



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월26일

(11) 등록번호 10-2317622

(24) 등록일자 2021년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/85 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/63 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

A61K 48/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7000200

(22) 출원일자(국제) 2017년06월02일

심사청구일자 2020년04월09일

(85) 번역문제출일자 2019년01월03일

(65) 공개번호 10-2019-0031230

(43) 공개일자 2019년03월25일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/063549

(87) 국제공개번호 WO 2017/207797

국제공개일자 2017년12월07일

(30) 우선권주장

16172964 2016년06월03일 유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

Sci Signal., 8(374):doi:

10.1126/scisignal.aaa0549(2015.4.28.)

Nat Biotechnol., 33(4):390-394(2015.4.)*

미국 특허출원공개공보

US2014/0322184(2014.10.30)*

Nat Chem Biol., 11(3):198-200(2015.3.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

앵스띠뛰 나쎬오날 드 라 샹페 에 드 라 흐셰르슈
메디칼 (인쎬름)

프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 톨비악
101

이쎬엠 (앵스띠뛰 뤼 셰르보 에 드 라 모엘 예뎬
니에르)

프랑스공화국, 75013 빠리, 볼르바르 드 로뎬딸
47/83, 오뎬딸 뎬띠에 쎬뎬트리에르

(뒹뎬에 계쎬)

(72) 발명자

하바쎬르, 필립

프랑스공화국, 75013 빠리, 볼르바르 드 로뎬딸,
47, 오뎬딸 뎬띠에 쎬뎬트리에르 뎬. 이쎬엠, 인
쎬름 위975; 앵스띠뛰 뤼 셰르보 에 드 라 모엘
르 예뎬니에르 (이쎬엠), 쎬엔에르에스
위엠에르7225

말레, 자끄

프랑스공화국, 75013 빠리, 볼르바르 드 로뎬딸,
47, 오뎬딸 뎬띠에 쎬뎬트리에르 뎬. 이쎬엠, 인
쎬름 위975; 앵스띠뛰 뤼 셰르보 에 드 라 모엘
르 예뎬니에르 (이쎬엠), 쎬엔에르에스
위엠에르7225

셰르게라, 체

프랑스공화국, 92265 퐁뜨네-오-로즈, 루뜨 뤼 빠
노하마, 18, 쎬어아 엠이에르쎬영, 인쎬름
위에스27

(74) 대리인

특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 최성호

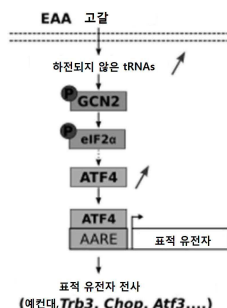
(54) 발명의 명칭 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 식이 제어된 발현 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 Cas 뉴클레아제를 이용하는 게놈 편집에 관한 것이다. 본 발명자들은 Cas 뉴클레아제의 발현이 최소의 프로모터 및 적어도 하나의 아미노산 반응 구성성분(AARE) 핵산을 포함하는 조절성 구성성분의 사용에 의해 미세하게 조절될 수 있으며, 이것은 적어도 하나의 필수 아미노산이 결여된 식이, 또는 투니카마이신에 대해 반응성

(뒹뎬에 계쎬)

대표도 - 도1



임음을 발견하였다. 예를 들면, FLAG-Cas9-GFP 융합 및 Cas9-FLAG-RFP 융합은 293 T 세포에서 발현될 수 있었다. 또한, 푸로마이신 내성 유전자를 지닌 공여체 플라스미드의 존재하에서, 상기 푸로마이신 내성 유전자의 통합은 293 T 세포의 게놈에서 유전자자리 AASV1을 안전하게 지닌 부위에서 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명은 (i) 최소의 프로모터 및 1 내지 20개의 AARE 핵산을 포함하는 조절성 폴리뉴클레오타이드, 및 (ii) 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드의 제어 하에 있는, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 개체에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2830/002 (2013.01)

(73) 특허권자

상프르 나쇼날 드 라 리쉴르쉴 상띠피크

프랑스 파리 에프-75016 뤼 미셀 앙즈 3

쏘호본느 유니베르시테

프랑스 75006 파리 뤼 드 르'에폴르 드 메드쉴느
21

**쑤미사리아 아 레네르지 아토미끄 에뜨 옥스 에너
지스 엘터네이티브즈**

프랑스, 파리 75015, 바띠맹 르 포낭트 디, 뤼 레
블랑크 25

아시스땅스 퍼블리끄-오삐또 드 빠리

프랑스 에프-75004 빠리 아브뉘 빅토리아 3

명세서

청구범위

청구항 1

- 최소의 프로모터(minimal promoter) 및 1 내지 20개의 아미노산 반응 구성성분(amino acid response element: AARE) 핵산을 포함하는 조절성 폴리뉴클레오타이드로, 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드가 개체(individual)에서 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이의 소비시 활성화되는, 조절성 폴리뉴클레오타이드; 및
- 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드의 제어 하에 있는, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 개체의 적어도 하나의 표적 세포에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

Cas 뉴클레아제가 Cas9 뉴클레아제인 핵산.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

아미노산 반응 구성성분(AARE) 핵산이 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4 및 서열 번호: 5의 서열의 핵산을 포함하는 그룹에서 선택된 핵산.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

조절성 폴리뉴클레오타이드가 2 내지 10개의 AARE 핵산을 포함하는 핵산.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

조절성 폴리뉴클레오타이드가 2 내지 6개의 AARE 핵산을 포함하는 핵산.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산 벡터.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 전달 입자.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

표적화된 세포의 막에 노출된 표적 수용체에 결합하기 위한 하나 이상의 리간드를 이의 표면에 포함하는 전달 입자.

청구항 9

(i) 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 핵산, 및 (ii) 약제학적으로 허용되는 비히클(vehicle)을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

의약의 제조에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

청구항 9에 있어서,

게놈을 적어도 하나의 표적 세포내로 편집하기 위한 활성제로서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

표적 세포가 적어도 하나의 유전 돌연변이를 갖는 약제학적 조성물.

청구항 14

청구항 9에 있어서,

질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한 활성제로서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 15

청구항 9에 따른 약제학적 조성물을 포함하고 약제학적으로 활성인 화합물을 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방용 키트.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 개체에서 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 관한 것이다.

[0003] 특히, 핵산의 발현은 적어도 하나의 필수 아미노산에 있어서 결핍된 식이의 소비시 제어될 수 있다.

배경 기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 표적화가능한 뉴클레아제(targetable nuclease)를 사용한 게놈 편집(genome editing)은 세균으로부터 식물 및 사람을 포함하는 동물의 범위의 유기체의 정밀한 게놈 변형을 위한 최근에 생겨난 기술이다. 이의 매력은 이것이 표적화된 게놈 변형이 다른 종류의 방법으로 가능하지 않았던 거의 모든 유기체에 대해 사용될 수 있다는 점이다.

[0006] 예컨대, 아연-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease: ZFN), 전사-활성인자 유사 효과인자 뉴클레아제(TALEN) 및 메가뉴클레아제를 시행하는, 표적화된 게놈 변형에 대한 최근의 시도는 이중 가닥 파괴를 도입하여 복구 경로를 활성화시킴으로써 영구적인 돌연변이를 생성하기 위한 과학적 군집(scientific community)을 가능하게 하

였다.

- [0007] ZFN 및 TALEN과 같이 설계된 뉴클레아제의 게놈내 요구되는 부위에서 DNA 이중 가닥 파괴를 생성하는 능력은 유전자자리-지시된 게놈 가공의 치료학적 해독을 위한 낙관론을 생성하여 왔다. 그러나, 이러한 시도들은 가공하기에 비용이 많이 들고 시간-소모적이며, 특히 대규모의, 고-처리량 연구를 위한 이들의 광범위한 용도를 제한한다.
- [0008] 보다 최근에, 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 전체적으로 명백하고 특이적인 시스템, 즉, 세균 CRISPR-관련 단백질-9 뉴클레아제(Cas9)를 기반으로 하는 새로운 도구가 크게 관심을 일으켜 왔다.
- [0009] 다른 유전자-편집 방법과는 달리, 이는 저렴하고, 신속하며 사용하기 용이하고, 전세계의 실험실을 통해 신속하게 퍼져왔다. 이러한 시스템의 힘은 생명공학의 모든 분야를 의심할여지없이 전환시키고 사람 질환에 대한 신규한 분자 치료요법의 개발을 자극할 게놈 서열 및 유전자 발현의 표적화되고, 매우 효율적인 변경을 수행한다는 것이다.
- [0010] 2012년에 이의 초기 입증 이후에, CRISPR/Cas9 시스템은 광범위하게 채택되었다. 이러한 시스템은 사람(Mali et al., 2013, Science, Vol. 339: 823-826), 세균 (Fabre et al., 2014, PLoS Negl. Trop. Dis., Vol. 8:e2671), 제브라피시(zebrafish)(Hwang et al., 2013, PLoS One, Vol. 8:e68708), 씨. 엘레간스(*C. elegans*)(Hai et al., 2014 Cell Res. doi: 10.1038/cr.2014.11), 식물(Mali et al., 2013, Science, Vol. 339: 823-826), 제노푸스 트로피칼리스(*Xenopus tropicalis*)(Guo et al., 2014, Development, Vol. 141: 707-714), 효모(DiCarlo et al., 2013, Nucleic Acids Res., Vol. 41: 4336-4343), 초파리(Drosophila)(Gratz et al., 2014 Genetics, doi:10.1534/genetics.113.160713), 원숭이(Niu et al., 2014, Cell, Vol. 156: 836-843), 토끼(Yang et al., 2014, J. Mol. Cell Biol., Vol. 6: 97-99), 돼지(Hai et al., 2014, Cell Res. doi: 10.1038/cr.2014.11), 랫트(Ma et al., 2014, Cell Res., Vol. 24: 122-125) 및 마우스(Mashiko et al., 2014, Dev. Growth Differ. Vol. 56: 122-129)를 포함하는 많은 세포주 및 유기체내에서 중요한 유전자를 표적화하는데 이미 성공적으로 사용되어 왔다.
- [0011] 또한, 게놈 편집은 전임상 수준에서 뿐만 아니라 제I상 임상 시험에서 다수의 질환에 성공적으로 적용되어 왔다 (참고: Cox 등의 검토, Nat Med. 2015 Feb;21(2):121-31). 게놈 편집을 기반으로 한 치료요법의 실행가능성을 평가하는데 있어서, 바람직한 유전적 변화의 치료학적 효과가 우선 명확하게 확립되어야 한다. 후속적으로, 제공된 전략의 성공은 편집된 세포의 적합성, 게놈을 편집하는데 이용된 DNB 복구 경로, 및 게놈 편집 분자의 표적 세포형으로의 전달 효율에 의해 지배되는, 치료학적 변형 '역치(threshold)'가 달성되는 용이성에 의존할 것이다.
- [0012] 그러나, 이의 모든 잠재능에도 불구하고, CRISPR-Cas9 기술은 편집 공정과 관련된 오프-표적 효과(즉, 원치않은 게놈 국제화(genomic localisation))에 의해서, 및 세균 뉴클레아제 Cas9의 면역원성에 의해 현재 심각하게 제한되어 있다.
- [0013] 지금까지, 오프-표적 쟁점은 포르테우스(Porteus)(Genome Biology, 2015, 16:286)가 강조한 바와 같이, 뉴클레아제 활성을 지배하는 기계론적 특징에 내재된 것으로 여겨지고 있다. 포르테우스는 "적절한 전달 전략을 결정하는데 있어서 중요한 고려사항은 히트 앤드 런 시도(hit and run approach)이다"라고 고려하고 있다. 더욱이, 포르테우스는 "뉴클레아제의 지속적인 발현은 필요하지 않을 뿐 아니라 피해져야만 한다: 뉴클레아제의 지속적인 발현은 유해한 게놈 불안정성의 가능성을 증가시키고 편집된 세포 적합성을 절충하거나 노출된 세포가 형질 전환되도록 한다"라고 믿고 있다. 마지막으로, 포르테우스는 "세포의 생체내(*in vivo*) 편집을 필요로 하는 치료학적 적용의 경우, 챌린지가 보다 더 크고 용액은 결정되지 않았다"라고 결론짓고 있다.
- [0014] 일부 적용에서 유해할 수 있는 오프 표적을 완화시키는 직접적인 수단은 보다 큰 특수성을 지닌 신규한 뉴클레아제를 확인하고/설계하는 것이다.
- [0015] 따라서, 개체에서, Cas 뉴클레아제, 특히 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 발현, 특히 안전한 유전자 치료요법 시도를 위하여 신규한 미세-조율되어 제어되는 발현 시스템을 제공하는 것이 당해 분야에서 요구되고 있다.

발명의 내용

- [0016] 발명의 요약

- [0017] 본 발명의 하나의 국면은:
- [0018] - 최소의 프로모터 및 적어도 하나의 AARE(아미노산 반응 구성성분) 핵산을 포함하는 조절성 폴리뉴클레오타이드로, 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드가 개체에서 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이의 소비시 활성화되는, 조절성 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0019] - 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드의 제어 하에 있는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 개체에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 국면은 본원에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산 벡터에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 여전히 추가의 국면은 본원에 정의된 바와 같은 핵산 또는 핵산 벡터를 포함하는 전달 입자에 관한 것이다.
- [0022] 다른 국면에서, 본 발명은 또한 (i) 본원에 정의된 바와 같은 핵산 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자, 및 (ii) 약제학적으로 허용되는 비히클(vehicle)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 추가의 국면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 핵산 또는 핵산 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명의 다른 국면은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 추가의 국면에서, 본 발명은 또한 적어도 하나의 표적 세포내로 계놈을 편집하기 위한 활성제로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 하나의 국면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에게 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 적어도 포함하는, 계놈을 적어도 하나의 표적 세포내로 편집하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0027] 다른 국면에서, 본 발명은 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한 활성제로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은, 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 국면은 또한 이를 필요로 하는 개체에게 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0029] 최종적으로, 추가의 국면에서, 본 발명은:
- [0030] - 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물, 및
- [0031] - 약제학적 활성 화합물을 포함하는, 질환을 치료하고/하거나 예방하기 위한 키트(kit)에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도면의 범례(LEGENDS OF THE FIGURES)

도 1: GCN2-eIF2 α -ATF4 시그널링 경로(signaling pathway)를 나타내는 개략도. EAA 기아(starvation)에 대한 반응시, 활성화된 GCN2는 eIF2 α 를 포스포릴화시켜, 전사 인자 ATF4의 상향 조절(up-regulation) 및 AARE 서열로 이를 보충시켜 표적 유전자 발현을 유도한다.

도 2: AARE-Cas 뉴클레아제 작제물(construct)의 묘사를 설명하는 개략도: Trb3 (검정색 점) 프로모터 및 Tk 최소 프로모터로부터의 AARE(검정색 점)의 6개 카피가 이러한 작제물을 구성한다.

도 3: pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9 플라스미드를 나타하는 개략도. pTK는 최소 TK 프로모터의 위치를 나타내고; 2X AARE는 AARE 핵산의 위치를 나타내며; 화살표 "NLS-FLAG-CAS9"는 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 위치를 나타내고; 화살표 "AmpR"은 암피실린 내성을 암호화하는 핵산을 나타낸다.

도 4: pTRIP blast_U6 AAVS1_2xAARE-Cas9-Flag-RFP 플라스미드를 나타내는 개략도. 하부 패널은 상부 패널과 연속된다. 상부 패널의 우측 말단의 EcoRI 제한 부위는 하부 패널의 좌측 말단의 EcoRI 제한 부위를 지칭한다.

도 5: 루이신(Leucine)이 고갈된 배지(293T-C9 Leu⁻; 분명한 곡선) 또는 투니카마이신을 포함하는 배지(293T-C9 TU; 점선 곡선)를 사용하여 T0에서 유도시 293T 세포내에서 Cas9 발현을 나타내는 플롯. 유도는 T0에서 수행하여 24 h에 제거된다. 발현은 유도의 제거 후 24시간 및 48시간 켜, 즉, T0+48 h 및 T0+72 h 각각에서 모니터링

한다. 가로 축은 시간선(단위: 시간)을 나타내고 세로 축은 Cas9 뉴클레아제의 밴드 강도를 나타내며, 따라서 Cas9 발현을 나타낸다. Cas9의 최대 발현은 유도 24 h 후 관찰되며, 이는 임의로 100%의 발현을 나타낸다.

도 6: 293T 세포의 게놈의 AAVS1 부위에서 공여체 DNA(Do)의 통합을 나타내는 플롯(plot). 293T 세포를 플라스미드 'pTRIP blast_U6 AAVS1_2xAARE-Cas9-flag-RFP'(C9) 및 또한 카세트(cassette) 'AAVS1 절단 부위-GFP-p2a-푸로마이신_AAVS1 절단 부위'(Do)를 함유하는 공여체 플라스미드로 형질감염시켰다. 푸로마이신 내성 세포의 수(가로 축)는 투니카마이신(293+Do+C9i Tu)의 존재 하에, 또는 루이신-고갈된 배지(293+Do+C9i Leu-)를 사용한 유도시 계수된다. 대조군으로서, 플라스미드 둘 다(Do 및 C9)로 형질감염된 293T 세포를 유도하지 않은 상태(293+Do+C9 ni)에서 검정한다. 최종적으로, 어떠한 카피의 C9 플라스미드도 없는 293T 세포를 공여체 플라스미드(Do)로 형질감염시키고 푸로마이신 내성 세포의 수를 추가로 계수하였다.

도 7: 도 6에서와 유사하게, C9 플라스미드(293-C9 세포)의 하나의 카피를 함유하는 293T 세포의 게놈의 AAVS1 부위에서 공여체 DNA(Do)의 통합을 나타내는 플롯. 293-C9 세포를 카세트 'AAVS1 절단 부위-GFP-p2a-푸로마이신_AAVS1 절단 부위'(Do)를 함유하는 공여체 플라스미드로 형질감염시켰다. 푸로마이신 내성 세포의 수(가로 축)를 투니카마이신(293_C9+Doi Tu)의 존재하에서, 또는 루이신-고갈된 배지(293_C9+Doi Leu-)를 사용한 유도시 계수한다. 대조군으로서, 플라스미드 Do로 형질감염된 293-C9 세포를 유도(293_C9+Do-ni)의 부재하에서 검정한다. 최종적으로, 유도하지 않고, 공여체 플라스미드(Do)로 형질감염된 293-C9 세포를 푸로마이신 내성 293-C9 세포의 수를 추가로 계수하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

본원에 언급된 어떠한 인용도 참고로 포함된다.

본 발명자들은 유전자 치료요법에 이상적으로 적합한 조절 시스템을 달성하기 위한 하나의 필수적인 아미노산이 고갈된 식이에 대한 영양적 적응 경로의 놀랄만한 특징을 평가하였다. 본 발명자들은 이러한 시스템이, 식이성 특수 아미노산 고갈을 기반으로, 합성의 전사 인자 또는 조절 단백질의 발현이나 약리학적 유도인자의 투여도 필요로 하지 않음을 발견하였다. 이는 생리학적으로 무-독성이며 임상 적용에 따른다. 이러한 신규의 영양-기반 조절 시스템은 사람 유전자 치료요법에서 주요 잔존하는 장애물 중 하나를 해결하는 능력을 지닌 생리학적 시도이다.

이론에 얽매이려는 의도 없이, 본 발명자들은 본원에 개시된 제어된 발현 시스템이 Cas 뉴클레아제(CRISPR(군집화된 일정 간격으로 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 관련 단백질(associated protein))의 미세-조율된 발현에 특히 적합한 시스템이다.

제WO 2013/068096호가 몇가지 단백질에 대해 이러한 제어된 발현 시스템을 개시하고, 이러한 개념의 증명이 루시페라제 단백질의 발현으로 수행되었음에 주목하여야 한다. 차베룩스(Chaveroux) 등(Science Signaling, 2015, vol. 8(374), 1-10)은 eIF2alpha-ATF4 시그널링 경로를 특성화하기 위한 이러한 시스템을 이용하였다.

그러나, 표적 숙주 세포내에서 Cas 뉴클레아제를 발현하는 것의 제약, 예컨대, 누출의 부재로 인하여, 제WO 2013/068096호 및 차베룩스 등에 개시된 영양-기반 조절 시스템이 Cas 뉴클레아제의 제어된 발현을 위한 적합한 도구를 제공할 수 있는지를 예측할 수 없었다.

본원에 개시된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산은 오프-표적을 제한하거나 피하도록 하며, 이는 일반적으로 효율적으로 제어된 발현 시스템의 결여(발현 "누출")로 인하여 관찰된다.

· Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산

본 발명의 제1 국면은:

- 최소의 프로모터 및 적어도 하나의 AARE(아미노산 반응 구성성분) 핵산을 포함하는 조절 폴리뉴클레오타이드로, 상기 조절 폴리뉴클레오타이드는 개체에서 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이의 소비시 활성화되는, 조절 폴리뉴클레오타이드; 및

- 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드의 제어하에 위치한 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 개체에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 관한 것이다.

다른 국면에서, 본 발명은 또한 :

- [0045] - 최소의 프로모터 및 적어도 하나의 AARE(아미노산 반응 구성성분) 핵산을 포함하는 조절성 폴리뉴클레오타이드(상기 조절성 폴리뉴클레오타이드는 개체에서 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이의 소비시 활성화된다); 및
- [0046] - 상기 조절성 폴리뉴클레오타이드의 제어 하에 위치한, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 개체의 적어도 하나의 표적 세포 내에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 영역내에서, 표현 "제어된 발현(controlled expression)"은 이러한 발현이 유도 순간, 유도 기간과 관련하여, 정밀한 방식으로 유도되거나 켜지고(turn "on") 멈추거나(shut down) 꺼지는(turn "off") 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0048] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 제I 부류 Cas 뉴클레아제, 제II 부류 Cas 뉴클레아제 및 제III 부류 Cas 뉴클레아제를 포함한다.
- [0049] 제I 형, 제II 형 또는 제III 형 Cas 단백질의 경우, 숙련가들은 문헌[Chylinski et al. (2014, Nucleic Acids Research, Vol. 42(10) : 6091-6105); Sinkunas et al. (2011, The EMBO Journal, Vol. 30(7) : 1335-1342); Aliyari et al. (2009, Immunological Reviews, Vol. 227(1) : 176-188); Cass et al. (Biosci Rep, doi:10.1042/BSR20150043), Makarova et al. (2011, Biology Direct, Vol. 6 : 38); Gasiunas et al. (2012, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 109(39) : E2579-E2586) ; Heler et al. (2015, Nature, Vol. 519(7542) : 199-202); Esvelt et al. (2013, Nat Methods, Vol. 10(11) : doi :10.138/nmeth.2681), Zetsche et al. (Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71), 또는 Chylinski et al. (2013, Biology, Vol. 10(5) : 726-737)]을 참조할 수 있다.
- [0050] 일부 구현예에서, 제I 부류 Cas 뉴클레아제는 Cas3, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1 및 Csy1으로 이루어진 그룹에서 선택된다.
- [0051] 일부 구현예에서, 제II 부류 Cas 뉴클레아제는 Cas9, Cpf1, Csn2 및 Cas4를 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0052] 일부 구현예에서, 제III 부류 Cas 뉴클레아제는 Cas10, Csm2 및 Cmr5를 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0053] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0054] 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제는 세균 공급원, 특히 아카리오클로리스 마리나(*Acaryochloris marina*), 악티노마이세스 나에슬룬디아(*Actinomyces naeslundii*), 알카니보락스 디에셀롤레이(*Alcanivorax dieselolei*), 벨리엘라 발티카(*Belliella baltica*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리오파테리움 글로머란스(*Coriobacterium glomerans*), 코리네박테리움 울케란스(*Corynebacterium ulcerans*), 데술포모닐레 티에드제이(*Desulfomonile tiedjei*), 딕케이 다단티이(*Dickeya dadantii*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 락토바실러스 케피라노파시엔스(*Lactobacillus kefirianofaciens*), 리스테리아 인노쿠아(*Listeria innocua*), 메틸로박테리움 엑토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*), 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 믹소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 파스퇴렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*), 프레보텔라 인테르메디아(*Prevotella intermedia*), 프로클로로코쿠스 마리누스(*Prochlorococcus marinus*), 피크로플렉수스 토르퀴스(*Psychroflexus torquis*), 스파에로박터 써모필루스(*Sphaerobacter thermophilus*), 스펅고박테리움 아종(*Sphingobacterium sp.*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코쿠스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*) 및 스트렙토마이세스 빙첵젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)를 포함하는 그룹에서 선택된 세균으로부터 기원할 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제는 예컨대 메타노쿨레우스 보우르젠시스(*Methanoculleus bourgensis*)와 같은 원시세균 공급원으로부터 기원할 수 있다.
- [0056] 어떠한 제한없이, 본원에 개시된 Cas9 뉴클레아제는 천연적으로 존재하는 Cas9 뉴클레아제의 동족체, 파랄로그(paralog) 및 오르톨로그(ortholog) 및 변이체를 포함한다.
- [0057] 특정 구현예에서, Cas9 변이체는 SpCas9-HF1(Kleinstiver et al.; Nature. 2016 Jan 28;529(7587):490-5), FokI 뉴클레아제에 대해 촉매적으로 불활성인 Cas9의 융합체인 fCas9(Guilinger et al.; Nat. Biotechnol. 2014; 32(6): 577-582), 및 슬라이마커(Slaymaker) 등(Science. 2016 Jan 1;351(6268):84-8)에 의해 개시된 바

와 같은 특이성이 증진된 어떠한 비례적으로 가공된 Cas9 뉴클레아제를 포함할 수 있다.

- [0058] 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 및/또는 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는 벡터는 예컨대, SIGMA-ALDRICH®로부터 상업적으로 이용가능할 수 있다.
- [0059] 일부 다른 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 단백질의 직접적인 진화를 위한 방법을 이용하여 확인할 수 있다 (Packer and Liu (Nat Rev Genet. 2015 Jul;16(7):379-94)).
- [0060] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 안내된 Cas 뉴클레아제이다.
- [0061] 본 발명의 영역내에서, "DNA 또는 RNA 안내된"은 안내(guide) DNA 또는 RNA의 존재하에서 Cas 뉴클레아제가 이의 서열이 안내 DNA 및 RNA와 상보적인 핵산에 대해 표적화되는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 특정 구현예에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 발현은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 전사로부터 생성되는 mRNA 발현의 측정, 및/또는 Cas 뉴클레아제 발현의 측정을 포함하는, 당해 분야에서 이용가능한 어떠한 적합한 방법으로도 측정될 수 있다.
- [0062] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제 발현의 측정은 상기 Cas 뉴클레아제에 특이적으로 결합하는 항-항체를 사용하여 Cas 뉴클레아제의 발현을 측정함으로써 수행할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 영역내에서, 유도된 발현은 기본적인, 비-유도된 발현과 비교하여 시간 배수 발현(time fold expression)으로 발현될 수 있다.
- [0064] 일부 구현예에서, 유도된 발현은 기본 발현과 비교하여 2배 내지 10,000배, 바람직하게는 4배 내지 500배, 보다 바람직하게는 8배 내지 250배, 가장 바람직하게는 10배 내지 100배에서 변할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 영역 내에서, 2배 내지 10,000배는 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 75배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 600배, 750배, 800배, 850배, 900배, 950배, 1,000배, 2,000배, 3,000배, 4,000배, 5,000배, 6,000배, 7,000배, 8,000배 및 9,000배를 포함한다.
- [0066] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "최소의 프로모터(minimal promoter)"는 하부(downstream)에 위치한 목적한 유전자의 전사를 적절하게 개시하는 모든 필요한 구성성분을 포함하는 프로모터를 의미하는 것으로 의도된다. 본 발명의 영역 내에서, "최소의 프로모터" 및 "코어 프로모터"는 동일한 표현으로 고려된다. 당해 분야의 기술자들은 "최소의 프로모터"가 적어도 하나의 전사 출발 부위, RNA 폴리머라제에 대한 결합 부위 및 일반적인 전사 부위에 대한 결합 부위(TATA 박스)를 포함한다는 것을 이해한다.
- [0067] 적합한 최소의 프로모터는 당해 분야의 기술자에게 알려져 있다.
- [0068] 일부 구현예에서, 본 발명을 수행하기에 적합한 최소의 프로모터는 티미딘 키나제의 프로모터, β -글로빈의 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV)에 대한 프로모터, SV40 프로모터 등의 프로모터를 포함하는 그룹에서 선택될 수 있다.
- [0069] 일부 구현예에서, 개체(individual)는 사람 또는 비-사람 포유동물, 바람직하게는 사람이다.
- [0070] 일부 구현예에서, 비-사람 포유동물은 개, 고양이, 길들인 돼지, 토끼, 흰담비, 햄스터, 마우스, 랫트 등과 같은 애완동물; 침팬지(chimp), 원숭이 등과 같은 영장류; 소, 돼지, 토끼, 말, 양, 염소, 마우스, 랫트와 같은 경제적으로 중요한 동물을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0071] 본 발명의 영역 내에서, "표적 세포"는 Cas 뉴클레아제의 발현이 유리할 수 있는, 상기 개체로부터의 세포를 지칭한다.
- [0072] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "필수 아미노산"은 히스티딘(His, H), 이소루이신(Ile, I), 루이신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W) 및 발린(Val, V)을 포함한다.
- [0073] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "적어도 하나의 필수 아미노산"은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 필수 아미노산(들)을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0074] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에게 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 45분, 1시간, 1시간 30분, 2시간, 2시간 30분, 3시간, 3시간 30분, 4시간, 4시간 30분, 5시간, 5시간 30분, 6시간, 6시간 30분, 7시간, 7시간 30분, 8시간, 8시간 30분, 9시간, 9시간 30분, 10시간, 10시간 30분, 11시간,

11시간 30분을 포함하는, 5분 내지 12시간의 기간 동안 투여될 수 있다.

- [0075] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에게 1일에 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 그 이상 투여될 수 있다.
- [0076] 특정 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에게 1일에 1회 또는 2회 투여될 수 있다.
- [0077] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에서 아침 일찍, 예컨대, 아침식사용으로 개체에게 투여될 수 있으며, 이후 개체는 점심 및 저녁용의 일반적인 식이로 투여받을 수 있다.
- [0078] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "정상 식이"는 필수 아미노산 중 어느 것도 결핍되지 않은 식이를 의미하는 것으로 의도된다.
- [0079] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에게 매일, 격일, 1주당 1회, 1주당 2회, 1주당 3회 투여될 수 있다.
- [0080] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 개체에게 반일, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일 또는 그 이상 동안 투여될 수 있다.
- [0081] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 매주, 격주, 매달, 매달 또는 그 이상 반복될 수 있다.
- [0082] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 식이는 MILUPA®의 명칭 하에 NUTRICA METABOLICS®로부터 상업적으로 이용가능한 이소루이신이 없고, 루이신이 없으며 발린이 없는 분말 식품으로 제공될 수 있다. 이러한 식이는 측쇄 아미노산 물질대사에 영향을 미치는 것으로 여겨지는 질환인, 단풍 시럽뇨병(Maple syrup urine disease)을 지닌 개체에 적용된다.
- [0083] 특정 구현예에서, 루이신이 없거나, 이소루이신이 없거나 발린이 없는 식이는 이소루이신이 없는, 루이신이 없는 및 발린이 없는 분말을 2개의 나머지 아미노산에 대한 외부 공급원과 혼합함으로써 수득할 수 있다.
- [0084] 특정 구현예에서, 페닐알라닌이 없는 식이는 MEAD JOHNSON®로부터 상업적으로 이용가능한, 페닐알라닌이 없는 분말로 제공될 수 있다. 이러한 식이는 페닐케톤뇨증을 지닌 개체에게 적용된다.
- [0085] 실행 시, 분말은 바람직한 필수 아미노산이 없는 적응된 액체 또는 반-고체 음식과 혼합된다.
- [0086] 특정 구현예에서, 아미노산 고갈은 할로푸기논의 투여에 의해, 또는 분자 "4(3H)-퀴나졸리논, 7-브로모-6-클로로-3-[3-(3-하이드록시-2-피페리디닐)-2-옥소프로필]-, 트랜스-(±)-에 상응하는 어떠한 다른 명칭 하에 모사(mimicking)되거나, 예를 들면, 할로쿠르, 스테노롤, 플라보마이신, 린코믹스, 스타팍으로서 상업화될 수 있다.
- [0087] 일 구현예에서, 아미노산 반응 구성성분(AARE) 핵산은 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4 및 서열 번호: 5의 핵산 서열을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0088] 본 발명의 영역내에서 표현 "적어도 하나의 AARE 핵산"은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 및 적어도 5개의 AARE 핵산을 포함한다. 따라서, 표현 "적어도 하나의 AARE 핵산"은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0089] 특정 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 2개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0090] 일부 다른 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오타이드는 1 내지 20개의 AARE 핵산, 바람직하게는 2 내지 10개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0091] 특정 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오타이드는 2 내지 6개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호: 2 및 서열 번호: 4의 서열의 핵산을 포함하는 그룹에서 선택된 2개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0093] 일부 구현예에서, 조절성 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호: 1의 서열의 6개의 AARE 핵산을 포함한다.
- [0094] 특정 구현예에서, 2개의 AARE 핵산, 또는 대안적으로, 적어도 2개의 AARE 핵산은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0095] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산에 포함된 조절성 폴리뉴클레오타이드는 또한 개체에게 할로푸기논, 투니카마이신 등, 즉, AARE 핵산의 활성화 특성을 갖는 것으로 알려진 화

합물의 투여시 또한 활성화될 수 있다.

[0096] **핵산 벡터**

[0097] 다른 국면에서, 본 발명은 또한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산을 포함하는, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산 벡터에 관한 것이다.

[0098] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산은 유전자 치료 요법에 적합한 벡터 속에 포함된다.

[0099] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "유전자 치료요법에 적합한 벡터"는 벡터가 표적 세포 내에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 발현을 달성하기 위한 필수적인 구성성분을 포함함을 의미하기 위해 의도된다.

[0100] 특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0101] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV), 알파바이러스, 헤르페스 바이러스, 렌티바이러스, 비-통합성 렌티바이러스, 레트로바이러스, 박시니아 바이러스 및 바쿨로바이러스를 포함하는 그룹에서 선택된다.

[0102] · **전달 입자(Delivery particle)**

[0103] 일부 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 Cas 뉴클레아제 또는 핵산 벡터를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산은 특히 예컨대, 지질, 단백질, 펩타이드, 또는 중합체와 같은 다른 화합물과 함께, 입자 속에 포함될 수 있다.

[0104] 본 발명의 영역 내에서, 상기 입자, 또는 "전달 입자"는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 또는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 상기 핵산을 포함하는 상기 핵산 벡터를 표적 세포에 제공하거나 "전달"하는 것으로 의도된다.

[0105] 여전히 다른 국면에서, 본 발명은 또한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 또는 핵산 벡터의 제어된 발현을 위한 핵산을 포함하는 전달 입자에 관한 것이다.

[0106] 특정 구현예에서, 전달 입자는 양이온성 지질; 지질 나노-유액; 고체 지질 나노입자; 펩타이드 기반 입자; 특히 천연 및/또는 합성 중합체를 포함하는 중합체 기반 입자를 포함하는 리포플렉스(lipoplex)의 형태일 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 중합체 기반 입자는 단백질; 펩타이드; 다당류, 특히 키토산을 포함할 수 있다.

[0108] 일부 구현예에서, 중합체 기반 입자는 합성 중합체, 특히, 폴리에틸렌 이민(PEI), 덴드리머, 폴리(DL-락타이드)(PLA), 폴리(DL-락타이드-코-글리콜리드)(PLGA), 폴리메타크릴레이트 및 폴리포스포에스테르를 포함할 수 있다.

[0109] 일부 구현예에서, 전달 입자는 이의 표면에 표적화된 세포의 막에 노출된 표적 수용체에 결합하기에 적합한 하나 이상의 리간드를 추가로 포함한다.

[0110] · **약제학적 조성물(Pharmaceutical composition)**

[0111] 본 발명의 다른 국면은 (i) 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자, 및 (ii) 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0112] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 제형은 당해 분야의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0113] 본원에서 언급된 바와 같이, 본 개시내용에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산은 활성제를 나타낼 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 개시내용에서 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자를 활성제로서만 포함할 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 적합한 약제학적으로 허용되는 비히클은 어떠한 및 모든 통상의 용매, 분산 매질, 충전제, 고체 담체, 수용액, 코팅, 항생균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0116] 특정 구현예에서, 적합한 약제학적으로 허용되는 비히클은 물, 염수, 인산염 완충 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0117] 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 비히클은 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충제와 같은, 소량의 보조 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 세포의 반감기 또는 효능을 향상시킨다. 약제학적으로 허용되는 비히

클의 제제 및 용도는 당해 분야에 잘 공지되어 있다.

- [0118] 어떠한 통상의 매질 또는 제제가 활성 성분과 혼화성이 아닌 한, 본 발명의 약제학적 조성물 속에서의 이의 용도가 고려된다.
- [0119] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 어떠한 경로, 즉, 경구 투여, 국소 투여 또는 비경구 투여, 예컨대, 피하 투여, 정맥 투여, 동맥 투여, 근육내 투여, 안구내 투여 및 귀내 투여(intra-auricular administration)를 포함하는, 주사에 의해, 이를 필요로 하는 개체에게 투여될 수 있다.
- [0120] 특정 구현예에서, 주사에 의한 약제학적 조성물의 투여는 특히 상기 약제학적 조성물 속에 포함된 핵산 또는 핵산 벡터의 확산을 방지하기 위하여, 목적인 표적 조직 속에서 직접 수행될 수 있다.
- [0121] 본 발명자들은 이것이, 뇌 조직이 표적인 경우 특히 중요함을 고려하고 있다. 핵산 벡터 주입은 예컨대, 특히 틀이없는 접촉주성 목적의 장치(frameless stereotactic aiming device)를 사용한 자기 공명 스캐너를 이용하는 수단에 의해 뇌 조직의 특정 부위 내에서 매우 정밀하게 수행될 수 있다. MRI-안내 및 신규한 접촉주성 목적의 장치의 사용은 본 발명에 이르러 증대된 신경학에서 허용된 과정이 되기 위한 신경 유전자 치료요법에 대한 강력한 기초를 확립하였다.
- [0122] 다른 투여 방식은 폐 제형, 좌제 및 경피 적용을 사용한다.
- [0123] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 경구 제형은 예를 들면, 만니톨, 락토즈, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로즈, 탄산마그네슘 등의 약제학적 등급과 같은 일반적인 부형제를 포함한다.
- [0124] 일부 구현예에서, 유효량의 상기 화합물이 이를 필요로 하는 상기 개체에게 투여된다.
- [0125] 본 발명의 영역 내에서, "유효량"은 단독으로 바람직한 결과를 자극하는, 즉 포함된 질환, 특히 유전 장애의 증상을 완화시키거나 근절시키는 상기 화합물의 양을 지칭한다.
- [0126] 바람직한 결과를 관찰하기 위하여 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산의 유효량은 기술자의 일반적인 지식 내에 있다.
- [0127] 본 발명의 영역 내에서, 투여될 유효량의 화합물은 당해 분야의 의사 또는 권위있는 기술자가 결정할 수 있으며 치료 과정 시간 내에 적합하게 채택될 수 있다.
- [0128] 특정 구현예에서, 투여될 유효량은 투여가 단일 용량이거나 다중 용량인 것에 상관없이, 투여를 위해 선택된 물질, 및 연령, 육체적 상태, 체격, 체중, 성별, 및 치료되는 질환의 중증도를 포함하는 개체의 매개변수를 포함하는, 다양한 매개변수에 의존할 수 있다.
- [0129] 특정 구현예에서, 활성제의 유효량은 투여량 단위당 약 0.001 mg 내지 약 3000 mg, 바람직하게는 투여량 단위당 약 0.05 mg 내지 약 100 mg을 포함할 수 있다.
- [0130] 본 발명의 영역 내에서, 약 0.001 mg 내지 약 3000 mg은 투여량 단위당 약 0.002 mg, 0.003 mg, 0.004 mg, 0.005 mg, 0.006 mg, 0.007 mg, 0.008 mg, 0.009 mg, 0.01 mg, 0.02 mg, 0.03 mg, 0.04 mg, 0.05 mg, 0.06 mg, 0.07 mg, 0.08 mg, 0.09 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg, 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2100 mg, 2150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg 및 2950 mg을 포함한다.
- [0131] 특정 구현예에서, 활성제는 1일당 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 바람직하게는 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약
- [0132] 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 및 보다 바람직하게는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg의 대상체 체중을 전달하기에 충분한 투여량 수준일 수 있다.
- [0133] 일부 특수한 구현예에서, 활성제의 유효량은 본 개시내용에서 정의된 바와 같은, 투여량 단위당 약 1×10^5 내지

약 1×10^{15} 개의 카피의 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산을 포함할 수 있다.

[0134] 본 발명의 영역 내에서, 약 1×10^5 내지 약 1×10^{15} 개의 카피는 투여량 단위당 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 9×10^{13} , 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 9×10^{14} 개의 카피를 포함한다.

[0135] · 표적 세포(Target cell) 및 숙주 세포(Host cell)

[0136] 추가의 국면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 또는 핵산 벡터의 제어된 발현을 위한 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0137] 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포 중에서 선택될 수 있다.

[0138] 본 발명의 영역 내에서, "원핵 세포"는 세균 세포 및 고세균 세포를 포함한다.

[0139] 일부 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 진핵 세포이다.

[0140] 본 발명의 영역 내에서, "진핵 세포"는 효모, 조류 세포, 식물 세포, 동물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포 및 보다 바람직하게는 사람 세포를 포함한다.

[0141] 일부 바람직한 구현예에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 바람직하게는 사람 세포이다.

[0142] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 제한 없이, 중추신경계의 세포, 상피 세포, 근육 세포, 배아 세포, 생식 세포, 줄기 세포, 선조 세포, 조혈 줄기 세포, 조혈 선조 세포, 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)를 포함할 수 있다.

[0143] 일부 특수한 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 줄기 세포, 선조 세포, 배반 세포 또는 배아 세포가 아니다.

[0144] 일부 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 근육 조직, 신경 조직, 연결 조직, 및 상피 조직을 포함하는 그룹에서 선택된 조직에 속할 수 있다.

[0145] 일부 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 방광, 뼈, 뇌, 유방, 중추 신경계, 경부, 결장, 자궁내막, 신장, 후두, 간, 폐, 식도, 난소, 췌장, 흉막, 전립선, 직장, 망막, 타액선, 피부, 소장, 연조직, 위, 고환, 갑상선, 자궁, 질을 포함하는 그룹에서 선택된 기관에 속할 수 있다.

[0146] · 용도

[0147] 본 발명의 다른 국면은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터, 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산, 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0148] 하나의 국면에서, 본 발명은 또한 의약의 제조 또는 제작을 위한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산의 용도에 관한 것이다.

[0149] 여전히 다른 국면에서, 본 발명은 게놈을 적어도 하나의 표적 세포내로 편집하기 위한 활성제로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터, 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산, 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0150] 본 발명의 다른 국면은 게놈을 적어도 하나의 표적 세포에 편집하기 위한 활성제로서, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산의 용도에 관한 것이다.

[0151] 특정 구현예에서, 게놈의 편집은 생체내, 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*)에서 수행될 수 있다.

- [0152] 일부 구현예에서, 게놈의 편집은 Komor et al. Nature; 2016 Apr 20;533(7603):420-4에서와 같이 수행될 수 있다.
- [0153] 하나의 구현예에서, 표적 세포는 적어도 하나의 유전적 돌연변이를 갖는다.
- [0154] 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이는 MTP; CNGB3; SLC39A4; TRMU; ACOX1; ADA; ABCD1; SAMHD1; MAN2B1; HBA; ATRX; COL4A3; COL4A4; COL4A5; ALMS1; SLC12A6; ASL; CYP19A1; SLC35A3; ASNS; AGA; TTPA; ATM; SACS; BBS10; BBS1; BBS2, BBS12; CIITA; BSND; GP1BA; HSD3B2; ACAT1; GPR56; BTD; BLM; ASPA; CPS1; CPT1A; CPT2; RAB23; RMRP; SLC6A8; GAMT; CYP27A1; NDRG1; PRPS1; GJB1; VPS13A; CHM; CYBA; CYBB; SLC25A13; ASS1; VPS13B; ACSF3; GFM1; TSFM; PROP1; LHX3; PSAP; CYP17A1; MPL; PMM2; MPI; ALG6; NTRK1; CHRNE; RAPSN; HAX1; VPS45; SLC4A11; CYP11B2; CFTR; CTNS; HSD17B4; LOXHD1; DMD; RTTEL1; COL7A1; ADAMTS2; EVC; EMD; NR2E3; ETHE1; GLA; F9; F11; IKBKAP; LDLR; LDLRAP1; ABCC8; KCNJ11; MEFV; FANCA; FANCC; FANCG; FMR1; FH; GALK1; GALT; GBA; SLC12A3; GCDH; ETFA; ETFDH; AMT; GLDC; G6PC; SLC37A4; GAA; AGL; GBE1; PYGM; PFKM; BCS1L; HFE2; TFR2; ALDOB; TECPR2; HPS1; HPS3; HMGCL; HLCS; CBS; MTHFR; MTRR; HYL1; SLC25A15; EDA; ALPL; GNE; MED17; IVD; TMEM216; RGRIP1L; LAMA3; LAMB3; LAMC2; GALT; TGM1; CEP290; RDH12; RPE65; LCA5; CRB1; LRPPRC; GLE1; EIF2B5; CAPN3; DYSF; SGGC; SGCA; SLC6A1; FKBP; DLD; STAR; LPL; HADHA; SLC7A7; BCKDHA; BCKDHB; MKS1; ACADM; MLC1; ATP7A; ARSA; MCCC1; MCCC2; OPA3; MMAA; MMAB; MUT; MMACHC; VSX2; ACAD9; NDUFAF5; NDUFS6; MPV17; PUS1; GNPTAG; MCOLN1; IDUA; IDS; NAGLU; HGSNAT; GNS; GLB1; HYAL1; ARSB; SUMF1; POMGNT1; TYMP; MTM1; NAGS; NEB; AQP2; NPHS1; NPHS2; CLN3; CLN5; CLN6; CLN8; MFSD8; PPT1; TPP1; SMPD1; NPC1; NPC2; NBN; GJB2; WNT10A; RAG2; DCLRE1C; OAT; OTC; TCIRG1; SLC26A4; PAH; PHGDH; PKHD1; AIRE; VRK1; RARS2; SLC22A5; DNAI1; DNAH5; DNAI2; AGXT; GRHPR; HOGA1; SEPSECS; ABCB11; PCCA; PCCB; CTSK; PDHA1; PDHB; PTS; ATP6V1B1; EYS; CERKL; FAM161A; DHDDS; PEX7; AGPS; ESCO2; SLC17A5; HEXB; SMARCAL1; TH; ALDH3A2; DHCR7; SMN1; MESP2; COL27A1; LIFR; SLC26A2; HEXA; FAH; MYO7A; USH1C; CDH23; PCDH15; USH2A; CLRN1; ACADVL; FKTN; ATP7B; LIPA; RS1; IL2RG; PEX1; PEX2; PEX6 및 PEX10을 포함하는 그룹에서 선택된 유전자 속에 존재한다.
- [0155] 일 국면에서, 본 발명은 질환을 치료하고/하거나 예방하기 위한 활성체로서 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터, 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산, 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0156] 일부 구현예에서, 질환은 유전적 장애, 감염성 질환 및 암을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0157] 일부 구현예에서, 질환은 유전적 장애이다.
- [0158] 특정 구현예에서, 유전적 장애는 무베타지질단백혈증; 색맹; 장성말단피부염; 급성 소아 간 부전; 아실-CoA 옥시다제 I 결핍증; 아테노신 데아미나제 결핍증; 부신백질형성장애증, X-연결된; 에르카디 증후군(Aicardi-Goutières Syndrome); 알파-만노스축적증(Alpha-Mannosidosis); 알파-지중해빈혈(Alpha-Thalassemia); 알파-지중해빈혈 정신지체 증후군(Alpha-Thalassemia Mental Retardation Syndrome); 알포트 증후군(Alport Syndrome); 알스트롬 증후군(Alstrom Syndrome); 안데만 증후군(Andermann Syndrome); 아르기닌숙신산뇨(Argininosuccinic Aciduria); 아로마타제 결핍증; 관절만곡증, 정신 지체, 및 발작; 아스파라긴 신데타제 결핍증; 아스파르틸글루코사민뇨; 분리된 비타민 E 결핍증을 지닌 운동실조; 모세혈관확장성 운동실조(Ataxia-Telangiectasia); 차를보익스-사그네의 상염색체 열성 뇌성마비(Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay); 바르데-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrome); 바르데-비들 증후군; 베어 림프구 증후군(Bare Lymphocyte Syndrome), 제II형; 바터 증후군, 제4A형; 베르나르-술리에 증후군(Bernard-Soulier Syndrome), 제A1형; 베타-글로빈-관련 이상혈색소증; 3-베타-하이드록시스테로이드 데하이드로게나제 제II형 결핍증; 베타-케토티올라제 결핍증; 양측 전두두정 다초뇌화증(Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria); 바이오티나제 결핍증(Biotinidase Deficiency); 블룸 증후군(Bloom Syndrome); 카나반 병(Canavan Disease); 카르바모일포스페이트 신데타제 I 결핍증; 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라제 IA 결핍증; 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라제 II 결핍증; 카펜터 증후군(Carpenter Syndrome); 연골형성 저하증(Cartilage-Hair Hypoplasia); 대뇌 크레아틴 결핍증 증후군(Cerebral Creatine Deficiency Syndrome) 1; 대뇌 크레아틴 결핍증 증후군 2; 뇌건황색증(Cerebrotendinous Xanthomatosis); 샤르코마리투스병(Charcot-Marie-Tooth Disease), 제4D형; 샤르코마리투스병, 제5형/아츠 증후군(Arts syndrome); 샤르코마리투스병, X-연결된; 유극적혈구구성무도병(Choreoacanthocytosis); 맥락막결손; 만성 육아종증; 만성 육아종증(Chronic Granulomatous Disease); 시트린 결핍증; 시트룰린혈증, 제1형; 코헨 증후군(Cohen Syndrome); 조합된 말론 및 메틸말론 산뇨증(Combined

Malonic and Methylmalonic Aciduria); 조합된 산화 포스포릴화 결핍증(Combined Oxidative Phosphorylation Deficiency) 1; 조합된 산화 포스포릴화 결핍증 3; 복합성 뇌하수체 호르몬 결핍증(Combined Pituitary Hormone Deficiency) 2; 조합된 뇌하수체 호르몬 결핍증 3; 조합된 SAP 결핍증; 17-알파-하이드록실라제 결핍증으로 인한 염상실형선천성 부신 과형성(Congenital Adrenal Hyperplasia); 선천적인 무거핵구성 혈소판감소증(Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia); 선천성 당화 장애, 제Ia형; 선천성 당화 장애, 제Ib형; 선천성 당화 장애, 제Ic형; 선천성 무통각증 및 무한증(Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis); 선천성 근무력증(Congenital Myasthenic Syndrome); 선천성 근무력증(Congenital Myasthenic Syndrome); 선천성 호중구감소증; 선천성 호중구감소증; 각막 이상증 및 지각난청(Perceptive Deafness); 코르티코스테론 메틸옥시다제 결핍증; 낭종 섬유증; 시스틴증(Cystinosis); D-이작용성 단백질 결핍증(D-Bifunctional Protein Deficiency); 청각장애인, 상염색체 열성 77; 듀켄씨근이영양증(Duchenne Muscular Dystrophy)/베커 근이영양증(Becker Muscular Dystrophy); 선천성 각하이상증(Dyskeratosis Congenita); 이영양성 수포성표피박리증(Dystrophic Epidermolysis Bullosa); 엘러스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos Syndrome), 제VIIC형; 엘리브-반크레벨트 증후군(Ellis-van Creveld Syndrome); 에머리-드레이프스 근위축증(Emery-Dreifuss Myopathy) 1; 향상된 S-콘 증후군(Enhanced S-Cone Syndrome); 에틸말론성 뇌증(Ethylmalonic Encephalopathy); 파브리병(Fabry Disease); 인자 IX 결핍증; 인자 XI 결핍증; 가족성 자율신경이상증(Familial Dysautonomia); 가족성 고콜레스테롤혈증; 가족성 과다콜레스테롤혈증, 상염색체 열성; 가족성 고인슐린혈증; 가족성 지중해열(Mediterranean Fever); 판코니 빈혈(Fanconi Anemia), 그룹 A; 판코니 빈혈, 그룹 C; 판코니 빈혈, 그룹 G; 취약 X 증후군(Fragile X Syndrome); 푸마라제 결핍증; 갈락토키나제 결핍증; 갈락토오스혈증; 고세병(Gaucher Disease); 지틀만 증후군(Gitelman Syndrome); 글루타르산혈증(Glutaric Acidemia), 제I형; 글루타르산혈증, 제IIa형; 글루타르산 혈증, 제IIc형; 글리신 뇌병증; 글리신 뇌병증; 당원병(Glycogen Storage Disease), 제Ia형; 당원병, 제Ib형; 당원병, 제II형; 당원병, 제III형; 당원병, 제IV형/성인 폴리글루코산 본체 질병(Adult Polyglucosan Body Disease); 당원병, 제V형; 당원병, 제VII형; 그라실 증후군(GRACILE Syndrome) 및 다른 BCS1L-관련 장애; 혈액색소증, 제2A형; 혈액색소증, 제3형; 유전성 과당불내성; 유전성 경련성 하반신 마비 49; 헤르만스키-푸들라크 증후군(Hermansky-Pudlak Syndrome), 제1형; 헤르만스키-푸들라크 증후군, 제3형; HMG-CoA 리아제 결핍증; 홀로카복실라제 신테타제 결핍증; 호모시스틴요증; MTHFR 결핍증으로 인한 호모시스틴요증; 호모시스틴요증, 제cbIE형; 하이드로레탈루스 증후군(Hydroletharus Syndrome); 고오르니틴혈증-항암모니아혈증-호모시트룰린우리아 증후군(Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria Syndrome); 저한성 외배엽이형성증(Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia) 1; 저인산효소증(Hypophosphatasia); 봉입체 근위축증(Inclusion Body Myopathy) 2; 뇌성마비 및 소뇌 위축증(Infantile Cerebral and Cerebellar Atrophy); 아이소길초산혈증(Isovaleric Acidemia); 주버트 증후군(Joubert Syndrome) 2; 주버트 증후군 7/메켈 증후군(Meckel Syndrome) 5/COACH 증후군; 연접부수포성표피박리증(Junctional Epidermolysis Bullosa); 연접부수포성표피박리증; 연접부수포성표피박리증; 크레베병(Krabbe Disease); 층판비늘증(Lamellar Ichthyosis), 제1형; 레베르 선천성 흑암사(Leber Congenital Amaurosis) 10 및 다른 CEP290-관련 용모질환(Ciliopathies); 레베르 선천성 흑암사 13; 레베르 선천성 흑암사 2/망막 색소변성증 20; 레베르 선천성 흑암사 5; 레베르 선천성 흑암사 8/망막 색소변성증 12/피그먼트드 파라베너스 맥락망막 위축증(Pigmented Paravenous Chorioretinal Atrophy); 라이 증후군(Leigh Syndrome), 프랑스-캐나다인 형(French-Canadian Type); 치명적인 선천성 연축 증후군(Lethal Congenital Contracture Syndrome) 1/전각세포 병을 지닌 치명적인 관절구축(Lethal Arthrogryposis with Anterior Horn Cell Disease); 소멸 백색 물질을 지닌 백질뇌증(Leukoencephalopathy with Vanishing White Matter); 지대 근디스트로피(Limb-Girdle Muscular Dystrophy), 제2A형; 지대 근디스트로피, 제2B형; 지대 근디스트로피, 제2C형; 지대 근디스트로피, 제2D형; 지대 근디스트로피, 제2E형; 지대 근디스트로피, 제2I형; 리포아미드 데하이드로게나제 결핍증(Lipoamide Dehydrogenase Deficiency); 지질 부신 과다형성(Lipoid Adrenal Hyperplasia); 지단백질 리파제 결핍증(Lipoprotein Lipase Deficiency); 장쇄 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제 결핍증; 라이신노 단백질 못견딤증(Lysinuric Protein Intolerance); 단풍당뇨증(Maple Syrup Urine Disease), 제1a형; 단풍당뇨증, 제1b형; 메켈 증후군 1/바르테-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrome) 13; 중쇄 아실-CoA 데하이드로게나제 결핍증; 피질하부 낭종을 지닌 메갈렌세팔릭 류코엔세팔로패티(Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts); 멘케스 질환(Menkes Disease); 이염성 백질디스트로피(Metachromatic Leukodystrophy); 3-메틸크로토닐-CoA 카복실라제 결핍증; 3-메틸크로토닐-CoA 카복실라제 결핍증; 3-메틸글루타코닉산뇨증(3-Methylglutaconic Aciduria), 제III형/백내장을 동반한, 시신경 위축(Optic Atrophy) 3; 메틸말론산혈증(Methylmalonic Acidemia); 메틸말론산혈증; 메틸말론산혈증 및 호모시스틴요증, 코발라민 C형; 소안구증(Microphthalmia)/무안구증(Anophthalmia); 미토콘드리아 복합체(Mitochondrial Complex) I 결핍증; 미토콘드리아 복합체 I 결핍증; 미토콘드리아 복합체 I 결핍증; 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군 6/나

바조 뉴로헤파토파티(Navajo Neurohepatopathy); 미토콘드리아 근병증 및 철적혈모구빈혈(Sideroblastic Anemia) 1; 뮤코리피드증(Mucopolysaccharidosis) II/IIIA; 뮤코리피드증 III 감마; 뮤코리피드증 IV; 점액다당류, 제I형; 점액다당류, 제II형; 점액다당류, 제IIIB형; 점액다당류, 제IIIC형; 점액다당류, 제IIID형; 점액다당류, 제IVb형/GM1 강글리오시드증(Gangliosidosis); 점액다당류, 제IX형; 점액다당류, 제VI형; 다중 설패타제 결핍증(Multiple Sulfatase Deficiency); 근육-눈-뇌 질환(Muscle-Eye-Brain Disease) 및 다른 POMGNT1-관련 선천성 근육 위축증(Related Congenital Muscular Dystrophy)-근이영양증(Dystroglycanopathies); 마이오뉴로가스트로인테스티날 엔세팔로페티(Myoneurogastrointestinal Encephalopathy); 근세관성 근증(Myotubular Myopathy) 1; N-아세틸글루타마제 신타제 결핍증; 네말린 근병증(Nemaline Myopathy) 2; 신성요붕증(Nephrogenic Diabetes Insipidus), 제II형; 신증후군/선천성 핀란드형 신장증(Congenital Finnish Nephrosis); 신증후군/스테로이드-저항성 증후군(Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome); 신경 세로이드 지질갈색소증(Neural Ceroid-Lipofuscinosis); 신경 세로이드 지질갈색소증; 니만-피크병(Niemann-Pick Disease), 제A/B형; 니만-피크병 제C형; 니지메겐 파손 증후군(Nijmegen Breakage Syndrome); 비증후군성 난청(Non-Syndromic Hearing Loss); 치아-손발톱-피부 이형성(Odonto-Onycho-Dermal Dysplasia)/쇼프-슐츠-패서지 증후군(Schopf-Schulz-Passarge Syndrome); 오펜 증후군(Ornstein Syndrome); 오펜 증후군/중증 합병성 면역결핍장애(Severe Combined Immunodeficiency), 아타바스칸-형(Athabaskan-Type); 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 결핍증; 오르니틴 트랜스카보밀라제 결핍증; 골화석증 1; 펜드리드 증후군(Pendred Syndrome); 페닐알라닌 하이드록실라제 결핍증; 3-포스포글리세레이트 데하이드로게나제 결핍증; 다낭성 신장 질환(Polycystic Kidney Disease), 상염색체 열성; 다선성 자가면역 증후군(Polyglandular Autoimmune Syndrome), 제1형; 다리뇌소뇌 형성 부전(Pontocerebellar Hypoplasia), 제1A형; 다리뇌소뇌 형성 부전, 제6형; 1차 카르니틴 결핍증(Primary Carnitine Deficiency); 원발성섬모운동이상증(Primary Ciliary Dyskinesia); 원발성 옥살산뇨증(Primary Hyperoxaluria), 제1형; 원발성 옥살산뇨증, 제2형; 원발성 옥살산뇨증, 제3형; 진행성 소뇌 대뇌 위축증(Progressive Cerebello-Cerebral Atrophy); 전진적 가족성 간내 담즙울체(Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis), 제2형; 프로피온산혈증(Propionic Acidemia); 프로피온산 혈증; 피크노디소토시드(Pycnodysostosis); 피루베이트 데하이드로게나제 E1-알파 결핍증; 피루베이트 데하이드로게나제 E1-베타 결핍증; 6-피루보일-테트라하이드로프테린 신타제 결핍증; 신세뇨관 산증 및 난청; 망막 색소변성증 25; 망막 색소변성증 26; 망막 색소변성증 28; 망막 색소변성증 59; 점상연골 이형성증(Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata), 제1형; 점상연골 이형성증, 제3형; 로버츠 증후군(Roberts Syndrome); 살라병(Salla Disease); 샌드호프병(Sandhoff Disease); 쉽게 임무노오세우스 이형성(Schimke Immunoosseous Dysplasia); 세가와 증후군(Segawa Syndrome); 소그렌-라손 증후군(Sjogren-Larsson Syndrome); 스미스-렘리-오피츠 증후군(Smith-Lemli-Opitz Syndrome); 척수성 근위축(Spinal Muscular Atrophy); 척추 연골 이형성증(Spondylothoracic Dysostosis); 스틸 증후군(Steel Syndrome); 스티부-아이드만 증후군(Stuve-Wiedemann Syndrome); 설패이트 트랜스포터-관련 골연골이형성증(Sulfate Transporter-Related Osteochondrodysplasia); 테이-삭스병(Tay-Sachs Disease); 타이로신혈증(Tyrosinemia), 제I형; 어셔 증후군(Usher Syndrome), 제IB형; 어셔 증후군, 제IC형; 어셔 증후군, 제ID형; 어셔 증후군, 제IF형; 어셔 증후군, 제IIA형; 어셔 증후군, 제III형; 매우 긴 쇄 아실-CoA 데하이드로게나제 결핍증; 워커-워버그 증후군(Walker-Warburg Syndrome) 및 다른 FKTN-관련 위축증; 윌슨병(Wilson Disease); 윌만병(Wolman Disease)/콜레스테릴 에스테르 저장 질환(Cholesteryl Ester Storage Disease); X-연관 연속성 망막분리(X-Linked Juvenile Retinoschisis); X-연관성 중증 복합 면역부전증(X-Linked Severe Combined Immunodeficiency) 및 젤웨거 증후군 스펙트럼(Zellweger Syndrome Spectrum)을 포함하는 비-제한 그룹에서 선택된다.

[0159] 일부 구현예에서, 질환은 감염성 질환이다.

[0160] 특정 구현예에서, 감염성 질환은 다음을 포함하는 비-제한적 그룹에서 선택된다: 아나플라즈마증(Anaplasmosis); 탄저병; 바베시아 감염증(Babesiosis); 보툴리눔독소증(Botulism); 브루셀라병(Brucellosis); 부르콜데리아 말레이(*Burkholderia mallei*) 감염(마비저(glanders)); 부르콜데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*) 감염(멜리오이도시스(melioidosis)); 캄피로박테리아증(Campylobacteriosis); 카바페넴 내성 장내세균(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae) 감염(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE); 무른 퀴양; 치쿱구니아(Chikungunya) 감염; 클라미디아(Chlamydia) 감염; 시가테라(Ciguatera); 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*) 감염; 클로스트리디움 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*) 감염(엡실론 독소); 콕시디오미테스 진균증(Coccidioidomycosis) 진균 감염(밸리 열(Valley fever)); 크로이츠펠트야콥병(Creutzfeldt-Jacob Disease), 전염성 해면모양(transmissible spongiform: CJD); 크립토스포리디움증(Cryptosporidiosis); 원포자충증(Cyclosporiasis); 뎅기열(Dengue Fever); 디프테리아(Diphtheria); 이. 콜라이(*E. Coli*) 감염; 동부 말 뇌염(Eastern Equine Encephalitis: EEE); 에볼라 출혈열(Ebola Hemorrhagic

Fever)(Ebola); 엘리히증(Ehrlichiosis); 아르보바이러스(Arboviral) 또는 부염증성 뇌염(parainfectious encephalitis); 비-폴리오 엔테로바이러스(Non-polio enterovirus) 감염; D68 엔테로바이러스 감염, (EV-D68); 지아디아증(Giardiasis); 임질 감염증(임질); 서혜부육아종(Granuloma inguinale); B형 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus Influenza*) 질환, (Hib 또는 H-flu); 한타바이러스 폐 증후군(Hantavirus pulmonary syndrome: HPS); 용혈성 요독증후군(Hemolytic uremic syndrome: HUS); A형 간염(Hep A); B형 간염(Hep B); C형 간염(Hep C); D형 간염(Hep D); E형 간염(Hep E); 헤르페스(Herpes); 헤르페스 조스터(Herpes zoster), 조스터 VZV(대상포진); 히스토플라스마증(Histoplasmosis); 사람 면역결핍성 바이러스(HIV/AIDS); 사람 파필로마바이러스(HPV); 인플루엔자(Flu); 납 중독; 레지오넬라증(Legionellosis)(재향군인병: Legionnaires Disease); 나병(한센병); 렙토스피라병(Leptospirosis); 리스테리아병(Listeriosis); 라임병(Lyme Disease); 림포그라눌로마 베네레움(*Lymphogranuloma venereum*) 감염(LVG); 말라리아; 홍역; 바이러스 수막염; 수막구균성 질환(Meningococcal disease); 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus: MERS-CoV); 볼거리; 노로바이러스; 마비성패류중독(Paralytic shellfish poisoning); 이 기생증(Pediculosis)(이, 두부 및 신체 이); 골반염(Pelvic inflammatory disease: PID); 백일해; 서혜 임파선종, 패혈증성 또는 폐 폐스트(Bubonic, septicemic or pneumonic plague); 폐렴구균의 이상반응(Pneumococcal disease); 소아마비(Polio); 앵무세병; 사면발이(Pthiriasis)(개; 사면발이 만연); 푸스툴라 래쉬병(Pustular rash diseases)(천연두, 원두(monkeypox), 우두); Q-열; 광견병; 리신 중독(Ricin poisoning); 리케치아증(Rickettsiosis)(록키산 홍반열: Rocky Mountain Spotted Fever); 선천성 풍진(독일 풍진: German Measles)을 포함하는 풍진; 살모넬라시스 가스트로엔테리시스(*Salmonellosis gastroenteritis*) 감염; 옴 만연(Scabies infestation); 스콤브로이드(Scombroid); 중증급성호흡기증후군(Severe acute respiratory syndrome: SARS); *시겔로시스 가스트로엔테리시스*(*Shigellosis gastroenteritis*) 감염; 천연두; 메티실린-내성 스타필로코컬 감염(Methicillin-resistant Staphylococcal infection: MRSA); 포도상구균 식중독(Staphylococcal food poisoning); 반코마이신 매개 스타필로코쿠스 감염(Vancomycin intermediate Staphylococcal infection: VISA); 반코마이신 내성 스타필로코쿠스 감염(Vancomycin resistant Staphylococcal infection: VRSA); 스트렙토코쿠스병(Streptococcal disease), 그룹 A; 스트렙토코쿠스병, 그룹 B; 연쇄구균 독성쇼크 증후군(Streptococcal toxic-shock syndrome: STSS); 1차, 2차, 조기 잠복, 말기 잠복 또는 선천성 매독(Primary, secondary, early latent, late latent or congenital syphilis); 테타누스 감염(Tetanus infection)(입벌림 장애: Lock Jaw); 모병(Trichonosis); 결핵(TB); 잠복성 결핵(LTBI); 야토병(Tularemia)(토끼 열); 장티푸스, 그룹 D; 발진 티푸스; 세균성 질염; 수두(Varicella, chickenpox); 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*) 감염(콜레라); 비브리오증(Vibriosis: Vibrio); 바이러스성 출혈열(Viral hemorrhagic fever: 에볼라(Ebola), 라싸(Lassa), 마르부르그(Marburg)); 웨스트 나일 바이러스 감염(West Nile virus infection); 황열병(Yellow Fever); 예르세니아 감염(Yersenia infection) 및 지카 바이러스 감염(Zika virus infection).

[0161] 일부 구현예에서, 질환은 암이다.

[0162] 일부 구현예에서, 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 중추신경계의 암, 자궁경부암, 상부 호흡 소화관(upper aero digestive tract)의 암, 직장결장암, 자궁내막암, 생식 세포암, 교아세포종, 호지킨 림프종, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 골수종, 신장모세포종(빌름스 종양), 신경아세포종, 비-호지킨 림프종, 식도암, 골육종, 난소암, 췌장암, 늑막암, 전립선암, 망막아종, 피부암(흑색종 포함), 소장암, 연조직 육종, 위암, 고환암 및 갑상선암을 포함하는 비-제한 그룹에서 선택된다.

[0163] 일부 구현예에서, 당해 분야의 기술자는 생체외(*ex vivo*) 조작 및/또는 치료요법이 본 발명의 영역내에 포함될 수 있으며, 이는 줄기 세포 및 선조 세포, 조혈 줄기 및 선조 세포, 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC), 및 상이한 종으로부터의 성체 세포를 포함할 수 있음을 이해할 수 있다. 이론에 얽매이지는 의도없이, 본 발명자들은 당해 분야의 기술자가 재생 의학을 수행하는 경우 이것이 특히 관심있음을 고려하고 있다.

[0164] 특정 구현예에서, 본 발명에 포함된 핵산 및 핵산 벡터를 사용하여 동물 또는 식물 모델, 예컨대, 근본적인 윤리 원리에 입각하여, 전임상 연구용 동물 모델을 가공할 수 있다.

[0165] · 방법

[0166] 본원에 개시된 방법은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 달성할 수 있다.

[0167] 본 발명의 다른 국면은 이를 필요로 하는 개체에게 본원에서 정의한 바와 같은 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 적어도 포함하는, 적어도 하나의 표적 세포내로 계를 편집하기 위한 방법에 관한 것이다.

- [0168] 일 국면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에게 본원에 정의된 바와 같은, 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 적어도 포함하는, 질환을 예방하고/하거나 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0169] 일부 구현예에서, 상기 방법은 개체에게 적어도 하나의 필수 아미노산, 특히 히스티딘(His, H), 이소루이신(Ile, I), 루이신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W) 및 발린(Val, V)을 포함하는 그룹에서 선택된 아미노산이 결핍된 식이를 제공하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0170] 특정 구현예에서, 상기 방법은 대안적으로 조절성 폴리뉴클레오타이드에 포함된 AARE 핵산을 활성화시키는 것으로 알려진 화합물, 특히 할로푸기논, 투니카마이신 등을 포함하는 그룹에서 선택된 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0171] 일부 구현예에서, 질환은 유전적 장애, 감염성 질환 및 암을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0172] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 개체에게 어떠한 경로, 즉, 경구 투여, 국소 투여 또는 비경구 투여에 의해, 예컨대, 피하 투여, 정맥 투여, 동맥 투여, 근육내 투여, 안구내 투여, 및 귀내 투여를 포함하는 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0173] 다른 투여 방식은 폐 제형, 좌제 및 경피 적용을 사용한다.
- [0174] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 경구 제형은 예를 들면, 약제학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 스테아르산 마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로즈, 탄산마그네슘 등과 같은 일반적인 부형제를 포함한다.
- [0175] 일부 구현예에서, 상기 화합물의 유효량이 이를 필요로 하는 상기 개체에게 투여된다.
- [0176] 본 발명의 영역 내에서, "유효량"은 단독으로 바람직한 결과를 자극하는, 즉, 포함된 질환, 특히 유전적 장애의 증상을 완화하거나 근절하는 상기 화합물의 양을 지칭한다.
- [0177] 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 포함된, 바람직한 결과를 관찰하기 위하여, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산, 또는 핵산 벡터 또는 전달 입자의 제어된 발현을 위한 핵산의 유효량을 측정하는 것은 당해 분야의 기술자의 일반적인 지식내에 있다.
- [0178] 본 발명의 영역 내에서, 투여될 유효량의 화합물은 당해 분야의 주치의 또는 공인된 기술자에 의해 결정될 수 있으며 치료의 시간 과정 내에서 적합하게 채택될 수 있다.
- [0179] 특정 구현예에서, 투여될 유효량은 투여용으로 선택된 물질, 투여가 단독인지 또는 다중 용량인지의 여부, 및 연령, 육체적 상태, 체격, 체중, 성별, 및 치료될 장애의 중증도를 포함하는 개체의 매개변수를 포함하는 다양한 매개변수에 의존할 수 있다.
- [0180] 본 발명의 다른 국면은 또한:
- [0181] - 표적 세포에게 다음을 제공하는 단계:
- [0182] o 본원에 개시된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산;
- [0183] o 편집될 게놈 표적 핵산의 특이적인 안내 DNA 또는 RNA;
- [0184] o 표적 게놈 핵산을 대체하도록 의도된 핵산을 포함하는 공여체 핵산;
- [0185] - Cas 뉴클레아제의 발현을 유도하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 표적 세포 내로 게놈을 편집하는 방법에 관한 것이다.
- [0186] Cas 뉴클레아제의 유도시, Cas 뉴클레아제는 안내 DNA 또는 RNA의 보조로, 게놈 표적 핵산 내에서 및 공여체 핵산 위에서 단일 가닥 또는 이중 가닥 파괴(들)를 촉진할 것이다. 후속적으로, 공여체 핵산으로부터의 핵산은 게놈 표적 핵산 대신 게놈 내에서 통합될 수 있다.
- [0187] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제의 발현의 유도는 표적 세포에 적어도 하나의 필수 아미노산이 결핍된 배지 또는 할로푸기논 및/또는 투니카마이신을 포함하는 배지를 제공함으로써 수행할 수 있다.
- [0188] 일부 구현예에서, 표적 핵산은 유전자 돌연변이를 갖는다.
- [0189] · **키트**

- [0190] 추가의 국면에서, 본 발명은:
- [0191] - 본원에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물, 및
- [0192] - 약제학적으로 활성인 화합물을 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 키트에 관한 것이다.
- [0193] 일부 구현예에서, 질환은 계능성 장애, 감염성 질환 및 암을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0194] 본 발명의 영역 내에서, 표현 "약제학적으로 활성인 화합물"은 주어진 질환의 예방 및/또는 치료에 대해 이점을 갖는 화합물을 의미하기 위해 의도된다.
- [0195] 기술자는 용어 "이점"은 주어진 질환과 관련하여 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 완화시키는데 긍정적인 효과를 가지는 것으로 이해한다. "이점"이라는 용어는, 당해 분야의 기술자는 또한 주어진 질환의 진행이 늦춰지거나 정지될 수 있음을 이해한다.
- [0196] 일부 구현예에서, 약제학적으로 활성인 화합물은 항미생물 화합물이며, 이는 당해 분야의 기술자에 의해 감염성 질환, 특히 세균, 진균 또는 바이러스 감염을 박멸하기 위해 일반적으로 사용된 화합물로부터 적합하게 선택될 수 있다.
- [0197] 특정 구현예에서, 항미생물 화합물은 페니실린, 특히 페니실린 및 아목시실린; 카바페넴, 특히 이미페넴; 세팔로스포린, 특히 세팔렉신; 아미노글리코사이드, 특히 겐타미신 및 토브라마이신; 테트라사이클린, 특히 테트라사이클린 및 독시사이클린; 마크로라이드, 특히 에리스로마이신 및 클라리스로마이신; 퀴놀론, 특히 시프로플록사신 및 레보플록사신; 및 설펜아미드, 특히 설파메티졸 및 설파메톡사졸을 포함하는 그룹에서 선택된 항생제이다.
- [0198] 특정 구현예에서, 항미생물 화합물은 뉴라미디나제 억제제; 구아니딘의 뉴클레오사이드 유사체; 티미딘의 뉴클레오사이드 유사체; 뉴클레오타이드 리버스 트랜스크립타제 억제제; 및 프로테아제 억제제를 포함하는 비-제한 그룹에서 선택된 항바이러스제이다.
- [0199] 일부 구현예에서, 약제학적으로 활성인 화합물은 항암 화합물이며, 이는 화학치료요법에 일반적으로 사용된 화합물로부터 당해 분야의 기술자에 의해 적합하게 선택될 수 있다.
- [0200] 특정 구현예에서, 항암 화합물은 알킬화제, 푸린 동족체, 피리미딘 동족체, 안트라사이클린, 블레오마이신, 미토마이신, 토포-이소머라제 1의 억제제, 토포-이소머라제 2의 억제제, 타산, 모노클로날 항체, 사이토킨, 단백질 키나제의 억제제 등을 포함하는 그룹에서 선택될 수 있다.
- [0201] **실시예**
- [0202] **실시예 1: 필수 아미노산 고갈(*starvation*)에 의한 CAS9 발현의 유도**
- [0203] 도 1은 GCN2-eIF2 α -ATF4 시그널링 경로를 나타낸다. EAA 고갈에 대한 반응시, 활성화된 GCN2는 eIF2 α 를 포스포릴화하여, 전사 인자 ATF4의 상향 조절 및 표적 유전자 발현을 유도하기 위한 AARE 서열에 대한 이의 보충을 이끈다.
- [0204] 도 2는 Tk 최소 프로모터 및 Trb3으로부터의 AARE 핵산의 6개 카피(검정색 점)의 조절 하에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 작제하기 위한 전체적인 전략을 나타낸다.
- [0205] CAS9 활성화에 초점을 맞추기 위해, GFP 전이유전자의 단일 카피를 지닌 HEK 293T 세포로부터 기원한 세포 모델을 사용한다(293T^{GFP} 세포주).
- [0206] 이러한 세포주는 2개의 상이한 렌티바이러스 벡터로 동시-형질유도한다.
- [0207] 첫번째 하나는 2X AARE-TK 조절 프로모터(서열 번호: 6 및 서열 번호: 7)의 제어 하에 위치하는 CAS9의 FLAG 태그된 버전을 발현한다(Shen et al Cell Res. 2013 Apr 2. doi: 10.1038/cr.2013.46; 서열 번호: 8).
- [0208] 두번째 벡터는 U6 프로모터 RNA 폴리머라제 III 프로모터(Ma, H et al. Mol Ther Nucleic Acids 2014 doi: 10.1038/mtna.2014.12)의 제어 하에서 GFP 리포터 유전자를 특이적으로 표적화하는 안내 RNA(gRNA^{GFP})를 발현한다.
- [0209] 렌티바이러스 벡터 둘 다를 pTRIP 렌티바이러스 골격내에 작제하였다(Zennou et al., 2000; Cell 101, 173-185).

- [0210] pTri p-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9 플라스미드의 핵산(서열 번호: 9)은 도 3에 나타낸다.
- [0211] EF1a 편재하는 프로모터의 제어하에서 FLAG-CAS9를 발현하는 세번째 렌티바이러스 벡터를 대조군으로서 생성한다.
- [0212] 형질도입된 세포를 배양물 속에서 증폭시킨다. 유도의 부재하에서 2XAARE-CAS9 세포 및 EF1a-CAS9 세포를 용해하고 CAS9의 발현을 정량적인 RT PCR 및 CAS9 단백질 발현의 양을 모니터한 후 FLAG 태그를 웨스턴 블롯(Western blot) 검출로 모니터링한다. 이러한 조건 하에서, 편재적으로 발현된 CA9 만이 검출되어 정량화된다.
- [0213] 다음에, 형질도입된 세포를 Leu 또는 Thr이 고갈된 특정 배지 속의 배양물 속에 둔다. 2XAARE-CAS9 세포 속에서 CAS9 발현의 유도는 mRNA 및 단백질의 수준 둘 다에서 시간별로 모니터링한다. 따라서 최적의 처리 기간이 측정된다.
- [0214] 최종적으로, 293T^{GFP} 세포가 CAS9 및 gRNA^{GFP} 둘 다를 발현하는 경우, 이들 세포내에서 GFP의 발현은 감소하므로, 유동 세포분석법에 의해 측정된 GFP 양성 세포의 퍼센트는 GFP 발현을 녹아웃하기 위한 CAS9 효능에 초점을 맞추는 정밀한 수단이다.
- [0215] 따라서, 아미노산 고갈없이, FLAG-CAS9 형질도입된 293T^{GFP} 세포내에서 GFP 양성 세포의 퍼센트는 배양물 속에 일정하게 남는다. 고갈된 AA 배지가 들어있는 배양물 속에서 최적의 유도 후 GFP 세포의 퍼센트는 현저하게 감소한다. 전체적인 효능은 EF1a-CAS9로 형질도입된 세포내에서 CAS9의 연속된 발현과 비교한다.
- [0216] **실시예 2: 필수 아미노산 고갈에 의한 CAS9 발현의 유도**
- [0217] 프로모터 2xAARE는 전사 인자 ATF4에 대한 6개의 결합 서열을 함유하며, 이는 필수 아미노산(EAA) 고갈, 또는 투니카마이신(Tu)에 의한 소포체에 대해 유도된 스트레스와 같은 다른 세포 스트레스의 상태에서 신속하게 유도된다.
- [0218] 세균 뉴클레아제 Cas9의 발현이 프로모터 2xAARE에 의해 조절될 수 있는지를 평가하기 위해, 스트렙토코쿠스 피오게네스(spCas9)의 Cas9 유전자를 플래그 태그(flag tag), 자가촉매성 P2A 펩타이드에 융합시키고, 적색 형광 단백질(RFP)을 ATF4에 대한 4개의 결합 부위를 함유하는 2xAARE 인핸서(enhancer) 및 헤르페스 단성 바이러스(HSV; 도 4)로부터 기원한 티미딘 키나제 유전자(TKm)의 최소 프로모터의 제어하에서 클로닝(cloning)하였다.
- [0219] 이러한 HIV-기원한 렌티바이러스 벡터는 벡터의 통합 사건의 선택을 위한 내성 유전자 블라스티시딘의 안정한 발현을 허용한다. 두번째 카세트(cassette)는 U6 프로모터 및 안내 RNA AAVS1(서열 번호: 10) 및 CRISPR-보조된 RNA 스캐폴드(scaffold)를 함유함으로써, 사람 유전자 PPP1R12C의 ATG 아래를 절단하도록 한다. 세번째 발현 카세트는 프로모터 2xAARE-TKm의 제어하에서 유전자 spCas9-flag-RFP를 함유한다.
- [0220] 이러한 플라스미드를 사용하여 벡터 플라스미드, 293T 세포내에서 VSV 엔벨로프(envelop)를 암호화하는 + a 플라스미드(pVSV), HIV Rev 유전자를 암호화하는 + a 플라스미드(pRev), HIV(p8.9)의 Gag 및 Pol 유전자를 암호화하는 + a 플라스미드의 동시-형질감염의 표준 프로토콜에 따라 렌티바이러스 입자를 생산하였다. 48시간 후, 세포 상층액을 수거하고, 농축을 위해 초-원심분리하며, 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다. 벡터 스톡(vector stock)을 실시간 정량적 PCR로 적정하여 게놈/ml의 바이러스 RNA 카피를 측정하였다(Saeed et al.; Mol Ther 핵산s. 2014 Dec 2;3:e213).
- [0221] spCas9-flag-RFP의 발현이 EAA 고갈(루이신, Leu-이 없는 배지) 또는 투니카마이신(Sigma-Aldrich®)에 의해 조절될 수 있는지를 평가하기 위하여, 293T 세포를 세포당 100개의 vRNAc로 형질도입한 후 블라스티시딘으로 2 µg/ml(Sigma-Aldrich®)에서 선택하였다. 형질도입되지 않은 293T 세포는 모두 죽었지만, 형질도입된 세포는 정상적으로 성장하였으며, 이는 이들 모두가 벡터 pTRIP blast_U6 AAVS1_2xAARE-Cas9-flag-RFP의 적어도 하나의 카피를 함유하였음을 나타낸다.
- [0222] 293-C9로 불리는 이러한 집단을 확장시키고 추가의 실험을 위해 사용하였다. 세포를 24웰 플레이트(105개의 세포/웰)에 플레이팅(plating)하고 유전자 Cas9-flag-RFP의 발현을 루이신이 고갈된 10% 혈청이 들어있는 배양 배지(DMEM Leu-), 0.5 µg/ml의 투니카마이신이 들어있는 배양 배지(완전한 DMEM + Tu) 또는 대조군 배지(완전한 DMEM)로 유도시켰다.
- [0223] 세포를 유도 후(4시간, 8시간, 24 h) 및 유도 배지를 제거하고 이를 완전 배지로 교체한 후 24 h(즉 도입 후 48 h) 및 48 h(즉 도입 후 72 h) 후에 수회 수집하였다. 다양한 시점에서 수집한 세포를 펠렛화(pelleting)하고 단

백질 정제를 위해 분해하였다(트리스-HCl 0,05 M; SDS 0,5%; 1 mM DTT; 항-프로테아제를 사용하여 pH 8.0).

- [0224] 단백질 농도를 브래드포드 시험(Bradford test)을 사용하여 측정하고 30 μ g의 분리물(lysate)을 로딩 완충액 (loading buffer) 및 베타-머캅토에탄올과 혼합하고 95°C에서 5분 동안 가열하고, 변성 SDS 10% 폴리아크릴아미드 겔 위에서 로딩하였다. 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 이주(migration)를 착색된 래더(ladder)로 모니터링하였다.
- [0225] 겔 위의 단백질을 반-건조 전달을 통해 니트로셀룰로즈 막으로 이전시키고 막을 항-FLAG M2 MAB(Sigma-Aldrich®)를 사용한 면역블롯을 위해 사용한 후, HRP에 커플링된 두번째 항-마우스 항체로 검출하였다. 퍼옥시다제 활성을 화학발광성 HRP 기질(Luminata crescendo-Millipore®)로 나타내었으며 화학발광성 검출기 Fusion FX7 (Vilber®)로 사진을 찍었다.
- [0226] 193 kDa의 SPCas9-Flag-RFP의 검출된 밴드의 밀도를 Fusion FX7 검출기(Vilber®)의 소프트웨어로 정량화하였다. 각각의 샘플에서 베타-액틴의 수준을 또한 동일한 방법으로 그러나 항-베타 액틴 1차 항체를 사용하여 측정하였다. Cas9-flag-RFP에 상응하는 밴드의 밀도를 베타-액틴의 밀도로 표준화하였다. 이들 실험을 상이한 겔에서 수행하므로 데이터를 균일화하기 위해서, 최고 밀도(둘 다의 경우 24 h 유도 후)의 밴드를 100% 발현으로 고려하고, 보다 낮은 밀도의 다른 밴드의 값을 각각의 겔에서 최대 강도 참고의 퍼센트로서 비교하였다.
- [0227] 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 2xAARE-Tkm의 발현의 유도되지 않은 기본 수준에서, Cas9-flag-RFP 융합은 검출할 수 없는 것으로 잔류한다. 그러나, 융합의 발현은 Leu- 배지를 세포에 첨가시(평선) 또는 Tu를 함유하는 완전 배지의 첨가시(점선) 신속하게 유도된다. 유도 배지((24 h 제에) 및 완전 배지로 이의 교체 시, 단백질 Cas9-flag-RFP의 발현은 점진적으로 감소하였다(참고: 48 h 및 72 h). 이는 프로모터 2xAARE-Tkm가 EAA 고갈을 사용하거나 ER 스트레스의 유도를 통해 Cas9 발현을 제어하도록 함을 나타낸다. 단백질 Cas9-flag-RFP의 유도가 계놈내 AAVS1 계놈 위치에서의 절단을 허용하는지(즉, 이중 가닥 파괴를 수행하는지)를 평가하기 위하여, 293-C9 세포를 24 h 동안 완전한 DMEM 또는 DMEM Leu-로 배양하였다. 세포를 24시간 후 수거하고, 펠렛화하며 계놈 DNA를 DNA easy Kit(QuiaGen®)를 사용하여 정제하였다. PCR을 AAVS1 절단 부위의 5'(서열 번호: 11) 및 3'(서열 번호: 12)에서 하이브리드화하는 프라이머(primer)로 수행하였다. 540 bp의 PCR 생성물을 정제하고 서열분석하여 표적화된 것임을 확인하였다.
- [0228] Cas9가 절단되는지를 추가로 평가하기 위해 본 발명자들은 T7 뉴클레아제 시험(New England Biolabs®)을 수행하였다. 유도되지 않거나 유도된 293-C9의 정제된 계놈 DNA로부터의 AAVS1 밴드를 증폭시키는 PCR을 변성시키고 제공자의 안내에 따라 느리게 재-하이브리드화하였다(<https://www.neb.com/protocols/2014/08/11/determining-genome-targeting-efficiency-using-t7-endonuclease-i>).
- [0229] Cas9-유도된 이중 가닥 파괴는 세포 기구(cell machinery)에 의해 쌍을 이루며 절단 부위에서 삽입 및 결실(삽입-결실)을 생성하므로, 상이한 삽입-결실의 혼합물을 함유하는 세포의 집단으로부터 수득된 PCR 밴드는 미스매치(mismatch)를 함유하는 DNA 단편을 생산한다. 이들은 DNA의 보다 작은 밴드를 방출하는 T7 뉴클레아제에 의해 절단된다.
- [0230] 293-C9 세포내에서 24 h 동안 DMEM Leu-를 사용한 Cas9-flag-RFP 발현의 유도는 전체 DNA의 약 20%를 나타내는 PCR 밴드의 중심에 위치한 절단 부위 AAVS1에 상응하는 250 bp에서 보다 작은 밴드를 생산함이 관찰될 수 있었다. 유도되지 않은 293-C9 세포에서, 이러한 밴드는 명확하지 않으며, 이는 AAVS1 부위가 유전자 Cas9-flag-RFP의 유도까지 절단되지 않고 남음을 나타낸다.
- [0231] 따라서, 본원에 개시된 바와 같이, ON/OFF 방식으로, Cas9의 제어된 발현을 위한 시스템은 계놈을 안전하게 편집하기 위한 도구를 제공한다. 실제로, 유도의 부재하에서, 발현 시스템의 어떠한 검출가능한 유출의 부재는 어떠한 원치않는 계놈 편집도 방지하기 위한 안전성 특징을 제공한다.
- [0232] 대조적으로, 유도의 존재하에서, 신속한 발현이 유도의 제거가 효과적이지 마자 정지할 수 있다.
- [0233] 이후에 2개의 기능 시험을 수행하여 AAVS1 부위에서 공여체 DNA (Do)를 통합하였다.
- [0234] 첫번째로, 293T 세포를 GFP-p2a- 푸로마이신 유전자의 5' 및 3' 에서 플라스미드 'pTRIP blast_U6 AAVS1_2xAARE-Cas9-flag-RFP' 및 또한 Cas9 + gRNA AAVS1를 사용한 절단을 허용하는, 카세트 'AAVS1 절단 부위-GFP-p2a-푸로마이신-AAVS1 절단 부위'를 함유하는 공여체 플라스미드로 형질감염(Ca²⁺ 포스페이트 방법)시켰다.
- [0235] 293T 세포의 계놈내에서 안내 RNA에 의해 표적화된 선택된 AAVS1 부위는 유전자 PPP1R12C의 ATG 출발 코돈을 포

함한다. 표적화되는 경우, 이는 PPP1R12C의 엑손 1 대신에 방출된 GFP-p2a-푸로마이신 카세트의 삽입 및 PPP1R12C 프로모터에 의한 후속적인 발현을 허용할 것이다. 이러한 경우, 제조할 세포는 GFP를 발현하며 푸로마이신에 대해 내성이 되어 이들의 선택을 허용하고 통합 사건에 상응하는 클론을 계수한다.

[0236] 도 6에 나타난 바와 같이, 플라스미드 'pTRIP blast_U6 AAVS1_2xAARE-Cas9-flag-RFP'(C9) 및 공여체 'pAAVS1 cut site-GFP-p2a-푸로마이신_AAVS1 절단 부위'(Do) 둘 다가 (i) 루이신 고갈된 배지(i Leu-) 또는 투니카마이신-함유 배지(i Tu)을 사용하지만, 완전한 배지(ni)는 사용하지 않는 2xAARE 유도과 함께 제공되는 경우에만 푸로마이신에 대해 내성인 클론을 제공한다. 이는 표적화된 통합에 대한 Cas9 활성이 프로모터 2xAARE의 유도를 필요로 함을 나타낸다.

[0237] 이러한 실험을 2개의 AAVS1 절단 부위(Do)에 의해 플랭킹된(flanked) -GFP-p2a-푸로마이신을 함유하는 공여체 플라스미드로 형질감염된 293-C9 세포내에서 반복하였다. 이러한 플라스미드 pAAVS1-안내된 Cas9 활성은 GFP-p2a-푸로마이신 서열을 방출할 것이다.

[0238] 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 293-C9 세포를 공여체 플라스미드(Do)로 형질감염시키는 경우, 푸로마이신 내성 콜로니가 유도의 부재(ni) 하에서 생산된다. 대조적으로, 293-C9 세포를 공여체 플라스미드(Do)로 형질감염시키고 투니카마이신또는 루이신-고갈된 배지의 존재하에서 유도시키는 경우, 이들 세포는 둘 다의 조건 속에서 푸로마이신 내성 콜로니를 생산하였다.

[0239] 이는 Cas9 발현의 유도시, Cas9 뉴클레아제가 AAVS1 절단 부위로 안내되는 경우에 (1) 공여체 카세트의 방출을 생성하는 공여체 플라스미드, 및 (2) 공여체 카세트의 통합을 생성하는 게놈 DNA내 AAVS1 부위내 둘 다에서, 이중 가닥 파괴를 생성하는데 효율적임을 추가로 입증한다.

[0240] ***

[0241] 상기 실험은 이의 발현이 AARE를 기반으로 하는, Cas9 뉴클레아제의 제어된 발현을 위한 시스템이 유도 조건에 의해 미세하게 조율될 수 있음을 나타내는 확실한 실험 데이터를 제공한다.

[0242] 실제로, 유도의 부재하에서, 검출가능한 발현이 관찰되지 않으며, 이는 누출이 관찰되지 않음을 의미한다.

[0243] 또한, 게놈 편집은 유도시에만 관찰될 수 있으며, 유도 조건의 제거시 신속하게 멈출 수 있다.

[0244] 따라서, 이러한 시스템이 매우 정밀하게 켜지고 꺼질 수 있으므로, 이러한 시스템은 이를 필요로 하는 개체에서 게놈 편집 및 따라서 유전자 치료요법을 제공하기 위한 안전한 도구를 제공한다.

[0245] ***

[0246] 본 발명에서 개시된 핵산 서열

[0247] 하기 표 1은 본원에 사용된 핵산 서열을 개시한다:

표 1

서열 번호:	유형	의견
1	핵산	TRIB3 유전자로부터의 AARE 서열
2	핵산	CHOP 유전자로부터의 AARE 서열
3	핵산	ASNS 유전자로부터의 AARE 서열
4	핵산	ATF3 유전자로부터의 AARE 서열
5	핵산	SNAT2 유전자로부터의 AARE 서열
6	핵산	티미딘 키나제 최소 프로모터
7	핵산	2xAARE 핵산
8	핵산	NLS-FLAG CAS9 핵산
9	핵산	pTRIP 2xAARE- NLS-FLAG CAS9 핵산
10	핵산	안내 RNA AAVS1
11	핵산	5' 프라이머
12	핵산	3' 프라이머

[0249] TRIB3 유전자로부터의 AARE 서열: 서열 번호: 1

- [0250] cggtttgcatcacccg
- [0251] CHOP 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 2
- [0252] aacattgcatcatccc
- [0253] ASNS 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 3
- [0254] gaagtttcatcatgcc
- [0255] ATF3 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 4
- [0256] agcgttgcatcacccc
- [0257] SNAT2 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 5
- [0258] gatattgcatcagttt
- [0259] 티미딘 키나제 최소 프로모터 핵산: 서열 번호: 6
- [0260] cgaggtccacttcgcatattaaggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgaccgccttaacagcgtcaacagcgtgccgca
- [0261] 2XAARE 핵산: 서열 번호: 7
- [0262] gat tagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatcacccggaccggggggcc
gggcgcgtgctagcgattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatcac
ccggaccggggg
- [0263] NLS-FLAG CAS9 핵산: 서열 번호: 8
- [0264] atgggacctaagaaaaagaggaaggtgcctaaagaaaaagaggaaggtgcctaaagaaaaagaggaaggtggcggccgctgactacaaggatgacgacgataaa
tctagagacaagaatactctattggactggatatcgggacaaactccgttggctggccgctcataaaccgacgagatgaaggtgccaaagcaagaataacaag
gtgctgggttaatactgaccgccattcaatcaagaagaacctgatcgagcactcctctcgactccggtgaaaccgctgaagctactcggtgaagcggacc
gcaagcggagatcaccccgcccaagaatcggtatgttatctgcaagagatcttagcaacgaaatggctaaggtggacgactcctctctcaccgcctg
gaagagagcttcttggtggaggaggataaagaacacgagaggcacccctatatcggaatatcgtggatgaggtggcttaccatgaaaagtatcctacaatc
taccatctgaggaagaagctggtggacgacccgataaagcagacctgaggctcatctatctggccctggctcatatgataaagtttagaggacacttctg
atcgaggcgacctgaatcccgataatccgatgtggataaactcttcatcaactggtgcagacataaaccaactgttcgaggagaatcccataaacgct
tctggtgtggatgccaaggctattctgtccgctcggtgtccaagtacgcgactggagaatctgattgcccactgccaggagaaaagaagaacggcctg
tttgggaacctcatcgccctgagcctgggctgacacctaaactcaagttcaattttgatctggccgaagatgctaaactccagctctccaaggacacctat
gacgatgatctggacaacctgctcgacagataggcgaccagtacgccgatctcttcttggtgctgaagaatctctccgacgccattctgctgagcgacata
ctccgggtcaacactgagatcaccaaagcacctctgagcgctccatgataaaacgctatgatgaacaccatcaagacctgactctgctcaaaacctcgtg
aggcaacagctgccagagaagtaacaagagatatcttcgaccagagcaagaatggatatgccggatacatcgatggcggagcatcacaggaagaatttac
aagttcatcaaaacatcctcgagaagatggacggtactgaagagctgctggtgaagctgaacaggaggagacctgctgaggaagcagaggacctttgat
aatggctccattccacatcagatacactgggagagctgcatgcaatcctccgaggcaggaggatttctatcctttcctgaaggataaccgggagaagatagag
aagatcctgacctcaggatcccttatctgctggccctctggctagaggcaactcccgttcgcttgatgaccaggaaatctgaggagacaattactcct
tggaaactcgaagaggtcgtggataaaggcgcaagcgccagtcattcatcgaacggatgaccaatttcgataaagaacctgccaacgagaaggtcctgcc
aaacattcactcctgtacgagtatttcaccgtctataacgagctgactaaagtgaagtacgtgaccgagggcagtaggaagcctgccttctgtccggagag
cagaagaaggctatcgttgatctgctctcaagactaatagaaaggtgacagtgaagcagctcaaggaggattactttaagaagatcgaatgctttgactca
gtggaaatctctggcgtggaggaccgctttaatgccagcctgggcacttaccatgatctgctgaagataatcaaaagacaaagatttctcgataatgaggag
aacgaggacatcctggaagatatcgtgctgaccctgactctgttcgaggatagagagatgatcgaagagcgctgaagacctatgcccatctgtttgacgat
aaagtcatgaaacagctcaagcggcgccgctacactgggtggggtgactctccaggaaactcataaacggcatccgcgacaaacagagcggaaagaccatc
ctggatttctgaaatccgacggattcgctaacaggaacttcatgcaactgattcacgatgactcttgacatttaaaggagacatccagaaggcacaggtg
agcggctcaaggcgacagcctgcacgacacatcgccaacctcgctggatcacccgccataaagaagggaatactgcagacagtcaaggtcgtggacgaactc
gtcaaagtgatgggtcggcacaagccagagaatatcgttatcgaatggcaagggagaaccaaaccaccagaaggccagaagaactctcggaacggatg
aaaagaatcgaagagggaattaaaggagctgggatctcagatactgaaggagcacctgtggagaatcacagctccagaacgagaactctacctgtactac
ctccagaacggcggggacatgtacgttgaccaggaactcgacatcaaccggctgtccgatgatgacgtggaccatattgttccacagtccttctcaaagat
gactccattgacaacaaggtgctgaccagatccgatagaatcgcggtgaagctgacaatgttccatcagaagaggtggtcaagaagatgaagaattactgg
cggcagctcctcaacgccaaactgatcacccagcggaagtttgacaatctgactaaggcagaagaggaggtctgagcgaactcgacaaggccggctttatt
aagaggcaactggtcgaaacacgccagattaccaaacacgtggcacaaatcctcgactctaggatgaacactaagtagcatgagaacgataagctgatcagg

gaagt gaaagt gata aact ct gaagag caagct ggtgt ct gact t ccggaaggact t t caat t ct acaaagt t cgcgaaat aaacaat t accat cat gct cac
gat gcct at ct caat gct gt cgt tggcaccgccct gat caagaaat accct aaact ggagt ct gagt t cgt gt accgt gact at aaagt ct acgat gt gagg
aagat gat agcaaagt ct gagcaagat tggcaaa gccaccgccaagt act t ct t ct act ct aat at cat gaat t t ct t t aagact gagata accct ggct
aacggcgaaat ccggaagc gccact gat cgaacaaac ggagaaac aggagaaat cgt gt gggat aaaggcagggact t cgcacat gt gcggaaggt gct g
t ccat gccacaagt caat at cgt gaagaagaccgaagt gcagaccggcggt t t ctaaaggagagcat cct gccaaagc ggaact ct gacaagct gat cgc
aggaagaaagat tgggacc caaagaagt at ggcggt t t cgt t cccct acagt ggct t at t cgt t t cgt cgt ggcaaaagt ggagaaaggcaagt ccaag
aaact caagt ct gt t aaggagct gct cggaat t act at t at ggagagat ccagct t cgagaagaat ccaat cgt t t cct ggaagct aagggt at aaagaa
gt gaagaaagat ct cat cat caaact gcccagct act ct ct t t gact ggagaat ggt aggaagcggat gct ggct c cgcggagagct gcagaaagga
aacgagct ggct ct gccct ccaat acgt gaact t cct gt at t ggct cccact acgagaaact caaaggt agccct gaagacaat gacgagaagcaact c
t t gt t gagcaacat aaacact acct ggacgaaat cat t gaacagat t agcgagt t cagcaagcgggt t at t t ggccgat gcaaacct cgt at aagt gct g
agcgcat at aata agcacagg gacaagccaat t cgcgaacaagcagagaat at t at ccacct ct t act ct gact aat ct gggcgct cct gct gcct t caag
t at t t cgt at aact at t gacaggaagcggat acacct ct accaaagaagt t t cgt gccacct gatacaccagt caat t accggact gt acgagact cgc
at cgaact gt ct cagct cggcgcgact ag

[0265] pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9 플라스미드의 핵산: 서열 번호: 9

[0266] ccagat cct ct acgccgacgcat cgt ggccggcat caccggcgccacaggt gcggt t gct ggcgct at at cccgacat caccgat ggggaagat cgggc
t gccact t cgggct cat gagcgt t gt t t cggcgt gggat ggt ggacggccccgt ggccgggggact gt tggcgccat ct cct t gcat gcaccat t cct
t cggcgcgcggt gct caacggct caacct act act gggct gct t cct aat gcaggagt cgcata aaggagagcgt cgaat ggt gact ct cagt acaat ct
gct ct gat gccgat agt t aagccagccccgacacccgccaacacccgct gacgcgccccgt gacgggt t gt ct gct cccggcat ccgt t acagacaagct g
tgaccgt ct cgggagct gcat gt gt cagaggt t t caccgt cat caccgaaacgcgcgagacgaaaggcct cgt gat acgct at t t t at aggt taat g
t cat gat aataat ggt t t ct tagact caggt ggact t t cggggaat gt gcgcggaacccct at t gt t t at t t t t taatacat t caaat at gt at c
cgct cat gagacaat aacct gataat gct t caat aat at t gaaaaaggaagat at gact at t caacat t t cgt gt gccct t at t cct t t t t cggg
cat t t t cct t cct gt t t t t gct caccagaaacgt ggt gaaagt aaaagt gct gaagat cagt tgggt gcacgagt ggggt t acat cgaact ggat ct ca
acagcggtaagat cct t gtaggt t t t cccccgaagaacgt t t t caat gat gacact t t t aaagt t ct gct at t tggcgcggt at t at cccgt at t gacg
ccgggcaagagcaact cgt t cgcgcat acact at t ct cagaat gact t ggt t gact act caccagt cacagaaaagcat ct t acggat ggcat gacagt aa
gagaat t at gact gct gccata aacct gact gat aacact gcggccaact t act t ct gacaacgat cggaggaccgaaggagct aaccgt t t t t tgcaca
acat gggggat gat gtaact cgcct t gat cgt t gggaaccggagct gaat gaagccat accaaacgacgagcgt gacaccacgat gcct gt agcaat ggcaa
caacgt t gcgcaaacat t aact ggcaact act t act ct agct t cccggcaacaat t aat agact ggat ggaggcggat aaagt tgcaggaccact t ct gc
gct cggccct t cgggt ggt ggt t t at t gct gat aact ct ggagccgt gacgct ggggt ct cgcggt at cat tgcagcact gggggcagat ggt aagcct
cccgt at cgt agt t at ct acacgacggggagt caggcaact at ggat gaacgaaat agacagat cgt gagat aggt gcct cact gat taagat t ggt aac
tgt cagaccaagt t t act cat at at act t tagatt gat t taaaact t cat t t t t aat t taaaaggat ct aggt gaagat cct t t t t gataat ct cat gacca
aaat cct t aacgt gact t t t cgt t cact gacgct cagacccgt agaaaagat caaaggat ct t ct t gact cct t t t t t cgcgct aat ct gct gct
t gcaaaaaaaaccaccgt accagcgt ggt t t gt t t gccgat caagact accaact ct t t t cgaaggt aact ggt t cagcagagcgcagat ac
caaat act gt cct t ct agt t gtagccgt agt t aggcaccact t caagaact ct t gtagcaccgct acat acct cgt ct gct aat cct gt t accagt ggct g
ct gccagt ggcat aagt cgt gt ct t accgggt tggact caagacgat agt t accggaat aaggcgacggt cgggt gaacgggggt t cgt gcacacagc
ccagct t ggagcgaacgact acaccgaact gagat acct acagcgt gacat t gagaagcgcacgct t cccgaaggagaaaggcggacaggt at cggg
t aagcggcagggt cggaaacaggagagcgcacaggaggt t cagggggaaacgcct ggt at ct t t at agt cct gt cgggt t t cggccact ct gact t gac
gt cgt t t t t gct gct cgt caggggggcgagcct at ggaaaaacgcagcaacgcggcct t t t t acggt t cct ggct t t t gct ggct t t t gct caca
tgt t ct t cct gct t at cccct gat t ct gt ggata aaccgt at t accgct t t gact gact gat accgct cgcgcagccgaacgaccgagcgcagcaggt
cagt gacgaggaagcgaagagcgcaccaat acgcaaacgcct ct ccccgcgct tggccgat t cat t aat gcagct gt ggaat gt gt gct t aggt g
tggaaagt cccaggt cccagcagcagaagt at gcaagcat gcat ct caat tagt cagcaaccaggt tggaaagt cccaggt cccagcagcagcag
aagt at gcaagcat gcat ct caat tagt cagcaaccat agt cccgccct aact cgcgccat cccgccct aact cgcgccgt t cgcgccat t ct cgcgc
ccat ggt gact aat t t t t t t t t at t gcaaggcggagggcgcct cggcct ct gact at t cagaagt agt gaggaggt t t t t tggaggcct aggt t
t t gcaaaaagct tggacacaagacaggt tgcgagat at gt t t gagaat accact t t at cccgct caggagagggcaggt gct aaaaagacgcggact cat
gt gaaat act ggt t t t t agt gcgccagat ct ct at aat ct cgcgcaacct at t t cccct cgaacact t t t t aagcgt agat aaacaggt gggacact t c
acat gacgaaaaat acat cgt cact gggacat gt tgcagat ccat gcagta aact cgcgaagcagct gat gcct t ct gaacaat ggaaggcat t at t g
ccgt aagcgt ggcgt ct gacgggt gct t act ggcgct gaact ggt at t cgt cat gt cgt accgt t gt at t t cagct acgat cagcacaacca
gcgcgagct t aaagt gct gaaacgcgcagaaggcgt ggcaaggct t cat cgt t at t gat gact ggt ggat accgt ggt act gcgt t gcat t cgt ga
aat gt at ccaaaagcgcact t t t caccat ct t cgaaaacggct ggt cgt cgcgt ggt t gat gact at gt t gt t gat at cccgcaagat acct ggat t ga
acagcgt gggt at gggcgt cgt at t cgt cccccaat ct cgggt cgt aat ct t t t caacgct ggact cccggcggt t gt t ct t t t t aact t caggcg
ggt tacaat agt t t cagta agt at t t ggaggct gcat ccat gacacaggcaaacct gacgcaaacct gt t caaacccgct t t aacat cct gaaacct

cgacgctagtccgccgctttaatcacggcgccacacccgctgtgcagtcggcccttgatggtaaaacccatccctcactggtatcgcatgattaacgctctga
 tgtggatctggcgccgcattgaccacgcgaaatcctcgacgtccaggcacgtatttgtgatgagcgatgccgaacgtaccgacgatgattatacgatacgg
 tgattggctaccgtggcggaactggatttatgagtgggccccggatctttgtgaaggaaaccttacttctgtggtgtgacataattggacaaactacctaca
 gagatttaaagctctaaggtaaatataaaattttaagtgtataatgtgttaaaactactgatctaatgttttgtgtattttatagatccaacctatggaact
 gatgaatgggagcagtggtggaatgcctttaatgaggaaaacctgtttgtcagaagaaatgccatctagtgtatgaggtactgctgactctcaacat
 tctactcctccaaaaagaagagaaaggtagaagaccccaaggactttccttcagaatgtctaagtttttgagtcagctgtgtttagtaataagaactctt
 gcttgctttgctatttacaccacaaaggaaaaagctgcactgctatacaagaaaatattggaaaaatattctgtaaccttttaagtaggcataaacagtat
 aatcataacatactgtttttcttactccacacaggcatagagtgtctgctattataaactatgctcaaaaatttgtgtaccttttagctttttaatttgtaaa
 ggggttaataaaggaatatttgtatgtatagtgccttgactagagatcataatcagccataccacatttgttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccaca
 cctccccctgaacctgaacataaaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttatgagcttataatgggtacaaataaagcaatagcatcacaaattt
 cacaaataaagcatttttttcactgcatctctagtgtgtgtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataaactcaagctaacca
 aatcatccaaacttcccaccccataccctattaccactgccaattacctagtgtttcatttactctaaacctgtgatctctgaattattttcatttt
 aaagaaattgtatttgttaaatatgtactacaaacttagtagttggaagggctaatcactcccaagaagacaagatcccttgatctgtggatctaccac
 acacaaggctacttccctgattagcagaactacacaccaggccagggtcagatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagcca
 gataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaaggtgttagagtggagg
 tttgacagccgctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaagggactttccgctggg
 gactttccaggaggcgctggcctggcgaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgctgtactgggtctctctggtt
 agaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttcaagtagtgtgtgcccgtct
 gttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaataatctctagcagtgccgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaa
 ccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtagtagcgcacaaatatttgactagcggga
 ggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagatttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattcgggttaaggccagggggaaagaaaaa
 tataaatataaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgatctgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactggga
 cagctacaacctcccttcagacaggatcagaagaacttagatcatatataatacagtgcacacctctatttgtgtgcatcaaaggatagagataaaagac
 accaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagttaagaccaccgcacagcaagcgccgctgatcttcagacctggaggaggagatagag
 ggacaattggagaagtgaattatataaatataaagttagtaaaaaatgaaccattaggagtgcacccaccaaggcaaaagagaagagtggtgcagagagaaaa
 aagagcagtggaataggagctttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcgagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaatt
 atttgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgttgagggtctatgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggc
 aagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgccaccactgctgtgctcttggatgc
 tagttggagtataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaataaacaattacacaagcttaatacactccttaatt
 tgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattgggttaacataaacaatttggtgtg
 gtataataaatatttcataatgatagtaggaggcttggtaggttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcacc
 attatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggaccgcagggcccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccatcgatt
 agtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggcagttatcatccacaattttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaaga
 atagttagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacaggacagcagagatcca
 ctttggtgtgacgcggatctacgctcaagtttgtacaaaaaagcaggctccggcgccgcccccttaccgggtaccgatagctccggtttgcatcaccgcg
 gaccgggggatagctccggtttgcatcaccgggaccgggggatagctccggtttgcatcaccgggaccggggcgggcgctgctagcgattagctccg
 gtttgcatcaccgggaccgggggatagctccggtttgcatcaccgggaccgggggatagctccggtttgcatcaccgggaccggggactcgaggtccact
 tcgcatattaaaggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgacctgacgcgacctgttaacagcgtcaacagcgtgccgcaagcttgaattctgatcagc
 attccggtactgttggttaagccacatgggacctaaagaaaagagggaaggtgcctaaagaaaagagggaaggtgcctaaagaaaagagggaaggtggcgccg
 ctgactacaaggatgacgacgataaatctagagacaagaaatactctattggactggatcgggacaaactccgttggtgggcccgtcataaccgacaggt
 ataaagtgccaagcaagaaattcaaggtgctgggttaactgaccgccattcaatcaagaagaacctgatcgagcactcctctcgactccggtgaaaccg
 ctgaagctactcggctgaagcggaccgcaaggcgagatcacccgcccgaagaatcggtatgttatctgcaagagatcttagcaacgaaatggctaagg
 tggacgactccttctttcaccgctggaagagagctttctgggtggaggaggataagaacacagagaggcaccctatattcggaatatcgtggatgaggtgg
 ctaccatgaaaagtatcctacaatctaccatctgaggaagaagctgggtggacgacccgataaagcagacctgaggtcatctatctggccctggctcata
 tgataaagtttagaggacactttctgatcgaggcgacctgaatcccgaataatccgatgtggataaactcttcatcaactggtgcagacataataaccaac
 tgttcgaggagaatccataaacgcttctggtgtggatgccaaggtattctgtccgctcggtgtccaagtcacgcagactggagaatctgattgccaac
 tgccaggagaaaaagaagaacggcctgtttgggaacctcatcgccctgagcctgggctgacacctaaactcaagttcaaattttgatctggccgaagatgcta
 aactccagctctccaaggacacctatgacgatgctggacaacctgctcgacagataggcgaccagtacgcccgatctctttctggctgctagaatctct
 ccgacgccattctgctgagcgacatactccgggtcaacactgagatcaccaaagcactctgagcgctccatgataaaacgctatgatgaacacccatcaag
 acctgactctgctcaaagccctcgtgaggcaacagctgccagagaagtacaaagagatatcttcgaccagagcaagaatggatagccggatacatcgatg
 gcggagcatcacaggaagaattttacaagttcatcaaaccaatcctcgagaagatggacggtactgaagagctgctggtagaagctgaacagggaggacctgc

tgaggaagcagaggacctttgataatggctccattccacatcagatacacctgggagagctgcatgcaatcctccgcaggcaggaggatttctatcctttcc
tgaaggataaccgggagaagatagagaagatcctgaccttcaggatcccttattacgtcgccctctggctagaggcaactcccgttcgcttggatgacca
ggaaatctgaggagacaattactccttggaaacttgaagaggtcgtggataagggcgcaagcgccagtcattcatcgaacggatgaccaatttcgataaga
acctgcccaacgagaaggtcctgcccaaacattactcctgtacgagtatcaccgtctataacgagctgactaaagtgaagtacgtgaccgaggggcatga
ggaagcctgccttctgtccggagagcagaagaaggctatcgttgatctgctctcaagactaatagaaaggtgacagtgaagcagctcaaggaggattact
ttaagaagatcgaatgctttgactcagtggaaatctctggcgtggaggaccgctttaatgccagcctgggcacttaccatgatctgctgaagataatcaag
acaaagatttctcgataatgaggagaacgaggacatcctggaagatatcgtgctgacctgactctgttcgaggatagagagatgatcgaagagcgctga
agacctatgccccatctgtttgacgataaagtcataaacagctcaagcggcgcgctacactgggtgggtagactctccaggaaactcataaacggcatcc
gcgacaacagagcggaagaccatcctggatttctgaaatccgacggattcgctaacaggaaacttcatgcaactgattcacgatgactctctgacattta
aaggaggacatccagaaggcacaggtgagcgggcaaggcgacagcctgcacgagcacatcgccaacctcgctggatcacccgccataaagaagggaatctgc
agacagtcaaggtcgtggacgaactcgtcaaagtgtgggtcggcacaagccagagaatatcgttatcgaatggcaagggagaaccaaaccaccagaagg
gccagaagaactctcggaacggatgaaaagaatcgaagagggaattaaaggagctgggatctcagatactgaaggagcacctgtggagaatcacagctcc
agaacgagaactctacctgtactacctccagaacggcgggacatgtacgttgaccaggaaactcgacatcaaccggctgtccgattatgacgtggaccata
ttgttccacagtccttctcaaagatgactccattgacaacaagggtctgaccagatccgatagaatcgcggttaagtctgacaatgttccatcagaagagg
tgggtcaagaagatgaagaattactggcggcagctcctcaacgcaaacctgatcacccagcggaagttgacaatctgactaaggcagaagaggagggtctga
gcgaactcgacaaggccggctttattaaaggcaactggtcgaacacgccagattaccaaacacgtggcacaatcctcgactctaggatgaacactaagt
acgatgagaacgataagctgatcaggaagtgaagtgataactctgaagagcaagctgggtctgacttccggaaggactttcaattctacaagtctcg
aaataaacaattaccatcatgctcacgatgcctatctcaatgctgtcgttggcaccgccctgatcaagaataaccctaaactggagcttgagttcgtgtacg
gtgactataaagtctacgatgtgaggaagatgatagcaaatctgagcaagagattggcaaaagccaccgccaagtacttcttctactctaatacatgaatt
tctttaagactgagataaacctggctaacggcgaaatccggaagcgccactgatcgaacaaacggagaacaggagaaatcgtgtgggataaaggcaggg
acttcgcaactgtcggaagggtgctgtccatgccacaagtcattatcgtgaagaagaccgaagtgcagaccggcggtatctcaaaggagagcatcctgccaa
agcggaaactctgacaagctgatcgccaggaagaaagattgggacccaagaagatggcggtttcgattcccctacagtggcttatccgttctgggtcgtgg
caaaagtggagaaggcaagtcgaagaactcaagtcgttaaggagctgctcggaattactattatggagagatccagcttcgagaagaatccaatcgatt
tcttggaaagctaaaggctataaagaagtgaagaaagatctcatcaaaactgcccaagtactctctttagactggagaatggtaggaagcggatgctgg
cctccgaggagagctgcagaaaggaacgagctggctctgcctccaaatcgtgaacttctgtatctggcctccactacgagaaactcaaaggtagcc
ctgaagacaatgagcagaagcaactcttgttgagcaacataaacactacctggacgaaatcattgaacagattagcgagttcagcaagcgggttatctgg
ccgatgcaaacctcgataaagtgtgagcgcatataaagaacagggacaagccaattcgcaacaagcagagaatatatccacctcttactctgacta
atctggcgctcctgctgcctcaagttatcgatacaactattgacaggaagcgtacacctctaccaagaagtctcgatgccacctgatacaccagt
caattaccggactgtacgagactcgatcgacctgtctcagctcgccggcgactagtaaagcggcgggctcgagctagaaaagggtggcgcgccgacca
gctttctgtacaaagtggctcgacggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaggggggactggaag
ggctaatctactcccaacgaagacaaaatcgtcgagagatgctgcatataagcagctgcttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagc
ctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgttcaagtgtgtgccctgtgtgtgactctgg
taactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttatattcagttattataacttgcaagaaatg
aatatcagagagtgagaggccttgacattataatagatttagcaggaattgaactaggagtggagcacacaggcaagctgcagaagtacttggaagaagcc
accagagatactcacgattctgcacataactggctaateccagatcctaaggattacattaaagttactaacattatataatgattatagtttaaagttat
aaacttatctaatttactattctgacagataataatcctcaaatatcataagagatgattactattatccccatttaacacaagaggaaactgagagg
gaaagatgtgaagtaattttcccacaattacagcatcgttagttacgactctatgatctctgacacaaattccattactcctcacctatgactcagt
cgaatatatacaagttatggacattatgctaagtaacaaatcacccttttatatagtaaatactgagtagattgagagaagaaattgtttgcaaacctgaat
agcttcaagaagaagagaagtgaggataagaataacagttgtcatttaacaagttttaacaagtaacttgggtagaaagggttcaaatgcataaagcaagg
gataaattttctggcaacaagactatacaatataaccttaaatatgacttcaataatgtttggaacttgataaaactaattaaatattatgaagattat
caatatataaatgtaatttacttttaaaagggaacatagaaatgtgtatcattagagttagaaacaatccttatatcacaaattgtcaaaacaagtttg
ttattaacacaagtagaactgcatccaattaaagttgactgcagattttgtgtttgttaaaattagaaagagataacaacaatttgaattattgaaagta
acatgtaaatagttctacatacgttcttttgacatctgttcaatcattgatcgaagttctttatcttggaagaattgttccaaagactcgaataagga
aaacaatctatatatagttctcacacctttgttttacttttagtgatttcaatttaataatgtaaatggttaaaatttatcttctctgagatcattcaca
ttgcagatagaaaacctgagactggggtaatttttataaaatctaatttaactcagaacacatctttattctaacaatcaattttccagtttgatatta
tcatataaagtacgcttctcatctgcaggttcacacaacaaaatccaaccaactgtggatcaaaaatttgggaaaaaatataaaatagcaatacaaca
taaaaaaatacaaatcagaaaaacagcacagataaacaactttatttagcatttacaatctattaggtattataagtaattctag

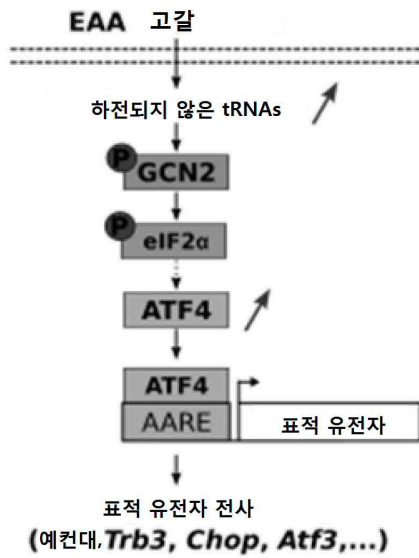
[0267] 안내 RNA AASV1: 서열 번호: 10

[0268] ggggcgggcgggtgcgatgtcgt_

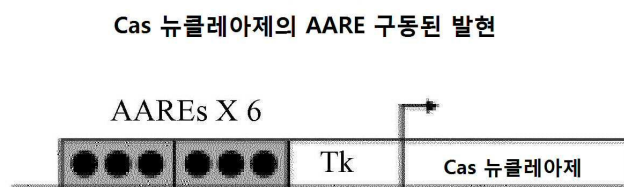
[0269] 5' 프라이머: 서열 번호: 11
 [0270] agggccacttctgctaattg
 [0271] 3' 프라이머: 서열 번호: 12
 [0272] gataccgtcggcgttgggtg

도면

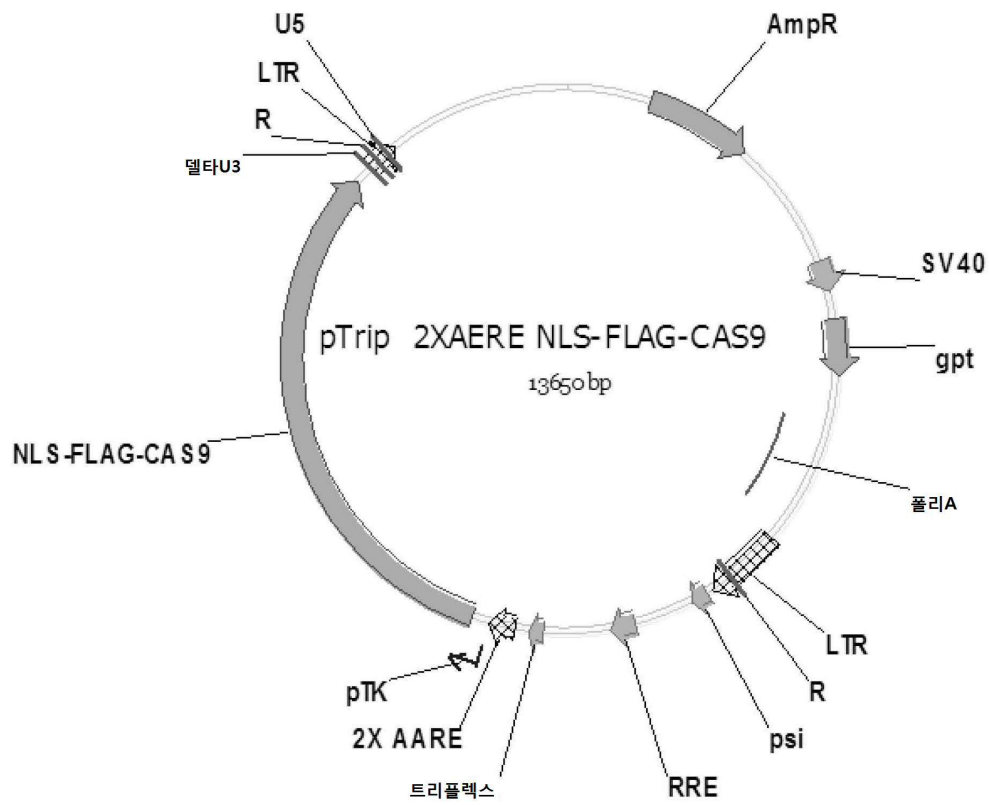
도면1



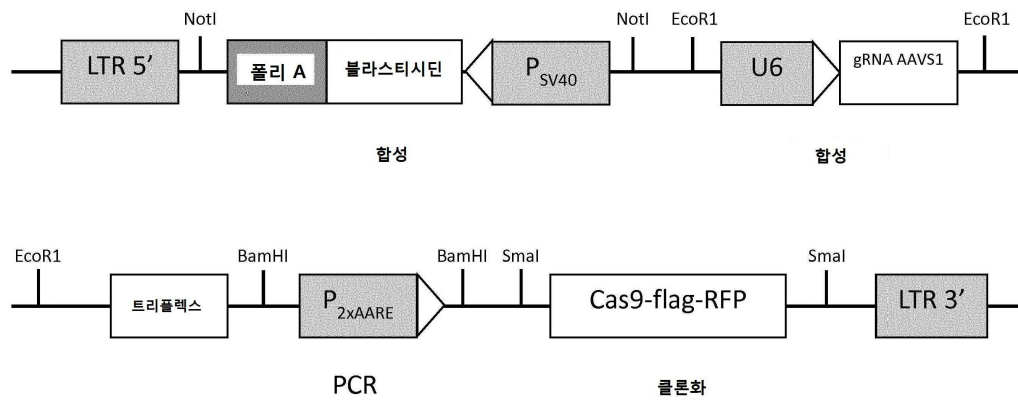
도면2



도면3

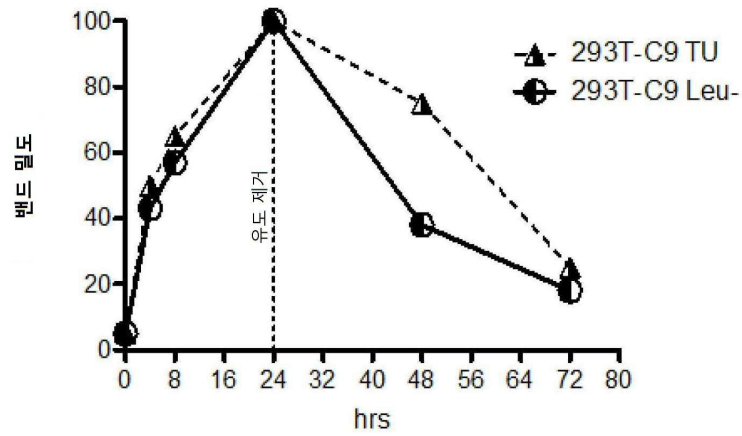


도면4



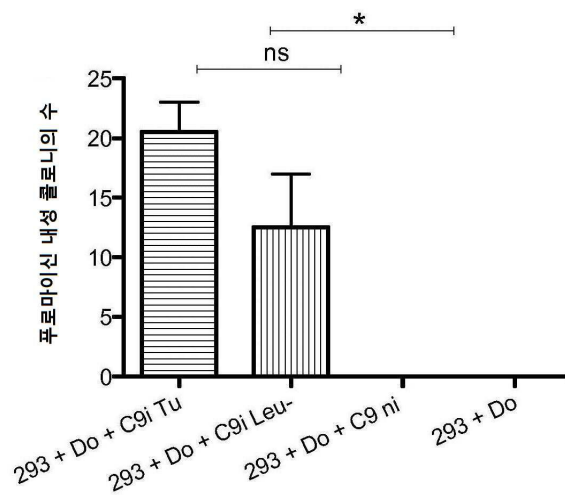
도면5

Leu- 또는 Tu를 사용한 유도 후 293T-C9에서 Cas9 발현의 면역블롯

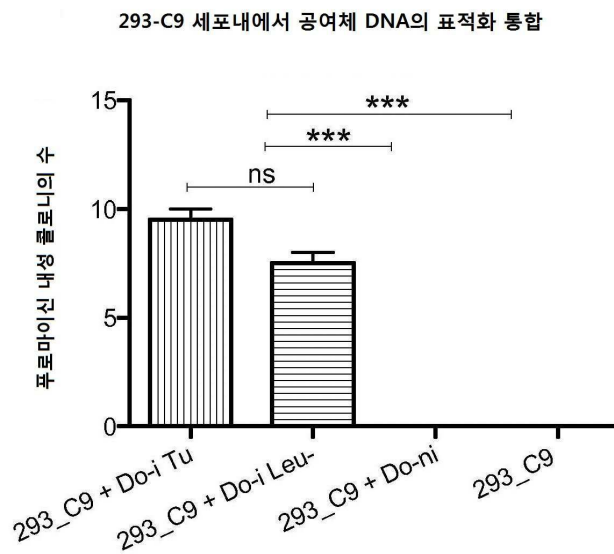


도면6

293T 세포내에서 공여체 DNA의 표적화 통합



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)

ICM (INSTITUT DU CERVEAU ET DE LA MOELLE EPINIERE)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

SORBONNE UNIVERSITE

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES (CEA)

ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS (APHP)

<120> Diet controlled expression of a nucleic acid encoding Cas9 nuclease and uses thereof

<130> IP20183567/FR

<150> EP16172964

<151> 2016-06-03

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AARE sequence from the TRIB3 gene

<400> 1
cggtttgcacacccg 16
<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AARE sequence from the CHOP gene
<400> 2
aacattgcacatccc 16
<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AARE sequence from the ASNS gene
<400> 3
gaagtttcatcatgcc 16
<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AARE sequence from the ATF3 gene
<400> 4
agcgttgcacacccc 16
<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AARE sequence from the SNAT2 gene
<400> 5
gatattgcacagttt 16

<210> 6

<211> 94

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> Thymidine kinase minimal promoter nucleic acid

<400> 6

cgaggtccac ttgcatatt aaggtgacgc gtgtggcctc gaacaccgag cgaccctgca 60

gcgacccgct taacagcgtc aacagcgtgc cgca 94

<210> 7

<211> 215

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2XAARE nucleic acid

<400> 7

gattagtcc ggtttgcac acccgaccg ggggattagc tccggtttgc atcaccgga 60

ccgggggatt agctccggtt tgcacaccc ggaccggggg ccgggcgcgt gctagcgatt 120

agctccggtt tgcacaccc ggaccggggg attagtccg gtttgcac caaccgaccg 180

gggattagct ccggtttgca tcaccggac cgggg 215

<210> 8

<211> 4212

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NLS-FLAG CAS9 nucleic acid

<400> 8

atgggacct aaaaaagag gaagtgctt aaaaaaaga ggaagtgcc taagaaaaag 60

aggaaggtgg cggccgctga ctacaaggat gacgacgata aatctagaga caagaatac 120

tctattggac tggatatcgg gacaaactcc gttggctggg ccgtcataac cgacgagtat 180

aagtgccaa gcaagaaatt caagtgctg ggttaatactg accgccattc aatcaagaag 240

aacctgatcg gagcactcct cttcgactcc ggtgaaaccg ctgaagctac tcggctgaag 300

cggaccgcaa ggccgagata caccgcgcg aagaatcgga tatgttatct gcaagagatc 360
 ttttagcaacg aaatggctaa ggtggacgac tccttctttc accgcctgga agagagcttt 420
 ctggtggagg aggataagaa acacgagagg caccctatat tcggaatat cgtggatgag 480
 gtggcttacc atgaaaagta tcctacaatc taccatctga ggaagaagct ggtggacagc 540
 accgataaag cagacctgag gctcatctat ctggccctgg ctcatatgat aaagtttaga 600
 ggacactttc tgatcgaggg cgacctgaat cccgataatt ccgatgtgga taaactcttc 660
 attcaactgg tgcagacata taaccaactg ttcgaggaga atcccataaa cgcttctggt 720

 gtggatgcca aggctattct gtccgctcgg ctgtccaagt caccgagact ggagaatctg 780
 attgccaac tgcaggaga aaagaagaac ggccctgttg ggaacctcat cgccctgagc 840
 ctgggctga cacctaactt caagtccaat ttgatctgg ccgaagatgc taaactccag 900
 ctctccaagg acacctatga cgatgatctg gacaacctgc tcgcacagat aggcgaccag 960
 tacgccgatc tctttctggc tgctaagaat ctctccgacg ccattctgct gagcgacata 1020
 ctccgggtca aactgagat caccaaagca cctctgagcg cctccatgat aaaacgctat 1080
 gatgaacacc atcaagacct gactctgctc aaagccctcg tgaggcaaca gctgccagag 1140

 aagtacaaag agatattctt cgaccagagc aagaatggat atgccggata catcgatggc 1200
 ggagcatcac aggaagaatt ttacaagttc atcaaacc aa tcctcgagaa gatggacggt 1260
 actgaagagc tgctggtgaa gctgaacagg gaggacctgc tgaggaagca gaggaccttt 1320
 gataatggct ccattccaca tcagatacac ctgggagagc tgcatgcaat cctccgcagg 1380
 caggaggatt tctatccttt cctgaaggat aaccgggaga agatagagaa gatcctgacc 1440
 ttcaggatcc cttattacgt cggccctctg gctagaggca actcccgtt cgcttgatg 1500
 accaggaaat ctgaggagac aattactcct tggaacttcg aagaggtcgt ggataagggc 1560

 gcaagcgccc agtcattcat cgaacggatg accaatttcg ataagaacct gcccaacgag 1620
 aaggtcctgc ccaaacattc actcctgtac gagtatttca ccgtctataa cgagctgact 1680
 aaagtgaagt acgtgaccga gggcatgagg aagcctgcct tcctgtccgg agagcagaag 1740
 aaggctatcg ttgatctgct cttcaagact aatagaaagg tgacagtga gcagctcaag 1800
 gaggattact ttaagaagat cgaatgcttt gactcagtgg aaatctctgg cgtggaggac 1860
 cgctttaatg ccagcctggg cacttaccat gatctgctga agataatcaa agacaaagat 1920
 ttctcgata atgaggagaa cgaggacatc ctggaagata tcgtgctgac cctgactctg 1980

 ttcgaggata gagagatgat cgaagagcgc ctgaagacct atgcccactt gtttgacgat 2040
 aaagtcatga aacagctcaa gcggcggcgc tacactgggt ggggttagact ctccaggaaa 2100
 ctcataaacg gcatccgca caaacagagc ggaaagacca tcctggattt cctgaaatcc 2160

gacggattcg ctaacaggaa ctatcatgcaa ctgattcacg atgactctct gacatttaaa 2220
 gaggacatcc agaaggcaca ggtgagcggg caaggcgaca gcctgcacga gcacatcgcc 2280
 aacctcgctg gatcacccgc cataaagaag ggaatactgc agacagtcaa ggtcgtggac 2340
 gaactcgtca aagtgatggg tcggcacaag ccagagaata tcgttatcga aatggcaagg 2400

 gagaacaaaa ccaccagaa gggccagaag aactctcggg aacggatgaa aagaatcgaa 2460
 gaggaatta aggagctggg atctcagata ctgaaggagc acctgtgga gaatacacag 2520
 ctccagaacg agaaactcta cctgtactac ctccagaacg ggccgggacat gtacgttgac 2580
 caggaactcg acatcaaccg gctgtccgat tatgacgtgg accatattgt tccacagtc 2640
 ttctcaaag atgactccat tgacaacaag gtgctgacca gatccgataa gaatcgcggt 2700
 aagtctgaca atgttccatc agaagagggt gtcaagaaga tgaagaatta ctggcggcag 2760
 ctctcaacg ccaaactgat caccagcgg aagtttgaca atctgactaa ggcagaaaga 2820

 ggaggtctga gcgaactcga caagccggc tttattaaga ggcaactggt cgaaacacgc 2880
 cagattacca aacacgtggc acaaatctc gactctagga tgaacactaa gtacgatgag 2940
 aacgataagc tgatcaggga agtgaaagt ataactctga agagcaagct ggtgtctgac 3000
 ttccggaagg actttcaatt ctacaaagt cgcgaaataa acaattacca tcatgtcac 3060
 gatgcctatc tcaatgtgt cgttggcacc gccctgatca agaaatacc taaactggag 3120
 tctgagttcg tgtacgggta ctataaagtc tacgatgtga ggaagatgat agcaaagtct 3180
 gagcaagaga ttggcaaag caccgccaag tacttcttct actctaatat catgaatttc 3240

 ttttaagactg agataaccct ggctaacggc gaaatccgga agcgccact gatcgaaaca 3300
 aacggagaaa caggagaaat cgtgtgggat aaaggcaggg acttcgcaac tgtgcggaag 3360
 gtgctgtcca tgccacaagt caatatctg aagaagaccg aagtgcagac cggcggattc 3420
 tcaaaggaga gcatcctgcc aaagcggaac tctgacaagc tgatcgccag gaagaaagat 3480
 tgggacccaa agaagtatgg cggtttcgat tccctacag tggtttattc cgttctggtc 3540
 gtggcaaaag tggagaaagg caagtccaag aaactcaagt ctgttaagga gctgctcgga 3600
 attactatta tggagagatc cagcttcgag aagaatccaa tcgatttcct ggaagctaag 3660

 ggctataaag aagtgaagaa agatctcatc atcaaactgc ccaagtactc tctctttgag 3720
 ctggagaatg gtaggaagcg gatgtggcc tccgccggag agctgcagaa aggaaacgag 3780
 ctggctctgc cctccaaata cgtgaacttc ctgtatctgg cctcccacta cgagaaactc 3840
 aaaggtagcc ctgaagacaa tgagcagaag caactctttg ttgagcaaca taaactactc 3900
 ctggacgaaa tcatigaaca gattagcgag ttcagcaagc gggttattct ggccgatgca 3960
 aacctgata aagtgtgag cgcatataat aagcacaggg acaagccaat tcgcgaacaa 4020

gcagagaata ttatccacct ctttactctg actaatctgg gcgctcctgc tgccttcaag 4080

tatttcgata caactattga caggaagcgg tacacctcta ccaaagaagt tctcgatgcc 4140

accctgatac accagtcaat taccggactg tacgagactc gcatcgacct gtctcagctc 4200

ggcggcgact ag 4212

<210> 9

<211> 13650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid of the pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9 plasmid

<400> 9

ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc cggcatcacc ggcgccacag gtgcggttgc 60

tggcgcttat atcgccgaca tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact tcgggctcat 120

gagcgtttgt ttcggcgtgg gtatggtggc aggccccgtg gccgggggac tgttgggcgc 180

catctccttg catgcacat tccttgcggc ggcggtgctc aacggcctca acctactact 240

gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa gggagagcgt cgaatggtgc actctcagta 300

caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg 360

cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 420

ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc 480

tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag 540

gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatattg tttatttttc taaatacatt 600

caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 660

ggaagagtat gattattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 720

gccttctctg ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 780

tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 840

ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgagg 900

tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 960

atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 1020

gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 1080

caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 1140

ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 1200

ccacgatgcc tgiagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta	1260
ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac	1320
ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc	1380
gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag	1440
ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga	1500
taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt	1560
agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata	1620
atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca gaccccgtag	1680
aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa	1740
caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt	1800
ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc	1860
cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa	1920
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa	1980
gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc	2040
ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa	2100
gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa	2160
caggagagcg cagcaggagc ctccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg	2220
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc	2280
tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggcttttgc tggccttttg	2340
ctcacatgtt ctttctgctg ttatccccig attctgtgga taaccgtatt accgcctttg	2400
agttagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg	2460
aagcgaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggcgg attcattaat	2520
gcagctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag	2580
aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc	2640
cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc	2700
cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg	2760
ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca	2820
gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggccttttgc aaaaagcttg gacacaagac	2880
aggcttgcga gatatgtttg agaataccac tttatccccg gtcagggaga ggcagtgctt	2940
aaaaagacgc ggactcatgt gaaatactgg tttttagtgc gccagatctc tataatctcg	3000

cgcaacctat tttccctcg aacacttttt aagccgtaga taaacaggct gggacacttc 3060

acatgagcga aaaatacatc gtcacctggg acatgttgca gatccatgca cgtaaactcg 3120

caagccgact gatgccttct gaacaatgga aaggcattat tgccgtaagc cgtggcggtc 3180

tgtaccgggt gcgttactgg cgcgtgaact gggatattcgt catgtcgata ccgtttgtat 3240

ttccagctac gatcacgaca accagcgcga gcttaaagtg ctgaaacgcg cagaaggcga 3300

tggcgaaggc ttcatcgta ttgatgacct ggtggatacc ggtggtactg cggttcgat 3360

tcgtgaaatg tatccaaaag cgcactttgt caccatcttc gcaaaaccgg ctggtcgacc 3420

gctggttgat gactatgttg ttgatatccc gcaagatacc tggattgaac agccgtggga 3480

tatgggcgtc gtattcgacc cgccaatctc cggtcgctaa tcttttcaac gcctggcact 3540

gccgggcgtt gttcttttta acttcaggcg ggttacaata gtttcagta agtattctgg 3600

aggctgcatc catgacacag gcaaacctga gcgaaaccct gttcaaacc cgttttaaac 3660

atcctgaaac ctgacgcta gtccgccgt ttaatcacgg cgcacaaccg cctgtgcagt 3720

cggcccttga tggtaaaacc atccctcact ggtatcgcat gattaaccgt ctgatgtgga 3780

tctggcgagg cattgaccca cgcgaaatcc tcgacgtcca ggcacgtatt gtgatgagcg 3840

atgccgaacg taccgacgat gatttatacg ataccgtgat tggctaccgt ggcggcaact 3900

ggatttatga gtgggccccg gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa 3960

ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttaagtgtg 4020

taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tgtgtatatt agattccaac ctatggaact 4080

gatgaatggg agcagtgggt gaatgccttt aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa 4140

atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag 4200

aagagaaagg tagaagacc caaggacttt cttcagaat tgctaagttt tttgagtcac 4260

gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctattt acaccacaaa ggaaaaagct 4320

gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac 4380

agttataatc ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgctatt 4440

aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggttaataag 4500

gaatatattga tgtatagtc cttgactaga gatcataatc agccatacca cattttaga 4560

ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa 4620

tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 4680

catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttactgcat tctagtgtg gtttgtccaa 4740

actcatcaat gtatcttata atgtctggat caactggata actcaagcta accaaaaatca	4800
tcccaaactt cccaccccat accctattac cactgccaat tacctagtgg ttctatttac	4860
tctaaacctg tgattcctct gaattatfff catfctaaag aaattgtatt tgttaaatat	4920
gtactacaaa cttagtagtt ggaagggtcia attcactccc aaagaagaca agataatcctt	4980
gatctgtgga tctaccacac acaaggctac ttccctgatt agcagaacta cacaccaggg	5040
ccaggggtca gatataccat gacctttgga tgggtgctaca agctagtacc agttgagcca	5100
gataaggtag aagaggccaa taaaggagag aacaccagct tgttacaccc tgtgagcctg	5160
catgggatgg atgacccgga gagagaagtg ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca	5220
tttcatcacg tggcccgaga gctgcatccg gactacttca agaactgctg atatcgagct	5280
tgctacaagg gactttccgc tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg	5340
gagtggcgag ccctcagatc ctgcatataa gcagctgctt ttgacctgta ctgggtctct	5400
ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa	5460
gcctcaataa agcttgctt gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc	5520
tggtaaactag agatccctca gaccttttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc	5580
ccgaacaggg acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg	5640
cttgctgaag cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtagtac gccaaaaatt	5700
ttgactacg gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg	5760
agaattagat cgcgatggga aaaaattcgg ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa	5820
ttaaaacata tagtatgggc aagcaggag ctagaacgat tcgcagttaa tcttgccctg	5880
ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca	5940
ggatcagaag aacttagatc attatataat acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa	6000
aggatagaga taaaagacac caaggaagct ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa	6060
agtaagacca ccgcacagca agcgcccgct gatcttcaga cctggaggag gagatatgag	6120
ggacaattgg agaagtgaat tatataaata taaagtagta aaaattgaac cattaggagt	6180
agcaccacc aaggcaaaga gaagagtggc gcagagagaa aaaagagcag tgggaatagg	6240
agctttgttc ctgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac	6300
gctgacgcta caggccagac aattattgtc tggatatgtg cagcagcaga acaatttgct	6360
gagggctatt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct	6420
ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tggggatttg	6480
gggttgctct ggaaaaacta ttgaccac tctgtgcct tggaatgcta gttggagtaa	6540
taaatctctg gaacagattt ggaatcacac gacctggatg gattgggaca gagaaattaa	6600

caattacaca agcttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaaccagc aagaaaagaa 6660
tgaacaagaa ttattggaat tagataaatg ggcaagttag tggaattggt ttaacataac 6720
aaattggctg tggatatataa aattattcat aatgatagta ggaggcttgg taggtttaag 6780
aatagttttt gctgtacttt ctatagttaa tagagttagg cagggatatt caccattatc 6840

gtttcagacc cacctcccaa ccccgagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga 6900
aggtggagag agagacagag acagatccat tcgattagtg aacggatctc gacggtatcg 6960
ccgaattcac aaatggcagt attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg 7020
tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta 7080
caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt acaggacag cagagatcca 7140
ctttggctga tacgcggatc tacgcgtcaa gtttgtacaa aaaagcaggc tccgcggccg 7200
cccccttcac cgttaccgat tagctccggt ttgcatcacc cggaccgggg gattagctcc 7260

ggtttgcac acccgaccg ggggattagc tccggtttgc atcacccgga cggggggccg 7320
ggcgcgtgct agcgattagc tccggtttgc atcacccgga cggggggatt agctccggtt 7380
tgcatcacc ggaccggggg attagctccg gtttgcacaa cccggaccgg ggactcgagg 7440
tccacttcgc atattaaggt gacgcgtgtg gcctcgaaca ccgagcgacc ctgcagcgac 7500
ccgcttaaca gcgtcaacag cgtgccgcaa gcttgaattc tgatcagcat tccggtactg 7560
ttggtaaagc caccatggga cctaagaaaa agaggaaggt gcctaagaaa aagaggaagg 7620
tgcctaagaa aaagaggaag gtggcggccg ctgactacaa ggatgacgac gataaatcta 7680

gagacaagaa ataactctatt ggactggata tcgggacaaa ctccgttggc tgggccgtca 7740
taaccgacga gtataaggtg ccaagcaaga aattcaaggt gctgggtaat actgaccgcc 7800
attcaatcaa gaagaacctg atcggagcac tcctcttcga ctccggtgaa accgctgaag 7860
ctactcggct gaagcggacc gcaaggcggg gatacacccg ccgcaagaat cggatatgtt 7920
atctgcaaga gatcttttagc aacgaaatgg ctaaggtgga cgactccttc tttaccgcc 7980
tggaagagag ctttctggtg gaggaggata agaaacacga gaggcaccct atattcgga 8040
atatcgtgga tgaggtggct taccatgaaa agtatcctac aatctacat ctgaggaaga 8100

agctggtgga cagcaccgat aaagcagacc tgaggctcat ctatctggcc ctggctcata 8160
tgataaagtt tagaggacac tttctgatcg agggcgacct gaatcccgat aattccgatg 8220
tgataaaact cticattcaa ctggtgcaga catataacca actgttcgag gagaatccca 8280
taaacgcttc tgggtggtg gccaaaggcta ttctgtccgc tcggtgttcc aagtcacgca 8340
gactggagaa tctgattgcc caactgccag gagaaaagaa gaacggcctg tttgggaacc 8400
tcacgcacct gagcctgggc ctgacacctt acttcaagtc caattttgat ctggccgaag 8460

atgctaaact ccagctctcc aaggacacct atgacgatga tctggacaac ctgctcgac	8520
agataggcga ccagtacgcc gatctctttc tggtgctaa gaatctctcc gacgccattc	8580
tgctgagcga catactccgg gtcaacctg agatcaccaa agcacctctg agcgctcca	8640
tgataaaacg ctatgatgaa caccatcaag acctgactct gctcaaagcc ctggtgaggc	8700
aacagctgcc agagaagtac aaagagatat tcttcgacca gagcaagaat ggatatgccg	8760
gatacatcga tggcggagca tcacaggaag aattttacaa gttcatcaaa ccaatcctcg	8820
agaagatgga cggtactgaa gagctgctgg tgaagctgaa cagggaggac ctgctgagga	8880
agcagaggac ctttgataat ggctccattc cacatcagat acacctggga gagctgcatg	8940
caatcctccg caggcaggag gatttctatc ctttcctgaa ggataaccgg gagaagatag	9000
agaagatcct gaccttcagg atcccttatt acgtcggccc tctggctaga ggcaactccc	9060
gcttcgcttg gatgaccagg aaatctgagg agacaattac tccttggaac ttcgaagagg	9120
tcgtggataa gggcgcaagc gccagtcac tcacgaacg gatgaccaat ttcgataaga	9180
acctgccccaa cgagaaggtc ctgccccaac attcactcct gtacgagtat ttcaccgtct	9240
ataacagact gactaaagtg aagtacgtga ccgaggcat gaggaagcct gccttctgt	9300
ccggagagca gaagaaggct atcgttgatc tgctcttcaa gactaataga aaggtgacag	9360
tgaagcagct caaggaggat tactttaaga agatcgaatg ctttgactca gtggaaatct	9420
ctggcgtgga ggaccgcttt aatgccagcc tgggcactta ccatgatctg ctgaagataa	9480
tcaaagacaa agatttcctc gataatgagg agaacagga catcctggaa gatatcgtgc	9540
tgacctgac tctgttcgag gatagagaga tgatcgaaga gcgcctgaag acctatgccc	9600
atctgtttga cgataaagtc atgaacagc tcaagcggcg gcgctacact ggggtgggta	9660
gactctccag gaaactcata aacggcatcc gcgacaaaca gagcggaaag accatcctgg	9720
atttctgaa atccgacgga ttctctaaca ggaacttcat gcaactgatt cacgatgact	9780
ctctgacatt taaaggaggac atccagaagg cacaggtgag cggtaaggc gacagcctgc	9840
acgagcacat cgccaacctc gctggatcac ccgccataaa gaagggaata ctgcagacag	9900
tcaaggtcgt ggacgaactc gtcaaagtga tgggtcggca caagccagag aatatcgta	9960
tcgaaatggc aaggagagaac caaaccacc agaaggcca gaagaactct cgggaacgga	10020
tgaaaagaat cgaagaggga attaaggagc tgggatctca gatactgaag gagcacctg	10080
tggagaatac acagctccag aacgagaaac tctacctgta ctacctccag aacgggcggg	10140
acatgtacgt tgaccaggaa ctgcacatca accggctgtc cgattatgac gtggaccata	10200

ttgttccaca gtccttcctc aaagatgact ccattgacaa caaggtgctg accagatccg	10260
ataagaatcg cggtaagtct gacaatgttc catcagaaga ggtggtcaag aagatgaaga	10320
attactggcg gcagctcctc aacgccaaac tgatcaccca gcggaagttt gacaatctga	10380
ctaaggcaga aagaggaggt ctgagcgaac tcgacaaggc cggctttatt aagaggcaac	10440
tggtcgaaac acgccagatt accaaacacg tggcacaat cctcgactct aggatgaaca	10500
ctaagtacga tgagaacgat aagctgatca gggaagtga agtgataact ctgaagagca	10560
agctgggtgc tgacttcggg aaggactttc aattctacaa agttcgcgaa ataaacaatt	10620
accatcatgc tcacgatgcc tatctcaatg ctgtcgttgg caccgccctg atcaagaaat	10680
accctaaact ggagtctgag ttctgttacg gtgactataa agtctacgat gtgaggaaga	10740
tgatagcaaa gtctgagcaa gagattggca aagccaccgc caagtacttc ttctactcta	10800
atatcatgaa tttctttaag actgagataa ccttggttaa cggcgaaatc cggaagcgcc	10860
caactgatcg aacaaacgga gaaacaggag aaatcgtgtg ggataaaggc agggacttcg	10920
caactgtcgc gaaggtgctg tccatgccac aagtcaatat cgtgaagaag accgaagtgc	10980
agaccggcgg attctcaaag gagagcatcc tgccaaagcg gaactctgac aagctgatcg	11040
ccaggaagaa agattgggac ccaaagaagt atggcggttt cgattcccct acagtggctt	11100
attccgttct ggtcgtggca aaagtggaga aaggcaagtc caagaaactc aagtctgtta	11160
aggagctgct cggaattact attatggaga gatccagctt cgagaagaat ccaatcgatt	11220
tcctggaagc taagggctat aaagaagtga agaaagatct catcatcaaa ctgcccaagt	11280
actctctctt tgagctggag aatggtagga agcggatgct ggccctcgcc ggagagctgc	11340
agaaaggaaa cgagctggct ctgccctcca aatacgtgaa cttctgtat ctggcctccc	11400
actacgagaa actcaaaggt agccctgaag acaatgagca gaagcaactc tttgttgagc	11460
aacataaaca ctacctggac gaaatcattg aacagattag cgagttcagc aagcgggtta	11520
ttctggccga tgcaaacctc gataaagtgc tgagcgcata taataagcac agggacaagc	11580
caattcgca acaagcagag aatattatcc acctctttac tctgactaat ctgggcgctc	11640
ctgctgcctt caagtatttc gatacaacta ttgacaggaa gcggtacacc tetaccaaag	11700
aagttctcga tgccaccctg atacaccagt caattaccgg actgtacgag actcgcatcg	11760
acctgtctca gctcggcgcc gactagtaaa gcggccgggc tcgagtctag aaagggtggg	11820
cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtg gctcgacggt acctttaaga ccaatgactt	11880
acaaggcagc tgtagatctt agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa	11940
ttcactccca acgaagacaa aatcgtcgag agatgctgca tataagcagc tgctttttgc	12000
ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg	12060

gaaccactg cttaaagctc aataaagcct gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgccccg	12120
tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat	12180
ctctagcagt agtagttcat gtcactttat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg	12240
aatatcagag agtgagaggc cttgacatta taatagattt agcaggaatt gaactaggag	12300
tggagcacac aggcaaagct gcagaagtac ttggaagaag ccaccagaga tactcacgat	12360
tctgcacata cctggctaata cccagatcct aaggattaca ttaagtttac taacatttat	12420
ataatgattt atagttttaa gtataaactt atctaattta ctattctgac agatattaat	12480
taatcctcaa atatacaga agatgattac tattatcccc atttaacaca agaggaaact	12540
gagagggaaa gatgttgaag taattttccc acaattacag catccgttag ttacgactct	12600
atgatcttct gacacaaatt ccatttactc ctcaccctat gactcagtcg aatatatcaa	12660
agttatggac attatgctaa gtaacaaatt acccttttat atagtaaata ctgagtagat	12720
tgagagaaga aattgtttgc aaacctgaat agcttcaaga agaagagaag tgaggataag	12780
aataacagtt gtcatttaac aagttttaac aagtaacttg gttagaaagg gattcaaag	12840
cataaagcaa gggataaatt tttctggcaa caagactata caatataacc ttaaataatga	12900
cttcaataa ttgttggac ttgataaac taattaaata ttattgaaga ttatcaatat	12960
tataaatgta atttactttt aaaaaggga catagaaatg tgtatcatta gagtagaaaa	13020
caatccttat tatcacaatt tgtcaaaaca agtttgttat taacacaagt agaatactgc	13080
attcaattaa gttgactgca gattttgtgt tttgttaaaa ttagaaagag ataacaaca	13140
tttgaattat tgaagtaac atgtaaatag ttctacatac gttcttttga catcttgttc	13200
aatcattgat cgaagtctct tatcttggaa gaatttggtc caaagactct gaaataagga	13260
aaacaatcta ttatatagtc tcacaccttt gttttacttt tagtgatttc aatttaataa	13320
tgtaaatggt taaaatttat tcttctctga gatcatttca cattgcagat agaaaacctg	13380
agactggggt aatttttatt aaaatcta ttaatctcag aaacacatct ttattctaac	13440
atcaattttt ccagtttgat attatcataa aaagtcagcc ttcctcatct gcaggttcca	13500
caacaaaaat ccaaccaact gtggatcaaa aatattggga aaaaattaaa aatagcaata	13560
caacaataaa aaaatacaaa tcagaaaaac agcacagtat aacaacttta tttagcattt	13620
acaatctatt aggtattata agtaatctag	13650
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> guide RNA AASV1
 <400> 10
 ggggcgggcg gtgcgatgtc gt 22
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 5' primer
 <400> 11
 agggccactt ctgctaattg 20
 <210>
 > 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 3' primer
 <400> 12
 gataccgtcg gcgttggtg 19