

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0038705
(43) 공개일자 2024년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/423 (2006.01)
A61K 31/603 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61K 9/51 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/423 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7002171

(22) 출원일자(국제) 2022년06월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년01월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2022/034454

(87) 국제공개번호 WO 2022/271780

국제공개일자 2022년12월29일

(30) 우선권주장

63/202,744 2021년06월22일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

인텔리아 테라퓨틱스, 인크.

미국, 매사추세츠 02139, 캠퍼릿지, 이리 스트리트 40

(72) 발명자

레브월, 데이빗

미국 02139 매사추세츠 캠퍼리지 이리 스트리트 40

메이틀런드, 마이클

미국 02139 매사추세츠 캠퍼리지 이리 스트리트 40

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

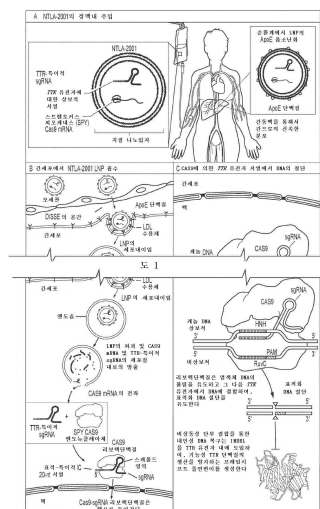
전체 청구항 수 : 총 138 항

(54) 발명의 명칭 간 유전자의 생체 내 편집 방법

(57) 요약

임상 시험에서 생체내 편집을 위한 CRISPR/Cas9-기반 치료제의 제1 전신 투여가 기재된다. 본 명세서에는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 지질 나노입자 조성물을 전신 투여함으로써 간 유전자를 생체내 편집하는 방법이 기재된다. 예를 들어, 본 명세서에는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 지질 나노입자 조성물을 전신 투여함으로써 트랜스티레틴 유전자를 생체내 편집하는 방법이 개시된다. 생물안전성 지표 및 임상 효능 지수의 평가뿐만 아니라 치료 방법이 또한 본 명세서에 기재된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/603 (2013.01)

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 9/5123 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2320/32 (2013.01)

(72) 발명자

스트로, 마크

미국 02139 매사추세츠 캠브리지 이리 스트리트 40

쉬, 위안신

미국 02139 매사추세츠 캠브리지 이리 스트리트 40

(30) 우선권주장

63/202,812 2021년06월25일 미국(US)

63/263,466 2021년11월03일 미국(US)

63/264,435 2021년11월22일 미국(US)

63/314,878 2022년02월28일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(amyloidosis associated with TTR: ATTR)을 치료하는 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하되,

상기 조성물의 투여는 기준선 혈청 TTR에 비해서 혈청 TTR을 감소시키는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ATTR은 유전성 트랜스티레틴(transthyretin) 아밀로이드증인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ATTR은 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ATTR은 다발신경병증(polyneuropathy)을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 5

제1항 및 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ATTR은 심근증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ATTR은 심근증을 동반한 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 7

제1항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 뉴욕 건강 협회(New York Health Association: NYHA) 분류 하에 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III로서 분류된, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 ATTRv-PN 및/또는 ATTR-CM을 갖는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 (9Z, 12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트를 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 PEG 지질을 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 PEG 지질은 다이미리스토일글리세롤(DMG)을 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 PEG 지질은 PEG-2k를 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 약 5 내지 7의 N/P 비율을 갖는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 5:1 내지 약 1:5 범위의 비율로 존재하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 S. 피오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 코돈-최적화된, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg 내지 약 2mg/kg인, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg 내지 약 1mg/kg인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.7mg/kg인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 1.0mg/kg인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg 내지 약 150mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg 내지 약 100mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 50mg 내지 약 90mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 60mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 70mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 80mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 90mg의 총 RNA인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 혈청 TTR을 상기 조성물의 투여 전의 기준선 혈청 TTR과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시키는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 용량의 상기 LNP 조성물을 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 상기 제1 용량의 투여 전의 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시키는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 용량의 상기 LNP 조성물을 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 상기 제2 용량의 투여 전 및 상기 제1 용량의 투여 후 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시키는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제2 치료제와 함께 투여되는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 제2 치료제는 다이플루니살(diflunisal) 또는 타파미디스(tafamidis)인, 방법.

청구항 41

트랜스티레틴(*TTR*)과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 갖는 인간 대상체에서 상기 트랜스티레틴(*TTR*) 유전자를 생체내 편집하는 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 지질 나노 입자(LNP) 조성물을 전신 투여하는 단계; 및

b. 상기 대상체의 간세포에서 상기 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 유전자를 편집하는 단계

를 포함하되;

상기 조성물의 투여는 생물안전성 지표(biosafety metric)의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 상기 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래하는, 방법.

청구항 42

ATTR을 갖는 인간 대상체에서 트랜스티레틴(*TTR*) 유전자의 생체내 편집 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계; 및

b. 상기 대상체의 간세포에서 상기 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 TTR 유전자를 편집하는 단계

를 포함하되;

상기 조성물의 투여는 기준선 수준과 비교할 때 상기 대상체에서 임상 지표 수준의 임상적으로 유의한 개선을 초래하는, 방법.

청구항 43

인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하되,

상기 조성물의 투여는 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 상기 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래하는, 방법.

청구항 44

인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하되,

상기 조성물의 투여는 임상 지표의 기준선 수준과 비교할 때 상기 대상체에서 임상 지표 수준의 임상적으로 유의한 개선을 초래하는, 방법.

청구항 45

인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하되,

상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25 내지 약 100mg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 46

단일유전인자 장애(monogenic disorder)를 갖는 인간 대상체의 간 내의 유전자의 생체내 편집 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계, 및

b. 상기 대상체의 간세포에서 상기 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 유전자를 편집하는 단계

를 포함하되;

상기 조성물의 투여는 생물안전성 지표의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 상기 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래하는, 방법.

청구항 47

단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계, 및

b. 상기 간에서 상기 유전자를 편집하여 상기 단일유전인자 장애를 치료하는 단계를 포함하되,
상기 치료는 안전하고 내약성이 양호한, 방법.

청구항 48

단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법으로서,

a. 상기 인간 대상체에게 유효량의

i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및

ii. 상기 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA

를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계;

b. 투여 전에 상기 대상체에서 생물안전성 지표의 제1 수준을 결정하는 단계;

c. 상기 대상체에서 투여 후 일정 시간 기간 동안 상기 생물안전성 지표의 제2 수준을 결정하는 단계; 및

d. 상기 생물안전성 지표의 상기 제1 수준과 상기 제2 수준 사이의 변화를 평가하는 단계

를 포함하되, 상기 조성물의 투여는 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 상기 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래하여 ATTR을 치료하는, 방법.

청구항 49

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전신 투여 전에 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 갖는 인간 대상체를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전신 투여 전에 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 51

제41항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 (9Z, 12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트를 포함하는, 방법.

청구항 52

제41항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 PEG 지질을 포함하는, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 PEG 지질은 다이미리스토일글리세롤(DMG)을 포함하는, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 PEG 지질은 PEG-2k를 포함하는, 방법.

청구항 55

제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 약 5 내지 7의 N/P 비율을 갖는, 방법.

청구항 56

제41항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 5:1 내지 약 1:5 범위의 비율로 존재하는, 방법.

청구항 57

제41항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는, 방법.

청구항 58

제41항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 Cas9 뉴클레아제를 암호화하는, 방법.

청구항 59

제41항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 S. 피오게네스 Cas9를 암호화하는, 방법.

청구항 60

제41항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 코돈-최적화된, 방법.

청구항 61

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 가이드 RNA에 대한 상기 적어도 하나의 변형은 뉴클레오타이드 사이에 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 또는 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 방법.

청구항 63

제41항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 64

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일유전인자 장애는 ATTR인, 방법.

청구항 65

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간 내의 유전자는 TTR인, 방법.

청구항 66

제41항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ATTR은 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 67

제41항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ATTR은 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 68

제41항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ATTR은 다발신경병증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 69

제41항 내지 제66항 및 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ATTR은 심근증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 70

제67항에 있어서, 상기 ATTR은 심근증을 동반한 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증인, 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 상기 대상체는 뉴욕 건강 협회(NYHA) 분류 하에서 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III로서 분류되는, 방법.

청구항 72

제41항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 ATTRv-PN 및/또는 ATTR-CM을 갖는, 방법.

청구항 73

제41항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물안전성 지표는 프로트롬빈인, 방법.

청구항 74

제41항, 제43항 및 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 생물안전성 지표의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 상기 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래하는, 방법.

청구항 75

제41항, 제43항, 제46항 및 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물안전성 지표는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time: aPTT)인, 방법.

청구항 76

제41항, 제43항, 제46항 및 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물안전성 지표는 피브리노겐인, 방법.

청구항 77

제41항, 제43항, 제46항 및 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물안전성 지표는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)인, 방법.

청구항 78

제41항, 제43항, 제46항 및 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물안전성 지표는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)인, 방법.

청구항 79

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg 내지 약 2mg/kg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 80

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg 내지 약 1mg/kg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 81

제41항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 82

제41항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.7mg/kg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 83

제41항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 1.0mg/kg의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 84

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 50mg 내지 90mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 제2 용량의 상기 LNP 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시키는, 방법.

청구항 86

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 15mg 내지 100mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 87

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 70mg 내지 약 90mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 제2 용량의 상기 LNP 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 (i) 상기 제1 용량의 투여 전 또는 (2) 상기 제2 용량의 투여 전 및 상기 제1 용량의 투여 후 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시키는, 방법.

청구항 89

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 27mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 90

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 150mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 91

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 100mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 92

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 50mg 내지 약 90mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 93

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 35mg 내지 65mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 94

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 40mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 95

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 50mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 96

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 60mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 97

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 70mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 98

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 80mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 99

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 90mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 100

제41항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 100mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 101

제84항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 총 RNA는 상기 합한 mg 용량의 $\pm 5\%$ 이내인, 방법.

청구항 102

제84항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 총 RNA는 상기 합한 mg 용량의 $\pm 10\%$ 이내인, 방법.

청구항 103

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 75mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 104

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 76mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 105

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 77mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 106

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 78mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 107

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 79mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 108

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 80mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 109

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 81mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 110

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 82mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 111

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 83mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 112

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 84mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 113

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 85mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 114

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 86mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 115

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 87mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 116

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 88mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 117

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 89mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 118

제41항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 90mg의 총 RNA의 합한 용량인, 방법.

청구항 119

제42항 또는 제44항에 있어서, 상기 임상 지표는 혈청 TTR 수준인, 방법.

청구항 120

제41항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 상기 TTR 유전자의 발현을 감소시키거나 억제시키는, 방법.

청구항 121

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 상기 조성물의 투여 전 기준선과 비교할 때 상기 TTR 유전자의 발현을 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시키거나 억제시키는, 방법.

청구항 122

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 상기 대상체에서의 TTR 혈청 수준을 상기 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준과 비교할 때 적어도 60% 감소시키는, 방법.

청구항 123

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 상기 대상체에서의 TTR 혈청 수준을 상기 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100% 감소시키는, 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 60% 감소되는, 방법.

청구항 125

제123항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80% 감소되는, 방법.

청구항 126

제123항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 90% 감소되는, 방법.

청구항 127

제123항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 95% 감소되는, 방법.

청구항 128

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 방법.

청구항 129

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 방법.

청구항 130

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 방법.

청구항 131

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 방법.

청구항 132

제41항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 TTR 수준은 상기 조성물의 투여 후에 약 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 방법.

청구항 133

제41항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제2 치료제와 함께 투여되는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 제2 치료제는 다이플루니살 또는 타파미디스인, 방법.

청구항 135

인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에서의 혈청 TTR 수준을 기준선 혈청 TTR 수준과 비교할 때 적어도 95% 감소시키는 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 136

제1항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 단일 투여 후, 상기 유전자의 발현을 지속적으로 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 137

제136항에 있어서, 상기 유전자는 TTR 유전자인, 방법.

청구항 138

제136항 또는 제137항에 있어서, 상기 조성물은 (i) Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 (ii) 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 본 출원은 미국 가출원 제63/202,744호(출원일: 2021년 6월 22일; 미국 가출원 제63/202,812호(출원일: 2021년 6월 25일); 미국 가출원 제63/263,466호(출원일: 2021년 11월 3일); 미국 가출원 제63/264,435호(출원일: 2021년 11월 22일); 및 미국 가출원 제63/314,878호(출원일: 2022년 2월 28일)의 이익을 주장하며, 이의 내용은 전 문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.
- [0002] 잘못 접힌 트랜스티레틴(transthyretin: TTR) 단백질로 구성된 아밀로이드 원섬유의 조직에서의 축적을 특징으 로 하는 아밀로이드증은 ATTR이라고 지칭될 수 있고, 진행성의 치명적인 질환이다(Marcoux et al., EMBO Mol Med 2015; Gertz et al., J Am Coll Cardiol 2015). ATTR은 넓은 스펙트럼의 증상을 나타낼 수 있고 상이한 부 류의 ATTR을 갖는 대상체는 상이한 특징 및 예후를 가질 수 있다. 일부 부류의 ATTR은 가족성 아밀로이드 다발 신경병증(familial amyloid polyneuropathy: FAP), 가족성 아밀로이드 심근증(familial amyloid cardiomyopathy: FAC) 및 야생형 TTR 아밀로이드증(wt-TTR 아밀로이드증)을 포함한다. FAP은 일반적으로 감각운 동 신경병증을 동반하는 반면, FAC 및 wt-TTR 아밀로이드증은 일반적으로 울혈성 심부전을 동반한다. ATTR 아밀 로이드증은 후천적일 수 있고(야생형 ATTR 아밀로이드증; ATTRwt), 심근증 및 심부전의 원인이라고 인식된다 (Gertz et al., J Am Coll Car다이올 2015). TTR 아밀로이드증은 유전적일 수 있고(변이체 ATTR; ATTRv; hATTR), TTR 유전자 내의 100개 초과 의 병원성 돌연변이에 의해서 촉발될 수 있다(Ando et al., Orphanet J Rare Dis 2013). 전 세계적으로 대략 50,000명에게 존재하는 것으로 생각되는 ATTRv 아밀로이드증(Hawkins et al., Ann Med, 2015; Schmidt et al., Muscle Nerve, 2018)은 상염색체 우성 유전 패턴 및 아밀로이드 다발신 경병증 또는 아밀로이드 다발신경병증 또는 심근증이 지배하는 임상 표현형을 가지며, 대부분의 대상체는 2개의 조합(ATTR-PN-CM)을 나타낸다(Dohrn et al., J Neurochem 2021). 증상 발병 후, ATTR 아밀로이드증은 진행성이 며, 아밀로이드 심근증이 있는 대상체의 진단 후 중양값 2 내지 6년의 중간값 이내에 사망에 이르고(Maurer et al., Circ Heart Fail, 2019), 심근증 없이 아밀로이드 다발신경병증이 있는 대상체에서는 증상 발병 후 4 내지 17년에 사망에 이른다(Merlini et al., Neurol Ther 2020).
- [0003] TTR은 일반적으로 몸 전체에 레티놀 및 티록신을 운반하는 기능을 하는 TTR 유전자에 의해 생산되는 단백질이다. TTR은 주로 간에서 합성되며 맥락막 신경총 및 망막에서 작은 부분이 생산된다. TTR은 일반적으로 혈액에서 가용성 사량체 단백질로 순환한다. 사량체 안정성을 파괴할 수 있는 TTR의 병원성 변이체는 TTR 유전 자의 돌연변이체 대립유전자에 의해 암호화될 수 있다. 돌연변이 TTR은 잘못 접힌 TTR을 초래할 수 있는데, 이 는 아밀로이드(즉, 잘못 접힌 TTR 단백질의 집합체)를 생성할 수 있다. 일부 경우에, TTR의 병원성 변이체는 아 밀로이드증 또는 아밀로이드 축적으로 인한 질환을 초래할 수 있다. 예를 들어, 잘못 접힌 TTR 단량체는 말초 신경, 심장 및 위장관과 같은 조직 내에서 아밀로이드 원섬유로 중합될 수 있다. 아밀로이드 원섬유는 또한 잘 못 접힌 TTR에 침착된 야생형 TTR을 포함할 수 있다.
- [0004] ATTR 아밀로이드증에 대한 현재 치료법은 TTR의 사량체 형태(다이플루니살(diflunisal), 타파미디스(tafamidis))의 안정화를 통해서(Maurer et al., NEJM 2018; Berk et al., Jama 2013) 또는 TTR mRNA의 분해를

통한 TTR 단백질 합성의 저해를 통해서(Benson et al., NEJM 2018; Adams et al., NEJM 2018) 진행 중인 아밀로이드 형성을 감소시키는 것에 의존한다(이노테센(inotersen), 파티시란(patisiran)). 이러한 치료법은 증상 완화, 기능 개선 및 생존 기간 연장을 제공하지만(Adams et al., NEJM 2018; Adams et al., Lancet Neurol 2021; Solomon et al., Circulation 2019), TTR 낙다운을 유지하기 위해 평생 투여해야 한다는 요구 사항으로 인해 제한된다. 보다 일반적으로, 많은 장애에 대한 기존 유전자 편집 접근법은 유전자 발현에 단기적인 효과를 나타내지만 유전자 발현에서 원하는 효과를 유지하기 위해서는 만성적인 투여가 필요할 것이다. 파티시란의 경우, 만성 치료는 글루코코티코이드 및 항히스타민제를 사용한 전처치와 관련이 있다(Urits et al., Neurol Ther 2020). 또한, TTR-안정화제를 제공받은 대상체는 질환 진행을 경험한다(Lozeron et al., Eur J Neurol 2013). 이노테센은 사구체신염 및 혈소판 수 감소를 포함한 심각한 부작용과 관련이 있다(Gertz et al., Expert Rev Clin Pharmacol 2019). 보다 광범위한 TTR 낙다운은 hATTR 다발성신경병증이 있는 대상체에서 신경병증 증점의 더 큰 개선과 관련이 있다(Adams et al., NEJM 2018). 지속적인 낙다운을 포함한 TTR 감소의 향상은 ATTR 아밀로이드증이 있는 대상체의 경우 향상된 결과로 해석될 수 있다. 따라서, 만성 투여를 요구하지 않고 유전자 발현에서 장기간 지속되는 효과, 예를 들어, TTR의 낙다운을 생성할 수 있는 유전자 편집 요법에 대한 충족되지 않은 요구가 남아 있다.

발명의 내용

- [0005] 본 개시내용은 임상 시험에서 생체내 편집을 위한 CRISPR/Cas9-기반 치료제의 제1 전신 투여를 기재한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 Cas 뉴클레아제와 함께 가이드 RNA, 예컨대, CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 TTR 유전자의 발현을 실질적으로 감소시키거나 낙다운시킴으로써, ATTR과 연관된 TTR 단백질의 생산을 실질적으로 감소시키거나 제거하는 방법을 제공한다. TTR 유전자의 변형을 통한 ATTR과 연관된 TTR 단백질의 생산의 실질적인 감소 또는 제거는 혈청 TTR 수준의 장기간 감소 또는 제거, 예컨대, 혈청 TTR의 지속적인 감소일 수 있다. 추가적인 실시형태는 인간 대상체에게 CRISPR/Cas RNA 성분, 예컨대, 가이드 RNA와 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 생체내 간-표적화 전달하는 데 사용하기 위한 지질 나노입자 시스템 및 이의 사용 방법을 포함한다.
- [0006] 일 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하여(LNP 조성물은 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함), ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, 조성물의 투여는 혈청 TTR을 기준선 혈청에 비해서 감소시킨다.
- [0007] 일 양상에서, 본 명세서에는 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)(트랜스티레틴 아밀로이드증이라고도 알려짐)을 갖는 인간 대상체에서 트랜스티레틴(TTR) 유전자를 생체내 편집하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 지질 나노 입자(LNP) 조성물을 전신 투여하는 단계 및 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 유전자를 편집하는 단계를 포함하되; 조성물의 투여는 생물안전성 지표의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 대상체에서의 생물안전성 지표의 수준 변화를 초래한다.
- [0008] 일 양상에서, 본 명세서에는 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 갖는 인간 대상체에서 트랜스티레틴(TTR) 유전자를 생체내 편집하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계(LNP 조성물은 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA, 및 ii. TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함) 및 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 TTR 유전자를 편집하는 단계를 포함하되; 조성물의 투여는 기준선 수준과 비교할 때 대상체에서 임상 지표의 수준의 임상적으로 유의미한 개선을 초래한다.
- [0009] 일 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하여(LNP는 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함), ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, 조성물의 투여는 임상 지표의 기준선 수준과 비교할 때 대상체에서 임상 지표의 수준의 임상적으로 유의미한 개선을 초래한다.
- [0010] 일 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하여(LNP 조성물은 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함), ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25 내지 약 100mg의 합한 용량으로 투여된다.

- [0011] 일 양상에서, 본 명세서에는 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 간 내의 유전자를 생체내 편집하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계(LNP 조성물은 i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함) 및 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 유전자를 편집하는 단계를 포함하되;
- [0012] 조성물의 투여는 생물안전성 지표의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래한다. 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애는 ATTR이다. 일부 실시형태에서, 유전자는 TTR이다.
- [0013] 일 양상에서, 본 명세서에는 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계(LNP 조성물은 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함함); 및 간 내의 유전자를 편집하여 단일유전인자 장애를 치료하는 단계를 포함하되, 치료는 안전하고 내약성이 양호하다. 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애는 ATTR이다. 일부 실시형태에서, 유전자는 TTR이다.
- [0014] 일 양상에서, 본 명세서에는 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하되, LNP 조성물은 유효량의, i. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 ii. 간 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함한다. 방법은 투여 전에 대상체에서 생물안전성 지표의 제1 수준을 결정하는 단계, 투여 후 일정 시간 동안 대상체에서 생물안전성 지표의 제2 수준을 결정하는 단계; 및 생물안전성 지표의 제1 수준과 제2 수준 사이의 변화를 평가하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 제1 수준과 제2 수준 사이의 변화는 허용 가능한 변화이다. 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애는 ATTR이다. 일부 실시형태에서, 유전자는 TTR이다.
- [0015] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP는 (9Z, 12Z)-3-(((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-((((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트를 포함한다.
- [0016] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP는 PEG 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 다이미리스트로일글리세롤(DMG)을 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-2k를 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-DMG2000이다.
- [0017] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물은 약 5 내지 7의 N/P 비율을 갖는다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 N/P 비율은 약 4 내지 6이다.
- [0018] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 5:1 내지 약 1:5 범위의 비율로 존재한다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 3:1 내지 약 1:3 범위의 비율로 존재한다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 2:1 내지 약 1:2 범위의 비율로 존재한다.
- [0019] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, mRNA는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 Cas9 뉴클레아제를 암호화한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 S. 피오게네스 Cas9를 암호화한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA는 코돈-최적화된다. 일부 실시형태에서, mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다.
- [0020] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA에 대한 적어도 하나의 변형은 뉴클레오타이드 사이에 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다.
- [0021] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, ATTR은 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, ATTR은 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, ATTR은 다발신경병증이 동반된 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, ATTR은 심근증이 동반된 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, ATTR은 심근증이 동반된 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증이고, 예를 들어, 대상체는 뉴욕 건강 협회(New York Health Association: NYHA) 분류 하에서 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III으로서 분류된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 대상체는 ATTRv-PN 및/또는 ATTR-CM을 갖는다.
- [0022] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 생물안전성 지표의 기준선 수준과 비교할 때 허용 가능한 대상체에서의 생물안전성 지표 수준의 변화를 초래한다.

- [0023] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 생물안전성 지표는 프로트롬빈이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 생물안전성 지표는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time: aPTT)이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 생물안전성 지표는 피브리노겐이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서 생물안전성 지표는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서 생물안전성 지표는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)이다.
- [0024] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg 내지 약 2mg/kg의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg 내지 약 1mg/kg의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.3mg/kg의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 0.7mg/kg의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 1.0mg/kg의 합한 용량으로 투여된다.
- [0025] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 5mg 내지 약 9mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 15mg 내지 약 27mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 7mg 내지 약 9mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 27mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다.
- [0026] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 150mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25mg 내지 약 100mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 50mg 내지 약 90mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 50mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다.
- [0027] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 35mg 내지 약 65mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 40mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 60mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 70mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 80mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 90mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 상기 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 100mg의 총 RNA의 합한 용량으로 투여된다.
- [0028] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 임상 지표는 혈청 TTR 수준이다.
- [0029] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 임상 지표는 혈청 프리알부민 수준이다.
- [0030] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 TTR 유전자의 발현을 감소시키거나 억누른다.
- [0031] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 TTR 유전자를 상기 조성물의 투여 전 기준선과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시키거나 억누른다.
- [0032] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 TTR 유전자를 상기 조성물의 투여 전 기준선과

비교할 때 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%만큼 감소시키거나 낮추는 것이다.

- [0033] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 60% 감소시킨다.
- [0034] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 70% 감소시킨다.
- [0035] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 80% 감소시킨다.
- [0036] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 84% 감소시킨다.
- [0037] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 90% 감소시킨다.
- [0038] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 95% 감소시킨다.
- [0039] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 96% 감소시킨다.
- [0040] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 TTR 혈청 수준을 조성물의 투여 전 혈청 TTR 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100% 감소시킨다.
- [0041] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 LNP 조성물의 투여 후 제7일에 상기 양 중 임의의 것에 의해서 대상체에서 TTR 혈청 수준을 감소시킨다.
- [0042] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 LNP 조성물의 투여 후 제14일에 상기 양 중 임의의 것에 의해서 대상체에서 TTR 혈청 수준을 감소시킨다.
- [0043] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 LNP 조성물의 투여 후 제28일에 상기 양 중 임의의 것에 의해서 대상체에서 TTR 혈청 수준을 감소시킨다.
- [0044] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 60% 감소시킨다.
- [0045] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 70% 감소시킨다.
- [0046] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 80% 감소시킨다.
- [0047] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 84% 감소시킨다.
- [0048] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 90% 감소시킨다.
- [0049] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 95% 감소시킨다.
- [0050] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 적어도 96% 감소시킨다.
- [0051] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 조성물의 투여 전 혈청 프리알부민 수준(예를 들어, 기준선)과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100% 감소시킨다.

- [0052] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다.
- [0053] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물은 또한 제2 치료제와 함께 투여된다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 제2 치료제는 TTR의 사량체 형태의 안정화제이다. 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 제2 치료제는 다이폴루니살 또는 타파미디스이다.
- [0054] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 LNP 조성물의 투여 후 제14일에 상기 양 중 임의의 것에 의해서 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 감소시킨다.
- [0055] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여는 LNP 조성물의 투여 후 제28일에 상기 양 중 임의의 것에 의해서 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 감소시킨다.
- [0056] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, 방법은 LNP 조성물의 단일 투여 후, 유전자, 예를 들어, TTR 유전자의 발현을 지속적으로 감소시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0057] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여 후 제28일에 혈청 TTR 수준 또는 혈청 프리알부민 수준은 지속적이다.
- [0058] 상기 양상 및 실시형태 중 임의의 것에서, LNP 조성물의 투여 후 제28일에 혈청 TTR 수준 또는 혈청 프리알부민 수준은 예를 들어, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 및/또는 12개월에 지속적이다.
- [0059] 일 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 개시되며, 이 방법은 대상체에서의 혈청 TTR 수준을 기준선 혈청 TTR 수준과 비교할 때 적어도 95% 감소시키는 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 본 특허 또는 출원 서류는 유색으로 구현된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 유색 도면(들)이 있는 본 특허 또는 특허 출원 공개는 요청하고 요구되는 금액의 지불 시에 특허청에 의해서 제공될 것이다.
- 도 1:** NTLA-2001 LNP-기반 유전자 요법을 위한 방법의 요약. 패널 A는 LNP 입자의 조성물 및 주입 요법을 설명하고, 패널 B는 유전자 요법 전달의 제안된 기전을 도시하고, 패널 C는 TTR 유전자의 CRISPR-Cas9 기반 유전자 편집을 설명한다.
- 도 2:** sgRNA 농도의 함수로서의 TTR 유전자의 NTLA-2001 편집의 1차 인간 간세포 세포 배양-기반 평가. 제시된 1차 지수는 대조군과 비교한 백분율로서의 TTR 유전자 편집, TTR mRNA 수준 및 TTR 단백질 수준.
- 도 3(a, b):** 비-인간 영장류에서 Cyn-LNP를 사용한 TTR 편집 빈도 및 유전자 편집 패턴의 생체내 평가.
- 도 4(a, b, c):** 시간의 함수로서의 NTLA-2001을 사용하여 처리된 인간에서의 (대조군과 비교된) 혈청 TTR 단백질 농도 변화(제28일까지 도시된 데이터). 코호트 A 및 B 둘 다로부터의 지수를 도시한다.
- 도 5:** Cas-OFFinder, GUIDE-seq 및 SITE-Seq에 의해서 식별된 바와 같은 NTLA-2001의 sgRNA의 가능한 표적외 부위.
- 도 6(a, b):** NTLA-2001로 처리된 1차 인간 간세포 세포 배양에서 평가된 표적내(on-target) 및 표적외(off-target) 유전자 편집.
- 도 7:** NTLA-2001에 의해서 유도된 유전자 돌연변이를 특징규명하기 위해서 사용된 방법을 설명한 요약 도면.
- 도 8(a, b):** 고속대량 서열결정(high throughput sequencing)을 위해서 사용된 PCR 방법을 설명하는 요약 도면.
- 도 9:** NTLA-2001 처리된 인간 간세포 1차 세포로부터의 TTR 유전자좌를 둘러싼 검출된 구조 변이체의 평가.

도 10(a, b): 간 및 혈청 단백질 수준에서 *TTR* 유전자 편집의 백분율로서 측정된 마우스 모델에서의 NTLA-2001 편집의 용량-의존적 평가.

도 11: 마우스에서 부분적인 간 절제 후 혈청 *TTR* 수준에 의해서 측정된 *TTR* 유전자의 NTLA-2001 기반 편집의 영구성 평가.

도 12: Cyn-LNP 처리된 비-인간 영장류에서의 시간의 함수로서의 혈청 RNA 농도.

도 13(a, b): Cyn-LNP 처리된 비-인간 영장류에서 유전자 편집 및 혈청 *TTR* 수준 백분율에 의해서 측정된 *TTR* 편집의 평가.

도 14: Cyn-LNP 처리된 비-인간 영장류에서 *TTR* 혈청 단백질 수준 및 간 내의 유전자 편집 백분율의 상관관계.

도 15(a, b, c, d, e): 프로트롬빈 시간(PT), 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT), 피브리노겐, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)로서 측정된, NTLA-2001 처리된 대상체에서의 간 및 응집 매개변수.

도 16: 비-인간 영장류에서 Cyn-LNP의 성분의 혈장 농도.

도 17: NTLA-2001 처리 이상 반응(adverse event).

도 18: 등록된 임상 시험 대상체 특징.

도 19(a 내지 d): 다발신경병증 용량 증량 연구에 대한 임상 시험 대상체 데이터.

도 20: 용량에 따른 *TTR* 감소. SE, 표준 오차. (*) 2개월에 N=2. (†) 2개월에 N=5.

도 21(a 내지 f): 프로트롬빈 시간(PT; 도 21a), 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT; 도 21b), 피브리노겐 (도 21c), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT; 도 21d), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST; 도 21e), 및 d-이량체(도 21f)에 대한 데이터. SE = 표준 오차.

도 22: 코호트 3 및 4를 포함한, NTLA-2001 처리 이상 반응.

도 23(a 내지 b): 등록된 임상 시험 대상체 인구통계학 및 기준선 특징.

도 24: NTLA-2001의 단일 용량 IV 주입 후 LP01의 중간 평균 혈장 농도-시간 프로파일. NTLA-2001은 최대값으로부터 급격히 감소한 후 제2 최대값 및 log-선형 단계를 나타낸다. 이용 가능한 LP01 PK 데이터는 투여 후 최대 48시간까지 도시된다.

도 25: 중간 평균(SE) 관찰(점) 및 모델 예측(선) 28일 *TTR* 대 NTLA(AUCmg*h/ml)는 NTLA-2001 노출 증가에 따라 28일 혈청 *TTR*이 감소함을 나타낸다. 투여 전 *TTR* 농도 데이터는 AUC = 0으로 표시한다. 데이터는 제시된 각각의 용량 수준에서 관찰된 개별 *TTR* 및 AUC 값의 분포 평균으로 표시한다.

도 26: 제시된 체중 사분위수에 따른 1.0mg/kg 및 80mg 이후 NTLA-2001 AUC(mg*h/ml)의 중간 모델 예측 분포. 모의실험은 NTLA-2001 80mg이 1.0mg/kg과 동일한 고정 용량인 것으로 확인해 주었다.

도 27: NTLA-2001 주입 후 관찰된 AST 및 ALT 수준의 경미하고 일시적인 변화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061]

이제 발명의 특정 실시형태를 상세히 참조할 것이며, 그 예는 첨부된 도면에 예시되어 있다. 본 발명은 예시된 실시형태와 관련하여 기재되지만, 발명을 이들 실시형태로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 본 발명은 첨부된 실시형태에 의해 정의된 바와 같이 발명 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포괄하도록 의도된다.

[0062]

본 교시내용을 상세히 설명하기 전에, 개시내용은 특정 조성 또는 공정 단계에 제한되지 않으며, 그 자체는 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 실시형태에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 것을 주목해야 한다. 따라서, 예를 들어 "접합체"에 대한 언급은 복수의 접합체를 포함하고 "세포"에 대한 언급은 복수의 세포 또는 세포 집단 등을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다" 및 이의 문법적 변형은 비-제한적인 것으로서 의도되어, 목록에서의 항목의 인용이 나열된 항목에 대체되거나 추가될 수 있는 다른 유사한 항목을 배제하는 것이 아니다.

- [0063] 수치 범위는 범위를 한정하는 수를 포함한다. 측정 및 측정 가능한 값은 유효 숫자 및 측정과 연관된 오류를 고려하여 대략적인 것으로 이해된다. 또한, "포함하다", "포함한다", "포함하는", "함유하다", "함유한다", "함유하는", "포괄하다", "포괄한다", "포괄하는"의 사용은 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 전술한 일반적인 설명 및 상세한 설명은 모두 단지 예시적이고 설명을 위한 것이고 교시내용을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0064] 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 다양한 성분을 "포함하는"을 언급하는 본 명세서에서의 실시형태는 인용된 성분으로 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진" 것으로 간주되고; 다양한 성분으로 "구성되는 것"으로 언급하는 본 명세서에서의 실시형태는 또한 인용된 성분을 "포함하는" 또는 "본질적으로 이루어진" 것으로 간주되며; 다양한 성분으로 "본질적으로 이루어진"을 언급하는 본 명세서에서의 실시형태는 또한 인용된 성분으로 "이루어진" 또는 "포함하는" 것으로 간주된다(이 호환성은 청구범위에서 이들 용어의 사용에 적용되지 않는다). 용어 "또는"은 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 포괄적인 의미, 즉 "및/또는"과 동등한 의미로 사용된다. 용어 "약"은 목록 또는 범위 앞에 사용될 때 목록의 각각의 구성원 또는 범위의 각각의 평가변수를 변형한다. 용어 "약" 또는 "대략적으로"는 그 값이 측정되거나 결정되는 방법에 부분적으로 의존하는 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대한 허용 가능한 오차를 의미한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, "약"은 언급된 값의 $\pm 10\%$ 또는 선택적으로 $\pm 5\%$ 를 포함한다.
- [0065] 수 또는 일련의 수 앞의 용어 "적어도"는 용어 "적어도"에 인접한 수 및 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 수 또는 정수를 포함하는 것으로 이해되며, 이는 문맥에서 명백하다. 예를 들어, 핵산 분자에서 뉴클레오타이드의 수는 정수여야 한다. 예를 들어, "20개 뉴클레오타이드 핵산 분자의 적어도 18개 뉴클레오타이드"는 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드가 제시된 특성을 갖는다는 것을 의미한다. 적어도가 일련의 수 또는 범위 앞에 있는 경우 "적어도"는 일련 또는 범위인 각각의 수를 수식할 수 있음을 이해한다.
- [0066] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "이하" 또는 "미만"은 어구에 인접한 값으로 이해되고 문맥상 논리적으로 0까지 논리적으로 더 낮은 값 또는 정수로 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오타이드 염기쌍"의 듀플렉스 영역은 2개, 1개 또는 0개의 뉴클레오타이드 염기쌍을 갖는다. 일련의 수 또는 범위 앞에 "이하" 또는 "미만"이 있는 경우, 일련의 또는 범위에서의 각각의 수가 변형된 것으로 이해된다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 범위는 상한 및 하한 둘 모두를 포함한다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 값의 최대량이 100%(예를 들어, 100% 저해 또는 100% 캡슐화)로 표현될 때 그 값은 검출의 방법에 의해 제한되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 100% 저해는 검정의 검출의 수준 아래의 저해로 이해되고, 100% 캡슐화는 캡슐화를 위한 물질이 소량 외부에서 검출될 수 없는 것으로 이해된다.
- [0069] 달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 다음 용어 및 문구는 다음 의미를 갖는 것으로 의도된다.
- [0070] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "mRNA"는 본 명세서에서 전적으로 또는 우세하게 RNA 또는 변형된 RNA이고 폴리펩타이드로 번역될 수 있는 개방 판독 프레임을 포함하는(즉, 리보솜 및 아미노-아실화된 tRNA에 의해 번역을 위한 기질로서 작용할 수 있는) 폴리뉴클레오타이드를 지칭하는 데 사용된다. mRNA는 리보스 잔기 또는 이의 유사체, 예를 들어 2'-메톡시 리보스 잔기를 포함하는 포스페이트-당 골격을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 포스페이트-당 골격의 당은 리보스 잔기, 2'-메톡시 리보스 잔기 또는 이의 조합으로 본질적으로 이루어진다. 일반적으로, mRNA는 상당한 양의 티미딘 잔기를 포함하지 않는다(예를 들어, 0개의 잔기 또는 30개, 20개, 10개, 5개, 4개, 3개 또는 2개보다 적은 티미딘 잔기; 또는 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2% 또는 0.1% 미만의 티미딘 함량). mRNA는 우리딘 위치의 일부 또는 전체에 변형된 우리딘을 포함할 수 있다.
- [0071] "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 통상의 RNA, DNA, 혼합 RNA-DNA, 및 이의 유사체인 중합체를 포함한, 골격을 따라 함께 연결된 질소 헤테로사이클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체를 포함하는 다량체 화합물을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 화학적으로 합성되거나 시험관내에서 전사된다. 폴리뉴클레오타이드는 mRNA, 예컨대, 변형된 우리딘을 포함하는 시험관내에서 전사된 RNA일 수 있다. 핵산 "골격"은 하나 이상의 당-포스포다이에스터 연결, 펩타이드-핵산 결합("펩타이드 핵산" 또는 PNA; PCT 번호 WO 95/32305), 포스포로티오에이트 연결, 메틸 포스포네이트 연결 또는 이의 조합을 포함하는 다양한 연결로 구성될 수 있다. 핵산의 당 모이어티는 리보스, 데옥시리보스, 또는 예를 들어 2' 메톡시 또는 2' 할라이드 치환 같은 치환을 갖는 유사한 화합물일 수 있다. RNA는 DNA 또는 하나 이상의 데옥시뉴클레오사이드 또는 데옥시뉴클레오사이드 유사체를 포함할 수 있다. "가이드 RNA", "gRNA"

및 "가이드"는 RNA, 예컨대, crRNA(CRISPR RNA로도 알려짐) 또는 crRNA와 trRNA(tracrRNA로도 알려짐)의 조합을 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 이것은 Cas 뉴클레아제를 게놈 위치에 표적화한다. Cas 뉴클레아제, 예컨대, Cas9 뉴클레아제에 대한 동족 가이드 RNA 구조는 당업계에 공지되어 있다. crRNA 및 trRNA는 단일 RNA 분자(단일 가이드 RNA, sgRNA)로서 또는 2개의 개별 RNA 분자(이중 가이드 RNA, dgRNA)로 회합될 수 있다. trRNA는 자연 발생 서열 또는 자연 발생 서열과 비교하여 변형 또는 변이를 갖는 trRNA 서열일 수 있다. 가이드 RNA는 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 RNA를 포함할 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "가이드 서열"은 표적 서열에 상보적이고 Cas 뉴클레아제에 의한 결합 또는 변형(예를 들어, 절단)을 위해 가이드 RNA를 표적 서열에 지향하도록 기능하는 가이드 RNA 내의 서열을 지칭한다. "가이드 서열"은 또한 "표적화 서열" 또는 "스페이서 서열"로 지칭될 수 있다. 가이드 서열은, 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(즉, Spy Cas9) 및 관련된 Cas9 동족체/오쏘로그의 경우 길이가 20개 염기 쌍일 수 있다. 더 짧거나 더 긴 서열, 예를 들어 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 21-, 22-, 23-, 24- 또는 25-뉴클레오타이드 길이가 또한 가이드로서 사용될 수 있다. 가이드 서열은 18 내지 25개 또는 18 내지 20개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 100% 상보적이거나 동일할 수 있다. 다른 실시형태에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 적어도 하나의 미스매치를 함유할 수 있다. 예를 들어, 가이드 서열 및 표적 서열은 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 표적 서열의 총 길이는 적어도 18, 19, 20개 또는 그 초과인 염기쌍이다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열이 적어도 18, 19, 20 또는 그 초과인 뉴클레오타이드를 포함하는 경우 가이드 서열 및 표적 영역은 0 또는 1 내지 4개의 미스매치를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열이 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우 가이드 서열 및 표적 영역은 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있다.

[0073] Cas 단백질에 대한 표적 서열은 Cas 단백질에 대한 핵산 기질이 이중 가닥 핵산이기 때문에 게놈 DNA의 양성 및 음성 가닥(즉, 서열 주어진 및 서열의 역전된 보체) 둘 다를 포함한다. 따라서, 가이드 서열이 "표적 서열에 상보적"인 것이라 하는 경우, 가이드 서열은 가이드 RNA가 표적 서열의 역전된 보체에 결합하도록 지시할 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 가이드 서열이 표적 서열의 역전된 보체에 결합하는 경우, 가이드 서열은 가이드 서열에서 T를 U로 치환한 것을 제외하고는 표적 서열(예를 들어, PAM을 포함하지 않는 표적 서열)의 소정의 뉴클레오타이드와 동일하다.

[0074] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "Cas 뉴클레아제"는 RNA 및 DNA 결합 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 복합체, 또는 이러한 복합체의 DNA 결합 소단위를 의미하며, 여기서 DNA 결합 활성은 서열 특이적이며 가이드 RNA의 서열에 좌우된다. 예시적인 Cas 뉴클레아제(및 또한 "Cas 단백질")는 Cas 클레아바제(cleavase)/닉카제(nickase)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 DNA의 1개 또는 2개의 가닥을 절단한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 닉카제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 dsDNA 클레아바제이다. Cas 뉴클레아제는 타입 III CRISPR 시스템의 Csm 또는 Cmr 복합체, 이의 Cas10, Csm1 또는 Cmr2 소단위, 타입 I CRISPR 시스템의 캐스케이드 복합체, 이의 Cas3 소단위 및 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "클래스 2 Cas 뉴클레아제"는 RNA-가이드된 DNA 결합 활성을 갖는 단일 쇠 폴리펩타이드, 예컨대, Cas9 뉴클레아제 또는 Cpf1 뉴클레아제이다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 추가로 RNA-가이드된 DNA 클레아바제 또는 닉카제 활성을 갖는 클래스 2 Cas 클레아바제 및 클래스 2 Cas 닉카제(예를 들어, H840A, D10A 또는 N863A 변이체)를 포함한다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 예를 들어, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9(예를 들어, N497A, R661A, Q695A, Q926A 변이체), HypaCas9(예를 들어, N692A, M694A, Q695A, H698A 변이체), eSPCas9(1.0)(예를 들어, K810A, K1003A, R1060A 변이체) 및 eSPCas9(1.1)(예를 들어, K848A, K1003A, R1060A 변이체) 단백질 및 이들의 변형을 포함한다. Cpf1 단백질(Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015))은 Cas9와 상동성이고 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유한다. Zetsche의 Cpf1 서열은 그 전체가 참조에 의해 포함된다. 예를 들어, Zetsche, 표 S1 및 S3 참조. "Cas9"는 본 명세서에 열거된 Cas9의 변이체인 Spy Cas9 및 이의 등가물을 포함한다. 예를 들어, 문헌(Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015)] 참조. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, Cas 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제, Cas9 뉴클레아제 또는 S. 피오게네스 Cas9 뉴클레아제)의 전달은 폴리펩타이드 또는 mRNA의 전달을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있다.

[0075] "변형된 우리딘"은 본 명세서에서 우리딘과 동일한 수소 결합 억셉터(acceptor) 및 우리딘과 하나 이상의 구조적 차이를 갖는 티미딘 이외의 뉴클레오사이드를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 치환된 우리딘, 즉, 하나 이상의 비-양성자성 치환체(예를 들어, 메톡시와 같은 알콕시)가 양성자를 대신하는

우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘(pseudouridine)이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 치환된 슈도우리딘, 즉, 하나 이상의 비-양성자성 치환체(예를 들어, 메틸과 같은 알킬)가 양성자를 대신하는 슈도우리딘, 예를 들어, N1-메틸 슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 임의의 치환된 우리딘, 슈도우리딘 또는 치환된 슈도우리딘이다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "우리딘 위치"는 우리딘 또는 변형된 우리딘이 차지하는 폴리뉴클레오타이드 내의 위치를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, "우리딘 위치의 100%가 변형된 우리딘"인 폴리뉴클레오타이드는 동일한 서열의 종래의 RNA(여기서, 모든 염기는 표준 A, U, C 또는 G 염기임)에서 우리딘이 될 모든 위치에 변형된 우리딘을 함유한다. 달리 나타내지 않는 한, 첨부된 본 개시내용에 있거나 또는 이에 수반되는 서열 표 또는 서열 목록의 폴리뉴클레오타이드 서열에서 U는 우리딘 또는 변형된 우리딘일 수 있다.

[0077] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "치료"는 대상체에서 질환 또는 장애에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 지칭하고, 질환의 저해, 질환 진행의 둔화, 이의 발달 저지, 질환의 진행 역전(예를 들어, 아밀로이드 원섬유 축적의 역전), 질환의 하나 이상의 증상 완화, 질환의 치유, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 임상 지수의 개선 또는 질환의 하나 이상의 증상의 재발 예방을 포함한다. 일부 실시형태에서, ATTR의 치료는 ATTR의 증상을 완화시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, ATTR의 치료는 TTR 유전자의 발현의 실질적인 감소 또는 니다우에 의해서, 예를 들어, 적어도 95% 감소에 의해서, ATTR과 연관된 TTR 단백질의 생산을 실질적으로 감소 또는 제거하는 것을 포함할 수 있다.

[0078] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아밀로이드"는 일반적으로 가용성인 단백질 또는 펩타이드의 비정상적인 응집체를 지칭한다. 아밀로이드는 불용성이며, 아밀로이드는 장기와 조직에 단백질성 침전물을 생성할 수 있다. 아밀로이드의 단백질 또는 펩타이드는 단백질의 많은 카피가 서로 달라붙어 원섬유를 형성할 수 있는 형태로 잘못 접힐 수 있다. 일부 형태의 아밀로이드는 인체에서 정상적인 기능을 가질 수 있지만, 본 명세서에서 사용되는 "아밀로이드"는 단백질의 비정상적 또는 병리학적 응집체를 지칭한다. 아밀로이드는 TTR과 같은 단일 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있거나, 또는 TTR 및 추가적인 단백질과 같은 다중 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아밀로이드 원섬유"는 분해에 저항성인 아밀로이드의 불용성 섬유를 지칭한다. 아밀로이드 원섬유는 특정 단백질 또는 펩타이드 및 그것이 응집된 조직 및 세포 유형에 기초하여 증상을 일으킬 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아밀로이드증"은 아밀로이드 또는 아밀로이드 원섬유의 침착에 의해 유발되는 증상을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 아밀로이드증은 심장, 신장, 간, 비장, 신경계 및 소화관을 포함하는 수많은 장기에 영향을 미칠 수 있다.

[0081] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "TTR"은 TTR 유전자의 유전자 산물인 트랜스티레틴을 지칭한다. TTR은 또한 당업계에 CTS, CTS1, HEL111, HsT2651, PALB, 프리알부민, TBPA 및 ATTN이라고 알려져 있다. 예를 들어, HGNC:HGNC:12405 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7276>)를 참조하기 바란다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "ATTR", "TTR-관련 아밀로이드증", "TTR 아밀로이드증", "ATTR 아밀로이드증", "TTR과 연관된 아밀로이드증" 또는 "트랜스티레틴 아밀로이드증"은 다수의 조직(주로 신경 및 근육)에서 아밀로이드 원섬유로서 축적되는 잘못 접힌 TTR 단백질로부터 생성되어 주로 다발신경병증(PN) 및/또는 심근증(CM) 표현형의 질병으로 이어지는 병태를 지칭한다. PN의 증상은 말초 신경병증으로 인한 사지의 무감각, 현기증, 자율 신경병증으로 인한 위장장애를 포함한다. CM의 증상은 호흡 곤란 및 울혈성 심부전을 포함한 심장 손상의 기타 증상을 포함한다. 두 표현형 모두 유전성(가족성) ATTR(ATTRv)과 연관되어 있다. ATTR-CM은 TTR 유전자(ATTRv-CM) 및/또는 야생형 TTR 유전자(ATTR-CM)의 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. 야생형 ATTR(ATTR-wt)은 주로 CM과 연관되어 있다. ATTRv가 있는 대상체는 신경학적 장애와 심장 장애로 이루어진 혼합된 임상 표현형을 나타낼 수 있다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "유전성 ATTR"은 TTR 유전자의 서열의 돌연변이와 연관된 ATTR을 지칭한다. ATTR과 연관된 TTR 유전자의 공지된 돌연변이는 T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A 또는 V122(-)의 치환을 갖는 TTR을 초래하는 것을 포함한다. 유전성 ATTR은 제한성 심근증을 특징으로 하는 가족성 아밀로이드 심근증("FAC")을 포함하며, 이는 심근증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증("ATTRv-CM")으로도 알려져 있다. 울혈성 심부전이 FAC에서 공통적이다. 평균 발병 연령은 약 60 내지 70세이며, 진단 후 예상 수명은 4 내지 5년이다. 유전성 ATTR은 또한 주로 감각운동 신경병증을 특징으로 하는 다발신경병증을 동반한 유전성 트랜

스티레틴 아밀로이드증("ATTRv-PN")이라고도 알려진 가족성 아밀로이드 다발신경병증("FAP")을 포함한다. FAP에서는 자율신경병증이 공통적이다. 신경병증이 주요 특징이지만 FAP의 증상은 악액질, 신부전 및 심장 질환을 또한 포함할 수 있다. FAP의 평균 발병 연령은 약 30 내지 50세이며, 진단 후 예상 수명은 5 내지 15세이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유전성 ATTR"은 ATTRv-PN 및/또는 ATTRv-CM을 지칭한다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "야생형 ATTR" 및 "ATTRwt"는 병리학적 TTR 돌연변이, 예컨대, T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A 또는 V122(-)와 연관되지 않은 ATTR을 지칭한다. ATTRwt는 또한 노인 전신성 아밀로이드증(senile systemic amyloidosis)으로 지칭된다. 발병은 전형적으로 60세 이상의 남성에서 발생하며, 가장 흔한 증상은 울혈성 심부전 및 심방세동(atrial fibrillation)과 같은 비정상적인 심장 박동이다. 추가적인 증상은 숨가쁨, 피로, 현기증, 부기(특히, 다리), 메스꺼움, 협심증, 수면 장애 및 체중 감소와 같은 심장 손상의 결과를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "야생형 ATTR"은 TTR 돌연변이와 연관되지 않은 질병의 다발신경병증 및/또는 심근증 표현형을 지칭한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 ATTR로 진단되었거나 동시에 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 유전자 검사(예를 들어, 문서화된 TTR 돌연변이)에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 감각운동 말초 신경병증의 임상 진단에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전 신경병증 손상 점수(NIS) 5 이상 및 130 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 생검에 의해 또는 검증된 비침습적 영상화에 의해 기록된 TTR 아밀로이드의 조직 침착에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 다발성 신경병증 장애(PND) 점수 3b 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 심근증 또는 야생형 심근증(ATTRwt)을 동반한 유전성 ATTR(ATTRv) 아밀로이드증으로서 분류된, 심근증을 동반한 ATTR 아밀로이드증으로 진단된다. 일부 실시형태에서, ATTR-CM을 갖는 인간 대상체는 뉴욕 건강 협회(NYHA) 분류 하에서 클래스 I 또는 클래스 II로서 분류된다. 일부 실시형태에서, ATTR-CM을 갖는 인간 대상체는 뉴욕 건강 협회(NYHA) 분류 하에서 클래스 III로서 분류된다.

[0086] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 증상(예를 들어, 다발신경병증 증상)의 진행을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 다발신경병증 장애(PND) 점수 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 가족성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 단계의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 신경병증 손상 점수(NIS)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 NIS-하지(LL)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 25 kg/m²×g/l 이상의 변형된 체질량 지수(mBMI) 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 30분 이상의 6분 보행 검사 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 0.1m/s 이상의 10미터 보행 검사의 감소를 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "돌연변이체 TTR"은 TTR의 야생형 아미노산 서열과 비교하여 TTR의 아미노산 서열이 변화된 TTR의 유전자 산물(즉, TTR 단백질)을 지칭한다. 인간 야생형 TTR 서열은 NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: Ensembl: ENSG000001 18271에서 입수 가능하다. 예를 들어, 인간에서 ATTR과 연관된 TTR의 돌연변이체 형태는 신호 서열이 없는 성숙 단백질에 기초한 아미노산 위치에 따라서 표기되는 T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A 또는 V122(-)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다(예를 들어, T60A는 p.T80A라고도 지칭되는 T80A와 동등함).

[0087] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "넉다운"은 예를 들어 세포, 세포의 집단, 조직, 또는 기관에서, 유전자 편집에 의한, 특정 유전자 산물(예를 들어, TTR)의 발현의 감소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 유전자 편집은 서열, 예를 들어 차세대 서열결정(NGS)에 의해 평가될 수 있다. 발현은 예를 들어, 적절한 대조군, 예를 들어, 치료 전 대상체와 비교하여 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%만큼 또는 검정의 검출 수준 아래로 감소될 수 있다. mRNA의 넉다운을 측정하는 방법은 공지되어 있고 관심 조직 또는 세포 집단으로부터 단리된 mRNA의 서열결정을 포함한다. 단백질의 넉다운은 관심 조직, 세포 집단 또는 유체에서 단백질의 양을 검출함으로써 측정될 수 있다. 유세포 분석 분석법은 단백질 발현의 넉다운을 측정하기 위한 공지된 방법이다. 분비된 단백질의 경우, 넉다운은 조직 배양 배지 또는 혈액, 또는 그로부터 유래된 혈청 또는 혈장과 같은 유체에서 평가될 수 있다. 혈청 단백질 수준은 정량적 검정, 예를 들어, ELISA에 의해서 측정될 수 있고, 넉다운을 검출하기 위해서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, "넉다운"은 특정 유전자 산물의 발현의 일부 손실, 예를 들어, 전장 단백질로 전사되거나 번역되는 전장 야생형 mRNA의 양에서 감소, 또는 세포 집단에 의해 발현되는 단백질의 양에서 감소를 지칭할 수 있다. mRNA 서열에서 어떤 변화가 야생형 또는 전장 단백질의 감소된 발현을 초래한다는 것은 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, "넉다운"은 특정 유전자 산물, 예를 들어, TTR의 발현의 일부 손실을 지칭할 수 있다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 혈청 TTR 또는 혈청 프리알부민 넉다운과 관련하여 "지속적인"(예를 들어,

지속적인 낙다운) 또는 유전자(예를 들어, TTR 유전자)의 발현을 "지속적으로" 감소시키는 유전자 발현의 지속적인 효과, 예컨대, 지속적인 낙다운 또는 지속적인 감소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 또는 혈청 프리알부민의 지속적인 낙다운은 예를 들어, 적어도 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 그 초과 동안 유지되는 LNP 조성물의 투여 후 제14일 또는 제28일에 측정된 바와 같은 감소(기준선 대비 수준)를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 유지되는 수준은 달라질 수 있다. 일부 실시형태에서, 감소는 치료될 장애에 대한 원하는 임상 효능과 상관관계가 있다. 주어진 장애, 예를 들어, ATTR에 대해 원하는 임상 효능을 달성하기 위한 감소 수준은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과 감소는 특정 장애에 대한 원하는 임상 효능과 상관관계가 있다. 예를 들어, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과 감소는 ATTR에 대한 원하는 임상 효능과 상관관계가 있다.

[0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "단일유전인자 장애"는 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성으로 인해 발생하는 장애를 지칭한다. 단일유전인자 장애는 간 내의 유전자에 대한 편집 또는 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성을 유발하는 비-암호 영역에 대한 편집으로 치료될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물은 단백질이다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물은 RNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성을 유발하는 간 내의 유전자 또는 비-암호 영역에 대한 편집은 유전자 산물의 수준(예를 들어, 혈청 수준)을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 유전자는 야생형에 비해 유전자에 하나 이상의 변형을 함유한다. 일부 실시형태에서, 유전자는 야생형이다. 단일유전인자 장애는 단일 유전자 편집에 의해서 치료할 수 있는 유전 장애일 수 있다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "유효량"은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해 대상체에서의 혈청 TTR 수준을 적어도 60% 감소시키고/시키거나 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA를 투여한 후 혈청 TTR을 약 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시키는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 양을 지칭한다. 예를 들어, LNP 조성물은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA, 예를 들어 TTR을 표적으로 하는 가이드 RNA(조합된 또는 전체 RNA)의 유효량을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA를 전달하며, 이는 총 RNA로 측정되는 "유효량"의 RNA를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 유효량은 기준선 혈청 TTR 수준에 비해 대상체에서의 혈청 TTR 수준을 적어도 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 유효량은 기준선 혈청 프리알부민 수준에 비해 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 적어도 60% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 유효량은 기준선 혈청 프리알부민 수준에 비해 대상체에서 혈청 프리알부민 수준을 적어도 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 유효량은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA의 투여 후에 혈청 TTR을 약 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만, 약 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만, 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만, 약 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만 또는 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다.

[0091] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "생물안전성 지표"는 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 인간 대상체에게 투여하는 것과 연관된 안전성 사건을 모니터링하는 데 사용되는 임상 지표를 지칭한다. 생물안전성 지표는 본 명세서에 기재된 바와 같은 이상 반응(NCI-CTCAE 3등급 이상), 심각한 이상 반응, 특별한 관심을 끄는 이상 반응 및/또는 치료로 인한 이상 반응(CTCAE 3등급 이상)를 포함한 안전성 사례의 결정을 허용할 수 있다. 안전성 사건(예를 들어, 이상 반응)의 중증도를 정의하기 위한 지침은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 국립 암 연구소(NCI)-CTCAE, 버전 5.0을 포함하는 이상 반응에 대한 공통 용어 기준(CTCAE)). 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물 투여 전에 측정된다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물 투여 후에 측정된다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 전 및 후에 측정되어, LNP 조성물을 사용한 치료 전 및 후의 생물안전성 지표 수준을 비교하여 변화, 예를 들어, 허용 가능한 변화를 결정한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "허용 가능한" 변화는 생물안전성 지표 수준의 변화를 지칭하며, 여기서 결과적인 변화는 안전성 사례(예를 들어, 이상 반응(NCI-CTCAE 3등급 이상), 심각한 이상 반응, 특별한 관심을 끄는 이상 반응, 치료로 인한 이상 반응(CTCAE 3등급 이상) 및/또는 임상외에 의해서 결정된 바와 같은 그렇지 않으면 연구 약물 중단이 필요한 사례를 구성하지 않는다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여 전에 측정된 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 후 측정된 생물안전성 지표의 하나 이상의 수준에 대한 비교를 위한 기준선으로 제공될 수 있다(예를 들어, 투여 후 특정 간격에 취해진 측정치는 기준선 수준과 비교될 수 있다). 일부 실시형태에서, 기준선은 LNP 조성물의 투여 전에 취해진 마지막의 입수 가능한 측정치이다. 일부 실시형태에서, 값만 안전성 사건을 결정하는 데 사용될 수 있다면 생물안전성 지표는 기준선과 비교되지

않는다.

- [0092] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "안전하고 내약성이 양호한"은 본 명세서에 기재된 바와 같은 안전성 사례의 부재, 예를 들어, 이상 반응(NCI-CTCAE 3등급 이상), 심각한 이상 반응, 특별한 관심을 끄는 이상 반응, 치료로 인한 이상 반응(CTCAE 3등급 이상) 및/또는 임상시에 의해서 결정된 바와 같은 그렇지 않으면 연구 약물 중단이 필요한 사례의 부재를 지칭한다. 일부 실시형태에서, "안전하고 내약성이 양호한"은 본 명세서에 기재된 조성물, 예를 들어, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 TTR을 표적화하는 가이드 RNA의 유효량을 포함하는 LNP 조성물의 투여와 관련되지 않고/않거나 예를 들어, 개입 여부에 관계없이 상기 사건에 대해 허용 가능한 기간 후에 해결되는 NCI-CTCAE 등급 3 이상을 경험하는 환자를 포함한다.
- [0093] 일부 실시형태에서, 특별한 관심을 끄는 이상 반응은 예를 들어, 주입 관련 반응(infusion-related reaction: IRR)(예를 들어, 치료 또는 주입 중단이 필요함 및/또는 3등급 이상); 사이토카인 방출 증후군의 발생; 임상적으로 관련된 비정상 출혈 또는 혈전성 또는 출혈 발생물 또는 CTCAE 2등급 이상의 비정상 혈액 검사 결과로 정의되는 비정상 응고 소견, ALT의 CTCAE 2등급 이상의 상승, AST의 CTCAE 2등급 이상의 상승, 총 빌리루빈의 CTCAE 2등급 이상의 상승, GLDH의 CTCAE 2등급 이상의 상승으로 입증된 급성 간 손상; 비장에 대한 영향으로 인한 사건(비장 출혈, 비장 경색, 때로는 혈소판 감소증, 때로는 빈혈 또는 현미경 검사에서 혈액 세포 연구에 대한 특정 이상 소견이 있는 림프구감소증); 부신에 대한 영향으로 인한 사건; 갑상선기능저하증의 임상적으로 관련된 증상; 정상 범위보다 낮은 티록신(T4 수준) 감소; 및 비타민 A 결핍과 일치하는 안과적 사건을 포함한다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 이상 반응은 연구 약물이 투여되거나 연구 절차를 겪은 적이 있는 대상체에서 임의의 예상치 못한 의학적 발생이며 이것은 반드시 치료와 인과 관계가 있는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 의약품(시험용)과 관련이 있는지 여부에 관계없이 치료와 일시적으로 연관된 의도하지 않은 징후(비정상적인 실험실 소견 포함), 증상 또는 질환이다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 임상 징후 또는 증상을 유도한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 적극적인 개입을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 치료의 정지 또는 중단을 요구한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 조사자의 견해로 임상적으로 유의미한 이상이다. 이상 반응에 대한 등급 기준은 예를 들어, NCI(국립 암 연구소)-CTCAE를 포함하는 CTCAE(이상 반응에 대한 공통 용어 기준)와 같이 당업계에 알려져 있다.
- [0095] 생물안전성 지표는 일반적으로 응고, 혈액학, 임상 화학, 소변검사 및 기타 생물분석 평가(예를 들어, 사이토카인, 보체)와 관련된 알려진 실험실 평가를 포함한다. 특정 생물안전성 지표는 다음을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 간 효소 수준(예를 들어, 치료제 투여 후 4주 초과 동안 $5 \times \text{ULN}$ 초과의 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)의 증가, $3 \times \text{ULN}$ 초과의 ALT 또는 AST 및 $2 \times \text{ULN}$ (Hy의 법칙) 초과의 총 빌리루빈), 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 수준(예를 들어, 치료제 투여 4주 초과 동안 $5 \times \text{ULN}$ 초과의 aPTT의 상승), 프로트롬빈 시간(PT) 수준, 트롬빈 생성 시간(TGT) 수준(예를 들어, 최고 높이, 지연 시간 및/또는 내인성 트롬빈 전위), 피브리노겐 수준, 프로트롬빈 국제 표준화(INR) 비율, d-이량체 수준, 파종성 혈관내 응고와 일치하는 실험실 매개변수, 혈액학 값의 변화(예를 들어, 치료제 투여 후 CTCAE 2등급을 초과하는 비정상 혈액 검사 결과), 화학적 값의 변화, 응고의 변화, 소변검사의 변화, 글루타메이트 데하이드로게나제 수준, C 반응성 단백질 수준, 보체(C3, C4, C3a, C5a, Bb) 수준, 사이토카인(GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-23, TNF- α , IL-17, MCP-1) 수준, 티록신(T4 수준)(예를 들어, 정상 범위 미만으로의 수준 감소 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 갑상선 기능 저하증 증상/징후), 급성 간 손상(예를 들어, ALT, AST, 총 빌리루빈 또는 GLDH의 CTCAE 2등급 초과의 상승 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 간 손상의 증상/징후) 및 12-리드 심전도의 변화. LNP 조성물의 투여와 연관된 것을 포함하는 추가적인 생체안전성 지표가 해당 분야에 알려져 있다. 유사하게, 생물안전성 지표의 허용 가능한 수준 및/또는 변화는 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어 임상의 또는 실험실에 의해 일상적인 방법으로 평가될 수 있다.
- [0096] 본 명세서에 사용된 "임상 효능 척도"는 본 명세서에 기재된 LNP 조성물로 치료된 인간 대상체에서 질환의 개선을 평가하는 데 사용된 지표를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 임상 효능 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 후에 측정된다. 일부 실시형태에서, 임상 효능 지표의 수준은 LNP 조성물 투여 전 및 투여 후에 측정되어, LNP 조성물을 사용한 치료 전 및 후의 임상 효능 지표 수준의 비교를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여 전에 측정된 임상 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 후 측정된 임상 지표의 하나 이상의 수준에 대한 비교를 위한 기준선 또는 대조군으로 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준선은 LNP 조성물의 투여 전에 취해진 마지막의 입수 가능한 측정치이다.
- [0097] 트랜스티레틴 아밀로이드를 특징으로 하는 장애의 경우, 임상 효능 지표는 다음을 포함하지만 이들로 제한되지

않는다: 혈청 TTR 감소(예를 들어, 치료제 투여 후 ELISA에 의해서 측정된 바와 같은 혈청 TTR의 60% 감소), 혈청 TTR 감소(예를 들어, 치료제 투여 후 질량 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 혈청 TTR의 적어도 60% 감소, 혈청 프리알부민 감소, 다발성신경병증 장애(PND) 점수 감소, 가족성 아밀로이드 다발성신경병증(FAP) 단계 감소, 신경병증 손상 점수(NIS)의 감소, 변형된 신경 손상 점수(mNIS+7) 감소, 신경병증 손상 점수(NIS)-하지(LL) 감소, 변형된 체질량 지수(mBMI)의 $25\text{kg}/\text{m}^2 \times \text{g}/\ell$ 이상의 증가, 6분 보행 검사(6-MWT)의 30미터 이상의 증가, 10미터 보행 검사(10-MWT)의 0.1미터/초 이상의 증가. 추가적인 임상 효능 지표는 혈청 신경필라멘트 경쇄(NfL) 수준의 개선, 당뇨병성 신경병증의 Norfolk 삶의 질(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)에 의해서 평가된 바와 같은 삶의 질 개선, EuroQOL(EQ)-5D-5L에 의해서 평가된 바와 같은 삶의 질 개선, 심장 MRI의 개선, 뇌 나트륨 이노 펩타이드(NT-proBNP) 수준의 N-말단 프로호르몬의 개선; 트로포닌 I 수준의 개선, 뉴욕 보건 협회(NYHA) 분류의 개선, 캔자스시티 심근병증 설문지(KCCQ)의 점수에 의한 개선을 포함한다. TTR 아밀로이드증을 포함하는 추가적인 임상 효능 지표가 해당 분야에 알려져 있다. 유사하게, 임상 효능 지표의 "임상적으로 유의미한 개선", 즉 TTR 아밀로이드증을 비롯한 질환의 개선을 나타내는 임상 효능 지표(들)의 수준 및/또는 변화는 당업계에 공지되어 있으며 일상적인 방법, 예를 들어, 임상의 또는 실험실에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 혈청 TTR 수준은 TTR 아밀로이드증에 대한 임상 효능 지표이다. TTR 아밀로이드증의 치료를 위한 이러한 임상 효능 지표의 "임상적으로 유의미한 개선"은 기준선, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 사용한 치료 전과 비교할 때 치료 후 혈청 TTR 수준의 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 감소를 포함한다. 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준은 또한 TTR 아밀로이드증에 대한 임상 효능 지표이다. TTR 아밀로이드증의 치료를 위한 이러한 임상 효능 지표의 "임상적으로 유의미한 개선"은 기준선, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 사용한 치료 전과 비교할 때 치료 후 혈청 프리알부민 수준의 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 감소를 포함한다. "TTR"은 "프리알부민"과 동의어이지만, "혈청 프리알부민 수준"은 "혈청 TTR 수준"을 측정하기 위한 검정과 비교하여 이 단백질 수준을 측정하기 위한 다른 검정을 나타내고, 두 검정 모두 동일한 단백질을 측정한다.

[0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지질 나노입자"(LNP)는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 회합된 복수의(즉, 하나 초과) 지질 분자를 포함하는 입자를 지칭한다. LNP는, 예를 들어, 마이크로스피어(단일층 및 다중층 소포, 예를 들어, "리포솜"(일부 실시형태에서, 실질적으로 구형인 층상 지질 이중층)을 포함하고, 보다 구체적인 실시형태에서, 예를 들어, 상당한 부분의 RNA 분자를 포함하는 수성 코어를 포함할 수 있음), 에멀션 중 분산된 상, 마이셀 또는 현탁액 중 내상(internal phase)일 수 있다. 예를 들어, 그 내용이 전체가 참조에 의해 본 명세서에 인용된 있는 WO2017173054A1 및 WO2019067992A1을 참조한다.

[0099] 본 명세서에서 사용되는 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 일반적으로 무독성이고, 생물학적으로 바람직하며, 그렇지 않으면 약제학적 용도를 위해 허용 가능한 약제학적 조성물을 제조하는데 유용함을 의미한다.

[0100] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 전신 투여는 정맥내 주입에 의해서 이루어질 수 있다. "주입"은, 예를 들어, 대략 2시간의 주입 시간으로 하나 이상의 작용제의 능동적 투여를 지칭한다. 일부 실시형태에서, LNP, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 Cas 뉴클레아제(예컨대, Cas9)를 암호화하는 mRNA 및 본 명세서에 기재된 gRNA는 인간 대상체에게 전신 투여된다.

[0101] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "주입 예방제"는 예를 들어, 정맥내 스테로이드(예를 들어, 덱사메타손 10 mg); 정맥내 H1 차단제(예를 들어, 다이펜하이드라민 50mg) 또는 경구 H1 차단제(예를 들어, 세티리진 10mg); 및 정맥내 또는 경구 H2 차단제(예를 들어, 파모티딘 20mg)를 투여하는 것을 포함하는, 치료(예를 들어, LNP의 투여 포함) 전에 대상체에게 투여되는 치료법을 지칭한다.

[0102] I. 유전자를 표적화하는 조성물

[0103] 본 명세서에는 인간 대상체의 간 내의 관심 유전자(예를 들어, *TTR*)의 편집 방법, 대상체의 간세포 내의 유전자를 변형시키는 방법 또는 질환을 치료하는 방법뿐만 아니라 이러한 방법에 사용하기 위한 조성물을 포함하는 관련 조성물이 개시된다. 일반적으로, 본 명세서에는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 LNP 조성물이 개시된다. 이러한 방법 및 조성물로 치료되는 대상체, 예를 들어, ATTR wt 또는 ATTR의 유전성(또는 가족성) 형태일 수 있는 ATTR을 갖는 대상체는 관심 서열의 야생형 또는 비-야생형 유전자를 가질 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법은 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA의 생체내 간-표적화 전달을 위한 지질 나노입자 시스템의 전신 투여를 포함한다.

[0105] 1. 가이드 RNA(gRNA)

[0106] 개시된 방법 및 조성물에 사용되는 가이드 RNA는 관심 유전자(예를 들어, *TTR* 유전자)를 표적화하는 가이드 서열을 포함한다. *TTR* 유전자를 표적화하는 예시적인 가이드 서열은 서열 표에 제시되어 있으며, 예시적인 일반 sgRNA 구조 및 가이드 RNA의 보존된 부분도 제시되어 있다. 가이드 서열은 crRNA를 형성하기 위한 추가적인 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 가이드 서열의 3' 단부 다음에 다음의 예시적인 뉴클레오타이드 서열이 있을 수 있다: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG(서열번호 33). sgRNA의 경우, 상기 가이드 서열은 sgRNA를 형성하기 위한 추가 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어 가이드 서열의 3' 단부 다음에 다음의 같은 예시적인 뉴클레오타이드 서열이 5'에서 3' 배향으로 있을 수 있다:

[0107] GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU(서열번호 32). 일부 실시형태에서, gRNA는 일반적인 sgRNA 구조 내에 가이드 서열을 포함할 수 있거나 서열 표에 제시된 예시적인 서열과 같은 가이드 서열 및 sgRNA 보존 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 변형된다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 아래 서열번호 19에 제시된 변형 패턴을 포함하며, 여기서 N은 임의의 자연 또는 비자연 뉴클레오타이드이고, N의 전체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 가이드 서열을 포함하고, 변형된 sgRNA는 다음 서열을 포함하고:

[0108] mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmCmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(서열번호 19), 여기서 "N"은 임의의 자연 또는 비-자연 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, 서열번호 19가 본 명세서에 포함되며, 여기서 N은 본 명세서에 개시된 임의의 가이드 서열로 대체된다. 가이드의 뉴클레오타이드에 대한 N의 치환에도 불구하고 변형은 서열번호 19에 제시된 바와 같이 유지될 수 있다. 즉, 가이드의 뉴클레오타이드가 "N"을 대체하더라도 처음 3개의 뉴클레오타이드는 2'OMe 변형되고 첫 번째와 두 번째 뉴클레오타이드, 두 번째와 세 번째 뉴클레오타이드, 세 번째와 네 번째 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 연결이 존재한다.

[0109] 일부 실시형태에서, gRNA는 뉴클레아제(예를 들어, Cas9 뉴클레아제, 예컨대, SpyCas9)일 수 있는 Cas 뉴클레아제를 표적 DNA 서열로 안내하는 가이드 서열을 포함한다. gRNA는 가이드 서열의 18, 19 또는 20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 crRNA를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 가이드 서열의 적어도 18, 19 또는 20개의 연속적인 뉴클레오타이드와 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 crRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 가이드 서열과 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 crRNA를 포함한다. gRNA는 trRNA를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 각각의 조성물 및 방법 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 단일 RNA(sgRNA)로서 회합될 수 있거나 별개의 RNA(dgRNA) 상에 존재할 수 있다. sgRNA와 관련하여, crRNA 및 trRNA 성분은 예를 들어, 포스포다이에스터 결합 또는 다른 공유 결합을 통해서 공유 연결될 수 있다.

[0110] 일부 실시형태에서, 서열 표에서 sgRNA 서열 및 변형된 서열을 포함하는 가이드 서열이 포함된다.

[0111] 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 서열번호 15, 16, 34, 35 및 38 내지 54 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 sgRNA는 서열번호 15, 16, 34, 35 및 38 내지 54 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 LNP 조성물은 서열번호 15, 16, 34, 35 및 38 내지 54 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분 중 임의의 하나 이상을 포함하는 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함한다.

[0112] 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 서열번호 15 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 sgRNA는 서열번호 15 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 LNP 조성물은 서열번호 15 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분 중 임의의 하나 이상을 포함하는 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 서열번호 16 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 sgRNA는 서열번호 16 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 LNP 조성물은 서열번호 16 또는 이의 18-, 19- 또는 20-뉴클레오타이드 부분 중 임의의 하나 이상을 포함하는 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함한다.

- [illegible]

으로 하는 가이드 RNA를 포함한다.

- [0133] 상기 TTR 가이드 RNA 중 임의의 것은 서열 표의 일반적인 sgRNA 구조를 포함할 수 있거나, 예를 들어, 서열 표에 제시된 바와 같은 가이드 RNA 보존 영역 구조를 포함할 수 있다.
- [0134] 본 명세서에 기재된 각각의 조성물, 용도 및 방법 실시형태에서, 가이드 RNA는 "이중 가이드 RNA" 또는 "dgRNA"로서 2개의 RNA 분자를 포함할 수 있다. dgRNA는 예를 들어, 가이드 서열을 포함하는 crRNA를 포함하는 제1 RNA 분자, 및 예를 들어, trRNA를 포함하는 제2 RNA 분자를 포함한다. 제1 및 제2 RNA 분자는 공유 연결되지 않을 수 있지만, crRNA와 trRNA의 부분 사이의 염기 페어링을 통해 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있다.
- [0135] 본 명세서에 기재된 각각의 조성물, 용도 및 방법 실시형태에서, 가이드 RNA는 "단일 가이드 RNA" 또는 "sgRNA"로서 단일 RNA 분자를 포함할 수 있다. sgRNA는 trRNA에 공유 연결된 가이드 서열을 포함하는 crRNA(또는 이의 일부)를 포함할 수 있다. sgRNA는 가이드 서열의 18개, 19개 또는 20개 또는 그 초과와 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 가이드 서열의 20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, crRNA와 trRNA는 링커를 통해서 공유 연결된다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 crRNA와 trRNA의 부분 사이의 염기 페어링을 통해 스템-루프 구조를 형성한다. 일부 실시형태에서, crRNA와 trRNA는 포스포다이에스터 결합이 아닌 하나 이상의 결합을 통해 공유 연결된다.
- [0136] 일부 실시형태에서, trRNA는 자연 발생 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래되는 trRNA 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, trRNA는 절단된 또는 변형된 야생형 trRNA를 포함한다. trRNA의 길이는 사용되는 CRISPR/Cas 시스템에 좌우된다. 일부 실시형태에서, trRNA는 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개 또는 그 초과와 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, trRNA는, 예를 들어, 하나 이상의 헤어핀 또는 스템-루프 구조 또는 하나 이상의 벌지(bulge) 구조와 같은 2차 구조를 포함할 수 있다.
- [0137] 본 명세서에 제공되는 가이드 RNA는 관심 유전자에서 표적 서열을 인식(예를 들어, 이에 대한 혼성화)하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 관심 표적 서열의 유전자는 가이드 RNA를 포함하는 제공된 Cas 클레아아제에 의해 인식되고 절단될 수 있다. 따라서, Cas 뉴클레아제, 예컨대, Cas 클레아아제는 가이드 RNA에 의해 관심 유전자의 표적 서열로 안내될 수 있고, 가이드 RNA의 가이드 서열은 표적 서열 및 Cas 뉴클레아제, 예컨대, Cas 클레아아제와 혼성화하여 표적 서열을 절단한다.
- [0138] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 가이드 RNA의 선택은 관심 유전자 내의 표적 서열에 기초하여 결정된다.
- [0139] 임의의 특정 이론에 얽매고자 함은 아니지만, 유전자의 특정 영역에서 돌연변이(예를 들어, 뉴클레아제-매개성 DSB의 결과로서 발생하는 indel에서 발생하는 프레임시프트 돌연변이)는 유전자의 다른 영역에서의 돌연변이보다 덜 용인될 수 있으므로, DSB의 위치는 발생할 수 있는 단백질 너다운의 양 또는 유형에 중요한 요소이다. 일부 실시형태에서, 관심 유전자 내의 표적 서열에 상보적이거나 또는 상보성을 갖는 gRNA가 Cas 뉴클레아제를 관심 유전자 내의 특정 위치로 안내하는 데 사용된다.
- [0140] **2. gRNA의 변형**
- [0141] 일부 실시형태에서, gRNA는 화학적으로 변형된다. 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함하는 gRNA는 표준 A, G, C 및 U 잔기 대신 또는 이에 더하여 사용되는 하나 이상의 비-자연 및/또는 자연 발생 성분 또는 구성의 존재를 설명하기 위해 "변형된" gRNA 또는 "화학적으로 변형된" gRNA라고 한다. 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 비-표준 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로 합성되며, 본 명세서에서 "변형된"이라고 한다.
- [0142] 변형된 가이드 RNA는 통상의 RNA, DNA, 혼합 RNA-DNA, 및 이의 유사체인 중합체를 포함한, 골격을 따라 함께 연결된 질소 헤테로사이클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 가이드 RNA "골격"은 당-포스포다이에스터 연결, 포스포로티오에이트 연결 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는 다양한 연결로 구성될 수 있다. 가이드 RNA의 당 모이어티는 리보스, 데옥시리보스, 또는 예를 들어 2' 메톡시 같은 치환을 갖는 유사한 화합물일 수 있다. 질소 염기는 통상적인 염기(A, G, C, T, U), 이의 유사체(예를 들어, 5-메톡시우리딘, 슈도우리딘 또는 N1-메틸 슈도우리딘 등과 같은 변형된 우리딘); 이노신; 퓨린 또는 피리미딘의 유도체(예를 들어, N⁴-메틸 데옥시구아노신, 데아자- 또는 아자-퓨린, 데아자- 또는 아자-피리미딘, 5 또는 6 위치에 치환기가 있는 피리미딘 염기(예를 들어, 5-메틸시토신), 2, 6 또는 8 위치의 치환

기가 있는 퓨린 염기, 2-아미노-6-메틸아미노퓨린, 0⁶-메틸구아닌, 4-티오-피리미딘, 4-아미노-피리미딘, 4-다 이메틸하이드라진-피리미딘 및 0⁴-알킬-피리미딘일 수 있다(미국 특허 제5,378,825호 및 PCT 제WO 93/13121호). 가이드 RNA에 대한 화학적 변형의 일반적인 논의는 문헌[*The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992)]을 참조하기 바란다. 가이드 RNA는 통상적인 RNA 또는 DNA 당, 염기 및 연결만을 포함할 수 있거나, 통상적인 성분 및 치환(예를 들어, 2' 메톡시 연결을 갖는 통상적인 염기 또는 통상적인 염 기 및 하나 이상의 염기 유사체 둘 모두를 함유하는 중합체) 둘 모두를 포함할 수 있다. RNA와 DNA는 서로 다른 당 모이어티를 가지며, RNA에 있는 우라실 또는 이의 유사체와 DNA에 있는 티민 또는 그 유사체의 존재 여부에 따라 다를 수 있다.

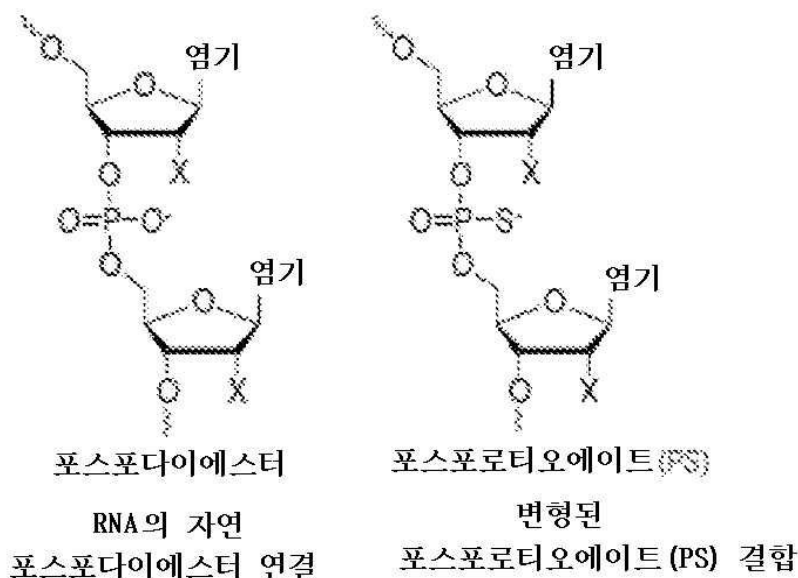
[0143] 변형되지 않은 핵산은 예를 들어 세포내 뉴클레아제 또는 혈청에서 발견되는 것에 의해 분해되기 쉽다. 예를 들 어, 뉴클레아제는 핵산 포스포다이에스터 결합을 가수분해할 수 있다. 따라서, 일 양상에서, 본 명세서에 기재 된 gRNA는 예를 들어, 세포내 또는 혈청-기반 뉴클레아제에 대한 안정성을 도입하기 위해 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다.

[0144] 포스포로티오에이트(PS) 연결 또는 결합은, 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기 사이의 결합의 포스포다이에스터 연결에서 하나의 비브리징 포스페이트 산소가 황으로 치환된 결합을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드를 생성하 기 위해 포스포로티오에이트가 사용될 때, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 S-올리고로도 지칭될 수 있다.

[0145] "*"는 PS 변형을 나타내는 데 사용될 수 있다. 본 출원에서, 용어 A*, C*, U* 또는 G*는 PS 결합으로 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오타이드에 연결되는 뉴클레오타이드를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0146] 본 출원에서, 용어 "mA*", "mC*", "mU*" 또는 "mG*"는 2'-O-Me로 치환되고 PS 결합으로 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오타이드에 연결되는 뉴클레오타이드를 나타내는 데 사용될 수 있다.

[0147] 아래의 다이어그램은 S-를 비브리징 포스페이트 산소로 치환하여 포스포다이에스터 결합 대신 PS 결합을 생성하 는 것을 나타낸다:



[0148]

[0149] 일부 실시형태에서, 5' 말단의 처음 3개, 4개 또는 5개의 뉴클레오타이드 중 하나 이상 및 3' 말단의 마지막 3 개, 4개 또는 5개의 뉴클레오타이드 중 하나 이상이 변형된다. 일부 실시형태에서, 변형은 2'-O-Me, 2'-F, 역전 된 비염기성 뉴클레오타이드, PS 결합 또는 안정성 및/또는 성능을 증가시키기 위해 당업계에 잘 알려진 다른 뉴클레오타이드 변형이다.

[0150] 일부 실시형태에서, 5' 말단의 처음 4개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 4개 뉴클레오타이드가 포스포로 티오에이트(PS) 결합으로 연결된다.

[0151] 일부 실시형태에서, 5' 말단의 처음 3개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 3개의 뉴클레오타이드는 2'- O- 메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0152] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 변형된 sgRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 서열번호 19에 제시된 변형 패턴을 포함하며, 여기서 N은 임의의 자연 또는 비-자연 뉴클레오타이드이고, N의 전체는 뉴클레아제를 표적 서열로 안내하는 가이드 서열을 포함한다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 전문이 본 명세서에 포함된 W00201906787의 표 2 중 임의의 것에 제시된 sgRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 전문이 본 명세서에 포함된 W002019067872의 표 1의 가이드 서열 중 임의의 하나를 포함하는 sgRNA 및 서열번호 32의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 서열번호 32의 뉴클레오타이드는 가이드 서열의 3' 단부 상에 존재하고, 가이드 서열은 서열번호 19에 제시된 바와 같이 변형될 수 있다.
- [0154] **3. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 RNA**
- [0155] 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제, 예컨대, *S. 피오게네스* Cas9를 암호화하는 ORF를 포함하는 임의의 RNA가 본 명세서에 개시된 gRNA 중 임의의 것과 함께 조성물 또는 방법에 조합될 수 있다. 본 명세서에 제시된 실시형태 중 임의의 것에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산은 mRNA일 수 있다.
- [0156] **번역을 증가시키고/시키거나 고도로 발현되는 tRNA에 상응하는 코돈; 예시적인 코돈 세트**
- [0157] 일부 실시형태에서, 핵산은 포유동물, 예컨대, 인간에서 번역을 증가시키는 코돈을 갖는 ORF를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 핵산은 인간의 간과 같은 장기에서 번역을 증가시키는 코돈을 갖는 ORF를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 핵산은 인간의 간세포와 같은 세포 유형에서 번역을 증가시키는 코돈을 갖는 ORF를 포함한다. 간세포, 간 또는 인간 등에서 번역의 증가는 ORF의 야생형 서열의 번역 정도와 관련하여, 또는 ORF가 유래되는 유기체 또는 *S. 피오게네스*, *S. 아우레우스*(*S. aureus*) 또는 또 다른 원핵생물과 같은 아미노산 수준에서 가장 유사한 ORF를 포함하는 유기체의 코돈 분포와 일치하는 코돈 분포를 갖는 ORF, 경우에 따라 하기에 기재된 다른 원핵생물로부터의 Cas 뉴클레아제와 같은 원핵생물-유래 Cas 뉴클레아제에 대해 결정될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 포유동물, 세포 유형, 포유동물의 장기, 인간, 인간의 장기 등에서 Cas9 서열에 대한 번역의 증가는 임의의 적용 가능한 점 돌연변이, 이중 도메인 등을 포함하여 다른 모든 것이 동일한 서열번호 36의 서열을 갖는 ORF의 번역과 관련하여 결정된다 인간의 간 및 인간의 간세포를 포함하여 인간에서 발현을 증가시키는데 유용한 코돈은 문헌[Dittmar KA, *PLoS Genetics* 2(12): e221 (2006)]에 논의되어 있는 인간의 간/간세포에서 고도로 발현되는 tRNA에 상응하는 코돈일 수 있다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 포유동물, 예컨대, 인간에서 고도로 발현되는 tRNA(예를 들어, 각각의 아미노산에 대해 가장 고도로-발현되는 tRNA)에 상응하는 코돈이다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 인간 장기와 같은 포유동물 장기에서 고도로 발현되는 tRNA(예를 들어, 각 아미노산에 대해 가장 고도로-발현되는 tRNA)에 상응하는 코돈이다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 포유동물 간세포, 예컨대, 인간의 간세포에서 고도로 발현되는 tRNA(예를 들어, 각 아미노산에 대해 가장 고도로-발현되는 tRNA)에 상응하는 코돈이다.
- [0158] 대안적으로, 유기체(예를 들어, 인간)에서 고도로 발현되는 tRNA에 상응하는 코돈이 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0159] 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 표 3에 나타난 코돈 세트로부터의 코돈(예를 들어, 낮은 U, 낮은 A 또는 낮은 A/U 코돈 세트)이다. 낮은 A 및 낮은 A/U 세트의 코돈은 표시된 뉴클레오타이드를 최소화하는 코돈을 사용하는 동시에 하나 이상의 옵션을 사용할 수 있는 경우 고도로 발현된 tRNA에 상응하는 코돈을 또한 사용한다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 표 3에 제시된 낮은 U 코돈 세트로부터의 코돈이다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 표 3에 제시된 낮은 A 코돈 세트로부터의 코돈이다. 일부 실시형태에서, ORF에서 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 표 3에 제시된 낮은 A/U 코돈 세트로부터의 코돈이다.

표 3

예시적인 코돈 세트 아미노산	낮은 U	낮은 A	낮은 A/U
Gly	GGC	GGC	GGC
Glu	GAG	GAG	GAG
Asp	GAC	GAC	GAC
Val	GTG	GTG	GTG
Ala	GCC	GCC	GCC
Arg	AGA	CGG	CGG
Ser	AGC	TCC	AGC
Lys	AAG	AAG	AAG
Asn	AAC	AAC	AAC
Met	ATG	ATG	ATG
Ile	ATC	ATC	ATC
Thr	ACC	ACC	ACC
Trp	TGG	TGG	TGG
Cys	TGC	TGC	TGC
Tyr	TAC	TAC	TAC
Leu	CTG	CTG	CTG
Phe	TTC	TTC	TTC
Gln	CAG	CAG	CAG
His	CAC	CAC	CAC

[0160]

[0161] 예시적인 서열

[0162] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 ORF는 서열번호 1 내지 12 및 36과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0163] 일부 실시형태에서, mRNA는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 ORF를 포함하되, Cas 뉴클레아제는 서열번호 13 내지 14 중 임의의 것과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 ORF는 서열번호 1 내지 12 및 36 중 임의의 것으로부터의 표 3에 제공된 서열에 따라서 최적화된 코돈인 서열 또는 서열번호 1 내지 12 및 36 중 임의의 것과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0165] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 제1 서열은 제2 서열에 대한 제1 서열의 정렬이 그 전체적으로 제2 서열의 위치의 X% 이상이 제1 서열에 의해 매치되는 것을 나타내는 경우 제2 서열에 대해 "적어도 X% 동일성을 갖는 서열을 포함하는" 것으로 간주된다. 예시적인 정렬 알고리즘은 당업계에 잘 알려진 Smith-Waterman 및 Needleman-Wunsch 알고리즘이다. 당업자는 정렬될 주어진 서열의 쌍에 대해 알고리즘 및 매개변수 설정의 어떤 선택이 적절한지 이해할 것이고; 일반적으로 유사한 길이의 서열 및 아미노산에 대해 >50% 또는 뉴클레오타이드에 대해 >75%의 예상된 동일성의 경우, www.ebi.ac.uk 웹 서버에서 EBI가 제공하는 Needleman-Wunsch 알고리즘 인터페이스의 기본 설정을 갖는 Needleman-Wunsch 알고리즘이 일반적으로 적절하다.

[0166] RNA, mRNA 및 ORF의 추가 특징

[0167] 본 명세서에 기재된 추가 특징 중 임의의 것은 상기에 기재된 임의의 실시형태와 실행 가능한 정도로 조합될 수 있다.

[0168] 암호화된 Cas 뉴클레아제

[0169] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 클래스 2 Cas 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 이중-가닥 엔도뉴클레아제 활성 또는 니카제 활성으로도 지칭될 수 있는 클리바아제 활성을 갖는다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 클래스 2 Cas 뉴클레아제(이는, 예를 들어, II형, V형 또는 VI형의 Cas 뉴클레아제일 수 있음)를 포함한다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는, 예를 들어, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 및 C2c3 단백질 및 이들의 변형을 포함한다. Cas9 뉴클레아제의 예는 S. 피오게네스, S. 아우레우스 및 기타 원핵생물(예를 들어, 다음 단락의 목록 참조)의 II형 CRISPR 시스템의 것들 및 이들의 변형된(예를 들어, 조작된 또는 돌연변이체) 버전을 포함한다. 예를 들어, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1을 참조하기 바란다. Cas 뉴클레아제의 다른 예는 III형 CRISPR 시스템의 Csm 또는 Cmr 복합체 또는 이들의 Cas10, Csm1 또는 Cmr2 서브 유닛; 및 I형 CRISPR 시스템의 캐스케이드 복합체 또는 이의 Cas3 소단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 IIA형, IIB형 또는 IIC형 시스템으로부터 유래될 수 있다. 다양한 CRISPR 시스템 및 Cas 뉴클레아제에 대한 논의는, 예를 들어, 문헌[Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9:467-477 (2011); Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)]을 참조하기 바란다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas 클레아바제, 예를 들어, Cas9 클레아바제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas 니카제, 예를 들어, Cas9 니카제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, 클레아바제이다.

[0170] Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제가 유래될 수 있는 비제한적인 예시적인 종은 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 종, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 인노쿠아(*Listeria innocua*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*), 올리넬라 숙시노게네스(*Wolinella succinogenes*), 수테렐라 와즈워스시스(*Sutterella wadsworthensis*), 감마프로테오박테리움(*Gammaproteobacterium*), 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 파스테우렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*), 피브로박터 숙시노젠(*Fibrobacter succinogene*), 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 노카디옵시스 다손빌레이(*Nocardiosis dassonvillei*), 스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스, 스트렙토스포란지움 로세움(*Streptosporangium roseumii*), 스트렙토스포란지움 로세움, 알리시클로바실러스 약시도칼다리우스(*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 바실러스 슈도마이코이데스(*Bacillus pseudomycoides*), 바실러스 셀레니티레두센스(*Bacillus selenitireducens*), 엑시구오박테리움 시비리쿰(*Exiguobacterium sibiricum*), 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*), 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 마이크로스킬라 마리나(*Microscilla marina*), 부크홀데리아레스 박테리움(*Burkholderiales bacterium*), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(*Polaromonas naphthalenivorans*), 폴라로모나스 종, 크로코스파에라 와트소니(*Crocospaera watsonii*), 시아노테세 종(*Cyanothece sp.*), 마이크로시스티스 아에루기노사(*Microcystis aeruginosa*), 시네코코커스 종(*Synechococcus sp.*), 아세토할로비움 아라바티쿰(*Acetohalobium arabaticum*), 암모니펙스 데겐시(*Ammonifex degensii*), 칼디셀룰로시럽토 베시(*Caldicelulosiruptor bescii*), 칸디다투스 데술포루디스(*Candidatus Desulfuridis*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 피넨골디아 마그나(*Finegoldia magna*), 나트란에어로비우스 써모필루스(*Natranaerobius thermophilus*), 펠로토마쿨룸 써모프로피오니쿰(*Pelotomaculum thermopropionicum*), 아시디티오바실러스 칼두스(*Acidithiobacillus caldus*), 아시디티오바실러스 페록시단스(*Acidithiobacillus ferrooxidans*), 알로크로마티움 비노숨(*Allochromatium vinosum*), 마리노박터 종(*Marinobacter sp.*), 니트로소코커스 할로필루스(*Nitrosococcus halophilus*), 니트로소코커스 와트소니(*Nitrosococcus watsoni*), 슈도알테로모나스 할로플랑크티스(*Pseudoalteromonas haloplanktis*), 크테도노박터 라세미페르(*Ktedonobacter racemifer*), 메타노할로비움 에베스티가툼(*Methanohalobium evestigatum*), 아나바에나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*), 노둘라리아 스푼미게나(*Nodularia spumigena*), 노스톡 종(*Nostoc sp.*), 아르트로스피라 막시마(*Arthrospira maxima*), 아르트로스피라 플라텐시스(*Arthrospira platensis*), 아르트로스피라 종, 링비아 종(*Lyngbya sp.*), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(*Microcoleus chthonoplastes*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria sp.*), 페트로토가 모빌리스(*Petrotoga mobilis*), 써모시포 아프리카누스(*Thermosipho africanus*), 스트렙토코커스 파스테우리아누스(*Streptococcus pasteurianus*), 네이세리아 시네레아(*Neisseria cinerea*), 캄필로박터 라리(*Campylobacter lari*), 파비바쿨룸 라바멘티보란스(*Parvibaculum lavamentivorans*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*), 아시다미노코커스 종(*Acidaminococcus sp.*), 라크노스피라세아에 박테리움

ND2006(*Lachnospiraceae bacterium* ND2006) 및 아카리오클로리스 마리나(*Acaryochloris marina*)를 포함한다.

[0171] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 피오게네스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 써모필루스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 네이세리아 메니지티디스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스타필로코커스 아우레우스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 노비시다로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 아시다미노코커스 종으로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 라크노스피라세아에 박테리움 ND2006으로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 추가의 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 라크노스피라세아에 박테리움, 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스(*Butyrivibrio proteoclasticus*), 페레그린박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium*), 파르쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium*), 스미텔라(*Smithella*), 아시다미노코커스, 칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼(*Candidatus Methanoplasma termitum*), 유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*), 모락셀라 보보쿨리(*Moraxella bovoculi*), 렙토스피라 이나다이(*Leptospira inadai*), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas crevioricanis*), 프레보텔라 디시엔스(*Prevotella disiens*) 또는 포르피로모나스 마카카에(*Porphyromonas macacae*)로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 특정 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 아시다미노코커스 또는 라크노스피라세아에로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다.

[0172] 야생형 Cas9는 2개의 뉴클레아제 도메인: RuvC 및 HNH를 갖는다. RuvC 도메인은 비-표적 DNA 가닥을 절단하고, HNH 도메인은 DNA의 표적 가닥을 절단한다. 일부 실시형태에서, Cas9 뉴클레아제는 하나 초과와 RuvC 도메인 및/또는 하나 초과와 HNH 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas9 뉴클레아제는 야생형 Cas9이다. 일부 실시형태에서, Cas9 뉴클레아제는 표적 DNA에서 이중 가닥 절단을 유도할 수 있다.

[0173] 일부 실시형태에서, 단백질의 하나의 도메인 또는 영역이 상이한 단백질의 일부로 대체된 키메라 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제 도메인은 Fok1과 같은 상이한 뉴클레아제로부터의 도메인으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 변형된 뉴클레아제일 수 있다.

[0174] 다른 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 I형 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 I형 CRISPR/Cas 시스템의 캐스케이드 복합체의 성분일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas3 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 III형 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 RNA 절단 활성을 가질 수 있다.

[0175] 폴리-A 테일

[0176] 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 폴리-아데닐화된(폴리-A) 테일을 더 포함한다. 일부 예에서, 폴리-A 테일은 폴리-A 테일 내의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드 "앵커"로 "단절"된다. 폴리-A 테일은 적어도 8개의 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있지만, 일부 실시형태에서 폴리-A 테일은 또한 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "비-아데닌 뉴클레오타이드"는 아데닌을 포함하지 않는 임의의 자연 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 지칭한다. 구아닌, 티민 및 사이토신 뉴클레오타이드는 예시적인 비-아데닌 뉴클레오타이드이다. 따라서, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA) 상의 폴리-A 테일은 관심 Cas 뉴클레아제 또는 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, mRNA 상의 폴리-A 테일은 Cas 뉴클레아제 또는 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 비-연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하되, 비-아데닌 뉴클레오타이드는 규칙적인 또는 불규칙한 간격으로 아데닌 뉴클레오타이드를 단절한다.

[0177] 일부 실시형태에서, 폴리-A 테일은 mRNA의 시험관내 전사에 사용되는 플라스미드에 암호화되어 전사체의 일부가 된다. 플라스미드에 암호화된 폴리-A 서열, 즉, 폴리-A 서열에서 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드의 수는 정확하지 않을 수 있고, 예를 들어, 플라스미드에서 100개의 폴리-A 서열은 전사된 mRNA에서 정확히 100개의 폴리-A 서열을 생성하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리-A 테일은 플라스미드에 암호화되지 않으며, 예를 들어, 이. 콜라이 폴리(A) 중합효소를 사용하여 PCR 테일링(tailing) 또는 효소적 테일링에 의해 첨가된다.

[0178] UTR; 코작 서열

[0179] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)는 5' UTR, 3' UTR 또는 5' 및 3' UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 하이드록시스테로이드 17-베타 데하이드로게나제

4(HSD17B4 또는 HSD)로부터의 적어도 하나의 UTR, 예를 들어, HSD로부터의 5' UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA(예를 들어, mRNA)는 글로빈 mRNA, 예를 들어, 인간 알파 글로빈(human alpha globin: HBA) mRNA, 인간 베타 글로빈(human beta globin: HBB) mRNA 또는 제노푸스 라에비스 베타 글로빈(Xenopus laevis beta globin: XBG) mRNA로부터의 적어도 하나의 UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 HBA, HBB 또는 XBG와 같은 글로빈 mRNA로부터의 5' UTR, 3' UTR 또는 5' 및 3' UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus: CMV), 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB 또는 XBG로부터의 5' UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스, 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB 또는 XBG로부터의 3' UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스, 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB, XBG, 열충격 단백질 90(heat shock protein 90: Hsp90), 글리세르 알데하이드 3-포스페이트 탈하이드로게네이스(GAPDH), 베타-액틴, 알파-튜불린, 종양 단백질(p53) 또는 상피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR)로부터의 5' 및 3' UTR을 포함한다.

[0180] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 동일한 공급원, 예를 들어, 액틴, 알부민, 또는 HBA, HBB 또는 XBG와 같은 글로빈과 같은 구성적으로 발현된 mRNA로부터 유래된 5' 및 3' UTR을 포함한다.

[0181] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)는 코작 서열을 포함한다. 코작 서열은 당업계에 공지되어 있다. 코작 서열은 번역된 개시 및 핵산으로부터 번역된 폴리펩타이드의 전반적인 수율에 영향을 미칠 수 있다. 코작 서열은 시작 코돈으로 기능할 수 있는 메티오닌 코돈을 포함한다. 최소 코작 서열은 NNNRUGN이되, 다음 중 적어도 하나가 참이다: 첫 번째 N은 A 또는 G이고, 두 번째 N은 G이다. 뉴클레오타이드 서열의 맥락에서, R은 퓨린(A 또는 G)을 의미한다. 일부 실시형태에서, 코작 서열은 미스매치가 0개이거나 또는 소문자로 된 위치에 최대 1개, 2개의, 3개의 또는 4개의 미스매치가 있는 gccgccRccAUGG(서열번호 37)이다.

[0182] **변형된 뉴클레오타이드**

[0183] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 ORF를 포함하는 mRNA는 일부 또는 모든 우리딘 위치에 변형된 우리딘을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 예를 들어, 할로겐 또는 C1-C3 알콕시로 5 번 위치에서 변형된 우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 예를 들어, C1-C3 알킬로 1번 위치에서 변형된 슈도우리딘이다. 변형된 우리딘은 예를 들어, 슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-아이오도우리딘 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-메톡시우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다.

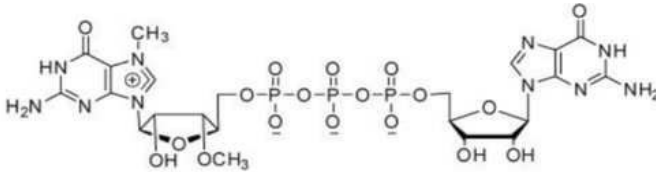
[0184] 일부 실시형태에서, 핵산에서 우리딘 위치의 적어도 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%는 변형된 우리딘이다. 일부 실시형태에서, 핵산에서 우리딘 위치의 85 내지 95% 또는 90 내지 100%는 변형된 우리딘, 예를 들어, N1-메틸 슈도우리딘, 슈도우리딘 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 핵산에서 우리딘 위치의 85 내지 95% 또는 90 내지 100%는 슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 핵산에서 우리딘 위치의 85 내지 95% 또는 90 내지 100%는 N1-메틸 슈도우리딘이다.

[0185] **5' 캡**

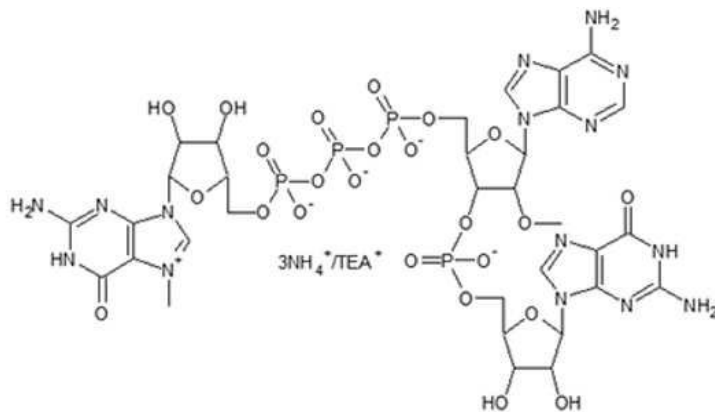
[0186] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제(예를 들어, Cas9)를 암호화하는 ORF를 포함하는 mRNA는 5' 캡, 예컨대, 캡 0, 캡1 또는 캡2를 포함한다. 5' 캡은 일반적으로 5'-트라이포스페이트를 통해 핵산의 5'에서 3' 사슬로의 제1 뉴클레오타이드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오타이드(예를 들어, ARCA와 관련하여 아래에서 논의되는 바와 같이 추가로 변형될 수 있음), 즉, 제1 캡-인접 뉴클레오타이드이다. 캡0에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-인접 뉴클레오타이드의 리보스는 둘 다 2'-하이드록실을 포함한다. 캡1에서, mRNA의 제1 및 제2 전사된 뉴클레오타이드의 리보스는 각각 2'-메톡시 및 2'-하이드록실을 포함한다. 캡2에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-인접 뉴클레오타이드의 리보스는 둘 다 2'-메톡시를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115]을 참조한다.

[0187] 캡은 공동-전사적으로(co-transcriptionally) RNA에 포함될 수 있다. 예를 들어, ARCA(항-역전 캡 유사체(anti-reverse cap analog); Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 AM8045)는 개시 시 시험관 내에서 전사

체에 통합될 수 있는 구아닌 리보뉴클레오타이드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 3'-메톡시-5'-트라이포스페이트를 포함하는 캡 유사체이다. ARCA는 제1 캡-인접 뉴클레오타이드의 2' 위치가 하이드록실인 캡0 캡을 생성한다. 예를 들어, 문헌[Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'deoxy)GpppG," *RNA* 7: 1486-1495]을 참조하기 바란다. ARCA 구조는 아래에 나타나 있다.



CleanCap™ AG(m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7113) 또는 CleanCap™ GG(m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7133)가 공동-전사적으로 캡1 구조를 제공하기 위해 사용될 수 있다. CleanCap™ AG 및 CleanCap™ GG의 3'-O-메틸화된 버전이 또한 TriLink Biotechnologies로부터 각각 카탈로그 번호 N-7413 및 N-7433으로 입수 가능하다. CleanCap™ AG 구조는 아래에 나타나 있다. CleanCap™ 구조는 때로는 상기에 열거된 카탈로그 번호의 마지막 세 자리를 이용하여 본 명세서에서 지칭된다(예를 들어, TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7113의 경우 "CleanCap™ 113").



대안적으로, 캡은 전사후 단계에서(post-transcriptionally) RNA에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 백시니아 캡핑 효소는 상업적으로 이용 가능하며 New England Biolabs 카탈로그 번호 M2080S), D1 소단위에 의해 제공되는 RNA 트라이포스파테이스 및 구아닐릴트랜스퍼라제 활성 및 D12 소단위에 의해 제공되는 구아닌 메틸트랜스퍼라제 활성을 갖는다. 이와 같이, S-아데노실 메티오닌 및 GTP의 존재 하에 캡0을 제공하기 위해 RNA에 7-메틸구아닌을 첨가할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Guo, P. and Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479]을 참조하기 바란다. 캡 및 캡핑 접근법의 추가적인 논의의 경우, 예를 들어, W02017/053297 및 문헌[Ishikawa et al., *Nucl. Acids. Symp. Ser.* (2009) No. 53, 129-130]을 참조하기 바란다.

4. 핵산 조성물의 전달

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 가이드 RNA를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 관심 유전자(예를 들어, *TTR*)에 이중 가닥 파손(double-stranded break: DSB)을 유도하거나 유전자 편집하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 관심 유전자에서 DSB를 유도하기 위해서 가이드 서열 중 하나 이상이 투여된다. 가이드 RNA는 Cas 뉴클레아제(예를 들어, Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA는 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A를 포함하는 LNP로 투여된다. 추가 실시형태에서, LNP는 지질 A, 보조 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 지질 성분을 포함한다.

일부 실시형태에서, 가이드 RNA, 예컨대, 화학적으로 변형된 가이드 RNA를 포함하는 LNP 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 관심 유전자(예를 들어, *TTR*)에 이중 가닥 파손(DSB)을 유도하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 관심 유전자에서 DSB를 유도하기 위해서 sgRNA 중 하나 이상이 투여된다. 가이드 RNA는 Cas 뉴클레아제

(예를 들어, Cas9)를 암호화하는 본 명세서에 기재된 RNA와 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA는 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0195] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA, 예컨대, 화학적으로 변형된 가이드 RNA를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 관심 유전자(예를 들어, *TTR*)를 변형시키는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 관심 유전자를 변형시키기 위해서 sgRNA 중 하나 이상이 투여된다. 가이드 RNA는 Cas 뉴클레아제(예를 들어, Cas9)를 암호화하는 본 명세서에 기재된 RNA와 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA는 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 질환(예를 들어, ATTR)을 치료하는 방법에 제공된다. 가이드 RNA는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 본 명세서에 기재된 RNA와 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0197] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는 유전자 산물(예를 들어, TTR)을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물의 축적을 감소시키거나 예방하기 위해서 가이드 서열 중 하나 이상을 포함하는 gRNA가 투여된다. gRNA는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 핵산과 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA는 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0198] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는 유전자 산물 농도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물의 축적을 감소시키거나 예방하기 위해서 가이드 서열 중 하나 이상을 포함하는 gRNA가 투여된다. gRNA는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 핵산과 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA는 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0199] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는 대상체의 유전자 산물의 축적을 감소시키거나 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, sgRNA 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체의 유전자 산물의 축적을 감소시키거나 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 아밀로이드 또는 아밀로이드 원섬유에서 TTR의 축적을 감소시키거나 예방하기 위해서 하나 이상의 가이드 서열을 포함하는 gRNA가 투여된다. gRNA는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 RNA와 함께 투여된다. Cas 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9이다. 특정 실시형태에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 본 명세서에 기재된 LNP, 예컨대, 지질 A, 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤), 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG) 및 선택적으로 중성 지질(예를 들어, DSPC)을 포함하는 LNP로 투여된다.

[0200] 일부 실시형태에서, 핵산으로부터 번역된 Cas 뉴클레아제와 함께 가이드 서열을 포함하는 gRNA는 DSB를 유도하고, 복구 중 비상동 말단 연결(non-homologous ending joining: NHEJ)은 *TTR* 유전자에서 돌연변이를 유발한다. 일부 실시형태에서, NHEJ는 뉴클레오타이드(들)의 결실 또는 삽입을 유발하여, *TTR* 유전자에서 프레임 시프트 또는 넌센스 돌연변이를 유도한다.

[0201] 5. 지질 조성물

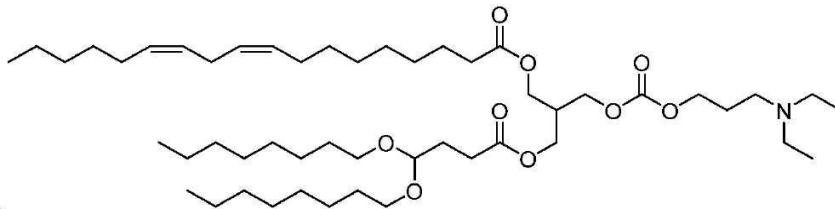
[0202] 일부 실시형태에서, gRNA 및 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas 9를 암호화하는 본 명세서에 기재된 핵산을 포함

하는, 본 명세서에 기재된 핵산 조성물은 지질 나노입자로 제형화되거나 이를 통해 투여된다: 예를 들어, WO2017173054A1(발명의 명칭: "LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS") 및 WO2019067992A1(발명의 명칭: "FORMULATIONS")을 참조하기 바람, 이들의 내용은 특히 이들 특허에 개시된 LNP 조성물에서 이들의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 치료 RNA를 대상체에게 전달할 수 있는 것으로 당업자에게 공지된 지질 나노입자(LNP)는 본 명세서에 기재된 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산과 함께 활용될 수 있다.

[0203] LNP를 포함하는 조성물은 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 성분과 함께 2개의 활성 물질, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 RNA를 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 결합된 다수의(즉, 1개 초과) 지질 분자를 포함하는 입자를 의미한다.

[0204] 이온화 가능한 지질

[0205] CRISPR/Cas mRNA 및 가이드 RNA 성분을 간 세포에 전달하기 위한 지질 조성물은 지질 A를 포함할 수 있는데, 이것은 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트, also called 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔오에이트이다. 지질 A는 다음과 같이 도시될 수 있다:



[0206]

[0207] 지질 A는 WO2015/095340(예를 들어, pp. 84-86)에 따라서 합성될 수 있다.

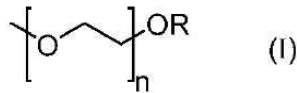
[0208] 추가 지질

[0209] 본 개시내용의 지질 조성물에서 사용에 적합한 "중성 지질"은, 예를 들어, 여러 가지의 중성, 비하전된 또는 쌍비터이온성 지질을 포함한다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 중성 인지질의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 5-헵타데실벤젠-1,3-다이올(레조르시놀), 다이팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 다이스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 포스포콜린(DOPC), 다이미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 포스파티딜콜린(PLPC), 1,2-디다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DAPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디라우틸로일포스파티딜콜린(DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린(PSPC), 1,2-다이아라키돈일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(SPPC), 1,2-다이에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DEPC), 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 라이소포스파티딜 콜린, 다이올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디리놀레오일포스파티딜콜린 다이스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 다이미리스토일 포스파티딜에탄올아민(DMPE), 다이팔미토일 포스파티딜에탄올아민(DPPE), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민(POPE), 라이소포스파티딜에탄올아민 및 이의 조합. 일 실시형태에서, 중성 인지질은 다이스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 및 다이미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPE)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 중성 인지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)일 수 있다.

[0210] "헬퍼 지질"은 스테로이드, 스테롤 및 알킬 레조르시놀을 포함한다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 헬퍼 지질은 콜레스테롤, 5-헵타데실레조르시놀, 및 콜레스테롤 헤미석시네이트를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤일 수 있다.

[0211] "스텔스 지질"은 나노입자가 생체내(예를 들어, 혈액에서) 실존할 수 있는 시간의 기간을 변경시키는 지질이다. 스텔스 지질은 예를 들어, 입자 응집을 감소시키고, 입자 크기를 제어함으로써, 제형화 과정을 지원할 수 있다. 본 명세서에 사용된 스텔스 지질은 상기 LNP의 약동학 성질을 조절할 수 있다. 본 개시내용의 지질 조성물에 사용하기에 적합한 스텔스 지질은 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 전형적으로 PEG 지질은 지질 모이어티 및 PEG를 기반으로 하는 중합체 모이어티를 포함한다. 약 2,000달톤의 평균 분자량을 갖는 "PEG-2000"으로도 지칭되는 "PEG-2K"를 포함하는 지질을 포함하여 당업계에 공지된 PEG 지질이 고려된다. PEG-2K는 본 명세서에서 하기 화학식 (I)로 표시되며, 여기서 n은 45이며, 이는 수평균 중합도가 약 45개의 소단위를 포함함을 의미한다.

그러나, 당업계에 공지된 다른 PEG 실시형태가 사용될 수 있다.



[0212]

[0213]

본 명세서에 기재된 임의의 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-다이라우로일글리세롤, PEG-다이미리스토일글리세롤(PEG-DMG)(NOF(일본, 도쿄 소재)의 카탈로그 번호 GM-020), PEG-다이팔미토일글리세롤, PEG-다이스테아로일글리세롤(PEG-DSPE)(카탈로그 번호 DSPE-020CN, NOF(일본, 도쿄 소재)), PEG-다이라우릴글리카마이드, PEG-다이미리스틸글리카마이드, PEG-다이팔미토일글리카마이드 및 PEG-다이스테아로일글리카마이드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카복사미도-3',6'-다이옥사옥탄일]카바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-다이테트라데코실벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜)에터), 1,2-다이미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DMPE) 또는 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG2k-DMG), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSPE)(Avanti Polar Lipids(미국, 앨라배마주 앨라바스터 소재)의 카탈로그 번호 880120C), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG2k-DSG; GS-020, NOF(일본, 도쿄 소재)), 폴리(에틸렌 글리콜)-2000-다이메타크릴레이트(PEG2k-DMA) 및 1,2-다이스테아릴옥시프로필-3-아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSA)로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG일 수 있다.

[0214]

일부 실시형태에서, PEG 지질은 글리세롤기를 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 다이미리스토일글리세롤(DMG)기를 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 PEG2k를 포함한다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-DMG이다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 실시형태에서, PEG 지질은 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000이다. 일부 실시형태에서, PEG2k-DMG 지질은 1,2-다이미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000이다.

[0215]

LNP 제형

[0216]

LNP 조성물은 지질 성분, 및 Cas 뉴클레아제 mRNA(예를 들어, 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대, a Cas9 mRNA) 및 gRNA를 포함하는 RNA 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 RNA 성분으로서의 gRNA를 포함한다. 특정 실시형태에서, LNP 조성물은 RNA 성분, 지질 A, 헬퍼 지질, 중성 지질 및 스텔스 지질을 포함할 수 있다. 특정 LNP 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 특정 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. 추가적인 실시형태에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다.

[0217]

특정 실시형태에서, 지질 조성물은 제형 중의 성분 지질의 각각의 몰비에 따라서 기재된다. 본 개시내용의 실시형태는 제형 중의 성분 지질의 각각의 몰비에 따라서 기재된 지질 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, 이온화 가능한 지질, 예컨대, 지질 A의 몰-%는 약 40몰-% 내지 60몰-%, 선택적으로 약 50몰-%일 수 있다. 일 실시형태에서, 이온화 가능한 지질의 몰-%는 약 55몰-%일 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 배취의 이온화 가능한 지질 몰-%는 목표몰-%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 실시형태에서, LNP 배취의 이온화 가능한 지질 몰-%는 목표 몰-%의 $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1.5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$ 또는 $\pm 0.25\%$ 일 것이다. 모든 몰-% 숫자는 LNP 조성물의 지질 성분의 분율로서 제공된다.

[0218]

일 실시형태에서, 중성 지질, 예를 들어, 중성 인지질의 몰-%는 약 5몰-% 내지 15몰-%, 선택적으로 약 9몰-%일 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 배취의 중성 지질 몰-%는 목표 중성 지질 몰-%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다.

[0219]

일 실시형태에서, 헬퍼 지질의 몰-%는 약 20몰-% 내지 60몰-%일 수 있다. 일 실시형태에서, 헬퍼 지질의 몰-%는 약 25몰-% 내지 55몰-%일 수 있고, 선택적으로, 헬퍼 지질의 몰-%는 약 30몰-% 내지 40몰-%일 수 있다. 일 실시형태에서, 헬퍼 지질의 몰-%는 이온화 가능한 지질, 중성 지질 및 PEG 지질 농도에 기초하여 지질 성분이 100몰-%가 되도록 조정된다. 일 실시형태에서, 헬퍼 지질의 몰-%는 이온화 가능한 지질 및 PEG 지질 농도에 기초하여 지질 성분이 적어도 99몰-%가 되도록 조정된다. 일부 실시형태에서, LNP 배취의 헬퍼 몰-%는 목표몰-%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다.

[0220]

일 실시형태에서, PEG 지질의 몰-%는 약 1몰-% 내지 10몰-%일 수 있다. 일 실시형태에서, PEG 지질의 몰-%는 약 2몰-% 내지 4몰-%일 수 있다. 일 실시형태에서, PEG 지질의 몰-%는 약 2.5몰-% 내지 4몰-%일 수 있다. 일 실시

형태에서, PEG 지질의 몰-%는 약 3몰-%일 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 배치의 PEG 지질 몰-%는 목표 PEG 지질 몰-%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다.

[0221] 특정 실시형태에서, 카고는 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas 뉴클레아제, 클래스 2 Cas 뉴클레아제 또는 Cas9)를 암호화하는 핵산(예를 들어, mRNA) 및 gRNA를 포함한다. 일 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 지질 A이다. 다양한 실시형태에서, LNP 조성물은 이온화 가능한 지질(예를 들어 지질 A), 중성 지질, 헬퍼 지질 및 PEG 지질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 특정 실시형태에서, 중성 지질은 DSPC이다. 구체적인 실시형태에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 지질 A, 헬퍼 지질, 중성 지질 및 PEG 지질을 포함할 수 있다. 추가 실시형태에서, LNP 조성물은 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG를 포함한다.

[0222] 본 개시내용의 실시형태는 또한 이온화 가능한 지질(N)의 양으로 하전된 이온화 가능한 기와 캡슐화된 핵산의 음으로 하전된 포스페이트기(P) 사이의 몰비에 따라 기재된 지질 조성물을 제공한다. 이는 수학적으로 N/P 비율로 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 이온화 가능한 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질 및 PEG 지질을 포함하는 지질 성분; 및 핵산 성분을 포함할 수 있고, N/P 비율은 약 3 내지 10이다. 일 실시형태에서, N/P 비율은 약 5 내지 7일 수 있고, 선택적으로 N/P 비율은 약 6일 수 있다. 일 실시형태에서, N/P 비율은 6 ± 1 일 수 있다. 일 실시형태에서, N/P 비율은 6 ± 0.5 일 수 있다. 일부 실시형태에서, N/P 비율은 목표 N/P 비율의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다.

[0223] 일부 실시형태에서, RNA 성분은 RNA, 예컨대, 본 명세서에 개시된, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 Cas 뉴클레아제(예컨대, 본 명세서에 기재된 Cas9 mRNA)를 암호화하는 핵산, 및 본 명세서에 기재된 gRNA를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA 성분은 본 명세서에 기재된 Cas 뉴클레아제 mRNA 및 본 명세서에 기재된 gRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, RNA 성분은 본 명세서에 기재된 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA 및 본 명세서에 기재된 gRNA를 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것에서, gRNA는 본 명세서에 기재된 sgRNA, 예컨대, 본 명세서에 기재된 화학적으로 변형된 sgRNA일 수 있다.

[0224] 특정 실시형태에서, LNP 조성물은 본 명세서에 기재된 Cas 뉴클레아제 mRNA(예컨대, 클래스 2 Cas mRNA) 및 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 gRNA를 포함한다. 특정 실시형태에서, LNP 조성물은 약 10:1 내지 1:10의 gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대, 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA 비율을 포함한다. 일부 실시형태에서 gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대, 클래스 2 Cas 뉴클레아제의 비율은 약 1:1이다. 일부 실시형태에서 gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대, 클래스 2 Cas 뉴클레아제의 비율은 약 1:2이다. 일부 실시형태에서 gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대, 클래스 2 Cas 뉴클레아제의 비율은 약 1:3이다.

[0225] 일부 실시형태에서, LNP는 수성 RNA 용액을 유기 용매-기반 지질 용액, 예를 들어, 100% 에탄올과 혼합함으로써 형성된다. 적합한 용액 또는 용매는 다음을 포함하거나 함유할 수 있다: 물, PBS, Tris 완충제, NaCl, 시트레이트 완충제, 에탄올, 클로로폼, 다이에틸에터, 사이클로헥산, 테트라하이드로퓨란, 메탄올, 아이소프로판올. 예를 들어, LNP의 생체내 투여를 위한 약제학적으로 허용 가능한 완충제가 사용될 수 있다.

[0226] 일부 실시형태에서, 미세유체 혼합, T-혼합 또는 교차 혼합이 사용된다. 특정 양상에서, 유량, 접합부 크기, 접합부 기하구조, 접합부 형상, 튜브 직경, 용액 및/또는 RNA 및 지질 농도는 다양할 수 있다. LNP 또는 LNP 조성물은 예를 들어, 투석, 접선 유동 여과 또는 크로마토그래피를 통해 농축되거나 정제될 수 있다. LNP는 지질 A; DSPC; 콜레스테롤; 및 DMG-PEG2k를 포함하는 4종의 지질로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP는 50mM Tris, 45mM NaCl 및 5%(w/v) 수크로스, pH 7.4의 수성 완충액에 현탁되고 제형화된다.

[0227] 동적 광 산란 ("DLS")는 본 개시내용의 LNP의 다분산도 지수 ("pdi") 및 크기를 특징구명하는 데 사용될 수 있다. DLS는 샘플을 광원에 적용함으로써 발생하는 광의 산란을 측정한다. DLS 측정으로부터 결정된 바와 같이, PDI는, 0의 PDI를 갖는 완벽하게 균일한 집단으로, 집단에서 입자 크기(대략적인 평균 입자 크기)의 분포를 나타낸다.

[0228] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 LNP는 50 내지 100 nm의 크기를 갖는다. 일부 실시 형태에서, LNP는 85 내지 90 nm의 크기를 갖는다. 달리 제시하지 않는 한, 본 명세서에 언급된 모든 크기는 Malvern Zetasizer에서 동적 광산란에 의해 측정된 완전히 형성된 나노입자의 평균 크기(직경)이다. 나노입자 샘플은 인산염 완충 식염수(PBS)에 희석되어 계수율이 약 200 내지 400kcts이다. 테이터는 강도 측정치의 가중 평균으로 표시된다.

[0229] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 ATTR을 치료하기 위한 의약을 제조하는 데 사용하기

위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 ATTR을 갖는 대상체에서 아밀로이드 또는 아밀로이드 원섬유에서 TTR의 축적 및 응집을 감소시키거나 예방하기 위한 의약을 제조하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 혈청 TTR 농도를 감소시키기 위한 의약을 제조하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 혈청 프리알부민 농도를 감소시키기 위한 의약을 제조하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 대상체, 예컨대, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예컨대, 인간에서 ATTR을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 ATTR을 갖는 대상체, 예컨대, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예컨대, 인간에서 아밀로이드 또는 아밀로이드 원섬유에서 TTR의 축적 및 응집을 감소시키거나 예방하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 대상체, 예컨대, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예컨대, 인간에서 혈청 TTR 농도를 감소시키는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 gRNA 및 본 명세서에 개시된 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9, Spy Cas9)를 암호화하는 RNA(예를 들어, mRNA)와 회합된 LNP는 대상체, 예컨대, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예컨대, 인간에서 혈청 프리알부민 농도를 감소시키는 데 사용하기 위한 것이다.

[0230] 일부 예에서, 지질 성분은, 48 내지 53몰-%의 지질 A; 약 8 내지 10몰-%의 DSPC; 및 1.5 내지 10몰-%의 PEG 지질(PEG2k-DMG)을 포함하되, 지질 성분의 잔부는 콜레스테롤이고, LNP 조성물의 N/P 비율은 3 내지 8 ±0.2이다.

[0231] 일부 실시형태에서, LNP는 지질 성분을 포함하며, 지질 성분은 약 50몰-%의 이온화 가능한 지질, 예컨대, 지질 A; 약 9몰-%의 중성 지질, 예컨대, DSPC; 약 3몰-%의 스텔스 지질, 예컨대, PEG 지질, 예컨대, PEG2k-DMG를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지고, 지질 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤이고, LNP 조성물의 N/P 비율은 약 6이다. 일부 실시형태에서, 이온화 가능한 지질은 지질 A이다. 일부 실시형태에서, 중성 지질은 DSPC이다. 일부 실시형태에서, 스텔스 지질은 PEG 지질이다. 일부 실시형태에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 일부 실시형태에서, LNP는 지질 성분을 포함하며, 지질 성분은 약 50몰-%의 지질 A; 약 9몰-%의 DSPC; 약 3몰-%의 PEG2k-DMG를 포함하고, 지질 성분의 잔부는 콜레스테롤이고, LNP 조성물의 N/P 비율은 약 6이다.

[0232] II. 전신 전달 방법

[0233] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물은 전신 투여된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 전신 투여는 유기체 내로의 넓은 생물분포, 예를 들어, 정맥내 투여, 복강내 주사 등을 지칭한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물의 단일 투여는 표적 단백질의 발현을 낮추는 데 충분하다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 단일 투여는 세포의 집단에서 표적 단백질의 발현을 낮추는 데 충분하다. 다른 실시형태에서, LNP 조성물의 1회 초과 투여는 누적 효과를 통해서 편집을 최대화하는 데 유익할 수 있다. 예를 들어, LNP 조성물은 제2 또는 제3 시간("후속 용량"), 예를 들어, 제2 용량 또는 제3 용량으로 투여될 수 있다. 제2 용량 또는 제3 용량은 기준선 수준(예를 들어, 제1 LNP 투여 전 수준)과 비교할 때 혈청 TTR 및/또는 혈청 프리알부민의 예를 들어, 약 또는 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과 감소를 제공하기 위해서 임상의에 의해서 결정될 수 있다. 1회 초과 투여(제2 용량 또는 제3 용량)는 제1 용량이 투여되는 방법과 관계 없이(체중-기반 또는 고정 용량) 체중-기반(예를 들어, 0.7mg/kg 또는 1.0mg/kg) 또는 고정 용량(예를 들어, 약 60mg, 70mg, 80mg 또는 90mg)으로서 투여될 수 있다.

[0235] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 약 2시간 내지 4시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 약 2시간 내지 3시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 약 3시간 내지 4시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 약 4시간 내지 5시간의 주

입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 약 4시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 적어도 2시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 적어도 3시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물은 적어도 4시간의 주입 시간으로의 주입에 의해서 투여된다.

III. 용량

1. 체중-기반 용량

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA(전체 또는 합한 RNA)를 포함하는) LNP 조성물은 체중-기반 용량을 사용하여 투여된다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.1mg/kg 내지 2mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg 내지 1mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.1mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.7mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 1mg/kg이다. LNP 조성물은, LNP 조성물 - 총 RNA를 기준으로 투여되는 경우 -이 유효량의 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 투여한다는 점에서 유효량으로 투여될 수 있다.

다른 실시형태에서, 0.1mg/kg 용량을 제공받는 대상체는 누적 효과를 통해서 편집을 최대화하기 위해서 LNP 조성물의 1회 초과 투여를 제공받을 수 있다. 예를 들어, LNP 조성물은 2, 3, 4, 5회 초과, 예컨대, 2회 - 예를 들어, 제2 투여, 제3 투여, 제4 투여 또는 제5 투여로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있는 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 *TTR*의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 ELISA에 의해서 측정되는 경우 혈청 *TTR*의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 *TTR*의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 질량 분석법 또는 ELISA에 의해서 측정되는 경우 혈청 *TTR*의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 프리알부민의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 탁도 검정에 의해서 측정되는 경우 혈청 프리알부민의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 프리알부민의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 혈청 프리알부민의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다.

2. 고정 용량

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA(전체 또는 합한 용량)를 포함하는) LNP 조성물은 고정 용량을 사용하여 투여된다. 고정 용량은 인간 대상체에서 약 25 내지 150mg일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 5mg 내지 75mg, 선택적으로 약 25mg 내지 75mg, 약 25mg 내지 60mg, 약 25mg 내지 80mg 또는 약 25mg 내지 115mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 50mg 내지 150mg, 선택적으로 약 50mg 내지 100mg 또는 약 75mg 내지 150mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 5mg 내지 9mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 15mg 내지 27mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량

이 약 50mg 내지 90mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 35mg 내지 65mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 5mg 내지 180mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 50mg 내지 70mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 60mg 내지 80mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 70mg 내지 90mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 80mg 내지 100mg이다. LNP 조성물은, LNP 조성물 - 총 RNA를 기준으로 투여되는 경우 -이 유효량의 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 투여한다는 점에서 유효량으로 투여될 수 있다.

[0242] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA(전체 또는 합한 용량)를 포함하는) LNP 조성물은 고정 용량을 사용하여 투여된다. 고정 용량은 인간 대상체에서 25 내지 150mg일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량은 5mg 내지 75mg, 선택적으로 25mg 내지 75mg, 25mg 내지 60mg, 25mg 내지 80mg 또는 25mg 내지 115mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 50mg 내지 150mg, 선택적으로 50mg 내지 100mg 또는 75mg 내지 150mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 5mg 내지 9mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 15mg 내지 27mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 50mg 내지 90mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 35mg 내지 65mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 5mg 내지 180mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 50mg 내지 70mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 60mg 내지 80mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 70mg 내지 90mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 80mg 내지 100mg이다.

[0243] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 7mg 내지 9mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg 내지 27mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 44mg 내지 68mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 59mg 내지 111mg이다.

[0244] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 7mg 내지 9mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 25mg 내지 27mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 44mg 내지 68mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 59mg 내지 111mg이다.

[0245] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg, 35mg, 40mg, 45mg, 50mg, 55mg, 60mg, 65mg, 70mg, 75mg, 80mg, 85mg, 90mg, 95mg, 100mg, 105mg, 110mg, 115mg, 120mg, 125mg, 130mg, 135mg, 140mg, 145mg 또는 150mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 25mg, 26mg, 27mg, 28mg, 29mg, 30mg, 31mg, 32mg, 33mg, 34mg, 35mg, 36mg, 37mg, 38mg, 39mg, 40mg, 41mg, 42mg, 43mg, 44mg, 45mg, 46mg, 47mg, 48mg, 49mg, 50mg, 51mg, 52mg, 53mg, 54mg, 55mg, 56mg, 57mg, 58mg, 59mg, 60mg, 61mg, 62mg, 63mg, 64mg, 65mg, 66mg, 67mg, 68mg, 69mg, 70mg, 71mg, 72mg, 73mg, 74mg, 75mg, 76mg, 77

mg, 78mg, 79mg, 80mg, 81mg, 82mg, 83mg, 84mg, 85mg, 86mg, 87mg, 88mg, 89mg, 90mg, 91mg, 92mg, 93mg, 94mg, 95mg, 96mg, 97mg, 98mg, 99mg, 100mg, 101mg, 102mg, 103mg, 104mg, 105mg, 106mg, 107mg, 108mg, 109mg, 110mg, 111mg, 112mg, 113mg, 114mg, 115mg, 116mg, 117mg, 118mg, 119mg, 120mg, 121mg, 122mg, 123mg, 124mg, 125mg, 126mg, 127mg, 128mg, 129mg, 130mg, 131mg, 132mg, 133mg, 134mg, 135mg, 136mg, 137mg, 138mg, 139, 140mg, 141mg, 142mg, 143mg, 144mg, 145mg, 146mg, 147mg 148mg 또는 150mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 80mg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 80mg이다.

[0246] 다른 실시형태에서, 약 5mg 내지 9mg의 용량을 제공받는 대상체는 누적 효과를 통해서 편집을 최대화하기 위해서 LNP 조성물의 1회 초과 투여를 제공받을 수 있다. 예를 들어, LNP 조성물은 2, 3, 4, 5회 초과, 예컨대, 2회 - 예를 들어, 제2 투여, 제3 투여, 제4 투여 또는 제5 투여로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있는 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 TTR의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 ELISA에 의해서 측정되는 경우 혈청 TTR의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 TTR의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 프리알부민의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 ELISA 또는 질량 분석법에 의해서 측정되는 경우 혈청 TTR의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 LNP 조성물이 이전에 투여된 적이 있고 예를 들어, 제1 LNP 투여 28일 후에 결정되는 경우 혈청 프리알부민의 60% 초과, 70% 초과 또는 80% 초과 감소(예를 들어, LNP 조성물의 투여 후 혈청 프리알부민의 60% 미만, 70% 미만 또는 80% 미만)가 달성되지 않은 인간 대상체에게 투여된다.

[0247] 본 발명의 일부 실시형태에서, "약"은 언급된 값의 $\pm 5\%$ 이내, 예를 들어, 약 80mg의 값의 경우 76mg 내지 84mg 범위를 의미한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, "약"은 언급된 값의 $\pm 10\%$ 이내를 의미한다.

[0248] IV. 사용 방법

[0249] 1. 생체내 편집 방법

[0250] 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 간 내의 유전자의 생체내 편집 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 생체내 편집은 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 일어난다.

[0251] 인간 대상체에서 간 내의 TTR 유전자의 생체내 편집 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, TTR 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, TTR 유전자의 생체내 편집은 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 일어난다.

[0252] 이들 실시형태에서, 대상체에 대한 LNP 조성물의 투여는 생물안전성 지표 변화와 연관될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체를 평가하여 생물안전성 지표의 변화가 허용 가능한지의 여부를 결정한다. 일부 실시형태에서, 허용 가능한 변화는 임상 및/또는 실험실에 의해서 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 허용 가능한 변화는 본 명세서에 기재된 바와 같은, 이상 반응(NCI-CTCAE 3 또는 그 이하의 등급), 심각한 이상 반응, 특별한 관심을 끄는 및/또는 치료로 인한 이상 반응(CTCAE 3 또는 그 이하의 등급)을 포함한 안전성 사례로서 정의되지 않은 것일 수 있다. LNP 조성물의 투여와 연관된 것을 포함한 생물안전성 지표는 당업계에 알려져 있다. 생물안전성 지표의 허용 가능한 수준 및/또는 변화는 당업계에 알려져 있고, 일상적인 방법에 의해서 평가될 수 있다.

[0253] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준은 대상체 포함 기준에 포함되고/되거나 본 명세서에 기

재된 대상체 제외 기준에 포함되지 않는 것이다.

- [0254] 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화는 일정 기간 후에 허용 가능한 변화, 예를 들어 처음에는 허용 가능한 수준을 벗어나지만 예를 들어, 투여 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 또는 28일 후 허용 가능한 수준으로 안정화되는 변화이다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화는 상기 생물안전성 지표에 대한 정상 상한의 150% 이내 및/또는 상기 생물안전성 지표에 대한 정상 하한의 50% 이내, 예를 들어, 프로트롬빈 ULN의 150% 이내 및/또는 피브리노겐의 LLN의 50% 이내에 포함되는 수준의 변화이다.
- [0255] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 국립 암 연구소(NCI)-CTCAE 가이드라인, 버전 5.0을 비롯한 CTCAE 가이드라인에 따라서 3등급 이상의 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 실험실 매개변수, 활력 징후, ECG 데이터, 신체 검사 등과 연관된 하나 이상의 수준)의 변화는, 임상외에 의해서 결정되는 경우 그 변화가 예를 들어, 임상 징후 또는 증상을 유도하고/하거나; 능동적인 개입을 필요로 하고/하거나; LNP 조성물의 단절 또는 중단을 필요로 하고/하거나; 및/또는 생물안전성 지표의 변화가 임상적으로 유의미한 경우 이상 반응으로 간주된다.
- [0256] 일부 실시형태에서, 이상 반응은 연구 약물이 투여되거나 연구 절차를 겪은 적이 있는 대상체에서 임의의 예상치 못한 의학적 발생이며 이것은 반드시 치료와 인과 관계가 있는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 의약품(시험용)과 관련이 있는지 여부에 관계없이 치료와 일시적으로 연관된 의도하지 않은 징후(비정상적인 실험실 소견 포함), 증상 또는 질환이다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 임상 징후 또는 증상을 유도한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 적극적인 개입을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 치료의 정지 또는 중단을 요구한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 조사자의 견해로 임상적으로 유의미한 이상이다. 이상 반응에 대한 등급 기준은 예를 들어, NCI(국립 암 연구소)-CTCAE를 포함하는 CTCAE(이상 반응에 대한 공통 용어 기준)와 같이 당업계에 알려져 있다.
- [0257] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 심각한 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 사망을 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 생명을 위협한다(예를 들어, 대상체를 임상외에 의해서 결정되는 바와 같은 즉각적인 사망 위험성에 놓이게 함). 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 지속적인 또는 상당한 장애를 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 정상적인 생활 기능을 수행하는 능력의 무능력 또는 실질적인 붕괴를 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 선천적 기형 또는 선천적 결함을 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 입원환자 입원을 필요로 하거나 입원 기간을 연장시킨다.
- [0258] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 특별한 관심을 끄는 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 특별한 관심을 끄는 이상 반응은 예를 들어, 주입 관련 반응(IRR)(예를 들어, 치료 또는 주입 중단이 필요함 및/또는 3등급 이상), 혈전증의 발생, 출혈의 발생, CTCAE 2등급 이상의 비정상 혈액 검사 결과, ALT의 CTCAE 2등급 이상의 상승, AST의 CTCAE 2등급 이상의 상승, 총 빌리루빈의 CTCAE 2등급 이상의 상승, GLDH의 CTCAE 2등급 이상의 상승, 사이토카인 방출 증후군의 발생, 비장에 대한 영향으로 인한 사건(비장 출혈, 비장 경색, 때로는 혈소판 감소증, 때로는 빈혈 또는 현미경 검사에서 혈액 세포 연구에 대한 특정 이상 소견이 있는 림프구감소증); 부신에 대한 영향으로 인한 사건; 갑상선기능저하증의 임상적으로 관련된 증상; 및 비타민 A 결핍과 일치하는 안과적 사건을 포함한다.
- [0259] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 치료로 인한 이상 반응의 경우 3 이상의 이상 반응에 대한 공통 용어 기준(CTCAE) 등급으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 신경계 장애(예를 들어, 두통, 말초 감각 신경병증)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 위장관 장애(예를 들어, 설사, 구역)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 부상, 중독 및 시술 합병증(예를 들어, 주입 관련 반응, 피부 마모)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 귀 및 래버린스(labyrinth) 장애(예를 들어, 체위 현기증(vertigo positional))이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 눈 장애(예를 들어, 눈의 이물감)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 전신 장애 또는 투여 부위 병태(예를 들어, 카테터 부위 부종)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 감염 또는 침입(예를 들어, 급성 부비동염)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 티록신 감소이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 호흡기, 흉부 또는 중격 장애(예를 들어, 콧물)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 피부 및 피하 조직 장애(예를 들어, 가려움증, 발진)이다.

- [0260] 생체내 편집 방법은 일반적으로 응고, 혈액학, 임상 화학, 소변검사 및 기타 생물분석 평가(예를 들어, 사이토카인, 보체)와 관련된 알려진 실험실 평가를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 생물안전성 지표는 하기 비제한적인 생물안전성 지표 중 하나 이상을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 간 효소, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 수준, 프로트롬빈 시간(PT) 수준, 트롬빈 생성 시간(TGT) 수준(예를 들어, 최고 높이, 지연 시간 및/또는 내인성 트롬빈 전위), 피브리노겐 수준, 프로트롬빈 국제 표준화(INR) 비율, d-이량체 수준, 비타민 A, 비타민 B12, 레티놀 결합 단백질 (RBP), 갑상선-자극 호르몬(TSH), 유리 티록신, 유리 트라이아이오도티로닌(T3), HBV, HBsAg, HCV Ab, 파종성 혈관내 응고와 일치하는 실험실 매개변수, 혈액학 값의 변화, 화학적 값의 변화, 응고의 변화, 소변검사의 변화, 글루타메이트 데하이드로게나제 수준, C 반응성 단백질 수준, 보체 (C3, C4, C3a, C5a, Bb) 수준, 사이토카인(GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-23, TNF- α , IL-17, MCP-1) 수준, 티록신(T4 수준)(예를 들어, 정상 범위 미만으로의 수준 감소 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 갑상선 기능 저하증 증상/징후), 급성 간 손상(예를 들어, ALT, AST, 총 빌리루빈 또는 GLDH의 CTCAE 2등급 초과)의 상승 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 간 손상의 증상/징후) 및 12-리드 심전도의 변화.
- [0261] 예를 들어, 혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변분석과 관련된 다른 생물안전성 지표는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 혈액학과 관련된 생물안전성 지표는, 혈소판 수치, RBC 수치, 헤모글로빈, 헤마토크리트, RBC 지수(MCV, MCH, MCHC, RDW), 망상적혈구%, 차동 WBC 수치(중성구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 응고와 관련된 생물안전성 지표는 aPTT, PT, INR, 피브리노겐, d-이량체 및 TGT를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 임상 화학과 관련된 생물안전성 지표는 알부민, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 비공복 혈당, 칼륨, 나트륨, 염화물, 이산화탄소, 칼슘, AST, ALT, 알칼리성 포스파타제, 총 및 직접 빌리루빈, 총 단백질, 크레아틴 키나제, 락토스 데하이드로게나제, 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 소변분석과 관련된 생물안전성 지표는 비중, pH, 글루코스, 단백질, 혈액, 케톤, 빌리루빈, 유로빌리노겐, 아질산염 및 백혈구 에스테라제를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0262] 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물 투여 후에 측정된다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 전 및 후에 측정되어, LNP 조성물을 사용한 치료 전 및 후의 생물안전성 지표 수준의 비교가 가능하다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여 전에 측정된 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 후 측정된 생물안전성 지표의 하나 이상의 수준에 대한 비교를 위한 기준선으로 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준선은 LNP 조성물의 투여 전에 취해진 마지막의 입수 가능한 측정치이다. 이들 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 간 효소 수준의 허용 가능한 변화(예를 들어, 치료제 투여 후 4주 초과 동안 5×ULN 초과)의 ALT 또는 AST의 상승, 치료제 투여 후 3×ULN 초과)의 ALT 또는 AST의 상승 및 2×ULN(Hy의 법칙) 초과)의 총 빌리루빈의 상승)를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 수준의 허용 가능한 변화(예를 들어, 치료제 투여 4주 후 5×ULN 초과)의 aPTT의 증가)를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 프로트롬빈 시간(PT)의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 트롬빈 생성 시간(TGT)(예를 들어, 최고 높이, 지연 시간 및/또는 내인성 트롬빈 전위)의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 피브리노겐의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 프로트롬빈 국제 표준화(INR) 비율의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 d-이량체의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 파종성 혈관내 응고와 일치하는 실험실 매개변수의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 혈액학 값(예를 들어, 치료제 투여 후 CTCAE 2등급 이상의 비정상 혈액 검사 결과)의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 화학 값의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 임상적으로 관련된 비정상 출혈에 의해서 정의된 비정상 응고 소견의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 소변분석에서의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 글루타메이트 데하이드로게나제 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 C-반응성 단백질의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 보체의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 사이토카인의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다.
- [0263] 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 CTCAE 가이드라인에 따라서 3등급 이상의 치료로 인한 이상 반응으로서 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 혈전증의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성

물의 투여는 출혈의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 파종성 혈관내 응고의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 사이토카인 방출 증후군의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 비장에 대한 영향으로 인한 발생(비장 출혈, 비장 경색, 때로는 혈소판 감소증, 때로는 빈혈 또는 현미경 검사에서 혈액 세포 연구에 대한 특정 이상 소견이 있는 림프구감소증)으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 부신에 대한 영향으로 인한 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 비타민 A 결핍과 일치하는 안과적 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 티록신 수준(T4 수준)의 허용 가능한 변화를 초래한다(예를 들어, 치료제 투여 후 정상 범위 미만의 수준으로 감소하지도 않고 갑상선기능저하증의 임상적으로 관련된 증상/징후로 간주되지도 않음). 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 급성 간 손상(예를 들어, 치료제 투여 후 ALT, AST, 총 빌리루빈 또는 GLDH의 CTCAE 2등급 초과 상승 또는 간 손상의 임상적으로 관련된 증상/징후로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 임상적에 의해서 결정된 바와 같은 12-리드 심전도에서의 허용 가능한 변화를 초래한다.

[0264] 일부 실시형태에서, 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 유효량의 Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는 LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하며, 투여는 항-Cas 항체(예를 들어, 항-Cas9 항체) 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다.

[0265] 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 지질 A의 약동학의 허용 가능한 변화를 초래한다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 DMG-PEG2k의 약동학의 허용 가능한 변화를 초래한다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 Cas9 mRNA의 약동학의 허용 가능한 변화를 초래한다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 sgRNA의 약동학의 허용 가능한 변화를 초래한다.

[0266] 2. 치료 방법

[0267] 간 내의 유전자의 생체내 편집에 의해서 인간 대상체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성으로 인해 발생하는 단일유전인자 장애를 치료한다. 단일유전인자 장애는 간 내의 유전자에 대한 편집 또는 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성을 유발하는 비-암호 영역에 대한 편집(예를 들어, 단일 편집)으로 치료될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물은 단백질이다. 일부 실시형태에서, 유전자 산물은 RNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 간 유전자 산물의 비정상적인 발현 또는 활성을 유발하는 간 내의 유전자 또는 비-암호 영역에 대한 편집은 유전자 산물의 수준(예를 들어, 혈청 수준)을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 간(예를 들어, 간세포) 내의 *TTR* 유전자를 표적으로 하여 이를 편집한다. 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애는 ATTR이다.

[0268] 일부 실시형태에서, 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계 및 생물안전성 지표의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 유전자의 생체내 편집은 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 일어나는 유전자의 생체내 편집을 포함한다.

[0269] 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계, 투여 전에 대상체에서 생물안전성 지표의 제1 수준을 결정하는 단계; 투여 후 일정 시간에 대상체에서 생물안전성 지표의 제2 수준을 결정하는 단계; 및 생물안전성 지표의 제1 수준과 제2 수준 사이의 변화를 평가하는 단계를 포함한다.

[0270] 일부 실시형태에서, 치료 방법은 대상체에서 간세포 내의 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함한다.

[0271] 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하여 간 내의 유

전자를 편집하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일유전인자 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하여 이상 간 유전자 산물의 생산을 억제시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 세포 집단에서 간 유전자 산물의 생산을 억제시킨다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 간에서의 단일 편집 후 간 유전자 생산의 장기간 억제(예를 들어, 지속적인 억제)를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 예를 들어, 누적 효과를 통해서 편집을 최대화하기 위해서 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 1회 초과, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5회 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 예를 들어, 효과적인 감소를 달성하기 위해서(예를 들어, 기준선 수준에 비해서 간 유전자 생산 수준의 적어도 60% 감소를 달성하기 위해서) 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 1회 초과(예를 들어, 2회) 투여하는 단계를 포함한다.

[0272] 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 생물안전성 지표의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 이들 실시형태에서, 대상체에 대한 LNP 조성물의 투여는 생물안전성 지표 변화와 연관될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체를 평가하여 생물안전성 지표의 변화가 허용 가능한지의 여부를 결정한다. 일부 실시형태에서, 허용 가능한 변화는 임상 및/또는 실험실에 의해서 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 허용 가능한 변화는 본 명세서에 기재된 바와 같은, 이상 반응(NCI-CTCAE 3 또는 그 이하의 등급), 심각한 이상 반응, 특별한 관심을 끄는 및/또는 치료로 인한 이상 반응(CTCAE 3 또는 그 이하의 등급)을 포함한 안전성 사례로서 정의되지 않은 것일 수 있다. LNP 조성물의 투여와 연관된 것을 포함한 생물안전성 지표는 당업계에 알려져 있다. 생물안전성 지표의 허용 가능한 수준 및/또는 변화는 당업계에 알려져 있고, 일상적인 방법에 의해서 평가될 수 있다.

[0273] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준은 대상체 포함 기준에 포함되고/되거나 본 명세서에 기재된 대상체 제외 기준에 포함되지 않는 것이다.

[0274] 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화는 일정 기간 후에 허용 가능한 변화, 예를 들어 처음에는 허용 가능한 수준을 벗어나지만 예를 들어, 투여 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 또는 28일 후 허용 가능한 수준으로 안정화되는 변화이다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화는 상기 생물안전성 지표에 대한 정상 상한의 150% 이내 및/또는 상기 생물안전성 지표에 대한 정상 하한의 50% 이내, 예를 들어, 프로트롬빈 ULN의 150% 이내 및/또는 피브리노겐의 LLN의 50% 이내에 포함되는 수준의 변화이다.

[0275] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 국립 암 연구소(NCI)-CTCAE 가이드라인, 버전 5.0을 비롯한 CTCAE 가이드라인에 따라서 3등급 이상의 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표 수준(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 실험실 매개변수, 활력 징후, ECG 데이터, 신체 검사 등과 연관된 하나 이상의 수준)의 변화는, 임상적에 의해서 결정되는 경우 그 변화가 예를 들어, 임상 징후 또는 증상을 유도하고/하거나; 능동적인 개입을 필요로 하고/하거나; LNP 조성물의 단절 또는 중단을 필요로 하고/하거나; 및/또는 생물안전성 지표의 변화가 임상적으로 유의미한 경우 이상 반응으로 간주된다.

[0276] 일부 실시형태에서, 이상 반응은 연구 약물이 투여되거나 연구 절차를 겪은 적이 있는 대상체에서 임의의 예상치 못한 의학적 발생이며 이것은 반드시 치료와 인과 관계가 있는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 의약품(시험용)과 관련이 있는지 여부에 관계없이 치료와 일시적으로 연관된 의도하지 않은 징후(비정상적인 실험실 소견 포함), 증상 또는 질환이다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 임상 징후 또는 증상을 유도한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 적극적인 개입을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 치료의 정지 또는 중단을 요구한다. 일부 실시형태에서, 이상 반응은 조사자의 견해로 임상적으로 유의미한 이상이다. 이상 반응에 대한 등급 기준은 예를 들어, NCI(국립 암 연구소)-CTCAE를 포함하는 CTCAE(이상 반응에 대한 공통 용어 기준)와 같이 당업계에 알려져 있다.

[0277] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 심각한 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 사망을 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 생명을 위협한다(예를 들어, 대상체를 임상적에 의해서 결정되는 바와 같은 즉각적인 사망 위험성에 놓이게 함). 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 지속적인 또는 상당한 장애를 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 정상적인 생활 기능을 수행하는 능력의 무능력 또는 실질적인 붕괴를 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 선천적 기형 또는 선천적 결함을 초래한다. 일부 실시형태에서, 심각한 이상 반응은 입원환자 입원을 필요로 하거나 입원 기간을 연장시킨다.

- [0278] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 특별한 관심을 끄는 이상 반응으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 특별한 관심을 끄는 이상 반응은 예를 들어, 주입 관련 반응(IRR)(예를 들어, 치료 또는 주입 중단이 필요함 및/또는 3등급 이상), 혈전증의 발생, 출혈의 발생, CTCAE 2등급 이상의 비정상 혈액 검사 결과, ALT의 CTCAE 2등급 이상의 상승, AST의 CTCAE 2등급 이상의 상승, 총 빌리루빈의 CTCAE 2등급 이상의 상승, GLDH의 CTCAE 2등급 이상의 상승, 사이토카인 방출 증후군의 발생, 비장에 대한 영향으로 인한 사건(비장 출혈, 비장 경색, 때로는 혈소판 감소증, 때로는 빈혈 또는 현미경 검사에서 혈액 세포 연구에 대한 특정 이상 조건이 있는 림프구감소증); 부신에 대한 영향으로 인한 사건; 갑상선기능저하증의 임상적으로 관련된 증상; 및 비타민 A 결핍과 일치하는 안과적 사건을 포함한다.
- [0279] 일부 실시형태에서, 허용 가능한 생물안전성 지표 수준(또는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화)은 치료로 인한 이상 반응의 경우 3 이상의 이상 반응에 대한 공통 용어 기준(CTCAE) 등급으로 간주되지 않는 것이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 신경계 장애(예를 들어, 두통, 말초 감각 신경병증)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 위장관 장애(예를 들어, 설사, 구역)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 부상, 중독 및 시술 합병증(예를 들어, 주입 관련 반응, 피부 마모)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 귀 및 레버린스(labyrinth) 장애(예를 들어, 체위 현기증(vertigo positional))이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 눈 장애(예를 들어, 눈의 이물감)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 전신 장애 또는 투여 부위 병태(예를 들어, 카테터 부위 부종)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 감염 또는 침입(예를 들어, 급성 부비동염)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 티록신 감소이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 호흡기, 흉부 또는 중격 장애(예를 들어, 콧물)이다. 일부 실시형태에서, 치료로 인한 이상 반응은 피부 및 피하 조직 장애(예를 들어, 가려움증, 발진)이다.
- [0280] 생체내 편집 방법은 일반적으로 응고, 혈액학, 임상 화학, 소변검사 및 기타 생물분석 평가(예를 들어, 사이토카인, 보체)와 관련된 알려진 실험실 평가를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 생물안전성 지표는 하기 비제한적인 생물안전성 지표 중 하나 이상을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 간 효소, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 수준, 프로트롬빈 시간(PT) 수준, 트롬빈 생성 시간(TGT) 수준(예를 들어, 최고 높이, 지연 시간 및/또는 내인성 트롬빈 전위), 피브리노겐 수준, 프로트롬빈 국제 표준화(INR) 비율, d-이량체 수준, 비타민 A, 비타민 B12, 레티놀 결합 단백질(RBP), 갑상선-자극 호르몬(TSH), 유리 티록신, 유리 트라이아이오도티로닌(T3), HBV, HBsAg, HCV Ab, 과중성 혈관내 응고와 일치하는 실험실 매개변수, 혈액학 값의 변화, 화학적 값의 변화, 응고의 변화, 소변검사의 변화, 글루타메이트 데하이드로게나제 수준, C 반응성 단백질 수준, 보체(C3, C4, C3a, C5a, Bb) 수준, 사이토카인(GM-CSF, INF-g, IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-23, TNF-a, IL-17, MCP-1) 수준, 티록신(T4 수준)(예를 들어, 정상 범위 미만으로의 수준 감소 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 갑상선 기능 저하증 증상/징후), 급성 간 손상(예를 들어, ALT, AST, 총 빌리루빈 또는 GLDH의 CTCAE 2등급 초과 상승 또는 치료제 투여 후 임상적으로 관련된 간 손상의 증상/징후) 및 12-리드 심전도의 변화.
- [0281] 예를 들어, 혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변분석과 관련된 다른 생물안전성 지표는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 혈액학과 관련된 생물안전성 지표는, 혈소판 수치, RBC 수치, 헤모글로빈, 헤마토크리트, RBC 지수(MCV, MCH, MCHC, RDW), 망상적혈구%, 차동 WBC 수치(중성구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 응고와 관련된 생물안전성 지표는 aPTT, PT, INR, 피브리노겐, d-이량체 및 TGT를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 임상 화학과 관련된 생물안전성 지표는 알부민, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 비공복 혈당, 칼륨, 나트륨, 염화물, 이산화탄소, 칼슘, AST, ALT, 알칼리성 포스파타제, 총 및 직접 빌리루빈, 총 단백질, 크레아틴 키나제, 락토스 데하이드로게나제, 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 소변분석과 관련된 생물안전성 지표는 비중, pH, 글루코스, 단백질, 혈액, 케톤, 빌리루빈, 유로빌리노겐, 아질산염 및 백혈구 에스테라제를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0282] 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물 투여 후에 측정된다. 일부 실시형태에서, 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 전 및 후에 측정되어, LNP 조성물을 사용한 치료 전 및 후의 생물안전성 지표 수준의 비교가 가능하다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여 전에 측정된 생물안전성 지표의 수준은 LNP 조성물의 투여 후 측정된 생물안전성 지표의 하나 이상의 수준에 대한 비교를 위한 기준선으로 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 기준선은 LNP 조성물의 투여 전에 취해진 마지막의 입수 가능한 측정치이다. 이들 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 간 효소 수준의 허용 가능한 변화(예를 들어, 치료제 투여 후 4주 초과 동안 $5 \times \text{ULN}$

초과의 ALT 또는 AST의 상승, 치료제 투여 후 $3 \times \text{ULN}$ 초과의 ALT 또는 AST의 상승 및 $2 \times \text{ULN}$ (Hy의 법칙) 초과의 총 빌리루빈의 상승)를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 수준의 허용 가능한 변화(예를 들어, 치료제 투여 4주 후 $5 \times \text{ULN}$ 초과의 aPTT의 증가)를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 프로트롬빈 시간(PT)의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 트롬빈 생성 시간(TGT)(예를 들어, 최고 높이, 지연 시간 및/또는 내인성 트롬빈 전위)의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 피브리노겐의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 프로트롬빈 국제 표준화(INR) 비율의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 d-이량체의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 파종성 혈관내 응고와 일치하는 실험실 매개변수의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 혈액학 값(예를 들어, 치료제 투여 후 CTCAE 2등급 이상의 비정상 혈액 검사 결과)의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 화학 값의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 임상적으로 관련된 비정상 출혈에 의해서 정의된 비정상 응고 소견의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 소변분석에서의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 글루타메이트 데하이드로게나제 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 C-반응성 단백질의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 보체의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 사이토카인의 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다.

[0283] 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 CTCAE 가이드라인에 따라서 3등급 이상의 치료로 인한 이상 반응으로서 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 혈전증의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 출혈의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 파종성 혈관내 응고의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 사이토카인 방출 증후군의 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 비장에 대한 영향으로 인한 발생(비장 출혈, 비장 경색, 때로는 혈소판 감소증, 때로는 빈혈 또는 현미경 검사에서 혈액 세포 연구에 대한 특정 이상 소견이 있는 림프구감소증)으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 부신에 대한 영향으로 인한 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 비타민 A 결핍과 일치하는 안과적 발생으로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 티록신 수준(T4 수준)의 허용 가능한 변화를 초래한다(예를 들어, 치료제 투여 후 정상 범위 미만의 수준으로 감소하지도 않고 갑상선기능저하증의 임상적으로 관련된 증상/징후로 간주되지도 않음). 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 급성 간 손상(예를 들어, 치료제 투여 후 ALT, AST, 총 빌리루빈 또는 GLDH의 CTCAE 2등급 초과의 상승 또는 간 손상의 임상적으로 관련된 증상/징후로 간주되지 않는 생물안전성 지표 수준의 허용 가능한 변화를 초래한다. 이들 실시형태에서, 조성물의 투여는 임상적에 의해서 결정된 바와 같은 12-리드 심전도에서의 허용 가능한 변화를 초래한다.

[0284] 간 내의 *TTR* 유전자의 생체내 편집에 의해서 인간 대상체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계 및 상기에 기재된 바와 같은 생물안전성 지표의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, *TTR* 유전자의 생체내 편집은 대상체의 간세포에서 가이드 RNA에 의해서 표적화된 부위에서 일어난다.

[0285] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 바와 같은 *TTR*과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 유전성 ATTR(ATTRv)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 비-유전적인(야생형) ATTR(ATTRwt)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 ATTRv-PN을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 가족성 아밀로이드 심근증(FAC, ATTRv-CM이라고도 알려짐)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 야생형 ATTR(ATTRwt-CM)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 ATTR-CM, NYHA 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 것이다.

- [0286] 일부 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하여, ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, 조성물의 투여는 임상 지표의 기준선 수준과 비교할 때 대상체에서 임상 지표의 수준의 임상적으로 유의미한 개선을 초래한다.
- [0287] 일 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하여, ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA는 약 25 내지 약 100mg의 합한 용량으로 투여된다.
- [0288] 일부 양상에서, 본 명세서에는 인간 대상체에서 TTR과 연관된 아밀로이드증(ATTR)을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하여, ATTR을 치료하는 단계를 포함하되, 조성물의 투여는 기준선 혈청에 비해서 혈청 TTR을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, ATTR은 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 일부 실시형태에서, ATTR은 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 일부 실시형태에서, ATTR은 다발신경병증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. 일부 실시형태에서, ATTR은 심근증을 동반한 유전성 트랜스티레틴 아밀로이드증이다. ATTR이 심근증을 동반한 야생형 트랜스티레틴 아밀로이드증인 실시형태에서, 대상체는 뉴욕 건강 협회(NYHA) 분류 하에서 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III로서 분류된다. 일부 실시형태에서, ATTR은 ATTRv-PN 및/또는 ATTR-CM이다. 일부 실시형태에서, LNP는 (9Z, 12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-((((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 PEG 지질을 포함한다. LNP가 PEG 지질을 포함하는 실시형태에서, PEG 지질은 다이미리스토일 글리세롤(DMG)을 포함한다. PEG 지질이 다이미리스토일글리세롤(DMG)을 포함하는 실시형태에서, PEG 지질은 PEG-2k를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물은 약 5 내지 7의 N/P 비율을 갖는다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 중량 기준으로 약 5:1 내지 약 1:5 범위의 비율로 존재한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 Cas9 뉴클레아제를 암호화한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 S. 피오게네스 Cas9를 암호화한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 코돈-최적화된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 가이드 RNA가 적어도 하나의 변형을 포함하는 실시형태에서, 가이드 RNA는 뉴클레오타이드 사이에 2'-O-메틸 변형된 뉴클레오타이드 또는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg 내지 약 2mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg 내지 약 1mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.3mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 0.7mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 1.0mg/kg이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg 내지 약 150mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 25mg 내지 약 100mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 50mg 내지 약 90mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 40mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 50mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 60mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 70mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 80mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 90mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA의 유효량은 합한 용량이 약 100mg의 총 RNA이다. 일부 실시형태에서, 조성물의 투여는

혈청 TTR을 상기 조성물의 투여 전의 기준선 혈청 TTR과 비교할 때 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95%, 95 내지 98%, 98 내지 99% 또는 99 내지 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 수준은 조성물의 투여 후에 약 50 μ g/ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 수준은 조성물의 투여 후에 약 40 μ g/ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 수준은 조성물의 투여 후에 약 30 μ g/ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 수준은 조성물의 투여 후에 약 20 μ g/ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 혈청 TTR 수준은 조성물의 투여 후에 약 10 μ g/ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 방법은 제2 용량의 LNP 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 제1 용량의 투여 전의 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 방법은 제2 용량의 LNP 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 제2 용량의 투여는 혈청 TTR 수준을 제2 용량의 투여 전 및 제1 용량의 투여 후 기준선 혈청 TTR 수준에 비해서 적어도 80%만큼 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 조성물은 제2 치료제와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 다이플루니살 또는 타파미디스이다.

[0289] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 ATTR로 진단된 적이 있거나 치료와 동시에 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 유전자 검사(예를 들어, 문서화된 TTR 돌연변이)에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 감각운동 말초 신경병증의 임상 진단에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전 신경병증 손상 점수(NIS) 5 이상 및 130 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 생검에 의해 또는 검증된 비침습적 영상화에 의해 기록된 TTR 아밀로이드의 조직 침착에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 다발성 신경병증 장애(PND) 점수 3b 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다.

[0290] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 ATTRv-PN 증상의 진행을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 다발신경병증 장애(PND) 점수 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 가족성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 단계의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 신경병증 손상 점수(NIS)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 NIS-하지(LL)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 25 kg/m²×g/l 이상의 변형된 체질량 지수(mBMI) 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 30분 이상의 6분 보행 검사 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 0.1m/s 이상의 10미터 보행 검사의 감소를 갖는다.

[0291] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 TTR-감소 요법을 제공받는 동안 ATTR이 진행된 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계 및 생물안전성 지표의 수준을 결정하는 단계를 포함하되, 대상체는 상이한 ATTR 요법에 의해서 치료된 적이 있거나 현재 치료 중이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 예를 들어, 임상 효능 지표, 예컨대, mNIS+7 점수에 의해서 측정되는 바와 같이, 상이한 ATTR 요법 중에 ATTR이 진행된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물이 투여될 대상체는 이노터센으로 치료된 적이 있거나 현재 치료 중이고, ATTR의 진행을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물이 투여될 대상체는 파티시란으로 치료된 적이 있거나 현재 치료 중이고, ATTR이 진행된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물이 투여될 대상체는 다이플루니살로 치료된 적이 있거나 현재 치료 중이고, ATTR이 진행된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LNP 조성물이 투여될 대상체는 타파미디스로 치료된 적이 있거나 현재 치료 중이고, ATTR이 진행된다.

[0292] 일부 실시형태에서, TTR 유전자의 생체내 편집 방법은 인간 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, 유효량의 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 전신 투여하는 단계를 포함하며 임상 지수 수준의 임상적으로 유의함 개선을 초래한다.

[0293] 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 혈청 TTR 감소(예를 들어, 치료제 투여 후 ELISA에 의해서 측정된 바와 같은 혈청 TTR의 60% 감소), 혈청 TTR 감소(예를 들어, 치료제 투여 후 질량 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 혈청 TTR의 60% 감소, 혈청 프리알부민 감소, 다발성신경병증 장애(PND) 점수 감소, 가족성 아밀로이드 다발성신경병증(FAP) 단계 감소, 신경병증 손상 점수(NIS)의 감소, 변형된 신경 손상 점수(mNIS+7) 감소, 신경병증 손상 점수(NIS)-하지(LL) 감소, 변형된 체질량 지수(mBMI)의 25 kg/m²×g/l 이상의 증가, 6분 보행 검사(6-MWT)의 30미터 이상의 증가, 10미터 보행 검사(10-MWT)의 0.1미터/초 이상의 증가를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 임상 효능 지표를 결정하는 단계를 포함한다. 추가적인 임상 효능 지표는 혈청 신경필라멘트 경쇄(NFL) 수준의 개선, 당뇨병성

신경병증의 Norfolk 삶의 질(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)에 의해서 평가된 바와 같은 삶의 질 개선, EuroQOL(EQ)-5D-5L에 의해서 평가된 바와 같은 삶의 질 개선, 심장 MRI의 개선(세포의 부피의 감소), 뇌 나트륨 이뇨 펩타이드(NT-proBNP) 수준의 N-말단 프로호르몬의 개선; 트로포닌 I 수준의 개선, 뉴욕 보건 협회(NYHA) 분류의 개선 및 캔자스시티 심근병증 설문지(KCCQ)의 점수에 의한 개선을 포함한다. TTR 아밀로이드증에 대한 효능을 평가하기 위한 지표를 포함하는 추가적인 임상 효능 지표가 해당 분야에 알려져 있다. 유사하게, TTR 아밀로이드증을 비롯한 질환의 개선을 나타내는 임상 효능 지표의 수준 및/또는 변화는 당업계에게 공지되어 있으며 일상적인 방법, 예를 들어, 임상의 또는 실험실에 의해 평가될 수 있다.

[0294]

일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하는 단계 및 LNP 조성물의 투여의 투여 후 임상 효능 지표를 측정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하는 단계 및 LNP 조성물 투여 전 및 투여 후에 임상 효능 지표를 측정하여 LNP 조성물을 사용한 치료 전 및 후의 임상 효능 지표 수준의 비교를 가능하게 하는 단계를 포함한다.

[0295]

예를 들어, 혈청 TTR 수준은 TTR 아밀로이드증에 대한 임상 효능 지표이다. 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하여 대상체에서 TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하여 대상체에서 TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 기준선, 예를 들어, 치료 전과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과만큼 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 적어도 60% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 적어도 70% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 적어도 80% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 적어도 85% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 TTR 수준을 적어도 90% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%만큼 감소시키는 것을 포함한다.

[0296]

TTR의 혈청 수준의 측정 방법은 당업계에게 공지되어 있고, 예를 들어, ELISA이다.

[0297]

예를 들어, 혈청 프리알부민 수준은 TTR 아밀로이드증에 대한 임상 효능 지표이다. 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하여 대상체에서 TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 본 명세서에 기재된 LNP 조성물을 투여하여 대상체에서 TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 기준선, 예를 들어, 치료전과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과만큼 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 적어도 60% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 적어도 70% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 적어도 80% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민

수준을 적어도 85% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 적어도 90% 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 TTR과 연관된 아밀로이드증의 치료 방법은 기준선과 비교할 때 치료 후(예를 들어, LNP 조성물의 투여 14일 또는 28일 후) TTR 수준, 예를 들어, 혈청 프리알부민 수준을 적어도 95% 감소시킨다. 프리알부민의 혈청 수준의 측정 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, ELISA이다.

[0298] 다른 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 대상체에서의 혈청 TTR 수준을 약 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물의 투여는 혈청 TTR 수준을 약 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만까지 감소시킨다.

[0299] 일부 실시형태에서, 치료는 기준선 수준과 비교할 때 혈청 프리알부민의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 다발신경병증 장애(PND) 점수에서 적어도 1점의 기준선으로부터의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 가족성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 단계에서 적어도 1점의 기준선으로부터의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 신경병증 손상 점수(NIS)에서 적어도 1점의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 변형된 신경학적 손상 점수(mNIS+7)에서의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 신경병증 손상 점수(NIS)-하지(LL)에서의 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 변형된 체질량 지수에서의 증가(예를 들어, $25\text{kg}/\text{m}^2 \times \text{g}/\ell$ 이상의 (mBMI))를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 30미터 이상의 6-분 보행 검사(6-MWT)의 증가를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 0.1미터/초 이상의 10-미터 보행 검사(10-MWT)의 증가를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 혈청 신경필라멘트 경쇄(NfL) 수준의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 당뇨병성 신경병증의 Norfolk 삶의 질에 의해서 평가되는 바와 같은 삶의 질의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 EuroQOL (EQ)-5D-5L에 의해서 평가되는 바와 같은 삶의 질의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 심장 MRI(예를 들어, 아밀로이드 원섬유의 심장 영상화)의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 뇌 나트륨 기준선과 비교할 때 뇌 나트륨 이뇨 펩타이드(NT-proBNP) 수준의 N-말단 프로호르몬의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 트로포닌 I 수준의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 뉴욕 건강 협회 (NYHA) 분류의 개선을 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 기준선과 비교할 때 캔자스시티 심근병증 설문지(KCCQ)의 점수에 의해서 정의된 바와 같은 개선을 초래한다.

[0300] 일부 실시형태에서, 치료는 FAP 진행을 둔화시키거나 중단시킨다. 일부 실시형태에서, 치료는 감각운동 신경병증 또는 자율신경 신경병증의 증상 변화의 개선, 안정화 또는 둔화를 초래한다.

[0301] 일부 실시형태에서, 치료는 FAC의 증상 변화의 개선, 안정화 또는 둔화를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 제한성 심근증 또는 울혈성 심부전의 증상 변화의 개선, 안정화 또는 둔화를 초래한다.

[0302] 일부 실시형태에서, 치료 효능은 감각운동 또는 자율신경 신경병증 증상의 개선 또는 이의 진행의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 신체 영역을 이동하는 능력 또는 신체의 임의의 영역에서 느끼는 능력의 증가 또는 이의 감소의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 삼키는 능력; 숨쉬는 능력; 팔, 손, 다리 또는 발을 사용하는 능력; 또는 보행 능력의 개선 또는 이의 감소의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 신경통의 개선 또는 이의 진행의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 신경통은 통증, 작열감, 열열함 또는 비정상적인 느낌을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 체위성 저혈압, 현기증, 위장 운동 장애, 방광 기능 장애 또는 성기능 장애의 개선 또는 이의 증가의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 약함의 개선 또는 이의 진행의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 근전도, 신경 전도 검사 또는 대상체-보고된 결과를 사용하여 측정된다.

[0303] 일부 실시형태에서, 치료 효능은 울혈성 심부전 또는 CHF의 증상의 개선 또는 이의 진행의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 숨가쁨, 숨쉬기 어려움, 피로 또는 발목, 발, 다리, 복부 또는 목의 정맥의 부종의 감소 또는 이의 증가의 둔화에 의해서 측정된다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 신체 내의 유체 축적의 개선 또는 이의 둔화에 의해서 측정되는데, 이것은 측정치, 예컨대, 체중 증가, 빈뇨 또는 야간 기침에 의해서 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료 효능은 심장 바이오마커 시험(예컨대, B형 나트륨 이뇨 펩타이드[BNP] 또는 N-말단 프로 b형 나트륨 이뇨 펩타이드[NT-proBNP]), 폐 기능 검사, 가슴 x선 또는 심전도검사

를 사용하여 측정된다.

[0304] 일부 실시형태에서, 치료는 대상체의 생존 시간 증가를 초래한다. 일부 실시형태에서, 치료는 질환 진행을 둔화시키거나 또는 중단한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물을 사용한 치료 효능은 전달 후 2주, 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 10년에 관찰된다.

[0305] 다른 실시형태에서, LNP 조성물은 또한 제2 치료제와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 TTR의 사랑제 형태의 안정화제이다. 일부 실시형태에서, 제2 치료제는 다이플루니살 또는 타파미디스이다.

[0306] a. 대상체 포함 기준

[0307] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물이 투여되는 TTR 아밀로이드증(ATTRv-PN 및 ATTR-CM)을 갖는 대상체는 하기 대상체 포함 기준 중 하나 이상에 대해서 평가된다.

[0308] i. ATTRv-PN 대상체 포함 기준

[0309] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 ATTR로 진단된 적이 있거나 동시에 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 유전자 검사(예를 들어, 문서화된 TTR 돌연변이)에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 감각운동 말초 신경병증의 임상 진단에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전 신경병증 손상 점수(NIS) 5 이상 및 130 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 생검에 의해 또는 검증된 비침습적 영상화에 의해 기록된 TTR 아밀로이드의 조직 침착에 기초하여 ATTR로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 다발성 신경병증 장애(PND) 점수 3b 이하에 기초하여 ATTR로 진단된다.

[0310] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전에 ATTRv-PN 증상의 진행을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 다발신경병증 장애(PND) 점수 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 1점 이상의 가족성 아밀로이드 다발신경병증(FAP) 단계의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 신경병증 손상 점수(NIS)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5점 이상의 NIS-하지(LL)의 증가를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 $25 \text{ kg/m}^2 \times \text{g/l}$ 이상의 변형된 체질량 지수(mBMI) 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 30분 이상의 6분 보행 시험 감소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 0.1m/s 이상의 10미터 보행 시험의 감소를 갖는다. 이들 및 다른 포함 기준의 평가는 당업계에 알려져 있다.

[0311] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 투여 시간에 18세 내지 80세이다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 문서화된 TTR 돌연변이(예를 들어, 전체 TTR 유전자 서열결정 정보)에 기반한 TTR 아밀로이드증(ATTR)으로 인해서 말초 신경병증(PN)으로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 감각운동 말초 신경병증으로 진단된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5 이상 및 130 이하의 신경병증 손상 점수(NIS)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 생검에 의해 또는 검증된 비침습적 영상화에 의해 기록된 TTR 아밀로이드의 조직 침착을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 3b 이하의 다발신경병증 장애(PND) 점수를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 약 50kg 내지 90kg의 체중을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 약 50kg 내지 120kg의 체중을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 상한(ULN) 이하의 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 수준 범위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 상한(ULN) 이하의 아미노트랜스퍼라제(ALT) 수준 범위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 상한(ULN) 이하의 총 빌리루빈 수준 범위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 상한(ULN) 이하의 국제 표준화 비율(INR) 범위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 (신장 질환 방정식의 식이 변형(Modification of Diet in Renal Disease equation)에 의해서 측정되는 경우) $45\text{ml/분}/1.73\text{m}^2$ 초과와 사구체 여과율(GFR) 예측치를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 100,000개 세포/mm³ 이상의 혈소판 수치를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 2,000pg/ml 미만의 뇌 나트륨 이뇨 펩타이드(NT-proBNP)의 N-말단 프로호르몬을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 200mg/dL 미만의 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 하한(LLN) 이상의 비타민 A를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 정상 범위 이내의 갑상선-자극 호르몬(TSH)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 LLN 이상의 비타민 B12 수준을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 심초음파검사된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 남성이고 투여 후 84일 동안 정자를 기증하지 않는 데 동의해야 한다.

[0312] ii. ATTR-CM 대상체 포함 기준

- [0313] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 심근증 또는 야생형 심근증(ATTRwt)을 동반한 유전성 ATTR(ATTRv) 아밀로이드증으로서 분류된, 심근증을 동반한 트랜스티레틴(ATTR) 아밀로이드증의 문서화된 진단을 갖는다.
- [0314] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 심부전 및/또는 심부전의 임상적 증거로 인해 적어도 한 번 이전에 입원한 적이 있다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 뉴욕 심장 협회(NYHA) 분류 I 내지 III 심부전을 앓고 있다.
- [0315] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 전 적어도 21일 동안 일관되게 유지된(또는 50% 이하로 변경된) 용량으로 매주 적어도 3회 경구 이노제 요법을 받는다.
- [0316] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 본 명세서에 기재된 조성물 투여 전 4주 이내에 심혈관 관련 입원 없이 임상적으로 안정적이다.
- [0317] 일부 실시형태에서, 인간 대상체의 심부전 증상은 연구자에 의해 평가된 바와 같이 최적으로 관리되고 임상적으로 안정적이다.
- [0318] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 기간 동안 6분 걷기 검사(6-MWT)에서 150미터 이상을 완주할 수 있다.
- [0319] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 체중이 적어도 45kg이다.
- [0320] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 동안 특정 실험실 기준을 충족한다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 (대상체가 길버트 증후군을 갖지 않는 한) 정상 상한(ULN) 이하의 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 총 빌리루빈 범위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 길버트 증후군의 병력이 있는 인간 대상체의 경우, 대상체는 스크리닝 시 총 빌리루빈이 2 XULN 이하이다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 CKD-EPI에 의해 측정된 추정 사구체 여과율(eGFR)이 30 mL/분/1.73m² 초과이다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 100,000개 세포/mm³ 이상의 혈소판 수치를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 정상 범위 내의 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT), 프로트롬빈 시간(PT), 피브리노겐 및 d-이량체 수준을 갖거나 조사자에 의해 임상적으로 중요하지 않은 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 600pg/mL 초과 NT-proBNP를 갖는다(또는 환자가 심방세동 진단을 받은 경우, NT-proBNP는 1,000pg/mL 초과임) 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 약물요법을 사용하거나 사용하지 않고 스크리닝 시 200mg/dL 미만의 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 정상 하한(LLN) 이상의 비타민 A를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 정상 범위 이내의 갑상선-자극 호르몬(TSH) 측정치를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 상기에 기재된 실험실 기준을 모두 충족한다.
- [0321] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 동안 및 본 명세서에 기재된 조성물로 치료 후 28일 동안 알코올 소비를 1일 1알코올 음료로 제한한다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 예를 들어, 사전 동의서에 서명할 당시 18세 내지 90세(포함)인 남성 및/또는 여성 대상체이다. 일부 실시형태에서, 여성 대상체는 폐경 후(예를 들어, 스크리닝 전 대체 의학적 원인 없이 12개월 동안 월경이 없음)이다. 일부 실시형태에서, 폐경 후 범위의 높은 난포 자극 호르몬(FSH) 수준을 사용하여 호르몬 피임 또는 호르몬 대체 요법을 사용하지 않는 여성의 폐경기 후 상태를 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, 12개월 동안 무월경이 없으면 단일 FSH 측정으로는 불충분하다. 일부 실시형태에서, 여성 대상체는 스크리닝 전 적어도 1개월 동안 외과적으로 불임이다(예를 들어, 자궁절제술, 양측 난관절제술 및 양측 난소절제술). 일부 실시형태에서, 가임 파트너(들)가 있거나 임신 중인 남성 대상체는 스크리닝 전 및 연구 약물 투여 후 84일 동안 콘돔을 사용하는 데 동의한다. 일부 실시형태에서, 남성 대상체는 연구 약물 투여 후 84일 동안 정자를 기증하지 않는 데 동의한다. 국가별 지침에 따라 정자 기증이 금지인 경우 기간이 84일 이상으로 연장될 수 있다.
- [0323] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 의료 시설에서 선택적인 절차(예를 들어, 백신 접종 시리즈가 완료되었다는 문서, 최근 PCR 검사 음성 또는 이러한 검사가 더이상 필요하지 않다는 문서 등)를 진행하는 것이 허용 가능한 것으로 결정된 SARS-CoV-2의 전파 또는 수축 위험에 대해 평가된다.
- [0324] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 투여 후 최소 28일 동안 또 다른 중재적 연구에 참여하지 않는 데 동의한다.
- [0325] 일부 실시형태에서, 스크리닝 기간 동안, 인간 대상체는 기록된 적절한 크기의 커프를 사용하여 각각 140/90mmHg 미만인 3회 혈압이 측정된다. 스크리닝 동안 혈압이 140/90mmHg 이상인 경우, 대상체는 신규 또는

변형된 항고혈압 요법을 받을 수 있고, 본 명세서에 기재된 조성물의 투여를 진행하기 전에 대상체의 3회 혈압 측정값이 140/90mmHg 미만일 때까지 스크리닝을 계속할 수 있다.

[0326] **b. 대상체 제외 기준**

[0327] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물이 투여되는 TTR 아밀로이드증(ATTRv-PN 및 ATTR-CM)을 갖는 대상체는 하기 대상체 제외 기준 중 하나 이상에 대해서 평가된다.

[0328] **i. ATTRv-PN 대상체 제외 기준**

[0329] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 비-TTR 단백질에 기인하는 아밀로이드증, 예를 들어 아밀로이드 경쇄(AL) 아밀로이드증을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 연수막 트랜스티레틴 아밀로이드증을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 임의의 지질 나노입자(LNP) 성분에 과민증을 갖지 않거나, 이전에 LNP를 제공받았고 임의의 치료 관련 실험실 이상 또는 이상 반응(예를 들어, 기준선이 정상인 경우 $3 \times \text{ULN}$ 초과 또는 LNP 함유 제품을 제공받은 후 기준선이 정상을 초과하는 경우 $3 \times$ 기준선 초과)의 ALT 또는 AST, 기준선이 정상인 경우 $1.5 \times \text{ULN}$ 초과 또는 LNP 함유 제품을 제공받은 후 기준선이 정상을 초과하는 경우 $1.5 \times$ 기준선 초과)의 INR, aPTT 또는 d-이량체, CTCAE 3등급 이상으로 분류된 LNP 치료 관련 이상 반응, 치료 또는 주입 중단을 요구하는 LNP 함유 제품에 대한 주입-관련 반응(IRR)을 경험한 적이 있다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 감각 운동 또는 자율 신경병증(예를 들어, 당뇨병성 신경병증, 자가면역 질환-연관 신경병증)의 다른 알려진 원인을 갖고 있지 않다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 5년 이상 동안 제1형 당뇨병을 앓지 않았거나 제2형 당뇨병으로 진단되지 않았다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 전 또는 스크리닝 동안 90일 이내에 심부전 또는 심부전 증상의 악화로 인한 현재 또는 이전의 NYHA 클래스 III 또는 IV 증상을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 90일 이내에 심혈관계 입원 또는 침습적 시술을 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 침습성 심혈관 시술(예를 들어, 관상동맥 스텐트, 심장 박동기 배치 등)을 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 비타민 A 보충을 받지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 치료 전 약물 요법을 받지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 투여 후 14일 이내에 항혈소판제(예를 들어 아스피린, 클로피도그렐) 또는 항혈전 요법(예를 들어 와파린, 다비가트란, 아픽사반)을 사용한 이력이 없다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 혈전성향증(thrombophilia)의 병력이 없거나 인자 V 라이덴 및/또는 프로트롬빈 20210에 대한 유전자 검사에서 양성이다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 2년 미만의 예상 생존 기간을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 비타민 A 결핍과 일치하는 안과학적 소견을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 간경변증의 병력을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 전신 바이러스, 기생충 또는 진균 감염이 알려지거나 의심되지 않으며, 박테리아 감염에 대한 항생제를 제공받지도 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 B형 또는 C형 간염 감염의 병력이 없거나 B형 간염 표면 항원(HBsAg) 또는 C형 간염 바이러스 항체(HCV Ab) 검사 양성이다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 양성 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 상태의 병력을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 이전에 간, 심장 또는 다른 고형 장기 이식 또는 골수 이식을 받은 적이 없거나 투여 후 1년 이내에 예상되는 이식을 받은 적이 없다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 피부의 기저 세포 암종, 치료적으로 절제된 피부의 편평 세포 암종, 치료적으로 치료된 동소 자궁경부 암종 또는 적절한 관리가 관찰만으로 이루어지는 저등급 전립선 선암종을 제외하고, 스크리닝 전 5년 이내 또는 스크리닝 기간 동안 활성 악성종양의 병력이 없다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 전 3년 이내에 알코올 또는 약물 남용의 병력이 없다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 여성이 아니고 가임기가 아니고 모유수유 중이 아니다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 투여 후 7일 이내에 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 중합효소 변화 반응(PCR) 검사에서 양성이다.

[0330] 이들 및 다른 제외 기준의 평가는 당업계에 알려져 있다.

[0331] **ii. ATTR-CM 대상체 제외 기준**

[0332] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 비-TTR 단백질에 기인하는 아밀로이드증, 예를 들어 아밀로이드 경쇄(AL) 아밀로이드증을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 알려진 연수막 트랜스티레틴 아밀로이드증을 갖지 않는다.

[0333] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 임의의 지질 나노입자(LNP) 성분에 대해 알려진 과민성을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 이전에 LNP를 제공받지 않았고 임의의 치료 관련 실험실 이상 또는 이상 반응, 예

를 들어, 기준선이 정상인 경우 $3 \times \text{ULN}$ 초과 또는 LNP 함유 제품을 제공받은 후 기준선이 정상을 초과하는 경우 $3 \times$ 기준선 초과와 ALT 또는 AST; 기준선이 정상인 경우 $1.5 \times \text{ULN}$ 초과 또는 LNP 함유 제품을 제공받은 후 기준선이 정상을 초과하는 경우 $1.5 \times$ 선 초과의 INR, aPTT 또는 d-이량체; CTCAE 3등급 이상으로 분류된 임의의 LNP 치료 관련 이상 반응; 치료 또는 주입 중단을 요구하는 LNP 함유 제품에 대한 주입-관련 반응(IRR)(일부 실시형태에서, 주입 관련 반응을 완화하기 위해 주입 속도를 늦추는 것은 제외적인 것으로 간주되지 않음); 및/또는 조사자의 의견으로는 제외되어야 하는 모든 LNP 치료 관련 이상반응을 경험하지 않았다.

- [0334] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 명시된 기간 내에 ATTR에 대한 다음 TTR 지향 요법을 사용하지 않는다:
- [0335] 파티시란(작은 간섭 리보핵산(siRNA) 치료제 제형화된 LNP), 예를 들어, 이전 사용 이력 및/또는 연구 약물 투여 전 90일 이내에 투여된 마지막 용량.
- [0336] 이노테센(안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)), 예를 들어, 이전 사용 이력 및/또는 연구 약물 투여 전 160일 이내에 투여된 마지막 용량.
- [0337] 부트리시란(연구용 siRNA 치료 GalNAc 접합체), 예를 들어, 이전 사용 이력.
- [0338] 타파미디스(TTR 안정화제), 예를 들어, 대상체는 연구 약물 투여 전 최소 14일 동안 안정적인 용량을 복용 중이다.
- [0339] 다이플루니살(TTR 안정화제), 예를 들어, 마지막 용량은 연구 약물 투여 전 14일 이내에 투여됨.
- [0340] 독시사이클린 및/또는 타우로우르소데옥시콜산(TTR 매트릭스 용매), 예를 들어, 마지막 용량은 연구 약물 투여 전 14일 이내에 투여됨.
- [0341] 실험적 TTR 안정화제(예를 들어, AG-10), 예를 들어, 마지막 용량은 연구 약물 투여 전 6개월 이내에 투여됨.
- [0342] ATTRv-CM의 치료를 위한 임의의 다른 연구용 작용제, 예를 들어, 마지막 용량은 연구 약물 투여 전 30일 또는 5반감기 중 더 긴 기간 이내에 투여됨.
- [0343] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 조사자의 견해에 따라 허혈성 심장 질환(예를 들어, 기록된 심장 효소 및 ECG 변화의 이력을 갖는 이전 심근경색), 고혈압 또는 교정되지 않은 판막 질환에 의해서 유발되고 주로 트랜스 티레틴 아밀로이드 심근증으로 인한 것은 아닌 심부전을 갖지 않는다.
- [0344] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 심박조율기가 제시되지만 배치되지 않을 방실(AV) 결절 또는 동심방(SA) 결절 기능 장애의 병력과 함께 지속적인 심실성 빈맥 또는 중단된 심실 세동의 병력이 없다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 연구 약물 투여 전 28일 이내에 심박조율기 또는 제세동기 배치, 항부정맥 약물의 개시 또는 변경을 갖지 않는다.
- [0345] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 비타민 A 보충제를 복용할 수 없거나 복용을 꺼리지 않는다.
- [0346] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 필요한 예비 약물의 ATTR-CM 상태 투여와 연관된 의미있는 위험을 나타내는 임상 평가를 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 필요한 치료 전 약물 요법을 복용할 수 없거나 복용을 꺼리지 않는다.
- [0347] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 연구 약물 투여 전 14일 이내에 와파린 또는 헤파린/헤파린-유도체를 이용한 항혈전 요법을 받지 않았거나 연구 약물 투여 이후 기간 동안 와파린 항혈전 요법에 대한 예상되는 필요성이 없었다. 일부 실시형태에서, 아픽사반, 다비가트란, 에독사반 또는 리바룩사반의 사용은 용량이 스크리닝 전 28일 동안 안정적이고, 스크리닝 전체에서 안정적이고, 연구 약물 투여 후 90일 동안 안정적으로 유지될 것으로 예상되는 경우 허용된다.
- [0348] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 혈전성향증의 병력 또는 인자 V 라이덴, 프로트롬빈 20210에 대한 양성 유전자 검사의 병력이 없거나 또는 단백질 S 결핍 및/또는 단백질 C 결핍에 대한 임의의 시험에 대해서 양성인 아니다.
- [0349] 일부 실시형태에서, 조사자의 의견에 따르면 인간 대상체의 예상 생존 기간은 1년 미만이다.
- [0350] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 안과 검사에서 비타민 A 결핍과 일치하는 안과학적 소견을 갖지 않는다.
- [0351] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 간경변증의 병력을 갖지 않는다.

- [0352] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 전신 바이러스, 기생충 또는 진균 감염이 알려지거나 의심되지 않으며, 스크리닝 14일 이내 박테리아 감염에 대한 항생제를 제공받지도 않는다.
- [0353] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 시 B형 또는 C형 간염 감염의 병력이 없거나 B형 간염 표면 항원 (HBsAg) 또는 C형 간염 바이러스 항체 (HCV Ab) 검사 양성이 아니다. 일부 실시형태에서, 간경변의 증거가 없고, C형 간염에 대한 치료 의도 요법을 완료하였으며, 위장병 전문의에 의해 활성 C형 간염이 없고 간독성에 대한 증가된 위험이 없는 것으로 간주되는 대상체는 제외되지 않는다.
- [0354] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 양성 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 상태의 병력을 갖지 않는다.
- [0355] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 이전에 간, 심장 또는 다른 고형 장기 이식 또는 골수 이식을 받은 적이 없거나 스크리닝 후 1년 이내에 예상되는 이식을 받은 적이 없다. 일부 실시형태에서, 각막 이식의 이전 이력 또는 계획된 각막 이식은 제외되지 않는다.
- [0356] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 피부의 기저 세포 암종, 치료적으로 절제된 피부의 편평 세포 암종, 치료적으로 치료된 동소 자궁경부 암종 또는 적절한 관리가 관찰로 이루어지는 저등급 전립선 선암종을 제외하고, 스크리닝 전 3년 이내 또는 스크리닝 기간 동안 활성 악성종양의 병력이 없다.
- [0357] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 스크리닝 전 3년 이내에 알코올 또는 약물 남용의 병력이 없다. 일부 실시형태에서, 여성 대상체는 가임기이거나 모유수유 중이 아니다. 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 조사자의 의견으로 대상체의 안전성에 부정적인 영향을 미치거나, 연구 결과의 평가를 손상시키거나, 연구 준수를 배제할 수 있는 어떠한 병태, 실험실 이상 또는 다른 이유도 갖지 않는다.

[0358] 3. 주입 예방

- [0359] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 대상체에게 본 명세서에 기재된(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 암호화하는 mRNA; 및 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA, 예를 들어, TTR 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는) LNP 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 방법은 주입 예방을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 주입 예방은 유전자 편집 조성물을 투여하기 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, LNP 조성물을 투여하기 전에 대상체에게 투여되는 주입 예방 요법은 정맥내 스테로이드; 정맥내 H1 차단제 또는 경구 H1 차단제; 정맥내 또는 경구 H2 차단제를 투여하는 것을 포함한다. 정맥내 스테로이드는 텍사메타손, 예를 들어 10mg일 수 있다. 정맥내 H1 차단제는 다이펜하이드라민, 예를 들어, 50mg일 수 있다. 경구 H1 차단제는 세티리진, 예를 들어 10mg일 수 있다. 정맥내 또는 경구 H2 차단제는 파모티딘, 예를 들어, 20mg일 수 있다.

[0360] 실시예

[0361] 실시예 1. TTR 유전자 편집을 위한 LNP-입자 기반 조성물

[0362] 뉴클레아제 mRNA의 시험관내 전사("IVT")

- [0363] N1-메틸 슈도-U를 함유하는 캡핑되고 폴리아데닐화된 mRNA를 일상적인 방법을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생산하였다. 간략하면, 선형화된 플라스미드 DNA 주형 및 T7 RNA 중합효소, T7 프로모터, 전사용 서열 및 폴리아데닐화 영역을 함유하는 플라스미드 DNA를 제조사의 프로토콜에 따라 XbaI로 선형화하였다. XbaI를 가열에 의해 비활성화시켰다. 선형화된 플라스미드를 효소 및 완충제 염으로부터 정제시켰다. 변형된 mRNA를 생산하기 위한 IVT 반응은 37°C에서의 인큐베이션에 의해서 수행하였다: 선형화된 플라스미드 50ng/ μ l; GTP, ATP, CTP 및 N1-메틸 슈도-UTP(Trilink) 각각 2 내지 5mM; ARCA(Trilink) 10 내지 25mM; T7 RNA 중합효소 5U/ μ l; 뮤린 RNase 저해제(NEB) 1U/ μ l; 무기 이. 콜라이 파이프로스파타제(NEB) 0.004U/ μ l; 및 1x 반응 완충제. TURBO DNase(ThermoFisher)를 최종 농도 0.01U/ μ l로 첨가하고 반응물을 37°C에서 인큐베이션시켜 DNA 주형을 제거하였다.

- [0364] 제조사의 프로토콜에 따라 MegaClear Transcription Clean-up 키트(ThermoFisher) 또는 RNeasy Maxi 키트(Qiagen)를 사용하여 mRNA를 정제시켰다. 대안적으로, mRNA를 침전 프로토콜을 통해 정제시켰고, 어떤 경우에는 그 후에 HPLC 기반 정제를 수행하였다. 간략하면, DNase 분해 후 LiCl 침전, 아세트산암모늄 침전 및 아세트산나트륨 침전을 사용하여 mRNA를 정제시켰다. HPLC 정제된 mRNA의 경우, LiCl 침전 및 재구성 후, mRNA를 RP-IP HPLC에 의해 정제시켰다(예를 들어, 문헌[Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142] 참조). 폴링을 위해 선택된 분획을 합하고, 상기에 기재된 바와 같이 아세트산나트륨/에탄올 침전을 통해 탈염시켰다. 추가 대체 방법에서, mRNA를 LiCl 침전 방법으로 정제시킨 후 접선 유동 여과를 통해 추가로 정제

시켰다. RNA 농도는 260nm(Nanodrop)에서 흡광도를 측정하여 결정하고, 전사체를 Bioanalyzer(Agilent)를 사용하여 모세관 전기영동으로 분석하였다.

[0365] 스트렙토코커스 피오게네스("Spy") Cas9 mRNA를 서열 표에 따라 오픈 리딩 프레임을 암호화하는 플라스미드 DNA로부터 생성시켰다. 이 단락에 인용된 서열이 RNA와 관련하여 하기에 언급되는 경우, T는 U(상기에 기재된 바와 같이 변형된 뉴클레오타이드일 수 있음)로 대체되어야 한다는 것이 이해된다. 실시예에 사용된 메신저 RNA는 5' 캡 및 3' 폴리아데닐화 서열, 예를 들어, 최대 100nt를 포함하고 표 3에서 확인된다. 가이드 RNA는 당업계에 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성된다.

[0366] **sgRNA 및 Cas9 mRNA를 포함하는 LNP 제형의 제조**

[0367] 일반적으로, 지질 나노입자 성분을 100% 에탄올에 다양한 몰비로 용해시켰다. RNA 카고(예를 들어, Cas9 mRNA 및 sgRNA)를 25mM 시트레이트, 100mM NaCl, pH 5.0에 용해시켜, 대략 0.45mg/ml의 RNA 카고 농도를 생성하였다. 사용된 LNP는 이온화 가능한 지질 ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-다이엔오에이트, also called 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부탄오일)옥시)-2-(((3-(다이에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔오에이트)(본 명세서에서 지질 A라고도 불림), 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG를 각각 50:38:9:3의 몰비로 함유하였다. LNP를 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비 약 6 및 gRNA 대 mRNA의 중량비 1:2로 제형화하였다. 사용된 LNP는 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 포함한다.

[0368] 에탄올 중의 지질을 2부피의 RNA 용액 및 1부피의 물과 충돌 제트 혼합하는 교차 흐름 기술을 사용하여 LNP를 제조하였다. 에탄올 중의 지질을 2 부피의 RNA 용액과 혼합 교차를 통해 혼합하였다. 제4 물 스트림을 인라인 티를 통해 교차부의 출구 스트림과 혼합하였다(WO2016010840 도 2 참조). LNP를 실온에서 1시간 동안 유지시킨 후 물(약 1:1 v/v)로 추가로 희석시켰다. 희석된 LNP를 평판 카트리지(Sartorius, 100kD MWCO)에서 접선 유동 여과를 사용하여 농축시킨 후 PD-10 탈염 칼럼(GE)을 사용하여 50mM Tris, 45mM NaCl, 5%(w/v) 수크로스, pH 7.5(TSS)로 완충제 교환시켰다. 이어서, 생성된 혼합물을 0.2µm 멸균 필터를 사용하여 여과하였다. 최종 LNP를 캡슐화 효율, 다분산성 지수 및 평균 입자 크기를 결정하기 위해 특징규명하였다. 최종 LNP를 추가 사용 시까지 4°C 또는 -80°C에서 저장하였다.

[0369] **편집 효율성을 위한 차세대 서열결정("NGS") 및 분석**

[0370] 예를 들어, QuickExtract DNA 추출 용액(Epicentre, Cat. QE09050) 또는 Quick Extract(Lucigen, Cat. SS000035-D2)를 사용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 세포 또는 조직으로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 게놈의 표적 위치에서의 편집 효율을 정량적으로 결정하기 위해서, 서열결정을 활용하여 유전자 편집에 의해 도입된 삽입 및 결실의 존재를 확인하였다. PCR 프라이머는 관심 유전자(예를 들어, TTR) 내의 표적 부위 주위에 설계되었으며 관심 게놈 영역이 증폭되었다. 프라이머 서열 설계는 현장 표준에 따라 수행되었다.

[0371] 서열결정을 위한 화학 물질을 첨가하기 위해 제조사의 프로토콜(Illumina)에 따라 추가 PCR을 수행하였다. 앰플리콘을 Illumina MiSeq 기기에서 서열결정하였다. 품질 점수가 낮은 것을 제거한 후 판독치를 참조 게놈(예를 들어, hg38)에 정렬하였다. 판독치를 포함하는 결과 파일을 참조 게놈(BAM 파일)에 매핑하였고, 여기서 관심 표적 영역과 중첩된 판독치를 선택하고 야생형 판독치의 수 대 삽입 또는 결실("indel")을 포함하는 판독치의 수를 계산하였다.

[0372] 편집 백분율(예를 들어, "편집 효율" 또는 "편집 백분율")은 야생형을 포함한 서열 판독치의 총 수에 대한 삽입 또는 결실("indel")을 갖는 서열 판독치의 총 수로서 정의된다.

[0373] **실시예 2. TTR 유전자를 표적화하는 sgRNA의 선택**

[0374] 인실리코 및 경험적 접근법 둘 다의 조합을 적용한 포괄적인 표적의 특징규명 워크플로우 후에 효율적인 녹아웃 및 특이성을 위해 TTR 유전자 서열 AAAGGCGCUGAUGACACCU(서열번호 15; 인간 게놈 빌드 hg38 염색체 18:31592987-31593007)를 표적화하는 sgRNA를 선택하였다. 높은 치료 지수(표적내 편집 대 표적외 편집의 비율)를 선택하기 위해서 본 발명자들은 게놈 전체 검색 및 표적 서열결정을 수행하여 후보 sgRNA 표적의 부위를 식별하고 검증하였다.

[0375] 상보적인 계산 및 실험실 기반 접근 방식(Cas-OFFinder, GUIDE-seq 및 SITE-Seq)을 사용하여 표적외 편집 가능성이 있는 게놈 유전자좌를 발견하였다. 이어서, 잠재적인 표적외 부위 및 NTLA-2001의 단일 가이드 RNA(sgRNA) 표적 서열 사이의 불일치를 조사하였다. 간격 트리 알고리즘을 사용하여 단백질 암호 엑손과 중첩되는 부위를

검출하였다. 단백질 암호 엑손과 적어도 하나의 뉴클레오타이드 중첩을 갖는 것은 그것이 프로토스페이서 서열과 4개 이하의 불일치가 있는 경우 유지되었다. 암호 DNA 서열(CDS)의 엑손과 중첩되지 않는 잠재적인 표적의 부위에 대해 3개의 불일치가 허용되었다. 두 부위 세트 모두 NTLA-2001에 대해 예측된 잠재적인 표적의 편집 유전자좌의 큐레이션에 포함되었다.

[0376] CRISPR/Cas9 표적의 발견 검정 GUIDE-seq는 이전에 기재된 바와 같이 세포에서 약간의 변경을 거쳐 수행되었다. Illumina 차세대 서열결정(NGS) 라이브러리 준비는 공개된 프로토콜에 따라 수행하였으며 서열결정은 Illumina의 MiSeq 및 HiSeq 2,500 둘 다에서 150개 염기쌍(bp) 페어드-엔드 판독(paired-end read)을 통해 수행하였다. GUIDE-seq는 Spy Cas9 녹색 형광 단백질(Spy Cas9-GFP) 융합 단백질을 구성적으로 발현하도록 조작된 HEK293 세포주(HEK293-Cas9)의 NTLA-2001에서 수행하였다.

[0377] CRISPR/Cas9 표적의 발견 검정 SITE-Seq는 잠재적인 표적의 편집 발견에 가장 민감한 무세포 생화학적 방법인데 그 이유는 이 검정이 CRISPR/Cas9 효소 활성에 대한 임의의 기질 제한을 제거하기 위해서 단백질 제거되고 정제된 게놈 DNA(gDNA)에서 실행되기 때문이다. SITE-Seq는 2명의 고유한 남성 혈액 공여자의 말초 혈액 단핵 세포에서 추출한 인간 gDNA에 대해 실행되었다. 각각의 gDNA 샘플을 Cas9의 시험관내 조립된 리보핵단백질 및 NTLA-2001에 함유된 sgRNA를 표적으로 하는 트랜스크립타제[*TTR*]로 분해시켜 sgRNA 서열과 상동성이 있는 표적내 부위 및 잠재적인 표적의 부위에서 DNA 절단을 유도하였다. gDNA 분해 후, 편집된 단편 농축 및 NGS 라이브러리 작제를 용이하게 하기 위해 유리 gDNA 단편 단부를 어댑터와 결합시켰다. NGS 라이브러리를 실시예 1에 기재된 바와 같이 서열결정하였고, 생물정보학 분석을 통해 판독값을 분석하여 유리 DNA 단부의 게놈 좌표를 결정하였다. 그런 다음 판독이 축적된 인간 게놈의 위치에 잠재적인 표적의 부위로서 주석을 달았다.

[0378] Cas-OFFinder를 사용한 계산 예측 및 경험적 발견 검정 GUIDE-seq 및 SITE-Seq에 의해서 발견된 모든 잠재적인 표적의 편집 유전자좌를 NTLA-2001 게놈 편집 세포에서 검증된 표적의 편집을 위해 선별하고 주석을 달았다. Cas-OFFinder, GUIDE-seq 및 SITE-Seq로부터의 NTLA-2001에 대한 잠재적인 표적의 편집 발견은 NTLA-2001 표적내 부위를 포함하여 총 658개의 부위를 생성하였다. SITE-Seq는 476개(72.3%) 부위를 발견하였고, 그 중 431개(65.5%)는 이 방법에 의해서만 발견되었다. Cas-OFFinder는 222개(33.7%)개의 부위를 발견하였고, 그 중 178개(27.1%)는 이 방법에 의해서만 발견되었다. GUIDE-seq는 12개(1.8%) 부위를 발견하였고, 그 중 4개(0.6%)는 이 방법에 의해서만 발견되었다(도 5).

[0379] 거짓 발견 비율은 각각의 발견 검정에 대해 고유하게 제어되었다: (1) Cas-OFFinder는 게놈 전체에서 최대 3개의 불일치 및 엑손 DNA에서 최대 4개의 불일치가 있는 유전자좌를 식별하도록 조정되었음; (2) 세포-기반 검정 GUIDE-Seq는 Cas9를 구성적으로 발현하도록 조작된 HEK293 세포주에서 최적화되었으며 이중 가닥 공여자 올리고 뉴클레오타이드의 최대 허용 용량이 사용되었음; (3) 생화학적-기반 검정 SITE-Seq는 16nM, 64nM 및 256nM Cas9 RNP 농도에서 표적의 발견에 적합하였고, 64nM Cas9 RNP 분해는 모든 잠재적인 표적의 유전자좌의 포획을 보장하기 위해 최적으로 선택되었는데 이는 더 많은 수의 잠재적인 표적의 유전자좌에 대한 부담으로 인해 본 발명자들의 검증 감도를 감소시키지 않으면서 편집된 셀에서 검증할 수 있음.

[0380] 분류 오류율은 다음과 같다.

[0381] • 게놈 전체에서 최대 3개의 불일치 및 엑손 DNA에서 최대 4개의 불일치를 허용하는 Cas-OFFinder 결과는 221개의 잠재적인 표적의 유전자좌를 식별하였다. 편집된 셀에서 검증 데이터에 기초함:

[0382] ○ 거짓 양성률 = $1 - (3 \div 221) = 98.6\%$

[0383] ○ 거짓 음성률 = $1 - (3 \div 7) = 57.1\%$

[0384] • GUIDE-seq는 11개의 잠재적인 표적의 유전자좌를 식별하였다. 편집된 셀에서 indel 검출 검증 데이터에 기초함:

[0385] ○ 거짓 양성률 = $1 - (3 \div 11) = 72.7\%$

[0386] ○ 거짓 음성률 = $1 - (3 \div 7) = 57.1\%$

[0387] • SITE-Seq는 475개의 잠재적인 표적의 유전자좌를 식별하였다. 편집된 셀에서 indel 검출 검증 데이터에 기초함:

[0388] ○ 거짓 양성률 = $1 - (7 \div 475) = 98.5\%$

[0389] o 거짓 음성률 = $1 - (7 \div 7) = 0\%$

[0390] **실시예 3. 1차 인간 간세포에서 잠재적인 표적외 편집의 검증**

[0391] 표적외 가능성을 평가하는 데 사용된 지질 나노입자[LNP]의 최대 농도는 1차 인간 간세포(PHH)에서 세포 독성을 유발하지 않는 NTLA-2001의 최대 농도를 기준으로 선택되었다. 이 농도는 90% 유효 농도(EC₉₀; PHH에서 90% 초과 의 TTR 단백질 억대운을 달성한 농도)보다 27배 더 컸다.

[0392] PHH에서 잠재적인 표적외 편집을 검증하기 위해 두 가지 보완 기술을 사용하였다. 첫 번째는 RNase H2-의존성 PCR 증폭 및 NGS(rhAMPSeq)라는 불리는 다중 PCR 기술이다. 이 검정을 사용하면 NGS를 사용한 앰플리콘 서열결정을 위한 단일 PCR 반응에서 표적내 유전자좌와 잠재적인 표적외 유전자좌를 동시에 농축할 수 있다. 두 번째 기술은 실시예 1에 설명된 바와 같은 표준 단일플렉스 앰플리콘 서열결정(Amp-Seq)이었으며, 이것을 rhAMPSeq에 적용된 포함 기준에 실패한 유전자좌를 특징규명하는 데 사용하였다.

[0393] Illumina Next Seq 기기를 사용하여 150 염기 bp의 페어드-엔드 서열결정 판독과 2개의 8 bp 이중 인덱싱 판독으로 rhAMPSeq 라이브러리를 서열결정하였다. 그런 다음 샘플-특이적 서열결정 판독을 bowtie2(v2.2.6)를 사용하여 인간 게놈 참조(GRCh38 빌드)에 연결하고 정렬한 다음 Smith-Waterman 알고리즘을 사용하여 코일 재정렬을 수행하였다. 잠재적인 Cas9 절단 부위의 10개 염기쌍 내의 뉴클레오타이드를 인간 게놈 참조 서열에 대한 indel에 대해 평가하였다. 부위 편집 백분율은 indel을 갖는 총 서열결정 판독 수를 총 서열결정 판독 수로 나눈 값으로 정의되었다.

[0394] 과포화 농도의 NTLA-2001에 노출된 후 2개의 PHH 공여자 로트에서 7개의 검증된 표적외 indel이 검출되었다(표 1). 이 접근법은 표적외 편집이 표적내 편집에 정비례하기 때문에 선택되었고 따라서 검증된 표적외 편집의 검출은 NTLA-2001을 사용한 과포화 게놈 편집을 통해 최대화되었다.

표 1

과포화 농도의 NTLA-2001을 사용한 2개의 1차 인간 간세포 공여자 로트에서 게놈 편집의 검증된 표적외 및 표적내 indel 검출

부위 설명	주석	PHH 로트 1		PHH 로트 2	
		평균 Δ indel (%)	p 값	평균 Δ indel (%)	p 값
표적내	표적내	92.57 ± 7.85	0.001	93.50 ± 0.10	1.91E-07
표적외 1	유전자간	7.37 ± 0.72	0.002	1.43 ± 0.12	1.99E-04
표적외 2	인트론	3.70 ± 0.10	3.90E-06	1.07 ± 0.15	4.11E-03
표적외 3	유전자간	0.57 ± 0.06	3.50E-05	0.50 ± 0.20	0.037
표적외 4	유전자간	1.50 ± 0.69	0.03	0.33 ± 0.06	0.001
표적외 5	유전자간	0.30 ± 0.10	0.02	0.13 ± 0.06	0.029
표적외 6	인트론	0.27 ± 0.06	0.01	0.10 ± 0.00	0.211
표적외 7	유전자간	0.27 ± 0.06	0.01	0.10 ± 0.00	0.091

굵은 글씨의 값은 검증된 표적외 indel을 나타낸다. PHH는 1차 인간 간세포를 나타낸다.

[0395]

[0396] 유전자좌 중 5개는 인간 게놈의 유전자간 영역에 위치하였고, 2개는 단백질 암호 유전자의 인트론에 위치하였다. 이러한 검증된 표적외 편집 유전자좌를 NTLA-2001 노출의 용량 반응 방식으로 추가로 특징규명하였다(도 6). 이러한 접근법을 통해 본 발명자들은 치료 관련 TTR 단백질 감소에서 표적외 indel 형성의 검출 및 빈도를 더 자세히 특징규명할 수 있었다.

[0397] NGS를 사용한 특정 표적외 서열결정 데이터의 분석은, PHH에서 평균 90% TTR 단백질 감소를 달성한 EC90보다 최대 3배 더 큰 NTLA-2001로 PHH를 처리할 때 검출된 검증된 표적외 indel이 0건인 것으로 나타났다.

[0398] 잠재적인 표적외 유전자좌의 거짓 분류율을 결정하기 위한 참-세트는 존재하지 않는다. 현재 이용 가능한 전체 게놈 서열결정 기술은 표적화된 앰플리콘 서열결정을 통해 검출된 표적외 indel의 감도에 비해 만족스럽지 않다. 총 657개의 잠재적인 표적외를 0.2% 빈도까지 90% 초과 의 indel을 검출할 수 있는 자격을 갖춘 앰플리콘 서열결정 검증에 적용하였다.

[0399] • 실패한 총 검증 부위 = 98.93%

[0400]  검증된 표적의 유전자좌 = 1.07%

[0401] **실시예 4. NTLA-2001의 효력의 시험관내 평가**

[0402] NTLA-2001의 시험관내 용량 반응 및 유전자 편집 효능을 인간 간세포의 1차 세포 배양에서 평가하였다.

[0403] 1차 인간 간세포에서, NTLA-2001은 매우 강력하였고(EC_{50} : 0.05 내지 0.15nM; EC_{90} : 0.17 내지 0.67nM), *TTR* 유전자 편집의 포화 수준($\geq 93.7\%$)을 나타내어 *TTR* mRNA 및 *TTR* 단백질이 91% 이상 감소하였고 *TTR* 단백질이 95% 이상 감소하였다(도 2). NGS 데이터는 NTLA-2001이 *TTR* 유전자의 녹아웃을 유도했음을 입증하였다.

[0404] 도 2는 가이드 RNA의 농도 증가와 이에 따른 *TTR* 유전자 편집 백분율뿐만 아니라 단일 로트의 1차 인간 간세포에서 *TTR* mRNA 및 단백질 감소 사이의 관계를 도시한다. 1차 indel 패턴은 절단 부위에서의 단일 뉴클레오타이드 결실 또는 삽입이었으며, 이는 프레임시프트 돌연변이를 유도하였다(데이터는 표시되지 않음).

[0405] **실시예 5. 게놈 편집 후 DNA 구조 변이체의 특징규명**

[0406] CRISPR/Cas9 게놈 편집은 이중 가닥 DNA 파손 복구의 자연스러운 결과로 DNA 구조 변이(SV)를 초래할 가능성이 있다. 잠재적인 DNA SV는 염색체간 전좌, 역전, 복제 및 결실을 포함한다. NTLA-2001을 사용한 게놈 편집 후에 발생할 수 있는 잠재적인 DNA SV의 포괄적인 특징규명을 실행하기 위해서 Intellia는 두 가지 보완적인 접근 방식의 적용을 개발하고 검증하였다: (1) SV 특징규명 검정을 통한 짧은 판독 NGS; (2) 긴 범위 PCR을 사용한 긴 판독 NGS(도 7). 이러한 접근법의 결과는 고효율 CRISPR/Cas9 게놈 편집의 공개된 결과와 일관된 일치하고 낮은(<1%) 수준의 DNA SV를 나타내었다.

[0407] SV 특징규명 검정 페어드-엔드 NGS 데이터의 분석은 두 가지 가능한 결과를 나타낸다. 하나는 페어드-엔드 서열 결정 판독의 일치하는 매핑이다. 일치하는 판독 매핑은 잠재적으로 균형 잡힌 재배열을 나타낼 수 있다. 그러나 균형 잡힌 재배열은 정상적인 염색체 구조를 보존하면서 정상적인 표적 편집과 구별할 수 없다. 대체 결과는 페어드-엔드 서열결정 판독의 불일치 매핑이다. 불일치 매핑은 잠재적으로 염색체간 전좌, 역전 또는 복제와 같은 DNA 복구 후 구조적 변형이 있음을 나타낼 수 있다.

[0408] SV 특징규명 검정을 NTLA-2001로 처리된 PHH의 두 공여자 로트에서 수행하였다. 고분자량 gDNA를 분리시키고 상기에 기재된 바와 같이 라이브러리를 준비하였다. NGS 라이브러리를 150bp 페어드-엔드 서열결정 판독과 2개의 8bp 이중 인덱싱 판독을 사용하는 Illumina MiSeq 또는 NextSeq NGS 기술을 사용하여 서열결정하였다. NGS 판독을 인하우스에서 개발된 코드를 사용하여 DNA SV에 대해 분석하였다. 간략하면, 각각의 판독 또는 판독 쌍을 참조 게놈(GRCh38)에 정렬하였다. 일치하지 않는 판독 또는 분할된 NGS 정렬은 5' 및 3' 단부가 야생형 게놈에서 예상되는 DNA 삽입물의 최대 크기(단일 판독의 경우 300bp 및 판독 쌍의 경우 1,000bp)보다 큰 게놈에서 2개의 상이한 위치에 정렬된 판독 또는 판독 쌍으로 정의되었다. NGS가 게놈에서 하나 초과 유전자좌에 정렬되는 경우 관련된 두 단편을 사용하여 다음 기준에 따라 SV를 분류하였다: (1) 염색체 내 전좌; (2) 염색체간; (3) 반전; (4) 복제. 정렬이 하나 초과 클래스의 시그니처와 일치하면 그것을 '복합체'로 분류하였다. 재발성 DNA SV는 검출된 DNA SV를 나타내는 하나 초과 고유 분자 식별자를 갖는 것으로 정의되었다.

[0409] NTLA-2001 게놈 편집 PHH는 표적내 편집의 과포화 수준에서 낮은(<1%) DNA SV 복구 결과를 나타내었다. NTLA-2001을 사용한 게놈 편집 후 검출된 DNA SV의 빈도는 이전에 보고된 고효율 편집 gRNA 결과와 일치한다. 확인된 전좌 중 어느 것도 알려진 위험과 관련이 없었으며, 발견된 유일한 재발 전좌는 자매 염색체의 표적 부위 사이의 무심성 및 이심성 융합이었다.

[0410] CRISPR/Cas9를 사용한 게놈 편집 후 DNA의 킬로염기쌍(Kb) 결실이 잠재적인 복구 결과로 나타날 가능성은 이전에 마우스 배아 줄기 세포, 마우스 조혈 전구 세포 및 인간 분화 세포주에서 보고되었다. Illumina-기반 NGS를 사용한 표적 PCR 기반 앰플리콘 서열결정은 100bp 이상의 삭제와 같은 큰 구조적 변형을 특징규명하고 정량화하는 능력이 제한적이다. 따라서 NTLA-2001을 사용한 게놈 편집 후 DNA 복구의 결과로 발생할 수 있는 대규모 결실의 가능성을 특징규명하기 위해서, 긴 범위 PCR에 이어 Pacific Biosciences 기술을 사용한 긴 판독 서열결정을 미국 뉴욕주 소재의 Mt Sinai의 Icahn School of Medicine에서 수행하였고, 966bp 결실의 검출 한계를 결정하여 자격을 얻었다(도 8).

[0411] 두 개의 PHH 공여자 로트를 NTLA-2001로 처리하고 긴 범위 PCR을 위해 gDNA를 분리시키고 미국 뉴욕주 소재의 Mt Sinai의 Icahn School of Medicine의 Pacific Biosciences Sequel II 장비를 사용하여 서열 결정하였다. PHH에서 NTLA-2001을 사용한 게놈 편집 후 표준 짧은 판독 Amp-Seq를 사용한 표적내 indel 편집 빈도의 분석은

표적내 indel 편집 빈도 $92.57 \pm 7.85\%$ (로트 1) 및 $93.50 \pm 0.10\%$ (로트 2)를 나타내었다. 과포화 게놈 편집 용량으로 시험관내에서 편집된 PHH 게놈에서 Pacific Biosciences 기술인 NTLA-2001을 사용하여 긴 범위 PCR에 이어 긴 판독 서열결정을 분석하면 2명의 PHH 공여자 중 1명에서 471bp 및 1,065bp 크기의 2개의 결실의 낮은 빈도를 나타내었고 각각 판독물의 0.26% 및 0.48%였다(도 9). NTLA-2001의 표적내 부위에 가장 가까운 유전자는 약 28Kb 떨어져 있으므로, 이 보고서에서 특징규명되는 DNA 구조 변이체는 암호 DNA 서열에서 의도하지 않은 추가적인 게놈 변경이 없는 *TTR* 유전자의 파괴를 초래하는 NTLA-2001의 생산적인 게놈 편집 결과로 간주된다.

[0412] 실시예 6. 트랜스제닉 마우스에서 용량-의존적이고 지속적인 효과

[0413] 트랜스제닉 마우스에서의 연구에서 NTLA-2001의 용량 의존성 및 지속적인 효과가 밝혀졌다.

[0414] 첫 번째 실험에서, hu*TTR* 트랜스제닉 마우스를 0.1, 0.3 또는 1mg/kg NTLA-2001, 1mg/kg 비표적화 대조군 지질 나노입자(LNP) 또는 트리스 수크로스 식염수 완충 대조군으로 처리하였다($n =$ 군당 5마리의 마우스). 간 *TTR* 유전자 편집(패널 A) 및 혈청 인간 *TTR* 단백질(패널 B)을 각각 차세대 서열결정 및 인간 트랜스티레틴 효소 결합 면역흡착 검정을 통해 투여 후 7일에 측정하였다. 각각의 군에서 처리된 5마리의 마우스의 평균 및 표준 편차 값을 나타낸다(도 10).

[0415] *TTR* 유전자의 편집은 순환 혈청 *TTR* 단백질 수준을 감소시켰으며, 이는 투여 후 4주까지 최저치에 도달하였고 12개월 관찰 시에도 여전히 최대로 억제되었다.

[0416] 두 번째 실험에서, 간의 2/3를 절제하고 그 다음 전체 간 재생을 수행한 후에도, 유전자 편집 백분율 및 상응하는 단백질 수준은 변화되지 않았는데, 이는 편집의 영구적인 특성을 뒷받침한다(도 11). CD1 마우스를 CRISPR/Cas9 mRNA 및 *TTR* 유전자를 표적으로 하는 단일 가이드 RNA를 함유하는 1mg/kg 지질 나노입자(LNP) 또는 트리스 수크로스 식염수(TSS) 대조군으로 처리하였다(군당 $n =$ 5마리의 마우스). 제7일에 마우스에서 부분 간 절제술(PHx)을 수행하여 간의 약 70%를 제거하였다. 혈청 *TTR* 단백질 농도는 투여 후 제0일, 제7일(PHx 전) 및 제17일(PHx 후 제4일)에 *TTR* 효소 결합 면역흡착 검정을 통해 측정하였다. 각각의 군에서 처리된 5마리의 마우스의 평균 및 표준 편차 값을 나타낸다.

[0417] LNP 제형 투여 후 7일 동안 동물은 혈청 *TTR*의 98% 낙다운을 나타냈는데, 이는 PHx 후 간 재생 후에도 유지되었다. 이들 LNP 처리 동물은 또한 PHx 전후 둘 다에서 동일한 *TTR* 유전자 편집 백분율(73%)을 나타내었는데, 이는 유전자 편집이 간 재생 과정을 통해 유지된다는 것을 나타낸다.

[0418] 실시예 7. 비-인간 영장류에서 LNP-매개 편집

[0419] 계획된 임상 전처리를 모방하기 위해 용량 군(1, 2, 3 및 6mg/kg)당 3마리의 시노물거스 원숭이를 Cyn-LNP 주입 적어도 1시간 전에 텍사메타손으로 전처리하였다. 간에서의 트랜스티레틴(*TTR*) 유전자 편집을 제29일에 차세대 서열결정을 사용하여 평가하였다. 혈청 *TTR* 단백질 농도를 탠덤 질량 분석법을 사용하는 액체 크로마토그래피로 검정하고 기저(제0일) 값의 백분율로 보고하였다. *TTR* 유전자 편집은 1 내지 6mg/kg에서 용량 반응성을 나타내었는데(패널 A), 이는 기준선에 비해 감소된 혈청 *TTR* 단백질 수준에 상응한다(패널 B). 각각의 치료군에 대한 평균 및 표준 편차값을 나타낸다. 패널 B의 음영 상자는 *TTR* 단백질 감소의 치료 관련 범위를 나타낸다(도 13). 시노물거스 원숭이 연구는 LNP 성분의 신속한 초기 분포 및 제거를 입증하였다(도 16 및 도 12).

[0420] 도 14는 시노물거스 원숭이에서의 Cyn-LNP의 단일 용량 약동학의 통합된 요약 플롯이다.

[0421] 또한, 3 또는 6mg/kg의 Cyn-LNP 단일 용량은 전체 간에서 73%의 유전자 편집 백분율(최대) 및 혈청 *TTR*의 거의 완전한 감소(> 94%)와 관련이 있었고, 이는 12개월에 걸쳐서 유지되었다(도 3a). *TTR* 유전자의 편집은 간 조직의 NGS 분석에 의해 확인되었다(도 3b).

[0422] 도 3a는 제0일에 시작하고 367일 동안 추적 관찰된 1.5, 3.0 및 6.0mg/kg(총 RNA/체중)의 용량으로 Cyn-LNP의 정맥내 투여를 제공받은 시노물거스 원숭이(코호트당 $n =$ 3)에서 기준선의 비율로서 혈청 트랜스티레틴(*TTR*) 단백질 농도의 평균 감소를 나타낸다. 치료를 받지 않은 대조군 코호트를 비교를 위해 제공한다. 각각의 점의 수직선은 각각의 군의 3마리의 동물에 대한 표준 편차를 나타낸다. 패널 B는 시노물거스 원숭이에게 Cyn-LNP를 투여한 후 차세대 서열결정 데이터의 결과를 나타낸다. 가이드 RNA 표적 서열은 적색으로 표시된 필수 PAM 서열 옆에 파란색으로 표시된다. [G/A]는 연구에 사용된 시노물거스 원숭이 중에서 자연 발생하는 SNP를 나타낸다. 시노물거스 게놈 빌드 mf5 염색체 18에 대한 indel의 뉴클레오타이드 위치는 다음과 같다:

[0423] +1: 50681549-50681550.

[0424] 1차 indel 패턴은 프레임시프트 돌연변이를 유도하는 절단 부위에서의 단일 뉴클레오타이드 삽입이었다. 삽입 부위에서의 "N"은 응집물에서 모든 indel의 1.03%를 구성하는 다중 뉴클레오타이드 삽입(AA, AGG 등)을 나타낸다. 나머지 부분은 다양한 길이의 결실로 구성되었다. sgRNA는 단일 가이드 RNA를 나타낸다.

표 2

비-인간 영장류 연구의 모델링을 기반으로 한 인간의 트랜스티레틴 단백질 감소 예측

카고 용량 (mg/kg)	TTR 단백질의 감소 예측, %	
	동등하게 강력함*	인간에서 4.6 배 더 강력함*
0.1	24	58
0.3	48	80

예측치는 인간 대상체의 경우 70킬로그램 체중에 기초한다.

[0425]

실시예 8. 임상 시험

[0427] 전체 치료 설계를 도 1에 요약한다. 패널 A는 NTLA-2001의 주요 성분을 나타낸다. NTLA-2001의 카고 시스템은 지질 나노입자(LNP)이다. LNP 제형이 본 명세서에 기재되어 있다. NTLA-2001의 활성 성분은 스트랩토코커스 피오게네스(Spy) Cas9 단백질(분자량이 대략 1.5MDa인 약 4400개의 뉴클레오타이드 서열)을 암호화하는 인간에 최적화된 메신저 RNA(mRNA) 분자 및 트랜스티레틴(TTR)을 암호화하는 인간 유전자에 특이적인 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자(분자량 약 35kDa)이다. 이러한 성분은 약물 투여를 위한 LNP의 카고를 형성한다. NTLA-2001을 정맥내 투여 및 순환체로의 진입 후 LNP는 전신 순환을 통해 간으로 직접 운반되어 우선적으로 분포된다. 패널 B는 NTLA-2001 LNP가 간 내부의 간 동양혈관(hepatic sinusoid)의 모세혈관으로 수송되는 것을 나타낸다. 임상적으로 승인된 다른 LNP와 유사하게, NTLA-2001은 순환계에서 아포지단백질 E(ApoE)에 의해 흡수되고 간세포의 표면에 발현된 저밀도 지질단백질(LDL) 수용체에 의해 흡수된 후 세포내이입 및 엔도솜 형성을 겪는다고 예측된다. LNP가 분해되고 엔도솜 막이 파괴된 후 활성 성분(TTR-특이적 sgRNA 및 Cas9를 암호화하는 mRNA)이 세포질로 방출된다. Cas9 mRNA 분자는 기본 리보솜 과정을 통해 번역되어 Cas9 엔도뉴클레아제 효소를 생성한다. TTR-특이적 sgRNA는 Cas9 엔도뉴클레아제와 상호작용하여 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR)-Cas9 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성한다. 패널 C는 Cas9 RNP 복합체가 핵 내수송을 목표로 하고 핵으로 들어간다는 것을 보여주는데, 여기서 이것은 TTR의 비상보적 DNA 가닥에 있는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)를 인식한다. sgRNA의 5' 단부의 표적-특이적 20개 뉴클레오타이드 서열은 표적 부위의 DNA 이중 나선에 결합하여 CRISPR-Cas9 복합체가 나선을 풀고 표적 유전자에 접근할 수 있도록 한다. Cas9는 일련의 구조적 변화 및 뉴클레아제 도메인 활성화(HNH 및 RuvC 도메인)를 거쳐 sgRNA 상보적 서열에 의해 정의된 바와 같이 TTR 서열을 정확하게 표적으로 하는 DNA 절단을 일으킨다. 내인성 DNA-복구 기전은 절단부의 단부를 결합시켜 잠재적으로 염기 삽입 또는 결실(indel)을 유도한다. indel이 생성되면 미스센스 또는 넌센스 돌연변이로 인해 전장 mRNA의 양이 감소하여 기능적 표적 유전자 mRNA 수준이 감소하여 궁극적으로 표적 단백질 수준이 감소할 수 있다. 표적 단백질, 이 경우 TTR의 생산을 중단시키는 indel을 벗어나 돌연변이라고 한다.

A. 다발신경병증 용량 증량 연구

다발신경병증 코호트1 및 2

등록

[0431] 한 연구 현장에서, 3명의 대상체를 스크리닝하였고, 이들 중 2명이 자격을 갖추고 모집되었다. 한 명의 대상체의 체중은 당시 연구 프로토콜에서 허용하는 상한을 초과하였다. 다른 연구 현장에, 4명의 환자를 스크리닝하였고, 이들 중 4명이 자격을 갖추고 모집되었다. 환자의 연령은 46 내지 64세였으며 4/6은 남성이었고; 체중은 70 내지 90kg이었다. 3명의 환자는 p.T80A 돌연변이, 2명은 p.S97Y 돌연변이, 1명은 p.H110D 돌연변이를 가졌다. 3명의 환자는 선행 요법을 제공받지 않았으며 3명의 환자는 이전에 다이플루니살을 제공받지 않았다. 6명의 환자 모두 다발성 신경병증 장애 점수가 1점이었고 뉴욕 심장 협회 기능 분류 I이었다. N-말단 프로-B형 나트륨 이노 펩타이드(NT-proBNP) 범위는 50 내지 596ng/ℓ였다.

임상시험 설계 및 적격성

[0433] 본 발명자들은 2-부분 글로벌 1상 공개 다기관 연구의 파트 1로부터의 2개의 초기 코호트(코호트 1 및 2)를 보

고한다. 환자는 2020년 11월부터 2021년 4월 사이에 총 RNA/체질량 0.1mg/kg 또는 0.3mg/kg의 NTLA-2001을 단일 용량으로 정맥내 제공받아 치료되었다. 이후 치료된 이들 환자의 데이터를 본 명세서에 또한 보고한다. 파트 1에 대한 주요 적격성 기준은 18 내지 80세, hATTR 아밀로이드증으로 인한 다발신경병증 진단(심근병증 유무), 스크리닝 방문 시 체중 50 내지 90kg, ATTR 아밀로이드증에 대해 승인된 치료제에 대한 접근성 부족을 포함하였다. 연속막 ATTR 아밀로이드증으로 알려진 비-ATTR 아밀로이드증을 갖는 환자 또는 RNA 침묵 요법의 이전 병력이 있는 환자는 제외되었다. TTR 안정화제의 사전 사용은 약효 세척 기간(다이플루니살: 3일)과 함께 허용되었다(도 18).

[0434] **임상 시험 안전성**

[0435] 시노물거스 원숭이에서의 안전성 연구는 최대 무독성 용량(no-observed-adverse-effect level: NOAEL)을 인간에서 1mg/kg 용량과 동일한 3mg/kg을 정맥 내로 단회 투여로서 결정하였다. 전체 신체 표면적을 기준으로 하는 상대측정 스케일링 및 안전성 계수 10을 적용한 후, 본 연구에 대한 NTLA-2001의 최대 권장 시작 용량은 0.1mg/kg이었다. 정맥 LNP 주입의 잠재적 전염증성 효과를 완화하기 위해서, 환자는 주입 전에 글루코코르티코이드 및 히스타민 수용체 1형 및 2형 차단제를 제공받았다.

[0436] 주입을 중단하지 않고 NTLA-2001 치료가 완료되었다. 프로토콜 지정된 중지 사건은 관찰되지 않았다. 치료로 인한 이상 반응은 환자 6명 중 3명에서 보고되었으며, 모두 경증(1등급)의 중증도였다. 1명의 환자는 특별한 관심을 끄는 이상 반응을 경험하였다(1등급 주입 관련 반응, 도 17 참조). 심각한 이상 반응은 관찰되지 않았다.

[0437] d-이량체 수준을 당업계에 공지된 방법에 의해 평가하였다. 6명의 환자 중 5명에서 주입 후 4 내지 24시간 후에 d-이량체 수준의 증가가 관찰되었고; 상승은 인간이 아닌 영장류에서 NOAEL 용량에서 관찰된 것보다 낮았다. 제 7일에 6명의 환자 모두의 값이 기준선으로 돌아왔다. 응집 매개변수는 부분 트롬보플라스틴 시간을 활성화하였고; 프로트롬빈 시간은 당업계에 공지된 방법으로 평가하였으며 결과는 기준 범위 상한의 1.2배 이내로 유지되었다. 피브리노겐 및 혈소판 계수는 당업계에 공지된 방법으로 수행되었으며 기준 범위의 하한을 초과하여 유지되었다. 간 기능 검사(아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제)는 당업계에 공지된 방법으로 수행되었고, 결과는 정상 범위 내에서 유지되었다(도 15).

[0438] 도 15a는 프로트롬빈 시간을 나타내고; 도 15b, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간을 나타내고; 도 15c는 피브리노겐을 나타내고; 도 15d는 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 나타내고; 도 15e는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제를 나타낸다. 청색 선은 시간 경과에 따른 개별 대상체의 결과를 나타낸다. 단일 적색 선은 시간 경과에 따른 평균 결과를 나타낸다. 수평 점선은 각각의 매개변수에 대해 적절하게 ULN 또는 LLN을 표시한다. 기준선은 연구 약물 주입 시작 전에 수행된 마지막 이용 가능한 측정으로 정의된다. 28일까지 중앙 실험실에서 얻은 결과만 플로팅된다.

[0439] ALT는 알라닌 아미노트랜스퍼라제, aPTT는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, AST는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, BL은 기준선, PT는 프로트롬빈 시간, LLN은 정상의 하한, ULN은 정상의 상한을 나타낸다. 치료로 인한 이상 반응 및 실험실 소견을 평가하기 위해 환자를 모니터링하였다. 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의한 TTR 단백질 수준 분석을 위해 기준선 및 제1주, 제2주, 제4주에 혈청 샘플을 얻었다. NTLA-2001 주입 후 24개월 동안 환자의 안전성 및 치료 활성 결과를 평가한다.

[0440] **약동학**

[0441] 중간 약동학 데이터는 정맥(IV) 주입 후 NTLA-2001 이온화 가능한 지질이 최고 수준에서 급격한 감소를 나타낸 후 2차 최고 수준 그리고 그 다음 로그 선형 단계를 나타냈다는 것을 시사한다.

[0442] **임상 시험 효능**

[0443] NTLA-2001의 약력학 효과를 결정하기 위해서, 혈청 TTR 수준을 평가하였다. 샌드위치 ELISA 방법은 건강한 대상체의 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 참조 표준으로 사용하여 정량적 검정으로 개발 및 검증되었다.

[0444] 간략하면, 검정 마이크로플레이트(Nunc, 446612)를 0.05M 카보네이트 코팅 완충액 pH 9.6에서 1μg/ml 다클론성 토끼 항-인간 프리알부민 항체(Dako, A0002)와 함께 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTR 세척 용액(TTRWS: 0.05% Tween-20, 1x Dulbecco's PBS)으로 4회 세척하고, 1X Powerblock(Biogenix, HK085-5k)으로 1시간 동안 차단한 후 TTRWS로 4회 세척하였다. 표준품, 대조군 및 희석된 연구 샘플을 준비된 플레이트와 함께 약 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척한 후 1X Powerblock에서 1:2,500으로 희석된 양 항-인간 프리알부민 항체(Bio-Rad, AHP1837)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척한 후

1X Powerblock에서 1:10,000으로 희석된 항-양 알칼리성 포스파타제 접합체 항체(Sigma, A5187)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척하였다. 플레이트를 제조사의 지침에 따라 SIGMAFAST™ p-나이트로페닐 포스페이트 정제(Sigma-Aldrich, N1891)를 사용하여 전개시켰다. 전개 시약과 함께 30분 동안 인큐베이션시킨 후 2N 수산화나트륨 용액을 사용하여 반응을 중단시켰다. 흡광도를 분광광도법으로 평가하였다. 표준 곡선, 신호(OD) 대 농도를 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 사용하여 생성하여 QC 및 미지 샘플을 정량하였다.

[0445] 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소는 제14일에 관찰되었으며 제28일까지 심화되었다(도 4a). 제28일에 NTLA-2001은 코호트 1(용량 수준 0.1mg/kg)에서 52%, 코호트 2(0.3mg/kg, 도 4b)에서 87%의 평균 TTR 감소와 관련이 있었다. 이 효과는 더 높은 용량의 NTLA-2001을 제공받은 환자에서 TTR 농도가 크게 감소하면서 용량 의존적이었다. 또한, NTLA-2001의 효과는 각각의 용량 수준에서 개체 전체에 걸쳐 재현 가능하였으며, 제28일에 감소 범위는 코호트 1에서는 47 내지 56%(47%, 52%, 56%)였고 코호트 2에서는 80 내지 96%(80%, 84%, 96%)였다(도 4c).

[0446] 패널 A는 코호트 1(0.1mg/kg)에 대한 기준선으로부터 총 순환 혈청 트랜스티레틴(TTR) 단백질의 백분율 변화를 나타낸다. TTR 단백질을 바이오마커 방법 검증을 위한 규제 지침에 따라 검증된 효소 결합 면역흡착 검정으로 정량화하였다. 혈청 샘플을 한 번 측정하였고, 각각의 샘플을 2회 시험하였다. 우수한 실험실 규칙에 따라 성공적인 검정 실행을 위해 재시험을 수행하지 않았다. 코호트 1의 각각의 환자(0.1mg/kg)에 대해, 투여 전 기준선(3개의 샘플링 시점으로부터의 평균 농도)에 비해 혈청 TTR 단백질의 백분율 감소에 대한 데이터가 투여 후 제7일, 제14일 및 제28일에 설명되어 있다. 패널 B는 코호트 2(0.3mg/kg)에 대한 기준선으로부터 총 순환 혈청 TTR 단백질의 백분율 변화를 나타낸다. 방법 및 분석은 패널 A에 기재된 것과 동일하다. 패널 C는 코호트 1 및 코호트 2 둘 다에 대해 28일 기준선으로부터 총 순환 혈청 TTR 단백질의 평균(코호트당 N=3) 백분율 감소를 나타낸다.

[0447] 상기에서 언급된 바와 같이 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소가 28일까지 관찰되었다. NTLA-2001로 치료한 후 제9개월(코호트 1 대상체 1 및 코호트 1 대상체 3, 도 19a) 또는 제12개월(코호트 1 대상체 2, 도 19a) 전체에서 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소가 또한 관찰되었다. 제28일의 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 1(용량 수준 0.1mg/kg)에서는 52%였고, 코호트 2(용량 수준 0.3mg/kg)에서는 87%였다. 제2개월의 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 1에서는 54%, 코호트 2에서는 81%였다. 치료 후 제9개월, 코호트 2의 평균 혈청 TTR 감소는 86%였다(도 19a 및 도 19b). 제12개월의 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 2에서 89%로 유지되었다(표 4).

[0448] 다발신경병증 코호트 3 및 4

[0449] **등록**

[0450] 6명의 대상체를 코호트 3을 위해서 모집하였고, 3명의 대상체를 코호트 4를 위해 모집하였다. 대상체의 연령은 19 내지 70세였으며 9명의 대상체 중 5명은 남성이었고; 체중은 59 내지 111kg이었다. 3명의 대상체는 p.T80A 돌연변이를 가졌고, 2명은 p.E62D 돌연변이를 가졌고, 1명은 p.S70R 돌연변이를 가졌고, 1명은 p.V50M 돌연변이를 가졌고, 1명은 p.E94G 돌연변이를 가졌다. 7명의 대상체는 다발신경병증 장애 점수가 1이었고, 2명은 다발신경병증 장애 점수가 2였다. 7명의 대상체는 뉴욕 심장 협회 기능 분류가 I이었고, 1명은 분류 II였고, 1명은 심부전으로 진단되지 않았다. N-말단 프로-B형 나트륨 이노 펩타이드(NT-proBNP) 범위는 50 내지 544ng/l였다(도 23a 및 도 23b).

[0451] 임상시험 설계 및 적격성

[0452] 본 명세서에는 2-부분 글로벌 1상 공개 다기관 연구의 파트 1로부터의 코호트 3 및 코호트 4의 중간 결과가 포함되어 있다. 환자는 총 RNA/체질량 1.0mg/kg(코호트 3의 6명의 환자) 또는 0.7mg/kg(코호트 4의 3명의 환자)의 NTLA-2001을 단일 용량으로 정맥내 제공받아 치료되었다. 등록 및 적격성 기준은 본 명세서에 기재된 바와 같다.

[0453] **임상 시험 안전성**

[0454] 시노몰거스 원숭이에서의 안전성 연구는 최대 무독성 용량(NOEL)을 인간에서 1mg/kg 용량과 동일한 3mg/kg을 정맥 내로 단회 투여로서 결정하였다. 정맥 LNP 주입의 잠재적 전염증성 효과를 완화하기 위해서, 환자는 주입 전에 글루코코티코이드 및 히스타민 수용체 1형 및 2형 차단제를 제공받았다.

- [0455] 주입을 중단하지 않고 NTLA-2001 치료가 완료되었다. 9명의 대상체 모두에서 치료로 인한 이상 반응이 보고되었다. 이상 반응 대부분은 경증 중등도였다(도 22). 모든 주입 관련 반응은 경미하고 임상적 후유증 없이 해결되는 것으로 간주되었다. 기저 위마비 환자에서 1.0mg/kg 용량에서 단일 관련 3등급 구토 사건(SAE)이 보고되었다. 임상적으로 유의미한 실험실 소견은 관찰되지 않았으며, 일시적인 1등급 간 효소 상승이 관찰되었다. 프로토콜 지정된 중지 사건은 관찰되지 않았다.
- [0456] 간 기능(아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제), 응고 매개변수(활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, 프로트롬빈 시간, 피브리노겐) 및 d-이량체 값은 당업계에 공지된 방법으로 평가하였다. 결과는 정상 범위 내에서 유지되었다(도 21).
- [0457] 도 21a는 프로트롬빈 시간을 나타내고; 도 21b는활성화 부분 프로트롬빈 시간을 나타내고; 도 21c는 피브리노겐을 나타내고; 도 21d는 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 나타내고; 도 21e는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제를 나타내고; 도 21f는 d-이량체 비율을 나타낸다. 각각의 코호트에 대한 시간에 대한 평균 결과로서의 데이터를 나타낸다. 기준선은 연구 약물 주입 시작 전에 수행된 마지막 이용 가능한 측정으로 정의된다. 7일까지 중앙 실험실에서 얻은 결과만 플로팅된다.
- [0458] ALT는 알라닌 아미노트랜스퍼라제, aPTT는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, AST는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, BL은 기준선, PT는 프로트롬빈 시간을 나타낸다. 치료로 인한 이상 반응 및 실험실 소견을 평가하기 위해 환자를 모니터링하였다. 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의한 TTR 단백질 수준 분석을 위해 기준선 및 제1주, 제2주, 제4주 및 제2개월에 혈청 샘플을 얻었다. NTLA-2001 주입 후 24개월 동안 환자의 안전성 및 치료 활성 결과를 평가한다.
- [0459] **임상 시험 효능**
- [0460] NTLA-2001의 약리학 효과를 결정하기 위해서, 혈청 TTR 수준을 평가하였다. 샌드위치 ELISA 방법은 건강한 대상체의 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 참조 표준으로 사용하여 정량적 검정으로 개발 및 검증되었다.
- [0461] 간략하면, 검정 마이크로플레이트(Nunc, 446612)를 0.05M 카보네이트 코팅 완충액 pH 9.6에서 1ug/ml 다클론성 토끼 항-인간 프리알부민 항체(Dako, A0002)와 함께 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTR 세척 용액(TTRWS: 0.05% Tween-20, 1x Dulbecco's PBS)으로 4회 세척하고, 1X Powerblock(Biogenix, HK085-5k)으로 1시간 동안 차단한 후 TTRWS로 4회 세척하였다. 표준품, 대조군 및 희석된 연구 샘플을 준비된 플레이트와 함께 약 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척한 후 1X Powerblock에서 1:2,500으로 희석된 양 항-인간 프리알부민 항체(Bio-Rad, AHP1837)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척한 후 1X Powerblock에서 1:10,000으로 희석된 항-양 알칼리성 포스파타제 접합체 항체(Sigma, A5187)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 TTRWS로 4회 세척하였다. 플레이트를 제조사의 지침에 따라 SIGMAFAST™ p-나이트로페닐 포스페이트 정제(Sigma-Aldrich, N1891)를 사용하여 전개시켰다. 전개 시약과 함께 30분 동안 인큐베이션시킨 후 2N 수산화나트륨 용액을 사용하여 반응을 중단시켰다. 흡광도를 분광광도법으로 평가하였다. 표준 곡선, 신호(OD) 대 농도를 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 사용하여 생성하여 QC 및 미지 샘플을 정량하였다.
- [0462] 코호트 3에서 6명의 대상체 중 3명 및 코호트 4에서 3명의 대상체 중 1명에서 보고된 중간 결과
- [0463] 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소는 제14일에 관찰되었으며 제28일까지 심화되었다. 제7일에 코호트 4로부터의 1명의 대상체(0.7mg/kg; 도 19c의 대상체 3)는 혈청 TTR이 78% 감소한 것으로 보고되었다. 제14일에까지, 대상체의 혈청 TTR이 94% 감소하였고, 제28일까지 97% 감소하였다. 제7일에, 코호트 3의 대상체 3명은 43 내지 88% 범위의 감소를 나타내었다(대상체 1 43%, 대상체 2 80%, 대상체 3 88%). 제14일에 혈청 TTR의 추가 감소가 관찰되었다(대상체 1 80%, 대상체 2 88%, 대상체 3 97%). 제28일에, 감소 범위는 88 내지 98%였다(대상체 1 88%, 대상체 2 88%, 대상체 3 98%; 도 19).
- [0464] 코호트 6에서 6명의 대상체 중 3명 및 코호트 4에서 3명의 대상체 중 3명에서 보고된 중간 결과
- [0465] 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소는 제7일, 제14일, 제28일, 제56일(2개월), 제4개월(일부 대상체), 제6개월(일부 대상체) 및 제6개월(일부 대상체)에 관찰되었다. 이러한 중간 결과 시점에 사용 가능한 각각의 대상체에 대한 모든 값을 도 19b 내지 도 19d에 도시한다. 제28일의 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 3 (용량 수준 1mg/kg)에서는 93%였고, 코호트 4(용량 수준 0.7mg/kg)에서는 86%였다. 제2개월의 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 3에서는 93%, 코호트 4에서는 88%였다. 도 20에 도시된 바와 같이, 감소는 제2개월에도 유지되었

다. 백분율의 감소는 코호트 3(1mg/kg) 및 코호트 4(0.7mg/kg)에 대한 기준선으로부터 각각의 대상체에 대해서 전체 순환 혈청 트랜스티레틴(TTR) 단백질의 변화를 나타낸다. 도 19a 내지 도 19d에 제시된 결과와 관련하여 추가로 업데이트된 혈청 TTR 감소 정보를 하기 표 4에 제시한다. 제6개월에 평균 TTR 감소 백분율은 코호트 3 (용량 수준 1mg/kg)의 경우 모든 대상체에서 93%였고, 코호트 4(용량 수준 0.7mg/kg)의 경우 모든 대상체에 대해 87%였다. 이번 업데이트 현재, 코호트 3의 대상체 6명 중 3명에 대한 제9개월 평균 TTR 감소율은 93%로 유지되었다. ATTR 단백질을 바이오마커 방법 검증을 위한 규제 지침에 따라 검증된 효소 결합 면역흡착 검정으로 정량화하였다. 혈청 샘플을 한 번 측정하였고, 각각의 샘플을 2회 시험하였다. 우수한 실험실 규칙에 따라 성공적인 검증 실행을 위해 재시험을 수행하지 않았다.

표 4

다발신경병증 용량 증량 연구에 대한 업데이트된 임상 시험 대상체 데이터

용량 mpk	환자	체중 (kg)	TTR 유전자형	NT- 프로 BN P 기준선 (ng/L)	TTR (ug/mL)	시험	TTR 감소%
0.1	코호트 1 대상체 1 (C1S1)	82.1	S77Y	89.0	149.94	7 일	-19.00
					100.64	14 일	-45.63
					80.58	28 일	-56.47
					87.61	56 일	-52.67
					97.7	4 개월	-47.22
					99.3	6 개월	-46.36
					86.36	9 개월	-53.35
					105.66	12 개월	-42.92
0.1	C1S2	70.4	T60A	596.0	208.23	7 일	-16.34
					174.31	14 일	-29.97
					132.54	28 일	-46.75
					201.88	4 개월	-18.89
					203.72	6 개월	-18.15
					283.50	9 개월	13.90
					198.51	12 개월	-20.24
					236.53	Month 18	-4.97
0.1	C1S3	89.1	T60A, T80A	127.0	234.60	7 일	-14.12
					149.47	14 일	-45.28
					130.28	28 일	-52.30
					123.75	56 일	-54.69
					153.35	4 개월	-43.86
					184.25	6 개월	-32.55
					142.57	9 개월	-47.81
					150.61	12 개월	-44.86
0.3	C2S1	83.3	S77Y	118.0	130.94	7 일	-43.78
					61.95	14 일	-73.40
					45.78	28 일	-80.34
					56.26	56 일	-75.84
					51.62	4 개월	-77.84
					44.81	6 개월	-80.76
					33.34	9 개월	-85.69
					29.90	12 개월	-87.16
0.3	C2S2	84.0	T60A	359.0	100.02	7 일	-30.43
					30.57	14 일	-78.74
					23.31	28 일	-83.79
					33.47	56 일	-76.72
					35.25	4 개월	-75.48
					31.88	6 개월	-77.83
					28.71	9 개월	-80.03

[0466]

용량 mpk	환자	체중 (kg)	TTR 유전자형	NT- 프로 BN P 기준선 (ng/L)	TTR (ug/mL)	시점	TTR 감소%
					20.03	12 개월	-86.07
0.3	C2S3	89.9	H90D	<50.0	84.08	7 일	-71.98
					20.00	14 일	-93.34
					12.81	28 일	-95.73
					28.37	56 일	-90.55
					25.61	4 개월	-91.47
					17.87	6 개월	-94.04
					21.97	9 개월	-92.68
					21.34	12 개월	-92.89
0.7	C4S1	62.4	E42D	58.0	120.35	7 일	-21.34
					58.76	14 일	-61.60
					51.72	28 일	-66.19
					41.26	56 일	-73.03
					48.44	4 개월	-68.34
					46.19	6 개월	-69.81
0.7	C4S2	97.6	E74G	<50.0	77.36	7 일	-63.17
					22.40	14 일	-89.34
					11.66	28 일	-94.45
					10.94	56 일	-94.79
					8.33	4 개월	-96.03
					10.26	6 개월	-95.12
0.7	C4S3	86.7	T60A	195.0	71.80	7 일	-78.34
					18.39	14 일	-94.45
					8.72	28 일	-97.37
					15.93	56 일	-95.20
					20.37	4 개월	-93.86
					16.36	6 개월	-95.07
					18.48	9 개월	-94.43
1.0	C3S1	75.9	E42D	56.0	121.91	7 일	-42.92
					43.08	14 일	-79.83
					25.10	28 일	-88.25
					n/a	예정되지 않은 방문	-89.51
					24.34	4 개월	-88.60
					25.30	6 개월	-88.16
					34.48	9 개월	-83.86
1.0	C3S2	74.6	E62D	140.0	65.55	7 일	-69.24
					22.43	14 일	-89.47
					12.54	28 일	-94.11
					11.75	56 일	-94.48

[0467]

용량 mpk	환자	체중 (kg)	TTR 유전자형	NT- 프로 BN P 기준선 (ng/L)	TTR (ug/mL)	시점	TTR 감소%
1.0	C3S3	111.0	T80A	<50.0	12.10	4 개월	-94.32
					10.43	6 개월	-95.11
					36.70	7 일	-76.51
1.0	C3S4	59.1	V30M	193.0	8.49	14 일	-94.56
					6.33	28 일	-95.95
					6.74	56 일	-95.69
					5.98	4 개월	-96.17
					7.99	6 개월	-94.88
1.0	C3S4	59.1	V30M	193.0	64.14	7 일	-77.97
1.0	C3S5	69.2	S50R	544.0	16.07	14 일	-94.48
					9.72	28 일	-96.66
					10.07	56 일	-96.54
					11.34	4 개월	-96.11
					9.97	6 개월	-96.58
1.0	C3S5	69.2	S50R	544.0	43.01	7 일	-79.84
1.0	C3S6	88.6	T60A	84.0	26.61	14 일	-87.53
					26.74	28 일	-87.47
					42.54	56 일	-80.06
					21.70	4 개월	-89.83
					35.50	6 개월	-83.36
					8.94	9 개월	-95.81
					44.95	7 일	-87.13
1.0	C3S6	88.6	T60A	84.0	11.39	14 일	-96.74
					8.26	28 일	-97.64
					4.10	56 일	-98.83
					4.75	4 개월	-98.64
					4.30	6 개월	-98.77
					4.65	9 개월	-98.67

B. 다발신경병증 80mg 균일 용량 연구

이번 업데이트 현재, 80mg 균일 용량 연구를 위해 1명의 대상체를 모집하였다. 대상체는 36세, 남성이다. 임상 시험 설계 및 적격성은 대상체가 총 RNA(가이드 RNA + 메신저 RNA) 80mg의 균일 용량으로 단일 용량의 NTLA-2001로 치료되었다는 점을 제외하고는 다발신경병증 연구에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같다.

NTLA-2001의 약리학 효과를 결정하기 위해서, 혈청 TTR 수준을 평가하였다. 샌드위치 ELISA 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같이 건강한 대상체의 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 참조 표준으로 사용하여 정량적 검정으로 개발 및 검증되었다. 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소가 제7일까지 관찰되었다. 제7일에, 대상체는 혈청 TTR이 58% 감소한 것으로 보고되었다(절대 TTR 농도 139ug/mL).

C. 심근증 용량 증량 연구

등록 코호트 1a 및 2a

코호트 1a 및 코호트 2a에 대한 모집이 진행 중이다. 본 명세서에는 TTR 감소 데이터가 입수 가능한 코호트 1a 및 2a의 대상체에 대한 모집 정보가 제공된다. 3명의 코호트 1a 대상체가 모집되었고; 대상체는 71세 내지 75세였으며; 3명의 대상체 모두는 남성이었으며; 체중 범위는 63 내지 88kg이었다. 코호트 1a의 경우, 3명의 대상체 중 2명은 야생형 TTR을 가졌고; 2명의 대상체는 뉴욕 심장 협회(NYHA) 기능 분류가 II였고, 1명의 대상체는 NYHA 기능 분류가 I이었으며; NT-proBNP 기준선 수준은 2103pmol/L 내지 3637pmol/L 범위였다. 1명의 코호트 2a 대상체가 모집되었고; 환자는 남성이며 75세이고, 체중이 71kg이다. 코호트 2a의 대상체는 야생형 TTR을 가졌고; NYHA 기능 분류가 III이었다.

임상시험 설계 및 적격성

본 명세서에는 2-부분 글로벌 1상 공개 다기관 연구의 파트 1로부터의 코호트 1a 및 코호트 2a에서 진행 중인 연구의 중간 결과가 포함되어 있다. 대상체는 총 RNA/체질량 0.7mg/kg(코호트 1a의 3명의 대상체) 또는 0.7mg/kg(코호트 2a의 1명의 대상체)의 NTLA-2001을 단일 용량으로 정맥내 제공받아 치료되었다. 등록 및 적격성 기준은 본 명세서에 기재된 바와 같다.

NTLA-2001의 약리학 효과를 결정하기 위해서, 혈청 TTR 수준을 평가하였다. 샌드위치 ELISA 방법은 본 명세서에

기재된 바와 같이 건강한 대상체의 인간 혈장 TTR(Sigma, P1742)을 참조 표준으로 사용하여 정량적 검정으로 개발 및 검증되었다. 하기 표 5에 요약된 바와 같이 기준선으로부터의 혈청 TTR 단백질 농도의 감소가 관찰되었다.

표 5

심근증 용량 증량 연구에 대한 임상 시험 대상체 데이터

용량 mpk	환자	체중 (kg)	TTR 유전자형	NT- 프로 BNP 기준선 (pmol/L)	TTR (ug/ml)	시점	TTR 감소%
0.7	코호트 1a 대상체 1 (C1aS1)	85	n/a	3637	115.37	7 일	-57.93
					37.94	14 일	-86.16
0.7	C1aS2	63	WT	2103	73.09	7 일	-59.15
					18.83	14 일	-89.48
0.7	C1aS3	88	WT	2480	86.96	7 일	-70.71
					23.76	14 일	-92.00
					16.32	28 일	-94.50
0.7	C2aS1	71	WT	16690	127.89	7 일	-50.04
					43.22	14 일	-83.12
					17.90	28 일	-93.01

실시예 9. 추가 임상 검정

생물분석 방법 및 임상 약리학

NTLA-2001의 4개의 성분인 이온화 가능한 질 A(LP01이라고도 함), DMG-PEG2k 지질, 가이드 RNA 및 mRNA를 정량화하기 위해 혈장 약동학 방법을 개발하고 검증하였다. 지질 A 및 DMG-PEG2k는 탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS) 방법을 사용하는 액체 크로마토그래피로 정량화된다. 검정 신호[내부 표준에 대한 참조 표준 곡선 하 면적의 비율 (IS, 동위원소 표지 참조 표준 사용)] 대 농도 반응 표준 곡선이 사용된다. QC 및 미지의 샘플 신호를 표준 곡선으로부터 보간하여 혈장 농도를 결정한다. 가이드 RNA 및 mRNA 둘 다는 qRT-PCR로 정량화된다. 신호 주기 임계 값(Ct) 대 농도 표준 곡선이 사용된다. QC 및 미지의 샘플을 표준 곡선으로부터 보간하여 혈장 농도를 정량한다. 배설을 특징규명하기 위해 지질 A 및 DMG-PEG2k에 대한 소변 PK 방법을 개발하고 검증하였다.

NTLA-2001 및 항-Cas9 단백질(Cas9mRNA 트랜스진 생성물) 항체에 대한 항-약물 항체(ADA)를 평가하기 위해서 면역원성 방법을 개발하고 검증하였다. 두 방법 모두 NTLA-2001 LNP 또는 Cas9 단백질이 포획 항원으로 코팅된 샌드위치 형식의 MSD-ECL(Meso Scale Discovery Electrochemiluminescence) 검정을 사용한다. 약물 또는 Cas9 단백질에 대한 고정된 항체를 항-인간 IgM/IgG-세포 태그 검출 항체에 의해 검출하였다. 샘플 분석은 항체 반응을 스크리닝, 확인 및 역가 측정하기 위해 규제 지침에 따라 컷 포인트를 사용하여 역가별 분석으로 계획하였다. 확증적 검정은 컷 포인트를 기반으로 하는 약물 또는 Cas9 단백질 경쟁적 저해를 기반으로 한다. 확인된 양성 샘플을 종점 역가에 대해 시험한다.

추가 약리학 방법은 1차 PD로서 ELISA에 의한 혈청 TTR, 2차 PD로서 LC-MS/MS 그리고 환자 관리 및 PD를 위한 프리알부민 시험관내 진단 방법(IVD)을 포함하였다. 샌드위치 ELISA 방법은 건강한 대상체의 인간 혈장 TTR)을 참조 표준으로 사용하여 정량적 검정으로 개발 및 검증되었다. 다클론성 항체를 포획 항체 및 검출 항체 둘 다로서 사용한다. QC 및 미지 샘플을 정량하기 위해서 신호(OD) 대 농도 표준 곡선을 생성한다. V30M 돌연변이체 및 상응하는 야생형 V30V를 포함한 TTR을 정량하기 위해서 3개의 대용 펩타이드, 및 NHP 데이터 연결을 위한 NHP LC-MS/MS 펩타이드 위치와 유사한 3차 펩타이드 업스트림을 사용하여 LC-MS/MS 방법을 개발하고 검증하였다. 신호(각각의 펩타이드에 대한 참조 표준/IS 표지된 동위원소의 비율) 대 농도 반응을 QC 및 미지 샘플을 보간하기 위한 표준 곡선으로 사용하여 혈청 농도를 결정한다. 프리알부민 방법은 면역 복합체를 생성하기 위해 TTR에 대한 다클론성 항혈청을 첨가하는 경우 TTR의 존재가 탁도를 형성하는 IVD 방법과 같은 탁도 측정 원리를 기반으로 한다. 샌드위치 ELISA에 의한 레티노이드 결합 단백질(RBP)을 포함하여 탐색 목적을 위해 추가적인 PD 바이오마커 검정을 개발하고 검증하였다. 탐색적 PD 바이오마커인 순환 신경필라멘트 경색(NFL)를 Quanterix Simoa 플랫폼을 기반으로 하는 검증된 방법을 사용하여 정량화하였고; 이 바이오마커는 ATTR-PN 특이적이다.

NTLA-2001 주입 후 사이토카인 반응을 평가하기 위해서 멀티플렉스 사이토카인(GM-CSF, IFN γ , IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17A, IL-23, TNF α)(Luminex) 및 MCP-1(ELISA)을 개발하고

검증하였다. 보체 활성화를 평가하기 위해서 ELISA에 의한 보체 성분 C3a, C5a 및 Bb 방법을 개발하고 검증하였다.

[0485] NTLA-2001의 4개의 성분(이온화 가능한 지질 A, DMG-PEG2k 지질, 가이드 RNA 및 mRNA)에 대한 예비 혈장 PK 데이터가 입수 가능하다. 0.1 내지 1.0mg/kg의 용량으로 NTLA-2001을 단일 IV 주입한 후, LP01은 피크 수준에서 급격한 감소를 나타낸 후 2차 피크가 이어졌고 그 다음 이러한 용량 범위 전체에서 19.74(16.57) 내지 24.81(23.55)h 범위의 평균(%CV) 말단 t_{1/2}를 특징으로 하는 log-선형 단계를 나타낸다. 도 24. 다른 성분에 대한 데이터는 나타나지 않는다.

[0486] **실시예 10. 노출-반응(ER) 분석**

[0487] 하기 수학적 식 1에 따라 시그모이드 관계를 가정하고 R4.0.5(The R Foundation for Statistical Computing, 오스트리아 빈 소재)를 사용하여 비선형 최소 제곱을 사용하여 28일 TTR(기준선%)을 사용하여 NTLA-2001에 대해 중간 ER 모델을 개발하였다.

[0488]
$$TTR(\text{기준선}\%) = 100 - E_{\max} \cdot \frac{EC_{50}^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + AUC^{\gamma}} + \varepsilon \quad \text{수학적 식 1}$$

[0489] 상기 식에서, γ 는 Hill 계수이고, E_{max}는 D28 TTR(기준선%)의 최대 감소이며, EC₅₀은 D28 TTR(기준선%)의 절반 최대 효과에 상응하는 NTLA-2001 노출이고, ε 는 평균이 0이고 분산이 σ^2 인 정상 분포이다. 평균 예측에 대한 부트스트랩(용량 근별로 계층화됨, n=1000) 신뢰 구간(CI)을 생성하였고; 예측 구간(PI)은 부트스트랩 추정치(n=1000) 및 ε 의 시뮬레이션을 통해 생성되었다.

[0490] 모델 적합성은 NTLA-2001에 대한 포화 ER 관계를 도시하는 도 25에 제시되어 있다.

[0491] **실시예 11. 집단 약동학(POP PK)**

[0492] NONMEM 소프트웨어(버전 7.5.0, ICON Clinical Research LLC, 미국 펜실베이니아주 블루 벨 소재)를 사용하여 공개된 모델을 기반으로 NTLA-2001 분석물 LP01에 대한 중간 POPPK 모델을 개발하였다. 이 분석은 15명의 ATTRv-PN 대상체에 대한 290개의 관찰이 존재하였다. 이 모델의 매개변수 값 및 적합도 플롯을 결정하였다(나타내지 않음). 모델링된 선형 관계와 함께 체중 및 추정 제거 청소율 사이의 관계를 결정하였다. 관계는 비례보다 작고, 즉, 체량이 두 배로 증가하면 제거율이 2배 미만으로 변화된다.

[0493] 도 26은 1mg/kg(좌측 패널) 및 80mg(우측 패널) NTLA-2001의 투여 후 중량 사분위수에 따른 시뮬레이션된 AUC 분포를 제공한다. 체중 중간값[5%, 95%]이 81[48, 146]kg인 10,000명의 가상 대상체에게 수행된 POPPK 시뮬레이션은 체중 사분위수에 전체에서 1mg/kg NTLA-2001을 투여한 후 LP01 AUC가 상당히 중첩되고 체중에 따른 중간값 노출 증가에 대해서 약간의 경향성이 있다는 것을 시사한다. 마찬가지로, 80mg NTLA-2001 이후에도 체중 사분위수에 걸쳐 시뮬레이션된 LP01 AUC의 중첩이 존재한다. 체중 기반 투여에 대한 고정 후 NTLA-2001 AUC 추정치의 기하 평균 및 개별 비율(GMR)의 5번째 및 95번째 백분위수 범위는 0.98[0.74, 1.28]이다. 첫 번째 체중 사분위수([48 내지 71.7]kg)에 대한 네 번째 체중 사분위수([90.3 내지 146]kg)의 시뮬레이션된 평균 노출 비율은 1mg/kg NTLA-2001의 경우 1.25이고 80mg NTLA-2001의 경우 0.81이다. 모의실험은 NTLA-2001 80mg이 1.0mg/kg과 동일한 고정 용량인 것으로 확인해 주었다.

[0494] **서열 표**

[0495] 하기 서열 표는 본 명세서에 개시된 서열 목록을 제공한다. DNA 서열(T 포함)이 RNA와 관련하여 언급되는 경우 T는 U(문맥에 따라 변형되거나 변형되지 않을 수 있음)로 대체되어야 하며 그 반대의 경우도 마찬가지인 것으로 이해된다.

서열 번호	설명	서열
1	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	ATGGACAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGAT GGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAGTTCAAGGTCCT GGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG TTTCAGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAA GAAGATACACAAGAGAAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAG CAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGC TTCTGGTTCGAAGAGACAAGAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA TCGTGACGAGAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAG AAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTG GCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACC TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGAC ATACAACACAGCTGTTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA AAGGCAATCTTCGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAACCTGA TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGC ACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATTCAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA GACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACC TGCTGGCAGATCGGAGACCACTACGACAGACCTGTTCTTGGCAGCAAGAA CCTGAGCGACGCAATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAACACAGAAATC ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACC AGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGTA CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGACAGGATACATCGAC GGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCTGGAAA AGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTG GGAGAATTCACGCAATCTTCGAGAAGCAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGTA AGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCTGACATTCAGAATCCCGTACTA CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAG CAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAACTTCGACAAGAACCTGCC GAACGAAAAGGTCCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC TACAACGAATGACAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGG CATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC AAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAA GCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAAGAAAACGAAGACATCTTGAAGACATCGTCTGCACTGACA CTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACC TGTTTCGACAGCAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATG GGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGA AAGACAATCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGC ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCTGCACGAAACACATCGCAAACCTGGCA GGAAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCTGACAGACAGTCAAGGTCGTCGACG AACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCTTCGAAAT GGCAAGAGAAAACGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGA ATGAAGAGAATCGAAGAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCTGAAGG AACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGACATCAACAGA CTGAGCGACTACGAGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG CGACACGTCCTCCGAGCGAAGAGTCTGTCAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA

[0496]

서열 번호	설명	서열
		CAGTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAA AGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAG ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGAC AGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAATCA AGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCA GTTTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAATACCACCACGACACAGCGCATAC CTGAACGCGAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA GCGAATTGCTCTACGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGC AAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGA CAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTC AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCA TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGA CCCGAAGAAAGTACGGAGGATTTCAGACGCCGACAGTCGCATACAGCGTCTG GTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGG AACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAGAAGAGCTTCGAAAAGAACCCGAT CGACTTCTGGAAGCAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATC AAGTGCCGGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGC TGCGAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAA GTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGC CCGGAAGACAAAGCAAGCAAGCAGCTGTTCTGTAACAGCACAAAGCACTACC TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGC AGACGCAAACTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAGCACAGAGACAAAG CCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAC TGGGAGCACCGGCGAGCATTCAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG ATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGAGCGCAACACTGATCCACCAGAGCATC ACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAG GAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
2	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGGCGGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCTCCAGAAGTTCAAGGTGCT GGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGC GGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCAGGATCTGTACCTGCAGGAGATCTTCTC CAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCC TTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACA TCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGGC GAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTG GCCCTGGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCACTTCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTATCCAGCTGGTGCAGAC CTACAACAGCTGTTCGAGGAGAAACCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCC AAGGCCATCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGGCGCTGGAGAACCTGA TCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCTGTTCGGCAACCTGATCGC CCTGTCTCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAATTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAC TGCTGGCCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTCTCTGGCCGCAAGAA CCTGTCCGACGCCATCCTGTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATC ACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACC AGGACCTGACCTGTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGAGCTGCCCGAGAAGTA CAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAAGGCTACGCCGGCTACATCGAC GGCGGCGCTCCAGGAGGAGTCTTCAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAGA AGATGGACGGCACCGAGGAGCTGTGTTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACAGATCCACCTG

[0497]

서열 번호	설명	서열
		GGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA AGGACAACCGGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTA CGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAG TCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGGCG CCTCCGCCCAGTCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCC CAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCG CCTTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGAC CAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCT CCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCGTGACC CTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGTGAAGACCTACGCCACCC TGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGCGGTACACCGGCTG GGGCCGCGTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGC AAGACCATCCTGGACTTCTTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTCA TGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC CCAGTGTCGCGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC GGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGAGC AGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCGAGAACATCGTGATCGAGAT GGCCCGGGGAGAACAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGG ATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGG AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTCGACAACGAGAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGG CTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCGAGTCTTCTGTAAGGACG ACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTC CGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGG CAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCA AGGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG GCAGCTGGTGGAGACCCCGGAGATCACCAGCAGTGGCCCGAGATCCTGGAC TCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGA AGGTGATCACCCCTGAAGTCCAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCA GTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAATAACACCCAGCCACGACGCTAC CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGT CCGAGTTCTGTACGCGGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGC CAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCC AACATCATGAACCTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCC GGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGA CAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTG AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCA TCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGA CCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCCTGGCCTACTCCGTGCTG GTGGTGGCCAGGTGGAGAAGGCCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGG AGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTTCCGAGAAGAACCCCAT CGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGC TGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAA GTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCC CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTGTTGGAGCAGCACAAGCACTACC TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTCTTCCAAGCGGGTGTCTTGGC CGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCTACAACAAGCACCGGGACAAAG CCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACC TGGGCGCCCCCGCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG

[0498]

서열 번호	설명	서열
		GTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAGTCCATC ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCAGCTGGGGCGGCACGGCG GCGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
3	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACGAACAGCGUUGGCU GGGUCUGUAUCACGGACGAGUACAAGGUUCCUCAAGAAGUUAAGGUGCU GGGCAACACGGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAAUUCUAUCGGUGCACUGCUG UUCGACAGCGGUGAGACGGCCGAAGCCACGCGGUGAAGCGGACCGGCCGCC GGCGGUACACGCGGCGGAAGAACCAGAUUCGUACCUUGCAGGAGAUUCUAG CAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCGGUGGAGGAGAGC UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACA UCGUGGACGAAGUCGCCUACCACGAGAAGUACCCCAUUAUACCAUCCUGCG GAAGAAGCUGGUGGACUCGACUGACAAGGCCGACUGCGGCGUAGUUAUCCUG GCACUGGCCCAUGAUAAAGUUCGGGGGCCAUUCUGAUUCGAGGGCGACC UGAACCCUGACAACACAGCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGAC CUACAACAGCUGUUCGAGGAGAACCACAUAACGCCAGCGGCGUGGACGCC AAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCCGGCGGUGGAGAAUUCUA UCGCCACAGCUUCAGGUGAGAAGAAGAUUGGGUGUUCGGCAAUUCUAUCGC ACUCAGCCUGGGCCUGACUCCCAUUAAGAGCAACUUCGACCUUGGCCGAG GACGCCAAGCUGCAGCUACGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAAUC UCCUGGCCCAAGAUCCGGGACCAAGUACGCCGACCUUGUUCUGGCGUCCAAAGAA UCUCAGCGACGCCCAUCCUGCUCAGCGACAUCUGCGGUGAAGACACAGAGAU ACGAAGGCCCCCUACGCGCCAGCAUGAUAAAGCGGUACGACGAGCACCAACC AGGACUCGACGCGUGCUGAAGGCACUGGUGCGGCAGCAGCUUCAGAGAAUGUA CAAGGAGAUUCUUCGACGAGCAAGAAUGGGUACGCCGGGUACAUCGAC GGUGUGGCCAGCCAGGAGAGUUCUACAAGUUAUUAAGCCCAUCCUGGAGA AGAUGGACGGCACAGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACAGGGAGGACCUUCU GCGGAAGCAGCGGACGUUCGACAAUGGGAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUUG GGUGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGGAGGAGACUUCUACCCUUCUUGA AGGACAACAGGGAGAAGAUAGAGAAGAUCCUGACGUUCGGAUUCCCUACUA CGUUGGCCCCUUGGCCCGCGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAUGACGCGGAAG AGCGAGGAGACGAUCAUCCUGGAACUUCGAGGAAGUCGUGGACAAAGGUG CCAGCGCCAGAGCUUCAUCGAGCGGAGUACGAACUUCGACAAGAAUUCUUC AAACGAGAAGGUGCUUCCAAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACGGUG UACAACGAGCUGACGAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGGCAUGCGGAAGCCCG CCUUCUUCAGCGGUGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUUGCUUUAAGAC GAACCGGAAGGUGACGGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGAU GAGUUCUUCGACAGCGUGGAGAUACGCGGCGUGGAGGACCGGUUAACGCCA GCCUGGGCACCUACACGACCUUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCU GGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCUGGAGGACAUCGUGCUGACGUGACG CUGUUCGAGGACAGGGAGAUUAAGAGGAGCGGUGAAGACCUACGCCCAACC UGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACAGGGCUG GGGCCGGCUACAGCCGGAAGCUGAUCAAUGGGAUCCGAGACAAGCAGAGCGGC AAGACGAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACGUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGC CCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCCGCAUUCUGCC GGGAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGGAUCCUGCAGACGGUGAAGGUGGUGGACG AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAAGCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAU GGCCAGGGGAGAACCAGACGACUCAAAAGGGGCGAAGAACAGCAGGGAGCGG AUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGG AGCACCCCGUGGAGAACACUCAACUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUA CCUGCAGAAUGGGCGAGACAUGUACGUGGACAGGAGCUGGACAUCAACCGG CUCAGCGACUACGACGUGGACCAUUCGUUCCCAAGAGCUUCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUGCUGACGCGGAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAG

[0499]

서열 번호	서열	서열
		CGACAACGUUCCUCAGAGGAAGUCGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGG CAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACUCAACGGAAGUUCGACAAUCUCACGA AGGCCGAGCGGGGUGGCCUCAGCGAGCUGGACAAGGCCGGGUUCAUCAAAGCG GCAGCUGGUGGAGACGCGGCAGAUACGAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGAC AGCCGGAUGAACACGAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCAGGGAAGUCA AGGUGAUCACGCUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCGGAAGGACUUCGA GUUCUACAAGGUGAGGGGAGAUCAACAACUACCCACGCCCCACGACGCCUAC CUGAACGCUGUGGUUGGCACGGCACUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGA GCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUAGC CAAGAGCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACGGCCAAGUACUUCUUCUACAGC AACAUCAUGAACUUCUUCAGACAGAGAUACGCGUGGCCAAUGGUGAGAUCC GGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACGAUUGGUGAGACGGGUGAGAUCCGUGGGGA CAAGGGGCGAGACUUCGCCACGGUGCGGAAGGUGCUCAGCAUGCCCCAGGUG AACAUUCGUGAAGAAGACAGAAGUCCAGACGGGUGGCUUCAGCAAGGAGAGCA UCCUUCCAAAGCGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGA CCCCAAGAAGUACGGUGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUG GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUGAAGG AGCUGCUGGGCAUCACGAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACCCAU CGACUUCUGGAAGCCAGGGGUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCUAC AAGCUUCCAAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAUGC UGGCCAGCGCCGGUGAGCUGCAGAAGGGGAACGAGCUGGCACUUCUCCUAAA GUACGUGAACUUCUGUACCGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGGAGC CCAGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAGCACUACC UGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGC CGACGCCAAUCUCGACAAGGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGAGACAAG CCCAUCAGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACGCUGACGAAUC UCGGUGCCCCCGCUGCCUCAAAGUACUUCGACACGACGAUCGACCGGAAGCG GUACACGUCGACUAAAGGAAGUCCUGGACGCCACGCUGAUCCACCAGAGCAUC ACGGGCCUGUACGAGACGCGGAUCGACCUCAGCCAGCUGGGUGGCGACGGUG GUGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUAG

[0500]

서열 번호	설명	서열
4	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUCGACAUCGGCACCAACAGCGUCGGCU GGGCCGUCUACACCGACGAGUACAAGGUCCCCAGCAAGAAGUUCAGGUCCU CGGCAACACCGACCGCCACAGCAUCAAGAAGAACCUCUACGGCGCCUCCUC UUCGACAGCGGGGAGACCGCGAGGCCACCCGCCUCAAGCGCACCGCCCGCC GCCGCUACACCCGCGCAAGAACCAGCAUCUGCUACCUCCAGGAGAUUCUAG CAACGAGAUUGGCCAAGGUCGACGACGCUUCUCCACCGCCUCGAGGAGAGC UUCUCUGUCGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCCACCCCAUCUUCGGCAACA UCGUCGACGAGGUCGCCUACACGAGAAGUACCCCAACUACACCUCCG CAAGAAGCUCUGCAGCAGCACCGACAAGGCCGACCUCCGCCUCAUCUACUCC GCCUCGCCCCACAUGAUCAAGUUCGCGGCCACUUCUCAUCGAGGGCGACC UCAACCCCGACAAACAGCGACGUCGACAAGCUCUUAUCCAGCUCGUCGAGAC CUACAACCAGCUCUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUCGACGCC AAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCGCCGCCUCGAGAACCUCU UCGCCAGCUCGCCCGGGGAGAAGAAGAACGGCCUCUUCGGCAACCUCAUCGC CCUCAGCCUCGGCCUACCCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUCCGCCGAG GACGCCAAGCUCGAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUCGACAAAC UCCUCGCCCAGAUCCGGGACCAUACGCCGACCUUCUCCUCGCCGCCAAGAA CCUCAGCGACGCCAUCUCCUCAGCGACAUCUCCCGGCUACACACCGAGAU ACCAAGGCCCCCCUCAGCGCCAGCAUGAUCAAGCGCUACGACGAGCACCCAC AGGACCUACCCUCCUCAAGGCCUCCGUCGCCGAGCAGCUCGCCGAGAAGUA CAAGGAGAUUCUUCGACCAAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGAC GGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGUUCACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGAGA AGAUGGAGGGCACCGAGGAGCUCCUCGUAAGCUCAACCGCGAGGACCUCCU CCGCAAGCAGCGCACCUUCGACAACGGCAGCAUCCCCACCAGAUCCACCU GGCGAGCUCCACGCCAUCCUCCGCCCGAGGAGGACUUCUACCCUCCUCA AGGACAACCGCGAGAAGAUAGAGAUCCUACCUUCCGCAUCCCUACUA CGUCGGCCCCCUCGCCCGCGCAACAGCCGCUUCGCCUGGAUGACCCGCAAG AGCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUCGUCGACAAGGGCG CCAGCGCCCAGAGCUUCAUCGAGCGCAUGACCAACUUCGACAAGAACCUC CAACGAGAGGUCUCCUCCCAAGCACAGCCUCCUACGAGUACUUCACCGUC UACAACGAGCUCACCAAGGUCAAGUACGUCACCGAGGGCAUGCGCAAGCCG CCUUCUCAGCGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGACCUCCUUCUACAAGAC CAACCGCAAGGUCACCGUCAAGCAGCUCUAGGAGGACUACUUCAGAAGAUC GAGUGCUUCGACAGCGUCGAGAUACGCGGCGUCGAGGACCGUUAACGCCA GCCUCGGCACCUACACGACCUCCUCAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCU CGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUCGAGGACAUUCUCCUACCCUACCC CUCUUCGAGGACCGCGAGAUGAUCGAGGAGCGCCUCAAGACCUACGCCACC UCUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUCUAGCGCCCGGCUACACCGGCU GGCGCGCCUCAGCGCAAGCUCUACAACGGCAUCCCGGACAAAGCAGAGCGGC AAGACCAUCCUCGACUUCUCAAGAGCGAGCGCUUCGCCAACCGCAACUUA UGCAGCUCAUCCACGACGACAGCCUACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGC CCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUCCACGAGCAUUCGCCAACCUCCGCC GGCAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUCCAGACCGUCAAGGUCGUCGAG AGCUCGUAAGGUCAUGGGCCGCCACAAGCCCGAGAACAUUCGUAUCGAGAU GGCCCGCGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAAGCCCGGAGCGC AUGAAGCGCAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUCGGCAGCCAGAUCCUCAAGG AGCACCCCGUCGAGAACACCCAGCUCAGAACGAGAAGCUCUACCUUACUA CCUCCAGAACGGCCCGGACAUUGUACGUCGACAGGAGCUCGACAUCAACCGC CUCAGCGACUACGACGUCGACCAUUCGUCCCCAGAGCUUCUUAAGGACG ACAGCAUCGACAAAGGUCUACCCCGAGCGACAAGAACCAGCGCAAGAG CGACAACGUCCCCAGCGAGGAGGUCGUAAGAAGAUAGAAGACUACUGGCGC CAGCUCUCAAACGCCAAGCUCUACCCAGCGCAAGUUCGACAACCUACCA AGGCCGAGCGCGCGGCCUCAGCGAGCUCGACAAGGCCGGCUUCAAGCG

[0501]

서열 번호	설명	서열
		CCAGCUCGUCGAGACCCGCCAGAUACCAAGCACGUCGCCAGAUCCUCGAC AGCCGCAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUCAUCCGCGAGGUCA AGGUCAUCACCCUCAAGAGCAAGCUCGUCAGCGACUCCGCAAGGACUCCA GUUCUACAAGGUCCGCGAGAUCAACAACUACCAACGCCCCACGACGCCUAC CUCAACGCCGUCGUCGGCACCGCCCUCAUCAAGAAGUACCCCAAGCUCGAGA GCGAGUUCGUCUACGGCGACUACAAGGUCUACGACGUCCGCAAGAUCAUCGC CAAGAGCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCACAGC AACAUCAUGAACUUCUUAAGACCGAGAUACCCUCCGCAACGGCGAGAUCC GCAAGCGCCCCUCAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUUCGUCGGGA CAAGGGCCGCGACUUCGCCACCGUCCGCAAGGUCCUCAGCAUGCCCCAGGUC AACAUUCGUCAAGAAGACCGAGGUCCAGACCGGGCGGUUCAGCAAGGAGAGCA UCCUCCCCAAGCGCAACAGCGACAAGCUCAUCCGCCGCAAGAAGGACUGGGA CCCCAGAAGUACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUCGCCUACAGCGUCCUC GUCGUCGCCAAGGUCGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUCAGAGCGUCAAGG AGCUCUCCGCGCAUCACCAUCAUGGAGCGCAGCAGCUUCGAGAAGAACCCAU CGACUUCUCGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUCAAGAAGGACCUCAUCAUC AAGCUCUCCCAAGUACAGCCUUCUUCGAGCUCGAGAACGGCCGCAAGCGCAUGC UCGCCAGCGCCGGCGAGCUCAGAAAGGGCAACGAGCUCGCCUCCCGAGCAA GUACGUCAACUCCUCUACUCCGCCAGCCACUACGAGAAGCUCAGGGCAGC CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUCUUCGUCGAGCAGCACAAAGCACUACC UCGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUUCAGCAAGCGCGUCAUCCUCGC CGACGCCAACCUCCGACAAGGUCCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGCGACAAG CCCAUCCGCGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUUUCACCCUACCCAAACC UCGGGCGCCCCCGCCCUUCAAGUACUUCGACACCAUCCAGACCGCAAGCG CUACACCAAGCACCAAGGAGGUCCUCGACGCCACCCUCAUCCACCAAGAGCAUC ACCGGCCUCUACGAGACCCGCAUCGACCUACGCCAGCUCGGGGCGGACGGCG GCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGUCUAG

[0502]

서열 번호	설명	서열
5	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCGGTGATCACCAGCAGTACAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCT GGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGCGCCCTGCTG TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGC GGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCAGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAG CAACGAGATGGCCAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGC TTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACA TCGTGAGCAGGTTGGCCTACACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCG GAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTG GCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACAGCGAGCTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGAC CTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCTGGACGCC AAGGCCATCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGCGGCTGGAGAACCCTGA TCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGC CCTGAGCCTGGGCTGACCCCACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACTACGACGACGACCTGGACAACC TGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCAAGAA CCTGAGCGACGCCATCTCTGCTGAGCGACATCTGCGGGTGAACACCGAGATC ACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACC AGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTA CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGAC GGCGGCCCGCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCTGGAGA AGATGACGCGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT GGCGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTG GGCGAGCTGCACGCCATCTGCGCGCGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGA AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCTGACCTTCCGGATCCCTACTA CCTTGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACAGCCGTTTCGCTGGATGACCCGGAAG AGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG CCAGCGCCCGAGGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCC CAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCG CCTTCTGAGCGCGCAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGAC CAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCA GCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAGGAGAACGAGGACATCTGAGGAGATCGTGTGACCCGTGACC CTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACC TGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGCGGTACACCGGCTG GGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGC AAGACCATCTGGAATTCTTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC CCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGACGAGCACATCGCCAACCTGGCC GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCTGACAGACCGTGAAGGTGGTGGACG AGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGAT GGCCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAAGCCGGGAGCGG ATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGG AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACAGGAGCTGGACATCAACCGG CTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCGAGAGCTTCTGAAGGACG ACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAG CGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGG CAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCA AGGCCGAGCGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG

[0503]

서열 번호	설명	서열
		GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGAC AGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGA AGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCACTTCCGGAAGGACTTCCA GTTCTACAAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACACGCCCACGACGCCTAC CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGA GCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGC CAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAAACGGCGAGATCC GGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGA CAAGGGCCCGGACTTCGCCACCGTGGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCA TCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGA CCCCAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTG GTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGG AGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT CGACTTCTCGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGC TGGCCAGCGCCCGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAA GTACGTGAATTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGC CCCGAGGACAACGAGCAGAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGACAAAGCACTACC TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTGAGCAAGCGGTGATCCTGGC CGAGCCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTTACAACAAGCACCGGGACAAG CCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACC TGGGGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG GTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGAGCATC ACCGGCTGTACGAGACCCGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCG GCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
6	Sp. Cas9 닉카제를 암호화하는 ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCT GGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGC GCGGTACACCGCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTC CAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCC TTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACA TCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACTGCG GAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTG GCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGCGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTATCCAGCTGGTGCAGAC CTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCC AAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCCTGA TCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGCGGCTGTTCGGCAACCTGATCGC CCTGTCCCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACTACGACGACGACCTGGACAAAC TGCTGGCCAGATCGGCGACAGTACGCGACCTGTTCTTCTGGCCGCAAGAA CCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATC ACCAAGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACC AGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTA

[0504]

서열 번호	설명	서열
		CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGGTACGCCGGCTACATCGAC GGCGGCGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGA AGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTG GGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTA CGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAG TCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG CCTCCGCCAGTCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCC CAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCG CCTTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGAC CAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCCT CCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAGGACTTCCT GGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACC CTGTFPGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGTGAAGACCTACGCCACAC TGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGCGGTACACCGGCTG GGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGC AAGACCATCCTGGACTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTCA TGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC CCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC GGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACG AGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGAT GGCCCCGGGAGAACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAAGTCCCGGGAGCGG ATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGG AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGG CTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCAAGTCTCTCTGAAGGACG ACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCAGGGGCAAGTC CGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGCGG CAGCTGTCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCA AGGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAGTGGCCAGATCCTGGAC TCCCAGGTGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGA AGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCA GTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACCGCCACGACGCCCTAC CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGT CCGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGC CAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTCTACTCC AACATCATGAAGTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCC GGAAGCGGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTGGGA CAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGGGAAGGTGCTGTCCATGCCCGAGGTG AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCA TCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGA CCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCCTGGCTACTCCGTGCTG GTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGG AGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCTCGAGAAGAAGCCCAT CGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGC TGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAA GTACGTGAAGTCTCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGGAGCAGCACAAAGCACTACC

[0505]

서열 번호	설명	서열
		TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGC CGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAGCACCAGGACAAAG CCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACC TGGGGGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCCGGAAGCG GTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGTCCATC ACCGGCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCAGCTGGGCGGCGACGGCG GCGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
7	Sp. Cas9 닉카제를 암호화하는 ORF	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCAGACAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTCAAGGTGCT GGGCAACACCGACCCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGC GGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAG CAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGC TTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACA TCGTGGACAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCAACCATCTACCACTGCG GAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTG GCCCTGGCCCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCGTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGAC CTACAACAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC AAGGCCATCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCTGGAGAACCTGA TCGCCACAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGCGGCTGTTTCGGCAACCTGATCGC CCTGAGCCTGGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC TGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAA CCTGAGCGCAGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATC ACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACC AGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTA CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAGCGGTACGCCGCTACATCGAC GGCGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCTGGAGA AGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTG GGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCGAGGAGACTTCTACCCCTTCTGA AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTA CGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACAGCCGTTTCGCTGGATGACCCGGAAG AGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG CCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCC CAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCG CCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGAC CAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC GAGTCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCA GCCTGGGCACTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCTGACC CTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACC TGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTG GGGCCGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGC AAGACCATCTGGACTTCTTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTCA TGACGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC CCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACG AGCTGGTGAAGGTGATGGCCGGCACAGCCGAGAACATCGTGATCGAGAT GGCCCGGGAGAACCAGACCCAGAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGG ATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGG

[0506]

서열 번호	설명	서열
		AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGG CTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAG CGACAACTGTCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGG CAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACTGACCA AGGCCGAGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGAC AGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGA AGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCGGGAAGGACTTCCA GTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAATACTACCAACGCCACGACGCTTAC CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGA GCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGC CAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAACTACTTCTTACAGC AACATCATGAAGTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCC GGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGA CAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGGCGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCA TCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGA CCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCTACAGCGTGTG GTGGTGGCCAAAGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGG AGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGC TGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAA GTACGTGAAGTCTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGC CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTGTTGGAGCAGCACAAGCACTACC TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTAGCAAGCGGGTGTCTGGC CGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCGGGACAAG CCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAATCATCCACCTGTTACCTGACCAACC TGGGCGCCCCCGCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG GTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC ACCGGCTGTACGAGACCCGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCG GCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA

[0507]

서열 번호	설명	서열
8	Sp. Cas9 를 암호화하는 mRNA	GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUG CAGGCCUUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGG ACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGU CCCGAGCAAGAAAGUUAAGGUCCUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCAAG AAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA CAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAU CUGCUUACCUGCAGGAAAUUCUUCAGCAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGC UUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAGAAGAACAAAGAACAGC AAAGACACCCGACUUCUGGAAACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAA GUACCCGACAAUCUACCACCUAGAGAAAGAGCUGGUCGACAGCACAGACAAG GCAGACCUGAGACUGAUCUACUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAG GACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAA GCUGUUAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACCGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAAGAA CGGACUGUUCGGAACCUGAUCGACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUC AAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACA CAUACGACGACGACCUGGACAACCUUGGCAAGAUUCGAGAGACAGUACGC AGACCUUGUCCUGGCAGCAAGAACCUAGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGAC AUCCUGAGAGUACAACAGAAAUACAAGGACCCGUGAGCGCAAGCAUGA UCAAGAGAUACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGACACUGGU CAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUUCGACACAGCAAG AACGGAUACGAGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUAGGACGGAACAGAAACUGCUGGU CAAGCUGAACAGAGAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAAACAUCGACACCGGA AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCACAUCUGAGAGAAC AGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAAACAGAGAAAGAUUGAAAGAU CCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC AGAUUCGCAUGGAGUACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACU UCGAAGAAUGUCGACAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAU GACAAACUUCGACAAGAACCUUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGGC AAUCGUCGACCUGCUGUUCAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUG AAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUCAAGUCCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCG GAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACACGACCCUGCUGAA GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAAGAAAGAAACGAGACAUCCUG GAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUCAAGGAG AAAGACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAC GGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAAACAGAAACUUAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGAC AUUCAAGGAAGACAUCACAGAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAUCAAAGAGGGAUCC UGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAA GCCGGAAAACAUCGUCUUCGAAAUGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCCGAAGAGGAUUAAGG AACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUUGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUUACUACUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUC GACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCG UCCCGCAGAGCUUCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAGGUCCUGACAAG AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCGAGCGAAGAGUCCGUC AAGAAGAUAGAAGACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAGCUGAUACACAC

[0508]

서열 번호	설명	서열
		AGAGAAAGUUCGACAACCGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACU GGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACA AAGCAGCUGCGACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGU CAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCAACACGACACGACGCAUACCGAACGACAGUCGUCGGAAACAGCACUGA UCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGU CUACGACGUCAGAAAGAUCAUCGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUAACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAA UCACACUGGCAAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGA AAGGUCCUGAGCAUGCCGAGGUCAACAUUGUCAAGAAGACAGAAUCCAGA CAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAGGACUGGGACCCGAGAGUACGGAGGAUUCGACAGC CCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAAGA GCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAG AAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAGGGGAUACAAG GAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAGUACAGCCUGUUCGAAC UGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGG AAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUGUACCCUGGCAAGC CACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGACAGAAAGCAGCUGU UCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGA AUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACUGGACAAAGGUCCUGAGC GCAUACAACAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCA UCCACCUGUUCACACUGACAAACCCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUACUU CGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACC UGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAGCCCGAAGAAAGAGAGAAAGGU CUAGCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGA AAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUCUUUUUCGUGGUGU AAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUCUCUGUGCUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCCGAGAAAAA AA AA

[0509]

서열 번호	설명	서열
9	Sp. Cas9를 암호화하는 mRNA	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACAA GAAGUACUCCAUCCGGCCUGGACAUCCGGCACCACUCCGUGGGCUGGGCCGUG AUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAAGAAGUACAAGGUGCUGGGCAACA CCGACCCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCUGCUGUUCGACUC CGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGCGCGCGGUAC ACCCGGCGGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUUGCAGGAGAUUUUCCAAACGAGA UGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGCUUGGAGGAGUCCUUCUGGU GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCAUUUCGGCAACAUCGUGGAC GAGGUGGCCUACACGAGAAGUACCCACCAUCUACCAUCCUGCGGAAGAAGC UGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUUGCGGCUGAUCUACCUUGGCCUUGGC CCACAUGAUCAAGUUCGGGGCCACUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCC GACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACC AGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU CCUGUCCGCCCGGCGUGUCCAAGUCCGGCGGCGUGGAGAACCUGAUCGCCCG CUGCCCGCGGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCGUGUCC UGGGCCUGACCCCAACUUCAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAA GCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAACUUGCUGGCC CAGAUCCGGGACCCAGUACGCCGACCUUGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCG ACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCUUGCGGGUGAACACCGAGAUCAACAGGC CCCCUGUCCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACGAGGACCUG ACCCUGCUGAAGGCCCGUGUGCGGCGAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAGGAGA UCUUCUUCGACAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGGCGC CUCCCGAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGAC GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUUGCUGCGGAAGC AGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACAGAUCCACUUGGCCGAGCU GCACGCCAUCCUGCGGCGGCGAGGAGCUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAAC CGGAGAAGAAGUAGAGAAGUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACUGGGGCC CCUUGGCCCGGGCAACUCCCGGUUGCCUGGAUACCCGGAAGUCCGAGGA GACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCC CAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGA AGGUGCUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGA GCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUG UCCGGCGAGCAGAAGAGGCCAUUGUGGACCUUGCUGUUAAGACCAACCGGA AGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGAUCCAGUGCUU CGACUCCUGGAGAUUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCUUGGGC ACCUACACGACCUUGCUGAAGAUCAUAGGACAAGGACUUCUUGGACAACG AGGAGAACGAGGACAUCUUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGA GGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCGUGAAGACCUACGCCCAACUUGUUCGAC GACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGUACACCGGCUUGGGCCGGC UGUCCCGAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAU CCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCCGCAACCGGAACUUAUGCAGCUG AUCCACGACGACUCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCAGAGAAGGCCAGGUGU CCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGGACCAUCGCCAACCUUGGCCCGGCUCCCC CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUG AAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCAGAAACUUGGUAUCGAGAUGGCCCGGG AGAACCAGACCCAGAGGGCCAGAAGAACUCCCGGAGCGGAUGAAGCG GAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCC GUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCAGA ACGGCCGGGACAUUAACGUGGACCGAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUUGCCGA CUACGACGUGGACCAUUCGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUC GACAACAAGGUGCUGACCCGUGCCGACAAGAACCAGGGCAAGUCCGACAACG UGCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUAGAACUACUGGCGGCGAGCUGCU GAACGCCAAGCUGAUCAACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUAGCCAAGGCCGAG

[0510]

서열 번호	설명	서열
		CGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGG UGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACUCCCGGAU GAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAU ACCCUGAAGUCCAAAGCUGGUGUCCGACUCCGGAAGGACUCCAGUUCUACA AGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCAACCGCCACGACGCCUACCUGAACGC CGUGGUGGGCACCGCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUC GUGUACCGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUCAUCGCCAAGUCCG AGCAGGAGAUCCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUACUCCAAACAUCAU GAACUUCUUAAGACCGAGAUCAACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGG CCCUGAUCCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCCUGGGGACAAGGGCC GGGACUUCGCCACCUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGUGAACAUCGU GAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCCAAGGAGUCCAUCUGCCC AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCCGCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGA AGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGC CAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUG GGCACUACCAUCAUGGAGCGGUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUC UGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUCAUCAAGCUGCC CAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCC GCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCUCCCAAGUACGUGA ACUUCUGUACUCCUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCUCCCGAGGA CAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAGCACUACCUAGGACGAG AUCUUCGAGCAGAUCCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGAGCGCA ACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCAGGACAAAGCCCAUCCG GGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUUUCACCCUGACCAACCUUGGGCGCC CCCGCCGCCUUAAGUACUUCGACACCAACUCCAGCCGGAAGCGGUACACCU CCACCAAGGAGGUGCUGGAGGCCACCCUGAUCCACAGUCCAUCACCGGCCU GUACGAGACCCGGAUCGACCUUCCAGCUGGGCGGCGAGCGGCGGCGGCCUCC CCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGACUAGCACCAGCCUACAAGAACAACCGGAU GGAGUUCUUAAGCUACAUAUAACCAACUACACUUAUACAAAUGUUGUCCCC CAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCUAAUAAAAAGAAAGUUCUUCACAU UCUCUCGAGAAAAA AA AA
10	Sp. Cas9를 암호화하는 mRNA	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCCGGAUUCGCCACCAUGGACAA GAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACAGCGUGGGCUGGGCCGUG AUCACCGACGAGUACAAGGUGCCAGCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGCAACA CCGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAACUUAUCGGCGCCUUGCUGUUCGACAG CGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGCGGUAC ACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUAGCAGGAGAUUCUAGCAACGAGA UGGCCAAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCGGCUGGAGGAGAGCUUCUUGGU GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGAC GAGGUGGCCUACCAAGAGAGUACCCACCAUCUACCAACCUUGCGGAAGAAGC UGGUGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCUAGCGGCGUAGUACCUUGGCCUUGG CCACAUAGUACAAGUUCGGGGGCCACUUCUAGUAGGGGCGACCUAGAACCC GACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGGAGACCUACAACC AGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUACAGCCAGCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU CCUGAGCGCCCGGUGAGCAAGAGCCGGCGGUGGAGAACCUAGUAGCCAG CUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUAGUAGCCCGGAGCC UGGGCCUGACCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUUGGCCGAGGACGCCAA GCUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGACAACCUUGCGGCC CAGAUCCGGCGACAGUACGCCGACCUUUCUUGGCCGCCAAGAACCUAGCG ACGCCAUCUGCUGAGCGACAUCUGCGGGUGAACACCGAGAUCAACCAAGGC CCCCUGAGCGCCAGCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCAACAGGACCU

[0511]

서열 번호	설명	서열
		ACCUGCUGAAGGCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCGAGAAGUACAAGGAGA UCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGC CAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCUACAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUAGGAC GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGC AGCGGACCUUCGACAACGGCAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCU GCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUCCUGAAGGACAAC CGGGAGAAGUUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACUGGGGCC CCUGGCGCGGGGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGAGCGAGGA GACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCAGCGCC CAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGA AGGUGCUGCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACCUGUACAACGA GCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUG AGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCGUGCUUACAAGACCAACCGGA AGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAGAAGAAGCAGUGCUU CGACAGCGUGGAGAUACAGCGCGUGGAGGACCGGUACAACGCCAGCCUGGGC ACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACG AGGAGAACCAGGACAUCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGA GGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCGAAGACCUACGCCACCUGUUCGAC GACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGCGCGGUAACCGCGUGGGGCGCGC UGAGCCGGAGCUGAUAACGGCAUCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAU CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUAUGCAGCUG AUCCACGACGACAGCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCAGAAAGGCCAGGUGA GCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCCUGGCCGGCAGCCC CGCCAUACAAGAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUG AAGUGAUGGGCGGCAACAGCCGAGAACAUCUGAUCGAGAUGGCCCGGG AGAACCCAGACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACGCCGGGAGCGGAUGAAGCG GAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAGCAGCCC GUGGAGAACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACUGUACUACCCUGCAGA ACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCGAGGAGCUGGACAUAACCGGCGAGCGA CUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGAGCUUCUGAAGGAGCAGCAGCAUC GACAACAAGGUGCUGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACG UGCCCGGAGGAGGUGGUGAAGAAGUAAGAAACUACUGGCGGACGUGCU GAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAG CGGGGCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAACAGCGGCAGCUGG UGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGGCCAGAUCCUGGACAGCCGGAU GAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCGGGAGGUGAAGGUGAUC ACCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACUUCGGGAAGGACUUCAGUUCUACA AGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCAACCGCCACGACGCCUACCUGAACGC CGUGGUGGGCACCGCCUGAUAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUC GUGUACGGGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUAGCCCAAGAGCG AGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCACAGCAACAUCAU GAACUUCUACAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGGAGAUCCGGAAGCGG CCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUUGUGGGACAAGGGCC GGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGAGCAUGCCCCAGGUGAACAUUGU GAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGCGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUGCCC AAGCGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGA AGUACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGC CAAGGUGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUG GGCACUACCAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACCCAUACGACUUC UGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUAAGCUGCC CAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCAGC GCCGGCAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUGCCAGCAAGUACGUGA ACUUCUGUACCCUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGA

[0512]

서열 번호	설명	서열
		CAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCUGGAGCAGCACAAAGCACUACCUGGACGAG AUCACUCGAGCAGAACGACGAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCA ACCUGGACAAGGUGUCGAGCGCCUACACAAAGCACCGGGACACGCCCAUCCG GGAGCAGGCCCGAGAAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCC CCGCCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUAACACCA GCACCAAGGAGGUGUCGAGCGCCACCUGAUCCGCACAGAGCAUACCCGGCCU GUACGAGACCCCGGAUCGACCUGAGCCAGCUGGGCGGGCGACGGCGGGCGGACG CCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUAGUAGCACCAGCCUCAAGAAACACCCGAAU GGAGUCUCUAAGCUACAUAUAACCAACUACACUUUACAAAUGUUGUCCCC CCAAAUUGAGCCAUUCGUUACUUCGUCUUAUAUAAAAGAAAGUUUUCACAU UCUCUCGAGAAAAA AA AA
11	Sp. Cas9를 암호화하는 mRNA	GGAAGCUCAGAAUAAACGCUCACAUUUGGCCGGAUCUGGCCACCAUGGACAA GAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCCGACAGAACAGCGUUGGCUGGGCUGUG AUCACGGCAGAGUACAAGGUUCCUCUAAAGAGAUUACAAGGUGUCGGGCAACA CGGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAAUCUCAUCGGUGCAGUCUGUUCGACAG CGGUGAGACGGCCGAAGCCACGGCGUGAAGCGGACGGCCCGCGCGGGUAC ACGCGCGCGGAAGAACCGGAUCUGCUAACUCGAGGAGAUUUCAGCAACGAGA UGGCCAAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCGCGUGGAGGAGACUUCUGGU GGAGGAGACAAGAGCAGCAGCGGCGCACCCCAUCUUCGGCAAGCAUCCGGAC GAAUGUCGCUACACGAGAAUACCCACCAUCUACCAACCUCGCGAAGAGAG UGGUGGACUCGACGUCAGGCGCGACCCUGCGGUGAUUACUCCUGGCACUGGC CCACAUAGUAAAGUUCGCGGGCACUUCUCAGGAGGCGGACUAGAACUUC GACAACAGCGCAGCUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACC AGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCAGCGCGUGGACCGCAAGGCCAU CUCUACGGCCCGCCUACAGCAAGGCGCGGUGGAGAAUUCUACUCCGCCAG CUUCCAGGUGAGAAGAAGAAUGGGCUGUUCGGCAAUCUCAUCGCACUCAGCC UGGGCCUGACUCCCAACUUCUAAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAA GCUGCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACUUCUGGCC CAGAUCGGCGACCAAGUACGCCGACCUUGUUCUGGCGUGCCGAAGAUUCCAGCG ACGCCAUCCUGUCUACGCGCAUCCUGCGGGUGAACACAGAGAUACAGAAAGC CCCCCUCAGCGCCAGCAUGAUAAAGCGGUACGACGAGCACCAACAGGACCUC ACGCUCUGAAGGCAUGGUGCGGCGGACGAGCAGCUUCACAGAAUACAGGAGA UCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAUGGGUACCGCCGGUACUUCGACGGUGGUGC CAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAGAUAGGAC GGCACAGAGAGGUGUCUAGAGCGGCGGAGCUGAACGUGGAGGACUUCGCGGAAGC AGCGGACGCUUCGACAAUGGGAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGUGAGCU GCACGCCAUCCUGCGGCGGCGAGGAGCAUUCUACCCUUCUGAAGGACAAAC AGGGAGAAGAUCCGAGAAGUCCUGACGUUCCGGAUCCCCUACUACGUUGGCC CCGGACCGCGCGCAACAGCGCGGUGUCCGUGGAUGACGCGCCAGCGAGGAGA GACGAUACUCCUGGAAUUCGAGGAAGUCUGGACAAGGGUGCCAGCGCC CAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGACGAACUUCGACAAGAAUUCUCCAAACGAGA AGGUGUCUCCAAGACAGCUCGCGGCGGCUAGCGAUUACCGGUGUACACAGCA GCUGACGAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGGCAUCGCGGAAGCCCGCCUUCUC AGCGUGUGAGCAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUUGUGUUCUACAGACGAACCGGA AGGUGACGGUAGAACGACGUGAAGGAGGACUUCUCAAGAAGAUAGUACAGCU CGACAGCGUGGAGAUACGCGCGUGGAGGACCGGUUACACGCCAGCGUGGGC ACCUACCAACGACCUUGCUGAAGAUCAUAAAGACAAGGACUUCUGGACAACG AGGAGAAGCAGGACAUCCUGGAGGACAUUGGUGCUGACGCGUGACGCUUUGCA GUCAGGGGAUGAUAGAGGAGCGGCGUGGAGAACUCCGCCACCUUGUCGAC GACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGCGCGCGGUACACGGGCGGGGCGCGC UCAGCCGGAAGCUGAUCUAAUGGGAUCCGAGACAAGCAGAGCGCGCAAGACAU CCUGGACAUCCUGAAGAGCGACCGGCUUCGCCAACCGGAACUUCUAGCAGCU

[0513]

서열 번호	설명	서열
		AUCCACGACGACAGCCUGACGUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUCA GCGGCCAGGGCGACAGCCUGCAGCAGCACAUCGCCAAUCUCGCCGGGAGCCC CGCCAUCAAGAAGGGGAUCCUGCAGACGGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUG AAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAUUGGCCAGGG AGAACCAGACGACUCAAAAGGGGCAGAAGAACAGCAGGGAGCGGAUGAAGCG GAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAGCAGCCCC GUGGAGAACACUCAACUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUACUGCAGA AUGGGCGAGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUCAGCGA CUACGACGUGGACCACAUCGUUCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC GACAACAAGGUGCUGACCGGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACG UUCUCCUCAGAGGAAGUCGUGAAGAAGAUAGAACAUCUGGCGGCAGCUGCU GAACGCCAAGCUGAUCACUCAACGGAAGUUCGACAAUCUACGAAGGCCGAG CGGGGUGGCCUCAGCGAGCUGGACAAGGCCGGGUUCAUCAAGCGGCAGCUGG UGGAGACGCGGGCAGAUACGAAGCAGUGGCCAGAUCCUGGACAGCCGGAU GAACACGAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCAGGGAAGUCAAGGUGAUC ACGCUGAAGAGCAGCUGGUCAGCGACUUCGGAAGGACUUCAGUUCUACA AAGUGAGGGAGAUCAACAACUACCACCGCCACGACGCGCUACCUAGAACGC UGUGUUGGCACGGCACUGAUCAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUC GUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUAGCCAGAGCG AGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACGGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAU GAACUUCUCCAAGACAGAGAUACGCGUGGCCAUGGUGAGAUCCGGAAGCGG CCCCUGAUCGAGACGAUUGGUGAGACGGGUGAGAUUCUGUGGGACAAGGGGC GAGAUUCGCCACGGUGCGGAAGGUGUCUACGCAUGCCCCAGGUGAACAUCGU GAAGAAGACAGAAGUCCAGACGGGUGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCA AAGCGGAACAGCGACAAGCUGAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCCAAGA AGUACGGUGGCUUCGACAGCCCAACCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGC CAAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUG GGCAUCCAGAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACCACAUCGACUUC UGGAAGCCAAAGGGGUACAAGGAAGUCAAGAGGACCUGAUCAUAAGCUUC AAAGUACAGCCUUCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAUGCUGGCCAGC GCCGUGAGCUGCAGAAGGGGAACGAGCUGGCACUUCUCCUAAAGUACGUGA ACUUCUUGUACCUUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGGAGCCAGAGGA CAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUAGACGAG AUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCA AUCUCGACAAAGGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCAGCAGACAGCCCAUCAG GGAGCAGGCCGAGAACAUAUCCACUGUUCACGUGACGAUUCUGGUGCC CCCGUGCCUUCAGAUUCGACACGACGAUCGACCGGAAGCGGUACACGU CGACUAAGGAAGUCCUGGACGCCACGUGAUCCACAGAGCAUACGGGCCU GUACGAGACGCGGAUCGACCUAGCCAGCUGGGUGGCGACGGUGGUGGCAGC CCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAU GGAGUCUCUAAGCUACAUAUAACCAACUACACUUAACAAAAGUUGUCCCC CAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUCUUCACAU UCUCUCGAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA AAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
12	Sp. Cas9 를 압화하는 mRNA	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACAA GAAGUACAGCAUCGGCCUCGACAUCCGACCAACAGCGUCGGCUGGGCCGUC AUCACCGACGAGUACAAGGUCCCCAGCAAGAAGUUAAGGUCCUCGGCAACA CCGACCGCCACAGCAUCAAGAAGAACCUCUACGGCGCCUCCUUCUGACAG CGGCGAGACCGCGAGGCCACCGCCUCAAGCGCACCGCCCGCGCGCUAC ACCCCGCGCAAGAACCGCAUCUGCUACCUCCAGGAGAUUCUACGCAACGAGA UGGCCAAGGUCGACGACGCUUCUCCACCGCCUCGAGGAGAGCUUCUUCGU CGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCCACCCAUUCUGGCAACAUCGUCGAC GAGGUCGCCUACCCAGAGAAGUACCCACCAUCUACCUCCGCAAGAAGC

[0514]

서열 번호	설명	서열
		UCGUCGACAGCACCACGACAAGGCCGACCUCCGCCUCAUCUACCUCGCCUCCG CCACAUCAAGUUCGCCGCCACUUCUCAUCGAGGGCGACCUCAACCCC GACAAACAGCGACGUCGACAAGCUCUUCAUCCAGCUCGUCCAGACCUACAACC AGCUCUUCGAGGAGAACCACAACGCCAGCGCGUGACGCCAAGGCCAU CCUCAGCGCCGCCUCAGCAAGAGCCGCCGCCUCGAGAACCUCUAGGCCAG CUCGCCGCCGAGAAGAAGACGCCUCUUCGGCAACCUCUAGCCCCUAGCC UCGGCCUCACCCCCAACUUCAGAGCAACUUCGACCUCGCCGAGGACGCCAA GCUCCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUCCGACAACUCCUCGCC CAGAUCCGCCGACCAAGUACGCCGACCUUCUUCGCCGCCAAGAACCUAGCG ACGCAUCCUCCUCAGCGACAUCUCCGCCGUAACACCGAGAUACCAAGGC CCCCUCAGCGCCAGCAUGAUCAAGCGCUACGACGAGCACCAACAGGACCU ACCUCCUCUAGGCCUCCGUCGCCAGCAGCUCGCCGAGAAGUACAAGGAGA UCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAGCGCUACGCCGCCUACUAGCGCGGCCG CAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCUACAAGCCAUCCUCGAGAAGAUAGGAC GGCACCGAGGAGCUCUUCGUAAGCUCACCGCGAGGACCUCCUCCGCAAGC AGCGCACCUUCGACAACGCCAGCAUCCCCACAGAUCCACCUCCGCCGAGCU CCACGCCAUCCUCCGCCGCCAGGAGGACUUCUACCCUCCUCAGGACAAC CGCGAGAAGAUCCGAGAAGAUCCUACCUCCGCCAUCCCUACUAGCGGCC CCCUCGCCGCCGCCAACAGCCGCCUUCGCCUGGAUGACCCGCAAGAGCGAGGA GACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUCGUCGACAAGGGGCCAGCGCC CAGAGCUUCUAGCGAGCGCAUGACCAACUUCGACAAGAACCUCCCAAGGAGA AGGUCCUCCCAAGCACAGCCUCCUACGAGUACUUCACCGUACAAACGA GCUCACCAAGGUCAGUACGUCACCGAGGGCAUGCGCAAGCCGCCUUCUUC AGCGCGGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGUCGACCUCUUCUACAAGCAACCGCA AGGUCACCGUCAAGCAGCUCUAGGAGGACUACUUCAGAAGAUCCGAGUCU CGACAGCGUCGAGAUACAGCGCGUCGAGGACCGCUCAACGCCAGCCUCCGC ACCUACACGACCUCCUCAAGAUCUACAAGGACAAGGACUCCUCGACAACG AGGAGAACGAGGACAUCUCCGAGGACAUCGUCCUACCCUACCCUUCUUGA GGACCGCGAGAUCAUCGAGGAGCGCCUCAAGACCUACGCCACCUCUUCGAC GACAAGGUCUAGAAGCAGCUCUAGCGCGCGCGUACACCGCGUGGGGCCGCC UCAGCGCAAGCUCUACAACGCCAUCCGCCACAAGCAGAGCGGCAAGACCAU CCUCGACUUCUACAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGCAACUUCUAGCAGCUC AUCCACGACGACAGCCUACCUUCAAGGAGGACAUCAGAAGGCCAGGUCU GCGGCCAGGGCGACAGCCUCCAGGACACAUCGCCAACCUCCGCCGCGAGCCC CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUCCAGACCGUCAAGGUCGUCGACGAGCUCGUC AAGGUCAUGGGCGCCACAAGCCCGAGAACAUCGUCAUCGAGAUUGGCCGCG AGAACCAGACACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGCAUGAAGCG CAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUCGGCAGCCAGAUCCUCAAGGAGCACCC GUCGAGAACACCCAGCUCAGAACGAGAAGCUCUACCUUACUACCUCCAGA ACGGCCGCGCAUGUACGUCGACCGAGGAGCUCGACAUAACCGCCUAGCGCA CUACGACGUCGACACAUUCGUCCCCAGAGCUCUUCUAGGACGACAGCAUC GACAACAAGGUCCUACCCGCGAGCGACAAGAACCAGCGGCAAGAGCGACAACG UCCCCAGCGAGGAGGUCGUCAAGAAGAUAGAACAUCUUGCGCGCAGCUCU CAACGCCAAGCUCUACCCAGCGCAAGUUCGACAACCUACCAAGGCCGAG CGCGCGGCCUCAGCGAGCUCGACAAGGCCGGCUUCAUAAGCGCCAGCUCG UCGAGACCCGCCAGAUACCAAGCACGUCGCCAGAUCCUCGACAGCCGCAU GAACACCAAGUACGACGAGAAGCAGCUCUACCGCGAGGUAAGGUAUCU ACCUCAAGAGCAAGCUCGUCAGCGACUUCGCCAAGGACUCCAGUUCUACA AGGUCCGCGAGAUCAACAACUACCAACCGCCAGCGCCUACCUCAACGC CGUCGUCGCGACCGCCUCAUCAAGAAGUACCCCAAGCUCGAGAGCGAGUUC GUCUACGGCGACUACAAGGUCUACGACGUCGCCAAGAUAGUAGCCAAAGAGCG AGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCU GAACUUCUACAAGACCGAGAUACCCUCCGCAACGGCGAGAUCCGCAAGCGC

[0515]

[illegible]

[0516]

서열 번호	설명	서열
13	Sp. Cas9 에 대한 아미노산 서열	MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKNNLIGALL FD8GETAEATRLKRTARRRYTRKKNRICYLQEIIFSNEMAKVDDSFHRLSEES FLVEEDRKHERHPIEGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVSDTKDADRLIYIL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKFLIQLVQTYNQLFEEFNIPASGVDA KAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLLAANKNSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHL GELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAMWTRK SEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLNEKVLPHKSHLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSAGEQKKAIVDLLFFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNABSLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT LFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQKSG KTIILDFLKSDFGAFNRNFMQLIHDDSLTFKEDIQAAQVSGQGDLSHEHIANLA GSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSGILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINR LSDYDVHIVPQSFLLKDDSIDNKLVRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMNYWR QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVYVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNHYHAHADY LNADVGTALIKKYPKLESEFVVGDKYVDYVRKMIKASEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPMPQV NIVYKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFGFDSPTVAYSVL VVAKEVGKSKKLLSVKELLGITIMERSSEFKNPIDEFLAARGYKEVKKDLII KLPKYSIFELENGRRKMLASAGELQKGNELAPSKYVNFPLYLASHYKELKGS PEDNEQKQLFVEQHRHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHHRDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTTIDRKRYTSTKEVLDTATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGEGDGGSPKGGKKRV

[0517]

서열 번호	설명	서열
14	아미노산 서열 Sp. Cas9 넥카제	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSSTKADLRLLIYL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFILQVQTYNQLFEEPNINASGVDA KAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL GELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPARGNSRFAMWTRK SEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPRHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTILT LFEDREMIEERLKTAYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLA GSPAIFKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRER MRRIEKGILGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINR LSDYDVDFIVPQSFLKDDSIDNKVLTSDKNRSGSDNVPSEEVVKRMKNYWR QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKROLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAY LNAVVGTAIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIASEQIEGKATAKYFFYS NIMNFPKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQV NIVKKEVQGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKEVKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKDLII KLPHYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYKELKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAVNKHDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGSPKKKKRV
15	TTR 가이드 서열	AAAGCGUCGUGAUGACACCU
16	TTR sgRNA	AAAGCGUCGUGAUGACACCGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
17	사용하지 않음	사용하지 않음
18	일반 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
19	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAA mAmGmCAAGUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
20	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
21	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
22	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAAGAAAGGCACCGAGUCGGUGC

[0518]

서열 번호	설명	서열
23	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGAAAGGCACCGAGUCG G*mU*mG*mC
24	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
25	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
26	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
27	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG* mU*mG*mC
28	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
29	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG* mU*mG*mC
30	일반적인 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAAUAG GCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
31	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
32	sgRNA 보존 영역	UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUCUUUU
33	crRNA 보존 영역	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
34	TTR 표적화 가이드	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
35	TTR 표적화 가이드	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

[0519]

서열 번호	설명	서열
36	Sp. Cas9 를 암호화하는 ORF	AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCGUGGAUAUCGGAACUAAUCCGUGGGUU GGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAGGUCCU GGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUUCUACUGGAGCCCGUCUG UUUGACUCCGGGAAACCGCAGAGCGACCCGGCUCAAACGUAACCGCGAGGC GACGCUACACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUUUUUC GAACGAAUUGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCU UCCUGUGGAGGAGGACAGAAGCAUGAACGGCAUCCUACUUUGGAAACA UCGUCGACGAAGUGGCGUACCAAGAAAGUACCCGACCAUUAACCAUCUGCG GAAGAAGUUGGUGACUCAACUGACAAGGCCGACCUAGAUUGAUUACUUG GCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUCCGCGGACACUCCUGAUCGAAGGCAGUC UGAACCUCGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGAC CUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUGCUAGCGGCGUCGAUGCC AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCGUGUCGAGUAGCGCGCCUCGAAAACCGUA UCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUCUCCGCAACUGAUCGC UCUCUACUGGGACUCACUCCAAUUAAGUCCAAUUAUUGACCGGCGAG GACGCGAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAU UGUGGCGACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAA CCUUUCGAGCAAAUUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGGAAUA ACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUGGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCC AGGAUCUCACGCGUCUCAAAGCGCUCGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUA CAAGGAGAUUUUCGACCAUCCAAGAAUGGGUACGCGAGGGUACAUCCGAU GGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUAUCAAGCCAAUCCUGGAAA AGUUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCU CCGGAACAGAGAACCUUUGACAAACGGAUCCAUUCCCCACAGAUCCAUUCG GGUGAGCUGCAGCGCAUCUUGCGCGCCAGGAGGACUUAUCCCAUUCUCA AGGACAACCGGGAAGAAUUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUA CGUGGGCCACUGGCGCGCGGCAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAA UCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUCGAGGAAGUUGGGAUAAGGGAG CUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAUAGCAACUUCGACAAGAAUUCUCC AAACGAGAAGGUGCUUCUUAAGCACAGCCUUCUUAAGAAUACUUCACUGUC UACAACGAACUGACUAAAGUGAAUACGUUACUGAAGGAUUGAGGAAGCCGG CCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUAAGAC CAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAGGAAGAU GAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUACAGCGGGUGGAGGACAGAUUACAGCUU CGCUGGGAACCUAUCAGAUUCCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAGGACUUCU UGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAUUCCGUCCUGACCUUGACC CUUUUCGAGGAUCGCGAGAUUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUC UCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAAGCGCCGCGGUACACUGGUUG GGGCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGU AAAACUAUCUGGAUUUCCUCAAUUCGGAUGGCUUCGCUAAUUCGUAACUUA UGCAAUUGAUCCACGACGACGCGUACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGC ACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUUCUGGCC GGUUCGCGCGGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUAAGGUGGUCGACG AGCUGGUGAAGGUCUUGGACCGGCACAAACCGGAGAAUUAUCGUAUUGAAAU GGCCCGAGAAAAACGACUACCCAGAGGGCCAGAAAAUCCCGCGAAAGG AUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAUUAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAG AGCACCCGGUGGAAAAACGCGAGCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUUGUACUA UUUGCAAAUUGGACGGGACUUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCGG UUGUCUGAUUAACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCGAAGGAUG ACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCGAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUC AGAUAUUGUGCCAUUCGAGGAGGUCUGAAGAAGAUAGAAGAAUUAUCUGCGG CAGCUCUGAAUUCGAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUUCACUA AAGCCGAGCGCGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUUGAUUCAAAACG

[0520]

서열 번호	설명	서열
		GCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGGAC UCCCCGAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCUACCGGGAGGUGA AGGUGAUUACCCUGAAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCA GUUUUAACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUAC CUCAACGUCUGUGGUCGGUACCGCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAAACUUGAAU CGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUAGC CAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUAUCUUUUUACUCA AACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUAACGUCUGGCCAAUGGAGAAAUCA GGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGA CAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAGUGUCUCUAUGCCGCAAGUC AAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAUUGCA UCCUCCCCAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUC GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAAG AGCUGUCUGGGGAUUAACCAUCAUGGAACGAUCCUGUUCGAGAAGAACCAGAU UGAUUUUUCUGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUC AAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAUGGUCGGAAGCGCAUUGC UGGCUUUCGGCGGAGAACUCCAAAAGGAAUAGAGCUGGCCUUGCCUAGCAA GUACGUCAAAUUCCUUAUCUUGCUUCGACUACGAAAAACUCAAAGGGUCA CCGGAAGAUAAACGAACAGAAAGCAGCUUUUCUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUC UGGAUGAAAUCUACGAACAAAUUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUUCGC CGACGCCAACCCUGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAG CCGAUCAGAAACAGGCCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACC UGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAGUACUUCGAUACUACUACUACGCAUCCGCAAAAG AUACACGUCACCAAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAGCAUC ACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGACGUGGGUGGCGAUGGCG GUGGAUCUCCGAAAAAGAGAGAAAGGUGUAAUGA
37	예시적인 코작서열	gccgccRccAUGG
38	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU* mU*mU*mU
39	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmCmUm*mU*mU*mU
40	TTR sgRNA	mA*mA*mA*mGGC*U*fG*fC*fU*fGAfUfGAC*fAfCCUmGUUUFUAGmAm mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmCm UmAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
41	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGC*U*fG*fC*fU*fGAfUfGAC*fAfCCUmGUUUFUAGmAm mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmCmU mAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
42	TTR sgRNA	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGAAAGGGCACCGAGUCG GmU*mG*mC*mU
43	TTR sgRNA	AAAGGCGUCUGAUGACACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC

[0521]

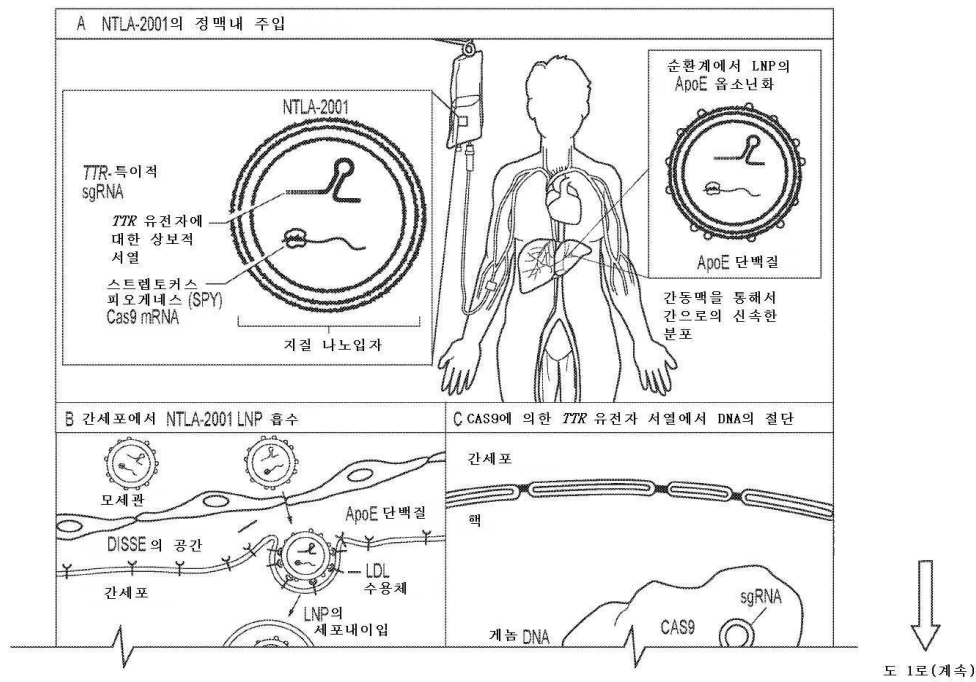
서열 번호	설명	서열
44	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
45	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
46	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCG G*mU*mG*mC
47	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGGUGC
48	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
49	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGGUGC
50	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
51	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGGUGC
52	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
53	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAUUUUAA GCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGGUGC
54	변형된 TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
55	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAUUUUUAGGCACCGAGUCG GmU*mG*mC*mU
56	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNmGUUUfUAGmAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmGmCmU mAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
57	변형된 일반적인 sgRNA	mN*mN*mN*NNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNmGUUUfUAGmAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmGmCmU mAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

* = PS 연결; 'm' = 2'-O-Me 뉴클레오타이드, 'f' = 2'-F 뉴클레오타이드

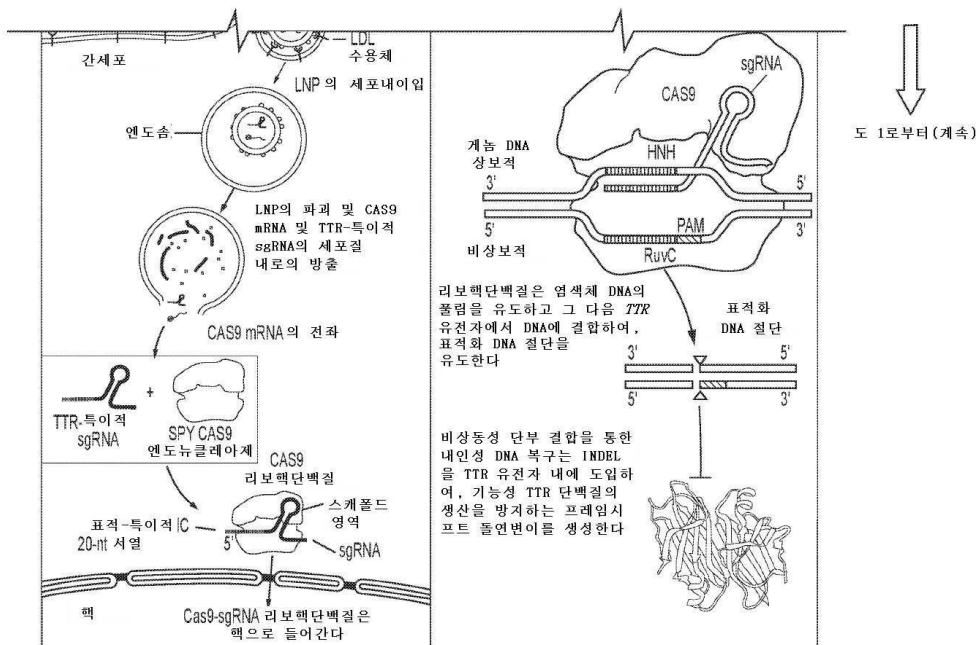
[0522]

도면

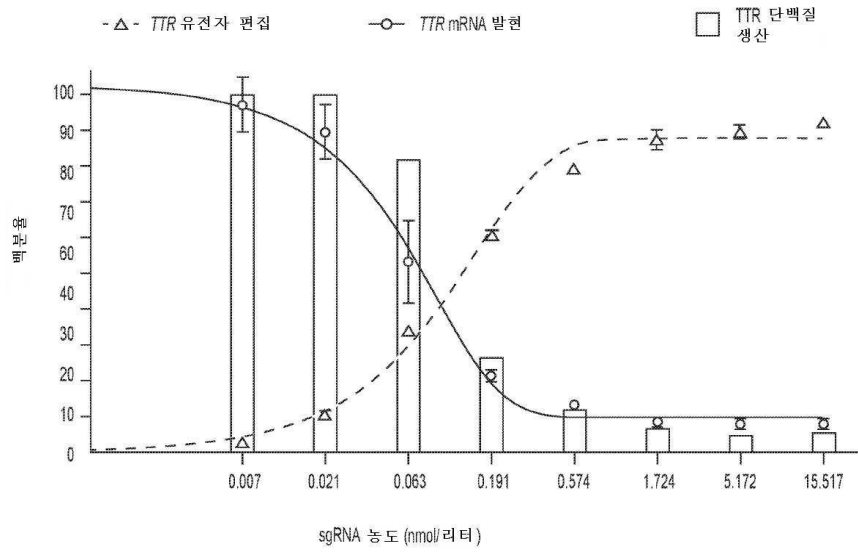
도면1a



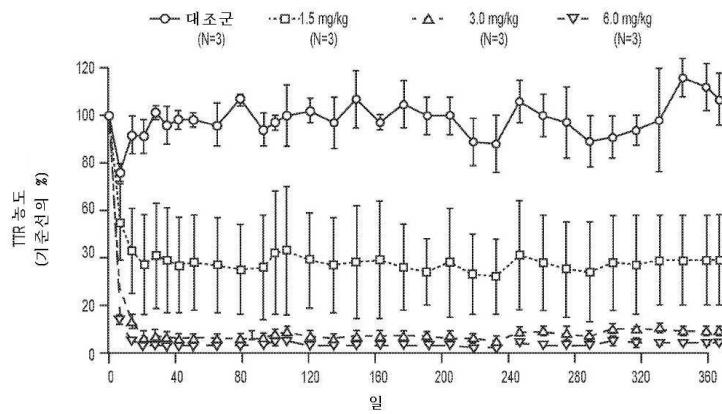
도면1b



도면2



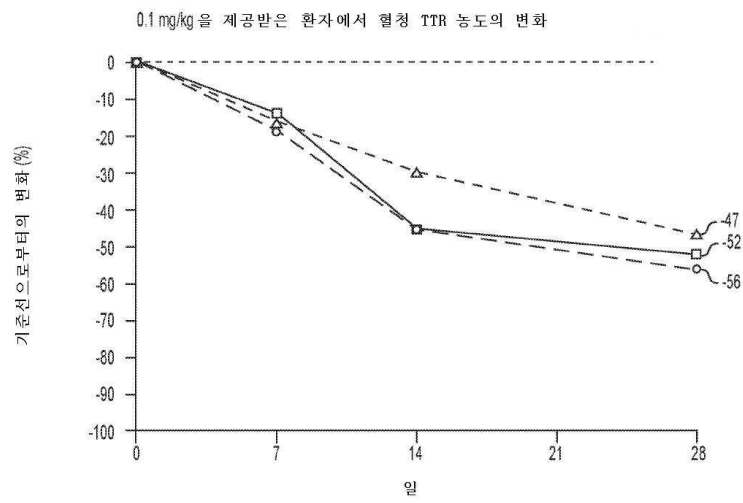
도면3a



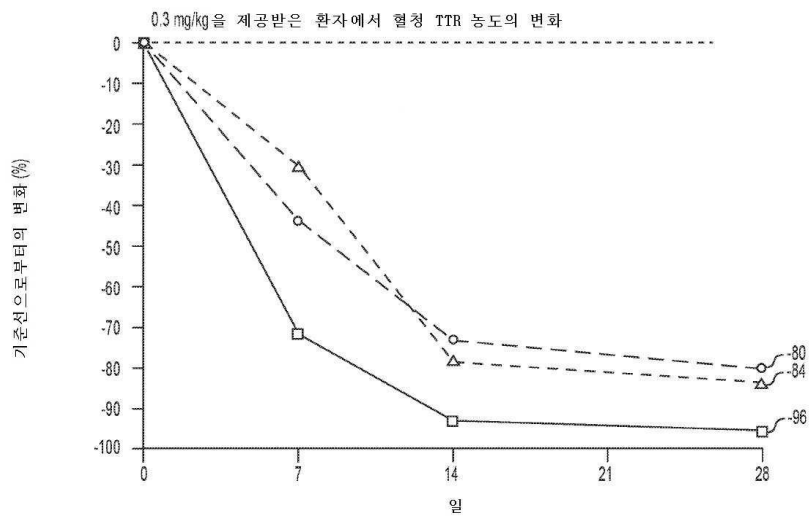
도면3b

indel 크기	서열	indel 빈도 %
아생형	AGACACAAATACCAGTCCAGCGAGGCAGAG [G/A] AGGAGCAG	—
+1	AGACACAAATACCAGTCCAAGCGAGGCAGAG [G/A] AGGAGCAG	98.9
>+1	AGACACAAATACCAGTCCANCGAGGCAGAG [G/A] AGGAGCAG	1.03

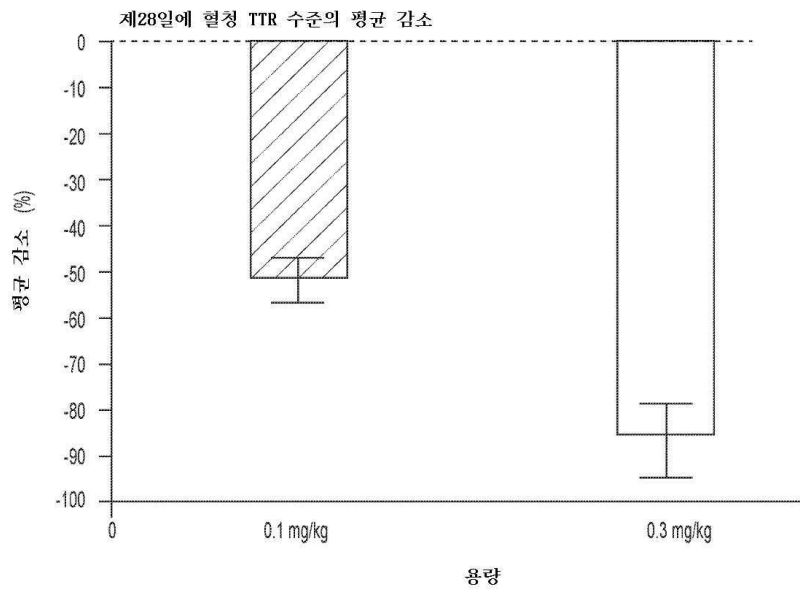
도면4a



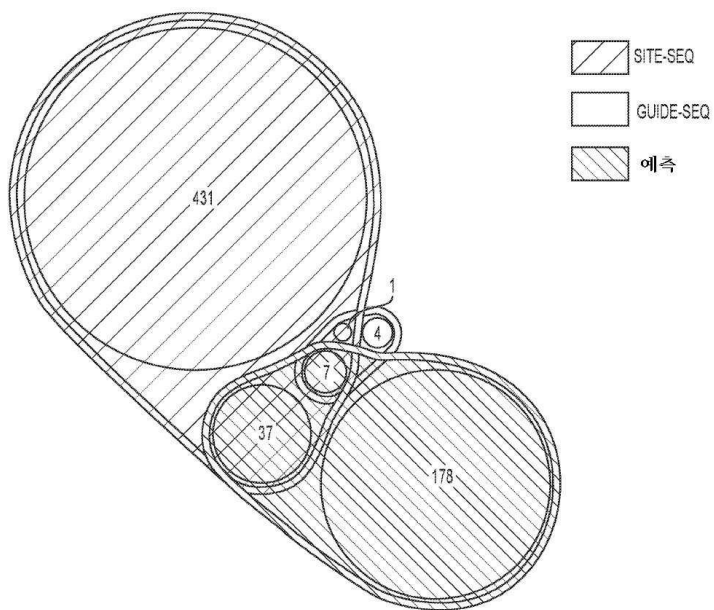
도면4b



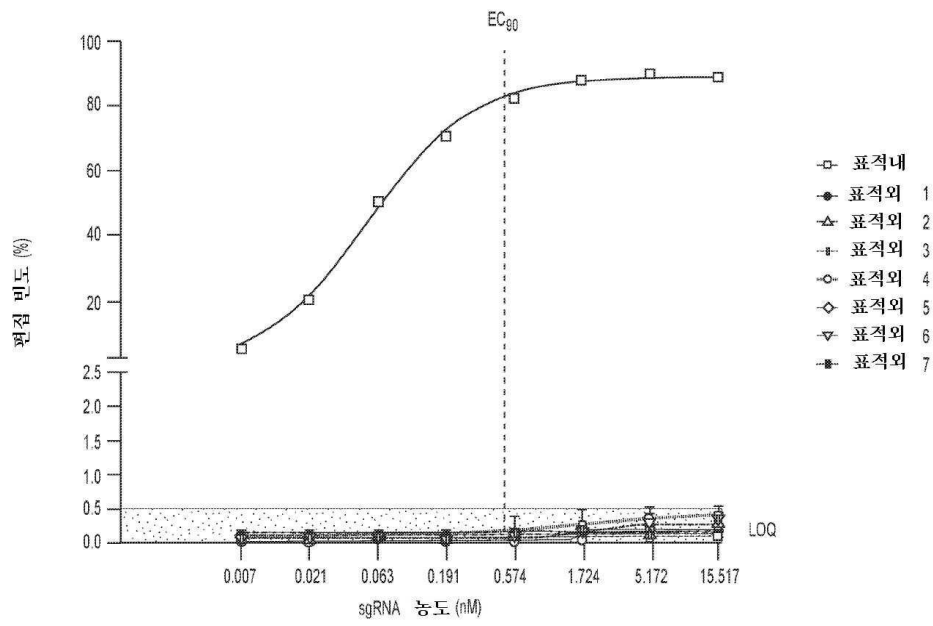
도면4c



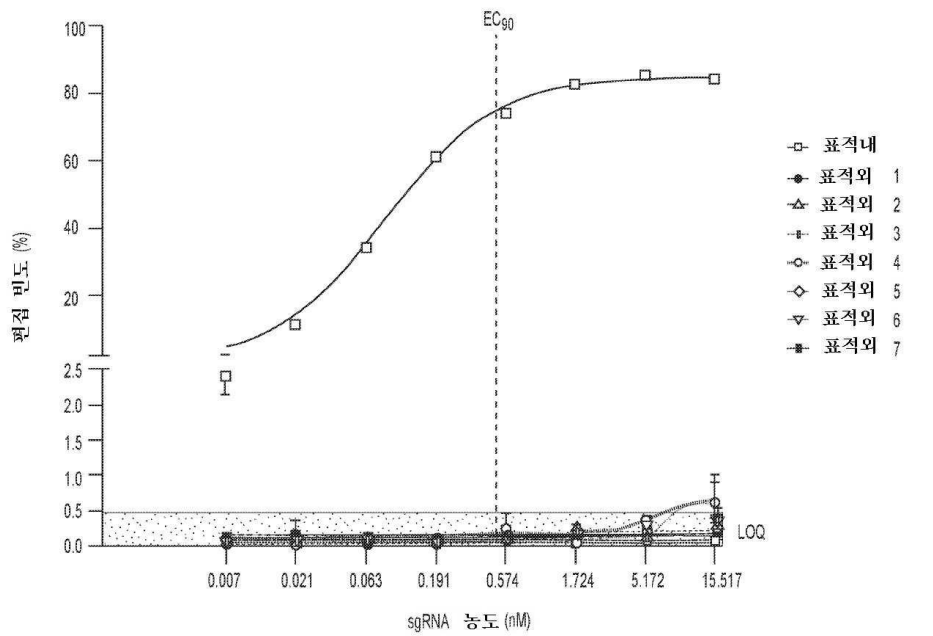
도면5



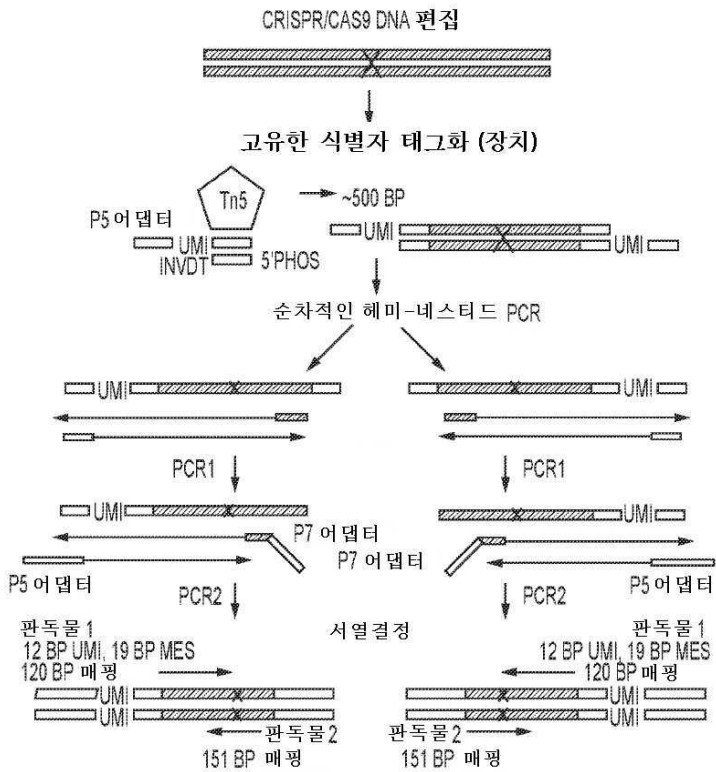
도면6a



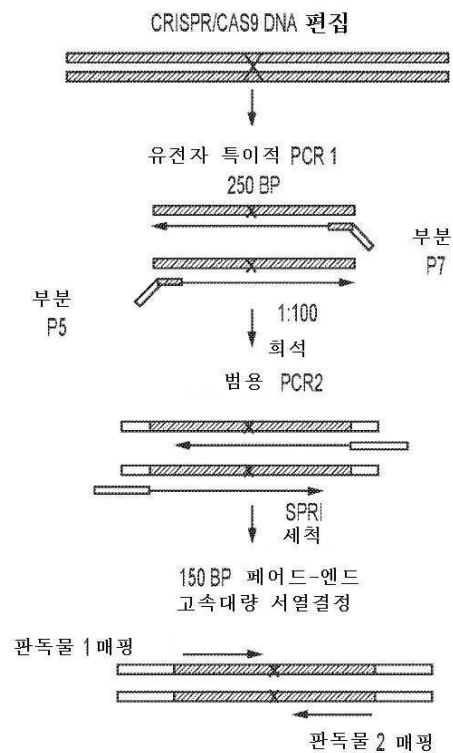
도면6b



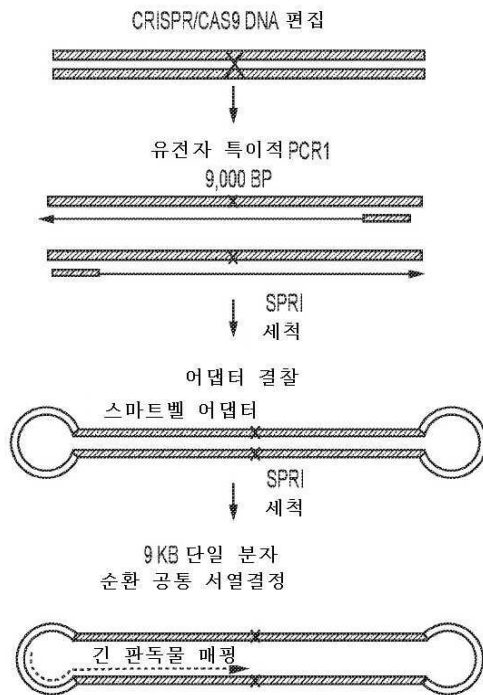
도면7



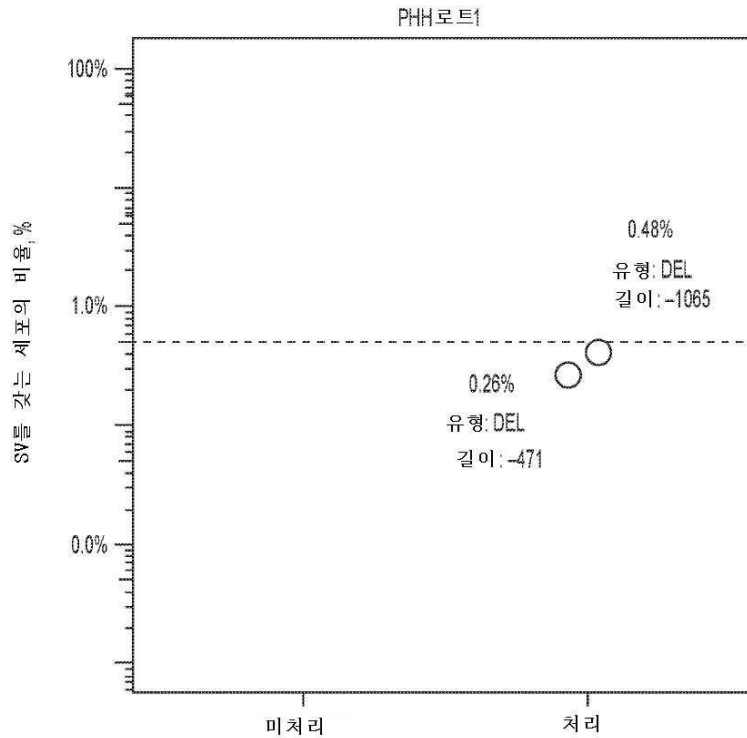
도면8a



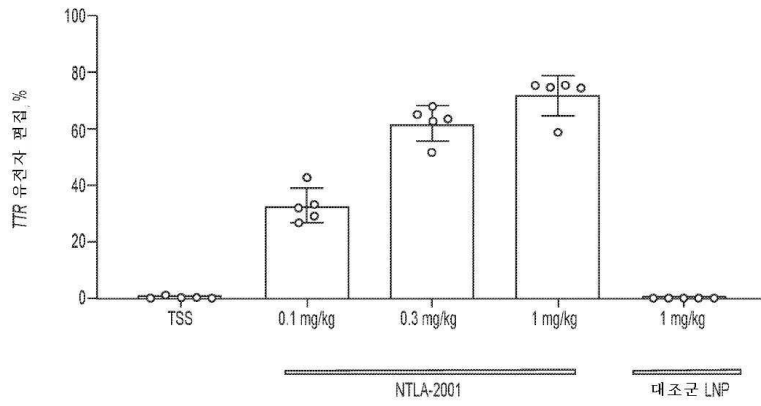
도면8b



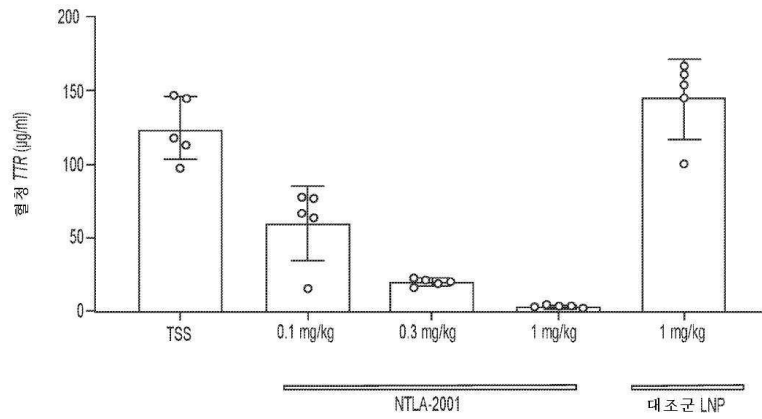
도면9



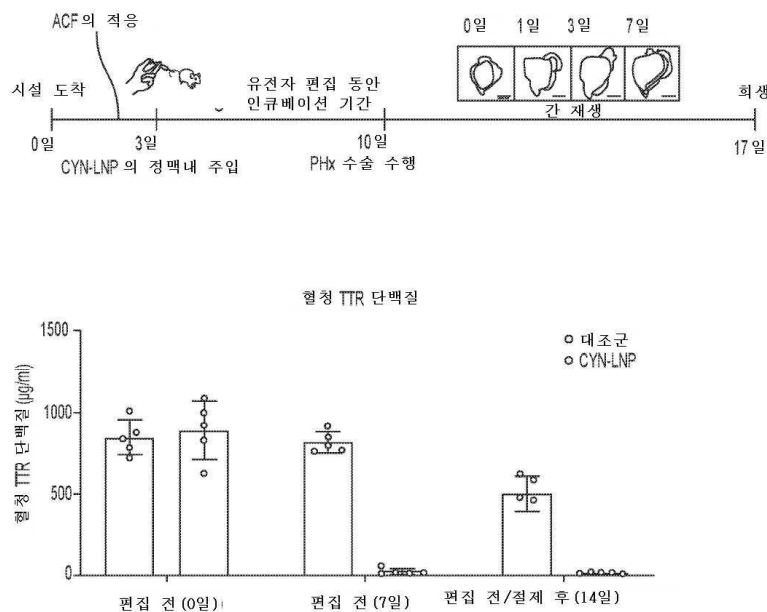
도면10a



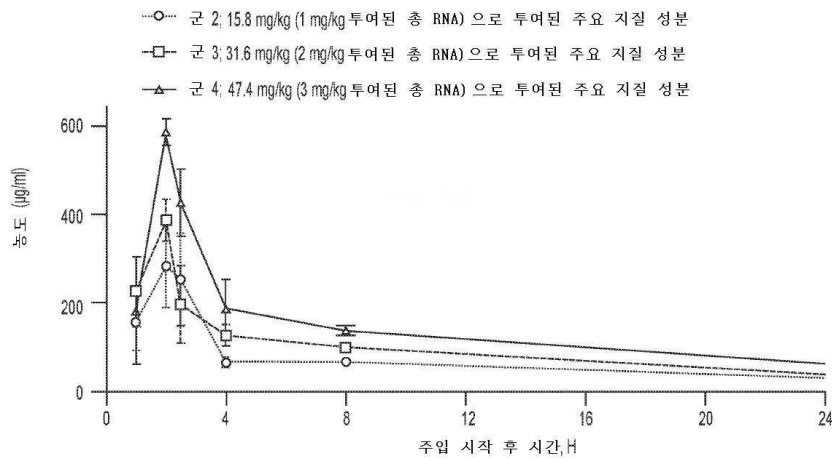
도면10b



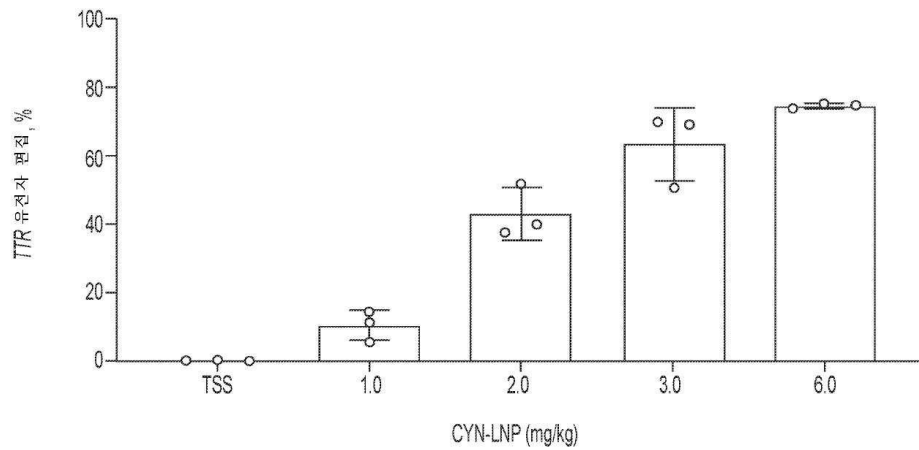
도면11



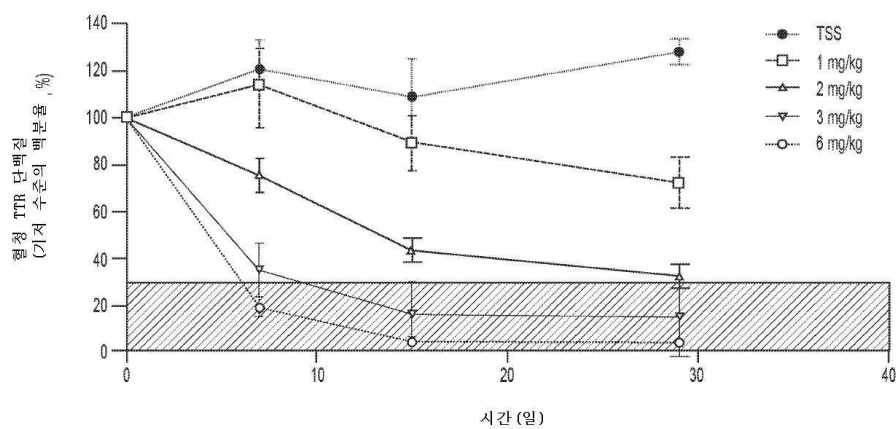
도면12



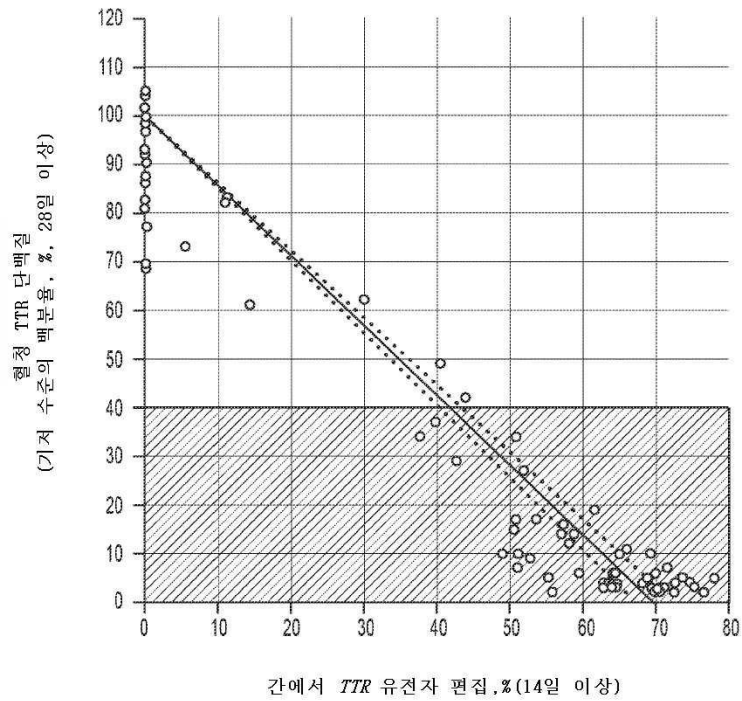
도면13a



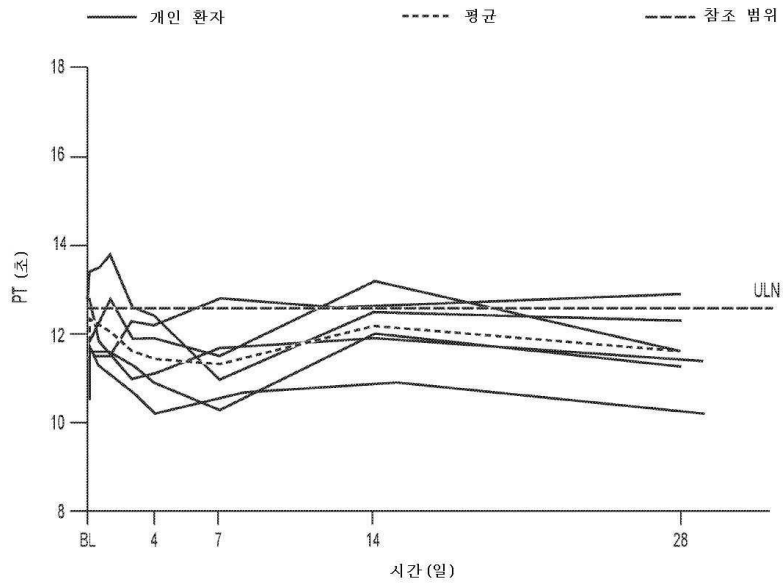
도면13b



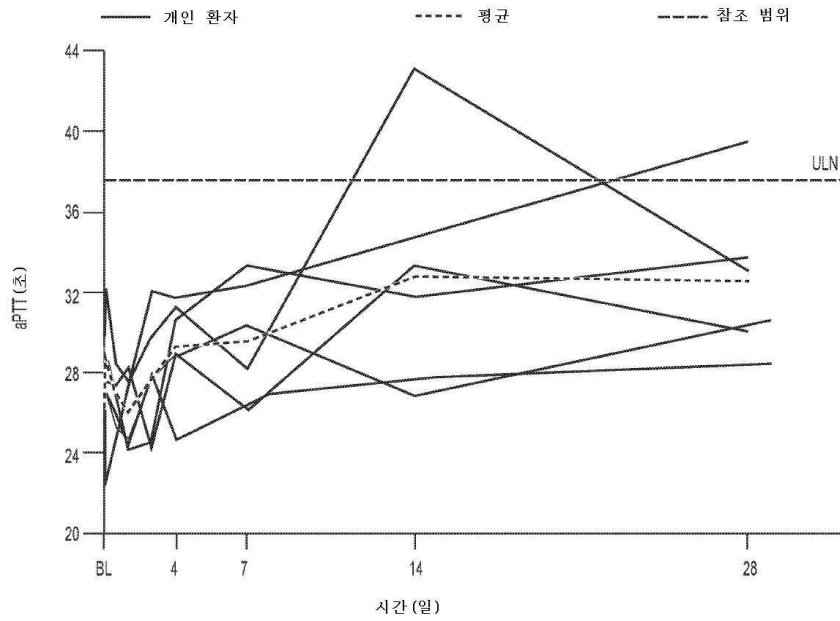
도면14



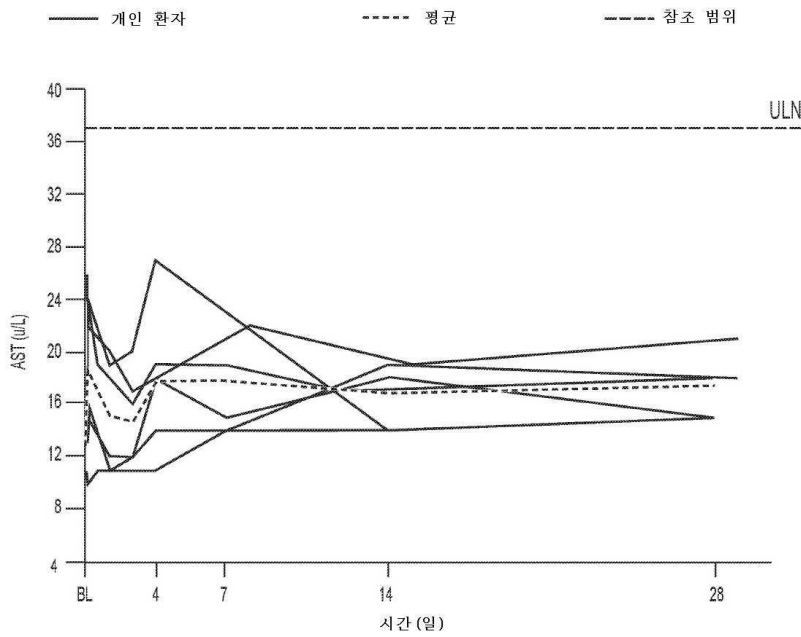
도면15a



도면15d



도면15e



도면16

군	총 RNA 용량 (MG/KG)	분석물	분석물 용량 (MG/KG)	C _{MAX} (NG/ML)	T _{MAX} (HR)	AUC _{LAST} (HR*NG/ML)	AUC _{INF} (HR*NG/ML)	CI (ML/MIN/KG)	T _{1/2} (HR)	VZ (L/KG)
2	1	주요 지질	15.8	346,000 (7.26)	2 (2.00-2.50)	2,100,000 (11.1)	2,100,000 (11.1)	0.127 (11.5)	13.6 (7.79)	0.15 (15.5)
		PEG2000	2.70	50,500 (16.9)	2 (2.00-2.50)	136,000 (15.7)	136,000 (15.7)	0.335 (15.6)	2.82 (22)	0.0811 (22.5)
		CYN-sgRNA	0.333	2,730 (38.7)	2.25 (2.00-2.50)	26,000 (13.5)	23,600 NC	0.235 NC	19.1 NC	0.388 NC
		CAS9 mRNA	0.667	4,400 (25.6)	2 (2.00-2.50)	32,300 (62.1)	32,300 (62.1)	0.535 (88.5)	13.9 (29.1)	0.592 (77.8)
3	2	주요 지질	31.6	388,000 (12.1)	2 (2.00-2.00)	2,790,000 (13.4)	2,790,000 (13.4)	0.191 (13.2)	13.5 (6.43)	0.224 (19)
		PEG2000	5.40	71,900 (3.23)	2 (2.00-2.00)	216,000 (6.36)	216,000 (6.33)	0.418 (6.46)	3.26 (57.7)	0.121 (64.3)
		CYN-sgRNA	0.667	4,470 (16)	2 (2.00-2.00)	30,600 (7.08)	30,800 (7.24)	0.362 (7.44)	16.8 (7.2)	0.527 (8)
		CAS9 mRNA	1.33	6,670 (37.5)	2 (1.00-2.00)	47,700 (9.65)	47,700 (9.64)	0.468 (9.79)	15.1 (4.91)	0.614 (13.7)
4	3	주요 지질	47.4	586,000 (5.26)	2 (2.00-2.00)	4,450,000 (7.79)	4,450,000 (7.79)	0.178 (8.03)	14.9 (5.45)	0.23 (10)
		PEG2000	8.10	94,600 (11.4)	2 (2.00-2.00)	312,000 (20)	313,000 (20.1)	0.444 (22.3)	5.17 (42.5)	0.187 (25.6)
		CYN-sgRNA	1.00	7,170 (3.61)	2 (2.00-2.00)	52,100 (53.9)	52,400 (53)	0.403 (62.1)	20.7 (25.9)	0.726 (71.6)
		CAS9 mRNA	2.00	14,400 (23.1)	2 (2.00-2.00)	130,000 (53)	130,000 (53)	0.305 (46.1)	14.9 (31)	0.367 (36.4)

NTLA-2001의 인간-특이적 약리학적 활성을 고려할 때, sgRNA 내의 표적 영역의 뉴클레오타이드 서열만 차이가 있는 대응 제품인 CYN-LNP를 시노글러스 연구를 위해서 사용하였다.
중간값(MIN-MAX)로서 제시된 T_{MAX}를 제외하고 데이터는 평균(CV%)로서 나타내었다. 모든 주입은 2시간 동안 수행하였다.
비구획적 분석에서 분석물 용량을 사용하였다.

도면17

선호 용어	0.1 MG/KG 용량을 제공받은 모든 환자 (N=3)		0.3 MG/KG 용량을 제공받은 모든 환자 (N=3)		모든 환자	
	관련 있음	관련 없음	관련 있음	관련 없음	관련 있음	관련 없음
설사	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
구역	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)	0
주입-관련 반응	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)	0
피부 마모	0	0	0	1(33.3%)	0	1(16.7%)
두통	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0	0	1(16.7%)	1(16.7%)
체위 현기증	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
눈의 이물감	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
카테터 부위 부종	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
급성 부비동염	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
티록신 감소	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)	0
콧물	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)	0
가려움증	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)
발진	0	1 (33.3%)	0	0	0	1(16.7%)

각각의 선호 용어의 경우 하나를 초과하는 이상 반응을 보고한 대상체는 연구 약물에 가장 가까운 상관관계를 사용하여 1회만 계수하였다. 이상 반응은 조절 활동에 대한 의학 사건을 사용하여 시스템 장기 분류 및 선호 용어에 대해서 암호화되고, 관련된 버전 23.0은 조사자 평가 후 연구 약물에 관련된 가능성 또는 계연성으로서 보고된 모든 사건을 포함한다.

도면18

매개 변수	0.1 MG/KG 용량을 제공 받은 모든 환자 (N=3)	0.3MG/KG 용량을 제공 받은 모든 환자 (N=3)	모든 환자 (N=6)
연령, 세 중간값 (MIN, MAX)	54 (50, 63)	53 (46, 64)	53.5 (46, 64)
성별, N (%)			
남성	1 (33.3%)	3 (100%)	4 (66.7%)
여성	2 (66.7%)	0	2 (33.3%)
체중, KG 중간값 (MIN, MAX)	82 (70, 89)	84 (83, 90)	84 (70, 90)
돌연변이 상태, N (%)			
P.H110D	0	1 (33%)	1 (17%)
P.S97Y	1 (33%)	1 (33%)	2 (33%)
P.T80A	2 (67%)	1 (33%)	3 (50%)
선행 요법, N (%)			
없음	1 (33%)	2 (67%)	3 (50%)
다이플루니살	2 (67%)	1 (33%)	3 (50%)
임상 점수, N (%)			
다발성 신경병증 장애	3 (100%)		
점수 1		3 (100%)	6 (100%)
NYHA 기능 분류 I	3 (100%)	3 (100%)	6 (100%)
NT-PROBNP (NG/L), 중간값 (MIN MAX)	127 (89, 596)	119 (50, 359)	123 (50, 596)
진단 후 년수 (MIN, MAX)	2 (2, 9)	3 (1, 11)	2.5 (1, 11)

도면19a

용량 (mg/kg)	환자	체중 (kg)	실제 용량 (mg)	TTR 유전자형	NT-PROBNP 기준선 (ng/L)	시점	TTR 감소%
0.1	코호트1 대상제1 (C1S1)	82.1	8.2	S77Y	89.0	7일	-19.00
						14일	-45.63
						28일	-56.47
						56일	-52.67
						4개월	-47.22
						6개월	-46.36
						9개월	-53.35
0.1	C1S2	70.4	7.0	T60A	596.0	7일	-16.34
						14일	-29.97
						28일	-46.75
						4개월	-18.89
						6개월	-18.15
						9개월	13.90
						12개월	-20.24
0.1	C1S3	89.1	8.9	T60A, T80A	127.0	7일	-14.12
						14일	-45.28
						28일	-52.30
						56일	-54.69
						4개월	-43.86
						6개월	-32.55
						9개월	-47.81
0.3	C2S1	83.3	25.0	S77Y	118.0	7일	-43.78
						14일	-73.40
						28일	-80.34
						56일	-75.84
						4개월	-77.84
						6개월	-80.76
						9개월	-85.69

도면19b

용량 (mg/kg)	환자	체중 (kg)	실제 용량(mg)	TTR 유전자형	NT-PROBNPX 기준선 (ng/L)	시점	TTR 감소%
0.3	C2S2	84.0	25.2	T60A	359.0	7일	-30.43
						14일	-78.74
						28일	-83.79
						56일	-76.72
						4개월	-75.48
						6개월	-77.83
0.3	C2S3	89.9	27.0	H90D	<50.0	9개월	-80.03
						7일	-71.98
						14일	-93.34
						28일	-95.73
						56일	-90.55
						4개월	-91.47
0.7	C4S1	62.4	43.7	E42D	58.0	6개월	-94.04
						9개월	-92.68
						7일	-21.34
						14일	-61.60
0.7	C4S2	97.6	68.3	E74G	<50.0	28일	-66.19
						56일	-73.03
						7일	-63.17
						14일	-89.34
						28일	-94.45
						56일	-94.79

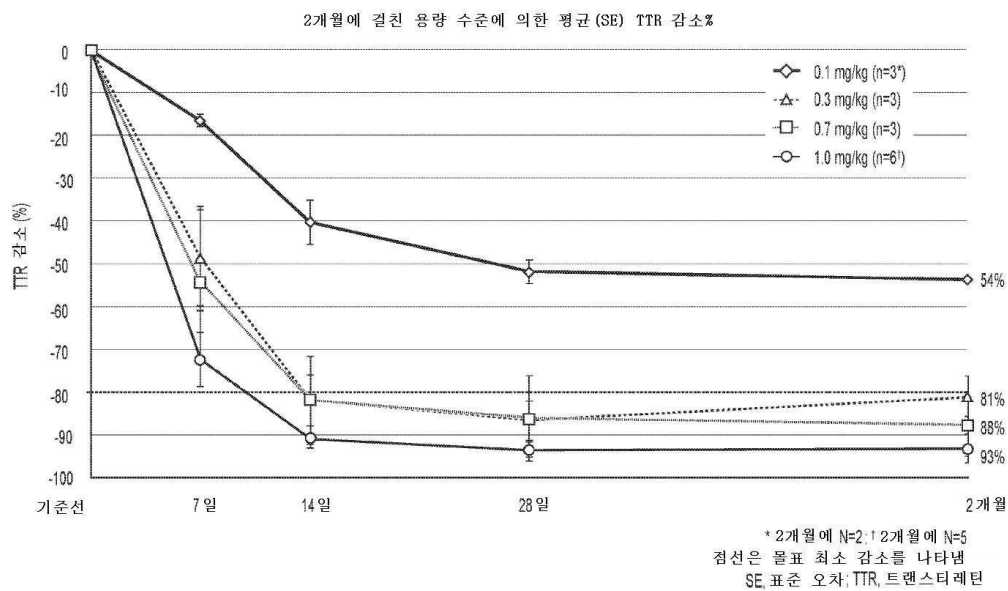
도면19c

용량 (mg/kg)	환자	체중 (kg)	실제 용량(mg)	TTR 유전자형	NT-PROBNPX 기준선 (ng/L)	시점	TTR 감소%
0.7	C4S3	86.7	60.7	T60A	195.0	7일	-78.34
						14일	-94.45
						28일	-97.37
						56일	-95.20
						4개월	-93.66
						6개월	-95.07
1.0	C3S1	75.9	75.9	E42D	58.0	7일	-42.92
						14일	-79.83
						28일	-88.25
						예정되지 않은 방문	-89.51
						4개월	-88.60
						6개월	-88.16
1.0	C3S2	69.2	69.2	S50R	544.0	7일	-79.84
						14일	-87.53
						28일	-87.47
						56일	-80.06
						4개월	-89.83
						6개월	-83.36
1.0	C3S3	88.6	88.6	T60A	84.0	7일	-87.13
						14일	-96.74
						28일	-97.64
						56일	-98.83
						4개월	-98.64

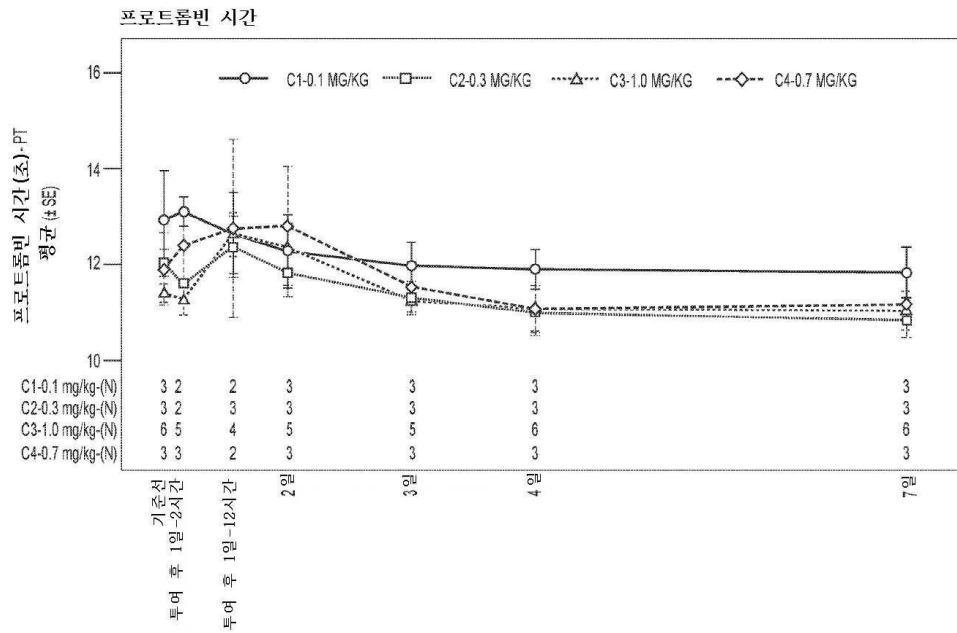
도면19d

용량 (mg/kg)	환자	체중 (kg)	실제 용량 (mg)	TTR 유전자형	NT-PROBNPX 기준선 (ng/L)	시점	TTR 감소%
1.0	C3S4	59.1	59.1	V30M	193.0	7일	-77.97
						14일	-94.48
						28일	-96.66
						56일	-96.54
1.0	C3S5	74.6	74.6	E62D	140.0	7일	-69.24
						14일	-89.47
						28일	-94.11
						56일	-94.48
1.0	C3S6	111.0	111.0	T80A	<50.0	7일	-76.51
						14일	-94.56
						28일	-95.95
						56일	-95.69

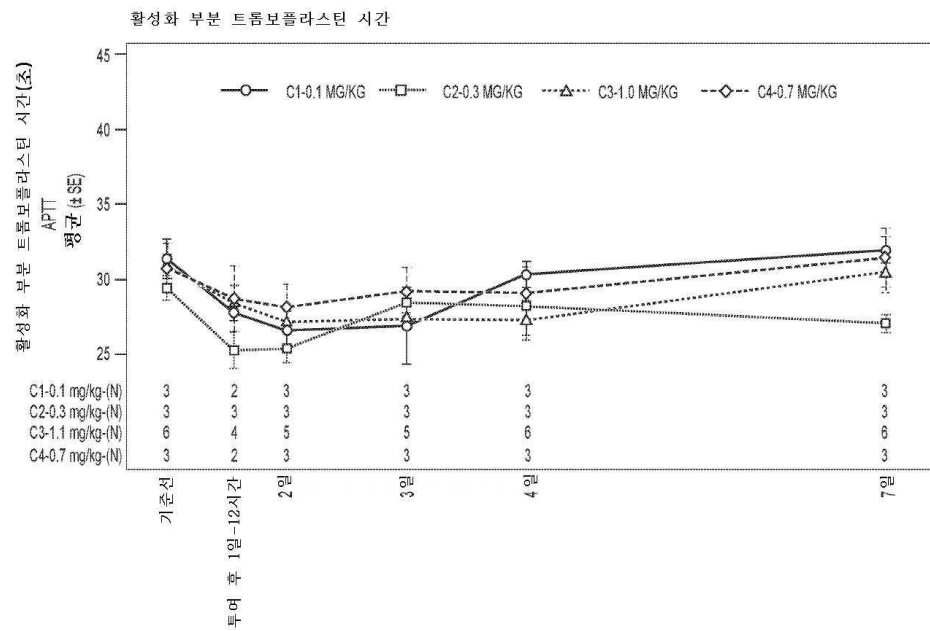
도면20



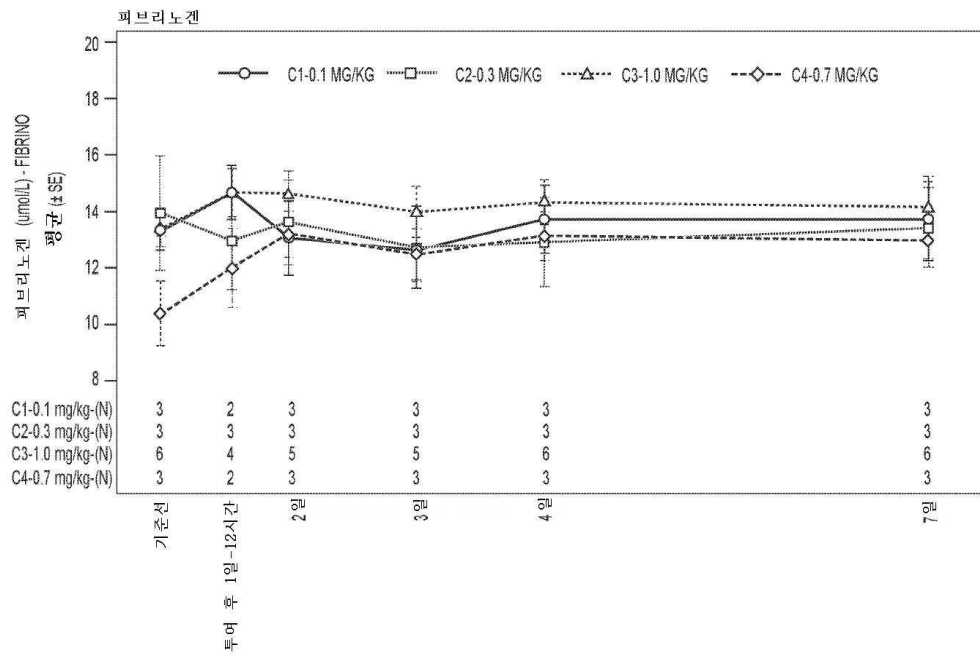
도면21a



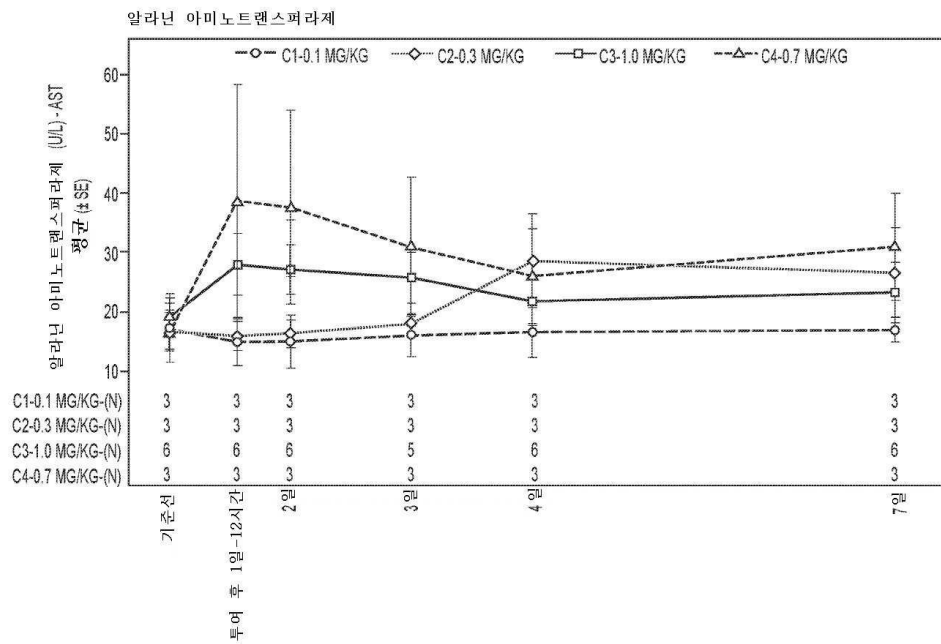
도면21b



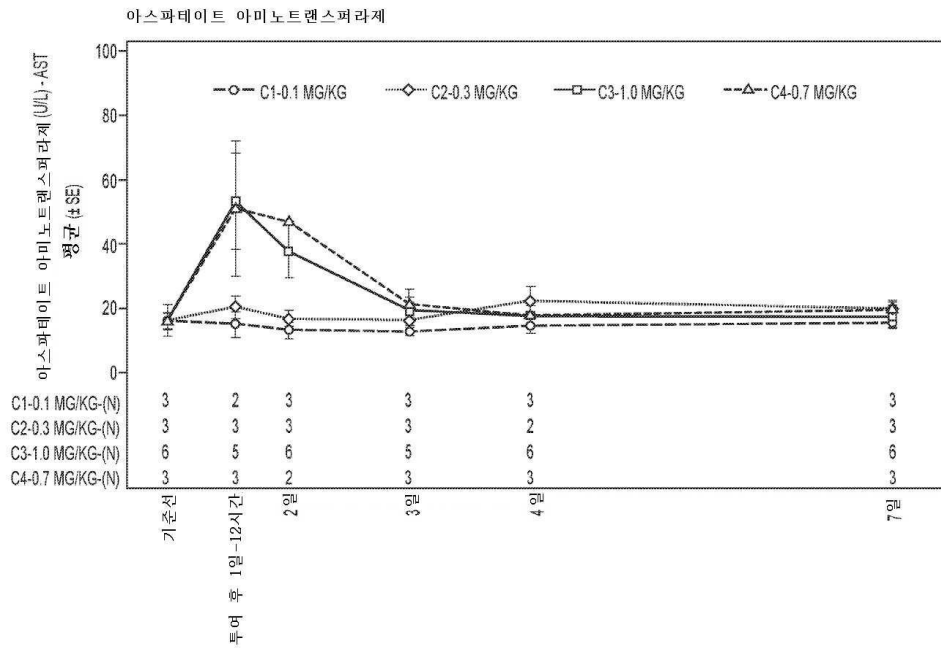
도면21c



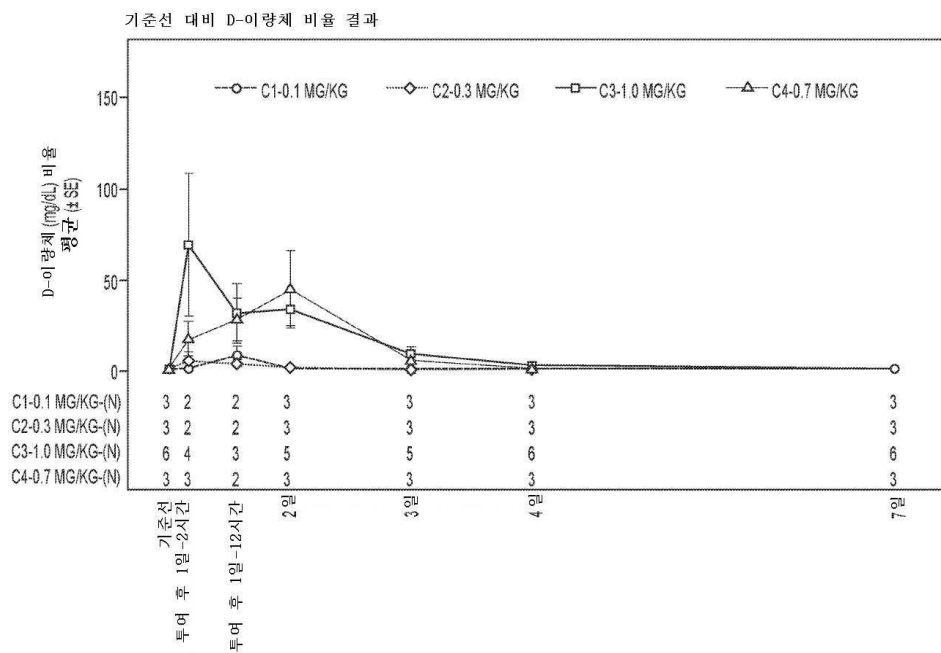
도면21d



도면21e



도면21f



도면22

매개변수	0.1 mg/kg N=3			0.3 mg/kg N=3			0.7 mg/kg N=3			1.0 mg/kg N=6			ALL N=15		
	GR.1	GR.2	GR.3	GR.1	GR.2	GR.3	GR.1	GR.2	GR.3	GR.1	GR.2	GR.3	GR.1	GR.2	GR.3
적어도 하나의 TEAE를 갖는 환자	3	—	—	3	—	—	2	—	1*	3	2	1†	11	2	2
두통	2	—	—	—	—	—	2	—	—	3	—	—	7	—	—
주입-관련 반응	1	—	—	—	—	—	2	—	—	4	—	—	7	—	—
등 통증	1	—	—	—	—	—	2	1	—	1	—	—	4	1	—
발진	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	4	—	—
구역	1	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	3	—	—

2명 초과와 환자에서 보고된 이상 반응

보고된 최고 등급으로서 환자는 해당, 용량 수준당 1회 계수함

* 관련 없는 3등급 COVID-19 폐렴(SAE)

† 위마비의 병력이 동반된 환자에서 관련 3등급 구토(SAE)

도면23a

매개변수	0.1 mg/kg N=3	0.3 mg/kg N=3	0.7 mg/kg N=3	1.0 mg/kg N=6	모든 환자 N=15
연령, 세 중간값 (MIN, MAX)	54 (50,63)	53 (46,64)	51 (19,58)	61 (49,70)	55 (19,70)
성별, N (%)					
남성	1 (33%)	3 (100%)	2 (67%)	3 (50%)	9 (60%)
여성	2 (67%)	—	1 (33%)	3 (50%)	8 (40%)
자가-보고 인종, N (%)					
백인	1 (33%)	3 (100%)	2 (67%)	4 (67%)	10 (67%)
서유럽인	2 (67%)	—	—	1 (17%)	3 (20%)
아시아인	—	—	—	1 (17%)	1 (7%)
하와이 원주민 / 기타 태평양 섬주민	—	—	1 (33%)	—	1 (7%)
체중, kg, 중간값 (MIN, MAX)	82 (70, 89)	84 (83, 90)	87 (62, 98)	75 (59, 111)	83 (59, 111)

도면23b

매개변수	0.1 mg/kg n=3	0.3 mg/kg n=3	0.7 mg/kg n=3	1.0 mg/kg n=6	모든 환자 n=15
TTR 유전자형, N (%)					
PH110D	0	1 (33%)	0	0	1 (7%)
P.S97Y	1 (33%)	1 (33%)	0	0	2 (13%)
P.E94G	0	0	1 (33%)	0	1 (7%)
P.T80A	2 (67%)	1 (33%)	1 (33%)	2 (33%)	6 (40%)
P.S70R	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
D.E62D	0	0	1 (33%)	2 (33%)	3 (20%)
D.V50M	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
임상 점수, N (%)					
PN 무능 점수					
1	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	4 (67%)	13 (87%)
2	0	0	0	2 (33%)	2 (13%)
NYHA 분류					
I	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	4 (67%)	13 (87%)
II	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
HF의 진단 없음	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
NT-PROBNP(ng/L)*, 중간 (MIN, MAX)	127 (89, 596)	118 (<50, 359)	58 (<50, 195)	112 (<50, 544)	118 (<50, 596)

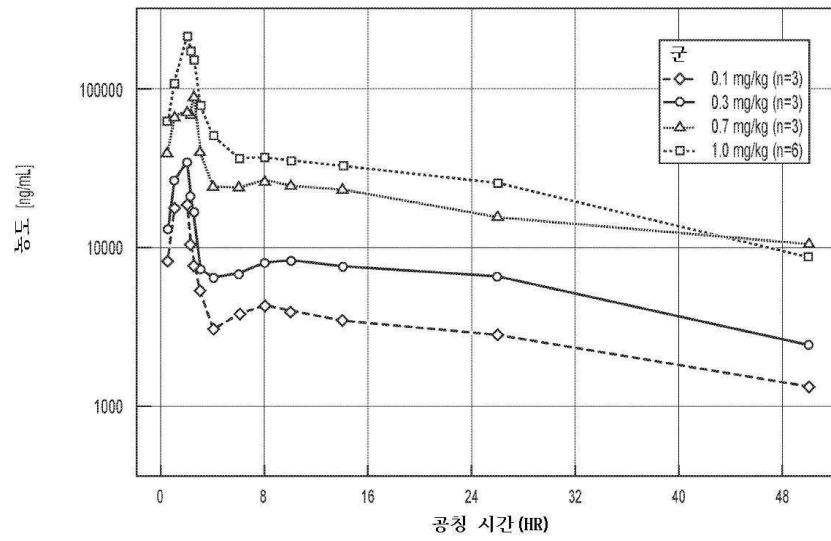
* NT-PROBNP ULN = 125 ng/L

HF, 심부전; NT-PROBNP, N-말단 프로 B형 나트륨 이뇨 펩타이드;

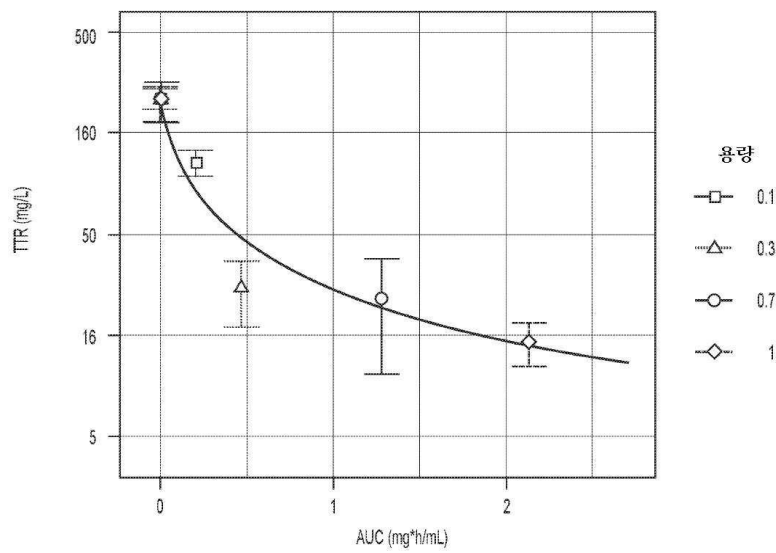
NYHA, 뉴욕 심장 협회; PN, 말초 신경병증;

TTR, 트랜스티레틴; ULN, 정상 상한

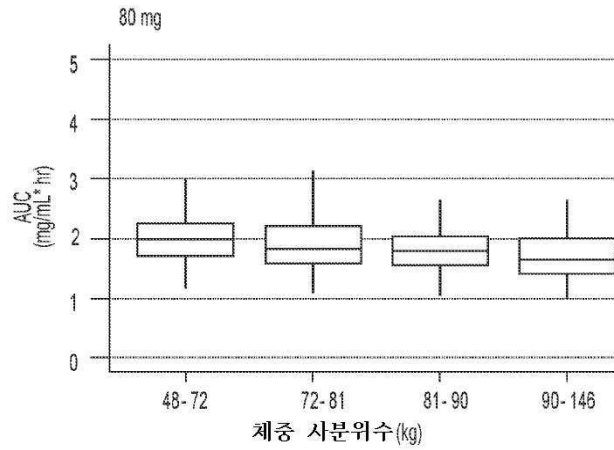
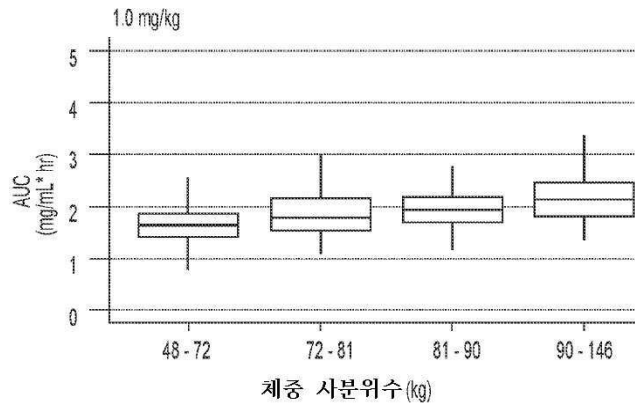
도면24



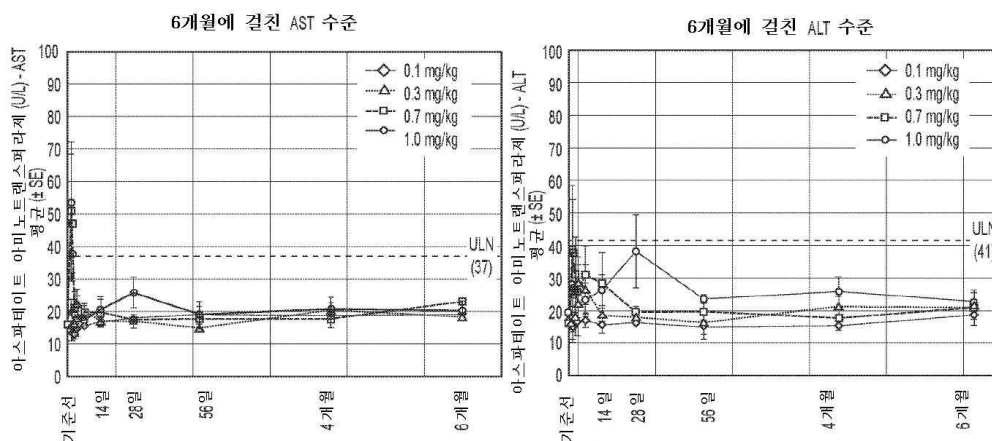
도면25



도면26



도면27



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

<120> METHODS FOR IN VIVO EDITING OF A LIVER GENE

<130> WO 2022/271780

<140> PCT/US2022/034454

<141> 2022-06-22

<150> US 63/314,878

<151> 2022-02-28

<150> US 63/264,435

<151> 2021-11-22

<150> US 63/263,466

<151> 2021-11-03

<150> US 63/202,812

<151> 2021-06-25

<150> US 63/202,744

<151> 2021-06-22

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4140

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 1

atggacaaga agtacagcat cggactggac atcggaaaca acagcgtcgg atgggcagtc	60
atcacagacg aatacaaggt cccgagcaag aagttcaagg tcttgggaaa cacagacaga	120
cacagcatca agaagaacct gatcggagca ctgctgttcg acagcggaga aacagcagaa	180
gcaacaagac tgaagagaac agcaagaaga agatacaca gaagaaagaa cagaatctgc	240
tacctgcagg aaatcttcag caacgaaatg gcaaaggtcg acgacagctt cttccacaga	300
ctggaagaaa gcttcctggt cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gatcttcgga	360
aacatcgtcg acgaagtcgc ataccacgaa aagtaccgca caatctacca cctgagaaag	420
aagctggtcg acagcacaga caaggcagac ctgagactga tctacctggc actggcacac	480
atgatcaagt tcagaggaca cttcctgatc gaaggagacc tgaacccgga caacagcgac	540
gtcgacaagc tgttcatcca gctgtgccag acatacaacc agctgttcga agaaaacccg	600

atcaacgcaa gcgagtcga cgcaaaggca atcctgagcg caagactgag caagagcaga	660
agactggaaa acctgatcgc acagctgccg ggagaaaaga agaacggact gttcggaaac	720
ctgatcgcac tgagcctggg actgacaccg aacttcaaga gcaacttcga cctggcagaa	780
gacgcaaagc tgcagctgag caaggacaca tacgacgacg acctggacaa cctgctggca	840
cagatcggag accagtacgc agacctgttc ctggcagcaa agaacctgag cgacgcaatc	900
ctgctgagcg acatcctgag agtcaacaca gaaatcaca aggcacgct gagcgcaagc	960
atgatcaaga gatacgacga acaccaccag gacctgacac tgctgaaggc actggtcaga	1020
cagcagctgc cggaaaagta caaggaaatc ttcttcgacc agagcaagaa cggatacgca	1080
ggatacatcg acggaggagc aagccaggaa gaattctaca agttcatcaa gccgatcctg	1140
gaaaagatgg acggaacaga agaactgctg gtcaagctga acagagaaga cctgctgaga	1200
aagcagagaa cattcgacaa cggaagcatc ccgcaccaga tccacctggg agaactgcac	1260
gcaatcctga gaagacagga agacttctac ccgttcctga aggacaacag agaaaagatc	1320
gaaaagatcc tgacattcag aatcccgtag tacgtcggac cgctggcaag aggaaacagc	1380
agattcgcat ggatgacaag aaagagcgaa gaaacaatca caccgtggaa cttcgaagaa	1440
gtcgtcgaca agggagcaag cgcacagagc ttcacgaaa gaatgacaaa cttcgacaag	1500
aacctgccga acgaaaaggt cctgccgaag cacagcctgc tgtacgaata cttcacagtc	1560
tacaacgaac tgacaaaggt caagtacgtc acagaaggaa tgagaaagcc ggcattcctg	1620
agcggagaac agaagaaggg aatcgtcgac ctgctgttca agacaaacag aaaggtcaca	1680
gtcaagcagc tgaaggaaga ctacttcaag aagatcgaat gcttcgacag cgtcgaaatc	1740
agcggagtcg aagacagatt caacgcaagc ctgggaacat accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttctt ggacaacgaa gaaaacgaag acatcctgga agacatcgtc	1860
ctgacactga cactgttcga agacagagaa atgatcgaag aaagactgaa gacatacgca	1920
cacctgttcg acgacaaggt catgaagcag ctgaagagaa gaagatacac aggatgggga	1980
agactgagca gaaagctgat caacggaatc agagacaagc agagcggaaa gacaatcctg	2040
gacttcctga agagcgacgg attcgcaaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
agcctgacat tcaaggaaga catccagaag gcacaggtca gcggacaggg agacagcctg	2160
cacgaacaca tcgaaacct ggcaggaagc ccggcaatca agaagggaat cctgcagaca	2220
gtcaaggtcg tcgacgaact ggtcaaggtc atgggaagac acaagccgga aaacatcgtc	2280
atcgaatgg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga	2340
atgaagagaa tcgaagaagg aatcaaggaa ctgggaagcc agatcctgaa ggaacacccg	2400
gtcgaaaaca cacagctgca gaacgaaaag ctgtacctgt actacctgca gaacggaaga	2460

gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aacagactga gcgactacga cgtcgaccac 2520

atcgtcccg agagcttctt gaaggacgac agcatcgaca acaaggtcct gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaagag cgacaacgtc ccgagcgaag aagtcgtcaa gaagatgaag 2640

aactactgga gacagctgct gaacgcaaag ctgatcacac agagaaagtt cgacaacctg 2700

acaaaggcag agagaggagg actgagcgaa ctggacaagg caggattcat caagagacag 2760

ctggtcgaaa caagacagat cacaagcac gtcgcacaga tcctggacag cagaatgaac 2820

acaaagtacg acgaaaacga caagctgac agagaagtca aggtcatcac actgaagagc 2880

aagctggtca gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtcagaga aatcaacaac 2940

taccaccag cacacgacgc atacctgaac gcagtcgtcg gaacagcact gatcaagaag 3000

taccgaagc tggaagcga attcgtctac ggagactaca aggtctacga cgtcagaaag 3060

atgatcgaa agagcgaaca ggaaatcgga aaggcaacag caaagtactt cttctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gacagaaatc aactggcaa acggagaaat cagaaagaga 3180

ccgtgatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtct gggacaaggg aagagacttc 3240

gcaacagtca gaaaggtcct gagcatgccg caggtcaaca tcgtcaagaa gacagaagtc 3300

cagacaggag gattcagcaa ggaaagcatc ctgccgaaga gaaacagcga caagctgac 3360

gcaagaaaga aggactggga cccgaagaag tacggaggat tcgacagccc gacagtcga 3420

tacagcgtcc tggtcgtcg aaaggtcgaa aagggaaga gcaagaagct gaagagcgtc 3480

aaggaactgc tgggaatcac aatcatggaa agaagcagct tcgaaaagaa cccgatcgac 3540

ttcttgaag caaagggata caaggaagtc aagaaggacc tgatcatcaa gctgccgaag 3600

tacagcctgt tcgaactgga aaacggaaga aagagaatgc tggcaagcgc aggagaactg 3660

cagaagggaa acgaactggc actgccgagc aagtacgtca acttctgta cctggcaagc 3720

cactacgaaa agctgaaggg aagcccgga gacaacgaac agaagcagct gttcgtcgaa 3780

cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gaacagatca gcgaattcag caagagagtc 3840

atcctggcag acgcaaactc ggacaaggtc ctgagcgcac acaacaagca cagagacaag 3900

ccgatcagag aacaggcaga aaacatcatc cacctgttca cactgacaaa cctgggagca 3960

ccggcagcat tcaagtactt cgacacaaca atcgacagaa agagatacac aagcacaag 4020

gaagtcttg acgcaacact gatccaccag agcatcacag gactgtacga aacaagaatc 4080

gacctgagcc agctgggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggtctag 4140

<210> 2

<211> 4140

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 2

atggacaaga agtactccat cggcctggac atcggcacca actccgtggg ctgggccgtg	60
atcacgcagc agtacaaggt gccctccaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg	120
cactccatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg actccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc tgaagcggac cgcccggcgg cggtacaccc ggcggaagaa ccggatctgc	240
tacctgcagg agatcttctc caacgagatg gccaaagtgg acgactcctt cttccaccgg	300
ctggaggagt ccttcctggg ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc	360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtacccca ccatctacca cctgcggaag	420
aagctggtgg actccaccga caagccgac ctgcggctga tctacctggc cctggcccac	480
atgatcaagt tccggggcca cttcctgatc gagggcgacc tgaaccccga caactccgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc	600
atcaacgcct ccggcgtgga cgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc caagtcccgg	660
cggctggaga acctgatcgc ccagctgcc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac	720
ctgatcgccc tgcctctggg cctgaccccc aattcaagt ccaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgtc caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgtc cgacgccatc	900
ctgctgtccg acatcctcgc ggtgaacacc gagatcacca agggccccct gtccgcctcc	960
atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgacct tgctgaaggc cctggtgcgg	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agtccaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcggcgc ctcccaggag gagtcttaca agttcatcaa gcccacctg	1140
gagaagatgg acggcaccca ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctgcgg	1200
aagcagcgga ccttcgacaa cggctccatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gccatcctgc ggcggcagga ggacttctac cccttcctga aggacaaccg ggagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttcgc gatccctac tacgtgggce cctggcccg gggcaactcc	1380
cggttcgctt ggatgacccg gaagtcgag gagaccatca cccctggaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgctc cgcccagtcc ttcacgagc ggatgaccaa cttcgacaag	1500
aacctgccc acgagaaggt gctgcccgaag cactccctgc tgtacgagta cttaccgtg	1560

tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttcctg	1620
tccggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgactc cgtggagatc	1740
tccggcgtgg aggaccggtt caacgcctcc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgaccctga cctgtttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc	1980
cggctgtccc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agtccggcaa gaccatcctg	2040
gacttcctga agtccgacgg cttcgccaac cggaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
tccttgacct tcaaggagga catccagaag gcccggtgt cggccaggc cgactccctg	2160
cacgagcaca tcgccaacct ggccggctcc ccgccatca agaaggcat cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtg atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg	2280
atcgagatgg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaactc cggggagcgg	2340
atgaagcga tcgaggagg catcaaggag ctgggctccc agatcctgaa ggagcacccc	2400
gtggagaaca ccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggccgg	2460
gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aaccggctgt ccgactacga cgtggaccac	2520
atcgtgcccc agtcttctt gaaggacgac tccatcgaca acaagggtgt gacccggtcc	2580
gacaagaacc ggggcaagtc gcacaactg ccctccgagg aggtggtgaa gaagatgaag	2640
aactactggc ggacgtgct gaacccaag ctgatcccc agcggaggtt cgacaacctg	2700
accaaggccg agcggggcgg cctgtccgag ctggacaagg ccggcttcat caagcgcag	2760
ctggtggaga cccggcagat caccaagcac gtggcccaga tcctggactc ccggtgaac	2820
accaagtacg acgagaacga caagctgatc cgggaggtga aggtgatcac cctgaagtec	2880
aagctggtgt ccgacttccg gaaggacttc cagttctaca aggtgcggga gatcaacaac	2940
taccaccag cccacgacg ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgcct gatcaagaag	3000
taccccaagc tggagtccga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag	3060
atgatcgcca agtccgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctactcc	3120
aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccggaagcgg	3180
cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgggacttc	3240
gccaccgtgc ggaaggtgct gtccatgcc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg	3300

cagaccggcg gcttctccaa ggagtcctatc ctgcccgaagc ggaactccga caagctgac 3360
gcccgaaga aggactggga cccaagaag tacggcggtc tcgactcccc caccgtggcc 3420
tactccgtgc tgggtggggc caaggtggag aagggaagt ccaagaagct gaagtccgtg 3480
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cggctctcct tcgagaagaa ccccatcgac 3540
ttcctggagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgcccgaag 3600
tactccctgt tcgagctgga gaacggccgg aagcggtatc tggcctccgc cggcgagctg 3660
cagaagggca acgagctggc cctgccctcc aagtacgtga acttctgtga cctggcctcc 3720

cactacgaga agctgaaggg ctccccgag gacaacgagc agaagcagct gtctgtggag 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatct ccgagttctc caagcgggtg 3840
atcctggccg acgccaacct ggacaaggtg ctgtccgctt acaacaagca ccgggacaag 3900
cccatccggg agcaggccga gaacatcatc cacctgttca cctgaccaa cctgggcgcc 3960
cccgccgctt tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgga agcgggtacac ctccaccaag 4020
gaggtgctgg acgccacct gateccaccg tccatcaccg gcctgtacga gaccgggatc 4080
gacctgtccc agctgggcgg cgacggcggc ggctcccca agaagaagcg gaaggtgtga 4140

<210> 3

<211> 4140

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 3

auggacaaga aguacagcau cggccuggac aucggcacga acagcguugg cugggcugug 60
aucacggacg aguacaaggu ucccuaaag aaguucaagg ugcugggcaa cacggaccgg 120
cacagcauca agaagaauca caucggugca cugcuguucg acagcgguga gacggccgaa 180
gccacgccc ugaagcggac ggcccggcgg cgguacacgc ggcggaagaa ccggaucugc 240
uaccugcagg agaucuucag caacgagaug gccaaggugg acgacagcuu cuuccaccgg 300

cuggaggaga gcuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc caucuucggc 360
aacaucgugg acgaagucgc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccugcggaag 420
aagcuggugg acucgacuga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc acugggccac 480
augauaaagu uccggggcca cuuccugauc gagggcgacc ugaaccuga caacagcgac 540
guggacaagc uguucaucca gcuggugcag accuacaacc agcuguucga ggagaacccc 600
aucaacgcca gcggcgugga cgccaaggcc auccucagcg cccgccucag caagagccgg 660

cggcuggaga aucucaucgc ccagcuucca ggugagaaga agaauaggcu guucggcaau	720
cucaucgcac ucagccuggg ccugacuccc aacuucaaga gcaacuucga ccuggccgag	780
gacgccaagc ugcagcucag caaggacacc uacgacgacg accuggacaa ucuccuggcc	840
cagaucggcg accaguacgc cgaccuguuc cuggcugcca agaauucag cgacgccauc	900
cugcucagcg acauccugcg ggugaacaca gagaucacga agggccccc cuagcgcagc	960
augauaaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugacgc ugcugaaggc acuggugcgg	1020
cagcagcuuc cagagaagua caaggagauc uucuuacgacc agagcaagaa uggguacgcc	1080
ggguacaucg acgguggugc cagccaggag gaguucuaca aguucaucaa gcccauccug	1140
gagaagaugg acggcacaga ggagcugcug gugaagcuga acaggaggga ccugcugcgg	1200
aagcagcggg cguucgacaa ugggagcauc cccaccaga uccaccuggg ugagcugcac	1260
gccauccugc ggcggcagga ggacuucua cccuuccuga aggacaacag ggagaagauc	1320
gagaagaucg ugacguuccg gaucuccuac uacguuggcc ccugggccg cggcaacagc	1380
cgguucgcuu ggauacgcg gaagagcgag gagacgauca cuccuggaa cuucgaggaa	1440
gucguggaca agggugccag cgcccagagc uucaucgagc ggauacgaa cuucgacaag	1500
aaucuuccaa acgagaaggu gcuuccaaag cacagccugc uguacgagua cuucacggug	1560
uacaacgagc ugacgaaggu gaaguacgug acagaggga ugcggaagcc cgccuuccuc	1620
agcggugagc agaagaaggc caucugggac cugcuguuca agacgaaccg gaaggugacg	1680
gugaagcagc ugaaggagga cuacuuaag aagaucgagu gcuucgacag cguggagauc	1740
agcggcgugg aggaccgguu caaccccagc cugggcaccu accacgaccu gcugaagauc	1800
aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgag gagaacgagg acauccugga ggacaucgug	1860
cugacgcuga cgcuuucga ggacaggagc augauagagg agcggcugaa gaccuacgcc	1920
caccuguucg acgacaaggu gaugaagcag cugaagcggc ggcgguacac gggcuggggc	1980
cggcucagcc ggaagcugau caauaggau cagacaagc agagcggcaa gacgauccug	2040
gacuuccuga agagcgacgg cuucgccaac cggaacuua ugcagcugau ccacgacgac	2100
agccugacgu ucaaggagga cauccagaag gccaggguca gcggccaggg cgacagccug	2160
cacgagcaca ucgccaau cuccgggagc cccgccauca agaaggggau ccugcagacg	2220
gugaaggugg uggacgagcu ggugaaggug augggccggc acaagccaga gaacaucgug	2280
aucgagaugg ccaggagaga ccagacgacu caaaaggggc agaagaacag caggagcgg	2340
augaagcggg ucgaggaggg caucaaggag cugggcagcc agauccugaa ggagcacccc	2400

guggagaaca cucaacugca gaacgagaag cuguaccugu acuaccugca gaaugggcga	2460
gacauguacg uggaccagga gcuggacauc aaccggcuca gcgacuacga cguggaccac	2520
aucguuuccc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaaggugcu gacgcggagc	2580
gacaagaacc ggggcaagga cgacaacguu ccucagagg aagucgugaa gaagaugaag	2640
aacuacuggc ggcagcugcu gaacgccaag cugaucacuc aacggaaguu cgacaauuc	2700
acgaaggccg agcggggugg ccucagcgag cuggacaagg ccggguucau caagcggcag	2760
cugguggaga cgcggcagau cacgaagcac guggcccaga uccuggacag ccggaugaac	2820
acgaaguacg acgagaacga caagcugauc agggaaguca aggugaucac gcugaagagc	2880
aagcugguca gcgacuuccg gaaggacuuc caguucuaca aggugaggga gaucaacaac	2940
uaccaccacg cccacgacgc cuaccugaac gcugugguug gcacggcacu gaucaagaag	3000
uacccaagc uggagagcga guucguguac ggcgacuaca agguguacga cgugcggaag	3060
augauagcca agagcgagca ggagaucggc aaggccacgg ccaaguacuu cuucacagc	3120
aacauauga acuuuuaa gacagagauc acgcugcca auggugagau ccggaagcgg	3180
ccccugaucg agacgaagg ugagacgggu gagaucgugu gggacaaggg gcgagacuuc	3240
gccacggugc ggaaggugcu cagcaugccc caggugaaca ucgugaaga gacagaaguc	3300
cagacgggug gcuucagcaa ggagagcauc cuuccaaagc ggaacagcga caagcugauc	3360
gcccgcaaga aggacuggga cccaagaag uacgguggcu ucgacagccc caccgugcc	3420
uacagcgugc ugguggugc caagguggag aagggaaga gcaagaagcu gaagagcgug	3480
aaggagcugc ugggcaucac gaucauggag cggagcagcu ucgagaaga ccccaucgac	3540
uuccuggaag ccaaggguua caaggaaguc aagaaggacc ugaucauaa gcuuccaaag	3600
uacagccugu ucgagcugga gaaugggcgg aagcggaugc ugccagcgc cggugagcug	3660
cagaaggga acgagcugc acuuccuca aaguacuga acuuccugua ccuggccagc	3720
cacuacgaga agcugaagg gagccagag gacaacgagc agaagcagcu guucguggag	3780
cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagauca gcgaguucag caagcgggug	3840
auccggccg acgccaauu cgacaaggug cucagcgccu acaacaagca ccgagacaag	3900
cccaucaggg agcaggcca gaacaucau caccuguuca cgugacgaa ucucggugcc	3960
cccgugccu ucaaguacuu cgacacgagc aucgaccgga agcgguacac gucgacuaag	4020
gaaguccugg acgccacgu gauccaccag agcaucacgg gccuguacga gacgcggauc	4080
gaccucagcc agcugggugg cgacgguggu ggagcccca agaagaagcg gaagguguag	4140

<210> 4

<211> 4140

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 4

auggacaaga aguacagcau cggccucgac aucggcacca acagcgucgg cugggcccugc	60
aucaccgacg aguacaaggu ccccagcaag aaguucaagg uccucggcaa caccgaccgc	120
cacagcauca agaagaaccu caucggcgcc cuccucuucg acagcgcgca gaccgccgag	180
gccacccgcc ucaagcgcac cgcccgccgc cgcuaacccc gccgcaagaa ccgcaucugc	240
uaccuccagg agaucuucag caacgagaug gccaaggucg acgacagcuu cuuccaccgc	300
cucgaggaga guuccucgu cgaggaggac aagaagcacg agcgccaccc caucuucggc	360
aacaucgucg acgaggucgc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccuccgcaag	420
aagcucgucg acagcaccga caaggccgac cuccgccuca ucuaccucgc ccucgcccac	480
augaucaagu uccgcgccca cuuccucauc gagggcgacc ucaaccccga caacagcgac	540
gucgacaagc ucuucaucca gcucguccag accuacaacc agcucuucga ggagaacccc	600
aucaacgcca gcggcgucga cgccaaggcc auccucagcg cccgccucag caagagccgc	660
cgccucgaga accucaucgc ccagcucccc ggcgagaaga agaacggccu cuucggcaac	720
cucaucgccc ucagccucgg ccucaccccc aacuuaaga gcaacuucga ccucgccgag	780
gagccaagc uccagcucag caaggacacc uacgacgacg accucgacaa ccuccucgcc	840
cagaucggcg accaguacgc cgaccucuuc cucgccgcca agaaccucag cgacgccauc	900
cuccucagcg acauccucg cguaacacc gagaucacca agggcccccu cagcgccagc	960
augaucaagc gcuacgacga gcaccaccag gaccucaccc uccucaaggc ccucguccgc	1020
cagcagcucc ccgagaagua caaggagauc uucuucgacc agagcaagaa cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg acggcgggcg cagccaggag gaguucuaca aguucauaa gcccuaucuc	1140
gagaagaugg acggcaccca ggagcuccuc gucaagcuca accgcgagga ccuccuccgc	1200
aagcagcgca ccuucgacaa cggcagcauc ccccaccaga uccaccucgg cgagcuccac	1260
gccaauccuc gccgccagga ggacuucuac ccuuccuca aggacaaccg cgagaagauc	1320
gagaagauc ucaccuuccg caucccuac uacgucggcc ccucgcccg cggcaacagc	1380
cgcucgccu ggauacccg caagagcgag gagaccauca ccccuggaa cuucgaggag	1440
gucgucgaca agggcgccag cgcccagagc uucaucgagc gcaugaccaa cuucgacaag	1500
aaccucccca acgagaaggu ccuccccaag cacagccucc ucuacgagua cuuaccguc	1560

uacaacgagc ucaccaaggu caaguacguc accgagggca ugcgcaagcc cgccuuccuc	1620
agcggcgagc agaagaaggc caucgucgac cuccucuuca agaccaaccg caaggucacc	1680
gucaagcagc ucaaggagga cuacuuaag aagaucgagu gcuucgacag cgucgagauc	1740
agcggcgucg aggaccgcuu caacgccagc cucggcaccu accacgaccu ccucaagauc	1800
aucaaggaca aggacuuccu cgacaacgag gagaacgagg acauccucga ggacaucguc	1860
cucaccucaa ccucuucga ggaccgagc augaucgagg agcgccucaa gaccuacgcc	1920
caccucuucg acgacaaggu caugaagcag cucaagcgcc gccgcuacac cggcuggggc	1980
cgccucagcc gcaagcucua caacggcauc cgcgacaagc agagcggcaa gaccauccuc	2040
gacuuccua agagcgacgg cuucgccaac cgcaacuua ugcagcucua ccacgacgac	2100
agccucaccu ucaaggagga cauccagaag gcccagguca gcggccaggc cgacagccuc	2160
cacgagcaca ucgccaaccu cgccggcagc cccgccauca agaagggcgu ccuccagacc	2220
gucaaggucg ucgacgagcu cgucaagguc augggccgcc acaagcccga gaacaucguc	2280
aucgagaugg cccgcgagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacag ccgcgagcgc	2340
augaagcgca ucgaggaggg caucaaggag cucggcagcc agauccucaa ggagcacccc	2400
gucgagaaca cccagcucca gaacgagaag cucuaccucu acuaccucca gaacggccgc	2460
gacauguacg ucgaccagga gcucgacau aaccgccuca gcgacuacga cgucgaccac	2520
aucgucccc agagcuuccu caaggacgac agcaucgaca acaagguccu caccgcgacg	2580
gacaagaacc gggcaagag cgacaacguc cccagcgagg agguvcguca gaagaugaag	2640
aacuacuggc gccagcuccu caacgccaag cucaucaccc agcgcaaguu cgacaaccuc	2700
accaaggccg agcgcgggcg ccucagcgag cucgacaagg ccggcuucau caagcgccag	2760
cucgucgaga cccgccagau caccaagcac gucggccaga uccucgacag ccgcaugaac	2820
accaaguacg acgagaacga caagcuauc cgcgagguca aggucaucac ccucaagagc	2880
aagcucguca gcgacuuccg caaggacuuc caguucuaca agguccgcga gaucaacaac	2940
uaccaccacg cccacgacgc cuaccucaac gccgucgucg gcaccgccc ucaucaagaag	3000
uacccaagc ucgagagcga guucgucua ggcgacuaca agguuacga cguccgcaag	3060
augaucgcca agagcgagca ggagaucggc aaggccaccg ccaaguacuu cuucacagc	3120
aacaucauga acuuuucua gaccgagau acccucgcca acggcgagau ccgcaagcgc	3180
ccccuacug agaccaacgg cgagaccggc gagaucgucu gggacaaggc ccgagacuuc	3240
gccaccgucc gcaagguccu cagcaugccc cagguaaca ucgucaagaa gaccgagguc	3300
cagaccggcg gcuucagcaa ggagagcauc cucccaagc gcaacagcga caagcuauc	3360
gcccgaaga aggacuggga cccaagaag uacggcggu ucgacagccc caccgucgcc	3420

uacagcgucc ucgucgucgc caaggucgag aagggaaga gcaagaagcu caagagcguc 3480
aaggagcucc ucggcaucac caucauggag cgcagcagcu ucgagaagaa ccccaucgac 3540
uuccucgagg ccaagggcua caaggagguc aagaaggacc ucaucaucaa gcuccccaag 3600

uacagccucu ucgagcucga gaacggccgc aagcgcaugc ucgccagcgc cggcgcguc 3660
cagaaggga acgagcucgc ccucggcagc aaguacguca acuuccucua ccucggcagc 3720
cacuacgaga agcucaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagcu cuucgucgag 3780
cagcacaagc acuaccucga cgagaucauc gagcagauca gcgaguucag caagcgcguc 3840
auccucgcc acgccaaccu cgacaagguc cucagcgccu acaacaagca ccgcgacaag 3900
cccauccgcg agcaggccga gaacaucauc caccucuua cccuaccaa ccucggcgcc 3960
ccgcccgc cuuaguacuu cgacaccacc aucgaccga agcgcuacac cagcaccaag 4020

gagguccucg acgccacccu cauccaccag agcaucaccg gccucuacga gacccgauc 4080
gaccucagcc agcucggcgg cgacggcggc ggagcccca agaagaagcg caaggucuag 4140

<210> 5
<211> 4140
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown:
ORF encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 5

atggacaaga agtacagcat cggcctggac atcggcacca acagcgtggg ctgggccgtg 60
atcaccgacg agtacaaggt gccagcaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg 120
cacagcatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg acagcggcga gaccgccgag 180

gccacccggc tgaagcggac cgcccggcgg cggtacacc ggcggaagaa ccggtatctg 240
tacctgcagg agatcttcag caacgagatg gccaaagtgg acgacagctt cttccaccgg 300
ctggaggaga gcttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc 360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcggaag 420
aagctggtgg acagaccga caagccgac ctgcggctga tctacctggc cctggccac 480
atgatcaagt tccggggcca cttctgatc gagggcgacc tgaacccga caacagcgac 540
gtggacaagc tggtcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc 600

atcaacgcca gggcggtgga cgccaaggcc atcctgagcg cccggctgag caagagccgg 660
cggctggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggaac 720

ctgatcgccc ttagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgag cgacgccatc	900
ctgctgagcg acatcctgcg ggtgaacacc gagatcacca aggccccct gagcgccagc	960
atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgacct tgctgaaggc cctggtgcgg	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agagcaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcggcgc cagccaggag gatttctaca agttcatcaa gccatcctg	1140
gagaagatgg acggcaccga ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctgcgg	1200
aagcagcgga ctttcgacaa cggcagcatc cccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gccatcctgc ggccgcagga ggacttctac cccttcctga aggacaaccg ggagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttcgc gatccctac tacgtgggcc ccctggcccg gggcaacagc	1380
cggttcgcct ggatgacccg gaagagcgag gagacatca cccctggaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgccag cgcccagagc ttcacgagc ggatgacaa cttcgacaag	1500
aacctgcccc acgagaaggt gctgccccaa cacagcctgc tgtacagta cttaccgtg	1560
tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttcctg	1620
agcggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgacag cgtggagatc	1740
agcggcggtg aggaccggtt caacgccagc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgacctga ccctgttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc	1980
cggctgagcc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agagcggcaa gaccatcctg	2040
gacttctga agagcgacgg cttcgccaac cggaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
agcctgacct tcaaggagga catccagaag gccaggtga gcggccaggg cgacagcctg	2160
cacgagcaca tcgccaacct ggccggcagc cccgccatca agaaggcat cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaagtg atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg	2280
atcgagatgg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacag cgggagcgg	2340
atgaagcggg tcgaggaggg catcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa ggagcacccc	2400
gtggagaaca cccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggccgg	2460
gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aaccggctga gcgactacga cgtggaccac	2520
atcgtgcccc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtgct gacccggagc	2580

gacaagaacc ggggcaagag cgacaacgtg cccagcgagg aggtggtgaa gaagatgaag 2640
aactactggc ggcagctgct gaacgccaag ctgatcacc agcggaagt cgacaacctg 2700

accaaggccg agcggggcgg cctgagcgag ctggacaagg ccggcttcat caagcggcag 2760
ctggtggaga cccggcagat caccaagcac gtggcccaga tcctggacag ccggatgaac 2820
accaagtacg acgagaacga caagctgac cgggaggtga aggtgatcac cctgaagagc 2880
aagctggtga ggcacttccg gaaggacttc cagtcttaca aggtgcggga gatcaacaac 2940
taccaccacg cccacgacgc ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgcct gatcaagaag 3000
taccccaagc tggagagcga gtctgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag 3060
atgatcgcca agagcgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt ctctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccggaagcgg 3180
ccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgggacttc 3240
gccaccgtgc ggaaggctct gagcatgccc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg 3300
cagaccggcg gcttcagcaa ggagagcatc ctgccaagc ggaacagcga caagctgatc 3360
gcccggaaga aggactggga cccaagaag tacggcggct tcgacagccc caccgtggcc 3420
tacagcgtgc tgggtggggc caaggtggag aagggaaga gcaagaagct gaagagcgtg 3480
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cggagcagct tcgagaagaa ccccatcgac 3540

ttcttgagg ccaagggcta caaggagggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgcccaag 3600
tacagcctgt tcgagctgga gaacggccgg aagcggatgc tggccagcgc cggcgagctg 3660
cagaaggga acgagctggc cctgcccagc aagtacgtga acttctgtg cctggccagc 3720
cactacgaga agctgaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagct gtctgtggag 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagttcag caagcgggtg 3840
atcctggccg acgccaacct ggacaagggtg ctgagcgctt acaacaagca ccgggacaag 3900
cccatccggg agcaggccga gaacatcatc cacctgttca cctgaccaa cctgggcgcc 3960

ccgcccgcct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgga agcggtacac cagcaccaag 4020
gaggtgctgg acgccacct gatccaccag agcatcaccg gcctgtacga gaccgggatc 4080
gacctgagcc agctgggcgg cgacggcggc ggagcccca agaagaagcg gaaggtgtga 4140

<210> 6
<211> 4140
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 nickase sequence

<400> 6

atggacaaga agtactccat cggcctggcc atcggcacca actccgtggg ctgggccgtg	60
atcacgcagc agtacaaggt gccctccaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg	120
cactccatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg actccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc tgaagcggac cgcccggcgg cggtacaccc ggcggaagaa cgggatctgc	240
tacctgcagg agatcttctc caacgagatg gccaaagtgg acgactcctt cttccaccgg	300
ctggaggagt ctttcttggg ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc	360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcggaag	420
aagctggtgg actccaccga caaggccgac ctgcggctga tctacctggc cctggcccac	480
atgatcaagt tccggggcca cttcttgatc gagggcgacc tgaaccccga caactccgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc	600
atcaacgcct cggcgctgga cgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc caagtcccgg	660
cggctggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac	720
ctgatcgccc tgtccctggg cctgaccccc aacttcaagt ccaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgtc caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgtc cgacgccatc	900
ctgctgtccg acatcctcgc ggtgaacacc gagatcacca aggccccct gtccgcctcc	960
atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgacce tgctgaaggc cctggtcggg	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agtccaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcggcgc ctcccaggag gatttctaca agttcatcaa gcccattctg	1140
gagaagatgg acggcaccca ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctcggg	1200
aagcagcggc ctttcgacaa cggctccatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gccatcctgc ggcggcagga ggacttctac cccttctga aggacaaccg ggagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttcgg gateccctac tacgtgggce ccctggcccc gggcaactcc	1380
cggttcgctt ggatgacccg gaagtccgag gagaccatca ccccttgaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgctc cgcccagtcc ttcatcgagc ggatgaccaa cttcgacaag	1500
aacctgccc aagagaaggt gctgccaag cactccctgc tgtacagta cttcaccgtg	1560
tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttctg	1620
tccggcgagc agaagaagc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgactc cgtggagatc	1740

tccggcgtgg aggaccggtt caacgcctcc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgaccctga cctgtttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc	1980
cggctgtccc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agtccggcaa gaccatcctg	2040
gacttcctga agtccgacgg cttcgccaac cggaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
tccttgacct tcaaggagga catccagaag gcccggtgt cggccaggcg cgactcctg	2160
cacgagcaca tcgccaacct ggccggctcc cccgccatca agaaggcat cctgcagacc	2220
gtgaaggtagg tggacgagct ggtgaaggtag atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg	2280
atcgagatgg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaactc ccgggagcgg	2340
atgaagcggg tcgaggagg catcaaggag ctgggctccc agatcctgaa ggagcacccc	2400
gtggagaaca cccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggccgg	2460
gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aaccggctgt ccgactacga cgtggaccac	2520
atcgtgcccc agtccttcct gaaggacgac tccatcgaca acaaggtgct gacccggtcc	2580
gacaagaacc ggggcaagtc cgacaacgtg ccctccgagg aggtggtgaa gaagatgaag	2640
aactactggc ggcagctgct gaacccaag ctgatcacc agcggaaagt cgacaacctg	2700
accaaggccg agcggggcgg cctgtccgag ctggacaagg ccggcttcat caagcggcag	2760
ctggtggaga cccggcagat caccaagcac gtggcccaga tcctggactc ccggtgaac	2820
accaagtacg acgagaacga caagctgac cgggaggtga aggtgatcac cctgaagtc	2880
aagctggtgt ccgacttcg gaaggacttc cagttctaca aggtgcggga gatcaacaac	2940
taccaccag cccacgacgc ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgccct gatcaagaag	3000
tacccaagc tggagtccga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag	3060
atgatgccca agtccgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctactcc	3120
aacatcatga actttctcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccggaagcgg	3180
cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgggacttc	3240
gccaccgtgc ggaaggtgct gtccatgcc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg	3300
cagaccggcg gctttctcaa ggagtcctc ctgcccgaag ggaactccga caagctgatc	3360
gcccgaaga aggactggga cccaagaag tacggcggct tcgactcccc caccgtggcc	3420
tactccgtgc tgggtggtgc caaggtggag aagggaagt ccaagaagct gaagtccgtg	3480

aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cggtcctcct tcgagaagaa ccccatcgac 3540
 ttcttgagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgccaag 3600
 tactccctgt tcgagctgga gaacggccgg aagcgatgc tggcctccgc cggcgagctg 3660
 cagaaggga acgagctggc cctgccctcc aagtacgtga acttcctgta cctggcctcc 3720
 cactacgaga agctgaaggg ctccccgag gacaacgagc agaagcagct gtctgtggag 3780
 cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatct ccgagttctc caagcgggtg 3840
 atcctggcgg acgccaacct ggacaagggt ctgtccgcct acaacaagca cggggacaag 3900

cccatccggg agcaggccga gaacatcatc cacctgttca ccctgaccaa cctgggcgcc 3960
 cccgccgcct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgga agcggtagac ctccaccaag 4020
 gaggtgctgg acgccaccct gatccaccag tccatcaccg gcctgtacga gacccgatc 4080
 gacctgtccc agctgggcgg cgacggcggc ggctcccccaga agaagaagcg gaagggtgta 4140

<210> 7

<211> 4140

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

ORF encoding Sp. Cas9 nickase sequence

<400> 7

atggacaaga agtacagcat cggcctggcc atcggcacca acagcgtggg ctgggccgtg 60

atcacgcagc agtacaaggt gcccagcaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg 120
 cacagcatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg acagcggcga gaccgccgag 180
 gccacccggc tgaagcggac cgcccgccgg cggtacaccc ggcggaagaa ccgcatctgc 240
 tacttcagc agatcttcag caacgagatg gccaaaggtg acgacagctt ctccaccgg 300
 ctggaggaga gcttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcggcacc catcttcggc 360
 aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcggaag 420
 aagctggtgg acagcaccga caaggccgac ctgcggctga tctacctggc cctggccac 480

atgatcaagt tccggggcca ctctctgac gagggcgacc tgaaccccga caacagcgac 540
 gtggacaagc tggtcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc 600
 atcaacgcca gcggcgtgga cgccaaggcc atcctgagcg cccggctgag caagagccgg 660
 cggctggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gtctggcaac 720
 ctgatcgccc tgagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag 780
 gacgccaagc tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc 840

cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgag cgacgccatc 900

ctgctgagcg acatcctgcg ggtgaacacc gagatcacca agggccccct gagcgccagc 960

atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgaccc tgctgaaggc cctggtgcgg 1020

cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agagcaagaa cggctacgcc 1080

ggctacatcg acggcggcgc cagccaggag gatttctaca agttcatcaa gcccatcctg 1140

gagaagatgg acggcaccca ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctgcgg 1200

aagcagcgga ccttcgacaa cggcagcatc cccaccaga tccacctggg cgagctgcac 1260

gccatcctgc ggcggcagga ggacttctac cccttcctga aggacaaccg ggagaagatc 1320

gagaagatcc tgaccttcgc gatcccttac tacgtgggcc ccttggcccg gggcaacagc 1380

cggttcgcct ggaatgacccg gaagagcgag gagaccatca ccccttgaa cttcgaggag 1440

tggttgaca agggcgccag cgcccagagc ttcatcgagc ggaatgacaa cttcgacaag 1500

aacctgcccc acgagaaggt gctgccaag cacagcctgc tgtacgagta cttcacctg 1560

tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttcctg 1620

agcggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc 1680

gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgacag cgtggagatc 1740

agcggcgtgg aggaccggtt caacgccagc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg 1860

ctgacctga cctgtttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc 1920

cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc 1980

cggctgagcc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agagcggcaa gaccatcctg 2040

gacttctga agagcgacgg cttcgccaac cggaacttca tgcagctgat ccacgacgac 2100

agcctgacct tcaaggagga catccagaag gccaggtga gcggccaggc cgacagcctg 2160

cacgagcaca tcgccaacct ggccggcagc cccgccatca agaaggcat cctgcagacc 2220

gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtg atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg 2280

atcgagatgg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacag ccgggagcgg 2340

atgaagcggg tcgaggagg catcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa ggagcacccc 2400

gtggagaaca cccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggccgg 2460

gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aaccggctga gcgactacga cgtggaccac 2520

atcgtgcccc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtgct gacccggagc 2580

gacaagaacc ggggcaagag cgacaacgtg cccagcgagg aggtggtgaa gaagatgaag 2640
aactactggc ggcagctgct gaacgccaag ctgatcacc agcggaagtt cgacaacctg 2700
accaaggccg agcggggcgg cctgagcgag ctggacaagg ccggcttcat caagcggcag 2760
ctggtggaga cccggcagat caccaagcac gtggcccaga tcctggacag ccgatgaac 2820
accaagtacg acgagaacga caagctgac cgggaggtga aggtgatcac cctgaagagc 2880
aagctggtga ggcacttccg gaaggacttc cagtctaca aggtgcggga gatcaacaac 2940
taccaccacg cccacgacgc ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgcct gatcaagaag 3000

tacccaagc tggagagcga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag 3060
atgatcgcca agagcgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctacagc 3120
aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccggaagcgg 3180
cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgggacttc 3240
gccaccgtgc ggaaggtgct gagcatgccc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg 3300
cagaccggcg gcttcagcaa ggagagcatc ctgccaagc ggaacagcga caagctgatc 3360
gcccggaaga aggactggga cccaagaag tacggcggct tcgacagccc caccgtggcc 3420

tacagcgtgc tgggtggtgc caaggtggag aagggaaga gcaagaagct gaagagcgtg 3480
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cggagcagct tcgagaagaa ccccatcgac 3540
ttcttgagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgccaag 3600
tacagcctgt tcgagctgga gaacggccgg aagcggatgc tggccagcgc cggcgagctg 3660
cagaaggga acgagctggc cctgcccagc aagtacgtga acttctgtg cctggccagc 3720
cactacgaga agctgaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagct gttcgtggag 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagttcag caagcgggtg 3840

atcctggccg acgccaacct ggacaaggtg ctgagcgctt acaacaagca ccgggacaag 3900
cccatccggg agcaggcca gaacatcatc cacctgttca cctgaccaa cctgggcgcc 3960
cccgccgct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgga agcggtacac cagcaccaag 4020
gagtgctgg acgccacct gatecaccag agcatcacg gcctgtacga gaccgggatc 4080
gacctgagcc agctgggcgg cgacggcggc ggagcccca agaagaagcg gaaggtgtga 4140

<210> 8

<211> 4511

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

mRNA encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 8

gggucgccga gucggcgucc agcggcucug cuuguucgug ugugugucgu ugcaggccuu	60
auucggaucc gccaccaugg acaagaagua cagcaucgga cuggacaucg gaacaaacag	120
cgucggaucc gcagucauca cagacgaaua caaggucucc agcaagaagu ucaagguccu	180
gggaaacaca gacagacaca gcaucaagaa gaaccugauc ggagcacugc uguucgacag	240
cggagaaaca gcagaagcaa caagacugaa gagaacagca agaagaagau acacaagaag	300
aaagaacaga aucugcuacc ugcaggaaau cuucagcaac gaaauggcaa aggucgacga	360
cagcuucuuc cacagacugg aagaaagcuu ccuggucgaa gaagacaaga agcacgaaag	420
acaccgcauc uucggaaaca ucgucgacga agucgcgauac cacgaaaagu acccgacaau	480
cuaccaccug agaaagaagc uggucgacag cacagacaag gcagaccuga gacugaucua	540
ccuggcacug gcacacauga ucaaguucag aggacacuuc cugaucgaag gagaccugaa	600
cccggacaac agcgacgucg acaagcuguu cauccagcug guccagacau acaaccagcu	660
guucgaagaa aaccgcauca acgcaagcgg agucgacgca aaggcaaucc ugagcgcaag	720
acugagcaag agcagaagac uggaaaaccu gaucgcacag cugccgggag aaaagaagaa	780
cggacuguuc ggaaccuga ucgcacugag ccugggacug acaccgaacu ucaagagcaa	840
cuucgaccug gcagaagacg caaagcugca gcugagcaag gacacauacg acgacgaccu	900
ggacaaccug cuggcacaga ucggagacca guacgcagac cuguuccugg cagcaaagaa	960
ccugagcgac gcaauccugc ugagcgacau ccugagaguc aacacagaaa ucacaaaggc	1020
accgcugagc gcaagcauga ucaagagaua cgacgaacac caccaggacc ugacacugcu	1080
gaaggcacug gucagacagc agcugccgga aaaguacaag gaaaucuucu ucgaccagag	1140
caagaacgga uacgcaggau acaucgacgg aggagcaagc caggaagaau ucuacaaguu	1200
caucaagccg auccuggaaa agauggacgg aacagaagaa cugcugguca agcugaacag	1260
agaagaccug cugagaaaagc agagaacauu cgacaacgga agcaucccg accagaacca	1320
ccugggagaa cugcacgcaa uccugagaag acaggaagac uucuaccgu uccugaagga	1380
caacagagaa aagaucgaaa agauccugac auucagaauc ccguacuacg ucggaccgcu	1440
ggcaagagga aacagcagau ucgcauggau gacaagaaag agcgaagaaa caaucacacc	1500
guggaacuuc gaagaagucg ucgacaaggg agcaagcgca cagagcuuca ucgaaagaau	1560
gacaaacuuc gacaagaacc ugccgaacga aaagguccug ccgaagcaca gccugcugua	1620

cgaauacuuc acagucuaca acgaacugac aaaggucaag uacgucacag aaggaaugag	1680
aaagccggca uuccugagcg gagaacagaa gaaggcaauc gucgaccugc uguucaagac	1740
aaacagaaag gucacaguca agcagcugaa ggaagacuac uucaagaaga ucgaaugcuu	1800
cgacagcguc gaaauacgag gagucgaaga cagauucaac gcaagccugg gaacauacca	1860
cgaccugcug aagaucacua aggacaagga cuuccuggac aacgaagaaa acgaagacau	1920
ccuggaagac aucguccuga cacugacacu guucgaagac agagaaauga ucgaagaaag	1980
acugaagaca uacgcacacc uguucgacga caaggucaug aagcagcuga agagaagaag	2040
auacacagga uggggaagac ugagcagaaa gcugaucaac ggaaucagag acaagcagag	2100
cgaaaagaca auccuggacu uccugaagag cgacggauuc gcaaacagaa acuucaugca	2160
gcugauccac gacgacagcc ugacauuca ggaagacauc cagaagcac agguagcgg	2220
acaggagag agccugcacg aacacaucgc aaaccuggca ggaagcccgg caaucaagaa	2280
gggaauccug cagacaguca agguugucga cgaacugguc aagguaugg gaagacacaa	2340
gccggaaaac aucgucaucg aaauggcaag agaaaaccag acaacacaga agggacagaa	2400
gaacagcaga gaaagauga agagaauca agaaggaauc aaggaacugg gaagccagau	2460
ccugaaggaa caccggucg aaaacacaca gcugcagaac gaaaagcugu accuguacua	2520
ccugcagaac ggaagagaca uguacgucga ccaggaacug gacaucaaca gacugagcga	2580
cuacgacguc gaccacaucg ucccgcagag cuuccugaag gacgacagca ucgacaacaa	2640
gguccugaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgucccga gcgaagaagu	2700
cgucaagaag augaagaacu acuggagaca gcugcugaac gcaaagcuga ucacacagag	2760
aaaguucgac aaccugacaa aggcagagag aggaggacug agcgaacugg acaaggcagg	2820
auucaucaag agacagcugg ucgaacaag acagaucaca aagcacgucg cacagaucuu	2880
ggacagcaga augaacacaa aguacgacga aaacgacaag cugaucagag aagucaaggu	2940
caucacacug aagagcaagc uggucagcga cuucagaaag gacuuccagu ucuacaaggu	3000
cagagaaauc aacaacuacc accacgcaca cgacgcuauc cugaacgcag ucgucggaac	3060
agcacugauc aagaaguacc cgaagcugga aagcgaauc gucuacggag acuaacaaggu	3120
cuacgacguc agaaagauga ucgcaaagag cgaacaggaa aucggaaagg caacagcaaa	3180
guacuucuuc uacagcaaca ucaugaacuu cuucaagaca gaaaucacac uggcaaacgg	3240
agaaucaga aagagaccgc ugaucgaaac aaacggagaa acaggagaaa ucgucuggga	3300
caagggaaga gacuucgcaa cagucagaaa gguccugagc augccgcagg ucaacaucgu	3360

caagaagaca gaaguccaga caggaggauu cagcaaggaa agcauccugc cgaagagaaa 3420
cagcgacaag cugaucgcaa gaaagaagga cugggacccg aagaaguacg gaggaauucga 3480
cagcccagaca gucgcauaca gcguccuggu cgcgcgcaaag gucgaaaagg gaaagagcaa 3540
gaagcugaag agcguaaagg aacugcuggg aaucacaauc auggaaagaa gcagcuucga 3600
aaagaacccg aucgacuucc uggaagcaaa gggauacaag gaagucaaga aggaccugau 3660
caucaagcug ccgaaguaca gccuguucga acuggaaaac ggaagaaaga gaaugcuggc 3720
aagcgagga gaacugcaga agggaaacga acuggcacug ccgagcaagu acguacaau 3780

ccuguaccug gcaagccacu acgaaaagcu gaagggaagc ccggaagaca acgaacagaa 3840
gcagcuguuc gucgaacagc acaagcacua ccuggacgaa aucaucgaac agaucagcga 3900
auucagcaag agagucaucc uggcagacgc aaaccuggac aagguccuga gcgcauacaa 3960
caagcacaga gacaagccga ucagagaaca ggcagaaaac aucauccacc uguucacacu 4020
gacaaaccug ggagcacccg cagcauucaa guacuucgac acaacaaucg acagaaagag 4080
auacacaagc acaaaggaag uccuggacgc aacacugauc caccagagca ucacaggacu 4140
guacgaaaca agaauccgacc ugagccagcu gggaggagac ggaggaggaa gcccgaagaa 4200

gaagagaaag gucuagcuag ccaucacauu uaaaagcauc ucagccuacc augagaauaa 4260
gagaaagaaa augaagauc auagcuuauu caucucuuuu ucuuuuucgu ugguguaaag 4320
ccaacacccu gucuaaaaa cauaaaauuc uuuaaucauu uugccucuuu ucucugugcu 4380
ucauuuaaua aaaaauaggaa agaaccucga gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaa a 4511

<210> 9

<211> 4418

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

mRNA encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 9

gggaagcuca gaauaaacgc ucaacuugg ccggaucugc caccauggac aagaaguacu 60
ccaucggccu ggacaucggc accaacuccg ugggcugggc cgugaucacc gacgaguaca 120
aggugcccuc caagaaguuc aaggugcugg gcaacaccga ccggcacucc aucaagaaga 180
accugaucgg cgcccugcug uucgacuccg gcgagaccgc cgaggccacc cggcugaagc 240
ggaccgcccg gcggcgguac acccgcgga agaaccggau cugcuaccug caggagaucu 300

ucuccaacga gauggccaag guggacgacu ccuucuucca ccggcuggag gaguccuucc	360
ugguggagga ggacaagaag cacgagcggc accccaucuu cggcaaacuc guggacgagg	420
uggccuacca cgagaaguac cccaccaucu accaccugcg gaagaagcug guggacucca	480
ccgacaaggc cgaccugcgg cugaucuaac uggtcccggc ccacaugauc aaguuccggg	540
gccacuuccu gaucgagggc gaccugaacc ccgacaacuc cgacguggac aagcuguuca	600
uccagcuggu gcagaccuac aaccagcugu ucgaggagaa ccccaucaac gccuccggcg	660
uggagccaa ggccauccug uccgcccggc uguccaaguc ccggcggcug gagaaccuga	720
ucgcccagcu gcccggcgag aagaagaacg gccuguucgg caaccugauc gcccuugccc	780
ugggccugac ccccaacuuc aaguccaacu ucgaccuggc cgaggacgcc aagcugcagc	840
uguccaagga caccuacgac gacgaccugg acaaccugcu ggcccagauc ggcgaccagu	900
acgccgaccu guuccuggcc gccaaagaac uguccgacgc cauccugcug uccgacaucc	960
ugcgggugaa caccgagauc accaaggccc ccuguccgc cuccaugauc aagcgguacg	1020
acgagcacca ccaggaccug acccugcuga aggcccggu gcggcagcag cugcccgaga	1080
aguacaagga gauucuuc gaccaguca agaacggcua cgccggcuac aucgacggcg	1140
gcgccuccca ggaggaguuc uacaaguua ucaagccau ccuggagaag auggacggca	1200
ccgaggagcu gcuggugaag cugaaccggg aggaccugcu gcggaagcag cggaccuucg	1260
acaacggcuc caucacccac cagauccacc uggtcgagcu gcacgccauc cugcggcggc	1320
aggaggacuu cuacccuuc cugaaggaca accgggagaa gaucgagaag auccugaccu	1380
uccggauccc cuacuacgug ggcccccugg cccggggcaa cucccguuc gccuggauga	1440
cccggaguc cgaggagacc aucaccccu ggaacuucga ggagguggug gacaaggcgc	1500
ccuccgccc guccuucac gacgggauga ccaacuucga caagaaccug cccaacgaga	1560
aggugcugcc caagcacucc cugcuguacg aguacuucac cguguacaac gacugacca	1620
aggugaagua cgugaccgag ggcaugcggg agcccgcuu ccuguccggc gacgagaaga	1680
aggccaucgu ggaccugcug uucaagacca accggaaggu gaccgugaag cagcugaagg	1740
aggacuacuu caagaagauc gagugcuucg acuccugga gaucuccggc guggaggacc	1800
gguucaacgc cuccugggc accuaccacg accugcugaa gaucaucaag gacaaggacu	1860
uccuggacaa cgaggagaac gaggacaucc ugaggacau cgugcugacc cugaccugu	1920
ucgaggaccg ggagaugauc gaggagcggc ugaagaccua cgcccaccug uucgacgaca	1980
aggugaugaa gcagcugaag cggcggcggu acaccggcug gggccggcug ucccgaagc	2040

ugaucaacgg cauccgggac aagcaguccg gcaagaccu ccuggacuuc cugaaguccg	2100
acggcuucgc caaccggaac uucaugcagc ugauccacga cgacuccug accuucagg	2160
aggacauca gaaggccag guguccggcc agggcgacuc ccugcacgag cacaucgcca	2220
accuggccgg cuccccgcc aucaagaagg gcauccugca gaccgugaag gugguggacg	2280
agcuggugaa ggugaugggc cggcacaagc ccgagaacau cgugaucgag augggccggg	2340
agaaccagac ccccagaag ggccagaaga acuccggga gcggaugaag cggaucgagg	2400
agggcaucaa ggagcugggc ucccagauc ugaaggagca ccccguggag aacaccagc	2460
ugcagaacga gaagcuguac cuguacuacc ugcagaacgg ccgggacaug uacguggacc	2520
aggagcugga caucaaccgg cuguccgacu acgacgugga ccacaucgug cccaguccu	2580
uccugaagga cgacuccauc gacaacaagg ugcugacccg guccgacaag aaccggggca	2640
aguccgacaa cgugccucc gaggaggugg ugaagaagau gaagaacuac uggcggcagc	2700
ugcugaacgc caagcugauc acccagcggg aguucgacaa ccugaccaag gccgagcggg	2760
gcggccuguc cgagcuggac aaggccggcu ucaucaagcg gcagcuggug gagaccggc	2820
agaucaccaa gcacguggcc cagaucugg acuccggau gaacaccaag uacgacgaga	2880
acgacaagcu gaucggggag gugaagguga ucaccugaa guccaagcug guguccgacu	2940
uccggaagga cuuccaguuc uacaaggugc gggagaucaa caacuaccac cagcccacg	3000
acgccuaccu gaacgccgug gugggcaccg ccugaucaa gaaguacccc aagcuggagu	3060
ccgaguucgu guacggcgac uacaaggugu acgacgugcg gaagaugauc gccaaguccg	3120
agcaggagau cggcaaggcc accccaagu acuuucua cuccaacauc augaacuuc	3180
ucaagaccga gaucaccug gccaacggcg agauccgga gcggccccug aucgagacca	3240
acggcgagac cggcgagauc gugugggaca agggccggga cuucgccacc gugcggaagg	3300
ugcuguccau gccccaggug aacaucguga agaagaccga ggugcagacc ggcggcuuc	3360
ccaaggaguc cauccugccc aagcggacu ccgacaagcu gaucggccgg aagaaggacu	3420
gggaccccaa gaaguacggc ggcucgacu cccccaccgu ggccuacucc gugcuggug	3480
uggccaaggu ggagaagggc aaguccaaga agcugaaguc cgugaaggag cugcugggca	3540
ucaccauau ggagcggucc uccuucgaga agaaccuau cgacuuccug gaggccaagg	3600
gcuacaagga ggugaagaag gaccugauca ucaagcugcc caaguacucc cuguucgagc	3660
uggagaacgg ccggaagcgg augcuggccu ccgccggcga gcugcagaag ggcaacgagc	3720
uggccugcc cuccaaguac gugaacuuc uguaccuggc cuccacuac gagaagcuga	3780
agggcucucc cgaggacaac gagcagaagc agcuguucgu ggagcagcac aagcacuacc	3840
uggacgagau caucgagcag aucuccgagu ucuccaagcg ggugaucug gccgacgcca	3900

accuggacaa ggugcugucc gccuacaaca agcaccggga caagcccauc cgggagcagg 3960

ccgagaacau cauccaccug uucaccuga ccaaccuggg cgcggccg ccuucagu 4020

acuucgacac caccuacgac cggaagcggu acaccuccac caaggaggug cuggacgcca 4080

cccugaucca ccaguccauc accggccugu acgagaccg gaucgaccug ucccagcugg 4140

gcggcgacgg cggcggcucc cccaagaaga agcgggaaggu gugacuagca ccagccucaa 4200

gaacaccgga auggagucuc uaagcuacau aaauaccau uacacuuuac aaaauugu 4260

ccccaaaaa guagccauuc guaucugcuc cuaauaaaaa gaaaguuuc ucacauucuc 4320

ucgagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 4418

<210> 10

<211> 4416

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

mRNA encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 10

gggaagcuca gaauaaacgc ucaacuugg ccggaucugc caccauggac aagaaguaca 60

gcaucggccu ggacaucggc accaacagcg ugggcugggc cgugaucacc gacgaguaca 120

aggugcccag caagaaguuc aaggugcugg gcaacaccga ccggcacagc aucaagaaga 180

accugaucgg cggccugcug uucgacagcg gcgagaccgc cgaggccacc cggcugaagc 240

ggaccgccc ggcggcgguac acccggcgga agaaccggau cugcuaccug caggagauca 300

ucagcaacga gauggccaag guggacgaca gcuucuuca ccggcuggag gagagcuucc 360

ugguggagga ggacaagaag cacgagcggc acccaucuu cggcaacauc guggacgagg 420

uggccuacca cgagaaguac cccaccaucu accaccugcg gaagaagcug guggacagca 480

ccgacaaggc cgaccugcgg cugaucuacc uggcccuggc ccacaugauc aaguuccggg 540

gccacuuccu gaucgagggc gaccugaacc ccgacaacag cgacguggac aagcuguuca 600

uccagcuggu gcagaccuac aaccagcugu ucgaggagaa ccccaucaac gccagcggcg 660

uggacccaa ggccaucug agcgcccggc ugagcaagag ccggcggcug gagaaccuga 720

ucgccagcu gcccggcgag aagaagaacg gccuguucgg caaccugauc gccugagcc 780

ugggcccugac cccaacuuc aagagcaacu ucgaccuggc cgaggacgcc aagcugcagc 840

ugagcaagga caccuacgac gacgaccug acaaccugcu ggcccagauc ggcgaccagu 900

acgccgaccu guuccuggcc gccaaagaacc ugagcgacgc cauccugcug agcgacaucc	960
ugcgggugaa caccgagauc accaaggccc ccugagcgc cagcaugauc aagcgguacg	1020
acgagcacca ccaggaccug acccugcuga agggccuggu gcggcagcag cugcccgaga	1080
aguacaagga gauucuuc gaccagagca agaacggcua cgccggcuac aucgacggcg	1140
gcgccagcca ggaggaguuc uacaaguca ucaagccau ccuggagaag auggacggca	1200
ccgaggagcu gcuggugaag cugaaccggg aggaccugcu gcggaagcag cggaccuucg	1260
acaacggcag caucacccac cagauccacc ugggcgagcu gcacgcauc cugcggcggc	1320
aggaggacuu cuacccuuc cugaaggaca accgggagaa gaucgagaag auccugaccu	1380
uccggauccc cuacuacug ggccccugg cccggggcaa cagccguuc gccuggauga	1440
cccggagag cgaggagacc aucaccccu ggaacuucga ggagguggug gacaagggcg	1500
ccagcgccca gagcuuac gaggcgauga ccaacuucga caagaaccug cccaacgaga	1560
aggugcugcc caagcacagc cugcuguacg aguacuucac cguguacaac gagcugacca	1620
aggugaagua cgugaccgag ggcaugcgga agcccgccuu ccugagcggc gagcagaaga	1680
aggccaucgu ggaccugcug uucaagacca accggaaggu gaccgugaag cagcugaagg	1740
aggacuacuu caagaagauc gagugcuucg acagcgugga gaucagcggc guggaggacc	1800
gguucaacgc cagccugggc accuaccacg accugcugaa gaucaucaag gacaaggacu	1860
uccuggacaa cgaggagaac gaggacaucc uggaggacau cgugcugacc cugaccugcu	1920
ucgaggaccg ggagaugauc gaggagcggc ugaagaccua cgcccaccug uucgacgaca	1980
aggugaugaa gcagcugaag cggcggcggu acaccggcug gggccggcug agccggaagc	2040
ugaucaacgg cauccgggac aagcagagcg gcaagaccu ccuggacuuc cugaagagcg	2100
acggcuucgc caaccggaac uucaugcagc ugauccacga cgacagccug accuuaagg	2160
aggacaacca gaaggcccag gugagcggc agggcgacag ccugcacgag cacaucgcca	2220
accuggccgg cagccccgcc aucaagaagg gcauccugca gaccgugaag gugguggacg	2280
agcuggugaa ggugaugggc cggcacaagc ccgagaacau cgugaucgag augggccggg	2340
agaaccagac caccagaag ggccagaaga acagccggga gcggaugaag cggaucgagg	2400
agggcaucaa ggagcugggc agccagauc ugaaggagca ccccguggag aacaccagc	2460
ugcagaacga gaagcuguac cuguacuacc ugcagaacgg ccgggacaug uacguggacc	2520
aggagcugga caucaaccgg cugagcgacu acgacgugga ccacaucgug ccccagagcu	2580
uccugaagga cgacagcauc gacaacaagg ugcugacccg gagcgacaag aaccggggca	2640
agagcgacaa cgugcccagc gaggaggugg ugaagaagau gaagaacuac uggcggcagc	2700
ugcugaacgc caagcugauc acccagcggga aguucgacaa ccugaccaag gccgagcggg	2760

gcggccugag cgagcuggac aaggccggcu ucaucaagcg gcagcuggug gagacccggc	2820
agaucaccaa gcacugggcc cagaucugg acagccggau gaacaccaag uacgacgaga	2880
acgacaagcu gauccgggag gugaagguga ucaccugaa gagcaagcug gugagcgacu	2940
uccggaagga cuuccaguuc uacaaggugc gggagaucaa caacuaccac cacgcccacg	3000
acgccuaccu gaacgccgug gugggcaccg ccugaucaa gaaguacccc aagcuggaga	3060
gcgaguucgu guacggcgac uacaaggugu acgacgugcg gaagaugauc gccaagagcg	3120
agcaggagau cggcaaggcc accgccaagu acuucuucua cagcaaac aucgaacuuc	3180
ucaagaccga gaucaccug gccaacggcg agauccggaa gcggccccug aucgagacca	3240
acggcgagac cggcgagauc gugugggaca agggccggga cuucgccacc gugcggaagg	3300
ugcugagcau gccccaggug aacaucguga agaagaccga ggugcagacc ggcggcuuca	3360
gcaaggagag cauccugccc aagcggaaca gcgacaagcu gaucgcccgg aagaaggacu	3420
gggaccccaa gaaguacggc ggcuucgaca gccccaccgu ggccuacagc gugcuggugg	3480
uggccaaggu ggagaaggcg aagagcaaga agcugaagag cgugaaggag cugcugggca	3540
ucaccauau ggagcggagc agcuucgaga agaaccacau cgacuuccug gaggccaagg	3600
gcuacaagga ggugaagaag gaccugauca ucaagcugcc caaguacagc cuguucgagc	3660
uggagaacgg ccggaagcgg augcuggcca gcgccggcga gcugcagaag ggcaacgagc	3720
uggcccugcc cagcaaguac gugaacuucc uguaccuggc cagccacuac gagaagcuga	3780
agggcagccc cgaggacaac gagcagaagc agcuguucgu ggagcagcac aagcacuacc	3840
uggacgagau caucgagcag aucagcgagu ucagcaagcg ggugauccug gccgacgcca	3900
accuggacaa ggugcugagc gccuacaaca agcaccggga caagcccauc cgggagcagg	3960
ccgagaacau cauccaccug uucaccuga ccaaccuggg cgcgcccgcc gccuucagu	4020
acuucgacac caccaucgac cggaagcggg acaccagcac caaggaggug cuggacgcca	4080
cccugauca ccagagcauc accggccugu acgagaccg gaucgaccug agccagcugg	4140
gcggcgacgg cggcggcagc cccaagaaga agcgggaaggu gugacuagca ccagccucaa	4200
gaacacccga auggagucuc uaagcuacau aaauaccau uacacuuuac aaaauguugu	4260
ccccaaaaa guagccauuc guaucugcuc cuaauaaaaa gaaaguuuu ucacauucuc	4320
ucgagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	4416

<210> 11

<211> 4420

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

mRNA encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 11

gggaagcuca gaauaaacgc ucaacuugg ccggaucugc caccauggac aagaaguaca	60
gcaucggccu ggacaucggc acgaacagcg uuggcugggc ugugaucacg gacgaguaca	120
agguucccuc aaagaaguuc aaggugcugg gcaacacgga ccggcacagc aucaagaaga	180
aucucaucgg ugcacugcug uucgacagcg gugagacggc cgaagccacg cggcugaagc	240
ggacggcccc ccggcgguac acgcggcgga agaaccggau cugcuaccug caggagaucu	300
ucagcaacga gauggccaag guggacgaca gcuucuucca ccggcuggag gagagcuucc	360
ugguggagga ggacaagaag cagcagcggc accccaucuu cggaacauc guggacgaag	420
ucgccuacca cgagaaguac cccaccaucu accaccugcg gaagaagcug guggacucga	480
cugacaaggc cgaccugcgg cugaucuacc uggcacuggc ccacaugaua aaguuccggg	540
gccacuuccu gaucgagggc gaccugaacc cugacaacag cgacuggac aagcuguuca	600
uccagcuggu gcagaccuac aaccagcugu ucgaggagaa ccccaucaac gccagcggcg	660
uggacgcaa ggccauccuc agcgcccgcc ucagcaagag ccggcggcug gagaauuca	720
ucgcccagcu uccaggugag aagaagaauug ggcuguucgg caaucucauc gcacucagcc	780
ugggcccugac uccaacuuc aagagcaacu ucgaccuggc cgaggacgcc aagcugcagc	840
ucagcaagga caccuacgac gacgaccugg acaaucuccu ggcccagauc ggcgaccagu	900
acgccgaccu guuccugguu gccaagaau ucagcgacgc cauccugcuc agcgacaucc	960
ugcgggugaa cacagagauc acgaaggccc ccucacgcg cagcaugaua aagcgguacg	1020
acgagcacca ccaggaccug acgcugcuga aggcacuggu gcggcagcag cuuccagaga	1080
aguacaagga gaucuucuuc gaccagagca agaauaggua cgccggguac aucgacggug	1140
gugccagcca ggaggaguuc uacaaguua ucaagcccau ccuggagaag auggacggca	1200
cagaggagcu gcuggugaag cugaacaggg aggaccugcu gcggaagcag cggacguucg	1260
acaauaggag caucacccac cagauccacc ugggugagcu gcacgccauc cugcggcggc	1320
aggaggacuu cuaccccuuc cugaaggaca acagggagaa gaucgagaag auccugacgu	1380
uccggauccc cuacuacguu ggccccugc cccgcggcaa cagccgguuc gccuggauga	1440
cgcggaagag cgaggagacg aucacuuccu ggaacuucga ggaagucgug gacaagggug	1500
ccagcgccca gagcuucauc gagcggauga cgaacuucga caagaauuu ccaaagcaga	1560
aggugcuucc aaagcacagc cugcuguacg aguacuucac gguguacaac gagcugacga	1620

aggugaagua cgugacagag ggcaugcgga agccccccuu ccucagcggu gagcagaaga	1680
aggccaucgu ggaccugcug uucaagacga accggaaggu gacggugaag cagcugaagg	1740
aggacuacuu caagaagauc gagugcuucg acagcgugga gaucagcggc guggaggacc	1800
gguucaacgc cagccugggc accuaccacg accugcugaa gaucacuaag gacaaggacu	1860
uccuggacaa cgaggagaac gaggacaucg uggaggacau cgugcugacg cugacgcugu	1920
ucgaggacag ggagauaaua gaggagcggc ugaagaccua cgcccaccug uucgacgaca	1980
aggugaugaa gcagcugaag cggcgcggu acacgggcug gggccggcuc agccggaagc	2040
ugaucaaugg gaucgagac aagcagagcg gcaagacgau ccuggacuuc cugaagagcg	2100
acggcuucgc caaccggaac uucaugcagc ugauccacga cgacagccug acguucaagg	2160
aggacaucca gaaggcccag gucagcggcc agggcgacag ccugcacgag cacaucgcca	2220
aucucgccgg gagccccgc aucaagaagg ggaucugca gacggugaag gugguggacg	2280
agcuggugaa ggugaugggc cggcacaagc cagagaacau cgugaucgag auggccaggg	2340
agaaccagac gacucaaaag gggcagaaga acagcaggga gcggaugaag cggaucgagg	2400
agggcaucaa ggagcugggc agccagaucg ugaaggagca ccccguggag aacacucaac	2460
ugcagaacga gaagcuguac cuguacuacc ugcagaauagg gcgagacaug uacguggacc	2520
aggagcugga caucaaccgg cucagcgacu acgacgugga ccacaucguu ccccagagcu	2580
uccugaagga cgacagcauc gacaacaagg ugcugacgag gagcgacaag aaccggggca	2640
agagcgacaa cguucccuca gaggaagucg ugaagaagau gaagaacuac uggcggcagc	2700
ugcugaacgc caagcugauc acucaacgga aguucgacaa ucucacgaag gccgagcggg	2760
guggccucag cgagcuggac aaggccgggu ucaucaagcg gcagcuggug gagacgcggc	2820
agaucacgaa gcacguggcc cagaucugg acagccggau gaacacgaag uacgacgaga	2880
acgacaagcu gaucaggga gucaagguga ucacgcugaa gagcaagcug gucagcgacu	2940
uccggaagga cuuccaguuc uacaagguga gggagaucaa caacuaccac cagccccacg	3000
acgccuaccu gaacgcugug guuggcacgg cacugaucaa gaaguacccc aagcuggaga	3060
gcgaguucgu guacggcgac uacaaggugu acgacgugcg gaagaugaua gccaagagcg	3120
agcaggagau cggcaaggcc acggccaagu acuuuucua cagcaaacu augaacuucu	3180
ucaagacaga gaucacgug gccaauggug agauccgga gcggccccug aucgagacga	3240
augguagac gggugagauc gugugggaca aggggcgaga cuucgccacg gugcggaagg	3300
ugcucagcau gccccaggug aacaucguga agaagacaga aguccagacg gguggcuuca	3360

gcaaggagag cauccuucca aagcggaaca gcgacaagcu gaucgcccgc aagaaggacu 3420

gggaccccaa gaaguacggu ggcuucgaca gccccaccgu ggccuacagc gugcuggugg 3480

uggccaaggu ggagaagggg aagagcaaga agcugaagag cgugaaggag cugcugggca 3540

ucacgaucau ggagcggagc agcuucgaga agaaccccaau cgacuuccug gaagccaagg 3600

gguaacaagg agucaagaag gaccugauca ucaagcuucc aaaguacagc cuguucgagc 3660

uggagaauagg gcggaagcgg augcuggcca gcgccgguga gcugcagaag gggaacgagc 3720

uggcacuucc cucaaaguac gugaacuucc uguaccuggc cagccacuac gagaagcuga 3780

aggggagccc agaggacaac gagcagaagc agcuguucgu ggagcagcac aagcacuacc 3840

uggacgagau caucgagcag aucagcgagu ucagcaagcg ggugauccug gccgacgcca 3900

aucucgacaa ggugcucagc gccuacaaca agcaccgaga caagcccauc agggagcagg 3960

ccgagaacau cauccaccug uucacgcuga cgaauucgg ugcccccgcu gccuuaagu 4020

acuucgacac gacgaucgac cggaagcggg acacgucgac uaaggaaguc cuggacgcca 4080

cgcuaucca ccagagcauc acgggccugu acgagacgcg gaucgaccuc agccagcugg 4140

guggcgacgg ugguggcagc cccaagaaga agcgggaaggu guagcuagca ccagccucaa 4200

gaacacccga auggagucuc uaagcuacau aaauaccau uacacuuuac aaaauuguu 4260

cccccaaaau guagccauuc guaucugcuc cuaauaaaaa gaaaguuuu ucacauucuc 4320

ucgagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4420

<210> 12

<211> 4429

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

mRNA encoding Sp. Cas9 sequence

<400> 12

gggaagcuca gaauaaacgc ucaacuugg ccggaucugc caccauggac aagaaguaca 60

gcaucggccu cgacaucggc accaacagcg ucggcugggc cgucaucacc gacgaguaca 120

aggucuccag caagaaguuc aagguccug gcaacaccga ccgccacagc aucaagaaga 180

accucaucgg cgccuccuc uucgacagcg gcgagaccgc cgaggccacc cgccucaagc 240

gcaccgccg ccgccguac acccgccga agaaccgau cugcuaccuc caggagaucu 300

ucagcaacga gauggccaag gucgacgaca gcuucuucca ccgccucgag gagagcuucc 360

ucgucgagga ggacaagaag cacgagcgcc accccaucuu cggcaacauc gucgacgagg	420
ucgccuacca cgagaaguac cccaccaucu accaccuccg caagaagcuc gucgacagca	480
ccgacaaggc cgaccuccgc cucaucuacc ucgcccucgc ccacaugauc aaguuccgcg	540
gccacuuccu caucgagggc gaccucaacc ccgacaacag cgacgucgac aagcucuua	600
uccagcucgu ccagaccuac aaccagcucu ucgaggagaa ccccaucaac gccagcggcg	660
ucgacgcaa ggccauccuc agcgcccgc ucagcaagag ccgcccucuc gagaaccuca	720
ucgcccagcu ccccgcgag aagaagaacg gccucuucgg caaccucauc gccucagcc	780
ucggccucac ccccaacuuc aagagcaacu ucgaccucgc cgaggacgcc aagcuccagc	840
ucagcaagga caccuacgac gacgaccucg acaaccuccu cggccagauc ggcgaccagu	900
acgccgaccu cuuccucgcc gccaaagaacc ucagcgacgc cauccuccuc agcgacauc	960
uccgcgucaa caccgagauc accaaggccc ccucagcgc cagcaugauc aagcgcuacg	1020
acgagacca ccaggaccuc acccuccuca agggccucgu ccgccagcag cuccccgaga	1080
aguacaagga gaucuucuuc gaccagagca agaacggcua cgccggcuac aucgacggcg	1140
gcgccagcca ggaggaguuc uacaaguua ucaagccau ccucgagaag auggacggca	1200
ccgaggagcu ccucgucaag cucaaccgcg aggaccuccu ccgcaagcag cgcaccuucg	1260
acaacggcag caucacccac cagauccacc ucggcgagcu ccacgccauc cuccgccgcc	1320
aggaggacuu cuaccccuuc cucaaggaca acccgagaa gaucgagaag auccuaccu	1380
uccgcauccc cuacuacguc ggccccucg cccgcggcaa cagccguuc gccuggauga	1440
cccgcaagag cgaggagacc aucaccccu ggaacuucga ggaggucguc gacaaggcg	1500
ccagcgccca gagcuuacg gagcgcauga ccaacuucga caagaaccuc cccaacgaga	1560
agguccuccc caagcacagc cuccucuacg aguacuucac cgucuacaac gagcucacca	1620
agguaagua cgucaccgag ggcaugcgca agcccgccuu ccucagcggc gagcagaaga	1680
aggccaucgu cgaccuccuc uucaagacca accgcaaggu caccgucaag cagcucaagg	1740
aggacuacuu caagaagauc gagugcuucg acagcgucga gaucagcggc gucgaggacc	1800
gcuucaacgc cagccucggc accuaccacg accuccuaa gaucaucaag gacaaggacu	1860
uccucgaaa cgaggagaac gaggacauc ucgaggacau cguccuacc cucaccucu	1920
ucgaggaccg cgagaugauc gaggagcgcc ucaagaccua cggccaccuc uucgacgaca	1980
agguaugaa gcagcucaag cgccgccgu acaccggcug gggccgccuc agccgcaagc	2040
ucaucaacgg cauccgcgac aagcagagcg gcaagaccu ccucgacuuc cucaagagcg	2100
acggcuucgc caaccgcaac uucaugcagc ucauccacga cgacagccuc accuuaagg	2160

aggacaucca gaaggcccag gucagcggcc agggcgacag ccuccacgag cacaucgcca	2220
accucgccgg cagccccgcc aucaagaagg gcauccucca gaccgucaag gucgucgacg	2280
agcucgucaa ggucaugggc cgccacaagc ccgagaacau cgucaucgag augggcccg	2340
agaaccagac caccagaag gggcagaaga acagccgcca gcgcaugaag cgcaucgagg	2400
agggcaucaa ggagcucggc agccagauc ucaaggagca ccccgucgag aacaccagc	2460
uccagaacga gaagcucuac cucuacuacc uccagaacgg ccgcgacaug uacgucgacc	2520
aggagcucga caucaaccgc cucagcgacu acgacgucga ccacaucguc ccccagagcu	2580
uccucaagga cgacagcauc gacaacaagg uccucacccg cagcgacaag aaccgcgga	2640
agagcgacaa cguccccagc gaggaggucg ucaagaagau gaagaacuac uggcgccagc	2700
uccucaacgc caagcucauc acccagcgca aguucgacaa ccucaccaag gccgagcgcg	2760
gcgccucag cgagcucgac aaggccggcu ucaucaagcg ccagcucguc gagaccgcc	2820
agaucaccaa gcacgucgcc cagaucucg acagccgcau gaacaccaag uacgacgaga	2880
acgacaagcu cauccgcgag gucaaggua ucaccucaaa gagcaagcuc gucagcgacu	2940
uccgcaagga cuuccaguuc uacaagguc gcgagaucaa caacuaccac cacgcccacg	3000
acgccuaccu caacgccguc gucggcaccg ccucaucaa gaaguacccc aagcucgaga	3060
gcgaguucgu cuacggcgac uacaaggucu acgacgucg caagaugauc gccaaagagcg	3120
agcaggagau cggcaaggcc accgccaagu acuucuucua cagcaaacu augaacuucu	3180
ucaagaccga gaucaccuc gccaacggcg agauccgcaa gcgccccuc aucgagacca	3240
acggcgagac cggcgagauc gucugggaca agggccgcca cuucgccacc guccgcaagg	3300
uccucagcau gcccagguc aaucuagca agaagaccga gguccagacc ggcggcuuca	3360
gcaaggagag cauccucucc aagcgcaaca gcgacaagcu caucgcccgc aagaaggacu	3420
gggaccccaa gaaguacggc ggcuucgaca gccccaccgu cgccuacagc guccucgucg	3480
ucgccaaggu cgagaagggc aagagcaaga agcucaagag cgucaaggag cuccucggca	3540
ucaccaucau ggagcgagc agcuucgaga agaaccuccau cgacuuccuc gaggccaagg	3600
gcuacaagga ggucaagaag gaccucauca ucaagcucc caaguacagc cucuucgagc	3660
ucgagaacgg ccgcaagcg augcucgcca gcgccgcca gcuccagaag ggcaacgagc	3720
ucgccccucc cagcaaguac gucaacuucc ucuaccucg cagccacuac gagaagcuca	3780
agggcagccc cgaggacaac gagcagaagc agcucuucgu cgagcagcac aagcacuacc	3840
ucgacgagau caucgagcag aucagcgagu ucagcaagcg cgucauccuc gccgacgcca	3900

accucgacaa gguccucagc gccuacaaca agcaccgcga caagcccauc cgcgagcagg 3960
 ccgagaacau cauccaccuc uucacccuca ccaaccucgg cgccccgcc gccuucagu 4020
 acuucgacac caccaucgac cgcaagcgcu acaccagcac caaggagguc cucgacgcca 4080
 cccucaucca ccagagcauc accggccucu acgagaccg caugaccuc agccagcucg 4140
 gcggcgacgg cggcggcagc cccaagaaga agcgcaaggu cuagcuagca ccagccucaa 4200
 gaacacccga auggagucuc uaagcuacau aaauaccau uacacuuuac aaaauguugu 4260
 cccccaaaau guagccauuc guaucugcuc cuaauaaaaa gaaaguuucu ucacauucuc 4320

ucgagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4429

<210> 13

<211> 1379

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Amino acid sequence for Sp. Cas9 sequence

<400> 13

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

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

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp

370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400
 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415

 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
 450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480

 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525
 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540

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

 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620

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

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

 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
 770 775 780
 Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
 785 790 795 800

 Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 805 810 815
 Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
 820 825 830
 Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
 835 840 845
 Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
 850 855 860

 Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys

865 870 875 880
 Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
 885 890 895
 Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
 900 905 910
 Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
 915 920 925

 Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
 930 935 940
 Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990

 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050

 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile	Ala Arg Lys Lys Asp	Trp Asp Pro
1115	1120	1125
Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp	Ser Pro Thr Val Ala	Tyr Ser Val
1130	1135	1140
Leu Val Val Ala Lys Val Glu	Lys Gly Lys Ser Lys	Lys Leu Lys
1145	1150	1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly	Ile Thr Ile Met Glu	Arg Ser Ser
1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp	Phe Leu Glu Ala Lys	Gly Tyr Lys
1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile	Ile Lys Leu Pro Lys	Tyr Ser Leu
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg	Lys Arg Met Leu Ala	Ser Ala Gly
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu	Leu Ala Leu Pro Ser	Lys Tyr Val
1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser	His Tyr Glu Lys Leu	Lys Gly Ser
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys	Gln Leu Phe Val Glu	Gln His Lys
1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile	Glu Gln Ile Ser Glu	Phe Ser Lys
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala	Asn Leu Asp Lys Val	Leu Ser Ala
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys	Pro Ile Arg Glu Gln	Ala Glu Asn
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu	Thr Asn Leu Gly Ala	Pro Ala Ala
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr	Ile Asp Arg Lys Arg	Tyr Thr Ser
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala	Thr Leu Ile His Gln	Ser Ile Thr

1340 1345 1350

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

1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1370 1375

<210> 14

<211> 1379

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Amino acid sequence Sp. Cas9 nickase sequence

<400> 14

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205

 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270

 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335

 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
 450 455 460

 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525

 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590

 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr

				645				650				655			
Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp
660				665				670							
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe
675				680				685							
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe
690				695				700							
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu
705				710				715				720			
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly
725				730				735							
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly
740				745				750							
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln
755				760				765							
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile
770				775				780							
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro
785				790				795				800			
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu
805				810				815							
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg
820				825				830							
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys
835				840				845							
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg
850				855				860							
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys
865				870				875				880			
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys
885				890				895							

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
 900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
 915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
 930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val

1130	1135	1140
Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys		
1145	1150	1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser		
1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys		
1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu		
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly		
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val		
1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser		
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys		
1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys		
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala		
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn		
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala		
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser		
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr		
1340	1345	1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp		
1355	1360	1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1370

1375

<210> 15

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 15

aaaggcugcu gaugacaccu

20

<210> 16

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 16

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc

60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu

100

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 18

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc

60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 19

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 19

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 20

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 20

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uuggcaccga gucguguc 88

<210> 21

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 21

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uuggcaccca gucggugc 88

<210> 22

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 22

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac aaagggcacc gagucggugc 90

<210> 23

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 23

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac aaagggcacc gagucggugc 90

<210> 24

<211> 89

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 24

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcaccg agucggugc 89

<210> 25

<211> 89

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 25

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcaccg agucggugc 89

<210> 26

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 26

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcaccg agucggugc 88

<210> 27

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 27

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaucaca aggcaccga gucggugc 88

<210> 28

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 28

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaaa auggcaccga gucggugc 88

<210> 29

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 29

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa auggcaccga gucggugc 88

<210> 30

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 30

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc gcgaagcgca aguuaaaaua aggcuaagucc 60

guuaucaaaa uggcaccgag ucggugc 87

<210> 31

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 31

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc gcgaagcgca aguuaaaaua aggcuaagucc 60

guuaucaaaa uggcaccgag ucggugc 87

<210> 32

<211> 80

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 32

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu	80
<210> 33	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 33	
guuuuagagc uaugcuguuu ug	22
<210> 34	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 34	
acacaaaac caguccagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 35	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 35	
acacaaaac caguccagcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 36	
<211> 4143	
<212> RNA	
<213> Unknown	
<220><223> Description of Unknown: ORF encoding Sp. Cas9 sequence	

<400> 36

auggaaaga aguacuaau cgggcuggau aucggaacua auuccguggg uugggcagug	60
aucacggaug aaucacaaagu gccguccaag aaguucaagg uccuggggaa caccgauaga	120
cacagcauca agaaaaau cuacggagcc cugcuguuug acuccggcga aaccgcagaa	180
gcgacccggc ucaaacguac cgcgaggcga cgcuaacccc ggcggaagaa ucgcaucugc	240
uauugcaag agaucuuuuc gaacgaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccaccgc	300
cuggaagaau cuuuccuggu ggaggaggac aagaagcaug aacggcaucc uaucuuugga	360
aacaucuguc acgaaguggc guaccacgaa aaguaccgga ccaucuacca ucugcggaag	420
aaguugguug acucaacuga caaggccgac cucagauuga ucuacuuggc ccucgccau	480
augaucaau uccgcggaca cuuccugauc gaaggcgauc ugaaccuga uaacuccgac	540
guggauaagc uuuucauua acuggugcag accuacaacc aacuguucga agaaaacca	600
aucaaugcua gcggcgucga ugccaaggcc auccuguccg cccggcuguc gaagucgcgg	660
cgccucgaaa accugaucgc acagcugccg ggagagaaaa agaaccgacu uuucggcaac	720
uugaucgcuc ucucacuggg acucacuccc aauuucaagu ccauuuuuga ccuggccgag	780
gacgcgaagc ugcaacucuc aaaggacacc uacgacgacg acuuggacaa uuugcuggca	840
caauuuggcg aucaguacgc ggaucuguuc cuugccgcua agaaccuuuc ggacgcaauc	900
uugcuguccg auauccugcg cgugaacacc gaaaauacca aagcgccgcu uagcgccucg	960
augauuaagc gguacgacga gcauccaccg gaucucacgc ugcuaaagc gcucgugaga	1020
cagcaacugc cugaaaagua caaggagauc uucuuugacc aguccaagaa uggguacgca	1080
ggguacaucg auggaggcgc uagccaggaa gaguucuaua aguucauaa gccaaucug	1140
gaaaagaugg acggaaccga agaacugcug gucaagcuga acaggaggga ucugcuccgg	1200
aaacagagaa ccuugacaa cggauccauu cccaccaga uccaucuggg ugagcugcac	1260
gccaucuugc ggcgccagga ggacuuuuac ccuuccuca aggacaaccg ggaaaagauc	1320
gagaaaauuc ugacguuccg caucccgauu uacgugggcc cacuggcgcg cggcaauucg	1380
cgcuuugcgu ggaugacuag aaaucagag gaaaccaua cuccuuggaa uuucgaggaa	1440
guuguggaua agggagcuuc ggcacaaagc uucaucgaac gaaugacaa cuucgacaag	1500
aaucucccaa acgagaaggu gcuuccuaag cacagccucc uuucgaaau cuucacuguc	1560
uacaacgaac ugacuaaagu gaaauacguu acugaaggaa ugaggaagcc ggccuuucug	1620
uccggagaac agaagaaagc aauugucgau cugcuguuca agaccaaccg caaggugacc	1680
gucaagcagc uuaaagagga cuacuuaag aagaucgagu guuucgacuc aguggaaauc	1740
agcggggugg aggacagauu caacgcuucg cugggaaccu aucaugaucu ccugaagauc	1800

aucaaggaca aggacuuccu ugacaacgag gagaacgagg acauccugga agauaucguc	1860
cugaccuuga cccuuuucga ggaucgag augaucgagg agaggcuuaa gaccuacgcu	1920
caucucuucg acgauaaggu caugaaacaa cucaagcgcc gccgguacac ugguuggggc	1980
cgccucuccc gcaagcugau caacgguaau cgcgauaaac agagcgguaa aacuaucug	2040
gaauuccuca aaucggaugg cuucgcuaau cguaacuua ugcaauugau ccacgacgac	2100
agccugaccu uuaaggagga cauccaaaaa gcacaagugu ccggacaggg agacucacuc	2160
caugaacaca ucgcgaaucu ggccgguucg ccggcgauua agaagggaau ucugcaaacu	2220
gugaaggugg ucgacgagcu ggugaagguc augggacggc acaaaccgga gaauaucgug	2280
auugaaaugg cccgagaaaa ccagacuacc cagaagggcc agaaaaacuc ccgcgaaagg	2340
augaagcgga ucgaagaagg aaucaggag cugggcagcc agauccugaa agagcaccgc	2400
gugaaaaaca cgcagcugca gaacgagaag cucuaccugu acuaauugca aaauggacgg	2460
gacauguacg uggaccaaga gcuggacauc aaucgguugu cugauuacga cugggaccac	2520
aucguuccac aguccuuucu gaaggauac ucgaucgaua acaagguguu gacucgcagc	2580
gacaagaaca gaggggaugc agauaaugug ccaucggagg aggucgugaa gaagaugaag	2640
aaauacuggc ggcagcuccu gaauccgaag cugauuaccc agagaaaguu ugacaauuc	2700
acuaaagccg agcgcgggcg acucucagag cuggauaagg cuggauucau caaacggcag	2760
cuggucgaga cucggcagau uaccaagcac guggcgagcaga ucuuggacuc ccgcaugaac	2820
acuaaaucg acgagaacga uaagcucauc cgggaaguga aggugauuac ccugaaaagc	2880
aaacuugugu cggacuucg gaaggacuuu caguuuuaca aagugagaga aaucacaac	2940
uaccaucagc cgcaugacgc auaccucaac gcuguggucg guaccgccc gaucaaaaag	3000
uaccuuaac uugaauccga guuuguguac ggagacuaca agguucagca cgugaggaag	3060
augauagcca aguccgaaca ggaaaucggg aaagcaacug cgaaaucuu cuuuuacuca	3120
aacauauga acuuuuucaa gacugaaau acgcuggcc auggagaaau caggaagagg	3180
ccacugaucg aaacuaacgg agaaacgggc gaaauugugu gggacaaggg cagggacuuc	3240
gcaacuguuc gcaaagugcu cucuaugccg caagucaaua uugugaagaa aaccgaagug	3300
caaaccggcg gaaauucaa ggaaucauc cuccaaaga gaaauagcga caagcuauu	3360
gcacgcaaga aagacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgauucgcc gacugucga	3420
uacuccgucc ucguggugc caagguggag aagggaaga gcaaaaagcu caaaucguc	3480
aaagagcugc ugaggauuac caucauggaa cgauccucgu ucgagaagaa cccgauugau	3540

uuccucgagg cgaaggguaa caaggaggug aagaaggau cgaucacaa acuccccaag 3600
uacucacugu ucgaacugga aaugggucgg aagcgcaugc ugguucggc cggagaacuc 3660
caaaaaggaa augagcuggc cuugccuagc aaguacguca acucccuaa ucuugcuucg 3720
cacuacgaaa aacucuaagg gucacgggaa gaaacgaac agaagcagcu uuucguggag 3780
cagcacaagc auuauugga ugaaauauc gaacaaaacu ccgaguuuuc aaagcgcgug 3840
auccucgccg acgccaaccu cgacaaaguc cugucggccu acauaagca uagagauaag 3900
ccgaucagag aacaggccga gaacauuau cacuuguuca ccugacuaa ccugggagcc 3960

ccagccgccu ucaaguacuu cgauacuacu aucgaucga aaagauacac guccaccaag 4020
gaaguucugg acgcgacccu gaucaccaa agcaucacug gacucacga aacuaggau 4080
gaucugucgc agcugggugg cgauggcggu ggaucuccga aaaagaagag aaagguguaa 4140
uga 4143

<210> 37

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 37

gccgcrcca ugg 13

<210> 38

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 38

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 39

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 39

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 40

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 40

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 41

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 41

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 42

<211> 91

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 42

acacaaauc caguccagcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac aaagggcacc gagucggugc u 91

<210> 43

<211> 88

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 43

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uggcaccga gucggugc 88

<210> 44

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 44

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uggcaccga gucggugc 88

<210> 45

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 45

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac aaagggcacc gagucggugc 90

<210> 46

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 46

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc 90

<210> 47

<211> 89

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 47

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcacgc agucggugc 89

<210> 48

<211> 89

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 48

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcacgc agucggugc 89

<210> 49

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 49

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aauggcacgc agucggugc 88

<210> 50

<211> 88

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 50

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa aggcaccga gucggugc 88

<210> 51

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 51

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa auggcaccga gucggugc 88

<210> 52

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 52

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaaa auggcaccga gucggugc 88

<210> 53

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 53

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc gcgaagcgca aguuaaaaua aggcuaagucc 60

guuaucaaaa uggcaccgag ucggugc 87

<210> 54

<211> 87

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 54

aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc gcgaagcgca aguuaaaaua aggcuaagucc 60

guuaucaaaa uggcaccgag ucggugc 87

<210> 55

<211> 91

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 55

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc u 91

<210> 56

<211> 99

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(19)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 56

nnnnnnnnnn nnnnnnnnng uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc 60

guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu 99

<210> 57

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 57

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 58

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 58

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 100

<210> 59

<211> 39

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

TTR gene sequence

<400> 59

agacacaaat accagtccag cgaggcagag raggagcag 39

<210> 60

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 60

agacacaaat accagtccaa gcgaggcaga graggagcag 40

<210> 61

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 61

agacacaaat accagtccan gcgaggcaga graggagcag 40

<210> 62

<211> 79

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 62

uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc guuaucacu ugaaaaagug 60

gcaccgaguc ggugcuuuu 79