시스템이 SpCas9 지속 시간을 제한하며, LCA10 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거하고, 야생형 *CEP290* 발현을 구제하며, 돌연변이체 *CEP290* 발현을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[0387] 실시예 4: 마우스 망막에서 마우스 *Cep290* 유전자의 인트론 영역의 표적화된 결실

방법

플라스미드

[0389] 본 발명자들은 마우스 망막에서 표적화된 유전체 결실에 대한 이중 AAV 시스템을 사용하였다. 제1 AAV는 상기 기재된 바와 같이 AAV 패키징 플라스미드 pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA를 이용하여 생성한다. 제2 AAV는 AAV 패키징 플라스미드 pAAV-U6-U11 sgRNA-U6-D11 sgRNA-RK-EGFP-BGH pA를 이용하여 생성한다. 이러한 플라스미드를 구축하기 위해, U11 sgRNA 가이드 서열(SEQ ID NO: 61) 및 D11 sgRNA 가이드 서열(SEQ ID NO: 62)을 상기 기재된 바와 같이 pSpCas9(BBUD) 플라스미드 내에 서브클로닝하여, pSpCas9(BBUD)-U11D11 플라스미드를 생성하였다. RK 프로모터-EGFP-BGH pA 단편(SEQ ID NO: 63)을 이 플라스미드의 KpnI 및 XhoI 부위 내에 삽입한 다음, 전체 U6-U11 sgRNA-U6-D11 sgRNA-RK-EGFP-BGH pA 카세트를 제한 효소 PciI 및 PmeI를 사용하여 이러한 플라스미드로부터 절단한 다음, 상기 기재된 AAV 패키징 플라스미드의 BamHI and SphI 부위 내로 서브클로닝하여, 최종 플라스미드를 생성하였다. 대조군 플라스미드 pAAV-RK-EGFP-BGH pA를 또한 생성하였다.

[0391] AAV 생성

[0392] 재조합 AAV 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 인간 배아 신장 암종 293 세포(HEK-293)의 삼중 형질감염에 의해 생성하였다(Xiao, X. et al. (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232). 간단히, AAV 패키징 플라스미드, 혈청형 2 유래의 rep 유전자 및 혈청형 5 유래의 캡시드 유전자를 함유하는 플라스미드, 및 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드(Stratagene)를 사용하였다. 형질감염 후 72시간째에 바이러스를 수합하고, AVB Sepharose 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare)에 의해 정제하였다. AAV 벡터의 유전체 카피(GC) 역가를 이전에 기재된 바와 같이 TaqMan-based 정량적 PCR 분석(Applied Biosystem)에 의해 확인하였다(Gerits, A. et al. (2015) *Neurophotonics*. 2:031209).

동물

[0394] Jackson Laboratories(미국 메인주 바 바허 소재)사로부터 8주령 내지 10주령의 암컷 C57BL/6J 마우스를 구입하고, Sanofi의 비바리움(vivarium)에서 유지시켰다. 연구 기간 동안 동물들이 먹이 및 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 모든 동물 시술을 동물 복지법(Animal Welfare Act), 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침, 실험 동

물 복지 위원회에 부응하여, 안과 및 시력 연구에서의 동물의 사용에 대한 ARVO 성명에 따라 수행하였다.

**[0395] 망막하 AAV 주사**

마우스를, 노즈콘(nose cone)을 통해 동물에게 전달되는 산소 800 ml/min에서 수행된 3.5% 이소플루란을 사용하여 진정시켰다. 트로피카마이드(Tropicamide)(Alcon, 미국 텍사스주 포트워스 소재)를 국소 적용하여 마우스에서 동공 확대(mydriasis) 및 모양근 마비(cycloplegia)를 유도하였다. 파일럿 절개(pilot incision)를 각막에 만들었으며, 33 게이지 블런트 팁트 바늘(blunt tipped needle)을 절개부를 통해 인도하고, 팁이 후방 신경감각 망막을 침투할 때까지 홍채와 수정체 피막 사이에서 후방으로 전진시켰다. AAV5-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA(도 7a에서 AAV5-SpCas9)의  $1 \times 10^9$  개 바이러스 유전체 입자, 및 AAV5-U6-U11 sgRNA-U6-D11 sgRNA-RK-EGFP-BGH pA(도 7a에서 AAV5-U11D11-RK-EGFP) 또는 대조군 AAV5-U6-RK-EGFP-BGH pA(도 7b에서 AAV5-RK-EGFP)의  $1 \times 10^9$  개 바이러스 유전체 입자를 각각의 마우스의 OS 눈에  $1 \mu\text{l}$ 의 부피로 1초에 걸쳐 전달하였다. 바늘을 후퇴시키기 전에 대략 5초 동안 그 위치에서 유지시켰다. 동물을 케이지에 돌려 보내기 전에 마취에서 회복되도록 하였다.

**[0397] 망막에서의 EGFP 발현을 주사 후 2주 내지 4주째에 Micron IV 망막 현미경(Phoenix Research Labs)을 사용하여 살아 있는 동물에서 평가하였으며, EGFP 발현이 결여된 마우스를 연구에서 배제하였다. 모든 동물들을 주사 후 4주째에 안락사시켰다.**

**망막 절개**

마우스 눈을 적출하고, 인산염-완충 식염수(PBS)에 넣었다. 망막을 해부 현미경 하에 미세해부 가위를 이용하여 단리하였다. 망막 색소 상피(RPE) 층을 조심스럽게 제거하였다.

**유전체 DNA 발현 및 PCR 분석**

망막을, 무선 모터(VWR)에 의해 동력을 받는 막자에서 QuickExtract DNA 추출 용액(Epicentre) 내에서 균질화하였다. 유전체 DNA를 제조업체(Epicentre)의 지시사항에 따라 추출하였으며,  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 까지 희석시킨 다음, GoTaq Hot Start 그린 마스터 믹스(Promega) 및 결실된 영역의 측면에 존재하는 PCR 프라이머(SEQ ID NO: 64 및 65)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물의 증폭을 하기 주기 파라미터에 의해 달성하였다: 2분 동안 95°C에서 1 주기; 30초 동안 95°C, 30초 동안 62°C, 및 2분 동안 72°C에서의 35 주기; 12분 동안 72°C에서 1 주기. 그런 다음, PCR 생성물을 아가로스 젤 전기영동 처리하였다.

**결과**

**[0403] LCA10의 세포 모델에서의 본 발명자들의 연구는, 시험관내에서 LCA10 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거하기 위한 본 발명자들의 페어드 sgRNA 및 SpCas9 접근법의 효율을 지지하였다. 이후, 본 발명자들은 생체내 설정에서 본 발명자들의 CRISPR-Cas9 접근법을 평가하였다. 현재 LCA10 인트론 스플라이스 돌연변이에 의해 유발된 크립틱 엑손을 발현하는 동물 모델이 존재하지 않기 때문에, 본 발명자들은, SpCas9과 함께 sgRNA의 쌍이, c.2991+1655A>G 돌연변이가 위치하는 인간 CEP290 유전자의 인트론 26과 상동성인 마우스 Cep290 유전자의 인트론 25에서 표적화된 유전체 결실을 유도할 수 있는지 시험하였다.**

본 발명자들은 AAV 벡터의 낮은 면역원성 및 소정의 세포 유형들의 선호적인 감염을 허용하는 혈청형 범위 때문에, 생체내 유전자 전달을 위해 AAV 벡터를 사용하기로 결정하였다. CEP290 돌연변이에 의해 가장 감염되는 망막 세포는 광수용체이고, 이전의 연구들은, AAV 혈청형 5(AAV5)가 망막하 주사에 의해 광수용체에 효율적으로 형질도입할 수 있었음을 보여주었다(Boye, S.E. et al. (2012) *Hum. Gene Ther.* 23:1101-1115). 따라서, 본 발명자들은 SpCas9 및 페어드 sgRNA를 광수용체에 전달하기 위해 AAV5를 사용하기로 결정하였다.

**[0405] AAV 벡터(대략 4.8 kb)의 낮은 패키징 능력 및 4.1 kb에서 측정되는 SpCas9 코딩 서열의 길이로 인해(아미노산 서열에 대해서는 SEQ ID NO: 40 참조), 1개의 SpCas9 구성성분 및 2개의 U6-sgRNA 구성성분들을 단일 AAV 벡터에 패키징하는 것은 어렵다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명자들의 생체내 결증 연구를 위해 이중 AAV 시스템을 사용하였다(도 7a). 제1 AAV 벡터는 상류 sgRNA U11(SEQ ID NO: 61) 및 하류 sgRNA D11(SEQ ID NO: 62), 뿐만 아니라 로돕신 키나제(RK) 프로모터-구동 EGFP 리포터 유전자를 발현하는 AAV5-U11D11-RK-EGFP이다. U11 및 D11 sgRNA 쌍은 마우스 Cep290 유전자의 인트론 25에서 557 bp의 유전체 결실을 생성하는 것으로 예측된다. 대조군 AAV AAV5-RK-EGFP를 또한 생성하였다. 제2 AAV 벡터는 minCMV 프로모터-구동 SpCas9을 발현하는 AAV5-SpCas9이다.**

**[0406] AAV5-U11D11-RK-EGFP(또는 AAV5-RK-EGFP) 및 AAV5-SpCas9(각각  $1 \times 10^9$  개 바이러스 유전체 입자)을 성체**

C57BL/6J 마우스의 망막하 공간 내에 공동-주사하였다. 망막에서의 EGFP 발현을 살아 있는 동물에서 평가하였으며, EGFP 발현이 결여된 마우스를 연구에서 배제하였다. 주사 후 4주째에, 동물을 안락사시키고, 유전체 DNA를 망막으로부터 추출한 다음, 결실 영역의 측면에 존재하는 프라이머(SEQ ID NO: 64 및 65)를 사용하여 PCR 분석 하였으며, 야생형 및 절단된 유전체 단편을 겔 전기영동에 의해 분해하였다. AAV5-U11D11-RK-EGFP 및 AAV5-SpCas9을 주사한 동물에 대해, PCR 생성물이 검출되었으며, 이는 U11 및 D11 sgRNA 쌍을 이용한 예상된 유전체 결실의 존재를 가리키고, 이러한 결실은 AAV5-RK-EGFP 및 AAV5-SpCas9이 주사된 동물에서는 존재하지 않았다(도 7b). 이를 결과는, 본 발명자들의 이중 AAV 시스템이 생체내에서 표적화된 유전체 결실을 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0407] 실시예 5: LCA10 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거하기 위한, 상류/하류 sgRNA 쌍 및 SaCas9의 이용

[0408] 방법

[0409] 플라스미드

[0410] SaCas9 플라스미드를 구축하기 위해, minCMV-SaCas9-NLS-FLAG-BGH pA-U6-BsaI:BsaI-sgRNA 스캐폴드 단편(SEQ ID NO: 66)을 GenScript에서 합성하고, Sigma pSpCas9 플라스미드의 PciI 및 BbsI 제한효소 부위 내로 서브클로닝하여, CMV-SpCas9-BGH pA 카세트를 대체하고, pminCMV-SaCas9-BGH pA-U6 플라스미드를 생성하였다. 5개의 sgRNA 가이드 서열(aU1, aU2, aU3, aD1, aD2; SEQ ID NO: 45-49)을 Benchling의 온라인 유전체-편집 설계 툴을 사용하여 확인한 다음, 상기 플라스미드의 2개의 BsaI 제한효소 부위 내로 서브클로닝하였다. 상류 sgRNA(aU1, aU2, aU3) 및 하류 sgRNA(aD1, aD2)의 쌍을 이루기 위해, U6-aD1 sgRNA 카세트 및 U6-aD2 sgRNA 카세트를 제한효소 KpnI 및 NotI를 사용하여 이들의 플라스미드로부터 절단한 다음, aU1, aU2 또는 aU3 sgRNA를 발현하는 플라스미드의 NotI 부위 내로 서브클로닝하였다. 그 결과, 본 발명자들은 6개의 상이한 sgRNA 쌍(aU1aD1, aU1aD2, aU2aD1, aU2aD2, aU4aD1, aU4aD2)을 발현하는 6개의 플라스미드를 생성하였다. 마지막으로, 이들 6개의 플라스미드 내의 minCMV-SaCas9-BGH pA-U6-페어드 sgRNAs 단편을 AAV 패키징 플라스미드 내에 서브클로닝하여, pAAV-minCMV-SaCas9-BGH pA-U6-페어드 sgRNAs 플라스미드를 생성하였다. sgRNA를 발현하지 않는 대조군 플라스미드 pAAV-minCMV-SaCas9-BGH pA를 또한 생성하였다.

[0411] 결과

[0412] 상기 연구로부터, 본 발명자들은, 상류/하류 sgRNA 쌍이 SpCas9을 효율적으로 가이드하여, LCA10 c.2991+1655A>G 돌연변이를 제거하고 야생형 CEP290 발현을 복구시킬 수 있었다고 나타내었다. SpCas9 코딩 서열의 길이(대략 4.1kb)는, 1개의 minCMV-SpCas9 구성성분 및 2개의 U6-sgRNA 구성성분들을 단일 AAV 벡터 내에 패키징하기 어렵게 만든다. Ran 등(Ran, F.A. et al. (2015) *Nature* 520:186-191)은 최근, 포유류 세포에서 또한 절단 활성을 나타내는 더 짧은 Cas9 효소 애스. 아우레우스 Cas9(SaCas9; 1053 아미노산; SEQ ID NO: 55)을 발견하였다. 더 작은 크기의 SaCas9은 1개의 minCMV-SpCas9 구성성분 및 2개의 U6-sgRNA 구성성분들을 단일 AAV 벡터 내에 패키징할 수 있게 한다. 페어드 sgRNA 및 SaCas9 또한 LCA10 인트론 돌연변이를 제거할 수 있는지 시험하기 위해, 본 발명자들은 SaCas9에 특이적인 3개의 상류 sgRNA 가이드 서열(aU1, aU2, aU3; SEQ ID NO: 45-47) 및 2개의 하류 sgRNA 가이드 서열(aD1, aD2; SEQ ID NO: 48-49)을 Benchling의 온라인 유전체-편집 설계 툴을 사용하여 설계하였다. 상류/하류 sgRNA를 쌍을 형성하고, AAV 패키징 플라스미드 내로 서브클로닝하였다. 동일한 플라스미드가 또한, minCMV 프로모터-구동 및 인간 코돈-최적화된 SaCas9(SEQ ID NO: 66)을 발현하였다.

[0413] 상기 기재된 바와 같이, 페어드 sgRNAs-SaCas9 플라스미드를 돌연변이체 세포 내에 형질감염시켰다. SaCas9을 SpCas9과 비교하기 위해, 돌연변이체 세포를 또한, 이중 SpCas9 AAV 플라스미드(pAAV-minCMV-SpCas9 + pAAV-U1D3 sgRNA 쌍) 또는 개별 플라스미드 단독을 이용하여 형질감염시켰다. PCR 분석을 결실 영역의 측면에 존재하는 프라이머(SEQ ID NO: 4-5)를 사용하여 수행하였다. 야생형 및 절단형 유전체 단편들을 겔 전기영동에 의해 분해하였다. 모든 시험된 상류/하류 sgRNA 쌍들에 대해, PCR 생성물이 검출되었으며, 상기 검출은 예상된 유전체 결실의 존재를 가리키고, 이러한 결실은 대조군 플라스미드-형질감염된 세포에서는 존재하지 않았다(도 8a). 이를 결과는, SaCas9 및 SpCas9이 둘 모두 페어드 sgRNA와 함께 작용하여 LCA10 인트론 스플라이스 돌연변이를 제거할 수 있음을 나타낸다.

[0414] 이후, 본 발명자들은 상기 AAV 패키징 플라스미드를 이용하여 형질감염된 돌연변이체 세포에서 야생형 및 돌연변이체 CEP290 mRNA 수준을 검사하였다. 놀랍게도, 상류/하류 sgRNA 쌍들 중 어느 것도 SaCas9 단독 플라스미드와 비교하여 야생형 CEP290 mRNA 수준을 유의하게 증가시키지 않았으며, 그렇지만 aU2aD1 쌍 및 aU2aD2 쌍은 증

가 경향을 보여주었다(도 8b). 이와는 대조적으로, SpCas9에 대한 이중 AAV 플라스미드는 개별 플라스미드와 비교하여 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 구제하였다(도 8b). 모든 페어드 sgRNAs-SaCas9 플라스미드들은 SaCas9 단독 플라스미드와 비교하여 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 감소시켰다(도 8c). 유사하게는, SpCas9에 대한 이중 AAV 플라스미드는 개별 플라스미드와 비교하여 돌연변이체 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 감소시켰다(도 8c). 현재의 연구에서 SaCas9이 돌연변이체 세포에서 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 구제하는 데 있어서 SpCas9만큼 효율적이지 않다고 하더라도, 본 발명자들은, 강력한 sgRNA 쌍이, 돌연변이체 세포에서 LCA10 인트론 스플라이스 돌연변이를 효율적으로 제거하고 야생형 *CEP290* mRNA 수준을 상당히 구제하기 위해 SaCas9을 가이드할 수 있다는 가능성을 배제할 수는 없다.

[0415]

서열

[0416]

모든 핵산 서열은 다르게 주지되지 않는 한 5'에서 3'으로 제시된다.

[0417]

모든 아미노산 서열은 다르게 주지되지 않는 한 N-말단에서 C-말단으로 제시된다.

[0418]

상동성 인도 복구(HDR)에 사용된 sgRNA에 대한 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 1)

[0419]

caccgAAGACACTGCCAATAGGGAT

[0420]

상동성 인도 복구(HDR)에 사용된 sgRNA에 대한 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 2)

[0421]

aaacATCCCTATTGGCAGTGTCTTC

[0422]

HDR 주형(SEQ ID NO: 3)

```
CCACCCGCTCGGCCTCCTAAAGTGCCTGGGATTACAGATGTGAGCCACCGCACCTGGCCCCAGTTGTAATTGT
GAGTATCTCATACGTATCCCTATTGGCAGTGTCTTAGTTTATTATCTTATTGTGGCAGCCATTA
TTCCTGTCTCTA
```

[0423]

CEP290 인트론 26 F 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 4)

GGTCCCTGGCTTTGTTCCCT

[0426]

CEP290 인트론 26 R 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 5)

CAGGAGGCTGAGGGTGTGTTT

[0428]

CEP290 인트론 26 서열분석 프라이머(SEQ ID NO: 6)

AGTAGAGATGGGGTTTCACC

[0430]

야생형 *CEP290* F 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 7)

TGACTGCTAACGTACAGGGACATCTTG

[0432]

야생형 *CEP290* R 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 8)

AGGAGATGTTTCACACTCCAGGT

[0434]

돌연변이체 *CEP290* F 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 9)

CTGGCCCCAGTTGTAATTGTGA

[0436]

돌연변이체 *CEP290* R 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 10)

CTGTTCCCAGGCTTGTCAATAGT

[0438]

U1 sgRNA에 대한 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 11)

caccGGCGGGTGGATCACGAGTTC

- [0440] U1 sgRNA에 대한 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 12)  
aaacGAACTCGTGATCCACCCGCC
- [0441] aaacGAACTCGTGATCCACCCGCC
- [0442] D1 sgRNA에 대한 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 13)  
caccgAAAGCTACCGGTTACCTGAA
- [0443] caccgAAAGCTACCGGTTACCTGAA
- [0444] D1 sgRNA에 대한 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 14)  
aaactTCAGGTAACCGGTAGCTTC
- [0445] aaactTCAGGTAACCGGTAGCTTC
- [0446] D2 sgRNA에 대한 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 15)  
caccgTCATTCTTGTGGCAGTAAGG
- [0447] caccgTCATTCTTGTGGCAGTAAGG
- [0448] D2 sgRNA에 대한 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 16)  
aaaccCCTTACTGCCACAAGAATGAC
- [0449] aaaccCCTTACTGCCACAAGAATGAC
- [0450] D3 sgRNA에 대한 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 17)  
caccGGAGTCACATGGGAGTCACA
- [0451] caccGGAGTCACATGGGAGTCACA
- [0452] D3 sgRNA에 대한 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 18)  
aaactGTGACTCCCATGTGACTCC
- [0453] aaactGTGACTCCCATGTGACTCC
- [0454] U1 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 19)  
GGCGGGTGGATCACGAGTTCGTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCGTTATCAACTTGAAAAAGTG  
[0455] GCACCGAGTCGGTGCTTTTT
- [0456] D1 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 20)  
GAAAGCTACCGGTTACCTGAAGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCGTTATCAACTTGAAAAAGT  
[0457] GCCACCGAGTCGGTGCTTTTT
- [0458] D2 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 21)  
GTCATTCTTGTGGCAGTAAGGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCGTTATCAACTTGAAAAAGT  
[0459] GGACCCGAGTCGGTGCTTTTT
- [0460] D3 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 22)  
GGAGTCACATGGGAGTCACAGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCGTTATCAACTTG  
[0461] AAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
- [0462] CEP290 인트론 26 서열(주지: c.2991+1655A>G 돌연변이는 이 서열에서 1655번째 뉴클레오티드이며, 굵은 글씨 및 밑줄 표시되어 있음)(SEQ ID NO: 23)

GTAAGTTGTGATTCTTGAACCTTGTGAAATTAGCCATTTCTCAATATTTGTGTTGGGGGATT  
 GGCAGATTTAATTAAAGTTGCCTGCATTTATATAAATTAAACAGAGATATAATTATCCATTATTCATTC  
 AGTTAGTTATAAATATTTGTCACATAACACACACACACACAATATATTATCTATTATAGTGGC  
 TGAATGACTTCTGAATGATTATCTAGATCATTCTCCTTAGGTCACTTGCATGATTAGCTGAATCAAACCTCT  
 TTTAACAGACATCTAACAGAGAAAAAGGAGCATGAAACAGGTAGAAATATTGTAATCAAAGGAGGGAAAGCAGCTCA  
 TTAAGTGGCATCCCTTCTTACCCCTGTACCCAGAACAAACTATTCTCCCATGGTCCCTGGCTTTGTTC  
 CTTGGAATGGATGAGCTAGCCAACAGTAGCTGAAATATTAGGGCTCTCCTGGACCATGGATGACTCTGTAAT  
 TCTCATCATTTTATTGAGAATAAATGAGAATTAAATGAGAATAAATTATTAAATGAGAATAAATTTAATGAGAATAA  
 ATAAAAAAACTAGAGTAGAATATCATAAGTTACAATCTGTGAATATGGACCAGACCTTGTAGTTATCTTAC  
 AGCCACTTGAACCTCTATACCTTTACTGAGGACAGAACAGCTCTGATTGTCATCTCCTCATCAGAAAT  
 AGAGGCTTATGGATTGGATTCTTACAGATCCTTACAGGAGTAGAATAAGATCTAATTCTATTA  
 GCTCAAAAGCTTGTGGCTCATAGAGACACATTCAAGTAAATGAAAACGTTCTGAGTAGCTTCAGGAT  
 TCCTACTAAATTATGAGTCATGTTATCAATATTATTAGAAGTAATCATAATCAGTTGCTTCTGCTGCTT  
 TTGCCAAAGAGAGGGTGAATTGTTACTTTTATAGAAAATTATGCTATTAGTGTGGTGAATAATTATT  
 TTCCATTCTCCATGTCCTCTGCCTATCCTCTCAGCATTAGAAAGCTCTAGGCCAGAGACATCTTGTGGATA  
 ATGATCAATGAGTGTGTTAACGTTACATTCTGTCACCCAGGCTGAGTGCAGTGGCACGATCTGGCTAACGCTT  
 ACTGCATCCTCTGCCTCCAGATTCAAGCAGTTCTCTGCCTCAGCCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGTG  
 CACCAACCACCCAGCTAATTTTTTTTTTTTGAGGAGAGCTCGCTCTCACCCAGGCT  
 GGAGTGCAGTGGGCCATCTGGCTCACTGCAAGCTCCACCTCCGGGTTCAGGCCGTTCTCTGCCTCAGCC  
 TCCTGAGTAGCTGGTACCAAGGCACCCACCATCATGCCGGCTAATTGGTATTTTAGAGATGGGG  
 TTTCACCTTGTAGCCAGGATGGTGTGATCTCTGAACCTGTCAGTCCACCCGCCCTGGCTCCCTAAAGTGC  
 GGGATTACAGATGTGAGCCACCGCACCTGGCCCCAGTTGTAATTGGA**G**TATCTCATACCTATCCCTATTGGC  
 AGTGTCTTAGTTTATTATTCTTATTCTGTCAGGCTTACCTGTCAGTCCCATGTCAGTCTACAT  
 CCTCTTACTGCCACAAGAATGATCATTAAACATGAACTACCTACCCCTGACTCCCATGTCAGTCCCT  
 TAAAAACTGTCAAAAGCTACCGTTACCTGAAGGGTAAAGTCAAGTCCCCTACTTACCTCATGTCATCTAGA  
 GCAAGAGATGAACTAGCTGAGTTTCTGACCACAGTGTCTTCTATGTAATTCTATTCTGTCAGTGTCTT  
 TCTATATATAGGAAACCATTCTCTTCCAGTTGTTTGCTCAGTGAATTCTATTCTGTCAGTGTCTTCAAAACTG  
 TTCAGGCCATTACCTTTTCTTAAGCATACTTTTAATGGAACAAAGTCACCTGTCACACTAGTTC

[0463]

[0464]

[0465]

### 돌연변이화된 ITR 서열(SEQ ID NO: 24)

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCACGCCCGGGCTTGGCGGGCG

[ 333 ]

[0407]

11aCl 시퀀스(SEQ ID NO: 25)

[0468]

TAGCAAGTTAAAAAATAGGCTAGGCCGTTATCAACTTGGAAAGGGCACCGAGTCGGTG

[0469]

NLS 서열

PKKKRKV (SEQ ID NO: 26)

PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO: 27)

[0471]

BbsI 제한효소 부위 돌연변이에 대한 포워드 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 28)

[0472]

GGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTG

- [0473] BbsI 제한효소 부위 돌연변이에 대한 리버스 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 29)  
CAGCATGCCTGCTATTCTCTCCCAATCCTCCC
- [0474]
- [0475] pSpCas9(BB) 구축용 U6 프로모터-BbsI:BbsI-sgRNA 스캐폴드-U6 종결자 카세트로서, U6 프로모터 서열에는 밑줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 30)  
CACATGTGAGGGCCTATTCCCATGATTCCTCATATTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT  
TGGAATTAATTGACTGAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTTGG  
GTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTCGA  
TTCTGGCTTATATATCTGTGAAAGGACGAAACACCGGGCTTCGAGAAGACCTGTTAGAGCTAGA  
AATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTATCAACTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGTCTTTGTT  
TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATG  
GCTCTAGAGGTACCC
- [0476]
- [0477] PPIA F 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 31)
- [0478] TTCATCTGCACTGCCAAGAC
- [0479] PPIA R 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 32)
- [0480] TCGAGTTGTCCACAGTCAGC
- [0481] pSpCas9(BBU) 구축용 U6 프로모터-BbsI:BbsI-sgRNA 스캐폴드-U6 종결자-CMV 프로모터로서, U6 프로모터 및 CMV 프로모터 서열에는 밑줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 33)  
CTCACATGTGAGGGCCTATTCCCATGATTCCTCATATTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAA  
TGGAATTAATTGACTGAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCTTGG  
GTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTCGAT  
TTCTGGCTTATATATCTGTGAAAGGACGAAACACCGGGCTTCGAGAAGACCTGTTAGAGCTAGAAA  
TAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTATCAACTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGTCTTTGTTTAG  
AGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTC  
TAGAGACCGGGCGCGCTACAGGCTTCCACCGGTGGCTCTCTAGAGGTACCGGTACATCTAGTTATTAAAT  
AGTAATCAATTACGGGGTATTAGTCATAGCCCATATATGGAGTCCCGGTACATAACTTACGGTAAATGG  
CCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA  
ATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT  
ATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATATTGCCAGTACAT  
GACCTTATGGGACTTCCATTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTT  
TGCGACTACATCAATGGCGTGGATAGCGTTTGACTCACGGGACTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCA  
ATGGGAGTTGGTGGCACC AAAATCAACGGGACTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCA  
AATGGGCGTAGGCCTGACGGTGGAGGTCTATAAAGCAGAGCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCT  
TACTGGCTTATCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGAACCAAGCTGGCTAGCCGC
- [0482]
- [0483] pSpCas9(BBD) 구축용 포워드 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 34)  
ATAACATGTGGTCTCACTCTAGAGGCATGTGAGGGCCTATTCCC
- [0484]
- [0485] pSpCas9(BBD) 구축용 리버스 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 35)
- [0486] TATGGTACCGGTCTCATAGAGCCATTGTCTGCAGA
- [0487] 대조군 1 sgRNA용 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 36)  
caccGGCACTACCAGAGCTAACTCA
- [0488]
- [0489] 대조군 1 sgRNA용 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 37)  
aaactTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC
- [0490]
- [0491] 대조군 2 sgRNA용 상부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 38)  
caccggTGCAGATACGCCACGCCAT
- [0492]
- [0493] 대조군 2 sgRNA용 하부 가닥 올리고뉴클레오티드(SEQ ID NO: 39)  
aaacATCGCGTGGCGTATTCCGAC
- [0494]

[0495] 애스. 퍼오게네스 Cas9 아미노산 서열(SEQ ID NO: 40)

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAATRLKRTARRYT  
 RRRKNRICYLQEIFSNEAKVDDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST  
 DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPNDNSVDKLFIFIQLVQTYNQLFEENPINAISGVDAKAILSARLSKS  
 RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDAEDAKLQLSKDTYDDLDNLLAQIGDQYADLFLA  
 AKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASIMKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDG  
 GASQEEFYKF1KPILEKMDGTEELLVQLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE  
 KIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPEWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF'DKNLPEKVLPKH  
 SLLYEYFTVYNELTKVYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIIDLFLKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE  
 DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMQIKRRTY  
 GWGRSLRKLINGIRDQSGKTIIDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS  
 PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSIQILKEHPVEN  
 TQLQNEKLYLQYDQELDINRLSDYDVFHIVPQSFLLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV  
 KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLELDKAGFIKRQLVETRQITKVAQIILDSRMNTKYDENDKL  
 IREVKVITLKSLLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI  
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPMQVNIV  
 KKTEVQTCGGFSKESILPKRNSDKLIAKRDWDPKYCCGFDSPVAVSVLVAKEKGKSKKLVSKVELLGITI  
 MERSSFEKNP1DFLEAKGYKEVKKDLIILKLPKYSILFELENGRKRLMASAGELQKGNEALPSKYVNFLYLA  
 YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFT  
 LTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRTSTKEVLDATLHQSITGLYETRIDSQLGGD

[0496]

[0497] U1 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 41)

GGGGGGTGGATCACGAGTTG

[0499]

[0498] D1 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 42)

AAAGCTACCGGTTACCTGAA

[0500]

[0501] D2 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 43)

TCATTCTTGTGGCAGTAAGG

[0503]

[0502] D3 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 44)

GGAGTCACATGGGAGTCACA

[0505]

[0504] aU1 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 45)

TTTAACGTTATCATTTCACCA

[0507]

[0506] aU2 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 46)

AGTTTCATTCTGTCACCCAGG

[0509]

[0508] aU3 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 47)

AAAAATTAGCCGGGCATGATG

[0511]

[0510] aD1 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 48)

TGTAAGACTGGAGATAGAGAC

[0513]

[0512] aD2 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 49)

CTTTTGACAGTTTAAGGCG

[0515]

[0514] aU1 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 50)

GTTTAACGTTATCATTTCACCAAGTTAGTACTCTGGAAACAGAACTACTAAAACAAGGCAAATGCCGTGTTATCTCG  
 TCAACTTGTGGCGAGATTTT

[0517]

[0516] aU2 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 51)

GAGTTTCATTCTGTCACCCAGGGTTTAGTACTCTGGAAACAGAACTACTAAAACAAGGCAAATGCCGTGTTATCTCG  
 TCAACTTGTGGCGAGATTTT

[0518]

[0519] aU3 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 52)

GAAAAATTAGCCGGGATGAGGTTTAGTACTCTGGAAACAGAACATCTACTAAAACAAGGAAAATGCCGTGTTATCTCG  
TCAACTTGGCGAGATTTT

[0520] aD1 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 53)

GTGTAAGACTGGAGATAGAGACGTTTAGTACTCTGGAAACAGAACATCTACTAAAACAAGGAAAATGCCGTGTTATCTCG  
TCAACTTGGCGAGATTTT

[0521] aD2 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 54)

GCTTTGACAGTTTAAGCCGGTTTAGTACTCTGGAAACAGAACATCTACTAAAACAAGGAAAATGCCGTGTTATCTCG  
TCAACTTGGCGAGATTTT

[0522] aD3 sgRNA 서열(SEQ ID NO: 55)

에스. 아우레우스 Cas9 아미노산 서열(SEQ ID NO: 55)

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFD  
YNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEFSAAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNNSKALE  
EKYVAELQLERLKKDGEVRSINRKFSTSYYKEAKQQLLKVKQAYHQDQSFIGTYIDLLETTRIYYEGPGEGS  
PFGWKDIKEWEYEMLGMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKK  
KPTLKQIAKEIILNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIEAELLDQIAKILTIYQSSEDIQ  
EELTLQEEIEQISNLKGTYGTHNLSLKAQINLDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDSLQQKEIPT  
TLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNIDIELAREKNNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRT  
TGKENAKYLLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNNPNEYEVDHIIIPRSVSFDNSFNNKVVLVKQEEENSKG  
NRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLM  
NLLRSYFRVNNLDVVKVKSINGGFTSFLRRKWFKKERNKGYKHAAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMEN  
QMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIFKDYKYSHRVDKKPNRELINTLYSTRKDDKGNTLIVN  
NLNGLYDKDNDLKKLINKSPEKLLMYHDPQTYQKIKLIMEQYQGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPV  
IKKIKYYGNKLNNAHLDITDDYPNSRNKVKLSLKPYRFDVLNNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEE  
AKKLKKISNQAEFIASFYNNNDLIKINGELYRVIJVNNNDLNRIEVNMIDITYREYLEMNNDKRPPRIIKTIAS  
KTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHQPQIICKG

[0526]

[0527] pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA 구축용 minCMV 프로모터-SpCas9 서열로서, minCMV 프로모터에는 밑줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 56)

TATACCGTGTGACACTAGTTCGCGAAATATTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCA  
ATGGGAGTTTGTGACCCAAATCACAGGGACTTCCAAATGTCGTAACAATCCGCCATTGACGCA  
AATGGGGCGGTAGGCCTGTCAGGTGGGAGGTCTATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGCCGCC  
ACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCATGGACATCGGCACCAACTCTGGGCTGGCCGTGATCACCGACG  
AGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAG

[0528]

[0529] pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA 구축용 SV40 pA 서열로서, SV40 조기 poly(A) 신호에는 밑줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 57)

TGACTCGAGAACTTGTATTGCGACTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATA  
AAGCATTTCACAGCATCTAGTTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTATCATGTCTGCAATAT  
TTCGGCAGAACATAGCAGG

[0530]

[0531] U1 sgRNA 인자 서열 (U1T; U1 sgRNA 가이드 서열 + PAM)(SEQ ID NO: 58)

GGCGGGTGGATCACGAGTTCAAG

[0532]

[0533] D3 sgRNA 인자 서열(D3T; D3 sgRNA 가이드 서열 + PAM)(SEQ ID NO: 59)

GGAGTCACATGGGAGTCACAGGG

[0534]

[0535] BGH pA-함유 단편으로서, BGH pA에는 밑줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 60)

CTAGTGGCGGCCGCTCGAGCATCTAGAGGGCCATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTG  
ATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCATCTGTTGCCCCCTCCCCGTGCCTCCCTGACCCCTG  
GAAGGTGCCACTCCCACTGTCCCTTCCATAATAAAATGAGGAAATTGCATCGATGTCTGAGTAGGTGTCA  
CTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAACACAATACCGAGGCATGCTGGGGA  
GCTAGAGTCGACCGGACCGCTGCAGGCATGCA

[0536]

[0537] U11 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 61)

GCATAAGGACTAAAGACCTA

[0539] D11 sgRNA 가이드/프로토스페이서 서열(SEQ ID NO: 62)

[0540] GGTAGTGGTTGAACTCACAA

[0541] RK 프로모터-카메라 인트론-EGFP-BGH pA 단편(SEQ ID NO: 63)

GGGCCCCAGAACGCTGGTGGTTGTCCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGGCCCTTGGAGGAAGGGCCG  
 GGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGCTTTCTAGCACCTTCTGCCACTCTAA  
 GCGTCCTCGTGACCCCGGCTGGGATTAGCCTGGTGTGTCAGCCCCGGCTCTCCAGGGCTTCCCAGTG  
 GTCCCCAGGAACCCCTGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGC  
 GGAGTCGCTGCCACGCTGCCCTCGCCCCGCTCCGCCGCGCCTCGGCCGCCGCCGGCTCTGA  
 CTGACGCCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGGCCACGGGCTTCTCCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTT  
 AATGACGCCCTGTTCTCTGTGGCTGCGTGAACAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGGCCCTTGTGCGGGGG  
 GAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGCGTGGGGCTCGCGCTGCCGTGCGCTCCGCGTGGCCGGCG  
 TGTGAGCGCTCGGGCGCGGGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCAGGGGAGCGCGGCCGGGGCG  
 GTGCCCGCGCTGCCGGGGGCTGCGAGGGGAAACAAAGCTGCGTGCCTGGGGTGTGCGTGGGGGTGAGC  
 AGGGGGTGTGGGCGCGTGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGCCG  
 GCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCTGGCGCGGGCTCGCCGTGCCGGGGGGTGGCGCAGGTGG  
 GGGTGCCGGGGGGCGGGGCCCTGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCCGGAGCGC  
 CGCGGCGCTGCGAGGCGCGAGGCCATGCTTATGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTT  
 CCTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCGAAATCTGGGAGGCAGCCGCACCCCTCTAGCGGGCCGGCGA  
 AGCGGTGCGGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGAGGGCCTCTGCGTGCCTGCCGCCGCTCCCTCT  
 CCCTCTCCAGCTCCTGGGCTGTCGGCGGGGACGGCTGCGCTCGGGGGAGGGGGCAGGGGGGGTTCGGC  
 TTCTGGCGTGTGACCCGGGGCTCTAGACCTCTGCTATGCTTCTACAGCTCC  
 TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCATCAITTTGGCAAAGAAATTCTCGAAAGATCTGCTAGCTTAAT  
 TAACCCGGTCGCCACCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAACGTTGCGTGTCCGGCAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA  
 CCCTGAAGTTCATCTGCAACCACGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGG  
 CGTGCAGTGCCTCAGCCGTAACCCGACCATGAAGCAGCACGACTCTCAAGTCCGCATGCCGAAGGC  
 TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTGAGG  
 GCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAA  
 GCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCGACAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAAC  
 TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGCCGACCACTACCGAGCAAGAACACCCCCCATCG  
 GCGACGGGCCCTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAACCCCCAACGA  
 GAAGCGCGATCACATGGCTGCTGGAGTTGACCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC  
 AAGTAAAGCGGCAAATCGTACGCCCTAGGTGATCAAGATCTGCTAGCTTAATTAAACCCGGGACTAGTGGGGC  
 CGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGTGTGATCAGCCTCGA  
 CTGTGCCCTCTAGTTGCCAGGCATCTGTGTTGCCCTCCCCCTGCGCTTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCAC  
 TCCCACTGTCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGACATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG  
 GGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGA

[0542]

[0543] 마우스 Cep290 인트론 25 F 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 64)

[0544] CCCCTCGCCTGTACTGAAAG

[0545]

마우스 Cep290 인트론 25 R 핵산 프라이머(SEQ ID NO: 65)

[0546] GCACATCATCTGAGGCAGGT

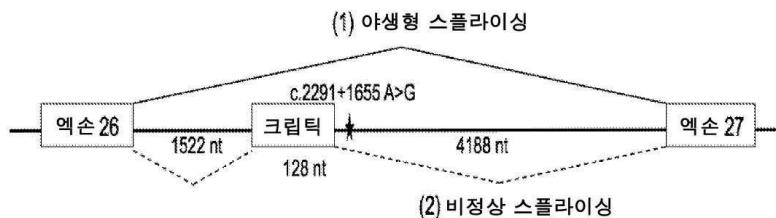
[0547]

minCMV-SaCas9-NLS-FLAG-BGH pA-U6-BsaI:BsaI-sgRNA 스캐폴드 단편으로서, minCMV 및 SaCas9 서열에는 밀줄 표시되어 있음(SEQ ID NO: 66)

ATGAATTCTAGACAATTGGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGTT  
 TTGGCACCAAAATCAACGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAATGGCGTAGG  
 CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCACCGTGGCACCAG  
 CGAACATACATCTGGGCTGGACATCGGCATCACCGCGTGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACCGGA  
 CGTGTACGGTGGGCTGGCTGTTCAAAGAGGCCAACGTGGAAAACAACGAGGGCAGGGGAGCAAGAGA  
 GGCAGGAGCTGAAGCGGGAGGGGGCATAGAATCAGAGAGGTGAAGAAAGCTGCTGACTACAACC  
 TGCTGACCGACCAACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCAGAGTGAAGGGCTGAGCCAGAAGCT  
 GAGCGAGGAAGAGTTCTGCCCTGCTGCACCTGGCAAGAGAAGAGCGTGCACAACCGTGAACGAGGTG  
 GAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCACCAAGAGCAGATCACCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAAT  
 ACGTGGCCGAACGTGAGCTGGAACGGCTGAAGAAAGACGGCAACTGCGGGGAGCATCAACAGATTCAAGAC  
 CAGCGACTACGTGAAAGAACGCAACAGCTGCTGAAGGTGAGAAGGCCATACCACCAAGCTGACAGAGCTC  
 ATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAACCCGGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAGGCCCTCG  
 GCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCACTGACCTACTTCCCGAGGAACTGCGGAG  
 CGTGAAGTACGCCCTACAACGCCGACCTGACACGCCCTGAACGACCTGAACAAATCTGATCACCGAGGAC  
 GAGAACGAGAAGCTGGAATATTACAGAGAAGTCCAGATCATCGAGAACGAGTGTCAAGCAGAAGAACGCCA  
 CCCCTGAGGAGATGCCAAAGGAAATCTCGTGAACGAAGAGGATAATTAGGGCTACAGAGTGAACGACCCGG  
 CAAGCCCGAGTGTGGATCAGATTGCAAGATCCTGACCATCTACAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAAC  
 TGACCAATCTGAACCTGGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTAATCTGAAGGGTATACCGGCAC  
 CCACAACTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTCGGCACACCAACGACAAACGATCGCT  
 ATCTTCAACCGCTGAAGCTGGTGGCAAGAGGTGGACCTGTCAGCAGAAAGAGATCCCCACCCATCTGG  
 TGGACACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCTCATCCAGAGCATCAAAGTGTACAGCCATCAT  
 CAAGAAGTACGCCCTGCCAACGACATCATTATCGAGCTGGCCCGAGAAGAACTCCAAGGACGCCAGAAA  
 ATGATCAACGAGATGCAAGACGGAAACGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAATCATCCGGACCACGGCA  
 AAGAGAACGCAAGTACCTGAGAAGATCAAGCTGACGACATGCAAGGAAGGCAAGTGGCTGACGCC  
 GGAAGCCATCCCTCTGGAAGATCTGCTGAACAAACCCCTCAACTATGAGGTGGACCATCATCCCCAGAAC  
 GTGCTCTCGAACACAGCTTCAACAACAGGCTGCTGTGAAGAGCAGGAAGAAAACAGCAAGAAGGGAACCGGA  
 CCCCATCCAGTACCTGAGCAGCAGCACGAGAACGAGTACAGCTACGAAACCTTCAAGAAGCACATCTGAATCT  
 GGCAAGGGCAAGGGCAGAAATCAGCAAGACCAAGAAAGAGTATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTT  
 TCCGTGAGAAAGACTTCATCAACCGAACCTGGTGGATACCGATACGCCACAGAGGCCCTGATGAACCTGC  
 TGCGGAGCTACTTCAGAGTGAACAACCTGGACGTAAACTGAACTGTCATCAATGGCGGCTTACCCAGCTTCT  
 GCGCGGAAGTGGAAAGTTAAGAAAGAGCGGAACAAGGGTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCCTGATCATT  
 GCCAACGCCGATTTCATCTTCAAAAGAGTGGAAAGAAACTGGACAAGGCCAAAAGTGTATGGAAAACAGATGT  
 TCGAGGAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCAGAGTCGAACACCGAGCAGGAGTACAAAGAGATCTCATCACCC  
 CCACCAAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAGGACTCAAGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAACGCTAATAGA  
 GAGCTGATTAACGACACCCCTGACTCCACCCCGGAAGGACGACAACGGCAACACCCCTGATCTGAACAAATCTGA  
 ACGGCCTGTACCGAACAGGACAATGACAAGCTGAAACAGGCTGATCACAAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTA  
 CCACCAAGCCCCAACCTGAGGAAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGCCGAGGAGAACATCCCCCTG  
 TACAAGTACTACAGGAAACCGGAACCTACCTGACCAAGTACTCCAAAAGGACAACGCCCTGATCAAGA  
 AGATTAAGTATTACGGCAACAAACTGAACGCCATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAACAA  
 GGTGCTGAGCTGCTCTGAAGCCCTACAGATTGACGTGTACCTGGACAATGGCTGATCAAGTCTGACCC  
 GTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAGAAAACTACTACGAAGTGAATAGCAAGTGTATGAGGAAGCTAAGA  
 AGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATGCCCTCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGG  
 CGAGCTGTATAGAGTGTGACGCCGTGAACACGACCTGCTGAACCCGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACC  
 TACCGCGACTCTGGAAAACATGAACGACAAGAGGCCCGAGGATCTTACGACAATGCCCTCAAGAACCC  
 AGAGCAATTAGAAGTACAGCACAGACATTCTGGCAACCTGTATGAAAGTGAAGATCTAAGAAGCACCCCTCAGAT  
 CATCAAAAGGGCGGATCCCCAAGAAAAAGCGCAAAGTGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGGCTAG  
 GACTGTGCTCTAGTTGCGCAGCCATCTGTTGGGCTCCCCCTGGCTCTCTGACCCCTGGAAAGGTGCC  
 ACTCCCACTGTCTTCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCACTCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTAATTCTGG  
 GGGGTGGGGGGGGAGGATGGGAAGAGAATAGCAGGCGATGCTGGTACCTGAGGGCC  
 TATTCTCATGATTCTCATATTGCAATACGATAACAGCTGTTAGAGAGATAATTGAAATTATTGAC  
 TGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTTAGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCACTT  
 AAATTATGTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTGCAATTCTGGCTTATATA  
 TCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAGACCACGGCAGGTCTCAGTTAGTACTCTGGAAACAGAACTACTA  
 AAACAAGGCAAATGCCGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCAGATTGGCGCCTCGACAT

## 도면

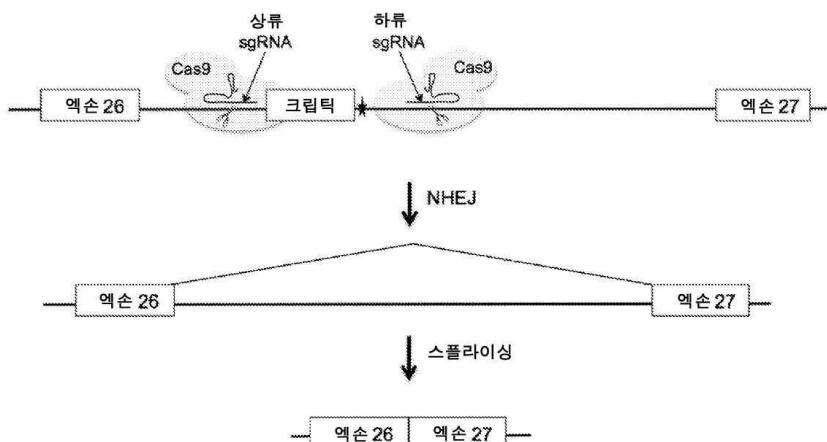
## 도면1



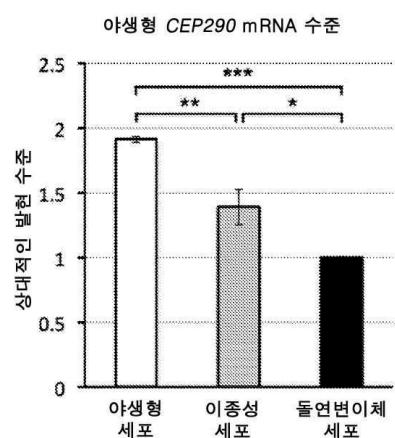
## 5' 스플라이스 부위

악생형: TGTAATTgtgaatat 점수: 0  
 돌연변이체: TGTAATTgtgagat 점수: 0.90

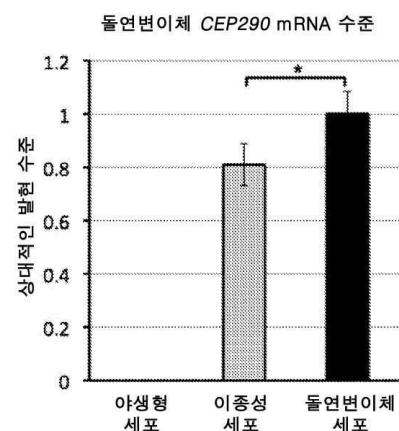
## 도면2



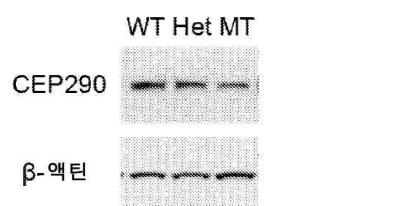
## 도면3a



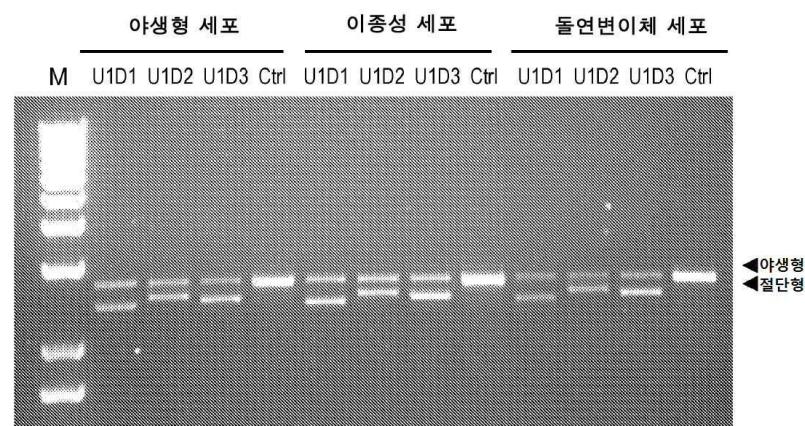
## 도면3b



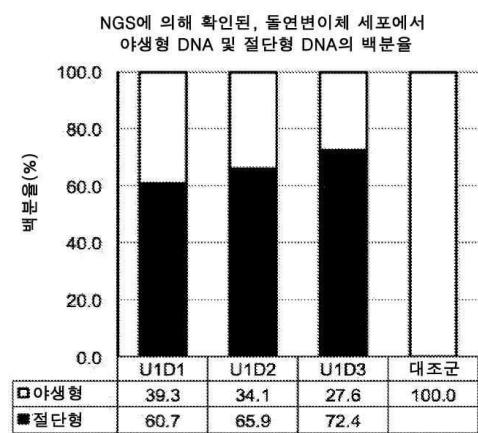
## 도면3c



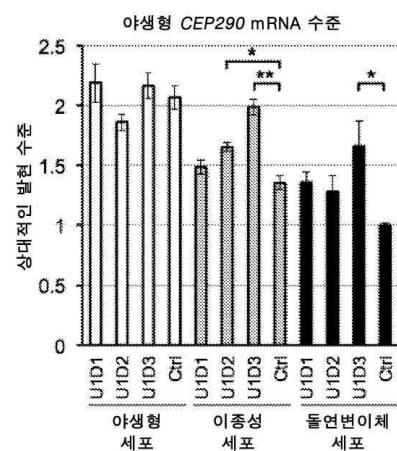
## 도면4a



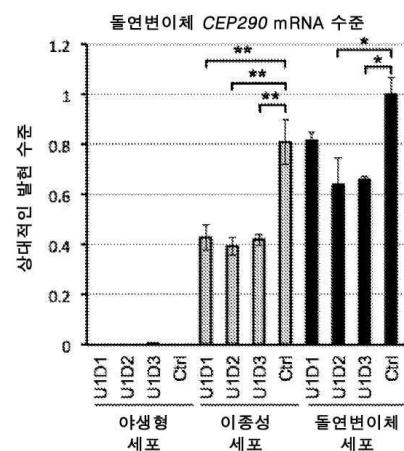
## 도면4b



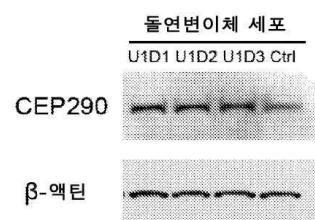
## 도면5a



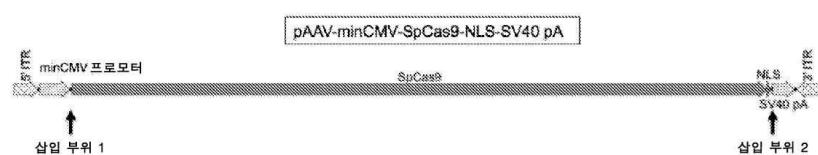
## 도면5b



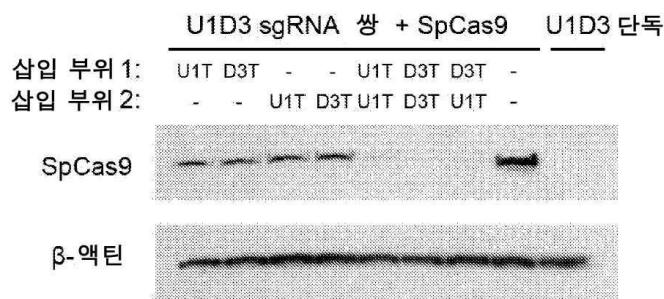
## 도면5c



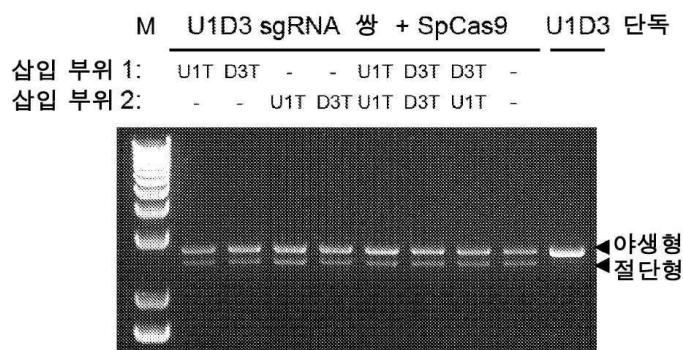
## 도면6a



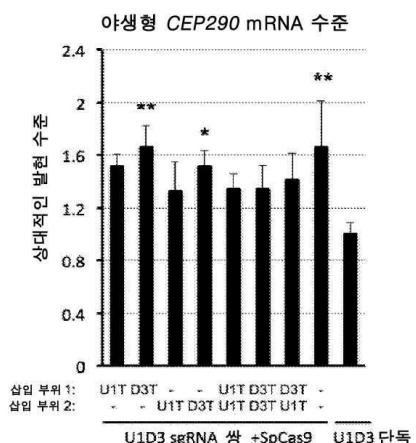
## 도면6b



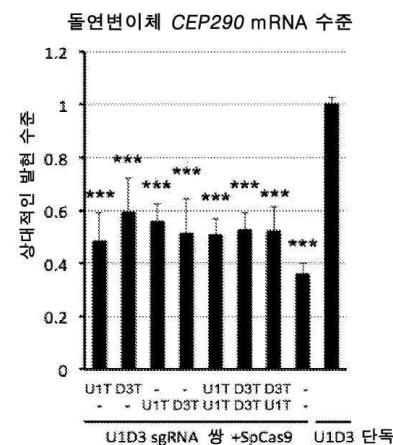
## 도면6c



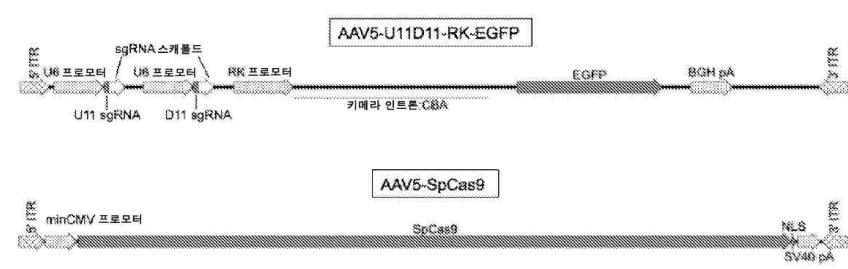
## 도면6d



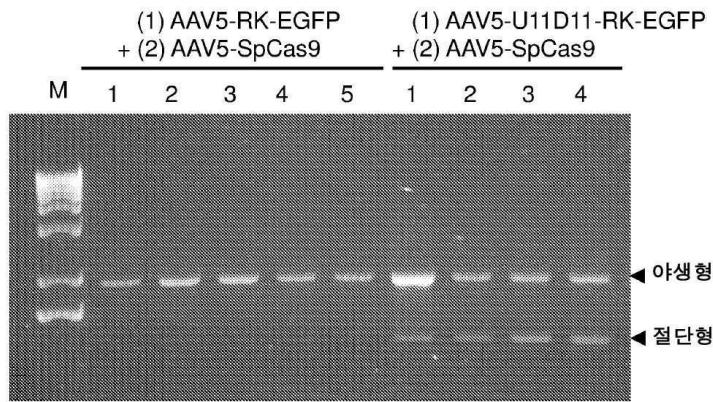
## 도면6e



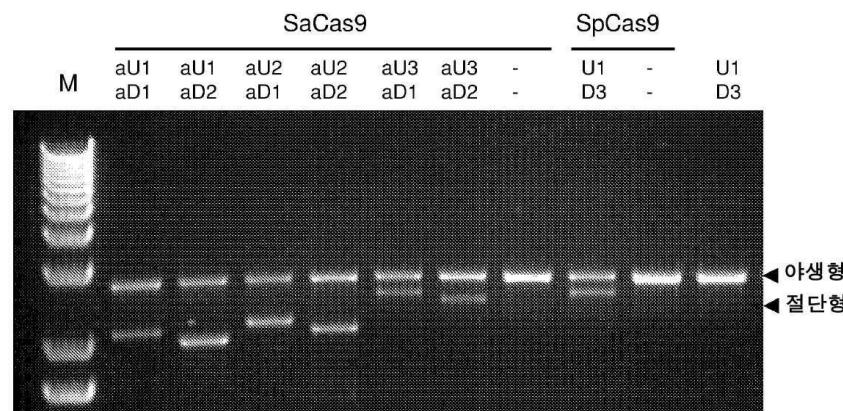
### 도면7a



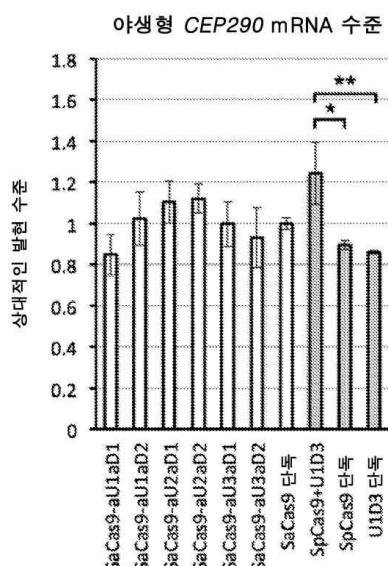
## 도면7b



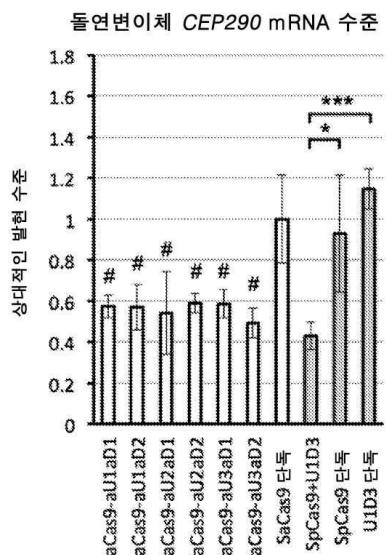
## 도면8a



## 도면8b



## 도면8c



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RUAN, Guoxiang

SCARIA, Abraham

&lt;120&gt; GENE EDITING OF DEEP INTRONIC MUTATIONS

&lt;130&gt; 15979013440

&lt;140&gt; Not Yet Assigned

&lt;141&gt; Concurrently Herewith

&lt;150&gt; 62/162,720

&lt;151&gt; 2015-05-16

&lt;160&gt; 66

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 1

caccgaagac actgccaata gggat 25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 2

aaacatccct attggcagtg tcttc 25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 158

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Synthetic construct

<400> 3

ccacccgcct cggcctccta aagtgcgtggg attacagatg tgagccaccg caccgtggcc 60  
 cagttgtatat tggatgtatc tcatacgtat ccctattggc agtgtcttag ttttattttt 120  
 tattatcttt attgtggcag ccattattcc tgtctcta 158

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 4

ggtcctggc tttgttcct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 5

caggaggctg aggggttttt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 6

agttagatg gggtttcacc 20

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220>		
<223> Synthetic construct		
<400> 7		
tgactgctaa gtacaggac atcttg		26
<210> 8		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<400> 8		
aggagatgtt ttcacactcc aggt		24
<210> 9		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<400> 9		
ctggccccag ttgtaatttg tga		23
<210> 10		
<211		
> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<400> 10		
ctgttcccgag gcttgttcaa tagt		24
<210> 11		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		

<400> 11	
caccggggg tggatcacga gttc	24
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 12	
aaacgaactc gtgatccacc cgcc	24
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 13	
caccgaaagc taccggttac ctgaa	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 14	
aaacttcagg taaccggtag ctttc	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 15	

caccgtcatt ctgtggcag taagg	25
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 16	
aaaccttac tgccacaaga atgac	25
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 17	
caccggagtc acatggagt caca	24
<210> 18	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 18	
aaactgtgac tcccatgtga ctcc	24
<210> 19	
<211> 102	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 19	
ggcggtgga tcacgagttc gtttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc	60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgtttt tt 102  
 <210> 20  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 20  
 gaaagctacc gtttacctga agtttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60  
 ccgttatcaa ctgtaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt ttt 103  
 <210>  
 21  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 21  
 gtcattttt tggcagtaag gtttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60  
 ccgttatcaa ctgtaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt ttt 103  
 <210> 22  
 <211> 102  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 22  
 ggagtccat gggagtcaca gtttttagagc tagaaatagc aagttttttt aaggctagt 60  
 cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgtttt tt 102  
 <210> 23  
 <211> 5838  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 23

gtaagttgt gtgattcttg aaccttgta aattagccat tttcttcaa tatttttgt 60  
 tttgggggaa ttggcagat ttaattaaa gtttgcctgc atttatataa atttaacaga 120  
 gatataatta tccatattat tcattcagtt tagttataaa tattttgttc ccacataaca 180  
 cacacacaca cacacaatatt attatctatt tatagtggtt gaatgacttc tgaatgatta 240  
 tctagatcat tctccttagg tcacttgcatt gattagctg aatcaaacct ctttaacca 300  
 gacatctaag agaaaaagga gcatgaaaca ggtagaatat tgtaatcaaa ggagggaaac 360  
 actcattaag tgccatccc tttctttaac ccctgtaccc agaacaaact attctccat 420

ggtccctggc tttgttctt tggaatggat gtagccaaca gtagctgaaa tattaaggc 480  
 tcttcctgga ccatggatgc actctgtaaa ttctcatcat tttttattgt agaataatg 540  
 tagaatttta atgtagaata aatttattta atgtagaata aaaaataaaa aaactagagt 600  
 agaatatcat aagttacaat ctgtgaatat ggaccagacc cttttagttt atcttacagc 660  
 cacttgaact ctataccctt tactgaggac agaacaagct cctgatttgc tcatcttct 720  
 catcagaat agaggcttggat ttattttttaat ctaagatctt ttcacaggag 780  
 tagaataaga tctaattcta ttagctcaaa agctttgct ggctcataga gacacattca 840  
 gtaaatgaaa acgttggctt gaggatctt caggattctt actaaattt gagtcatgtt 900

tatcaatatt attagaagt aatcataatc agtttgctt ctgctgctt tgccaaagag 960  
 aggtgattat gttactttt atagaaaatt atgcctattt agtgtggta taattttttt 1020  
 ttttccatttc tccatgtctt ctgtcctatc ctctccagca tttagaaagtc cttagcaaga 1080  
 gacatcttgtt ggataatgtt tcaatgatgtt atgttaacgtt ttatcattttt cccaaagagt 1140  
 attttccatc ttctctaaatg atttttttt ttttttttggatggagtt tcattctgtc 1200  
 acccaggctg agtgcagtgg cacgatctcg gcttaacgct tactgcattcc tctgcctccc 1260  
 agattcaagc agtctccctg cctcagcctc tgagtagctg ggattacagg tgtgcaccac 1320  
 cacaccagct aattttttt ttttttttggatggagtt gcagagtcctc gctctgtcac 1380

ccaggctgga gtgcagtggc gccatcttgg ctcaactgcaaa gctccaccc tcgggttcag 1440  
 ggcgttctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctggtagcc accgcacccac catcatgccc 1500  
 ggctaaatttt ttgtatTTTt agtagagatg gggtttacc ttgttagcca ggtgggtgc 1560  
 gatctcctga actcgtgatc cacccgcctc ggcctctaa agtgcgtggaa ttacagatgt 1620  
 gagccaccgc acctggcccc agttgtattt gtgagttatc catacctatc cctattggca 1680  
 gtgtcttagt ttatTTTt attatctta ttgtggcagc cattattctt gtctctatct 1740  
 ccagtccttac atcctcctta ctgccacaag aatgatcatt ctaaacatga atcctaccct 1800  
 gtgactccca tgtgactccc cgccttaaaa actgtcaaaa gctaccgggtt acctgaaggg 1860

taaaagtcaa gtcctact tacctcatgt catctagac aagagatgaa ctagctgagt 1920  
 tttctgacca cagtgttctt tcttatgtat gttctttgt acgtgcctt ttctatata 1980  
 aggaaaccat ttctcttcc cagttgttt gctcagtgaa ttcttattcc tgtttcaaaa 2040  
 cttgttcagg ctttacccttt ttttcttaa gcatactttt ttatggaa caaagtact 2100  
 cctgtctaca ctatgttgc atcttataca taggtttgt acatagtaca tatttatac 2160  
 acatcaaatt atatgtttt acatatctgt ttcccttaat ggaatataag tctttgata 2220  
 taaggaacta tttaattttt ttctgtgtg tgagtatctc ctgttggca cagagttcaa 2280  
 gctaatacat gagagtgatt agtggtgag agccacagtg catgtgggt caaatatggt 2340

gcttagaaaa ttatgttgc ttttgagag gtaaagggtc atgagactag aggtcacgaa 2400  
 aatcagattt catgtgtgaa gaatggaata gataataagg aaatacaaaa actggatgg 2460  
 taataaggca aaagaaaaac ttgaaattt atagtagaag aaaaaagaaa tagatgtaga 2520  
 ttgaggtaga atcaagaaga ggattcttt ttgttggtt ttttttga aacagagtct 2580  
 cactgtgttgc cccaggctgg agtgcagtgg agtgatctg gcttactgca acctctgcct 2640  
 cccaggttca agcgattctt ctgcttca gctccgatca gctggaatta caggtgccca 2700  
 ccagcacggc cgcttaattt agtagagaca gggtttgcg atgtggccg ggctggctc 2760  
 aaactttgga tctcaggtaa tccgcccagcc tcaacttccc aaagtgtgg gattacaggc 2820

atgagccact gtgccagcc tttttttttt ttttaaagg agaccagtga agttcagga 2880  
 ggagggaaag aaaatttaga gttacttaggg agagagtgt gaagataaga gatgaaagt 2940  
 gtaataaggg aaatagcaaa atatcagggt aggtggaga aaaagagatt tgtaacaac 3000  
 aataggatta tcctgtgaaa aaggatgaaa ggaagaaaaa aatggataga aagatattta 3060  
 aaacaccctc agcctctgt tttccctct gtgttattcat agtataaaa actataatta 3120  
 tgtactttac ttaaaaaata tatttattt accttacgt gcttatttaa tcatagcatg 3180  
 tcctttttt agtctcatta ccctgtttt attattcttca aacactta atacgtaca 3240  
 ttgttattata tattggctta tttccaggt actccactca aatataagtt ctaggatata 3300

atttatttat cactgaaatc cattgcttag agtacctggc atgttagtaaa taggcattct 3360  
 gtttttcaa ataaaaaata aaggaactta agatataat ttatgttata tcgcccgcct 3420  
 tttccctcac agtcttattc ttttgcacag aattacctac ttacaattt ctgtgttca 3480  
 aggggatctc aaatthaacg tgtccacaat gaactcctga ttctgttcc tctccatgc 3540  
 attcttattt caatataatgt tcaatgttaccc aaccagctag tcaaggcaga tacttttagag 3600  
 ttattctgttca gtcattttt ttccctacca ttttgcattt ccaaatgtaa ttatgtgtg 3660  
 tcttcttcat cctcgcagct ctaacccttg tccaaaccag catcatcact catctggagt 3720

tccacaatgt ctttctggct agttccctg atttctctat tgacccttt attctccaca 3780

gtgcagccag aatgattgtt taaaacttcc tccttaaaat cttaaatttgc ttttctttt 3840  
tagcttaagt taaattccag ttccctgtct tggcatgcct tgccctgcct ggtgtggccc 3900  
ctgatggct ctccaaacttc atgtttact actattgact ctatttttgc cttactctgc 3960  
ttgggtgctc cagtcctcca aatcatttcc tgctccaatc atttcaatca tttttccctc 4020  
tcagatctt tagtattcca aatgtttct tcctttggag catctgggtt tactaataaaa 4080  
tacttcgtac ctcacagttc agcttaaata tcaatttattt ggtggtaag acatccttca 4140  
accgctctat ctaaatgttc ctttcttattt ttcaactggct cagttactctg tttttatttt 4200  
ctttcttaaat gtcaactttt ttttttttga gtcagggtct cactgttgcc caggctcgag 4260

tgtgtgtatg tgtgtgtgtg tgtatatata tatgtatgtatgtatttag tcggctctca 5280  
tgctgctatg aagaaatacc tgagactggg taatttataa agggaaagagg ttttaattgac 5340  
tcacagttcc acagagctgg ggaggcctca gaaaacttaa cagttatggc agaagggaa 5400  
gcaaacacat ttttcttcac atggggcccg gaatttagaag aatgtgagcc gagcaaaggg 5460  
gaaaggccct tataaaacca tcagacatcg tgagaactta ctattatgag aatagcgtgg 5520  
ggggaaaccac ccccacgatt caattacctc ccaccaaatc cctccatga catatgagga 5580

ttatggAAC tatgattCAA gatgagATT gggtagggAC acagccAAAC catatcAGTA 5640  
 tgtatATGTA tacaAGTATT atatATATAT gtatGTGTT gtatGCATAC atgtATTATA 5700

tatggaggAA attctaATTt tGtaaaaaAC tggattGTGA gtttaAGGA gatGttatAT 5760  
 aaagttaAGA caatgtcATT ttgtggTATT ggtctGAATT acaatgtAGT ttcttagtGA 5820  
 tattttcCT ttattcAG 5838

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 78

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 24

cactccTCT ctgcgcgCTC gctcgctac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60  
 ccgggcTTG cccgggCG 78

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 25

tagcaAGTTA aaataaggCT agtccgttat caacttgAAA aagtggcacc gagtcggTgc 60

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Simian vacuolating virus 40

&lt;400&gt; 26

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Simian vacuolating virus 40

&lt;400&gt; 27

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5 10 15

Asp

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt;

&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 28

gggaggattg ggaagagaat agcaggcatg ctg 33

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 29

cagcatgcct gctattctct tcccaatcct ccc 33

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 30

cacatgtgag ggcctatttc ccatgattcc ttcatatttgcataacgtatcaaggctgt 60

tagagagata attggaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtc aaaaatcgtg 120

acgtagaaag taataatttc ttggtagtt tgcagttta aaattatgtt ttaaaatgga 180

ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttg 240

gaaaggacga aacaccgggt cttcgagaag acctgttttgcataacgtatcaaggctgt 300

aaataaggct agtccgttat caacttgaaa aagtggcacc gagtcggtgc tttttgttt 360  
 tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagccgtt ttagcgcgt ggcgcattc 420  
 tgcagacaaa tggctctaga ggtaccc 447  
 <210> 31

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 31

ttcatctgca ctgccaagac 20

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 32

tcgagttgtc cacagtgc 20

<210> 33  
 <211> 1153  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 33

ctcacatgtg agggcttatt tcccatgatt cttcatatt tgcataacg atacaaggct 60

gttagagaga taatttgaat taatttgact gtaaacacaa agatatttagt acaaaatacg 120  
 tgacgtagaa agtaataatt tcttggtag tttcgttt taaaattatg ttttaaaatg 180  
 gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggctt atatatctg 240  
 tggaaaggac gaaacaccgg gtcttcgaga agacctgtt tagagctaga aatagcaagt 300  
 taaaataagg ctagtccgtt atcaacttga aaaagtggca ccgagtcgtt gctttttgt 360  
 ttttagagcta gaaatagcaa gttaaaataa ggcttagtccg ttttagcgc gtgcgcatt 420

tctgcagaca aatggctcta gagaccggcg ccgctacagg cttccaccg gtggctctt 480  
 ctagaggtac cggttacatc tagttattaa tagtaatcaa ttacgggtc attagttcat 540

agcccatata tggagttccg cggttacataa cttacggtaa atggccgccc tggctgaccg 600  
 cccaaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacccaata 660  
 gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacgt aaactgccc cttggcagta 720  
 catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc 780  
 gcctggcatt atgcccagta catgaccta tgggacttgc ctacttggca gtacatctac 840  
 gtattagtca tcgttattac catggtgatg cggtttggc agtacatcaa tggcgtgga 900  
 tagcggttg acicacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttg 960  
 ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg 1020

caaatggcg gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctact 1080  
 agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagaaccaa 1140  
 gctggctagc cgc 1153

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 34

ataacatgtg gtctcactct agaggcatgt gagggcctat ttccc 45

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 35

tatggtaccg gtctcataga gccatttgc tgcaga 36

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 36

caccgcacta ccagagctaa ctca

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 37

aaactgagtt agctctggta gtgc

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 38

caccgtgcga atacgccacg cgat

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 39

aaacatcgcg tggcgtattc gcac

24

<210> 40

<211> 1368

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 40

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

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

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys  
 100 105 110  
 His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr  
 115 120 125  
 His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp  
 130 135 140  
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His  
 145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro  
 165 170 175  
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr  
 180 185 190  
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala  
 195 200 205  
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn  
 210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe

245	250	255
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp		
260	265	270
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp		
275	280	285
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp		
290	295	300
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser		
305	310	315
320		
Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys		
325	330	335
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe		
340	345	350
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser		
355	360	365
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp		
370	375	380
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg		
385	390	395
400		
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu		
405	410	415
Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe		
420	425	430
Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile		
435	440	445
Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp		
450	455	460
Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu		
465	470	475
480		
Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr		
485	490	495

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

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr  
 545 550 555 560  
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp  
 565 570 575  
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly  
 580 585 590  
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
 595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
 610 615 620  
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala  
 625 630 635 640  
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr  
 645 650 655  
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp  
 660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe  
 675 680 685  
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe  
 690 695 700  
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu  
 705 710 715 720  
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly  
 725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly

740	745	750
Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln		
755	760	765
Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile		
770	775	780
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro		
785	790	795
800		
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
805	810	815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg		
820	825	830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys		
835	840	845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg		
850	855	860
865		
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys		
870	875	880
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys		
885	890	895
895		
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Leu Ser Glu Leu Asp		
900	905	910
915		
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr		
920	925	
925		
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp		
930	935	940
940		
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser		
945	950	955
955		
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg		
960	965	970
970		
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val		
975	980	985
985		
990		

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
 995 1000 1005  
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys  
 1010 1015 1020  
 Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu  
 1045 1050 1055  
  
 Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile  
 1060 1065 1070  
 Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser  
 1075 1080 1085  
 Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly  
 1090 1095 1100  
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile  
 1105 1110 1115 1120  
  
 Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser  
 1125 1130 1135  
 Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly  
 1140 1145 1150  
 Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile  
 1155 1160 1165  
 Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala  
 1170 1175 1180  
  
 Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys  
 1185 1190 1195 1200  
 Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser  
 1205 1210 1215  
 Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr  
 1220 1225 1230  
 Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser

1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His

1250 1255 1260

Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val

1265 1270 1275 1280

Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys

1285 1290 1295

His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu

1300 1305 1310

Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp

1315 1320 1325

Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp

1330 1335 1340

Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile

1345 1350 1355 1360

Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1365

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 41

ggcggtggatcaggttc 20

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 42

aaagctaccg gttacctgaa	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 43	
tcattttgt ggcagttaagg	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 44	
ggagtcacat gggagtcaca	20
<210> 45	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 45	
tttaacgtta tcattttccc a	21
<210> 46	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<400> 46	
agtttcattc tgtcacccag g	21
<210>	

> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 47

aaaaattagc cgggcatgat g 21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 48

tgtaagactg gagatagaga c 21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 49

ctttgacag ttttaaggc g 21

<210> 50

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 50

gtttaacgtt atcatttcc cagtttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60

caaaatgccg tggtatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 51

&lt;211&gt; 103

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 51

gagtttcatt ctgtcaccca gggtttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60

caaaatgccc tggttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

&lt;210&gt;

52

&lt;211&gt; 103

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 52

gaaaaattag cggggcatga tggtttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60

caaaatgccc tggttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 103

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 53

gtgtaagact ggagatagag acgttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60

caaaatgccc tggttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 103

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 54

gcttttaca gttttaagg cggttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60  
 caaaatgccg ttttatctc gtcaacttgt tggcagatt ttt 103  
 <210> 55  
 <211> 1053  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 55

Met Lys Arg Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ile Thr Ser Val  
 1 5 10 15

Gly Tyr Gly Ile Ile Asp Tyr Glu Thr Arg Asp Val Ile Asp Ala Gly  
 20 25 30

Val Arg Leu Phe Lys Glu Ala Asn Val Glu Asn Asn Glu Gly Arg Arg  
 35 40 45

Ser Lys Arg Gly Ala Arg Arg Leu Lys Arg Arg Arg Arg His Arg Ile  
 50 55 60

Gln Arg Val Lys Lys Leu Leu Phe Asp Tyr Asn Leu Leu Thr Asp His  
 65 70 75 80

Ser Glu Leu Ser Gly Ile Asn Pro Tyr Glu Ala Arg Val Lys Gly Leu  
 85 90 95

Ser Gln Lys Leu Ser Glu Glu Phe Ser Ala Ala Leu Leu His Leu  
 100 105 110

Ala Lys Arg Arg Gly Val His Asn Val Asn Glu Val Glu Glu Asp Thr  
 115 120 125

Gly Asn Glu Leu Ser Thr Lys Glu Gln Ile Ser Arg Asn Ser Lys Ala  
 130 135 140

Leu Glu Glu Lys Tyr Val Ala Glu Leu Gln Leu Glu Arg Leu Lys Lys  
 145 150 155 160

Asp Gly Glu Val Arg Gly Ser Ile Asn Arg Phe Lys Thr Ser Asp Tyr  
 165 170 175

Val Lys Glu Ala Lys Gln Leu Leu Lys Val Gln Lys Ala Tyr His Gln  
 180 185 190

Leu Asp Gln Ser Phe Ile Asp Thr Tyr Ile Asp Leu Leu Glu Thr Arg

195

200

205

Arg Thr Tyr Tyr Glu Gly Pro Gly Glu Gly Ser Pro Phe Gly Trp Lys

210

215

220

Asp Ile Lys Glu Trp Tyr Glu Met Leu Met Gly His Cys Thr Tyr Phe

225 230 235 240

Pro Glu Glu Leu Arg Ser Val Lys Tyr Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Tyr

245

250

255

Asn Ala Leu Asn Asp Leu Asn Asn Leu Val Ile Thr Arg Asp Glu Asn

260

265

270

Glu Lys Leu Glu Tyr Tyr Glu Lys Phe Gln Ile Ile Glu Asn Val Phe

275

280

285

Lys Gln Lys Lys Pro Thr Leu Lys Gln Ile Ala Lys Glu Ile Leu

290

295

300

Val Asn Glu Glu Asp Ile Lys Gly Tyr Arg Val Thr Ser Thr Gly Lys

305 310 315 320

Pro Glu Phe Thr Asn Leu Lys Val Tyr His Asp Ile Lys Asp Ile Thr

325

330

335

Ala Arg Lys Glu Ile Ile Glu Asn Ala Glu Leu Leu Asp Gln Ile Ala

340

345

350

Lys Ile Leu Thr Ile Tyr Gln Ser Ser Glu Asp Ile Gln Glu Glu Leu

355

360

365

Thr Asn Leu Asn Ser Glu Leu Thr Gln Glu Glu Ile Glu Gln Ile Ser

370

375

380

Asn Leu Lys Gly Tyr Thr Gly Thr His Asn Leu Ser Leu Lys Ala Ile

385 390 395 400

Asn Leu Ile Leu Asp Glu Leu Trp His Thr Asn Asp Asn Gln Ile Ala

405

410

415

Ile Phe Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Lys Lys Val Asp Leu Ser Gln

420

425

430

Gln Lys Glu Ile Pro Thr Thr Leu Val Asp Asp Phe Ile Leu Ser Pro

435

440

445

Val Val Lys Arg Ser Phe Ile Gln Ser Ile Lys Val Ile Asn Ala Ile  
 450 455 460  
 Ile Lys Lys Tyr Gly Leu Pro Asn Asp Ile Ile Ile Glu Leu Ala Arg  
  
 465 470 475 480  
 Glu Lys Asn Ser Lys Asp Ala Gln Lys Met Ile Asn Glu Met Gln Lys  
 485 490 495  
 Arg Asn Arg Gln Thr Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Thr  
 500 505 510  
 Gly Lys Glu Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Glu Lys Ile Lys Leu His Asp  
 515 520 525  
 Met Gln Glu Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Leu Glu Ala Ile Pro Leu Glu  
  
 530 535 540  
 Asp Leu Leu Asn Asn Pro Phe Asn Tyr Glu Val Asp His Ile Ile Pro  
 545 550 555 560  
 Arg Ser Val Ser Phe Asp Asn Ser Phe Asn Asn Lys Val Leu Val Lys  
 565 570 575  
 Gln Glu Glu Asn Ser Lys Lys Gly Asn Arg Thr Pro Phe Gln Tyr Leu  
 580 585 590  
 Ser Ser Ser Asp Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Phe Lys Lys His Ile  
  
 595 600 605  
 Leu Asn Leu Ala Lys Gly Lys Gly Arg Ile Ser Lys Thr Lys Glu  
 610 615 620  
 Tyr Leu Leu Glu Glu Arg Asp Ile Asn Arg Phe Ser Val Gln Lys Asp  
 625 630 635 640  
 Phe Ile Asn Arg Asn Leu Val Asp Thr Arg Tyr Ala Thr Arg Gly Leu  
 645 650 655  
 Met Asn Leu Leu Arg Ser Tyr Phe Arg Val Asn Asn Leu Asp Val Lys  
  
 660 665 670  
 Val Lys Ser Ile Asn Gly Gly Phe Thr Ser Phe Leu Arg Arg Lys Trp  
 675 680 685  
 Lys Phe Lys Lys Glu Arg Asn Lys Gly Tyr Lys His His Ala Glu Asp

690	695	700	
Ala Leu Ile Ile Ala Asn Ala Asp Phe Ile Phe Lys Glu Trp Lys Lys			
705	710	715	720
Leu Asp Lys Ala Lys Lys Val Met Glu Asn Gln Met Phe Glu Glu Lys			
725	730	735	
Gln Ala Glu Ser Met Pro Glu Ile Glu Thr Glu Gln Glu Tyr Lys Glu			
740	745	750	
Ile Phe Ile Thr Pro His Gln Ile Lys His Ile Lys Asp Phe Lys Asp			
755	760	765	
Tyr Lys Tyr Ser His Arg Val Asp Lys Lys Pro Asn Arg Glu Leu Ile			
770	775	780	
Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Thr Arg Lys Asp Asp Lys Gly Asn Thr Leu			
785	790	795	800
Ile Val Asn Asn Leu Asn Gly Leu Tyr Asp Lys Asp Asn Asp Lys Leu			
805	810	815	
Lys Lys Leu Ile Asn Lys Ser Pro Glu Lys Leu Leu Met Tyr His His			
820	825	830	
Asp Pro Gln Thr Tyr Gln Lys Leu Lys Leu Ile Met Glu Gln Tyr Gly			
835	840	845	
Asp Glu Lys Asn Pro Leu Tyr Lys Tyr Glu Glu Thr Gly Asn Tyr			
850	855	860	
Leu Thr Lys Tyr Ser Lys Lys Asp Asn Gly Pro Val Ile Lys Lys Ile			
865	870	875	880
Lys Tyr Tyr Gly Asn Lys Leu Asn Ala His Leu Asp Ile Thr Asp Asp			
885	890	895	
Tyr Pro Asn Ser Arg Asn Lys Val Val Lys Leu Ser Leu Lys Pro Tyr			
900	905	910	
Arg Phe Asp Val Tyr Leu Asn Gly Val Tyr Lys Phe Val Thr Val			
915	920	925	
Lys Asn Leu Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Glu Val Asn Ser			
930	935	940	

Lys Cys Tyr Glu Glu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Ile Ser Asn Gln Ala  
 945 950 955 960  
 Glu Phe Ile Ala Ser Phe Tyr Asn Asn Asp Leu Ile Lys Ile Asn Gly  
 965 970 975  
 Glu Leu Tyr Arg Val Ile Gly Val Asn Asn Asp Leu Leu Asn Arg Ile

980 985 990  
 Glu Val Asn Met Ile Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Asn Met  
 995 1000 1005  
 Asn Asp Lys Arg Pro Pro Arg Ile Ile Lys Thr Ile Ala Ser Lys Thr  
 1010 1015 1020  
 Gln Ser Ile Lys Lys Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Gly Asn Leu Tyr Glu  
 1025 1030 1035 1040  
 Val Lys Ser Lys Lys His Pro Gln Ile Ile Lys Lys Gly

1045 1050

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 56

tatacgcgtg ttgacactag ttgcgcgaaat attgactcac ggggatttcc aagtctccac 60  
 cccattgacg tcaatgggag tttgtttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 120  
 cgttaacaact ccgcgcatt gacgcaaatg ggccgttaggc gtgtacggtg ggaggtctat 180  
 ataaggcagag ctcgttagt gaaccgtcag atcgccgcca ccatggacaa gaagtacagc 240  
 atcggcctgg acatcgac caactctgtg ggctggccg tcatcaccga cgagtacaag 300

gtgcccccagca agaaattcaa g 321

<210> 57

<211> 168

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 57

tgactcgaga acttgttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca 60  
 aattcacaa ataaaggcatt ttttcactg cattctagtt gtggttgtc caaactcatc 120  
 aatgtatctt atcatgtctg caatattcg cgagaagaca atagcagg 168

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 58

ggcgggtgga tcacgagttc agg 23

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 59

ggagtcacat gggagt caca ggg 23

<210> 60

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 60

ctagtggcgg ccgctcgagc atgcatctag agggccctat tctatagtgt caccataatg 60  
 ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc 120  
 cctcccccgt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa 180  
 atgagggaaat tgcacatcgat tgtctgagta ggtgtcatc tattctgggg ggtgggtgg 240

ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gagctagagt 300

cgaccggacc	gctgcaggca	tgca	324
<210> 61			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic construct			
<400> 61			
gcataaggac	taaagaccta		20
<210> 62			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic construct			
<400> 62			
ggtagtggtt	gaactcacaa		20
<210> 63			
<211> 2471			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic construct			
<400> 63			
ggcccccaga agcctgggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggcccttg 60			
gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaatac ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120			
ttcttagcacc ttcttgccac tcctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg 180			
gtgtgtgtc agccccggtc tcccaagggc ttcccaagtttgg tccccagggaa ccctcgacag 240			
ggcccggtct ctctcggtcca gcaaggccag ggacggccca cagggcaagg gcggagtcgc 300			
tgcgacgctg ctttcgtcccc gtggcccgct ccggccggc ctcggccgc ccggccggc 360			
tctgactgac cgcttactc ccacaggtga gcggccggga cggcccttct cctccggct 420			
gtaatttagcg ctgggtttaa tgacggcttg ttctttct gtggctgcgt gaaagccttg 480			
aggggctccg ggagggccct ttgtgcgggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgttg 540			

tgtgcgtggg gagcgccgca tgccgcgtcg cgctgcccgg cgctgtgag cgctgcggc 600  
 gcggcgccgg gcttgcgtcg ctccgcgtg tgccgcgtggg gagcgccgca gggggcggtg 660  
 ccccgccgtg cggggggggc tgccgaggga acaaaggctg cgtgcgggt gtgtgcgtgg 720  
 gggggtgagc aggggtgtg ggcgcgtcg tcgggtcgca accccccctg cacccttc 780  
 cccgagttgc tgagcacggc ccggcttcgg gtgcgggct ccgtacggg cgtggcgccg 840

ggctcgccgt gccggggccggg gggtgccggc aggtgggggt gccggggccgg gggggccgc 900  
 ctcggccgg ggagggtcg ggggaggggc gcggcgccccc ccggagcgcc ggcggctgtc 960  
 gaggcgccgc gagccgcagc cattgcctt tatgtaatc gtgcgagagg gcgcaggac 1020  
 ttcccttgtc ccaaattctgt gcccggccga aatctggag gcccggccgc accccctta 1080  
 gcggcgccgg ggcgaagcgg tgccgcggc gcaggaagga aatgggggg gaggccttc 1140  
 gtgcgtcgcc gcgcggccgt ccccttcctc ctctccagcc tcgggtctgt ccgcgggggg 1200  
 acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcggtt ctctggcgt gtgaccggcg 1260  
 gctcttagagc ctctgctaact catgttcatg ctttttttttttccctacag ctccctggca 1320

acgtgctggt tattgtgtcg tctcatcatt ttggcaaaa attttcgaa agatctgcta 1380  
 gcttaattaa cccgggtcgcc accatggta gcaagggcga ggagctgttc accgggggtgg 1440  
 tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg 1500  
 agggcgaggg cgtatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca 1560  
 agctgcccgt gccctggccc accctcgta ccaccctgac ctacggcgat cagtgcgtca 1620  
 gccgctaccc cgaccacatg aaggcggcag acttcttcaa gtccggccatg cccgaaggct 1680  
 acgttccagga ggcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcggcgagg 1740  
 tgaagttcga gggcgacacc ctggtaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg 1800

aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata 1860  
 tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg 1920  
 aggacggcgag cgtcgagctc gccgaccact accaggcaga caccggccatc ggcgacggcc 1980  
 ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccccgatc cggccgtgac aaagacccca 2040  
 acgagaagcg cgtatcacatg gtcctgctgg agttcgatc cggccgggg atcactctcg 2100  
 gcatggacga gctgtacaag taaagcggcc aaatcgatc cctaggtgt caagatctgc 2160  
 tagcttaatt aaccgggac tagtggcgcc cgctcgagca tgcatctaga gggccctatt 2220  
 ctatagtgtc acctaaatgc tagagctcgc tgatcggcct cgtactgtgcc ttcttagttgc 2280

cagccatctg ttgttgcccc ctcccccgtg ctttcgttgc ccctggaaagg tgccactccc 2340  
 actgtccctt cctaataaaaa tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct 2400

attctgggg gtgggtgg gcaggacagc aagggggagg attggaaaga caataggcagg 240  
 catgctgggg a 2471  
 <210> 64  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 64  
 cccctcgct gtactgaaag 20  
 <210> 65  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 65  
 gcacatcatc tgaggcaggt 20  
 <210> 66  
 <211> 4009  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <400> 66  
 atgaattctc tagacaattt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca 60  
 atggagttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgttgt aacaactccg 120  
 cccattgac gcaaattggc ggttaggcgtg tacggtgga ggtctatata agcagagctc 180  
 gtttagtgaa ccgtcagatc acgcgtgcac ccatgaagcg gaactacatc ctggccctgg 240  
  
 acatggcat caccagcgtg ggctacggca tcatacgacta cgagacacgg gacgtgatcg 300  
 atgcggcggt gggctgttc aaagaggcca acgtggaaaa caacgaggcaggcaggca 360  
 agagaggcgc cagaaggctg aagcggcgg agcggcatag aatccagaga gtgaagaagc 420  
 tgctgttcga ctacaacctg ctgaccgacc acagcgagct gagcggcatc aaccctacg 480

aggccagagt gaagggcctg agccagaagc tgagcgagga agagttctct gccgccctgc 540  
 tgcacctggc caagagaaga ggcgtgcaca acgtgaacga ggtggaagag gacaccggca 600  
 acgagctgtc caccaaagag cagatcagcc ggaacagcaa ggccctggaa gagaaatacg 660  
 tggccgaact gcagctggaa cggctgaaga aagacggcga agtgcgggca agcatcaaca 720

gattcaagac cagcgactac gtgaaagaag ccaaacagct gctgaaggtg cagaaggcct 780  
 accaccagct ggaccagagc ttcatcgaca cctacatcga cctgctggaa accccggcga 840  
 cctactatga gggacctggc gagggcagcc cttcggctg gaaggacatc aaagaatgg 900  
 acgagatgct gatgggccac tgcacctact tccccgagga actgcggagc gtgaagtacg 960  
 cctacaacgc cgacctgtac aacgcccctga acgacctgaa caatctcgt atcaccagg 1020  
 acgagaacga gaagctggaa tattacgaga agttccagat catcgagaac gtgttcaagc 1080  
 agaagaagaa gcccacccctg aagcagatcg ccaaagaaat cctcgtaac gaagaggata 1140  
 ttaagggcta cagagtgacc agcaccggca agcccgagtt caccaacctg aaggtgtacc 1200

acgacatcaa ggacattacc gcccgaaag agattattga gaacgccgag ctgctggatc 1260  
 agattgcca gatctgacc atctaccaga gcagcgagga catccagggaa gaactgacca 1320  
 atctgaactc cgagctgacc caggaagaga tcgagcagat ctctaatctg aaggctata 1380  
 cccgcaccca caacctgagc ctgaaggcga tcaacctgtat cctggacgag ctgtggcaca 1440  
 ccaacgacaa ccagatcgct atcttcaacc ggctgaagct ggtgcccaag aaggtggacc 1500  
 tgtcccgagca gaaagagatc cccaccaccc tggtgacga ctcatcctg agccccgtcg 1560  
 tgaagagaag ctcatccag agcatcaaag tgatcaacgc catcatcaag aagtacggcc 1620  
 tgcccaacga catcattatc gagctggccc gcgagaagaa ctccaaggac gcccgaaaa 1680

tgatcaacga gatgcagaag cggaaaccggc agaccaacga gcggatcgag gaaatcatcc 1740  
 ggaccaccgg caaagagaac gccaagtacc tgatcgagaa gatcaagctg cacgacatgc 1800  
 aggaaggcaa gtgcctgtac agcctggaa ccattccctt ggaagatctg ctgaacaacc 1860  
 cttcaacta tgagggtggac cacatcatcc ccagaagcgt gtccttcgac aacagctca 1920  
 acaacaaggt gtcgtgaag caggaagaaa acagcaagaa gggcaaccgg accccattcc 1980  
 agtacctgag cagcagcgac agcaagatca gctacgaaac cttcaagaag cacatcctga 2040  
 atctggccaa gggcaagggc agaatcagca agaccaagaa agagtatctg ctggaagaac 2100  
 gggacatcaa caggttctcc gtgcagaaag acttcatcaa ccggAACCTG gtggatacca 2160

gatacgccac cagaggcctg atgaacctgc tgccggacta cttagagtg aacaacctgg 2220  
 acgtgaaagt gaagtccatc aatggcggt tcaccagctt tctgcggcgg aagtggaaat 2280  
 ttaagaaaga gggaaacaag gggtacaagc accacggcga ggacggccctg atcattgcca 2340

acgccgattt catttcaaa gagtggaaga aactggacaa ggccaaaaaa gtgatggaaa 2400  
 accagatgtt cgaggaaaag caggccgaga gcatgcccga gatcgaaacc gagcaggagt 2460  
 acaaagagat cttcatcacc ccccaccaga tcaagcacat taaggacttc aaggactaca 2520  
 agtacagcca ccgggtggac aagaagccta atagagagct gattaacgac accctgtact 2580  
 ccacccggaa ggacgacaag ggcaacaccc tgatcgtgaa caatctgaac ggcctgtacg 2640

acaaggacaa tgacaagctg aaaaagctga tcaacaagag cccgaaaag ctgctgatgt 2700  
 accaccacga cccccagacc taccagaaac tgaagctgat tatggaacag tacggcagc 2760  
 agaagaatcc cctgtacaag tactacgagg aaaccggaa ctacctgacc aagtactcca 2820  
 aaaaggacaa cggccccgtg atcaagaaga ttaagtatta cggcaacaaa ctgaacgccc 2880  
 atctggacat caccgacgac taccctaaaca gcagaaacaa ggtcgtgaag ctgtccctga 2940  
 agccctacag attcgacgtg tacctggaca atggcgtgta caagttcgtg accgtgaaga 3000  
 atctggatgt gataaaaaaaaaa gaaaactact acgaagtgaa tagcaagtgc tatgaggaag 3060  
 ctaagaagct gaagaagatc agcaaccagg ccgagtttat cgcctccctt tacaacaacg 3120

atctgatcaa gatcaacggc gagctgtata gagtgatcg cgtaacaac gacctgctga 3180  
 accggatcga agtgaacatg atcgacatca cctaccgca gtacctggaa aacatgaacg 3240  
 acaagaggcc ccccaggatc attaagacaa tcgcctccaa gacccagagc attaagaagt 3300  
 acagcacaga cattctggc aacctgtatg aagtgaaatc taagaagcac cctcagatca 3360  
 tcaaaaaggg cggatcccc aagaaaaagc gcaaagtgga ctacaagac gatgacgaca 3420  
 agtgagctag cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccct ctcggccgtg 3480  
 ctttccttga ccctggagg tgccactccc actgtcttt cctaataaaa tgaggaaatt 3540  
 gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctgggg gtggggtgccc gcaggacagc 3600

aagggggagg attggaaaga gaatagcagg catgctggta cctgaggccc tattccat 3660  
 gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataattt gaattttttt 3720  
 gactgtaaac acaaagat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat aatttcttgg 3780  
 gtagtttgcgat tttttttttat tatgttttaa aatggactat catatgctt ccgtacttg 3840  
 aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaaca ccggagacca 3900  
 cggcaggctc cagtttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg caaaatgccc 3960  
 tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt tttgcggccg cgtcgacat 4009

## 【심사관 직권보정사항】

## 【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4

【변경전】

제1항에 있어서,

심부 인트론 돌연변이가

- (i) SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이이거나;
- (ii) c.2991+1655A>G 돌연변이이거나;
- (iii) 핵산의 5' 스플라이스 공여체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치하거나;
- (iv) 핵산의 3' 스플라이스 수용체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치하거나; 또는
- (v) 핵산에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입하는 것인,

조성물.

【변경후】

제1항에 있어서,

심부 인트론 돌연변이가

- (i) SEQ ID NO:23으로 표시된 서열의 심부 인트론 돌연변이이거나;
- (ii) c.2991+1655A>G 돌연변이이거나;
- (iii) 핵산의 5' 스플라이스 공여체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 하류에 위치하거나;
- (iv) 핵산의 3' 스플라이스 수용체 부위의 1개 내지 10,000개 뉴클레오티드, 1개 내지 1000개 뉴클레오티드, 또는 100개 내지 1000개 뉴클레오티드 상류에 위치하거나; 또는
- (v) 핵산에 스플라이스 공여체 부위 또는 스플라이스 수용체 부위를 도입하는 것인,

조성물.