



등록특허 10-2317622



(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

전체 청구항 수 : 총 15 항

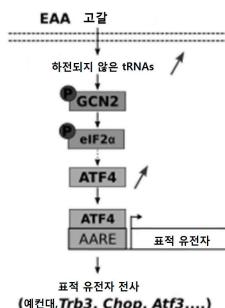
심사관 : 최성호

(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

(뒷면에 계속)

**대 표 도 - 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 계놈에서 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

**상뜨로 나쇼날 드 라 러쉐르쉐 샹띠피크**

프랑스 파리 에프-75016 뤼 미셀 앙즈 3

**쏘흐본느 유니베흘시테**프랑스 75006 파리 뤼 드 르'에꼴르 드 메드сан느  
21**쯤미사리아 아 레네르지 아토미끄 에뜨 옥스 에너  
지스 엘터네이티브즈**프랑스, 파리 75015, 바띠멩 르 포낭트 디, 뤼 레  
블랑크 25**아시스땅스 퍼블리끄-오빠또 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 폴리뉴클레오타이드 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 백터.

#### 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,

제작을 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

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]

표적화 가능한 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 계놈내 요구되는 부위에서 DNA 이중 가닥 파괴를 생성하는 능력은 유전자자리-지시된 계놈 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 계놈 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, 계놈 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). 계놈 편집을 기반으로 한 치료요법의 실행가능성을 평가하는데 있어서, 바람직한 유전적 변화의 치료학적 효과가 우선 명확하게 확립되어야 한다. 후속적으로, 제공된 전략의 성공은 편집된 세포의 적합성, 계놈을 편집하는데 이용된 DNB 복구 경로, 및 계놈 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 계놈 국재화(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 계놈 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, 철린지가 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

### 발명의 요약

- [0017] 본 발명의 하나의 국면은:
- 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 정의한 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 게놈을 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, 게놈을 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

#### 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 α를 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 카페가 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 EcoR1 제한 부위는 하부 패널의 좌측 말단의 EcoR1 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 째, 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 계놈의 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 계놈의 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

[0033]

#### 발명의 상세한 설명

[0034]

본원에 언급된 어떠한 인용도 참고로 포함된다.

[0035]

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.

[0036]

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

[0037]

제WO 2013/068096호가 몇 가지 단백질에 대해 이러한 제어된 발현 시스템을 개시하고, 이러한 개념의 증명이 루시퍼라제 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.

[0038]

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.

[0039]

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.

[0040]

#### · Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산

[0041]

본 발명의 제1 국면은:

[0042]

- 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

[0043]

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

[0044]

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 Csyl으로 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 나에슬룬디이(*Actinomyces naeslundii*), 알카니보락스 디에셀룰레이(*Alcanivorax dieselolei*), 벨리엘라 발티카(*Belliella baltica*), 캄필로박ter 제주니(*Campylobacter jejuni*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리오박테리움 글로머란스(*Coriobacterium glomerans*), 코리네박테리움 울케란스(*Corynebacterium ulcerans*), 데솔포모닐레 티에드제이(*Desulfomonile tiedjei*), 딕케야 다단티이(*Dickeya dadantii*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 락토바실러스 케피라노파시엔스(*Lactobacillus kefirancaciens*), 리스테리아 인노쿠아(*Listeria innocua*), 메틸로박테리움 엑토르쿠엔스(*Methylbacterium extorquens*), 마이크로코쿠스 류테우스(*Micrococcus luteus*), 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 파스퇴렐라 몰토시다(*Pasteurella multocida*), 프레보텔라 인테르메디아(*Prevotella intermedia*), 프로클로로코쿠스 마리누스(*Prochlorococcus marinus*), 피크로플렉수스 토르퀴스(*Psychroflexus torquis*), 스파에로박ter 씨모필루스(*Sphaerobacter thermophilus*), 스핑고박테리움 아종(*Sphingobacterium sp.*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코쿠스 씨모필루스(*Streptococcus thermophilus*) 및 스트렙토마이세스 빙쳉겐시스(*Streptomyces bingchengensis*)를 포함하는 그룹에서 선택된 세균으로부터 기원할 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제는 예전대 메타노콜레우스 보우르겐시스(*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 상보성인 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 기본의, 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,  $\beta$ -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, 랙트 등과 같은 애완동물; 침팬지(chimp), 원숭이 등과 같은 영장류; 소, 돼지, 토끼, 말, 양, 염소, 마우스, 랙트와 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-페페리디닐)-2-옥소프로필]-, 트랜스-( $\pm$ )-에 상응하는 어떠한 다른 명칭 하에 모사(mimicking)되거나, 예를 들면, 할로쿠르, 스테노를, 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

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.

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

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.

특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

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

#### [0102] · 전달 입자(Delivery particle)

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

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.

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.

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

일부 구현예에서, 중합체 기반 입자는 단백질; 웨타이드; 다당류, 특히 키토산을 포함할 수 있다.

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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, 목적한 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 중재된 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 극복시키는 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  $1 \times 10^5$  내지

약  $1 \times 10^{15}$  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  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^{15}$  개의 카피는 투여량 단위당  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ ,  $9 \times 10^{14}$  개의 카피를 포함한다.

#### · 표적 세포(Target cell) 및 숙주 세포(Host cell)

[0135] 추가의 국면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 또는 핵산 벡터의 제어된 발현을 위한 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0136] 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포 중에서 선택될 수 있다.

[0137] 본 발명의 영역 내에서, "원핵 세포"는 세균 세포 및 고세균 세포를 포함한다.

[0138] 일부 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 진핵 세포이다.

[0139] 본 발명의 영역 내에서, "진핵 세포"는 효모, 조류 세포, 식물 세포, 동물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포 및 보다 바람직하게는 사람 세포를 포함한다.

[0140] 일부 바람직한 구현예에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 바람직하게는 사람 세포이다.

[0141] 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.

[0142] 일부 특수한 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 줄기 세포, 선조 세포, 배반 세포 또는 배아 세포가 아니다.

[0143] 일부 구현예에서, 표적 세포 및/또는 숙주 세포는 근육 조직, 신경 조직, 연결 조직, 및 상피 조직을 포함하는 그룹에서 선택된 조직에 속할 수 있다.

[0144] 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.

#### · 용도

[0145] 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.

[0146] 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.

[0147] 여전히 다른 국면에서, 본 발명은 계놈을 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.

[0148] 본 발명의 다른 국면은 계놈을 적어도 한의 표적 세포에 편집하기 위한 활성제로서, 본원에 정의된 바와 같은, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 제어된 발현을 위한 핵산의 용도에 관한 것이다.

[0149] 특정 구현예에서, 계놈의 편집은 생체내, 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*)에서 수행될 수 있다.

- [0152] 일부 구현예에서, 계놈의 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 MTTP; CNGB3; SLC39A4; TRMU; ACOX1; ADA; ABCD1; SAMHD1; MAN2B1; HBA; ATRX; COL4A3; COL4A4; COL4A5; ALMS1; SLC12A6; ASL; CYP19A1; SLC35A3; ASNS; AGA; TPPA; 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; RTEL1; COL7A1; ADAMTS2; EVC; EMD; NR2E3; ETHE1; GLA; F9; F11; IKBKAP; 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; HYLS1; SLC25A15; EDA; ALPL; GNE; MED17; IVD; TMEM216; RGPRIP1L; LAMA3; LAMB3; LAMC2; GALC; TGM1; CEP290; RDH12; RPE65; LCA5; CRB1; LRPPRC; GLE1; EIF2B5; CAPN3; DYSF; SGCG; SGCA; SGCB; FKRP; DLD; STAR; LPL; HADHA; SLC7A7; BCKDHA; BCKDHB; MKS1; ACADM; MLC1; ATP7A; ARSA; MCC1; MCC2; 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 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.
- [0156] 일부 구현예에서, 질환은 유전적 장애, 감염성 질환 및 암을 포함하는 그룹에서 선택된다.
- [0157] 일부 구현예에서, 질환은 유전적 장애이다.
- [0158] 특정 구현예에서, 유전자 장애는 무베타지질단백질증; 색맹; 장성말단피부염; 급성 소아 간 부전; 아실-CoA 옥시다제 I 결핍증; 아데노신 테아미나제 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 신테타제 결핍증; 아스파르탈글루코사민뇨; 분리된 비타민 E 결핍증을 지닌 운동실조; 모세혈관화장성 운동실조(Ataxia-Telangiectasia); 차를보익스-사그네의 상엽색체 열성 뇌성마비(Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay); 바드데-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 테하이드로게나제 제II형 결핍증; 베타-케토티올라제 결핍증; 양측 전두두정 다소뇌화증(Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria); 바이오티니다제 결핍증(Biotinidase Deficiency); 블룸 증후군(Bloom Syndrome); 카나반 병(Canavan Disease); 카르바모일포스페이트 신테타제 I 결핍증; 카르니틴 팔미토일트랜스페라제 IA 결핍증; 카르니틴 팔미토일트랜스페라제 II 결핍증; 카펜터 증후군(Carpenter Syndrome); 연골털형성 저하증(Cartilage-Hair Hypoplasia); 대뇌크레이틴 결핍증 증후군(Cerebral Creatine Deficiency Syndrome) 1; 대뇌 크레이틴 결핍증 증후군 2; 뇌건황색종증(Cerebrotendinous Xanthomatosis); 샤르코마리투드병(Charcot-Marie-Tooth Disease), 제4D형; 샤르코마리투드병, 제5형/아츠 증후군(Art's syndrome); 샤르코마리투드병, X-연결됨; 유극적혈구성무도병(Choreoacanthocytosis); 맥락막결손; 만성 육아종병; 만성 육자종증(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; 듀肯씨근이영양증(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-반크레벨드 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; 갈락토오즈혈증; 고쉐병(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; 혈색소증, 제2A형; 혈색소증, 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 효모시스틴요증; 효모시스틴요증, 제cb1E형; 하이드로레살러스 증후군(Hydrocephalus Syndrome); 고오르니틴혈증-항암모니아혈증-호모시트롤린우리아 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); 충판비늘증(Lamellar Ichthyosis), 제1형; 레베르 선천성 흑암사(Leber Congenital Amaurosis) 10 및 다른 CEP290-관련 융모질환(Ciliopathies); 레베르 선천성 흑암사 13; 레베르 선천성 흑암사 2/망막 색소변성증 20; 레베르 선천성 흑암사 5; 레베르 선천성 흑암사 8/망막 색소변성증 12/피그먼티드 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; 라이신뇨 단백질 못견딤증(Lysinuric Protein Intolerance); 단풍당뇨증(Maple Syrup Urine Disease), 제1a형; 단풍당뇨증, 제1b형; 메켈 증후군 1/바르데-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrome) 13; 중쇄 아실-CoA 데하이드로게나제 결핍증; 피질하부 낭종을 지닌 메갈렌세팔릭 류코엔세팔로파티(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(Mucolipidosis) II/IIIA; 뮤코리피드증 III 감마; 뮤코리피드증 IV; 점액다당류, 제I형; 점액다당류, 제II형; 점액다당류, 제IIIB형; 점액다당류, 제IIIC형; 점액다당류, 제IID형; 점액다당류, 제IVb형/GM1 강글리오시드증(Gangliosidosis); 점액다당류, 제IX형; 점액다당류, 제VI형; 다종 설플라제 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 엔세팔로파티(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(Neuronal 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-Onychodermal Dysplasia)/슈프-슐츠-페서저 증후군(Schopf-Schulz-Passarge Syndrome); 오멘 증후군(Omenn Syndrome); 오멘 증후군/중증 합병성 면역결핍장애(Severe Combined Immunodeficiency), 아타바스칸-형(Athabaskan-Type); 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 결핍증; 오르니틴 트랜스카보밀라제 결핍증; 골화석증 1; 펜드리드 증후군(Pendred Syndrome); 폐닐알라닌 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; 프로피온산 혈증(Propionic Acidemia); 프로피온산 혈증; 피크노디소토시드(Pycnodyostosis); 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); 쉼케 임무노오세우스 이형성(Schimke Immunoosseous Dysplasia); 세가와 증후군(Segawa Syndrome); 소그伦-라손 증후군(Sjogren-Larsson Syndrome); 스미스-лем리-오피츠 증후군(Smith-Lemli-Opitz Syndrome); 척수성 근위축(Spinal Muscular Atrophy); 척추 연골 이형성증(Spondylothoracic Dysostosis); 스틸 증후군(Steel Syndrome); 스티류-아이드만 증후군(Stuve-Wiedemann Syndrome); 설페이트 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); 월만병(Wolman Disease)/콜레스테릴 에스테르 저장 질환(Cholestryol 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-제한적 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)); 캠피로박테리아증(Campylobacteriosis); 카바페넴 내성 장내세균(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae) 감염(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE); 무른 콤비; 치쿤구니아(Chikungunya) 감염; 클라미디아(Chlamydia) 감염; 시가테라(Ciguatera); 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*) 감염; 클로스트리디움 퍼프링겐스(*Clostridium perfringens*) 감염(엡실론 독소); 콕시디오이데스 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. 콜라 이(*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 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 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); 렙토스파리병(Leptospirosis); 리스테리아병(Listeriosis); 라임병(Lyme Disease); 림포그라눌로마 베네래움(*Lymphogranuloma venereum*) 감염(LVG); 말라리아; 홍역; 바이러스 수막염; 수막구균성 질환(Meningococcal disease); 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus: MERS-CoV); 불거리; 노로바이러스; 마비성폐류중독(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); 푸스톨라 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; 살모넬로시스 가스트로엔테리티스(*Salmonellosis gastroenteritis*) 감염; 옴 만연(Scabies infestation); 스콤브로이드(Scombroïd); 중증급성호흡기증후군(Severe acute respiratory syndrome: SARS); 시겔로시스 가스트로엔테리티스(*Shigellosis gastroenteritis*) 감염; 천연두; 메티실린-내성 스타필로코콜 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(Yersinia 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 얹메이려는 의도없이, 본 발명자들은 당해 분야의 기술자가 재생 의약을 수행하는 경우 이것이 특히 관심있음을 고려하고 있다.

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

#### · 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 계놈을 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 극복하는 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)을 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:
- 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 게놈성 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 젠타미신 및 토프라마이신; 테트라사이클린, 특히 테트라사이클린 및 독시사이클린; 마크롤라이드, 특히 에리쓰로마이신 및 클라리쓰로마이신; 퀴놀론, 특히 시프로플록사신 및 레보플록사신; 및 셀폰아미드, 특히 셀파메티졸 및 셀파메톡사졸을 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, 탁산, 모노클로날 항체, 사이토kin, 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 $\alpha$ -ATF4 시그널링 경로를 나타낸다. EAA 고갈에 대한 반응시, 활성화된 GCN2는 eIF2 $\alpha$ 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 카페(검정색 점)의 조절 하에서 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 삭제하기 위한 전체적인 전략을 나타낸다.
- [0205] CAS9 활성에 촛점을 맞추기 위해, GFP 전이유전자의 단일 카페를 지닌 HEK 293T 세포로부터 기원한 세포 모델을 사용한다(293T<sup>GFP</sup> 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<sup>GFP</sup>)를 발현한다.
- [0209] 렌티바이러스 벡터 둘 다를 pTRIP 렌티바이러스 골격내에 삭제하였다(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<sup>GFP</sup> 세포가 CAS9 및 gRNA<sup>GFP</sup> 둘 다를 발현하는 경우, 이들 세포내에서 GFP의 발현은 감소하므로, 유동 세포분석법에 의해 측정된 GFP 양성 세포의 퍼센트는 GFP 발현을 녹 아웃하기 위한 CAS9 효능에 초점을 맞추는 정밀한 수단이다.
- [0215] 따라서, 아미노산 고갈없이, FLAG-CAS9 형질도입된 293T<sup>GFP</sup> 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 웨بت아이드에 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 상충액을 수거하고, 농축을 위해 초-원심분리하며, 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 벡터 스톡(vector stock)을 실시간 정량적 PCR로 측정하여 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-α 없는 배지) 또는 투니카마이신(Sigma-Aldrich®)에 의해 조절될 수 있는지를 평가하기 위하여, 293T 세포를 세포당 100개의 vRNAs로 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  $\mu$ 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 모니터하였다.
- [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 두번재 항-마우스 항체로 검출하였다. 페옥시다제 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 째에) 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 표적화될 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-targetting-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 효과적이자 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 부위를 함유하는 공여체 플라스미드로 형질감염(Ca<sup>2+</sup> 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, 재조합 세포는 GFP를 발현하며 푸로마이신에 대해 내성이 되어 이들의 선택을 허용하고 통합 사건에 상응하는 클론을 계수한다.

[0236] 도 6에 나타낸 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 유도와 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(flagged) -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, 이를 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, 이 중 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] \*\*\*

#### 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] cggttgcacccg

[0251] CHOP 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 2  
aacattgcaccc

[0253] ASNS 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 3  
gaagttcatcatgcc

[0255] ATF3 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 4  
agcggtgcaccc

[0257] SNAT2 유전자로부터 AARE 서열: 서열 번호: 5  
gatattgcatttt

[0259] 티미딘 키나제 최소 프로모터 핵산: 서열 번호: 6  
cgaggccacttcgcattaaaggtaacgcgtggcctgaaacaccgagcgaccctgcagcgaccgcgttaacagcgtcaacagcgtgccgca

[0261] 2XAARE 핵산: 서열 번호: 7  
gatttagctccggtttgcattccccggaccggggattagctccggtttgcattccccggaccggggattagctccggtttgcattccccggaccggggattagctccggtttgcattccccggaccggggattagctccggtttgcattcacccggaccggggcc

[0263] NLS-FLAG CAS9 핵산: 서열 번호: 8  
atggacctaagaaaaagagggagggtgcctaagaaaaagagggagggtgcctaagaaaaagagggagggtggcgccgctgactacaaggatgacgacgataaa  
tctagagacaagaaaactctatggactggatatcgggacaaactcggtggctggccgtataaccgacgagtataagggtccaagcaagaattcaag  
gtgctggtaatactgaccgcattcaatcaagaagaacctgtatcgagcactcttcgactccggtaaaaccgcgtaaagctactcggtgaagcggacc  
gcaaggcggagataccccggcaagaatcgatgttatctgcaagagatcttagcaacgaaatggctaaagggtggacgactccctttcacccgcctg  
gaagagagcttctgtggaggaggataagaaacacgagggccacctatattcgaaatatcggtgatgaggtggcttaccatgaaatcttacaatc  
taccatctgaggaagaagctgttgacagcaccgataaaacgacgacttgcggcttatctatctggccctggctcatatgataaaatctttagggacacttctg  
atcgaggggcaccgtaatccgataattccgatgtggataactcttcatcaactggcgcacatataaccaacttgtcgaggagaatcccataaacgct  
tctgtgtggatgccaaggctattctgtccgtcggtgtccatcgacgactggagaatctgttgcacatgttgcaggagaaagaacggcctg  
tttgggacactcatcgccctgagccgtggccgtacaccaacttcaagtccatattgtatcggtggccgaaatgtctaaactccagctcccaaggacacctat  
gacgatgtctggacaacctgtcgacagataggcgaccgtacgacgtctttctggctgctaagaatcttcgcacgcattctgtgagcgacata  
ctccggtaacactgagatcaccaagcaccctgtggccctcatgataaaacgctatgtgaacaccaataagacactgactctgtcaaaaggccctgt  
aggcaacagctccagagaagtaaaagagatattcttcgaccagacgaaatggatgtccggatacatcgatggggagcatcacaggaagaatttac  
aagtctcatcaaaccatctcgagaagatggacggtactgaagactgtgtgaagctgaacaggaggactgtgaggaagcagaggacttataat  
ggccatccacatcgatcacccctggagagctgcattgcacatctccgcaggcaggaggattctatcttcctgtgaggataaccggagaagatag  
aagatcttgacattcaggatccattacgtcgccctctggcttagggcaactccgcgtcggtggatgaccaggaaatctgaggagacaattactc  
tggacttcgaagaggctgtggataaggcgcaagcgccactcatcgatcgacgatgaccaatttcgataagaacctgccaacgagaaggctctgccc  
aaacattactcctgtacgacttccacggttataacgagctgactaaagtgaagtcgtgaccggcatgaggaaactgcgtggccgatc  
cagaagaaggctatcggtatctgttcaagactataaaaggtaacgtgaagcgtcaaggaggattacttataaagatcgatgtttactca  
gtggaaatctctggctggaggaccgtttaatgccagctggcacttaccatgtctgtgaagataatcaaagacaagatctctcgataatgaggag  
aacgaggacatcttggaaatctgtgtggccacttaccatgtctgtggatgaggagatcgatcgacgatccggatcgccatctgttgcgt  
aaagtcatgaaacagctcaagcgccgcgtacactgggtgggttagactctccaggaaactcataaacggcatccgcacaaacagagcggaaagaccatc  
ctggattccgtaaatccgacggattcgcaacaggaacttcatgcacgttacgttgcgtggatcaccgcataaaagaaggaaactgcacgacttgc  
agcgttcaaggcgacacgcctgcacgacatcgcaacactcggtggatcaccgcataaaagaaggaaactgcacgacttgcacgttgc  
gtcaagtgtggatggcacaaggcagagaatctgttgcggatcgacatcaaccggctgtccgatttgcgtggaccatattgttccacagtcttct  
gactccattgacaacaagggtgtgaccagatccgataagaatcgccgtaaatgcgttgcacatgcgtggaccatattgttccacagtcttct  
gactccattgacaacaagggtgtgaccagatccgataagaatcgccgtaaatgcgttgcacatgcgtggaccatattgttccacagtcttct  
aaggcaactgtcgaaacacgcccagattaccaaacacgtggcacaatccctcgacttgcacttgcacatgcgtggaccatattgttccacagt  
aaggcaactgtcgaaacacgcccagattaccaaacacgtggcacaatccctcgacttgcacttgcacatgcgtggaccatattgttccacagt

gaagtgaaagtataactctgaagagcaagctggtgtctgacttccggaggacttcaattctacaaagtctcgcaaaataaacaatttaccatcatgtctcactgcctatctcaatgctgtcggtggcaccgcctgatcaagaataccctaaactggagtctgagttcggtacggtgactataaagtctacgtgtgaggaaatgatagcaaagtctgagcaagagatggcaagccaccgccaagtaacttcttactctaataatcatgaatttttaagactgagataaccctggttccatgccacaagtcaatcgtgaagaagaccgaagtgcagaccggcgattctcaaaggagacatctgccaagcggactctgacaagctgatcgccaggaagaaagattgggacccaaagaagatggcggttcgatccctacagtggatttccgttctggcgtggcaaaagtggagaaaggcaagtccaaactcaagtctgttaaggagctgtcgaaattactattatggagagatccagctcgagaagaatccaatcgattcttggaaagctaaaggctataaagaaatgtgaagaaagatctcatcatcaaactgccaagtaactctctttagctggagaatggtaggaagcggatgtggcctccggagagctgcagaaaggaaacgagctggctctgcctccaaatagtgaaacttctgtatctggctccactacgagaaactcaaaggtagccctgaagacaatgagcagaagcaacttttgtttagcaacataaacactacctggacgaaatcattgaacagattagcgaggctcagcaagcgggttattctggccatgcaaacctcgataaaagtctgcgtcgccatataaagcacaggacaagccattcgcaacaagcagagaaatattccacctttactctgactaatctggcgtctgtgcctcaagtatccatgacagacttgcacccgtacacccttaccaaagaagtctcgatgccacccgtataaccaggtaattaccggactgtacgagactcgcacgtcgatcgccggcgacttag

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



## 안내 RNA AASV1: 서열 번호: 10

ggggcgggcggtgcgatgtcgt\_

[0269] 5' 프라이머: 서열 번호: 11

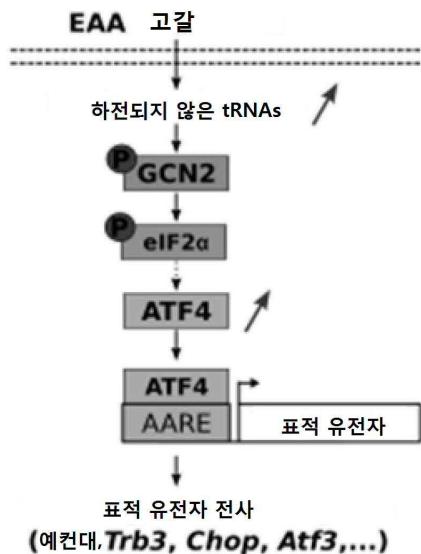
[0270] agggccacttctgctaattgg

[0271] 3' 프라이머: 서열 번호: 12

[0272] gataccgtcgccgttggtg

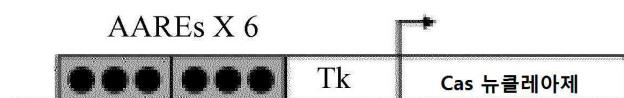
## 도면

### 도면1

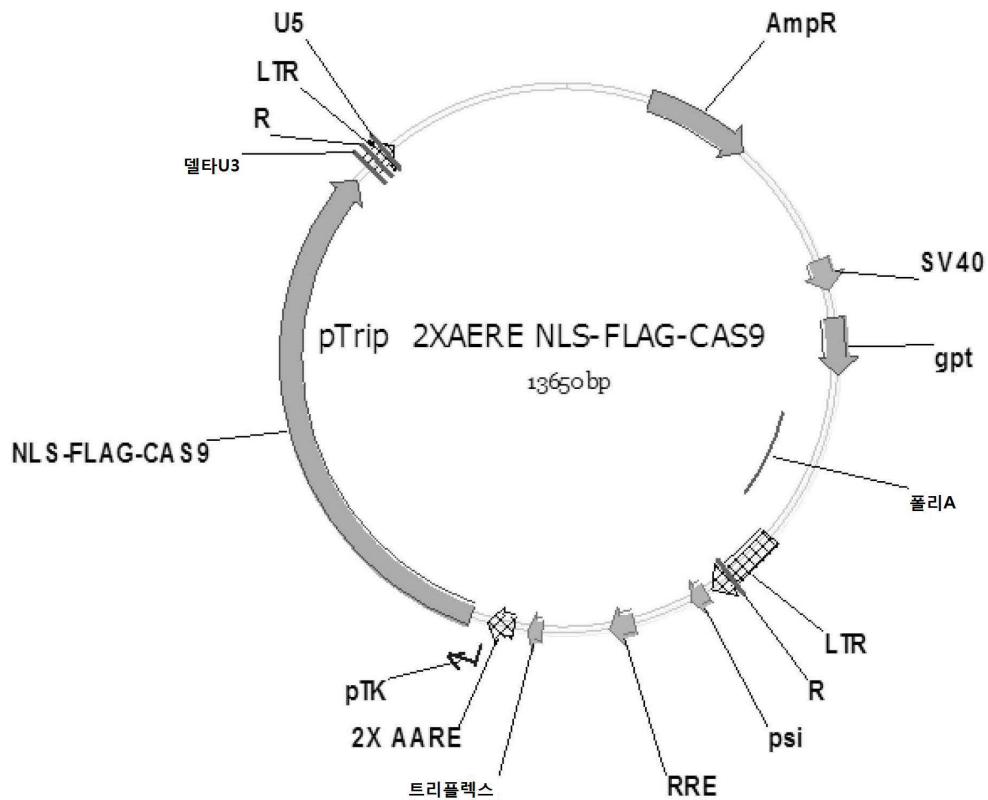


### 도면2

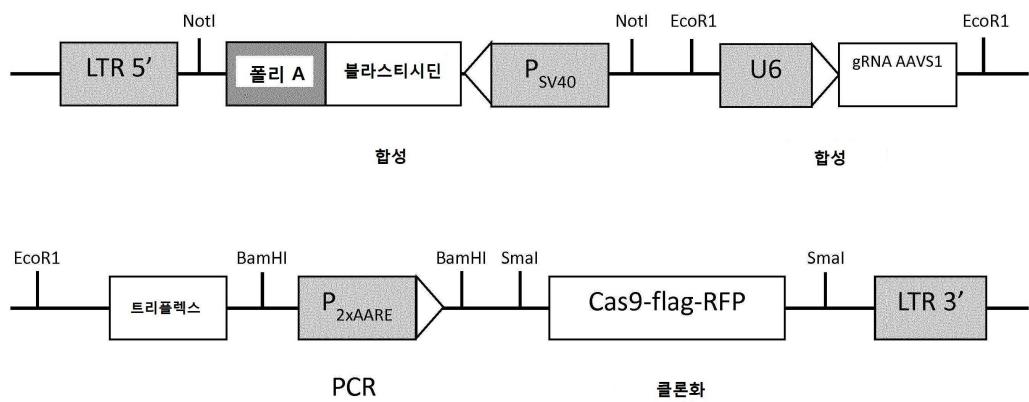
Cas 뉴클레아제의 AARE 구동된 발현



## 도면3

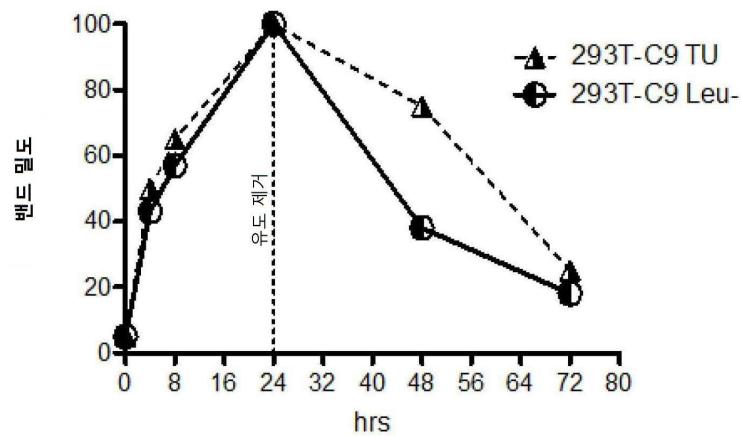


## 도면4



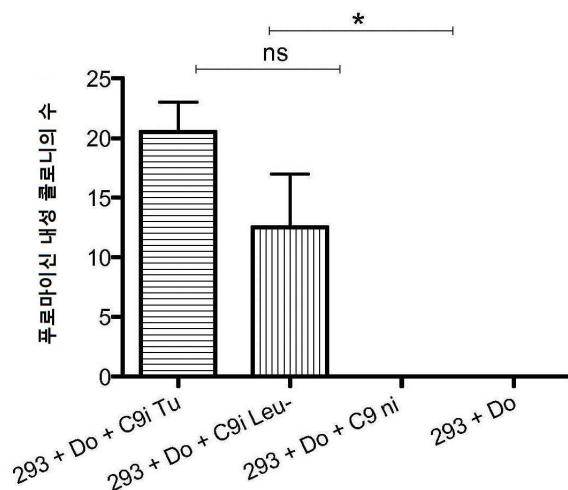
### 도면5

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



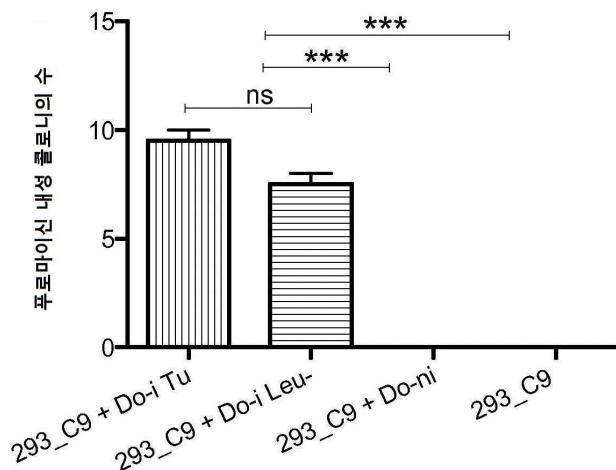
### 도면6

293T 세포내에서 공여체 DNA의 표적화 통합



## 도면7

293-C9 세포내에서 공여체 DNA의 표적화 통합



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 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)

&lt;120&gt; Diet controlled expression of a nucleic acid encoding Cas9 nuclease and uses thereof

&lt;130&gt; IP20183567/FR

&lt;150&gt; EP16172964

&lt;151&gt; 2016-06-03

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; KopatentIn 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; AARE sequence from the TRIB3 gene

<400> 1	
cggttgcac cacccg	16
<210> 2	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> AARE sequence from the CHOP gene	
<400> 2	
aacatttgcac catccc	16
<210> 3	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> AARE sequence from the ASNS gene	
 <400> 3	
gaagtttgcac catgcc	16
<210> 4	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> AARE sequence from the ATF3 gene	
<400> 4	
agcgttgcac cacccc	16
<210> 5	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> AARE sequence from the SNAT2 gene	
<400> 5	
gatatttgcac cagttt	16

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 94

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;

Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thymidine kinase minimal promoter nucleic acid

&lt;400&gt; 6

cgagggtccac ttgcatatt aaggtgacgc gtgtggctc gaacaccgag cgaccctgca	60
gcgacccgct taacagcgta aacagcgta cgca	94

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 215

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 2XAARE nucleic acid

&lt;400&gt; 7

gattagctcc gtttgcatc acccgaccc ggggatttgc tccgggttgc atcacccgaa	60
ccgggggatt agtccggtt tgcatcaccc ggaccggggg ccgggcgcgt gctagcgatt	120
agctccggtt tgcatcaccc ggaccggggg attagctcg gtttgcata cccggaccgg	180

gggatttagct ccggtttgcata caccggac cgggg	215
---	-----

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 4212

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NLS-FLAG CAS9 nucleic acid

&lt;400&gt; 8

atgggaccta agaaaaagag gaaggtgcct aagaaaaaga ggaaggtgcc taagaaaaag	60
aggaagggtgg cggccgctga ctacaaggat gacgacgata aatctagaga caagaaatac	120
tctattggac tggatatcgac gacaaactcc gttggctggg ccgtcataaac cgacgagtat	180
aagggtccaa gcaagaaatt caaggtgctg ggtataactg accgcccattc aatcaagaag	240
aacctgtatcg gggactctt cttcgactcc ggtgaaaccg ctgaagctac tcggctgaag	300

cggaccgcaa ggcggagata cacccgccgc aagaatcgga tatgttatct gcaagagatc	360
tttagcaacg aaatggctaa ggtggacgac tccttcttc accgcctgga agagagctt	420
ctggtgagg aggataagaa acacgagagg caccctatat tcgaaatat cgtggatgag	480
gtggcttacc atgaaaagta tcctacaatc taccatctga ggaagaagct ggtggacagc	540
accgataaag cagacctgag gtcatactat ctggccctgg ctcatatgtaa aagttttaga	600
ggacacttgc tgatcgaggg cgacactgaat cccgataatt ccgatgtgga taaacttttc	660
attcaactgg tgcagacata taaccaactg ttcgaggaga atcccataaa cgcttctggt	720
gtggatgcca aggctattct gtccgctcg ctgtccaagt cacgcagact ggagaatctg	780
attgccccac tgccaggaga aagaagaac ggcctgttg ggaacctcat cgccctgagc	840
ctggcctga cacctaactt caagtccaat ttgatctgg ccgaagatgc taaactccag	900
ctctccaagg acacctatga cgatgatctg gacaacctgc tcgcacagat aggccaccag	960
tacggcgate tcttctggc tgctaagaat ctctccgacg ccattctgct gagcgacata	1020
ctccgggtca acactgagat caccaagca cctctgagcg cctccatgtat aaaacgctat	1080
gatgaacacc atcaagacact gactctgctc aaagccctcg tgaggcaaca gctgccagag	1140
aagtacaaag agatattctt cgaccagagc aagaatggat atgccgata catcgatggc	1200
ggagcatcac aggaagaatt ttacaagttc atcaaaccat tcctcgagaa gatggacggt	1260
actgaagagc tgctggtaa gctgaacagg gaggacctgc tgaggaagca gaggacctt	1320
gataatggct ccattccaca tcaagatacac ctggagagc tgcatgcaat cctccgcagg	1380
caggaggatt tctatcctt cctgaaggat aaccggaga agatagagaa gatccctgacc	1440
ttcaggatcc ttattacgt cggccctcg gctagaggca actcccgctt cgcttgatg	1500
accagggaaat ctgaggagac aattactctt tggaacttcg aagaggtcgt ggataaggc	1560
gcaagcgccc agtcattcat cgaacggatg accaatttcg ataagaacct gcccaacgag	1620
aaggctctgc ccaaaccatc actcctgtac gagtatttca cggctataa cgagctgact	1680
aaagtgaagt acgtgaccga gggcatgagg aagcctgcct tcctgtccgg agaggcagaag	1740
aaggctatcg ttgatctgct cttcaagact aatagaagg tgacagtgaa gcagctcaag	1800
gaggattact ttaagaagat cgaatgctt gactcagttt aaatctctgg cgtggaggac	1860
cgctttaatg ccagcctggg cacttaccat gatctgctga agataatcaa agacaaagat	1920
ttcctcgata atgaggagaa cgaggacatc ctggaagata tcgtgctgac cctgactctg	1980
ttcgaggata gagagatgat cgaagagcgc ctgaagacact atgcccattt gtttgacgat	2040
aaagtcatga aacagctcaa gggcgccgc tacactgggt ggggtagact ctccaggaaa	2100
ctcataaacg gcatccgcga caaacagagc ggaaagacca tcctggattt cctgaaatcc	2160

gacggattcg ctaacaggaa cttcatgeaa ctgattcagc atgactctct gacat taaa	2220
gaggacatcc agaaggcaca ggtgagcggt caaggcaca gcctgcacga gcacatcgcc	2280
aacctcgctg gatcacccgc cataaagaag ggaatactgc agacagtcaa ggtcgtggac	2340
gaactcgta aagtgtatgg tcggcacaag ccagagaata tcgttatcga aatggcaagg	2400
gagaaccaaa ccacccagaa gggccagaag aactctcggg aacggatgaa aagaatcgaa	2460
gagggatta aggagctggg atctcagata ctgaaggagc accctgtgga gaatacacag	2520
ctccagaacg agaaactcta cctgtactac ctccagaacg ggcgggacat gtacgttgac	2580
caggaactcg acatcaaccg gctgtccgat tatgacgtgg accatattgt tccacagtcc	2640
ttccctcaaag atgactccat tgacaacaag gtgctgacca gatccgataa gaatcgcggt	2700
aagtctgaca atgttccatc agaagaggtg gtcaagaaga tgaagaatta ctggcggcag	2760
ctcctcaacg ccaaactgat cacccagcgg aagtttgaca atctgactaa ggcagaaaga	2820
ggaggtctga gcgaactcga caaggccggc ttatataaga ggcaactggc cgaaacacgc	2880
cagattacca aacacgtggc acaaatcctc gactcttaga tgaacactaa gtacgatgag	2940
aacgataaagc tgatcaggga agtggaaatgt ataactctga agagcaagct ggtgtctgac	3000
ttccggaagg actttcaatt ctacaaagt cgcgaaataa acaattacca tcatgctcac	3060
gatgcctatc tcaatgctgt cggtggcacc gccctgatca agaaataaccc taaactggag	3120
tctgagttcg tgtacggtga ctataaagt c tacgatgtga ggaagatgat agcaaagtct	3180
gagcaagaga ttggcaaagc caccgccaag tacttcttct actctaataat catgaatttc	3240
tttaagactg agataaccct ggctaacggc gaaatccgga agcgccact gatcgaaaca	3300
aacggagaaa caggagaaat cgtgtggat aaaggcaggg acttcgcaac tgtcggaaag	3360
gtgctgtcca tgccacaagt caatatcgta aagaagaccg aagtgcagac cggcggattc	3420
tcaaaggaga gcatcctgcc aaagcggAAC tctgacaagc tgatcgccag gaagaaagat	3480
tgggacccaa agaagtatgg cggtttcgat tcccctacag tggcttattc cggtctggc	3540
gtggcaaaag tggagaaagg caagtccaaAG aaactcaagt ctgttaagga gctgctcgaa	3600
attactatta tggagagatc cagcttcgag aagaatccaa tcgatttcct ggaagctaag	3660
ggctataaaAG aagtgaagaa agatctcatc atcaaactgc ccaagtactc tctttttag	3720
ctggagaatg gtaggaagcg gatgctggcc tccggcggag agctgcagaa aggaaacgag	3780
ctggctctgc cttccaaata cgtgaacttc ctgtatctgg cttccacta cgagaaactc	3840
aaaggttagcc ctgaagacaa tgagcagaag caacttttg ttgagcaaca taaacactac	3900
ctggacgaaa tcattgaaca gattagcgag ttcaagcaagc gggattttct ggccgatcga	3960
aacctcgata aagtgtatgg cgcatataat aagcacaggg acaagccaaat tcgcaacaa	4020

gcagagaata ttatccacct cttaactctg actaatctgg gcgctcctgc tgccttcaag	4080
tatttcgata caactattga caggaagcgg tacacctcta ccaaagaagt tctcgatgcc	4140
accctgatac accagtcaat taccggactg tacgagactc gcatcgaccc gtctcagctc	4200
ggcggcgaact 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 tacgccccac gcatcggtgc cggcatcacc ggcgccacag gtgcgggtgc	60
tggcgcttat atcgccgaca tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact tcgggctcat	120
gagcgcttgt ttccggcgtgg gtatgggtgc aggccccgtg gcccggggac tgttgggcgc	180
catctccttg catgcaccat tccttgcggc ggcggtgctc aacggcctca acctactact	240
gggcgtgttc ctaatgcagg agtgcgcataa gggagagcgt cgaatggtgc actctcgata	300
caatctgctc ttagtgcgcata tagttaagcc agcccccaca cccgccaaca cccgctgacg	360
cgcctcgacg ggcttgcgtc ctcccgcat ccgcattacag acaagctgtg accgtctccg	420
ggagctgcgtat gtgtcagagg ttttccacgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaaggccc	480
tcgtgatacg cctatTTTA taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag	540
gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatTTTC taaatacatt	600
caaataatgtt tccgctcatg agacaataac cctgataaaat gctcaataa tattgaaaaa	660
ggaagagatgat gagtattcaa catttccgtg tcgccttat tccctttttt gggcatttt	720
gccttcctgt ttttgcaccc ccagaaacgc tggtaaaatgaaaatgct gaagatcgt	780
tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagat	840
ttcgccccga agaacgtttt ccaatgtga gcactttaa agttctgcta tgtggcgcgg	900
tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga	960
atgacttggt ttagtactca ccagtccacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa	1020
gagaattatg cagtgcgtcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga	1080
caacgatcg aggaccgaaag gagctaacccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa	1140
ctcgccctga tcgtggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgcgac gagcgtgaca	1200

ccacgatgcc ttagcaatg gacaacaacgt tgccaaact attaactggc gaactactta	1260
ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac	1320
ttctgcgctc gcccctccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc	1380
gtgggtctcg cggtatcatt gcagcaactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag	1440
ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgcgtgaga	1500
taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt	1560
agattgattt aaaacttcat tttaattta aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata	1620
atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttcgttcca ctgagcgtca gacccgtag	1680
aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgctc cgtaacttgc tgcttgaaa	1740
caaaaaaacc accgctacca gcggtggtt gtttgcggg tcaagagcta ccaactctt	1800
ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtac	1860
cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcacccg tacataccctc gctctgtaa	1920
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa	1980
gacgatagtt accggataag ggcgcggcgt cgggtgaac ggggggttcg tgcacacagc	2040
ccagcttggaa gcaacgacc tacaccgaac tgagataacct acagcgtgag cattgagaaa	2100
gcccacgct tcccgaaagg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaaaggcggc agggtcggaa	2160
caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg	2220
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatc ctgcgtcagg gggcggagcc	2280
tatgaaaaa cggcagcaac gccccttt tacggctctt ggcctttgc tggccttttg	2340
ctcacatgtt ctgcgttgc ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg	2400
agttagctga taccgtcg cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcggagg	2460
aagcggaaaga gcccataa cgcacccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaa	2520
gcagctgtgg aatgtgtgtc agtttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag	2580
aagtatgcaa agcatgcattcaattatgc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc	2640
cccagcagggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagccccc	2700
cctaactccg cccatcccgcc ccttaactcc gcccagttcc gcccattctc cgcccatgg	2760
ctgactaatt ttttttattt atgcagagggc cgaggccgccc tggcccttg agctattcca	2820
gaagtagtga ggaggctttt ttggaggccctt aggctttgc aaaaagcttgc gacacaagac	2880
aggcttgcga gatatgtttt agaataaccac ttatcccgc gtcagggaga ggcagtgcgt	2940
aaaaagacgc ggactcatgt gaaatactgg ttttagtgc gccagatctc tataatctcg	3000

cgcaacctat ttccccctcg aacactttt aagccgtaga taaacaggct gggacactc	3060
acatgagcga aaaatacatc gtcacctggg acatgttgc gatccatgca cgtaaactcg	3120
caagccgact gatgcctct gaacaatgga aaggcattat tgccgtaagc cgtggcggtc	3180
tgtaccgggt gcgttactgg cgctgtact gggtattcgt catgtcgata cgctttgtat	3240
ttccagctac gatcacgaca accagcgcga gcttaaagtg ctgaaacgcg cagaaggcga	3300
tggcgaaggc ttcatcgta ttgatgacct ggtggatacc ggtggtaact cggttgcgtat	3360
tcgtgaaatg tatccaaaag cgcaacttgt caccatctc gcaaaaccgg ctggcgtcc	3420
gctggttgat gactatgtt tgatatccc gcaagatacc tggattgaac agccgtggga	3480
tatggcgctc gtattcgcc cgccaatctc cggtcgctaa tctttcaac gcctggcact	3540
gccggcggtt gttctttta acttcaggcg ggttacaata gttccagta agtattctgg	3600
aggctgcac catgacacag gcaaaccctga gcgaaaccct gttcaaaccc cgctttaaac	3660
atccgtaaac ctcgacgcta gtccgcccgt ttaatcacgg cgacacaaccg cctgtgcagt	3720
cggcccttga tgtaaaaacc atccctact ggtatcgcat gattaaccgt ctgatgtgga	3780
tctggcgccg cattgaccca cgcaaatcc tcgacgtcca ggacgtatt gtgatgagcg	3840
atgcgaacg taccgacgat gatttatacg atacggtgat tggctaccgt ggcggcaact	3900
ggatttatga gtggccccc gatctttgt aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa	3960
ttggacaaac tacctacaga gatttaaagg tctaaggtaa atataaaatt ttaagtgtta	4020
taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tgtgtatTTT agattccaac ctatggact	4080
gatgaatggg agcagtgggt gaatgcctt aatgaggaaa acctgtttt ctcagaagaa	4140
atgcacatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag	4200
aagagaaagg tagaagaccc caaggactt cttcagaat tgctaagtt tttgagtcat	4260
gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttc tttgctatTTT acaccacaaa ggaaaaagct	4320
gcactgctat acaagaaaa tatggaaaaa tattctgtaa ctttataag taggcataac	4380
agttataatc ataacatact gttttttttt actccacaca ggcatacgat gtctgttatt	4440
aataactatg ctcaaaaatt gtgtacctt agcttttaa tttgtaaagg ggttaataag	4500
gaatatttga tgatagtgc cttgactaga gatcataatc agccatacca cattgttaga	4560
ggtttactt gcttaaaaaa acctcccaca cctcccccgt aacctgaaac ataaaatgaa	4620
tgcaattgtt gtgttactt tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag	4680
catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgt gtttgc当地	4740

actcatcaat gtatcttatac atgtctggat caactggata actcaagcta accaaaatca	4800
tcccaaacctt cccacccat accctattac cactgcaat tacctagtgg tttcattac	4860
tctaaacctg tgattccctt gaattatccc catttaaag aaattgtatt tgttaaatat	4920
gtactacaaa ctiagtagtt ggaagggcta attcactccc aaagaagaca agatatcctt	4980
gatctgtgga tctaccacac acaaggctac ttccctgatt agcagaacta cacaccagg	5040
ccaggggtca gatatccact gaccttgga tggtgctaca agctagtagcc agttgagcca	5100
gataaggtag aagaggccaa taaaggagag aacaccagct ttttacaccc tgtgagcctg	5160
catggatgg atgaccggaa gagagaagtgg tagagtggaa ggtttgacag ccgcctagca	5220
tttcatcacg tggcccgaga gctgcacccg gagtacttca agaactgctg atatcgact	5280
tgctacaagg gactttccgc tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg	5340
gagttggcgag ccctcagatc ctgcatataa gcagctgtt tttgcctgtt ctgggtctct	5400
ctggtagac cagatcttag cctggagct ctctggctaa ctagggaaacc cactgcttaa	5460
gcctcaataa agttgcctt gagtgttca agtagtgtt gcccgttgt tgtgtgactc	5520
tggtaacttag agatccctca gacccttttta gtcaagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc	5580
ccgaacaggg acttggaaagc gaaaggaaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcg	5640
cttgctgaag cgccacggc aagaggcgag gggcgccgac tggtgagtac gccaaaatt	5700
ttgactagcg gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagttt taagcggggg	5760
agaatttagat cgcatggaa aaaaattcgg ttaaggccag gggaaagaa aaaatataaa	5820
ttaaacatata tagatgggc aagcaggagat ctggcgttta tcctggcctg	5880
ttagaaacat cagaaggctg tagacaataa ctgggacagc tacaaccatc ctttcagaca	5940
ggatcagaag aacttagatc attatataat acagtagcaa ccctctattt tgtgtcatcaa	6000
aggatagaga taaaagacac caaggaagct ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa	6060
agtaagacca ccgcacagca agcggccgct gatcttcaga cctggaggag gagatatgag	6120
ggacaattgg agaagtgaat tatataaata taaagttagttaaaaattgaac cattaggagt	6180
agcacccacc aaggcaaaaga gaagagtggt gcagagagaa aaaagagcag tggaaatagg	6240
agcttttttc ctgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac	6300
gctgacggta caggccagac aattattgtc tggtatagt cagcagcaga acaatttgc	6360
gagggttattt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct	6420
ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tggggatttg	6480
gggttgcctt ggaaaactca ttgcaccac tgctgtgcct tggaaatgcta gttggagtaa	6540
taaatctctg gaacagattt ggaatcacac gacctggatg gagtgggaca gagaattaa	6600

caattacaca agcttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaaccaggc aagaaaagaa	6660
tgaacaagaa ttattggat tagataaatg ggcaagtttgc tgaaatttgtt ttaacataac	6720
aaattggctg tggtatataa aattattcat aatgatagta ggaggcttgg taggttaag	6780
aatagtttt gctgtacttt ctatagtgaa tagagtttagg cagggatatt caccattatc	6840
gtttcagacc cacctccaa ccccgagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga	6900
aggtaggagag agagacagag acagatccat tcgatttagt aacggatctc gacggtatcg	6960
ccgaattcac aaatggcagt attcatccac aatttaaaaa gaaaaggggg gattgggggg	7020
tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta	7080
caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cggtttatt acagggacag cagagatcca	7140
ctttgctga tacgcggatc tacgcgtcaa gtttgacaa aaaaggcggc tccgcggccg	7200
cccccttcac cggtaccgat tagctccgt ttgcacatcacc cggaccgggg gattagctcc	7260
ggtttgcac acccggaccg ggggattagc tccggtttgc atcacccgga ccggggccg	7320
ggcgcgtgt agcgattagc tccggtttgc atcacccgga ccgggggatt agctccgtt	7380
tgcacatcacc ggaccggggg attagctcg gtttgacatca cccggaccgg ggactcgagg	7440
tccacttcgc atattaagggt gacgcgtgt gcctcgaaca ccgagcgacc ctgcagcgac	7500
ccgcttaaca gcgtcaacag cgtgccgaa gcttgaattt tgatcagcat tccggtaactg	7560
ttggtaaaggc caccatggc cctaagaaaa agaggaaggt gcctaagaaa aagaggaagg	7620
tgcctaagaa aaagaggaag gtggccggccg ctgactacaa ggatgacgac gataaatcta	7680
gagacaagaa atactctatt ggactggata tcgggacaaa ctccgttggc tggccgtca	7740
taaccgacga gtataagggt ccaagcaaga aattcaaggt gctggtaat actgaccgcc	7800
attcaatcaa gaagaacctg atcggagcac tcctttcga ctccggtaaa accgctgaag	7860
ctactcggt gaagcggacc gcaaggcggg gatacacccg ccgcaagaat cggatatgtt	7920
atctgcaaga gatcttttagc aacgaaatgg ctaagggtggc cgactccttc tttcacccgc	7980
tggaaaggag ctttctgggt gaggaggata agaaacacga gaggcacccat atattcgaa	8040
atatcgtgga tgaggtggct taccatgaaa agtacccatc aatctaccat ctgaggaaga	8100
agctggtgga cagcaccgat aaagcagacc tgaggctcat ctatctggcc ctggctata	8160
tgtataaagt tagaggacac tttctgtatcg agggcgacccat gaatcccgat aattccgatg	8220
tggataaact cttcattcaa ctgggtcaga catataacca actgttcgag gagaatccca	8280
taaacgcttc tggtggttggat gccaaggctt ctctgtccgc tcggctgtcc aagtacacgca	8340
gactggagaa tctgattgcc caactgccag gagaaaagaa gaacggccctg tttggaaacc	8400
tcatcgccct gagcctggc ctgacaccta acttcaagtc caatttgat ctggccgaag	8460

atgctaaact ccagctctcc aaggacacct atgacgatga tctggacaac ctgctcgac	8520
agataggcga ccagtacgcc gatctttc tggctgctaa gaatctctcc gacgccattc	8580
tgctgagcga catactccgg gtcaacactg agatcaccaa agcacctctg agccgcctcca	8640
tgataaaaacg ctatgtgaa caccatcaag acctgactct gctcaaagcc ctcgtgaggc	8700
aacagctgcc agagaagtac aaagagatat tcttcgacca gagcaagaat ggatatgccg	8760
gatacatcga tggcggagca tcacaggaag aatttacaa gttcatcaa ccaatcctcg	8820
agaagatgaa cggtactgaa gagctgctgg tgaagctgaa cagggaggac ctgctgagga	8880
agcagaggac ctgtgataat ggctccattc cacatcagat acacctggga gagctgcatg	8940
caatccctcg caggcaggag gatttctatac ctttcctgaa ggataaccgg gagaagatag	9000
agaagatcct gacccctcagg atcccttatt acgtcgcccc tctggctaga ggcaactccc	9060
gcttcgcttg gatgaccagg aaatctgagg agacaattac tccttggAAC ttcaagagg	9120
tcgtggataa gggcgaagc gcccagtcat tcatacgacg gatgaccaat ttcaagataa	9180
acctgcccac cgagaaggc tcgccccaaac attcactcct gtacgagttt ttcaccgtct	9240
ataacgagct gactaaagtg aagtacgtga ccgagggcat gaggaagcct gccttcgt	9300
ccggagagca gaagaaggct atcggtgatc tgctttcaa gactaataga aaggtgacag	9360
tgaagcagct caaggaggat tacttaaga agatcgaatg ctttgactca gtggaaatct	9420
ctggcgtgga ggaccgcctt aatgccagcc tggcactta ccatgatctg ctgaagataa	9480
tcaaagacaa agatttcctc gataatgagg agaacgagga catcctggaa gatatcgac	9540
tgaccctgac tctgttcgag gatagagaga tgatcgaaga gcgcctgaag acctatgccc	9600
atctgttga cgataaaagtc atgaaacagc tcaagcggcg gcgcctacact ggggtgggta	9660
gactctccag gaaactcata aacggcatcc gcgcacaaaca gagcggaaag accatcctgg	9720
atttcctgaa atccgacgga ttgcctaaca ggaacttcat gcaactgatt cacgatgact	9780
ctctgacatt taaagaggac atccagaagg cacaggtgag cggtaaggc gacagcctgc	9840
acgagcacat cgccaaacctc gctggatcac ccgcataaa gaaggaaata ctgcagacag	9900
tcaaggttgtt ggacgaactc gtcaaagtga tgggtcggca caagccagag aatatcgta	9960
tcgaaatggc aaggagaac caaaccaccc agaaggccca gaagaactct cgggaacgg	10020
tgaaaagaat cgaagaggaa attaaggac tggatctca gatactgaag gagcaccctg	10080
tggagaatac acagctccag aacgagaaac tctacccatc ctacccatc aacggccgg	10140
acatgtacgt tgaccaggaa ctgcacatca accggctgac cgattatgac gtggaccata	10200

ttgttccaca gtccttcctc aaagatgact ccattgacaa caaggtgctg accagatccg	10260
ataagaatcg cggttaagtct gacaatgttc catcagaaga ggtggtcaag aagatgaaga	10320
attactggcg gcagctcctc aacgccaaac tgatcaccca gcggaaagttt gacaatctga	10380
ctaaggcaga aagaggaggt ctgagcgaac tcgacaaggc cggcittatt aagaggcaac	10440
tggtcgaaac acgccagatt accaaacacg tggcacaat cctcgactct aggatgaaca	10500
ctaagtacga tgagaacgat aagctgatca ggaaagtgaa agtgataact ctgaagagca	10560
agctggtgctc tgacttccgg aaggactttc aattctacaa agttcgcgaa ataaacaatt	10620
accatcatgc tcacgatgcc tatctcaatg ctgtcggtgg caccgcctg atcaagaat	10680
accctaaact ggagtcttag ttcgtgtacg gtgactataa agtctacgtat gtgaggaaga	10740
tgatagcaaa gtctgagcaa gagattggca aagccaccgc caagtacttc ttctactcta	10800
atatcatgaa ttctttaag actgagataa ccctggctaa cggcgaatc cggaagegcc	10860
cactgatcga aacaaacgga gaaacaggag aaatcgtgtg ggataaaggc agggacttcg	10920
caactgtgctg gaaggtgctg tccatgccac aagtcaatat cgtgaagaag accgaagtgc	10980
agaccggcgg attctcaaag gagagcatcc tgccaaagcg gaactctgac aagctgatcg	11040
ccaggaagaa agattggac ccaaagaagt atggcggtt cgattccc acagtggctt	11100
attccgttct ggtcgtagca aaagtggaga aaggcaagtc caagaaactc aagtcgtta	11160
aggagctgct cggaaattact attatggaga gatccagctt cgagaagaat ccaatcgatt	11220
tcctggaagc taaggctat aaagaagtga agaaagatct catcatcaaa ctgccaagt	11280
actctctctt tgagctggag aatggtagga agcggatgct ggctccgcc ggagagctgc	11340
agaaaggaaa cgagctggct ctgcctcca aatacgtaa ctgcctgtat ctggcctccc	11400
actacgagaa actcaaaggt agccctgaag acaatgagca gaagcaactc tttgttgac	11460
aacataaaaca ctacctggac gaaatcattt aacagattag cgagttcagc aagcgggta	11520
ttctggccga tgcaaaccctc gataaagtgc tgagcgcata taataagcac agggacaagc	11580
caattcgcga acaaggcagag aatattatcc accttttac tctgactaat ctggcgctc	11640
ctgctgcctt caagtatttc gatacacta ttgacaggaa gcggtacacc tctaccaaag	11700
aagttctcga tgccaccctg atacaccagt caattaccgg actgtacgag actcgcac	11760
acctgtctca gctcgccggc gactagtaaa gcggccggc tcgagtcgtaa aaagggtgg	11820
cgcgccgacc cagtttctt gtacaaagtg gctcgacggt accttaaga ccaatgactt	11880
acaaggcagc tgttagatctt agccacttt taaaagaaaa gggggactg gaaggctaa	11940
ttcactccca acgaagacaa aatcgtcgag agatgtgcata tataagcagc tgctttgc	12000
ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg	12060

gaacccactg cttaaaggctc aataaagctt gccttgagtgc ttcaagtag tgtgtgcccg	12120
tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcgttgtggaaaat	12180
ctcttagcagt agtagttcat gtcatcttat tattcagttat ttataacttg caaagaatgt	12240
aatatcagag agtgagaggc ctggacattta taatagattt agcaggaaatt gaacttaggg	12300

tggagcacac aggcaaagct gcagaagtac ttggaagaag ccaccagaga tactcacat	12360
tctgcacata cctggctaat cccagatcct aaggattaca ttaagttac taacatttat	12420
ataatgattt atagttaaa gtataaactt atctaattt ctattctgac agatattaat	12480
taatcctcaa atatcataag agatgattac tattatcccc attaacaca agagggaaact	12540
gagagggaaa gatgttgaag taatttccc acaattacag catcgtag ttacgactct	12600
atgatcttct gacacaaatt ccattactc ctacccat gactcagtcg aatatatcaa	12660
agttatggac attatgtcaa gtaacaatt accctttat atagtaaata ctgagtatgat	12720

tgagagaaga aattgtttgc aaacctgaat agcttcaaga agaagagaag tgaggataag	12780
aataacagt gtcatttaac aagtttaac aagtaacttg gttagaaagg gattcaaatg	12840
cataaagcaa gggataaaatt tttctggcaa caagactata caatataacc ttaaatatga	12900
cttcaaataa ttgttggAAC ttgataaaAC taattaaATA ttattGAAGA ttatCAATAT	12960
tataaatgtA atttactttt aaaaAGGGAA catagaaATG tgtatcATTa gagtagaaaa	13020
caatccttat tatcacaatttgtcaaaACA agtttGTTAT taacacaAGT agaataCTGC	13080
attcaattaa gttgactgca gatTTGTGT tttgttaaaa ttagaaAGAG ataacaACAA	13140

caacaataaa aaaatacaaa tcagaaaaac agcacagttt aacaacttta tttagcattt 13620  
acaatctatt aggtattata agtaatctag 13650

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; guide RNA AASV1

&lt;400&gt; 10

ggggcggcg gtgcgtatgc gt 22

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 5' primer

&lt;400&gt; 11

agggccactt ctgctaatgg 20

&lt;210

&gt; 12

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 3' primer

&lt;400&gt; 12

gataccgtcg gcgttggtg 19