



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월26일

(11) 등록번호 10-2081962

(24) 등록일자 2020년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0121312

(22) 출원일자 2018년10월11일

심사청구일자 2018년10월11일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150101476 A*

Urocitellus parryii amyloid beta precursor protein (App), transcript variant X6, mRNA
NCBI no: XM_026396151.1 (2018. 09. 11)*

Young-Pearse et al., The Journal of Neuroscience, 2007, Vol.27, no.52, p.14459-14469 (2007.12.26.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김연수

대전광역시 유성구 계룡로52번길 11, 1111호(봉명동, 유성세움펠리피아 주상복합아파트)

강문경

대전광역시 유성구 가정로 65, 106동 604호(신성동, 대림두레아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 5 항

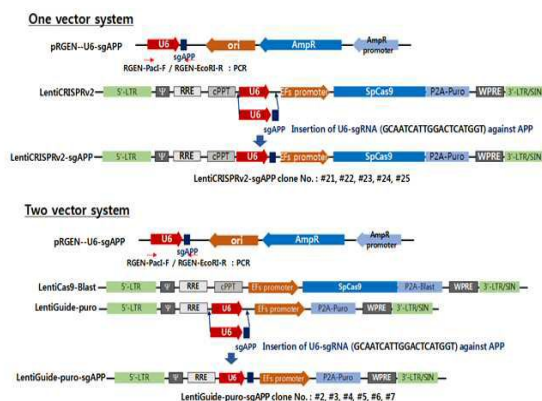
심사관 : 이근혜

(54) 발명의 명칭 아밀로이드 전구 단백질 유전자를 절단하기 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA인 아밀로이드 전구 단백질 유전자를 절단하기 위한 조성물, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 유효성분으로 포함하는 유전자 치료제 및 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA에 관한 것이다. 본 발명의 표적 DNA를 절단용 조성물을 이용하면 알려진 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이에 유전자를 타겟으로 하여 상기 유전자만의 절단이 가능하므로, 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이에 기반한 알츠하이머 치매 환자에게 적용할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 약학적 조성물 및 유전자 치료제로 활용할 수 있는 효과가 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)
C07K 14/4711 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2320/00 (2013.01)
C12N 2740/15041 (2013.01)

김수진

대전광역시 유성구 노은동로75번길 93, 202호 (노은동)

(72) 발명자

박미정

경상남도 김해시 진영읍 하계로 110

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3A9B6073507

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발

연구과제명 염색체 비삽입성 렌티바이러스 벡터기반 생체 내 게놈편집 활용기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.12.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열인 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 이루어지는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA; 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas9 단백질을 포함하는, 진핵세포 또는 유기체(Organism)에서 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열을 절단하기 위한 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)인, 진핵세포 또는 유기체(Organism)에서 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열을 절단하기 위한 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 엑스 비보 (ex vivo) 또는 인 비보(in vivo)에서 진핵 세포 또는 유기체의 표적 DNA를 절단하기 위한 것인, 진핵세포 또는 유기체(Organism)에서 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열을 절단하기 위한 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 진핵 세포 또는 유기체에서 표적 DNA의 발현을 억제하기 위한 것인, 진핵세포 또는 유기체(Organism)에서 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열을 절단하기 위한 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

서열번호 1로 이루어지는, 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 표적 DNA 절단용 가이드 RNA.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA인 아밀로이드 전구 단백질 유전자를 절단하기 위한 조성물, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 포함하는 유전자 치료제 및 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 게놈 시퀀싱(sequencing) 기술 및 분석 방법의 최근의 진전에 의해, 다양한 생물학적 기능 및 질병(disease)과 관련된 유전적 요인을 분류하고 발견하는 능력이 상당히 촉진되었다. 개별 유전 요소의 선택적 변동을 가능하게 함으로써 원인이 되는 유전 변이의 체계적인 역의 조작을 가능하게 할 뿐 아니라, 합성 생물학, 생명공학 및 의학 응용을 진전시키기 위하여, 정밀한 게놈 표적화 기술이 필요하다. 게놈-편집 기술, 예를 들어, 디자인어 징크 핑거, 전사 활성화제-유사 이펙터(effector)(TALE) 또는 메가뉴클레아제(meganuclease)가 표적화된 게놈 변동을 생성하는데 이용 가능하지만, 가격이 알맞고, 설립하기 용이하며, 확대 가능하고, 진핵 게놈 내의 다수의 위치를 표적화하는데 부합되는 새로운 게놈 조작 기술이 필요하다.
- [0004] CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 시스템은 대부분 바이러스 같은 외부 침입자에 대한 저항성을 제공하는 원핵 생물, 고세균의 면역 시스템으로서, 보통 타입 I, 타입 II, 타입 III 등으로 분류된다.
- [0005] 이 중 가장 잘 알려진 타입 II CRISPR 시스템을 예로 들면, CRISPR RNA(crRNA)와 transactivating crRNA(tracrRNA)로 이루어진 RNA 복합체에 CRISPR 효소가 결합한 CRISPR-Cas9 복합체가 타겟서열(CRISPR 복합체 결합 서열을 의미한다)을 인식하고, 특정 위치를 절단한다. 이러한 CRISPR-Cas9 복합체는 PAM 이라 불리는 특정 서열 앞의 20 bp 정도의 타겟서열을 인식하고 이러한 타겟서열 내부 혹은 인근 서열을 절단하는 것으로 알려져 있다. 또한, crRNA와 tracrRNA를 하나의 형태로 만든 sgRNA(single guide RNA) 역시 crRNA와 tracrRNA의 복합체와 동일한 역할을 하는 것으로 밝혀져, sgRNA와 CRISPR/Cas9 효소의 복합체가 타겟서열을 절단할 수 있음에 대해서도 잘 알려져 있다.
- [0006] 한편, 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)의 돌연변이는 알츠하이머성 치매의 유발 원인 중 하나로 알려져 있다. 현재까지 아밀로이드 전구 단백질 유전자의 돌연변이 종류에 관계없이 모든 알츠하이머 유발 돌연변이 APP 유전자를 타겟으로 절단 및 수선할 수 있는 CRISPR/Cas9 벡터 시스템에 대하여는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 현재까지 알려진 모든 종류의 APP 돌연변이를 기반으로 한 알츠하이머 치매 환자에 적용할 수 있는 표적 DNA 시퀀스를 찾아내고, 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 가지는 가이드 RNA를 찾아냄으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 본 발명의 목적은 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA인 아밀로이드 전구 단백질 유전자를 절단하기 위한 조성물, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 포함하는 유전자 치료제 및 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA; 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas9 단백질을 포함하는 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA를 절단하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 포함하는 유전자 치료제를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 표적 DNA를 절단용 조성물을 이용하면 알려진 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이 유전자를 타겟으로 하여 상기 유전자만의 절단이 가능하므로, 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이에 기반한 알츠하이머 치매 환자에게 적용할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 약학적 조성물 및 유전자 치료제로 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 26명의 병원성 알츠하이머 환자의 APP 유전자 돌연변이를 나타낸 도이다.
 도 2는 26명의 병원성 알츠하이머 환자의 APP 유전자 돌연변이를 종합하여 하나의 유전자 염기서열에 나타낸 도이다.
 도 3은 아밀로이드 전구 단백질 유전자를 타겟으로 할 수 있는 가이드 RNA 후보군의 RNA 미스매치 실험 수행 결과를 나타낸 도이다.
 도 4는 ex17_RG7 sgRNA 시퀀스의 미스매치 sensitive nuclease assay를 수행한 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 가이드 RNA인 ex17_RG7 서열의 APP 내 위치를 나타낸 도이다.
 도 6은 sgRNA를 포함하는 RGEN 시스템 도입 벡터(APP-RGEN)의 구축방법을 모식화한 도이다.
 도 7은 sgRNA ex17_RG7를 도입한 CRISPR/Cas9 시스템의 유효성을 확인하는 One vector system 실험 수행 결과를 나타낸 도이다.
 도 8은 sgRNA ex17_RG7를 도입한 CRISPR/Cas9 시스템의 유효성을 확인하는 Two vector system 실험 수행 결과를 나타낸 도이다.
 도 9는 sgRNA ex17_RG7를 도입한 CRISPR/Cas9 시스템을 통한 APP 발현 억제 현상을 확인하기 위한 실험 수행 결과를 나타낸 도이다.
 도 10은 sgRNA ex17_RG7를 도입한 삽입형 APP-RGEN 렌티바이러스 벡터가 효율적으로 작동하는지를 293T 세포(도 10a) 및 U87MG 세포(도 10b)에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 11은 sgRNA ex17_RG7를 도입한 비삽입형 APP-RGEN 렌티바이러스 벡터가 효율적으로 작동하는지를 293T 세포에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 12는 sgRNA ex17_RG7를 도입한 비삽입형 렌티바이러스 벡터에 의하여 확인되는 Indel 스펙트럼 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA; 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas9 단백질을 포함하는 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA를 절단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 돌연변이 종류에 관계없이 모든 알츠하이머 유발 돌연변이 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP) 유전자를 표적 DNA로 하고, 이에 특이적인 가이드 RNA를 이용한 CRISPR-Cas9 시스템으로 타겟 유전자를 절단하거나 수선하는 것을 목적으로 한다. 특히 본 발명의 표적 DNA를 절단용 조성물을 이용하면 알려진 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이 유전자에 있어서 이를 타겟으로 하여 절단이 가능하므로, 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이에 기반한 알츠하이머 치매 환자에게 적용할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 약학적 조성물 및 유전자 치료제로 활용할 수 있다.

- [0023] 상기의 RNA 유전자 가위(RNA-guided CRISPR)(clustered regularly interspaced short palindrome repeats)-연관된 뉴클레아제 Cas9는 표적 유전자의 턱-아웃, 전사 활성화 및 single guide RNA(sgRNA)(즉, crRNA-tracrRNA 융합 전사체)를 이용한 억제에 대한 획기적인 기술을 제공하며, 이 기술은 수많은 유전자 위치를 타겟팅하는 것으로 알려져 있다.
- [0024] Cas9 단백질은 CRISPR/Cas9 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미하고, 상기 Cas9 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터(national center for biotechnology information, NCBI)의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas9 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관 유전자는 약 40 개 이상의 서로 다른 Cas9 단백질 패밀리가 존재하는 것으로 알려져 있으며, Cas9 유전자 및 반복 구조(repeat structure)의 특정 조합에 따라 8개의 CRISPR 하위 유형(E.coli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Aperi, 및 Mtube)을 정의할 수 있다. 따라서 상기 각 CRISPR 하위 유형이 반복단위를 이루어 폴리리보뉴클레오티드-단백질 복합체를 형성할 수 있다. 일 구체예에서 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* genus)으로부터 유래된 것일 수 있고, 상기 스트렙토코커스 속은 스트렙토코커스 피오젠스(*Streptococcus pyogenes*)일 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 표적 DNA는 아밀로이드 전구 단백질을 암호화 하는 DNA일 수 있으며, 또한 상기 표적 DNA는 아밀로이드 전구 단백질 유전자 내 엑손 16 및 17 사이에 위치한 염기서열일 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서, 용도 "절단"은 뉴클레오티드 분자의 공유결합 백본의 파손(breakage)을 의미한다.
- [0027] 또한 상기 표적 DNA에 특이적인 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)일 수 있으며, 상기 가이드 RNA는 표적 DNA 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA를 절단하기 위한 조성물은 엑스 비보(ex vivo) 또는 인 비보(in vivo)에서 진핵 세포 또는 유기체의 표적 DNA를 절단하기 위해 사용될 수 있으며, 또한 상기 조성물은 표적 DNA를 절단함으로써 진핵 세포 또는 유기체에서 표적 DNA의 발현을 억제할 수 있다. 본 발명의 조성물은 실험을 위한 시약 조성물 용도일 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물로 치료 및 예방이 가능한 질환인 알츠하이머는 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌 질환으로 서서히 발병하여 기억력을 포함한 인지기능의 악화가 점진적으로 진행되는 질환을 말한다. 특히 본 발명의 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA를 절단하기 위한 조성물을 약학적 조성물에 유효성분으로 포함하면 알려진 모든 종류의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이 유전자의 절단 및 수선이 가능한바, APP 돌연변이로 인해 발생하는 알츠하이머 질환을 효율적으로 치료할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 진핵세포 또는 유기체에서 표적 DNA를 절단하기 위한 조성물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체 즉 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및/또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 또는 흡입제로 제제화하는 것이 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로서 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 본 발명의 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명에 의한 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로는 0.0001 ~ 1000 mg/일, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있다.

- [0034] 본 발명에서 '개체'란 암의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0036] 또한 본 발명은 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 포함하는 유전자 치료제를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 표적 DNA에 특이적인 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질을 암호화하는 핵산을 유전자 치료제에 포함시키면 투여된 개체의 아밀로이드 전구 단백질 돌연변이 유전자의 절단 및 수선이 가능한바, APP 돌연변이로 인해 발생하는 알츠하이머 질환을 효율적으로 치료할 수 있다.
- [0038] 상기 유전자 치료제는 인간 등의 포유동물에 적절한 경로로서, 예를 들면, 주사, 경폐, 경비, 경구, 직장투여의 형태로 적용될 수 있다. 바람직하게는 주사투여 형태로서 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막, 뇌혈관 등에 투여될 수 있으며 필요에 따라 특정 조직 장기 및 암 조직에 직접 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 치료제의 투여량은 1일 1mg/kg ~ 10 mg/kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 치료기간, 및 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 가이드 RNA를 제공한다.
- [0042] 상기 가이드 RNA는 표적 DNA에 특이적인 RNA로, 세포 내로 전달된 선형 이중가닥 DNA의 전사를 통해 발현되어 표적 유전자를 인식하고 Cas9 단백질과 복합체를 형성할 수 있고 Cas9 단백질을 표적 DNA에 가져오는 RNA를 말한다. 따라서, 상기 가이드 RNA는 표적 DNA를 인식할 수 있는 스페이서; 및 표적과 무관한 불변 서열(non-variable sequence)로 이루어진 가이드 RNA 스캐폴드를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] **실시예 1. sgRNA 설계 및 합성**
- [0048] **1.1 sgRNA의 표적 DNA의 선정**
- [0049] A β 는 정상적인 대사과정의 결과로 체내 모든 세포들로부터 생성되는 물질이나, 신경계는 A β 에 의해 유해한 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특히, APP(amyloid beta precursor protein)는 β 및 γ -secretase에 의해 잘려져 A β 축적을 증가시키고 플라그(plaque)를 형성하여 알츠하이머를 유발하므로, 신경세포에 A β 발현 및 축적을 억제한다면 플라그 형성을 방해하여 알츠하이머의 진행을 방지할 수 있을 것인바, 유전자 가위 CRISPR/Cas9 시스템의 하나인 RGEN을 사용하여 APP 유전자를 표적 DNA로 하고 이에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 RNA를 설계하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0050] 알츠하이머 환자 44명의 APP 유전자(<http://www.alzforum.org>)를 분석하였으며, 이중 병원성을 보인 26명 환자의 APP 유전자 돌연변이를 조사하였고, 그 단백질의 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다. 또한, 병원성을 나타내는 26명 환자의 돌연변이를 하나의 유전자 염기서열로 표시하고 이를 도 2에 나타내었다. 서열 중 검은색으로 표시한 서열은 APP 유전자 및 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이며, 이중 파란색으로 표시한 서열은 A β 를 암호화하는 염기서열 및 A β 단백질 아미노산 서열을 나타낸 것이며, 붉은색으로 표시한 서열은 26명의 알츠하이머 환자의 돌연변이 중 병원성을 나타낼 수 있는 돌연변이를 표시한 것이다.
- [0051] 도 1 및 도 2을 통하여 병원성을 보인 26명 환자의 APP 내에 있는 A β 서열을 포함하여 그 주변 단백질의 돌연변이를 확인하였다. 상기 26명 환자의 A β 서열을 모두 커버할 수 있도록 공통된 타겟 DNA 서열을 디자인하고 이에 특이적으로 결합하는 guide RNA를 제작하여 RGEN 시스템에 도입한다면 효과적으로 APP의 발현을 억제시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0053] **1.2 sgRNA 설계**

- [0054] APP 내 A β 서열에 특이적인 가이드 RNA 서열을 설계하기 위한 실험방법 및 내용은 다음과 같다. APP 내 A β 서열을 <https://asia.ensembl.org/index.html>에서 분석한 결과 A β 서열이 엑손 16과 17에 걸쳐 존재함을 알 수 있었다. 따라서 인트론이 존재하지 않도록 엑손 16과 17에서 guide RNA 후보군을 탐색하였고 각각 4개씩 모두 8개의 guide RNA를 선별할 수 있었다. 이와 같은 선별을 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0055] 도 3에 나타난 바와 같이, 엑손 16에서 얻은 4개의 후보군은 알츠하이머 환자 중 병원성을 보인 26명 환자의 APP 유전자 돌연변이를 조사하였을 때, 돌연변이가 다수 일어난 부위이므로 이를 배제 하였고, 26명의 알츠하이머 환자의 A β 서열을 모두 커버할 수 있는 공통된 타겟 염기서열로서 돌연변이가 일어나지 않은 부위는 설계한 RGEN 타겟 시퀀스 중 ex17_RG6 및 ex17_RG7임을 확인하였다. 엑손 17에서 얻은 4개의 후보 가이드 RNA만을 선택 하여 T7E1 assay를 수행하여 “gene editing(유전자편집)” 능력을 확인하였다. T7E1(T7 endonuclease 1)은 특정 유전자를 PCR 했을 때 돌연변이가 일어난 부위를 잘라주는 기능을 갖고 있다. 실험 방법은 다음과 같다. ex17_RG7를 sgRNA 시퀀스로 하고 1 μ g의 dRGEN 및 Cas9 발현 플라스미드를 HEK293 세포에 리포펙타민 (Lipofectamine 2000)과 함께 24시간 동안 처리하여 mismatch sensitive nuclease assay를 수행하였고, 그 실험 수행 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0056] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이 엑손 17에 대한 4개의 가이드 RNA 후보군 모두 유전자 편집을 할 수 있었다. 타겟 가이드 RNA 염기서열의 mismatch(mismatching) 빈도수가 ex17-RG3, 5, 6, 7 중 ex17-RG7이 가장 낮았으므로 ex17-RG7을 선택하여 바이러스 벡터에 도입하고자 선별하였다. mismatch 빈도수가 높다는 것은 염색체 내에 유사한 염기서열을 표적하는 가능성이 높다는 것을 의미하므로, 선별된 타겟 가이드 RNA를 사용할 경우 “off-target “ 발생율이 낮을 것으로 기대되었다.
- [0057] 상기 ex17_RG7 서열의 APP 내 위치를 도 5에 나타내었다. 도 5의 서열 중 검은색으로 표시한 서열은 APP 유전자 서열을 나타낸 것이며, 이중 파란색으로 표시한 서열은 A β 를 암호화하는 염기서열을 나타낸 것이며, 붉은색으로 표시한 서열은 26명의 알츠하이머 환자의 돌연변이 중 병원성을 나타낼 수 있는 돌연변이를 표시한 것이고, 녹색으로 표시한 서열은 최종적으로 선별된 guide RNA를 암호화하는 염기서열을 나타낸 것이다.
- [0059] **실시예 2. 선별한 sgRNA의 APP에 대한 발현 억제 확인**
- [0060] 최종적으로 선별한 sgRNA ex17_RG7을 CRISPR/Cas9 시스템에 도입하는 경우, 표적 DNA의 유전자를 효율적으로 knock out 시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 과발현 수준에서 sgRNA ex17_RG7를 도입한 CRISPR/Cas9 시스템의 유효성을 확인하는 실험을 수행하였다. 상기 ex17-RG7이 탑재되어있는 U6 벡터를 주형으로 U6-sgRNA ex17_RG7(sgAPP)가 증폭되도록 다음의 프라이머를 제작하였고 PCR에 적용하였다: RGEN-PacI-F : 5'-tggTTAATTAActcgagcggccgcccccttcacc-3', RGEN-EcoRI-R : 5'-CGGAATTCcgcgatatctggcccgtaga-3'. 이후 얻어진 U6 promoter-sgAPP 산물을 정제하여 PacI-EcoRI으로 자른 뒤, Cas9 one vector와 two vector system의 cPPT와 EF1a 프로모터 사이에 클로닝하여 RGEN 시스템을 구축하였다. sgRNA를 포함하는 RGEN 시스템에 도입한 벡터 (APP-RGEN)의 구축방법은 도 6에 모식화하여 나타내었다.
- [0061] 각각 One vector system인 LentiCRISPR-APP-RGEN과 two vector system인 Lenti-Guidepuro-APP-RGEN 벡터를 과 발현 벡터인 pCB6-APP와함께 293T 세포에 공동 형질도입하였고, 2일 후 세포를 수확하여 rabbit polyclonal anti-APP 항체(sigma, A8717)를 이용한 웨스턴 블롯으로 APP 발현을 확인하였다. 또한 pCB6-APP는 Myc가 tagging 되어있으므로 각각 APP항체와 Myc 항체로 단백질 발현을 확인할 수 있는바, mouse monoclonal anti-Myc 항체(Santacruz, SC-40)을 처리하여 APP 발현을 확인하였다. 웨스턴 블롯은 200 μ l의 2X SDS 로딩 버퍼로 형질도입된 세포를 lysis 시킨 후, 40 μ l를 로딩하여 9% SDS-PAGE를 이용하여 수행하였다. 상기 One vector system 확인 결과를 도 7에, Two vector system 확인 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0062] 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯 결과 A β 에 대한 guide RNA가 없는 대조군에 비해 guide RNA가 포함된 벡터가 도입된 세포에서 APP 단백질 발현이 현저하게 저해가 된 것을 확인하였다. 또한 Myc 항체의 경우 과발현 벡터에서 발현하는 APP만 인지할 수 있으므로, sgRNA ex17_RG7를 도입한 CRISPR/Cas9 시스템을 통하여 발생하는 내인성(endogenous) APP knockout 및 in-frame-indel 형태의 단백질은 검출할 수 없었다. 반면 APP 항체의 경우 APP에 대한 결합력이 매우 높으므로 대조군에 비해 실험군에서 in-frame-indel이 일어난 APP 단백질을 검출할 수 있었다. 이에, APP 내 A β 서열에 특이적인 sgRNA가 도입되는 경우에는 효율적으로 APP의 발현의 저해가 일어날 수 있는 것을 확인하여, sgRNA ex17_RG7를 도입하면 APP 내 A β 서열의 유전자를 효율적으로 편집할 수 있음을 확인하였다.
- [0064] **실시예 3. 선별한 sgRNA의 genomic DNA 수준에서의 Indel 발생 확인**

[0065] 상기 실시예 2에서 APP 발현 억제 현상을 지노믹 DNA 수준에서 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN 도입 벡터에 삽입형 바이러스를 합성한 후, 293T와 U87MG 세포에 4일 동안 처리하여 형질전환시켰다. 이후 각각 웨스턴 블롯과 지노믹 DNA PCR을 수행하였으며 단백질 및 유전자 수준에서 내인성 APP의 발현을 확인하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0066] 도 9에 나타낸 바와 같이, 293T와 U87MG 세포에서 APP 단백질 발현이 감소하였고, 지노믹 DNA PCR에서도 APP PCR 산물의 수준이 감소하였음을 확인하였다. 이후, 도 9에 구축한 293T(LentiCRISPR-sgAPP)와 U87MG(LentiCRISPR-sgAPP)에서 얻은 지노믹 DNA PCR 산물을 분석을 위하여 4개의 분획으로 나누었다.

[0068] 실시예 4. 삽입형 렌티바이러스 벡터(APP-RGEN)에 의한 세포 내 Indel 확인

[0069] sgRNA ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN에 도입할 수 있는 벡터로 삽입형 APP-RGEN 렌티바이러스 벡터를 선택한 경우에 유전자 편집이 가능한지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 실시예 3에서 구축한 293T(LentiCRISPR-sgAPP)와 U87MG(LentiCRISPR-sgAPP)에서 얻은 지노믹 DNA PCR 산물을 각각 T vector에 클로닝 하였고, 293T 세포에서 확인한 약 30개의 염기서열을 분석한 결과를 도 10a 및 표 1에 나타내었고, U87MG 세포에서 확인한 약 30개의 염기서열을 분석한 결과를 도 10b 및 표 2에 나타내었다. 표 1 및 2에서 빨간색으로 표시한 서열은 타겟 시퀀스를 나타내고, 파란색으로 표시한 서열은 삽입된 서열을, 녹색으로 표시한 서열은 치환된 서열, 회색으로 표시한 서열은 삭제된 서열을 나타낸다.

[0070] [표 1]

293T/LentiCRISPRsgAPP 감염 후 분석	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG (sgAPP sequence)	# of indel/ # of total
9, 11, 12, 14, 20, 23, 25, 30, 36, 39, 40	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	11/31
10	GCAATCATTGGACTCAAGGTGGG	1/31
13	GCAATCATTGGACTCATAGGTGGG	1/31
15 (9 bp deletion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
16, 26	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	2/31
17	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
18	GCAATCATTGGACTCAAGGTGGG	1/31
19	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
21 (18 bp deletion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
22, 27	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	2/31
24	GCAATCATTGGACTCAATCATTGGTGGG	1/31
28	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
29	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
31	GCAATCATTGGACTCAATGGTGGG	1/31
32	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
33	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG (이후로 73 bp deletion)	1/31
35	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
37	gaagatgtgggttaacaaGCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31
38	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/31

[0071]

[0072] [표 2]

U87MG/LentiCRISPRsgAPP 감염 후 분석	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG (sgAPP sequence)	
51, 53, 54, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 68, 73, 80	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	13/32
49	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
50	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
52(60 bp deletion)	AAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTGTGTCATAACGACAGTGATCGTCATC	1/32
55 (sgAPP 사이트로 72 bp insertion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGAAACGAATGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAATTCCTGTACCTGGCCA GCCACTATGAGAAGCTGAAGGGGTGGG	1/32
56	GCAATCAT TGGACTCATGGTGGG	1/32
59	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
65	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
66	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
67 (24 bp deletion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
69	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
70 (6 bp deletion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
71	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
72 (31 bp deletion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
74 (43 bp deletion)	ggttaacaaagagGCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
75 (3 bp deletion in-frame)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
76	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
77	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
78	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	1/32
79	GCAATCATTGGTGTAGCACTCTGGACTCTGAATCCAGCGATCCGAGTACTGCTAGAGATTTCCACACTG ACTAAAAGGCTGTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACAC	1/32

[0073]

[0074] 도 10a, B 및 표 1, 표 2에 나타낸 바와 같이, 293T 와 U87MG 세포 sgRNA ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN에 의한

여 타겟 시퀀스 내 Indel이 발생했음을 확인하였다. 이중 293T 경우 2가지, U87MG은 4가지 형태의 in-frame Indel이 발생하였음을 알 수 있었고, 이는 도 7 및 도 8에서 APP-RGEN 시스템을 도입시킨 일부 세포에서 APP 단백질이 검출되는 현상을 설명할 수 있었다. 결과적으로, sgRNA ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN를 삽입형 렌티바이러스 벡터에 도입한 경우, 효율적으로 표적 DNA의 indel을 유도하는 것을 확인하였다.

[0076] 실시예 5. 비삽입형 렌티바이러스 벡터(APP-RGEN)에 의한 세포 내 Indel 확인

[0077] 상기 실시예 3에서 sgRNA ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN 시스템이 삽입형 렌티바이러스 벡터에서 효율적으로 작동함을 확인하였으므로 insertional mutagenesis의 위험을 줄일 수 있는 비삽입형 바이러스 벡터에서도 효율적으로 작동할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. sgRNA ex17_RG7를 도입한 APP-RGEN 시스템을 비삽입형 바이러스 벡터에 포함시켜 벡터를 합성한 후, 60 mm 디쉬에서 배양 중인 293T와 U87MG 세포에 상기 비삽입형 렌티바이러스를 농도별(0.1, 1, 2ml)로 처리하여 형질전환시키고 표적 DNA에 대한 유전자 편집이 일어나는지 확인하였다. 형질전환 시킨 4일 후, 지노믹 DNA를 분리하여 Aβ가 포함된 APP를 증폭 하였고, T vector에 클로닝하여 유전자 분석으로 Indel을 확인하였다. 이때 비삽입형 바이러스의 U87MG 감염율이 293T에 비해 낮았으므로 293T를 대상으로 실험을 진행하였고, 그 결과를 도 11, 도 12 및 표 3에 나타내었다.

[표 3]

293T에 LentiCRISPRsgAPP 감염 후 분석(Non-integrating)	sgAPP sequence	Clone number	
60 mm dish에 2 ml 감염 (감염 후 APP PCR 하역pGEMT 벡터에 클로닝 : 1-40 개 DNA prep 하였으나 1, 2, 5, 13, 16, 22, 26은 false 옴)	1 (wild type sequence, no change)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	21/33
	2 (deletion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	6
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	9
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	10
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	23, 30
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	27, 40
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	32, 34
	3 (insertion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	37
	4 (substitution)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	36
	% of total Indel		33.3 %
60 mm dish에 1 ml 감염 (감염 후 APP PCR 하역pGEMT 벡터에 클로닝 : 41-80 개 DNA prep 하였으나 44, 45는 false 옴)	1 (wild type sequence, no change)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	28/38
	2 (deletion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	42, 54, 72
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	56
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	75
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	80
	3 (insertion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	47, 71
		GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	73
	4 (substitution)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	68
	% of total Indel		23.6 %
60 mm dish에 0.1 ml 감염 (감염 후 APP PCR 하역pGEMT 벡터에 클로닝 : 81-120 개 DNA prep 하였으나 96, 104는 false 옴)	1 (wild type sequence, no change)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	37/38
	2 (deletion)	GCAATCATTGGACTCATGGTGGG	101
	% of total Indel		2.63 %

[0079]

[0081] 도 11, 도 12 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 유전자염기 서열 분석 결과 sgRNA ex17_RG7를 도입한 비삽입형 렌티바이러스 벡터에 의하여 Indel이 발생한 것을 확인하였다. 처리한 sgRNA ex17_RG7를 도입한 비삽입형 렌티바이러스 벡터의 농도가 높아질수록 표적 DNA에 대한 Indel 발생비율이 높아지는 것을 확인하였다. 다만, 비삽입형 바이러스 벡터를 이용한 경우 Indel 효율이 삽입형 바이러스 벡터보다 좋지 않았는데 이는 비삽입형 바이러스 벡터는 episome 형태로 세포를 감염시키는바, DNA 복제가 되지 않으므로 Indel 효율이 삽입형 바이러스에 비해 떨어지기 때문이다. 그러나 sgRNA ex17_RG7를 도입한 비삽입형 렌티바이러스 벡터도 표적 DNA인 Aβ 영역에 Indel을 유도하므로, sgRNA ex17_RG7를 가이드 RNA로 활용하여 RGEN 시스템을 이용하는 경우, Aβ를 특이적으로 타겟팅할 수 있어, 효율적으로 상기 유전자만을 knockout 하는데 유용하게 사용할 수 있다. 따라서, 상기 sgRNA ex17_RG7를 가이드 RNA를 RGEN 시스템에서 사용하면 알츠하이머를 예방 및 치료할 수 있는 유전자 치료제로 개발될 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0083] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

도면1

Beta Amyloid(Aβ) 1-42	
Wild-type	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
SwedishKM670/G71NLI	IKTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Iowa(D694N)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Arctic(E693G)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Osaka(E693del)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Flemish(A692G)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Leuven(E682K)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Tottori(D678N)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Taiwanese(D678H)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
EnglishH67R)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Belgian(K724N)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Australian(L723P)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
London(V717L)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Indiana(V717F)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Florida(V716V)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
French(V715M)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
German(V715A)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Austrian(T714A)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Iranian(T714A)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(V717L)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(V717G)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(I716T)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(I716F)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(A713I)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(K687M)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(A673V)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(A673T)	IKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

도면2

Ap : APP 2313 bp 중 1983 – 2220 bp (641 – 740 aa) 부분
Aβ : bold Blue
Pathogen mutation : Bold Red
CAAGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAAATCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAATTTGGTGT
TCTTTCCAGAAAGATGTGGGGTTCAAACAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGCGGTGTTGTATAGCGACAGTGATCGTCATC
ACCTTGGTGATGCTGAAGAGAAACAGTACACATTCATTATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCC

도면3

Human APP

http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/View?db=core;g=ENSMUG0000026661;t=1;107046674-170867773;f=ENSMUT0000027874;endirect=0

Exon16

GTCTGGGTGCAGAAATATCAAGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAAATCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAATTTGGTGT

	BGEN Target	Direction	Mismatch			
			0 bp	1 bp	2 bp	3 bp
ex16_801	TGGTTGCAGAAATATCAAGACGG	+	1	0	0	13
ex16_802	GTGACAAATATCAAGACGGAGG	+	1	0	1	7
ex16_803	GCAGAAATCCGACATGACTCAGG	+	1	0	0	5
ex16_804	CTTCATATGATGATCATGTGG	-	1	0	0	20

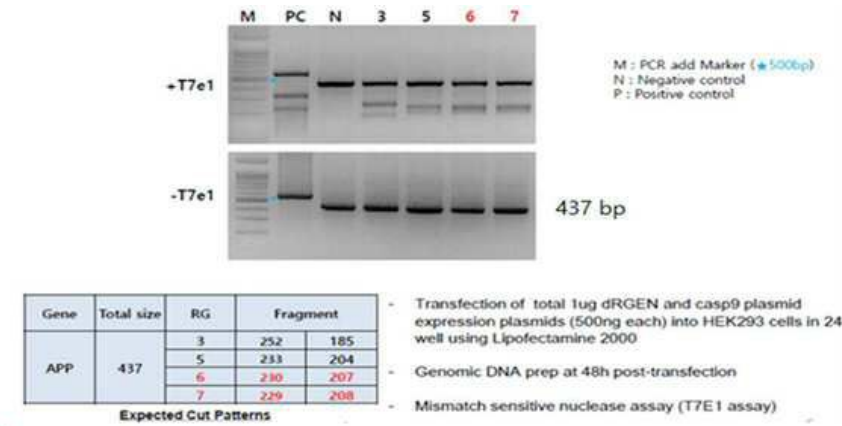
Exon17

GTCTGGGTGCAGAAATATCAAGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAAATCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAATTTGGTGT

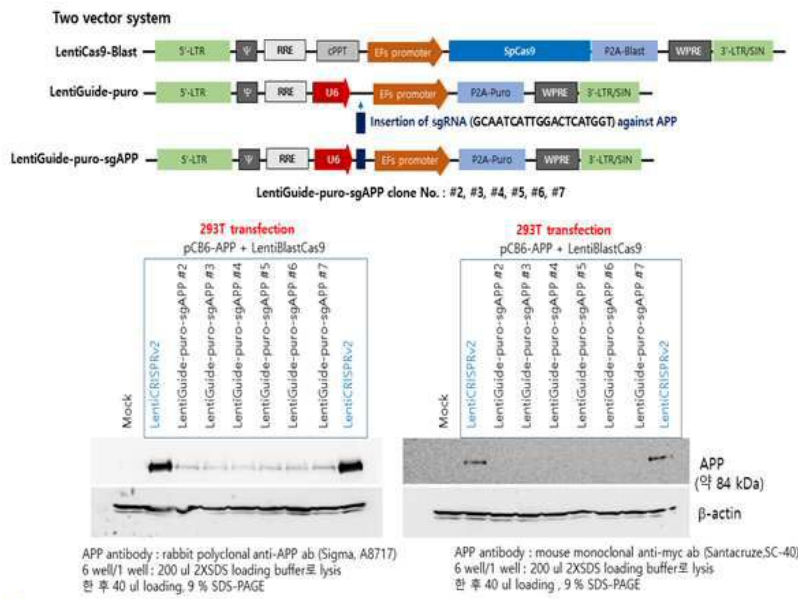
AGAGAAACAGTATC

	BGEN Target	Direction	Mismatch			
			0 bp	1 bp	2 bp	3 bp
ex17_801	GAGATGTGGTTCAACAAAGG	+	1	0	0	22
ex17_802	AGGTGCAATCATGGAATCATGG	+	1	0	0	14
ex17_803	TGCAATCATGGAATCATGGAAT	+	1	0	0	6
ex17_804	GCAATCATGGAATCATGGAAT	+	1	0	0	1

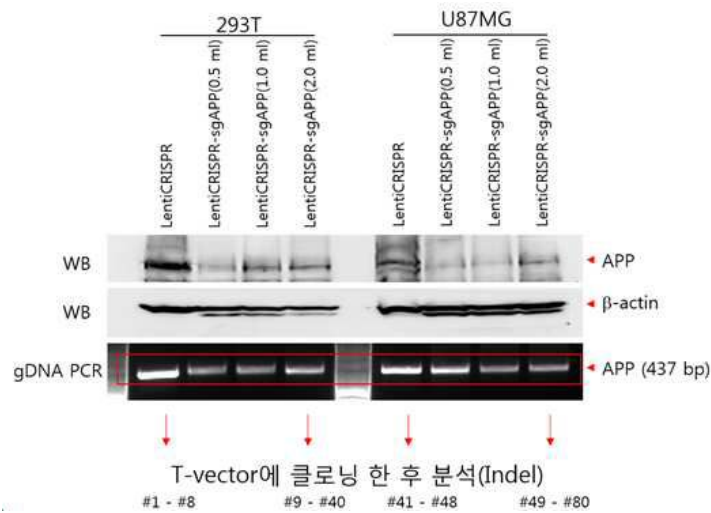
도면4



도면8



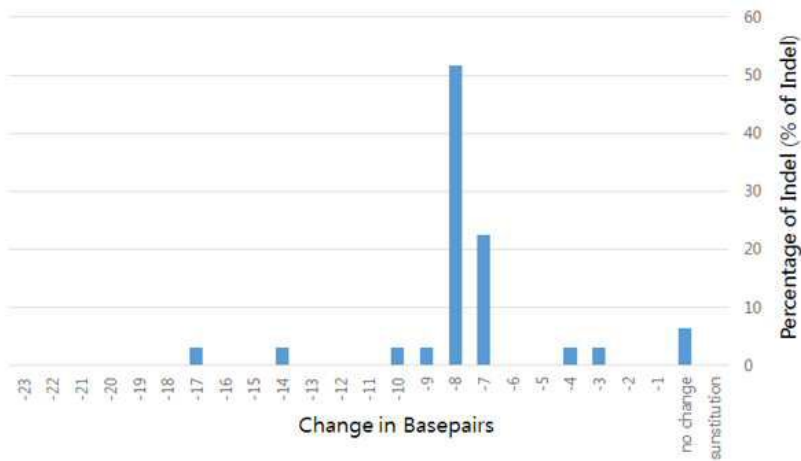
도면9



도면10a



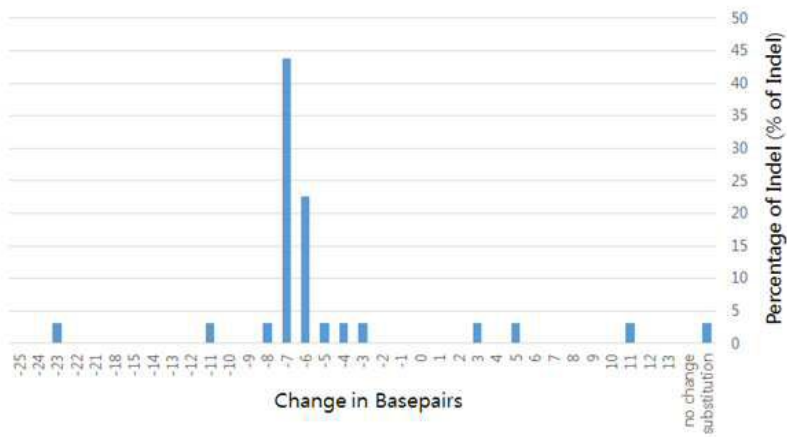
Indel Spectra from CRISPR Cleavage and NHEJ (293T, 삽입형)



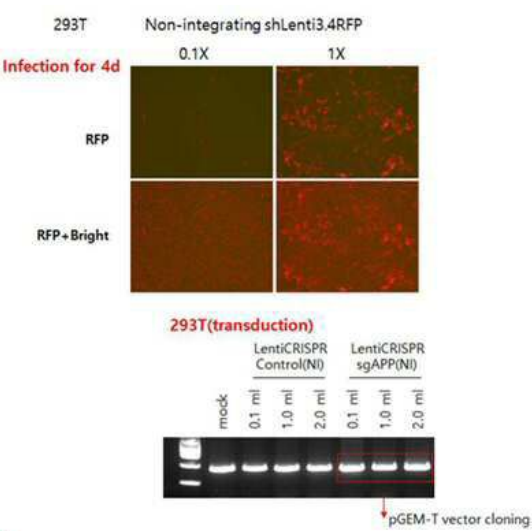
도면10b



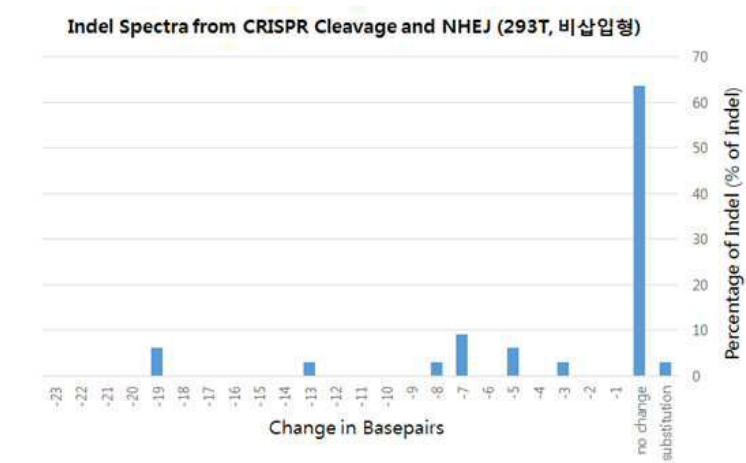
Indel Spectra from CRISPR Cleavage and NHEJ (U87MG, 삽입형)



도면11



도면12



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 - <120> Composition for cleaving amyloid precursor protein gene
 - <130> CNU1-58P
 - <160> 2
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 20
 - <212> RNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> single guide RNA
 - <400> 1
- gcaatcattg gactcatggt

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> target DNA
 <400
 > 2
 gcaatcattg gactcatggt

20