

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0135610

(43) 공개일자 2024년09월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7022561
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월06일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년07월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/081019
- (87) 국제공개번호 WO 2023/107946
국제공개일자 2023년06월15일
- (30) 우선권주장
63/286,855 2021년12월07일 미국(US)

- (71) 출원인
에멘도바이오 인코포레이티드
미국, 텔라웨어 19805, 윌밍턴, 스위트 403-비,
1013 센터 로드
- (72) 발명자
이자르 리오르
이스라엘 텔 아비브 6910414 바르트 스트리트 8
록카 리아트
이스라엘 7525941 리손 레지온 하바'알 샘 토브 7
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리엔목특허법인

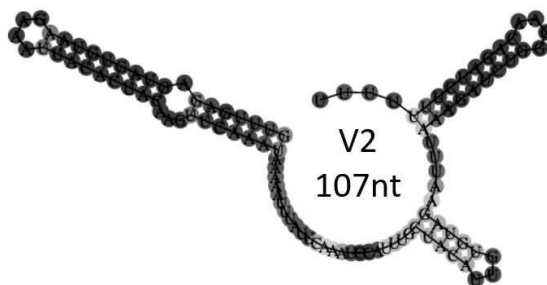
전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제-RNA 복합체

(57) 요약

비-천연 RNA 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 RNA 스캐폴드 부분을 포함하며, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 하기 구조: crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분;을 가지며, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, 상기 RNA 분자의 가이드 서열 부분에 상보성을 갖는 DNA 표적 부위에 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 표적화한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

(72) 발명자

마르바흐 바르 나다브

이스라엘 레호보트 76466 하케렘 9/14

헥트 나르

이스라엘 69651 텔 아비브 즐로스스티 스트리트 6

명세서

청구범위

청구항 1

비-천연 RNA 분자, 또는 상기 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하고, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 서열의 존재 하에 OMNI-103 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, OMNI-103 뉴클레아제를 DNA 표적 부위로 표적화하며, 상기 tracrRNA 서열은 상기 RNA 분자의 tracrRNA 부분 또는 제2 RNA 분자의 tracrRNA 부분에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 최대 17개 뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 14-17개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23과 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 23이 아닌 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하는 RNA 분자는 tracrRNA 부분을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 폴리뉴클레오티드 링커 부분에 의해 상기 tracrRNA 부분에 공유결합에 의해 연결된 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 tracrRNA 부분을 포함하는 제2 RNA 분자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 22개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 11

비천연 RNA 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 부분을 포함하고, 상기 RNA 분자는 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분의 존재 하에 OMNI-103 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, OMNI-103 뉴클레

아제를 DNA 표적 부위로 표적화하며, 상기 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분은 상기 RNA 분자 또는 제 2 RNA 분자에 의해 코딩되는 것인 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 85개 미만의 뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 84-80, 79-75, 74-70, 69-65, 또는 64-60개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 11 또는 12에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 30-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 11 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 15

청구항 11 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 4 또는 5의 tracr 부분인 것인 조성물.

청구항 16

청구항 11 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 최대 19개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 16-19개 뉴클레오티드 길이의 tracrRNA 역-반복 서열 부분(anti-repeat sequence portion)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

청구항 11 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-96% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

청구항 11 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

청구항 11 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 25 이외의 서열을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

청구항 11 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 부분을 포함하고, crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

청구항 11 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 폴리뉴클레오티드 링커 부분에 의해 상기 crRNA 반복 서열에 공유결합에 의해 연결된 것인 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 링커 부분은 4-10개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 링커는 GAAA 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 24

청구항 11 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하는 제2 RNA 분자를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

청구항 11 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 26

청구항 11 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 22개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 27

비-천연 RNA 분자, 또는 상기 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 RNA 스캐폴드 부분을 포함하고, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 하기 구조를 갖고:

crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분;

상기 RNA 스캐폴드 부분은 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, 상기 RNA 분자의 가이드 서열 부분에 상보성을 갖는 DNA 표적 부위로 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 표적화하는 것인 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 29

청구항 27 또는 28에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 110-105, 104-100, 99-95, 94-90, 89-85, 84-80, 79-75, 또는 74-70개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 30

청구항 27 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 107, 101, 95, 85 또는 79개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 31

청구항 27 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 32

청구항 27 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 최대 17개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 14-17개 뉴클레오티드 길이인 것인 조성물.

청구항 33

청구항 27 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23과 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 34

청구항 27 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23 중 어느 하나와

적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 35

청구항 27 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 23이 아닌 것인 조성물.

청구항 36

청구항 27 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 85개 미만의 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 84-80, 79-75, 74-70, 69-65, 또는 64-60개 뉴클레오타이드 길이인 것인 조성물.

청구항 37

청구항 27 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 30-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 38

청구항 27 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 39

청구항 27 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 4 또는 5의 tracrRNA 부분이 아닌 것인 조성물.

청구항 40

청구항 27 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 상기 crRNA 반복 서열 부분과 상기 tracrRNA 부분 사이에 링커 부분을 추가로 포함하여 RNA 스캐폴드가 하기 구조를 갖는 것인 조성물:

crRNA 반복 서열 부분 - 링커 부분 - tracrRNA 부분.

청구항 41

청구항 27 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하고, 상기 crRNA 반복 서열과 상기 tracrRNA 역-반복 서열 부분은 상기 링커 부분에 의해 공유결합에 의해 연결되는 것인 조성물.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 링커 부분은 4-10개 뉴클레오타이드 길이의 폴리뉴클레오타이드 링커인 것인 조성물.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드 링커는 GAAA 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 44

청구항 27 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 최대 19개 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 16-19개 뉴클레오타이드 길이의 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 45

청구항 27 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

청구항 27 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도

95% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

청구항 27 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 역-반복 서열은 서열번호 25가 아닌 것인 조성물.

청구항 48

청구항 27 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 상기 tracrRNA 역-반복 부분에 연결된 뉴클레오타이드의 제1 섹션을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드의 제1 섹션은 서열번호 26-28 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 49

청구항 27 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA 부분은 뉴클레오타이드의 제1 섹션에 연결된 뉴클레오타이드의 제2 섹션을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드의 제2 섹션은 서열번호 29-32 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 50

청구항 27 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 51

청구항 27 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 V2, V2.1, V2.2, V2.3, V2.4, 또는 V2.5 RNA 스캐폴드 중 어느 하나의 예측된 구조를 갖는 것인 조성물.

청구항 52

청구항 27 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 4 또는 5 이외의 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 53

청구항 27 내지 52 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 서열 부분이 상기 RNA 분자의 crRNA 반복 서열 부분에 공유 결합에 의해 연결되어, 하기 구조를 갖는 단일-가이드 RNA 분자를 형성하는 것인 조성물:

가이드 서열 부분 - crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분.

청구항 54

청구항 27 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 20-23개 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 22개 뉴클레오타이드 길이인 것인 조성물.

청구항 55

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 추가로 포함하고, 상기 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 것인 조성물.

청구항 56

청구항 1 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 분자는 시험관내 전사(IVT) 또는 고체상 인공 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 형성되는 것인 조성물.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 RNA 분자는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 58

청구항 1 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 분자는 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열을 포함하는

것인 조성물.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 RNA 분자는 서열번호 18의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 60

청구항 58에 있어서, 상기 RNA 분자는 서열번호 19의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 61

청구항 58 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열로 구성된 것인 조성물.

청구항 62

청구항 1 내지 61 중 어느 한 항의 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 63

청구항 1 내지 61 중 어느 한 항의 조성물 및 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 CRISPR 뉴클레아제를 무세포 시스템 또는 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 게놈의 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포인 것인 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 상기 진핵 세포는 인간 세포 또는 식물 세포인 것인 방법.

청구항 66

청구항 1 내지 61 중 어느 한 항의 조성물 및 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 CRISPR 뉴클레아제를 무세포 시스템 또는 세포에 도입하는 것을 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 게놈의 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키기 위한 키트로서, 상기 RNA 분자 및 상기 CRISPR 뉴클레아제를 세포에 전달하기 위한 설명서를 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 2021년 12월 7일자로 출원된 미국 가출원 제63/214,506호, 및 2021년 2월 8일자로 출원된 미국 가출원 제63/286,855호의 이익을 주장하며, 그의 내용은 참조에 의해 본원에 포함된다.
- [0002] 본 출원 전반에 걸쳐, 괄호 안에 언급된 것을 포함하여, 다양한 간행물이 언급된다. 본 출원에 전체로 언급된 모든 간행물의 개시는 본 발명이 속하는 기술 분야 및 본 발명과 함께 이용될 수 있는 당업계의 특징에 대한 추가적인 설명을 제공하기 위해 본 출원에 참조에 의해 포함된다.
- [0003] **서열 목록에 대한 참조**
- [0004] 본 출원은 본 출원의 일부로 2022년 12월 6일자로 제출된 XML 파일에 포함된, MS-윈도우와 운영 시스템 호환성을 갖는 IBM-PC 머신 형식으로 2022년 11월 9일자로 작성되고, 파일의 크기가 81 킬로바이트이며, 파일명이 "221206_91822-A-PCT_Sequence_Listing_AWG.xml"인 파일에 존재하는 뉴클레오티드 서열을 참조에 의해 포함한다.
- [0005] **본 발명의 분야**
- [0006] 본 발명은 특히 게놈 편집을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 박테리아 및 고세균 적응 면역의 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 시스템은 단백질 조성 및 게놈 로커스 아키텍처(genomic loci architecture)의 극도의 다양성을 나타낸다. CRISPR 시스템은 연구 및 게놈 조작(genome engineering)을 위한 중요한 도구가 되었다. 그럼에도 불구하고, CRISPR 시스템의 많은 세부사항이 결정되지 않았으며, CRISPR 뉴클레아제의 적응성은 서열 특이성 요건, 발현, 또는 전달 문제에 의해 제한될 수 있다. 상이한 CRISPR 뉴클레아제는 크기, PAM 부위, 온타겟(on target) 활성, 특이성, 절단 패턴(예를 들어, 평활(blunt), 점착(staggered) 말단), 및 절단 후 indel(insertion/deletion) 형성의 두드러진 패턴과 같은 다양한 특징을 갖는다. 상이한 특징 세트가 상이한 적용에 유용할 수 있다. 예를 들어, 일부 CRISPR 뉴클레아제는 PAM 부위의 제한으로 인해 다른 CRISPR 뉴클레아제가 표적화할 수 없는 특정 게놈 로커스를 표적화할 수 있다. 또한, 현재 사용 중인 일부 CRISPR 뉴클레아제는 선제성 면역(pre-immunity)을 나타내고, 이는 생체 내 적응성을 제한할 수 있다. Charlesworth et al., Nature Medicine (2019) 및 Wagner et al., Nature Medicine (2019)을 참조한다. 따라서, 신규 CRISPR 뉴클레아제 및 이들을 활성화하고 표적화하는 RNA 분자의 발견, 조작 및 개선이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명은 비-천연(non-naturally occurring) RNA 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 crRNA 반복 서열 부분(crRNA repeat sequence portion) 및 가이드 서열 부분을 포함하고, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 서열의 존재 하에 OMNI-103 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, OMNI-103 뉴클레아제를 DNA 표적 부위로 표적화하며, 상기 tracrRNA 서열은 상기 RNA 분자의 tracrRNA 부분 또는 제2 RNA 분자의 tracrRNA 부분에 의해 코딩되는 것인 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 비-천연 RNA 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 RNA 스캐폴드 부분을 포함하고, 상기 RNA 스캐폴드 부분은 하기 구조를 갖고:

[0011] crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분;

[0012] 상기 RNA 스캐폴드 부분은 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, 상기 RNA 분자의 가이드 서열 부분에 상보성을 갖는 DNA 표적 부위로 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 표적화하는 것인 조성물을 제공한다.

[0013] OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제, 및 RNA 스페이서 부분으로도 지칭되는, RNA 분자의 가이드 서열 부분에 기초하여 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 특이적으로 결합하고 활성화할 수 있는 스캐폴드 부분을 포함하는 비-천연 RNA 분자를 사용하여, 게놈 공학, 후성유전체 공학(epigenetic engineering), 게놈 표적화, 세포의 게놈 편집 및/또는 시험관 내 진단에 활용될 수 있는 조성물 및 방법이 본원에 개시된다.

[0014] 개시된 조성물은 게놈 DNA 서열을 변형시키는 데 이용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 게놈 DNA는 목적 세포 또는 세포들에 존재하는 선형 및/또는 염색체 DNA 및/또는 플라스미드 또는 기타 염색체의 DNA 서열을 의미한다. 일부 구체예에서, 목적 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 목적 세포는 원핵 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 게놈 DNA 서열의 미리 결정된 표적 부위에서 이중-가닥 절단(DSB)을 생성하여, 게놈의 표적 부위(들)에서 DNA 서열의 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 초래한다.

과제의 해결 수단

[0015] **상세한 설명**

[0016] 본 발명은 비-천연 RNA 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하고, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 서열의 존재 하에 OMNI-103 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, OMNI-103 뉴클레아제를 DNA 표적 부위로 표적화하며, 상기 tracrRNA 서열은 상기 RNA 분자의 tracrRNA 부분 또는 제2 RNA 분자의 tracrRNA 부분에 의해 코딩되는 것인 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 뉴클레아제, 니카아제(nickase) 또는 촉매 활성이 상실된 데드(catalytically dead) 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 서열번호 1에 의해 코딩되거나 그의 촉매적 변이체(catalytic variant)이다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 이중 가닥 DNA 절단(double-stranded DNA break)을 형성할 수 있는 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서,

서, OMNI-103은 이중 가닥 DNA의 단일 가닥에만 DNA 절단을 형성할 수 있는 니카아제이다.

- [0017] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 최대 17개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 14-17개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0018] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23과 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0019] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23 중 어느 하나와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0020] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열은 서열번호 23이 아니다.
- [0021] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하는 RNA 분자는 tracrRNA 부분을 추가로 포함한다.
- [0022] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 폴리뉴클레오티드 링커 부분에 의해 tracrRNA 부분에 공유결합에 의해 연결된다.
- [0023] 일부 구체예에서, 조성물은 tracrRNA 부분을 포함하는 제2 RNA 분자를 포함한다.
- [0024] 일부 구체예에서, OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고, D12, E776, H988, D991, D856, H857 및 N880으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는 니카아제이다. 일부 구체예에서, OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고, D12, E776, H988, 및 D991로부터 선택된 위치에 하나 이상의 아미노산 치환, 및 D856, H857 및 N880으로부터 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 촉매 활성이 상실된 데드 뉴클레아제이다.
- [0025] 일부 구체예에서, 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 22개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0026] 본 발명은 또한 비-천연 RNA 분자, 또는 상기 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 분자는 tracrRNA 부분을 포함하고, 상기 RNA 분자는 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분의 존재 하에 OMNI-103 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, OMNI-103 뉴클레아제를 DNA 표적 부위로 표적화하며, 상기 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분은 상기 RNA 분자 또는 제2 RNA 분자에 의해 코딩되는 것인 조성물을 제공한다.
- [0027] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 85개 미만의 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 84-80, 79-75, 74-70, 69-65, 또는 64-60개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0028] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 30-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0029] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0030] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 4 또는 5의 tracr 부분이 아니다.
- [0031] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 최대 19개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 16-19개 뉴클레오티드 길이인 tracrRNA 역-반복 서열(anti-repeat sequence) 부분을 포함한다.
- [0032] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0033] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0034] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 25 이외의 서열을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0035] 일부 구체예에서, RNA 분자는 tracrRNA 부분을 포함하고, crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 추가로 포함한다.
- [0036] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 폴리뉴클레오티드 링커 부분에 의해 crRNA 반복 서열에 공유결합에 의해 연

결된다.

- [0037] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 링커 부분은 4-10개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0038] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 링커는 GAAA 서열을 갖는다.
- [0039] 일부 구체예에서, 조성물은 crRNA 반복 서열 부분 및 가이드 서열 부분을 포함하는 제2 RNA 분자를 추가로 포함한다.
- [0040] 일부 구체예에서, OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0041] 일부 구체예에서, 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 22개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0042] 본 발명은 또한 비-천연 RNA 분자, 또는 상기 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물로써, 상기 RNA 분자는 RNA 스캐폴드 부분을 포함하고, 상기 스캐폴드 부분은 하기 구조를 갖고:
- [0043] crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분;
- [0044] 상기 RNA 스캐폴드 부분은 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고, 상기 RNA 분자의 가이드 서열 부분에 상보성을 갖는 DNA 표적 부위로 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 표적화하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0045] 일부 구체예에서, OMNI-103은 뉴클레아제, 니카아제 또는 촉매 활성이 상실된 데드 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 서열번호 1에 의해 코딩되거나 또는 그의 촉매적 변이체이다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 이중 가닥 DNA 절단을 형성할 수 있는 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서, OMNI-103은 이중 가닥 DNA의 단일 가닥에서만 DNA 절단을 형성할 수 있는 니카아제이다.
- [0046] 일부 구체예에서, OMNI-103 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0047] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 110-105, 104-100, 99-95, 94-90, 89-85, 84-80, 79-75, 또는 74-70개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0048] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 107, 101, 95, 85 또는 79개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0049] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0050] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 최대 17개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 14-17개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0051] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23과 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0052] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열 부분은 서열번호 22 또는 23 중 어느 하나와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0053] 일부 구체예에서, crRNA 반복 서열은 서열번호 23이 아니다.
- [0054] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 85개 미만의 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 84-80, 79-75, 74-70, 69-65, 또는 64-60개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0055] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 30-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0056] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 tracrRNA 부분과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0057] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 4 또는 5의 tracrRNA 부분이 아니다.
- [0058] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 crRNA 반복 서열 부분과 tracrRNA 부분 사이에 링커 부분(linker portion)을 추가로 포함하여, RNA 스캐폴드가 하기 구조를 갖는다:
- [0059] crRNA 반복 서열 부분 - 링커 부분 - tracrRNA 부분.
- [0060] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함하고, 상기 crRNA 반복 서열과 tracrRNA

역-반복 서열 부분은 링커 부분에 의해 공유결합에 의해 연결된다.

- [0061] 일부 구체예에서, 링커 부분은 4-10개 뉴클레오타이드 길이인 폴리뉴클레오타이드 링커이다.
- [0062] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드 링커는 GAAA 서열을 갖는다.
- [0063] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 최대 19개 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 16-19개 뉴클레오타이드 길이인 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0064] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 60-70%, 71-80%, 81-90%, 91-95%, 또는 96-99% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 역-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0065] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 서열번호 24 또는 25 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 tracrRNA 항-반복 서열 부분을 포함한다.
- [0066] 일부 구체예에서, tracrRNA 역-반복 서열은 서열번호 25가 아니다.
- [0067] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 tracrRNA 역-반복 부분에 연결된 뉴클레오타이드의 제1 섹션을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드의 제1 섹션은 서열번호 26-28 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0068] 일부 구체예에서, tracrRNA 부분은 뉴클레오타이드의 제1 섹션에 연결된 뉴클레오타이드의 제2 섹션을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드의 제2 섹션은 서열번호 29-32 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0069] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 17-21 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다.
- [0070] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 V2, V2.1, V2.2, V2.3, V2.4 또는 V2.5 RNA 스캐폴드 중 어느 하나의 예측된 구조를 갖는다.
- [0071] 일부 구체예에서, RNA 스캐폴드 부분은 서열번호 4 또는 5 이외의 서열을 갖는다.
- [0072] 일부 구체예에서, 가이드 서열 부분은 RNA 분자의 crRNA 반복 서열 부분에 공유결합에 의해 연결되어 하기 구조를 갖는 단일-가이드 RNA 분자를 형성한다:
- [0073] 가이드 서열 부분 - crRNA 반복 서열 부분 - tracrRNA 부분.
- [0074] 일부 구체예에서, 가이드 서열 부분은 17-30개 뉴클레오타이드 길이, 더 바람직하게는 20-23개 뉴클레오타이드 길이, 더 바람직하게는 22개 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0075] 일부 구체예에서, 조성물은 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 추가로 포함하고, 상기 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다.
- [0076] 일부 구체예에서, RNA 분자는 시험관내 전사(IVT) 또는 고체상 인공 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 형성된다.
- [0077] 일부 구체예에서, RNA 분자는 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0078] 일부 구체예에서, RNA 분자는 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열을 갖는 스캐폴드를 갖는 sgRNA 분자일 수 있다.
- [0079] 일부 구체예에서, RNA 분자는 서열번호 18의 서열을 포함한다.
- [0080] 일부 구체예에서, RNA 분자는 서열번호 19의 서열을 포함한다.
- [0081] 일부 구체예에서, RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열로 구성된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, RNA 분자는 가이드 서열 부분과 스캐폴드로 구성된 sgRNA 분자이고, 상기 스캐폴드는 서열번호 17-21 중 어느 하나의 서열을 갖는다.
- [0082] 본 발명은 또한 전술된 구체예 중 어느 하나의 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다.
- [0083] 본 발명은 또한, 청구항 1 내지 57 중 어느 한 항의 조성물 및 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 CRISPR 뉴클레아제를 무세포 시스템 또는 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 게놈의 DNA 표적 부위에서 뉴클레오타이드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0084] 일부 구체예에서, 상기 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다.

- [0085] 일부 구체예에서, 상기 진핵 세포는 인간 세포 또는 식물 세포이다.
- [0086] 본 발명은 또한, 전술된 구체예 중 어느 하나의 조성물, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 CRISPR 뉴클레아제, 및 상기 RNA 분자 및 상기 CRISPR 뉴클레아제를 세포에 전달하기 위한 설명서를 포함하는, 무세포 시스템(cell-free system) 또는 세포의 게놈의 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키기 위한 키트를 제공한다.
- [0087] 본 발명의 구체예에서, 비-천연 RNA 분자는 "스페이서" 또는 "가이드 서열" 부분을 포함한다. RNA 분자의 "스페이서 부분" 또는 "가이드 서열 부분"은 특정 표적 DNA 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 의미하며, 예를 들어 가이드 서열 부분은 가이드 서열 부분의 길이를 따라 표적화되는 DNA 서열에 완전히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 가이드 서열 부분은 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이어거나 대략 17-30, 17-29, 17-28, 17-27, 17-26, 17-25, 17-24, 18-22, 19-22, 18-20, 17-20 또는 21-22개 뉴클레오티드 길이이다. 바람직하게는, 가이드 서열 부분의 전체 길이는 가이드 서열 부분의 길이를 따라 표적화되는 DNA 서열에 완전히 상보적이다. 가이드 서열 부분은 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 CRISPR 뉴클레아제를 활성화할 수 있는 "스캐폴드 부분(scaffold portion)"을 갖는 RNA 분자의 일부일 수 있으며, RNA 분자의 가이드 서열 부분은 CRISPR 복합체의 DNA 표적화 부분으로 작용한다. 스캐폴드 부분 및 가이드 서열 부분을 갖는 RNA 분자가 CRISPR 분자와 동시에 존재하는 경우, RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제를 특정 표적 DNA 서열에 표적화할 수 있다. 각 가능성은 별도의 구체예를 나타낸다. RNA 분자 스페이서 부분은 임의의 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다.
- [0088] 일 구체예에서, 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열 및 DNA 표적화 RNA 뉴클레오티드 서열(예를 들면, 스페이서 또는 가이드 서열 부분)은 단일-가이드 RNA 분자(sgRNA) 상에 있고, 상기 sgRNA 분자는 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 DNA 표적화 모듈로 작용할 수 있다.
- [0089] 일 구체예에서, 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열은 제1 RNA 분자 상에 있고, DNA-표적화 RNA 뉴클레오티드 서열은 제2 RNA 분자 상에 있으며, 상기 제1 RNA 분자 및 상기 제2 RNA 분자는 염기쌍 형성에 의해 상호작용하고 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하여, 표적화 모듈로 작용한다.
- [0090] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 본원에 기재된 구체예 중 어느 하나의 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 게놈에서 표적 부위의 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 포함한다.
- [0091] 본 발명은 또한 세포 내 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키기 위한 본 발명의 임의의 조성물 또는 방법의 용도를 제공한다.
- [0092] 본 발명은 진핵 세포의 게놈의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0093] 본 발명은 포유동물 세포의 게놈의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.
- [0094] 본 발명은 식물 세포의 게놈의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0095] 일부 구체예에서, 방법은 생체외에서 수행된다. 일부 구체예에서, 방법은 생체내에서 수행된다. 일부 구체예에서, 방법의 일부 단계는 생체외에서 수행되고, 일부 단계는 생체내에서 수행된다. 일부 구체예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.
- [0096] 본 발명은 또한 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 획득되는 변형된 세포 또는 세포들을 제공한다. 일 구체예에서, 이들 변형된 세포 또는 세포들은 자손(progeny) 세포를 생성할 수 있다. 일 구체예에서, 이들 변형된 세포 또는 세포들은 생착 후에 자손 세포를 생성할 수 있다.
- [0097] 본 발명은 또한 이러한 변형된 세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한, 상기 세포를 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 상기 조성물을 제조하는 인 비트로 또는 엑스 비보 방법을 제공한다.
- [0098] 본원에 기술된 뉴클레아제-RNA 가이드 복합체는 가이드 RNA 분자를 통해 원하는 DNA 표적 서열을 특이적으로 표적화할 수 있다. 뉴클레아제-가이드 복합체는 또한 복합체에 부착된 임의의 분자를 표적 부위로 운반할 것이다. 따라서, 본 개시는 또한 CRISPR 뉴클레아제 및 DNA 변형 도메인(예를 들어, 데아미나아제, 뉴클레아제, 니카아제, 제조합효소, 메틸트랜스퍼라아제, 메틸라아제, 아세틸라아제, 아세틸트랜스퍼라아제, 전사 활성화

(transcriptional activator), 또는 전사 억제자 도메인)을 포함하는 융합 단백질, 및 질병과 관련된 게놈(예를 들면, 인간 대상체의 게놈)의 돌연변이를 교정하거나 유전자의 발현을 감소시키거나 막기 위해 게놈(예를 들면, 인간 게놈)에 돌연변이를 생성하는데 있어서 이러한 융합 단백질의 용도를 고려한다.

[0099] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 임의의 CRISPR 뉴클레아제는 효소 활성을 갖는 단백질에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 표적 DNA를 변형시킨다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 뉴클레아제 활성, 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제(demethylase) 활성, DNA 복구 활성, DNA 손상 활성, 탈아민화(deamination) 활성, 디스뮤타아제(dismutase) 활성, 알킬화 활성, 탈퓨린화 활성, 산화 활성, 피리미딘 이량체 형성 활성, 인테그라아제 활성, 트랜스포사아제(transposase) 활성, 재조합효소 활성, 폴리머라아제 활성, 리가아제 활성, 헬리카아제 활성, 포토리아제(photolyase) 활성 또는 글리코실라아제 활성이다. 일부 경우에, 효소 활성은 뉴클레아제 활성이다. 일부 경우에, 뉴클레아제 활성은 표적 DNA에 이중 가닥 절단을 도입한다. 일부 경우에, 효소 활성은 표적 DNA와 회합된(associated) 표적 폴리펩티드를 변형시킨다. 일부 경우에, 효소 활성은 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, 아세틸트랜스퍼라아제 활성, 탈아세틸화효소 활성, 키나아제 활성, 포스파타아제 활성, 유비퀴틴 리가아제 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO일화(SUMOylating) 활성, 탈SUMO일화(deSUMOylating) 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성 또는 탈미리스토일화(demyristoylation) 활성이다. 일부 경우에, 표적 폴리펩티드는 히스톤이고, 효소 활성은 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, 아세틸트랜스퍼라아제 활성, 데아세틸라아제 활성, 키나아제 활성, 포스파타아제 활성, 유비퀴틴 리가아제 활성 또는 탈유비퀴틴화 활성이다.

[0100] 따라서, 본원에 기술된 CRISPR 뉴클레아제, 또는 니카아제(즉, 단일 가닥 DNA 절단 활성을 가짐) 또는 데드 뉴클레아제(dead-nuclease)(즉, DNA 가닥 절단을 생성할 수 없음)로 변형된 뉴클레아제의 버전 중 어느 하나는 데아미나제와 같은 염기교정 유전자가위(base editor), 역전사효소(예를 들면, 프라임 편집(prime editing)에서의 용도를 위한 역전사 효소, Anzaolone et al.(2019) 참조), DNA의 메틸화 상태를 변형하는 효소(예를 들면, 메틸트랜스퍼라아제) 또는 히스톤 변형제(예를 들면, 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 또 다른 DNA 조정(modulating) 또는 DNA 변형 효소에 융합될 수 있다(예를 들면, 직접 융합되거나 링커를 통해 융합될 수 있다). 실제로, 본원에 기술된 OMNI-130 뉴클레아제, 니카아제, 불활성 뉴클레아제는 DNA 변형 효소 또는 그의 이펙터(effector) 도메인에 융합될 수 있다. DNA 변형제(DNA modifier)의 예는 데아미나아제, 뉴클레아제, 니카아제, 재조합효소, 메틸트랜스퍼라아제, 메틸라아제, 아세틸라아제, 아세틸트랜스퍼라아제, 역전사효소, 헬리카아제, 인테그라아제, 리가아제, 트랜스포사아제, 데메틸라아제, 포스파타아제, 전사 활성화자 또는 전사 억제자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 임의의 CRISPR 뉴클레아제는 효소 활성을 갖는 단백질에 융합된다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 표적 DNA 분자를 변형시킨다. 일부 구체예에서, 본원에 기술된 CRISPR 뉴클레아제 또는 그의 융합 단백질은 질병과 관련된 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 교정 또는 생성하기 위해, 또는 유전자 발현을 증가, 교정, 감소 또는 방지하기 위해 사용될 수 있다.

[0101] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 대상체(subject)의 게놈 내의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 단계를 포함하는, 게놈 돌연변이와 연관된 질환을 앓고 있는 대상체의 치료를 위한 본원에 기술된 조성물 중 어느 하나의 용도를 포함한다.

[0102] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 본원에 기술된 조성물 중 어느 하나를 돌연변이 장애와 연관된 대립유전자(allele)로 표적화하는 단계를 포함하는, 돌연변이 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0103] 일부 구체예에서, 돌연변이 장애는 종양(neoplasia), 연령-관련 황반 변성, 조현병, 신경학적, 신경변성, 또는 운동 장애, 취약 X 증후군, 세크레타제-관련 장애, 프리온-관련 장애, ALS, 중독, 자폐증, 알츠하이머병, 호중구감소증, 염증-관련 장애, 파킨슨병, 혈액 및 응고 질환 및 장애, 세포 조절장애 및 종양학 질환 및 장애, 염증 및 면역-관련 질환 및 장애, 대사성, 간, 신장 및 단백질 질환 및 장애, 근육 및 골격 질환 및 장애, 피부 질환 및 장애, 신경학적 및 신경 질환 및 장애, 각막 질환 및 장애, 망막 질환 및 장애, 및 안구 질환 및 장애 중 임의의 것으로부터 선택되는 질병 또는 장애와 관련된다.

[0104] 질병 및 치료법

[0105] 본 발명의 특정 구체예는 유전자 편집, 치료 방법, 또는 치료법의 형태로서 질환 또는 장애와 연관된 특정 유전자좌로 뉴클레아제를 표적화한다. 예를 들어, 유전자의 편집 또는 녹아웃(knockout)을 유도하기 위해, 본원에 개시된 조성물은 맞춤형 설계된 가이드 RNA 분자를 사용하여 유전자의 병원성 돌연변이 대립유전자로 특이적으로 표적화될 수 있다. 가이드 RNA 분자는 바람직하게는 먼저 뉴클레아제의 PAM 요건을 고려함으로써 설계되며, 이는 또한 본원에서 확인된 바와 같이, 유전자 편집이 수행되는 시스템에 따라 달라진다. 예를 들어, 표적 부위로

OMNI-103 뉴클레아제를 표적화하도록 설계된 가이드 RNA 분자는 OMNI-103 PAM 서열, "NGG"의 근처에 있는 영역에 상보적인 스페이서 영역을 포함하도록 설계된다. 가이드 RNA 분자는 또한 바람직하게는 뉴클레아제의 특이적 활성을 증가시키고 오프타겟(off-target) 효과를 감소시키기 위해 충분하고, 바람직하게는 최적의 길이의 스페이서 영역(즉, 표적 대립유전자에 대해 상보성을 갖는 가이드 RNA 분자의 영역)을 포함하도록 설계된다. 예를 들면, OMNI-103 뉴클레아제를 표적화하도록 설계된 가이드 RNA 분자는 높은 온타겟 절단 활성을 위해 22-뉴클레오타이드 스페이서를 포함하도록 설계된다.

- [0106] 비-한정적인 예로서, 가이드 RNA 분자는 뉴클레아제에 의해 유발되는 DNA 손상 시 비-상동성 말단 연결(non-homologous end joining; NHEJ) 경로가 유도되고 프레임쉬프트 돌연변이의 도입에 의해 돌연변이 대립유전자의 침묵을 야기하도록, 돌연변이 대립유전자의 특정 영역, 예를 들어 개시 코돈 근처로 뉴클레아제를 표적화하도록 설계될 수 있다. 가이드 RNA 분자 설계에 대한 이러한 접근법은 우성 음성 돌연변이의 효과를 변경하고 이에 의해 대상체를 치료하는 데 특히 유용하다. 별개의 비-한정적 예로서, 가이드 RNA 분자는, 뉴클레아제에 의해 유발된 DNA 손상 시 상동성 기반 복구(HDR) 경로가 유도되고 돌연변이 대립유전자의 주형 매개 교정을 초래하도록, 돌연변이된 대립유전자의 특정 병원성 돌연변이를 표적화하도록 설계될 수 있다. 가이드 RNA 분자 설계에 대한 이러한 접근법은 돌연변이된 대립유전자의 반수체 기능부전(haploinsufficiency) 효과를 변경하고 이에 의해 대상체를 치료하는 데 특히 유용하다.
- [0107] 질병 또는 장애를 치료하기 위한 변경을 위해 표적화될 수 있는 특정 유전자의 비-한정적 예가 본원에서 하기에 제시된다. 돌연변이 장애를 유도하는 특정 질병-연관 유전자 및 돌연변이는 문헌에 기재되어 있다. 이러한 돌연변이는 질병 연관 유전자의 대립유전자에 대해 CRISPR 조성물을 표적화하기 위해 DNA-표적화 RNA 분자를 설계하기 위해 이용될 수 있으며, 상기 CRISPR 조성물은 DNA 손상을 유발하고 DNA 복구 경로를 유도하여 대립유전자를 변경하고 이에 의해 돌연변이 장애를 치료한다.
- [0108] ELANE 유전자의 돌연변이는 호중구감소증과 연관된다. 따라서, 한정 없이, ELANE를 표적화하는 본 발명의 구체예는 호중구감소증을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0109] CXCR4는 인간 면역결핍 바이러스 1형(HIV-1) 감염에 대한 공동 수용체(co-receptor)이다. 따라서, 한정 없이, CXCR4를 표적화하는 본 발명의 구체예는 HIV-1를 앓고 있는 대상체를 치료하거나 대상체에서 HIV-1 감염에 대한 내성을 부여하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0110] PD-1(programmed cell death protein 1) 파괴는 종양 세포의 CAR-T 세포 매개 사멸을 증가시키고 PD-1은 다른 암 치료법에서 표적일 수 있다. 따라서, 한정 없이, PD-1을 표적화하는 본 발명의 구체예는 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 치료는 PD-1 결핍이 되도록 본 발명에 따라 변형된 T 세포를 이용한 CAR-T 세포 요법이다.
- [0111] 추가적으로, BCL11A는 헤모글로빈 생산의 억제에서 역할을 하는 유전자이다. 글로빈 생산은 BCL11A를 억제함으로써 탈라세미아 또는 겸상 적혈구 빈혈과 같은 질환을 치료하기 위해 증가될 수 있다. 예를 들어, PCT 국제 공개 WO 2017/077394A2; 미국출원 공개 US2011/0182867A1; 문헌[Humbert et al. Sci. Transl. Med. (2019); 및 Canver et al. Nature (2015)를 참조한다. 따라서, 한정 없이, BCL11A의 인핸서를 표적화하는 본 발명의 구체예는 베타 탈라세미아 또는 겸상 적혈구 빈혈을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0112] 본 발명의 구체예는 또한, 하기 표 A 또는 표 B에 열거된 질환 또는 장애를 연구, 변경, 또는 치료하기 위해, 임의의 질환-연관 유전자를 표적화하기 위해 이용될 수 있다. 실제로, 질병-연관 유전자에 의해 유발된 질환을 치료하기 위해, 질병-연관 유전자가 본원에 개시된 뉴클레아제에 의해 연구되거나, 변경되거나, 표적화될 수 있다. 비-한정적 예는 미국출원 공개 2018/0282762A1 및 유럽 특허 EP3079726B1에 열거된 것이다.

표 A - 질병, 질환 및 그들의 연관된 유전자

질병/질환	유전자
종양(Neoplasia)	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR alpha; PPAR gamma; WT1 (윌름스 종양); FGF Receptor Family members (5 members: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (망막모세포종); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (Androgen Receptor); TSG101; IGF; IGF Receptor; Igf1 (4개의 변이체); gfi (3개의 변이체); Igf 1 Receptor; Igf 2 Receptor; Bax; Bcl2; 카스파아제 패밀리 (9 members: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
노인성 황반변성	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (ceruloplasmin); Timp3; cathepsinD; Vldlr; Ccr2
조현병(Schizophrenia)	Neuregulin1 (Nrg1); Erb4 (뉴레굴린 수용체); Complexin1 (Cplx1); Tph1 Tryptophan hydroxylase; Tph2 Tryptophan hydroxylase 2; Neurexin 1; GSK3; GSK3a; GSK3b
신경계, 신경퇴행성, 및 운동 장애	5-HTT (S1c6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
삼염기 반복 질환(Trinucleotide Repeat Disorders)	HTT (헌팅턴병); SBMA/SMAX1/AR (케네디병); FXN/X25 (프리드리히 운동실조증); ATX3 (마카도 조셉병(MJD)); ATXN1 및 ATXN2 (척수소뇌운동실조증); DMPK (근긴장성 이영양증); Atrophin-1 및 Atn1 (DRPLA병); CBP (Creb-BP - 완전불안증(global instability)); VLDLR (알츠하이머병); Atxn7; Atxn10
취약 X 증후군(Fragile X Syndrome)	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
세크레타제 관련 질환(Secretase Related Disorders)	APH-1 (alpha and beta); Presenilin (Psen1); nicastrin (Ncstn); PEN-2
기타	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
프리온 관련 질환(Prion related disorders)	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
중독	Prkce (알코올); Drd2; Drd4; ABAT (알코올); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (알코올)
자폐증	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; Neurexin 1; Fragile X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
알츠하이머병	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; Clusterin; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, Aquaporin 1); Uchl1; Uchl3; APP
염증	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/CARD15 for IBD; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
파킨슨병	x-Synuclein; DJ-1; LRRK2; Parkin; PINK1

[0113]

표 B - 질병, 질환 및 그들의 연관된 유전자

질병 카테고리	질병 및 연관된 유전자
혈액 및 혈액응고 질병 및 장애 (Blood and coagulation diseases and disorders)	빈혈 (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 노출 림프구 증후군(Bare lymphocyte syndrome) (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), Bleeding disorders (TBXA2R, P2RX1, P2X1); Factor H and factor H-like 1 (HF1, CFH, HUS); Factor V and factor VIII (MCFD2); Factor VII 결핍 (F7); Factor X 결핍 (F10); Factor XI 결핍 (F11); Factor XII 결핍 (F12, HAF); Factor XIIIa 결핍 (F13A1, F13A); Factor XIIIb 결핍 (F13B); 판코니 빈혈 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 혈구탐식성 림프조직구 증식 장애(Hemophagocytic lymphohistiocytosis disorders) (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); 혈우병 A (F8, F8C, HEMA); 혈우병 B (F9, HEMB), 출혈 장애 (PL, ATT, F5); 백혈구 결핍 및 질환 (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 겸상 적혈구성 빈혈 (HBB); 탈라세미아 (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1)
세포 조절장애 및 종양 질병 및 질환 (Cell dysregulation and oncology diseases and disorders)	B-세포 비호지킨 림프종 (BCL7A, BCL7); 백혈병 (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMP5, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN)
염증 및 면역 관련 질병 및 질환 (Inflammation and immune related diseases and Disorders)	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 자가면역 림프증식 증후군 (ALPS) (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 복합 면역결핍, (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV 감수성(susceptibility) 또는 감염 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCKR5 (CCR5)); 면역결핍 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI); Inflammation (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a,

[0114]

질병 카테고리	질병 및 연관된 유전자
	IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); 중증 복합 면역결핍증 (SCID _s)(JAK3, JAK1, DCLRE1C, ARTEMIS, SCDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4)
대사, 간, 신장 및 단백질 질병 및 질환 (Metabolic, liver, kidney and protein diseases and disorders)	아밀로이드 신경병증 (TTR, PALB); 아밀로이드증 (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); 경화증 (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988); 낭포성 섬유증 (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); 글리코겐 축적병 (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); 간 선종, 142330 (TCF1, HNF1A, MODY3), 간 부전, 조발성(early onset), 및 신경 질환 (SCOD1, SCO1), 간 리파아제 결핍 (LIPC), 간모세포종, 암 및 암종 (CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; 수질 낭포성 신장 질환(MCKD) (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); 페닐케톤뇨증 (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); 다낭성 신장 및 간 질환 (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63)
근육/골격 질병 및 질환 (Muscular / Skeletal diseases and disorders)	베커 근 이영양증 (DMD, BMD, MYF6), 뮐렌 근 이영양증 (DMD, BMD); 에머리-드레이푸스 근 이영양증 (LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); 안면경갑상완 근 이영양증 (FSHMD1A, FSHD1A); 근 이영양증 (FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); 골화석증 (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); 근 위축증(VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1)
피부과 질병 및 질환 (Dermatological diseases and disorders)	백색증 (TYR, OCA2, TYRP1, SLC45A2, LYST), 외배엽 이형성증 (EDAR, EDARADD, WNT10A), 엘러스-단로스 증후군 (COL5A1, COL5A2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, FKBP14), 비늘증-관련 질환 (FLG, STS, TGM1, ALOXE3/ALOX12B, KRT1, KRT10, ABCA12, KRT2, GJB2, TGM1, ABCA12, CYP4F22, ALOXE3, CERS3, NSHDL, EBP, MBTPS2, GJB2, SPINK5, AGHD5, PHYH, PEX7, ALDH3A2, ERCC2, ERCC3, GFT2H5, GBA), 색소 실조증 (IKBKG, NEMO), 결절성 경화증 (TSC1, TSC2), 조기 노화 증후군(POLR3A, PYCR1, LMNA, POLD1, WRN, DMPK)

[0115]

질병 카테고리	질병 및 연관된 유전자
신경계 및 신경 질환 및 질환 (Neurological and Neuronal diseases and disorders)	ALS (SOD1, ALS2, STX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); 알츠하이머병(APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 자폐증 (Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, Neurexin 1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); Fragile X 증후군 (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); 헌팅턴병 및 헌팅턴병 유사 질환 (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); 파킨슨병 (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); 레트 증후군(MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-Synuclein, DJ-1); 조현병 (Neuregulin1 (Nrg1), Erb4 (receptor for Neuregulin), Complexin1 (Cplx1), Tph1 Tryptophan hydroxylase, Tph2, Tryptophan hydroxylase 2, Neurexin 1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); 세크레타제 관련 질환 (APH-1 (alpha and beta), Presenilin (Psen1), nicastrin, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Natl, Nat2); 삼염기 반복 질환(HTT (헌팅턴병), SBMA/SMAX1/AR (케네디병), FXN/X25 (프레드리히 운동실조증), ATX3 (마카도-조셉병), ATXN1 and ATXN2 (척수소뇌 운동실조증), DMPK (근긴장성 이영양증), Atrophin-1 and Atn1 (DRPLA병), CBP (Creb-BP -완전불안증), VLDLR (알츠하이머병), Atxn7, Atxn10)
안구 질환 및 질환 (Ocular diseases and disorders)	노인성 황반변성(Abcr, Ccl2, Cc2, cp (ceruloplasmin), Timp3, cathepsinD, Vldlr, Ccr2); 백내장 (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 각막 혼탁 및 이영양증 (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 선천성 편평 각막 (KERA, CNA2); 녹내장(MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); 레버 선천성 흑암시 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 황반 이영양증 (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2)

[0116]

[0117]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및/또는 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 균등한 방법 및 물질이 본 발명의 구체예의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및/또는 물질이 하기에 기재된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하여 본 명세서가 우선할 것이다. 추가적으로, 재료, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것일 뿐이며, 반드시 한정하려는 것이 아니다.

[0118]

본 논의에서 달리 언급되지 않는 한, 본 발명의 구체예의 특징 또는 특징들의 특징적인 조건 또는 관계를 수식하는 "실질적으로" 및 "약"과 같은 형용사는 조건 또는 특징이 의도된 적용에 대한 구체예의 작동에 허용 가능한 허용 오차 내에서 정의됨을 의미하는 것으로 이해된다. 달리 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서 단어 "또는"은 배타적인 "또는"이 아닌 포괄적인 "또는"인 것으로 간주되며, 그것이 결합시키는 항목들 중 적어도 하나 및 임의의 조합을 나타낸다.

[0119]

본원에서 앞서 및 다른 곳에 사용되는 바와 같이 용어 "하나("a" 및 "an)"는 열거된 구성요소 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 단수의 사용은 복수를 포함한다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 용어 "하나" 및 "적어도 하나"는 본 출원에서 호환 가능하게 사용된다.

[0120]

달리 표지되지 않는 한, 본 교시를 더 잘 이해하기 위해 및 교시의 범위를 한정하지 않는 방식으로, 양, 백분율 또는 비율을 표현하는 모든 숫자, 및 본 명세서 및 청구범위에서 사용되는 다른 수치는 모든 경우에 용어 "약"

으로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 표시되지 않는 한, 하기 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 적어도, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 숫자의 수에 비추어 및 일반적인 반올림(ordinary rounding) 기법을 적용하여 해석되어야 한다.

[0121] 본 명세서에서 수치 범위가 기재되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 상한과 하한을 포함하여 이들 사이의 각각의 정수를 고려하는 것으로 이해된다.

[0122] 본 출원의 설명 및 청구범위에서, 동사 "포함하다(comprise)", "함유하다(include)" 및 "갖다" 각각 및 이들의 활용어는 동사의 목적어 또는 목적어들이 반드시 동사의 주어 또는 주어들의 구성요소, 요소 또는 부분의 완전한 열거가 아니라는 것을 나타내는 데 사용된다. 본원에서 사용되는 다른 용어는 당업계에 잘 알려진 의미로 정의되는 것으로 의도된다.

[0123] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 호환적으로 사용된다. 이들 용어는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중 어느 하나, 또는 그의 유사체인 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 알려지거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 비-한정적인 예는 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관(linkage) 분석으로부터 정의된 유전자좌, 엑손, 인트론, mRNA(messenger RNA), tRNA(transfer RNA), rRNA(ribosomal RNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short-hairpin RNA), miRNA(micro-RNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머이다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예를 들면, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 비-뉴클레오티드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예를 들면, 표지화 성분(labeling component)과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0124] 용어 "뉴클레오티드 유사체(nucleotide analog)" 또는 "변형된 뉴클레오티드"는 뉴클레오시드의 질소 함유 염기(예를 들어, 시토신(C), 티민(T) 또는 우라실(U), 아데닌(A) 또는 구아닌(G))에 또는 그 위에, 뉴클레오시드의 당 모이어티(예를 들어, 리보오스, 데옥시리보오스, 변형된 리보오스, 변형된 데옥시리보오스, 6원 당 유사체, 또는 개방-사슬 당 유사체)에 또는 그 위에, 또는 인산염에 하나 이상의 화학적 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 뉴클레오티드를 의미한다. 본원에 기재된 RNA 서열 각각은 하나 이상의 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, 하기 뉴클레오티드 식별자가 언급된 뉴클레오티드 염기(들)를 나타내기 위해 사용된다:

뉴클레오티드 참조부호	해당 염기(Base(s) represented)			
A	A			
C		C		
G			G	
T				T
W	A			T
S		C	G	
M	A	C		
K			G	T
R	A		G	
Y		C		T
B		C	G	T
D	A		G	T
H	A	C		T
V	A	C	G	
N	A	C	G	T

[0126]

[0127]

본원에서 사용된, 용어 "표적화 서열(targeting sequence)" 또는 "표적화 분자"는 특정 표적 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 분자를 의미하고, 예를 들어, 표적화 서열은 표적화 서열의 길이에 따라 표적화되는 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 표적화 서열 또는 표적화 분자는 예를 들어, 스캐폴드 부분을 통해 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 표적화 RNA 분자의 일부일 수 있으며, 상기 표적화 서열은 CRISPR 복합체의 표적화 부분(targeting portion), 예를 들어, 스페이서 부분으로 작용한다. 표적화 서열을 갖는 RNA 분자가 CRISPR 뉴클레아제와 동시에 존재하는 경우, 상기 RNA 분자는 단독으로, 또는 추가적인 하나 이상의 RNA 분자(예를 들면, tracrRNA 분자)와 조합되어, 특정 표적 서열에 대해 CRISPR 뉴클레아제를 표적화할 수 있다. 비-한정적 예로서, CRISPR RNA 분자의 가이드 서열 부분, 또는 단일 가이드 RNA 분자가 표적화 분자로 작용할 수 있다. 각각의 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. 표적화 서열은 임의의 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다.

[0128]

본원에 사용된, 용어 "표적화(targets)"는 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 표적화 서열 또는 표적화 분자의 우선적인 혼성화를 의미한다. 용어 "표적화"는 가변 혼성화 효율(variable hybridization efficiency)을 포함하여, 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산의 우선적인 표적화가 존재하나, 온타겟 혼성화 외에, 의도하지 않은 오프타겟 혼성화도 일어나는 것으로 이해된다. RNA 분자가 서열을 표적화하는 경우, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제 분자의 복합체는 뉴클레아제 활성을 위해 상기 서열을 표적화하는 것으로 이해된다.

[0129]

RNA 분자의 "가이드 서열 부분(guide sequence portion)"은 특정 표적 DNA 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 의미하고, 예를 들어, 가이드 서열 부분은 가이드 서열 부분의 길이를 따라 표적화되는 DNA 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 가이드 서열 부분은 길이가 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 대략 17-50, 17-49, 17-48, 17-47, 17-46, 17-45, 17-44, 17-43, 17-42, 17-41, 17-40, 17-39, 17-38, 17-37, 17-36, 17-35, 17-34, 17-33, 17-31, 17-30, 17-29, 17-28, 17-27, 17-26, 17-25, 17-24, 17-22, 17-21, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-22, 18-20, 20-21, 21-22, 또는 17-20개 뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 가이드 서열의 전장은 가이드 서열의 길이를 따라 표적화되는 DNA 서열에 완전히 상보적이다. 가이드 서열 부분은 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 RNA 분자의 일부일 수 있고, 가이드 서열 부분이

CRISPR 복합체의 DNA 표적화 부분으로 작용한다. 가이드 서열 부분을 갖는 RNA 분자가 단독으로, 또는 추가적인 하나 이상의 RNA 분자(예를 들면, tracrRNA 분자)와 조합된 CRISPR 분자와 동시에 존재할 때, 상기 RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제를 특정 표적 DNA 서열에 표적화할 수 있다. 따라서, CRISPR 복합체는 가이드 서열 부분을 갖는 RNA 분자가 CRISPR 뉴클레아제에 직접 결합하거나, 가이드 서열 부분 및 추가적인 하나 이상의 RNA 분자를 갖는 RNA 분자가 CRISPR 뉴클레아제에 결합함으로써 형성될 수 있다. 각각의 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. 가이드 서열 부분은 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다. 따라서, "가이드 서열 부분"을 포함하는 분자는 표적화 분자의 일 유형이다. 각각의 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. RNA 분자는 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다. 따라서, "가이드 서열 부분"을 포함하는 분자는 표적화 분자의 일 유형(type)이다. 본 출원 전반에 걸쳐, 용어 "가이드 분자", "RNA 가이드 분자", "가이드 RNA 분자", 및 "gRNA 분자"는 가이드 서열 부분을 포함하는 분자와 동의어이고, 용어 "스페이서"는 "가이드 서열 부분"과 동의어이다.

[0130] 복수의 세포에 존재하는 DNA 서열을 표적화하는 상황에서, 표적화는 하나 이상의 세포에서 RNA 분자의 가이드 서열 부분과 상기 서열의 혼성화를 포함하고, 또한 복수의 세포에서 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 RNA 분자와 표적 서열의 혼성화를 포함하는 것으로 이해된다. 따라서, RNA 분자가 복수의 세포에서 서열을 표적화하는 경우, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체는 하나 이상의 세포에서 표적 서열과 혼성화하는 것으로 이해되고, 또한 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 표적 서열과 혼성화할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체는 하나 이상의 세포에서 표적 서열과의 혼성화와 관련하여 이중 가닥 절단을 도입하고, 또한 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 표적 서열과의 혼성화와 관련하여 이중 가닥 절단을 도입할 수 있는 것으로 이해된다. 본원에서 사용된, 용어 "변형된 세포(modified cell)"는 이중 가닥 절단이 표적 서열과의 혼성화, 즉 온타겟 혼성화의 결과로서 RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체에 의해 영향을 받는 세포를 의미한다.

[0131] 본원에서 사용된, 용어 "야생형(wild type)"은 당업자에 의해 이해되는 당업계의 용어이며 돌연변이체 또는 변이체 형태와 구별되는 자연에서 발생하는 유기체, 스트레인(strain), 유전자 또는 특징의 전형적인 형태를 의미한다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 또는 뉴클레오티드의 서열이 야생형 서열을 지칭하는 경우, 변이체는, 예를 들어 치환, 결실, 삽입을 포함하는, 해당 서열의 변이체를 지칭한다. 본 발명의 구체예에서, 조작된 CRISPR 뉴클레아제는 표 1에 표시된 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형(예를 들어, 치환, 결실, 및/또는 삽입)을 포함하는 변이체 CRISPR 뉴클레아제이다.

[0132] 용어 "비-천연(non-naturally occurring)" 또는 "조작된(engineered)"은 호환적으로 사용되며 인간 조작을 나타낸다. 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 지칭할 때 상기 용어는 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 자연에서 자연적으로 회합되고 자연에서 발견되는 바와 같은 적어도 하나의 다른 구성요소가 적어도 실질적으로 없다는 것을 의미할 수 있다.

[0133] 본원에서 사용된, 용어 "아미노산"은 글리신, D 또는 I형, 광학 이성질체, 및 아미노산 유사체 및 펩티도미메틱(peptidomimetic)을 포함한, 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산을 포함한다.

[0134] 본원에서 사용된, "계놈 DNA"는 목적 세포 또는 세포들에 존재하는 선형 및/또는 염색체 DNA 및/또는 플라스미드 또는 기타 염색체의 DNA 서열을 지칭한다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 원핵 세포이다. 일부 구체예에서, 방법은 계놈 DNA 서열의 미리-결정된 표적 부위에서 이중-가닥 절단(DSB)을 생성하여, 계놈의 표적 부위(들)에서 DNA 서열의 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 초래한다.

[0135] "진핵" 세포는 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0136] 본원에서 사용된, 용어 "뉴클레아제"는 핵산의 뉴클레오티드 서브유닛 사이의 포스포디에스테르 결합을 절단할 수 있는 효소를 지칭한다. 뉴클레아제는 천연 공급원으로부터 단리되거나 유래될 수 있다. 천연 공급원은 임의의 살아있는 유기체일 수 있다. 대안적으로, 뉴클레아제는 포스포디에스테르 결합 절단 활성을 유지하는 변형된 또는 합성 단백질일 수 있다.

[0137] 본원에서 사용된, 용어 "PAM"은 표적화된 DNA 서열에 근접하게 위치하고 CRISPR 뉴클레아제에 의해 인식되는 표적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. PAM 서열은 뉴클레아제 실체(identity)에 따라 다를 수 있다.

[0138] 본원에서 사용된, 용어 "돌연변이 장애" 또는 "돌연변이 질환"은 돌연변이에 의해 유발된 유전자의 기능장애와

관련된 임의의 장애 또는 질환을 지칭한다. 돌연변이 장애로서 나타나는 기능장애 유전자는 그의 대립유전자의 적어도 하나에 돌연변이를 포함하고 "질병-연관 유전자(disease-associated gene)"로 지칭된다. 돌연변이는 질병-연관 유전자의 임의의 부분에, 예를 들어 조절, 코딩, 또는 비-코딩 부분에 있을 수 있다. 돌연변이는 돌연변이의 임의의 부류, 예컨대, 치환, 삽입, 또는 결실일 수 있다. 질병-연관 유전자의 돌연변이는 임의의 유형의 돌연변이, 예컨대, 열성, 우성 음성, 기능 획득(gain-of-function), 기능 손실(loss-of-function), 또는 유전자 산물의 반수체 기능부전(haploinsufficiency)을 야기하는 돌연변이의 메커니즘에 따라 장애 또는 질환으로 나타날 수 있다.

[0139] 당업자는 본 발명의 구체예가 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있고 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 활성화하여 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제를 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 인접한 목적 표적 DNA 부위로 표적화할 수 있는 스캐폴드 부분을 포함하는 RNA 분자를 개시한다는 것을 이해할 것이다. OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제는 목적 표적 DNA 부위에 상보성을 갖는 가이드 서열 부분(즉, RNA 스페이서)에 의해 목적 DNA 부위로 표적화된다. 그 후, 뉴클레아제는 표적 DNA의 절단을 매개하여 프로토스페이서 표적 부위 내에 이중 가닥 절단을 생성한다.

[0140] 용어 "단백질 결합 서열" 또는 "뉴클레아제 결합 서열"은 CRISPR 뉴클레아제와 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 서열을 의미한다. 통상의 기술자는 CRISPR 뉴클레아제와 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 스캐폴드 RNA 또는 tracrRNA가 단백질 또는 뉴클레아제 결합 서열을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0141] CRISPR 뉴클레아제의 "RNA 결합 부분"은 RNA 분자, 예를 들어 sgRNA의 RNA 스캐폴드 부분의 뉴클레아제 결합 서열에 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 CRISPR 뉴클레아제의 부분을 의미한다. CRISPR 뉴클레아제의 "활성 부분" 또는 "활성 부분"은 예를 들어 DNA-표적화 RNA 분자와 복합체일 때, DNA 분자에 이중 가닥 절단을 형성하는 CRISPR 뉴클레아제의 부분을 의미한다.

[0142] 용어 "RNA 스캐폴드" 또는 "스캐폴드"는 tracrRNA 부분에 공유결합으로 연결된 crRNA 부분을 포함하는 비-천연 분자의 부분을 의미한다. 본원에 사용된, "crRNA 부분"은 crRNA 반복 서열을 포함한다. 본원에 사용된, "tracrRNA 부분"은 tracrRNA 역-반복 서열(anti-repeat sequence)을 포함한다. tracrRNA 부분은 tracrRNA 역-반복 서열에 연결된 추가적인 tracrRNA 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 서열은 넥서스(nexus), 헤어핀, 또는 넥서스, 헤어핀 또는 tracrRNA 역-반복 서열의 상류 또는 하류에 있는 기타 tracrRNA 서열을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 따라서, RNA 스캐폴드의 tracrRNA 부분은 추가 tracrRNA 섹션에 선택적으로 연결되는, 역-반복 서열을 포함한다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같이, RNA 스캐폴드 부분 및 RNA 가이드 서열 부분(또는 RNA 스페이서 부분)을 포함하는 RNA 분자는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자로 작용한다. sgRNA의 RNA 스캐폴드 부분은 CRISPR 뉴클레아제에 특이적으로 결합하여 활성화하고, sgRNA의 RNA 스페이서 부분은 CRISPR 뉴클레아제를 DNA 표적 부위로 표적화한다. 예를 들어, sgRNA 분자는 RNA 스캐폴드의 crRNA 반복 서열 부분으로의 가이드 서열 부분의 공유결합에 의해 형성될 수 있다.

[0144] 따라서, 본 발명의 구체예에서, RNA 분자는 OMNI-103 CRISPR 뉴클레아제에 결합하고 그를 표적화할 수 있는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 함께 형성하는 스캐폴드 부분과 스페이서 부분의 합성 융합체로서 설계될 수 있다. Jinek et al., Science(2012)를 참조한다.

[0145] 본 발명의 구체예에는 또한 별도의 crRNA 분자 및 별도의 tracrRNA 분자를 활용하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있다. 이러한 구체예에서, crRNA 분자는 crRNA 분자의 crRNA 반복 서열 부분과 tracrRNA 분자의 tracrRNA 역-반복 서열 부분 사이의 적어도 부분적인 혼성화를 통해 tracrRNA 분자와 혼성화할 수 있다. 이러한 부분적 혼성화는 또한, 혼성화된 RNA 뉴클레오티드를 "상부(upper)" 스텝과 "하부(lower)" 스텝으로 분리하는 전형적인 벌지(bulge)를 포함할 수 있다. 별도의 crRNA 및 tracrRNA 분자는 본원에 기술된 본 발명의 특정 적용에 유리할 수 있다.

[0146] 본 발명의 구체예에서, RNA 분자의 스캐폴드 부분은 RNA 분자의 구조를 추가로 한정할 수 있는 "넥서스(nexus)" 영역 및/또는 "헤어핀" 영역을 포함할 수 있다. (Briner et al., Molecular Cell (2014) 참조).

[0147] 본원에서 사용된, 용어 "직접 반복 서열(direct repeat sequence)"은 특정한 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 2개 이상의 반복을 의미한다.

[0148] 본원에서 사용된, CRISPR 뉴클레아제와 "상호작용"하거나 CRISPR 뉴클레아제와 "결합"할 수 있는 RNA 서열 또는

분자는 CRISPR 뉴클레아제와 CRISPR 복합체를 형성하는 RNA 서열 또는 분자 능력을 의미한다.

[0149] 본원에서 사용된, 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 2개의 서열 또는 분자 사이의 관계(즉, 융합, 혼성화)를 의미한다. 본 발명의 구체예에서, RNA 분자가 프로모터에 작동 가능하게 연결된 경우, RNA 분자 및 프로모터는 둘 다 의도된 방식으로 기능하도록 허용된다.

[0150] 본원에서 사용된, 용어 "이종 프로모터(heterologous)"는 촉진되는 분자 또는 경로와 함께 자연적으로 발생하지 않는 프로모터를 지칭한다.

[0151] 본원에서 사용되는 바와 같이, 서열 또는 분자는 서열 또는 분자간에 뉴클레오티드 또는 아미노산의 X%가 동일하고 동일한 상대적 위치에 있는 경우, 또 다른 서열 또는 분자에 대해 X% "서열 동일성"을 갖는다. 예를 들어, 제2 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 제1 뉴클레오티드 서열은 동일한 상대적 위치에서 나머지 서열과 동일한, 적어도 95%의 뉴클레오티드를 가질 것이다. 비-한정적인 예로서, 서열 동일성은 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘을 적용하여 제1 뉴클레오티드 서열의 제2 뉴클레오티드 서열에 대한 정렬을 생성함으로써 결정될 수 있다.

[0152] 전달

[0153] 본원에 기재된 CRISPR 뉴클레아제 또는 CRISPR 조성물은 단백질, DNA 분자, RNA 분자, 리보핵단백질(ribonucleoprotein: RNP), 핵산 벡터, 또는 이들의 임의의 조합으로서 전달될 수 있다. 일부 구체예에서, RNA 분자는 화학적 변형을 포함한다. 적합한 화학적 변형의 비-한정적 예는 2'-O-메틸(M), 2'-O-메틸, 3'-포스포티오에이트(PS) 또는 2'-O-메틸, 3'티오PS(MSP), 슈도우리딘, 및 1-메틸 슈도-우리딘을 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구체예를 나타낸다.

[0154] 본원에 기재된 CRISPR 뉴클레아제 및/또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 선택적으로 추가적인 단백질(예를 들어, ZFP, TALEN, 전사 인자, 제한 효소) 및/또는 가이드 RNA와 같은 뉴클레오티드 분자는 임의의 적합한 수단에 의해 표적 세포로 전달될 수 있다. 표적 세포는 임의의 환경에서, 예를 들어 단리되거나 단리되지 않은, 배양물, 인 비트로, 엑스 비보, 인 비보, 또는 인 플랜타(in planta)로 유지되는, 임의의 유형의 세포, 예를 들어 전핵 또는 원핵 세포일 수 있다.

[0155] 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA 및 가이드 분자의 RNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, 가이드의 RNA 및 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, 가이드 RNA, 및 예를 들어, 상동성 기반 복구(HDR)를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA 및 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA, 및 예를 들어, 상동성 기반 복구(HDR)를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다.

[0156] 임의의 적합한 바이러스 벡터 시스템이 RNA 조성물을 전달하는 데 사용될 수 있다. 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법이 세포(예를 들어, 포유동물 세포, 식물 세포 등) 및 표적 조직에서 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제를 도입하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 또한 CRISPR 뉴클레아제 단백질을 코딩하는 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제 단백질을 인 비트로에서 세포에 투여하는 데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제는 생체내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo) 유전자 치료법 용도를 위해 투여된다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 네이키드(naked) 핵산, 및 리포좀 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 유전자 치료법 절차에 대한 리뷰를 위해, Anderson, Science (1992); Nabel and Felgner, TIBTECH (1993); Mitani and Caskey, TIBTECH (1993); Dillon, TIBTECH (1993); Miller, Nature (1992); Van Brunt, Biotechnology (1988); Vigne et al., Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer and Perricaudet, British Medical Bulletin (1995); Haddada et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1995); 및 Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)을 참조한다.

[0157] 핵산 및/또는 단백질의 비-바이러스 전달의 방법은 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 바이오리스틱(biolistic), 입자 총 가속화, 비로좀(virosome), 리포좀, 면역리포좀, 다중양이온 또는 지질:핵산 접합체, 인공비리온, 및 핵산의 작용체-증강 흡수(agent-enhanced uptake)를 포함하거나 또는 박테리아 또는 바이러스(예를 들어, 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 리조비움 종 NGR234(*Rhizobium* sp. NGR234), 시노리조보이움멜로티

(*Sinorhizobium meliloti*), 메조리조비움 로티(*Mesorhizobium loti*), 담배 모자이크 바이러스, 감자 바이러스 X, 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 및 카사바 베인 모자이크 바이러스(cassava vein mosaic virus))에 의해 식물 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, Chung et al. Trends Plant Sci. (2006)을 참조한다. 예를 들어, Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 사용하는 초음파천공(sonoporation)이 또한 핵산의 전달에 사용될 수 있다. 단백질 및/또는 핵산의 양이온성-지질 매개 전달이 또한 생체내, 또는 시험관내 전달 방법으로서 고려된다. Zuris et al., Nat. Biotechnol. (2015), Coelho et al., N. Engl. J. Med. (2013); Judge et al., Mol. Ther. (2006); 및 Basha et al., Mol. Ther. (2011)을 참조한다.

[0158] 비-바이러스 벡터, 예컨대, 트랜스포존-기반 시스템(transposon-based system), 예를 들어 재조합 Sleeping Beauty 트랜스포존 시스템 또는 재조합 PiggyBac 트랜스포존 시스템이 또한 표적 세포로 전달될 수 있고, 표적 세포에서 조성물의 분자의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 조성물의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 전위(transposition)에 이용될 수 있다.

[0159] 추가적인 예시적 핵산 전달 시스템은 Amaxa® Biosystems(독일 쾰른 소재), Maxcyte, Inc.(미국 메릴랜드주 록빌 소재), BTX Molecular Delivery Systems(미국 매사추세츠주 홀리스틴 소재) 및 Copernicus Therapeutics Inc.,(예를 들어, 미국 특허 제6,008,336호 참조)에 의해 제공되는 것을 포함한다. 리포펙션은, 예를 들어 미국 특허 제5,049,386호, 미국 특허 제4,946,787호; 및 미국 특허 제4,897,355호에 기재되어 있으며, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예를 들어, Transfectam.TM., Lipofectin.TM. 및 Lipofectamine.TM. RNAiMAX). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 PCT 국제 공개 WO/1991/017424 및 WO/1991/016024에 개시된 것들을 포함한다. 전달은 세포(생체의 투여) 또는 표적 조직(생체내 투여)에 대한 것일 수 있다.

[0160] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하는, 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Crystal, Science (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. (1994); Gao and Huang, Gene Therapy (1995); Ahmad and Allen, Cancer Res., (1992); 미국 특허 제4,186,183호; 제4,217,344호; 제4,235,871호; 제4,261,975호; 제4,485,054호; 제4,501,728호; 제4,774,085호; 제4,837,028호; 및 제4,946,787호 참조).

[0161] 추가적인 전달 방법은 전달될 핵산을 EnGeneIC 전달 비히클(EDV) 내로 패키징하는 것의 사용을 포함한다. 이들 EDV는 이중특이적 항체를 사용하여 표적 조직으로 특이적으로 전달되며, 상기 항체의 하나의 암(arm)은 표적 조직에 대한 특이성을 갖고, 나머지 암은 EDV에 대한 특이성을 갖는다. 항체가 EDV를 표적 세포 표면으로 가져간 다음, EDV가 엔도시토시스(endocytosis)에 의해 세포 내로 들어간다. 일단 세포 안에 들어가면, 내용물이 방출된다(MacDiamid et al., Nature Biotechnology (2009) 참조).

[0162] 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 신체의 특정 세포에 바이러스를 표적화하고 바이러스 페이로드(viral payload)를 핵으로 수송하기 위한 고도로 진화된 프로세스를 이용한다. 바이러스 벡터는 환자에게 직접 투여될 수 있거나(생체내) 시험관내에서 세포를 치료하는 데 사용될 수 있고 변형된 세포가 환자에게 투여된다(생체외). 핵산의 전달을 위한 종래 바이러스 기반 시스템은 유전자 전달을 위한 재조합 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아 바이러스 및 단순 포진 바이러스(herspes simplex virus) 벡터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그러나, 본원에 기재된 RNA 조성물의 전달을 위해서는 RNA 바이러스가 바람직하다. 추가적으로, 높은 형질도입(transduction) 효율이 다수의 다양한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다. 본 발명의 핵산은 비-통합 렌티바이러스(non-integrating lentivirus)에 의해 전달될 수 있다. 선택적으로, 렌티바이러스를 이용한 RNA 전달이 이용된다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, 가이드의 RNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, 가이드 RNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, 가이드 RNA 및/또는, 예를 들어 상동성 기반 복구를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA, 및 공여체 주형을 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, DNA-표적화 RNA, 및 tracrRNA, 및, 예를 들어 상동성 기반 복구를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다.

[0163] 전술된 바와 같이, 본원에 기재된 조성물은 비-통합 렌티바이러스 입자 방법, 예를 들어 LentiFlash® 시스템을 사용하여 표적 세포로 전달될 수 있다. 이러한 방법은 표적 세포로의 RNA의 전달이 표적 세포 내부에서 본원에

기재된 조성물의 조립을 초래하도록, 표적 세포 내로 mRNA 또는 다른 유형의 RNA를 전달하기 위해 이용될 수 있다. 또한 PCT 국제 공개 WO2013/014537, WO2014/016690, WO2016185125, WO2017194902, 및 WO2017194903을 참조한다.

[0164] 레트로바이러스의 향성(tropism)은 외래 외피 단백질을 포함시킴으로써 변경되어, 표적 세포의 잠재적 표적 집단을 확장시킬 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 형질도입시키거나 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 벡터이고 전형적으로 높은 바이러스 역가를 가져온다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 다르다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6 내지 10 kb의 외래 서열에 대한 패키징 능력을 갖는 시스-작용 장형 말단 반복부(cis-acting long terminal repeats)로 구성된다. 최소 시스-작용 LTR이 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 그 후, 표적 세포 내로 치료용 유전자를 통합시켜 영구적인 이식유전자(transgene) 발현을 제공하기 위해 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 MuLV(murine leukemia virus), GaLV(gibbon ape leukemia virus), SIV(Simian Immunodeficiency virus), HIV(Human Immunodeficiency virus), 및 이들의 조합에 기반한 것들을 포함한다(예를 들어, Buchscher Panganiban, J. Virol. (1992); Johann et al., J. Virol. (1992); Sommerfelt et al., Virol. (1990); Wilson et al., J. Virol. (1989); Miller et al., J. Virol. (1991); PCT 국제 공개 WO/1994/026877A1 참조).

[0165] 적어도 6개의 바이러스 벡터 접근법이 현재 임상 시험에서 유전자 전달을 위해 이용 가능하며, 이는 형질도입체(transducing agent)를 생성하기 위해 헬퍼 세포주 내로 삽입된 유전자에 의한 결함 벡터(defective vector)의 보완을 포함하는 접근법을 이용한다.

[0166] pLASN 및 MFG-S는 임상 시험에서 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다(Dunbar et al., Blood (1995); Kohn et al., Nat. Med. (1995); Malech et al., PNAS (1997)). PA317/pLASN은 유전자 치료법 시험에서 사용된 최초의 치료용 벡터이었다(Blaese et al., Science (1995)). 50% 이상의 형질도입 효율이 MFG-S 패키징된 벡터에서 관찰되었다(Ellem et al., Immunol Immunother. (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. (1997)).

[0167] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는 데 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스, AAV를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 psi.2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료법에서 사용되는 바이러스 벡터는 일반적으로 바이러스 입자 내로 핵산 벡터를 패키징하는 생산체 세포주(producer cell line)에 의해 생성된다. 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 내로의 후속 통합(적용 가능한 경우)을 위해 요구되는 최소 바이러스 서열을 포함하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 결여된(missing) 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료법에서 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 게놈 내로의 통합을 위해 요구되는 AAV 게놈으로부터의 ITR(inverted terminal repeat) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 세포주에서 패키징되며, 이는 나머지 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 코딩하나, ITR 서열은 없는 헬퍼 플라스미드를 포함한다. 상기 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부재로 인해 유의한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다. 추가적으로, AAV는 바큇로바이러스(baculovirus) 시스템을 사용하여 임상 규모로 생산될 수 있다(미국 특허 번호 제7,479,554호 참조).

[0168] 여러 유전자 치료법 적용에서, 유전자 치료법 벡터는 특정 조직 유형으로 고도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 리간드를 바이러스의 외부 표면 상의 바이러스 외피(viral coat) 단백질과의 융합 단백질로서 발현시킴으로써 주어진 세포 유형에 대해 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 목적 세포 유형의 세포 상에 존재하는 것으로 알려진 수용체에 대해 친화도를 갖도록 선택된다. 예를 들어, Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995)은 MMLV(Molony murine leukemia virus)가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린(hereregulin)을 발현하도록 변형될 수 있고, 재조합 바이러스가 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시킨다는 것을 보고하였다. 이 원리는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 확장될 수 있고, 여기서 표적 세포는 수용체를 발현하고 바이러스는 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현한다. 예를 들어, 사상 파아지(filamentous phage)는 실질적으로 임의의 선택된 세포성 수용체에 대해 특이적 결합 친화도를 갖는 항체 단편(예를 들어, FAB 또는 Fv)을 표시하도록 조작될 수 있다. 전술된 내용은 주로 바이러스 벡터에 적용되지만, 동일한 원리가 비-바이러스 벡터에 적용될 수 있다. 이러한 벡터는 특정 표적 세포에 의한 흡수에 유리한 특정 흡수 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.

[0169] 유전자 치료법 벡터는 하기 기재된 바와 같이, 전형적으로 전신 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 진피

하, 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의해, 개별 환자에 대한 투여에 의해 생체내 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 개별 환자로부터 외식된 세포(예를 들어, 림프구, 골수 흡입물, 조직 생검)와 같은 생체의 세포 또는 범용 공여체 조혈 줄기 세포로 전달된 후, 보통 벡터를 내포하는 세포에 대한 선택 후에, 환자 내로의 세포의 재이식이 이어질 수 있다. 일부 구체예에서, 생체내 및 생체의 mRNA의 전달, 및 RNP 전달이 이용될 수 있다.

[0170] 진단, 연구, 또는 유전자 치료법(예를 들어, 숙주 유기체 내로의 형질감염된 세포의 재주입을 통한 유전자 치료법)을 위한 생체의 세포 형질감염은 당업자에게 잘 알려져 있다. 바람직한 구체예에서, 세포를 대상 유기체로부터 분리하고, RNA 조성물로 형질감염시키고, 대상 유기체(예를 들어, 환자) 내로 다시 재주입한다. 생체의 형질감염에 적합한 다양한 세포 유형은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 환자로부터 세포를 어떻게 분리하고 배양하는지의 논의에 대해, Freshney, "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (6th edition, 2010) 및 그에서 인용된 참조문헌 참조).

[0171] 적합한 세포는 진핵 및 원핵 세포 및/또는 세포주를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 세포 또는 이러한 세포로부터 생성된 세포주의 비-한정적 예는 COS, CHO(예를 들어, CHO--S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293(예를 들어, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), 및 perC6 세포, 임의의 식물 세포(분화 또는 미분화)뿐만 아니라, 곤충 세포, 예컨대, 스포도테라푸기페르다(*Spodoptera frugiperda*(Sf)), 또는 진균 세포, 예컨대, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pichia*) 및 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)를 포함한다. 특정 구체예에서, 세포주는 CHO-K1, MDCK 또는 HEK293 세포주이다. 추가적으로, 1차 세포가 분리되고, 뉴클레아제(예를 들어, ZFN 또는 TALEN) 또는 뉴클레아제 시스템(예를 들어, CRISPR)에 의한 처리 후 치료대상 대상체 내로의 재도입을 위해 생체외에서 이용될 수 있다. 적합한 1차 세포는 말초혈액 단핵 세포(PBMC), 및 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포와 같은 기타 혈액 세포 서브셋을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 세포는 또한 예로서, 배아 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 조혈 줄기 세포(CD34+), 신경 줄기 세포 및 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포를 포함한다.

[0172] 일 구체예에서, 줄기 세포는 세포 형질감염 및 유전자 치료법을 위한 생체외 절차에서 사용된다. 줄기 세포를 사용하는 장점은 줄기 세포가 인 비트로에서 다른 세포 유형으로 분화될 수 있거나 골수에서 생착될 포유동물(예컨대, 세포의 공여체) 내로 도입될 수 있다는 것이다. 인 비트로에서 CD34+ 세포를 GM-CSF, IFN-감마 및 TNF-알파와 같은 사이토카인을 사용하여 임상적으로 중요한 면역 세포 유형으로 분화시키는 방법이 알려져 있다(비한정적인 예로서, Inaba et al., J. Exp. Med. (1992) 참조).

[0173] 줄기 세포는 알려진 방법을 이용하여 형질도입 및 분화를 위해 분리된다. 예를 들어, 줄기 세포는 원치 않는 세포, 예컨대, CD4+ 및 CD8+(T 세포), CD45+(panB 세포), GR-1(과립구), 및 Iad(분화 항원 제시 세포)에 결합하는 항체로 골수 세포를 패닝(panning)함으로써 골수 세포로부터 분리된다(비한정적 예로서, Inaba et al., J. Exp. Med. (1992) 참조). 변형된 줄기 세포가 또한 일부 구체예에서 사용될 수 있다.

[0174] 특히, 본원에 기재된 CRISPR 조성물은 유사분열-후(post-mitotic) 세포 또는 활발히 분열 중이 아닌 임의의 세포, 예를 들어 정지된(arrested) 세포에서 게놈 편집에 적합할 수 있다. 본 발명의 CRISPR 뉴클레아제를 사용하여 편집될 수 있는 유사분열-후 세포의 예는 근육세포, 심근세포, 간세포, 골세포 및 신경세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0175] 치료 RNA 조성물을 포함하는 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 리포좀 등)가 또한 생체내에서 세포의 형질도입을 위해 유기체에 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 RNA 또는 mRNA가 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용 및 전기천공을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 분자를 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적 접촉으로 도입하기 위해 보통 사용되는 임의의 경로에 의한다. 이러한 핵산을 투여하는 적합한 방법이 이용 가능하고 당업자에게 잘 알려져 있으며, 하나 초과 경로가 특정 조성물을 투여하는 데 이용될 수 있지만, 특정 경로가 종종 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0176] 면역 세포(예를 들어, T-세포) 내로의 이식유전자의 도입에 적합한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2009/0117617호를 참조한다.

[0177] 약학적으로 허용 가능한 담체는 부분적으로 투여되는 특정 조성물 및 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 하기 기재된 바와 같이, 약학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 이용 가능하다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989 참조).

[0178] 상동 재조합에 의한 DNA 복구

[0179] 용어 "상동성 기반 복구(homology-directed repair)" 또는 "HDR"은, 예를 들어 DNA에서 이중-가닥 절단 및 단일-가닥 절단의 복구 동안, 세포 내에서 DNA 손상을 복구하기 위한 메커니즘을 지칭한다. HDR은 뉴클레오티드 서열 상동성을 필요로 하며 이중-가닥 또는 단일 절단이 일어난 서열(예를 들어, DNA 표적 서열)을 복구하기 위해 "핵산 주형"(핵산 주형 또는 공여체 주형은 본 명세서에서 호환적으로 사용됨)을 사용한다. 이는, 예를 들어 핵산 주형으로부터 DNA 표적 서열로 유전 정보의 전달을 초래한다. HDR은 핵산 주형 서열이 DNA 표적 서열과 상이하고 핵산 주형 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 일부 또는 전부가 DNA 표적 서열 내로 포함되는 경우, DNA 표적 서열의 변경(예를 들어, 삽입, 결실, 돌연변이)을 초래할 수 있다. 일부 구체예에서, 전체 핵산 주형 폴리뉴클레오티드, 핵산 주형 폴리뉴클레오티드의 일부, 또는 핵산 주형의 카피가 DNA 표적 서열의 부위에서 통합된다.

[0180] 용어 "핵산 주형(nucleic acid template)" 및 "공여체(donor)"는 게놈 내로 삽입되거나 카피되는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 핵산 주형은, 표적 핵산에서 주형에 부가될 것이거나 변화의 주형이 될 것이거나 표적 서열을 변형하기 위해 사용될 수 있는, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 핵산 주형 서열은 임의의 길이, 예를 들어 2 내지 10,000개 뉴클레오티드 길이(또는 그 사이 또는 초과)의 임의의 정수 값), 바람직하게는 약 100 내지 1,000개 뉴클레오티드 길이(또는 그 사이의 임의의 정수), 더 바람직하게는 약 200 내지 500개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 핵산 주형은 단일 가닥 핵산, 이중 가닥 핵산일 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은, 예를 들어 표적 위치의 표적 핵산의 야생형 서열에 상응하는, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은, 예를 들어 표적 위치의, 표적 핵산의 야생형 서열에 상응하는, 예를 들어 하나 이상의 리보뉴클레오티드의, 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은 변형된 리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0181] 예를 들어, 돌연변이체 유전자의 교정을 위한 또는 야생형 유전자의 증가된 발현을 위한, 외인성 서열(또한 "공여체 서열", "공여체 주형" 또는 "공여체"로도 불림)의 삽입이 또한 수행될 수 있다. 공여체 서열은 전형적으로 이것이 배치되는 게놈 서열과 동일하지 않음은 용이하게 명백할 것이다. 공여체 서열은 목적 위치에서 효율적인 HDR을 가능하게 하기 위해 상동성인 2개 영역에 측접하는(flanking) 비-상동성 영역을 포함할 수 있다. 추가적으로, 공여체 서열은 세포 염색질 중 목적 영역과 상동성이 아닌 서열을 포함하는 벡터 분자를 포함할 수 있다. 공여체 분자는 세포 염색질과 상동성인 수개의 불연속 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일반적으로 목적 영역에 존재하지 않는 서열의 표적화된 삽입을 위해, 상기 서열은 공여체 핵산 분자에 존재하고, 목적 영역 내 서열과 상동성인 영역에 측접할 수 있다.

[0182] 공여체 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 및/또는 이중-가닥일 수 있고, 선형 또는 환형 형태로 세포 내에 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2010/0047805호; 제2011/0281361호; 제2011/0207221호; 및 제2019/0330620호를 참조한다. 선형 형태로 도입되는 경우, 공여체 서열의 말단은 당업자에게 알려진 방법에 의해(예를 들어, 핵산말단 가수분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 부가되고 및/또는 자가-상보성 올리고뉴클레오티드가 일 말단 또는 양 말단에 라이게이션된다. 예를 들어, Chang and Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987); Nehls et al., Science (1996)을 참조한다. 분해로부터 외인성 폴리뉴클레오티드를 보호하기 위한 추가적인 방법은 말단 아미노기(들)의 부가 및, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 및 O-메틸 리보오스 또는 데옥시리보오스 잔기와 같은 변형된 뉴클레오티드간 연결(internucleotide linkage)의 사용을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0183] 따라서, 복구를 위해 공여체 주형을 사용하는 본 발명의 구체예는 선형 또는 환형 형태로 세포 내에 도입될 수 있는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 및/또는 이중-가닥 공여체 주형을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체예에서 유전자-편집 조성물은 (1) 복구 전에 유전자에서 이중 가닥 절단에 영향을 미치는 가이드 서열을 포함하는 RNA 분자 및 (2) 복구를 위한 공여체 RNA 주형을 포함하고, 상기 가이드 서열을 포함하는 RNA 분자는 제1 RNA 분자이고 공여체 RNA 주형은 제2 RNA 분자이다. 일부 구체예에서, 가이드 RNA 분자와 주형 RNA 분자는 단일 분자의 일부로서 연결된다.

[0184] 공여체 서열은 또한 올리고뉴클레오티드일 수 있고 내인성 서열의 유전자 교정 또는 표적화된 변경에 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 벡터 상에서 세포로 도입될 수 있거나, 세포 내에 전기천공될 수 있거나, 당업계에 알려진 기타 방법을 통해 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 내인성 유전자 내의 돌연변이된 서열(예를 들어, 베타 글로빈 내 겸상(sickle) 돌연변이)을 '교정'하는 데 사용될 수 있거나, 내인성 유전자좌 내로 원하는 목적을 갖는 서열을 삽입하는 데 사용될 수 있다.

- [0185] 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 복제 원점, 프로모터 및 항생제 내성을 코딩하는 유전자와 같은 추가적인 서열을 갖는 벡터 분자의 일부로서 세포 내로 도입될 수 있다. 또한, 공여체 폴리뉴클레오티드는 네이키드 핵산으로서, 리포좀 또는 폴록사머와 같은 작용제와 복합체화된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 재조합 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 인테그라제 결합 렌티바이러스(IDLV))에 의해 전달될 수 있다.
- [0186] 공여체는 일반적으로 그 발현이 통합 부위에서 내인성 프로모터, 즉 공여체가 삽입되는 내인성 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 의해 구동되도록 삽입된다. 그러나, 공여체가 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어 항시적(constitutive) 프로모터 또는 유도성 또는 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있음이 명백할 것이다.
- [0187] 공여체 분자는 내인성 유전자의 전부, 일부가 발현되거나 전혀 발현되지 않도록 내인성 유전자 내로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 이식유전자는, 예를 들어 이식유전자와의 융합체로서, 내인성 서열의 일부(이식유전자에 대해 N-말단 및/또는 C-말단)가 발현되거나 전혀 발현되지 않도록, 내인성 유전자와 내로 삽입될 수 있다. 다른 구체예에서, 이식유전자(예를 들어, 내인성 유전자를 위한, 추가적인 코딩 서열을 갖거나 갖지 않음)는 임의의 내인성 유전자와, 예를 들어 세이프-하버(safe-harbor) 유전자와, 예를 들어 CCR5 유전자, CXCR4 유전자, PPP1R12c(또한 AAVS1로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 또는 Rosa 유전자 내로 통합된다. 예를 들어, 미국 특허 제7,951,925호 및 제8,110,379호; 미국 공개 제2008/0159996호; 제2010/0218264호; 제2010/0291048호; 제2012/0017290호; 제2011/0265198호; 제2013/0137104호; 제2013/0122591호; 제2013/0177983호 및 제2013/0177960호 및 미국 가출원 제61/823,689호를 참조한다.
- [0188] 내인성 서열(내인성 또는 이식유전자의 일부)이 이식유전자와 함께 발현되는 경우, 내인성 서열은 전장 서열(야생형 또는 돌연변이체) 또는 부분적 서열일 수 있다. 바람직하게는, 내인성 서열은 기능적이다. 이러한 전장 또는 부분적 서열의 기능의 비-한정적 예는 이식유전자(예를 들어, 치료용 유전자)에 의해 발현되는 폴리펩티드의 형성 반감기 증가 및/또는 담체로서의 작용을 포함한다.
- [0189] 또한, 발현을 위해 요구되지는 않지만, 외인성 서열은 또한 전사 또는 번역 조절 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 인슐레이터(insulator), 내부 리보솜 진입 부위, 2A 펩티드를 코딩하는 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.
- [0190] 특정 구체예에서, 공여체 분자는 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들어, 세포에 또는 대상체에 부재하는 단백질을 코딩하는 코딩 서열 또는 단백질을 코딩하는 유전자의 대안적 버전), 조절 서열 및/또는 마이크로RNA 또는 siRNA와 같은 구조적 핵산을 코딩하는 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0191] 전술된 구체예에 있어서, 본원에 개시된 각각의 구체예는 각각의 다른 개시된 구체예에 적용 가능한 것으로 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 임의의 RNA 분자 또는 조성물이 본 발명의 임의의 방법에서 이용될 수 있음이 이해된다.
- [0192] 본원에서 사용된, 모든 표제는 단순히 구성을 위한 것이며 어떠한 방식으로든 본 개시를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 임의의 개별 섹션의 내용은 모든 섹션에 동일하게 적용 가능할 수 있다.
- [0193] 본 발명의 추가적인 목적, 장점, 및 신규한 특징은 하기 실시예의 조사 시 당업자에게 명백해질 것이며, 이는 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 추가적으로, 본원에서 상술되고, 하기 청구범위 섹션에서 청구된 바와 같은 본 발명의 각각의 다양한 구체예 및 양태는 하기 실시예에서 실험적 뒷받침이 확인된다.
- [0194] 명확성을 위해 별개의 구체예의 상황에서 기재되는, 본 발명의 특정 특징이 또한 단일 구체예에서 조합되어 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간결성을 위해, 단일 구체예의 상황에서 기재되는 본 발명의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위-조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 기재된 구체예에서 적합한 바와 같이 제공될 수 있다. 다양한 구체예의 상황에서 기재되는 특정한 특징들은 구체예가 이들 요소 없이 작동되지 않는 경우가 아닌 한, 이들 구체예의 필수적 특징으로 간주되어서는 안 된다.
- [0195] 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 명명법, 및 본 발명에서 이용되는 실험실 절차는 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기법을 포함한다. 이러한 기법은 문헌에서 철저하게 설명되어 있다. 예를 들어, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (1989); Ausubel, R. M. (Ed.), "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New

York; Birren et al. (Eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시된 바와 같은 방법론; Cellis, J. E. (Ed.), "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III (1994); Freshney, "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" Third Edition, Wiley-Liss, N. Y. (1994); Coligan J. E. (Ed.), "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III (1994); Stites et al. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (Eds.), "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Clokie and Kropinski (Eds.), "Bacteriophage Methods and Protocols", Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (2009)]을 참조하며, 이들 모두 참조에 의해 인용된다. 다른 일반 참조문헌이 본 문헌 전체를 통해 제공된다.

[0196]

본 발명의 보다 완전한 이해를 촉진하기 위해 실시예가 하기에 제공된다. 하기 실시예는 본 발명의 제조 및 실시의 예시적 방식을 예시한다. 그러나, 본 발명의 범주는 이들 실시예에 개시된 특정 구체예에 제한되지 않으며, 이는 단지 예시 목적을 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0197]

도 1a-1f: 표 3에 나열된 sgRNA의 예측된 2차 구조. **도 1a:** 스캐폴드(scaffold) V2. **도 1b:** 스캐폴드 V2.1. **도 1c:** 스캐폴드 V2.2. **도 1d:** 스캐폴드 V2.3. **도 1e:** 스캐폴드 V2.4. **도 1f:** 스캐폴드 V2.5.

도 2: HeLa 세포에서 상이한 sgRNA 스캐폴드에 의한 OMNI-103 편집 활성(표 3). HeLa 세포를 OMNI-103 및 TRAC-s91 또는 PDCD-s40을 표적으로 하는 sgRNA 플라스미드로 형질감염시켰다. 편집 활성은 차세대 시퀀싱 결과(막대)에 근거하여 계산하고, 형질감염 효율은 mCherry 발현의 FACS 분석에 근거했다. 3회의 기술적 반복실험의 평균 및 표준 편차가 제시된다.

도 3: U2OS에서의 활성. U2OS 세포를 OMNI-103 및 TRAC35 및 B2Ms12를 표적으로 하는 sgRNA(RNP)로 전기천공시켰다. 편집 활성은 차세대 시퀀싱(NGS) 결과에 근거하여 계산하였다. 3회의 기술적 반복실험의 평균 및 표준 편차가 제시된다.

도 4: 일차 T 세포에서의 활성. 일차 T 세포(primary T cell)를 PBMC로부터 분리하고 제조사의 프로토콜(Miltenyi #130-096-535, #130-091-441)에 따라 활성화시켰다. 활성화된 T 세포를 OMNI-103 및 TRAC-s35 및 B2M-s12를 표적으로 하는 sgRNA(RNP)로 전기천공시켰다. 8일 후, TCR 및 B2M 발현 수준에 대해 유동 세포측정법으로 세포를 측정했다. 분석을 위해, 살아있는 CD3 양성 세포만 계수했다. 제시된 결과는 모두 유사한 결과를 보인 3명의 T 세포 공여자의 결과를 대표하고, 그들 중 하나의 것이다.

도 5: T 세포 활성화 분석. 절단 활성 분석에 사용된 공여자 샘플 세포를 72시간 동안 비드로 활성화시켰고, FACS로 측정한 결과 85%의 1차 T 세포 활성화율을 나타냈다(CD3⁺CD25⁺ 세포).

도 6: RNA 스캐폴드의 대표적인 예. 예시적인 RNA 스캐폴드 부분은 테트라루프에 의해 tracrRNA 부분에 연결된 crRNA 부분을 포함한다. crRNA 부분은 crRNA 반복 서열을 포함한다. tracrRNA 부분은 tracrRNA 역-반복 서열 및 추가적인 tracrRNA 섹션을 포함한다. RNA 분자는 crRNA 반복 서열에 연결된 가이드 서열 부분(즉, RNA 스페이서)을 추가로 포함할 수 있어서, RNA 분자가 단일-가이드 RNA 분자로서 기능한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0198]

실험 세부사항

[0199]

본 발명의 보다 완전한 이해를 촉진하기 위해 실시예가 하기에 제공된다. 하기 실시예는 본 발명의 제조 및 실시의 예시적 방식을 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위는 이들 실시예에서 개시된 특정 구체예에 한정되지 않으며, 이들은 단지 예시 목적을 위한 것이다.

[0200]

방법

[0201]

CRISPR 반복(crRNA), 트랜스활성화 crRNA(tracrRNA) 및 뉴클레아제 폴리펩티드의 OMNI-103 서열은 환경 샘플의 메타게놈 서열 데이터베이스로부터 예측되었다. 스페이서 최적화를 갖는 전장 가이드 스캐폴드, NNRRHY PAM 및 포유동물에서의 활성이 2022년 8월 11일에 공개된 PCT 국제 공개 WO2022/170199 A2에서 논의되었고, 주요 발견 요소들은 표 1에서 확인할 수 있다.

[0202] OMNI-103 단백질 발현

[0203] 요약하면, 뉴클레아제 개방 해독 프레임(ORF)을 인간에 대해 코돈 최적화하고(표 1), 하기 요소, SV40 NLS - OMNI-103 ORF(인간 최적화된 제2 아미노산부터) - HA 태그 - SV40 NLS - 8 His-태그를 갖는 변형된 pET9a 플라스미드로 클로닝하였고, 그 서열은 표 2에서 확인할 수 있다. OMNI-103 구조체를 KRX 세포(PROMEGA)에서 발현시켰다. 세포를 6.66 mM 람노오스(0.5 M 스톱으로부터 26.4 ml) 및 0.05% 글루코스(0.5 M으로부터 2 ml)를 첨가한 TB+0.4% 글리세롤에서 성장시키고, 4시간 후 20℃로의 온도 저하에 의해 중간-지수기(mid-log phase)에 발현시켰다. 화학적 용해를 이용하여 세포를 용해시키고 상층 용해물(cleared lysate)을 Ni-NTA 수지 상에서 정제했다. Ni-NTA 용리 분획은 CEX(S03 fractogel) 수지에서 정제하고 뒤이어 Superdex 200 Increase 10/300 GL, AKTA Pure(GE Healthcare Life Sciences)에서 SEC 정제를 수행했다. OMNI103 단백질을 포함하는 분획을 모아서 30 mg/ml 스톱으로 농축하고, 액체 질소에서 급속 냉동한 후 -80℃에서 보관했다.

[0204] 사용된 합성 sgRNA

[0205] OMNI-103의 모든 합성 sgRNA는 3' 및 5' 말단에 3개의 2'-O-메틸 3'-포스포로티오에이트를 갖도록 합성하였다(Agilent 또는 Synthego).

[0206]

[0207] 포유동물 세포주에서의 활성

[0208] 더 짧은 sgRNA 버전을 이용하여 편집을 촉진하는 OMNI-103의 능력을 인간 세포의 특정 게놈 위치에서 테스트하였다(표 4). HeLa 세포의 경우, OMNI-103-P2A-mCherry 발현 벡터(pmOMNI, 표 2)를 sgRNA(pShuttle 가이드, 표 2, 스페이서 서열, 표 4)와 함께 형질감염시켰다.

[0209] U2OS 세포의 경우, 100 μM 뉴클레아제를 120 μM 합성 가이드 및 100 μM Cas9 전기천공 인헨서(IDT)와 혼합하여 RNP를 조립했다. 실온에서 10분간 인큐베이션한 후, RNP 복합체를 사전 세척된 U2OS 세포 200,000개와 혼합하고, 제조사의 프로토콜에 따라 DN100 프로그램이 포함된 Lonza SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit를 사용하여 전기천공했다. 72시간차에 세포를 용해시키고, 그들의 게놈 DNA 함량을 상응하는 추정적 게놈 표적을 증폭시키는 PCR 반응에 사용했다. 앰플리콘에 NGS를 수행하고, 결과적으로 수득된 서열을 사용하여 편집 사건(editing event)의 비율을 계산했다.

[0210] T 세포의 경우, 113 μM 뉴클레아제와 160 μM 합성 가이드를 혼합하고 실온에서 10분간 인큐베이션하여 RNP를 조립했다. RNP 복합체를 200,000개의 일차 활성화 T 세포와 혼합하고, EH-115 펄스 코드로 P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X 키트를 사용하여 전기천공했다. 3일 및 8일 후에 세포를 수집하고, CD3 및 편집된 단백질 발현을 유세포 분석법으로 측정했다.

[0211] 결과

[0212] 게놈 크기 및 세포 유형 전반에 걸친 짧은 가이드의 활성

[0213] OMNI-103 뉴클레아제 활성을 더 짧은 sgRNA 스캐폴드와의 사용을 위해 최적화하였다. 5개의 짧은 sgRNA 스캐폴드는 'V2' 이중체(duplex) 버전을 기반으로 설계되었고, 이는 테트라 루프 "GAAA" 및 종결자(terminator) 영역 주위에 최대 4개의 결실을 포함했다(표 3, 도 1a-1f). 설계된 V2 스캐폴드로 표시된 OMNI-103의 활성 수준을 테스트하기 위해, "TRAC-s91" 또는 "PDCD-s40"의 가이드 서열 부분을 갖는 sgRNA를 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 편집 활성은 NGS 결과에 근거하여 계산했다(도 2). 모든 경우에, 설계된 sgRNA는 편집 활성을 가능하게 했다. 다음 단계는 U2OS 및 일차 T 세포에서 RNP로서 OMNI-103 활성을 테스트하는 것이었다. OMNI-103을 V2, V2.2 또는 V2.3 스캐폴드를 갖고 "TRAC-s35" 또는 "B2M-s12"의 가이드 서열 부분을 갖는 sgRNA와 함께 전기천공시켰다. 편집 활성은 NGS 결과에 근거하여 계산했고, 입증된 바와 같이 스캐폴드 변이체와 함께 사용할 때 OMNI-103 활성의 수준은 손상되지 않았다(도 3). 일차 T 세포에서, 짧은 스캐폴드 변이체가 활용되었을 때, 향상된 활성이 확인되었다.

[0214] 일차 T 세포를 인간 PBMC로부터 분리하고, 제조사의 권장 사항(#130-091-441, Miltenyi)에 따라, CD2, CD3 및 CD28에 의해 활성화시켰다. 3일 후, 세포는 대부분 활성화되었다(85% 이상의 CD25-양성 세포, 도 5 참조). 200,000개의 활성화된 일차 T 세포를 OMNI-103 뉴클레아제 및 V2, V2.2 또는 V2.3 스캐폴드 및 TRAC-s35 또는 B2M-s12의 스페이서 서열(즉, 가이드 서열 부분)을 갖는 가이드 RNA 분자로 전기천공시켰다. 배양에서 8일 후 편집을 차세대 시퀀싱(NGS)으로 측정하고, 단백질 발현 수준은 유세포 분석기로 측정했으며, 이는 V2 스캐폴드 사용시 TCR 또는 B2M의 상당한 감소를 보여주었고, V2.2 또는 V2.3 사용시 단백질 발현의 훨씬 더 큰 감소를 보

여주었다(도 4).

표 1 - 미국 임시 출원 63/147,166 및 63/214,506에서 발견된 OMNI-103 유전적 요소

표 1

뉴클레아제 명칭	OMNI-103
단백질 서열	서열번호 1
OMNI-103 ORF의 DNA 서열	서열번호 2
OMNI-103 ORF의 인간 최적화 DNA 서열	서열번호 3
OMNI-103 PAM	NNRRHY
sgRNA V1 스캐폴드	GUUUGAGAGUAGUGUAAgaaaUUACACUACAAGUUCAAAUAAAAUUUUAU UCAAUCCUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUAAAGAUCUGGCAACAGAU UUUUUU (서열번호 4)
sgRNA V2 스캐폴드	GUUUGAGAGUAGUGUAAgaaaUUACACUACAAGUUCAAAUAAAAUUUUAU UCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUAAAGAUCUGGCAACAGAU UUUUUU (서열번호 5)

표 2 -OMNI-103 발현 및 정제를 위한 플라스미드 구조체

표 2

플라스미드	요소	코딩 ORF 서열	DNA 서열
pET9a: OMNI-103	박테리아 시스템에서 OMNI 폴리펩티드 발현	T7 프로모터 - SV40 NLS - OMNI ORF (인 간 최적화) - HA 태그 - SV40 NLS - 8Xhis 태그 - T7 종결자	서열번호 7
pShuttle Guide: OMNI-103 V2	박테리아 및 인간 세포 시스템에서 OMNI sgRNA 발현	U6 프로모터 - T7 프로모터 - T2 스페이 서 - sgRNA 스캐폴드 - T7 종결자	서열번호 8
pmOMNI: OMNI-103	인간 세포 시스템에서 OMNI 폴리펩티드 발현	CMV 프로모터 - T7 프로모터 - SV40 NLS - OMNI ORF (인간 최적화) - HA - SV40 NLS - P2A - mCherry - BGH poly(A)	서열번호 9

표 3 - OMNI-103 설계된 스캐폴드 서열

표 3

실험 명칭	전체 서열	길이
V2.1	GUUUGAGAGUAGUGGAAACACUACAAGUUCAAAUAAAAUUU AUUCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUAAAGAUCUG GCAACAGAUUUUUUU (서열번호 17)	101
V2.2	GUUUGAGAGUAGUGUAAAGAAUUACACUACAAGUUCAAAUAA AAUUUUAUCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUUUU U (서열번호 18)	85
V2.3	GUUUGAGAGUAGUGGAAACACUACAAGUUCAAAUAAAAUUU AUUCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUUUUU (서열번호 19)	79
V2.4	GUUUGAGAGUAGUGGAAACACUACAAGUUCAAAUAAAAUUU AUUCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUAAAGAUGCA AAUUUUUUUU (서열번호 20)	95
V2.5	GUUUGAGAGUAGUGUAAAGAAUUACACUACAAGUUCAAAUAA AAUUUUAUCAAUCCAUUUGCUACAUUGUGUAGAAUUUAAA GAUGCAAUCCUUUUUU (서열번호 21)	101

실험 명칭	crRNA 반복(부)	tracrRNA 역-반복(부)
V2.1	GUUUGAGAGUAGUG (서열번호 22)	CACUACAAGUUCAAA (서열번호 24)
V2.2	GUUUGAGAGUAGUGAA (서열번호 23)	UUACACUACAAGUUCAAA (서열번호 25)
V2.3	GUUUGAGAGUAGUG (서열번호 22)	CACUACAAGUUCAAA (서열번호 24)
V2.4	GUUUGAGAGUAGUG (서열번호 22)	CACUACAAGUUCAAA (서열번호 24)
V2.5	GUUUGAGAGUAGUGAA (서열번호 23)	UUACACUACAAGUUCAAA (서열번호 25)

실험 명칭	tracrRNA 부분 1	tracrRNA 부분 1 - 일부(partial)	tracrRNA 부분 2	tracrRNA 부분 2 - 일부
V2.1	AAAAAUUUUAUUC AAUCCAUUUGCUA CAUUGUGUAGAAU UU (서열번호 26)	미열거	AAAGAUCUGG CAACAGAUCU UUUUUU (서열번호 29)	AAAGAUCUGG CAACAGA (서열번호 31)
V2.2	AAAAAUUUUAUUC AAUCCAUUUGCUA CAUUGUGUAGAAU UUUUUU (서열번호 27)	AAAAAUUUUAU UCAAUCCAU UUGCUACA GUGUAGAA (서열번호 28)	미열거	미열거
V2.3	AAAAAUUUUAUUC AAUCCAUUUGCUA CAUUGUGUAGAAU UUUUUU (서열번호 27)	AAAAAUUUUAU UCAAUCCAU UUGCUACA GUGUAGAA (서열번호 28)	미열거	미열거
V2.4	AAAAAUUUUAUUC AAUCCAUUUGCUA CAUUGUGUAGAAU UU (서열번호 26)	미열거	AAAGAUGCAA AUCUUUUUUU (서열번호 30)	AAAGAUGCAA AUC (서열번호 32)
V2.5	AAAAAUUUUAUUC AAUCCAUUUGCUA CAUUGUGUAGAAU UU (서열번호 26)	미열거	AAAGAUGCAA AUCUUUUUUU (서열번호 30)	AAAGAUGCAA AUC (서열번호 32)

표 4 - 짧은-스캐폴드 가이드 활성을 테스트하기 위한 내인성 표적

표 4

유전자	부위	스페이서
TRAC	s91	GCUGUGGCCUGGAGCAACAAA (서열번호 33)
PDCD1	s40	AACACAUCGGAGAGCUUCGUGC (서열번호 34)
B2M	S12	GUAUGCCUGCCGUGUGAACCAU (서열번호 35)
TRAC	S35	GACCCUGCCGUGUACCAGCUGA (서열번호 36)

표 5 - 3종의 세포 유형에서 상이한 내인성 표적에 대한 짧은 가이드의 활성의 요약

표 5

세포 유형	유전자	부위	V2	V2.1	V2.2	V2.3	V2.4	V2.5
HeLa	TRAC	s91	46.90	35.81	42.68	42.74	38.62	4.06
HeLa	PDCD1	s40	35.21	9.45	32.94	40.82	27.60	25.59
U2OS	TRAC	S35	96.58	N/A	96.22	97.34	N/A	N/A
U2OS	B2M	S12	97.19	N/A	97.76	96.16	N/A	N/A
일차 T 세포	TRAC	S35	77.40	N/A	87.60	90.80	N/A	N/A
일차 T 세포	B2M	S12	79.90	N/A	88.00	91.60	N/A	N/A

표 6 - 일차 T 세포 분석에서 사용된 sgRNA의 요약

표 6

sgRNA 명칭	유전자	부위	스페이서	스캐폴드	sgRNA
OMNI-103 v2.2 TRAC S35	TRAC	S35	서열번호 36	서열번호 18	서열번호 37
OMNI-103 v2.3 TRAC S35	TRAC	S35	서열번호 36	서열번호 19	서열번호 38
OMNI-103 v2.2 B2M S12	B2M	S12	서열번호 35	서열번호 18	서열번호 39
OMNI-103 v2.3 B2M S12	B2M	S12	서열번호 35	서열번호 19	서열번호 40

참조문헌

- Ahmad and Allen (1992) "Antibody-mediated Specific Binding and Cytotoxicity of Liposome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells *in Vitro*", Cancer Research 52:4817-20.
- Anderson (1992) "Human gene therapy", Science 256:808-13.
- Basha et al. (2011) "Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells", Mol. Ther. 19(12):2186-200.
- Behr (1994) "Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy", Bioconjugate Chem 5:382-89.
- Blaese et al. (1995) "Vectors in cancer therapy: how will they deliver", Cancer Gene Ther. 2:291-97.
- Blaese et al. (1995) "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years", Science 270(5235):475-80.
- Briner et al. (2014) "Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality", Molecular Cell 56:333-39.
- Buchschacher and Panganiban (1992) "Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes", J. Virol. 66:2731-39.
- Burstein et al. (2017) "New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes", Nature 542:237-41.
- Canver et al., (2015) "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis", Nature Vol. 527, Pgs. 192-214.
- Chang and Wilson (1987) "Modification of DNA ends can decrease end-joining relative to homologous recombination in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963.
- Charlesworth et al. (2019) "Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans", Nature Medicine, 25(2), 249.
- Chung et al. (2006) "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria", Trends Plant Sci. 11(1):1-4.
- Coelho et al. (2013) "Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis" N. Engl. J. Med. 369, 819-829.
- Crystal (1995) "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success", Science 270(5235):404-10.
- Dillon (1993) "Regulation gene expression in gene therapy" Trends in Biotechnology 11(5):167-173.
- Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", Hum. Gene Ther.

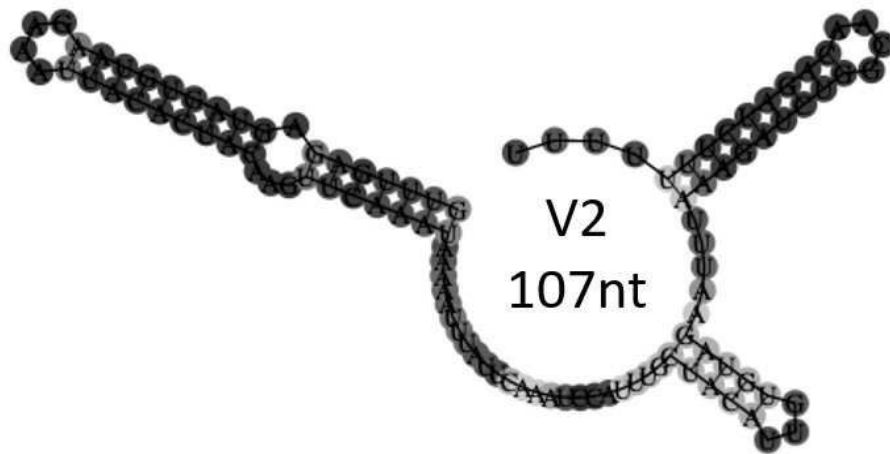
8(1):111-23.

- [0247] 18. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", *Blood* 85:3048-57.
- [0248] 19. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy", *Cancer Immunol Immunother* 44:10-20.
- [0249] 20. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" *Gene Ther.* 2(10):710-22.
- [0250] 21. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: *The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis*, ed. Doerfler and Böhm, pp. 297-306.
- [0251] 22. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(21):9747-51.
- [0252] 23. Humbert et al., (2019) "Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates", *Sci. Trans. Med.*, Vol. 11, Pgs. 1-13.
- [0253] 24. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", *J Exp Med.* 176(6):1693-702.
- [0254] 25. Jiang and Doudna (2017) "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms", *Annual Review of Biophysics* 46:505-29.
- [0255] 26. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* 337(6096):816-21.
- [0256] 27. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus", *J Virol* 66(3):1635-40.
- [0257] 28. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", *Mol Ther.* 13(3):494-505.
- [0258] 29. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency", *Nature Medicine* 1:1017-23.
- [0259] 30. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", *Br. Med. Bull.* 51(1):31-44.
- [0260] 31. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", *Nat Biotechnol.* 27(7):643-51.
- [0261] 32. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease", *PNAS* 94(22):12133-38.
- [0262] 33. Maxwell et al. (2018) "A detailed cell-free transcription-translation-based assay to decipher CRISPR protospacer adjacent motifs", *Methods* 143:48-57
- [0263] 34. Miller et al. (1991) "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus", *J Virol.* 65(5):2220-24.
- [0264] 35. Miller (1992) "Human gene therapy comes of age", *Nature* 357:455-60.
- [0265] 36. Mir et al. (2019) "Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism and Application", *ACS Chem. Biol.* 13(2):357-365.
- [0266] 37. Mitani and Caskey (1993) "Delivering therapeutic genes - matching approach and application", *Trends in Biotechnology* 11(5):162-66.

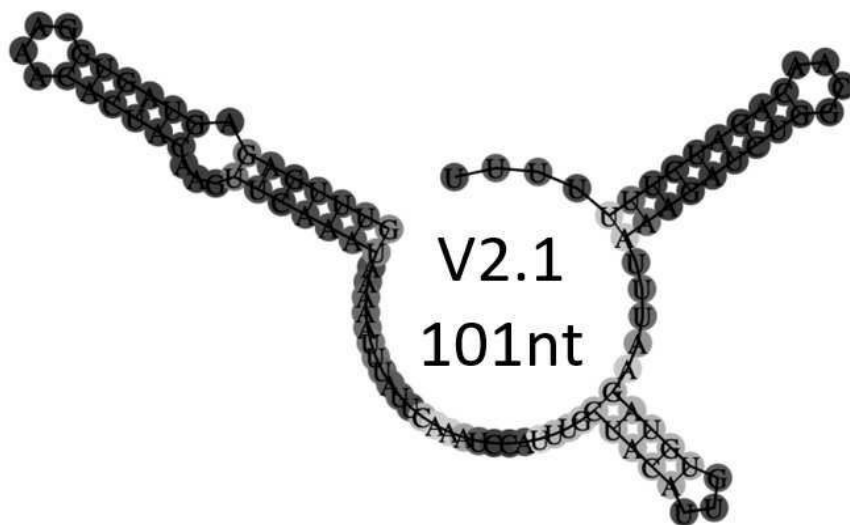
- [0267] 38. Nabel and Felgner (1993) "Direct gene transfer for immunotherapy and immunization", Trends in Biotechnology 11(5):211-15.
- [0268] 39. Nehls et al. (1996) "Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium" Science 272:886-889.
- [0269] 40. Nishimasu et al. "Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA" (2014) Cell 156(5):935-49.
- [0270] 41. Nishimasu et al. (2015) "Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9" Cell 162(5):1113-26.
- [0271] 42. Palermo et al. (2018) "Key role of the REC lobe during CRISPR-Cas9 activation by 'sensing', 'regulating', and 'locking' the catalytic HNH domain" Quarterly Reviews of Biophysics 51, e9, 1-11.
- [0272] 43. Remy et al. (1994) "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules", Bioconjugate Chem. 5(6):647-54.
- [0273] 44. Sentmanat et al. (2018) "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing", Scientific Reports 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8.
- [0274] 45. Sommerfelt et al. (1990) "Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19", J. Virol. 64(12):6214-20.
- [0275] 46. Van Brunt (1988) "Molecular framing: transgenic animals as bioactors" Biotechnology 6:1149-54.
- [0276] 47. Vigne et al. (1995) "Third-generation adenovectors for gene therapy", Restorative Neurology and Neuroscience 8(1,2): 35-36.
- [0277] 48. Wagner et al. (2019) "High prevalence of Streptococcus pyogenes Cas9-reactive T cells within the adult human population" Nature Medicine, 25(2), 242
- [0278] 49. Wilson et al. (1989) "Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the *gag* and *pol* proteins of Moloney murine leukemia virus", J. Virol. 63:2374-78.
- [0279] 50. Yu et al. (1994) "Progress towards gene therapy for HIV infection", Gene Ther. 1(1):13-26.
- [0280] 51. Zetsche et al. (2015) "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system" Cell 163(3):759-71.
- [0281] 52. Zuris et al. (2015) "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo" Nat Biotechnol. 33(1):73-80.

도면

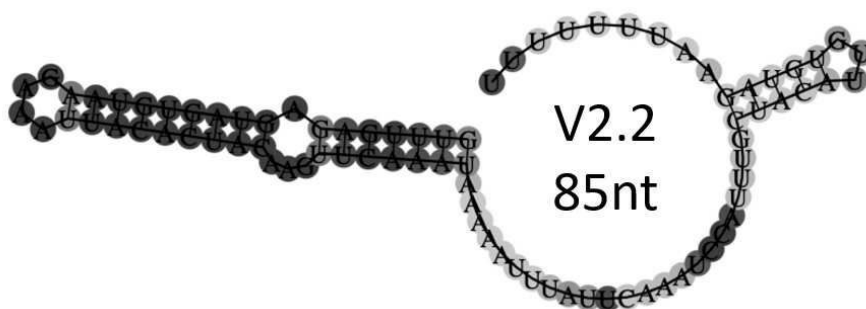
도면1a



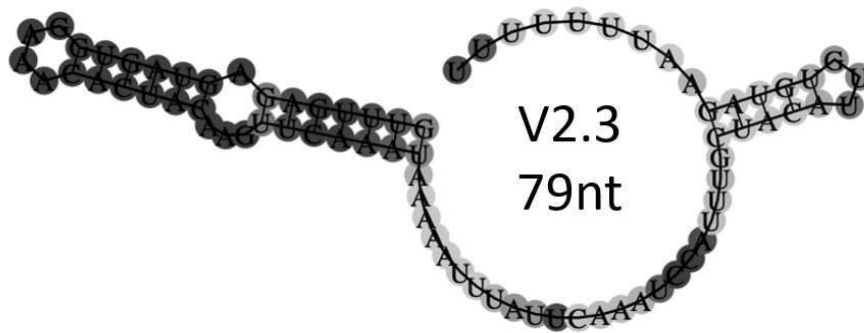
도면1b



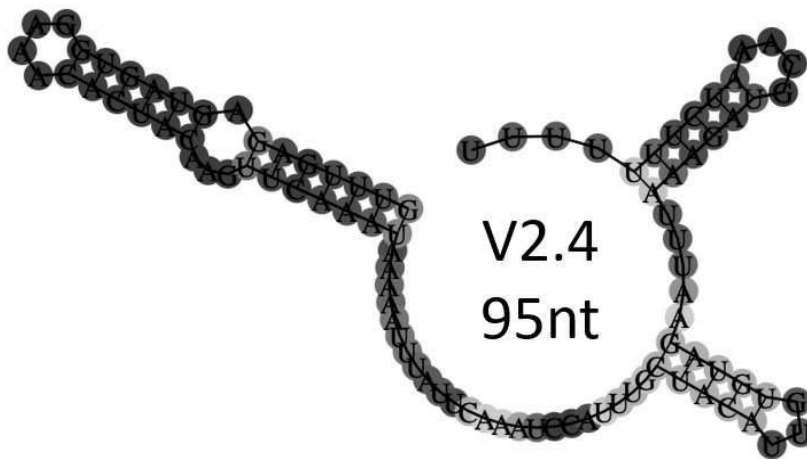
도면1c



도면1d



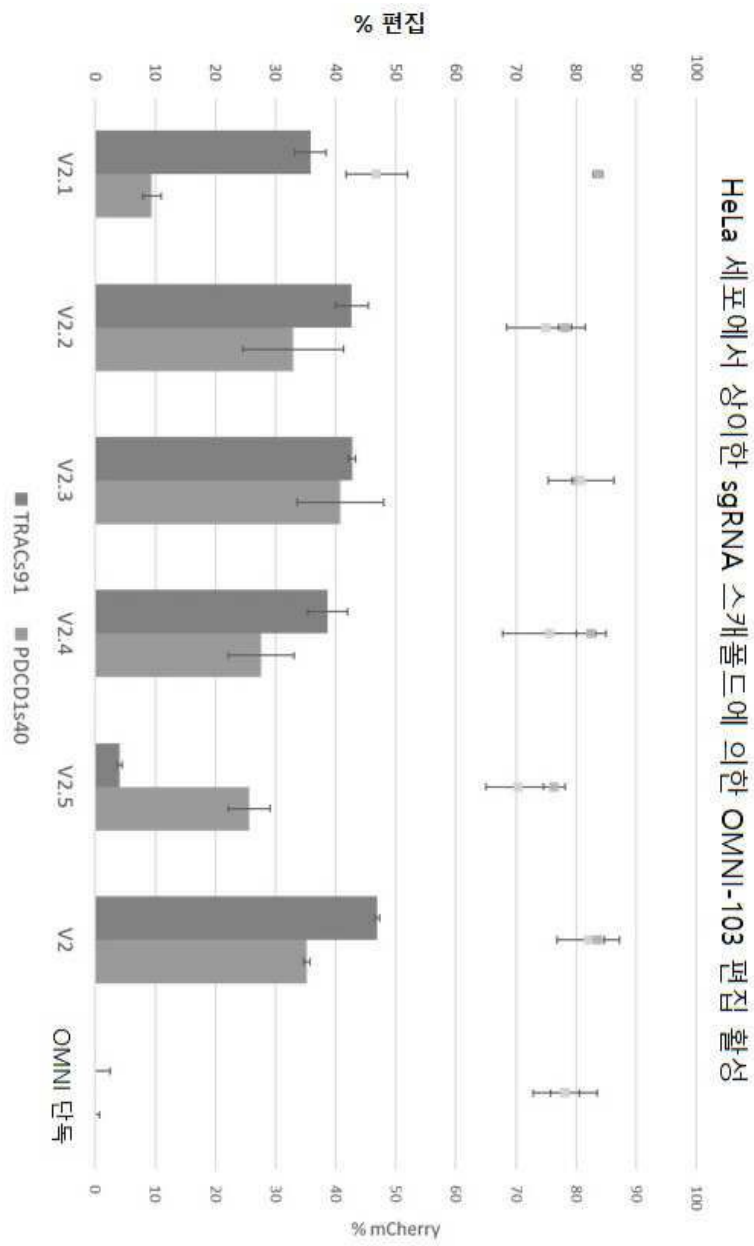
도면1e



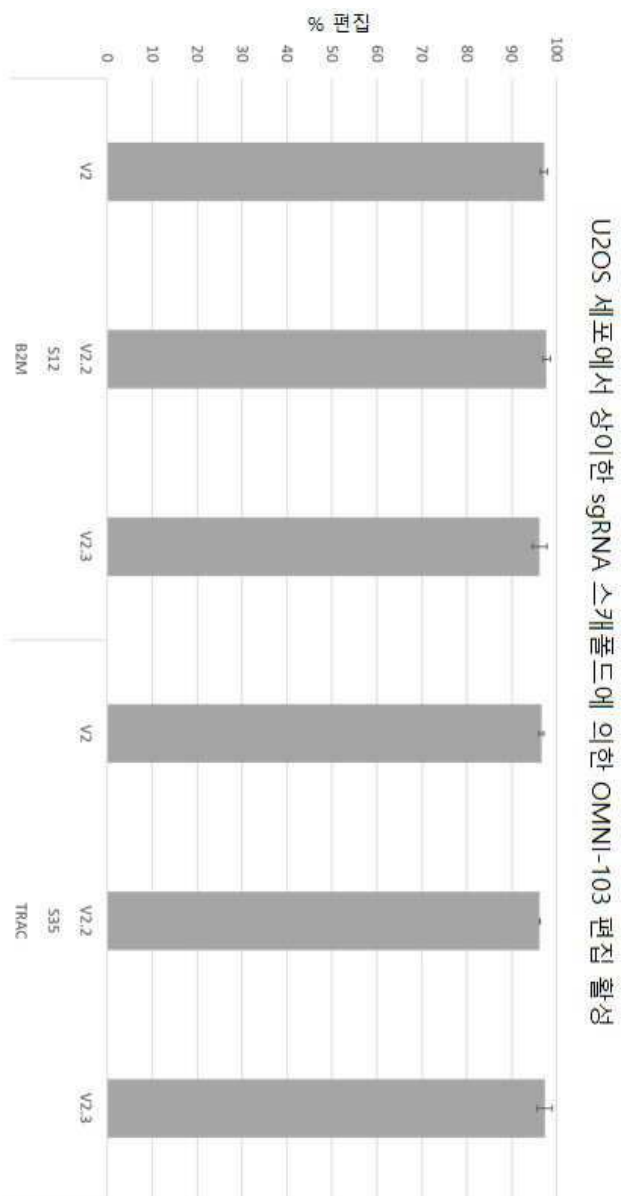
도면1f



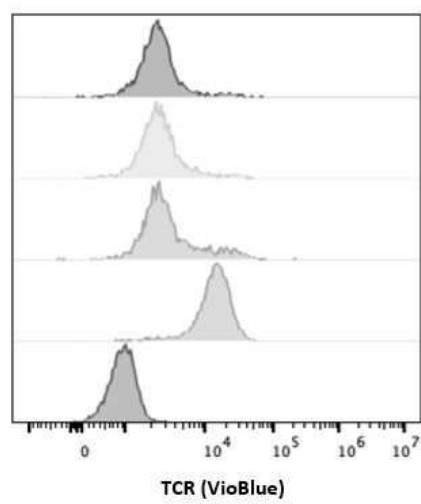
도면2



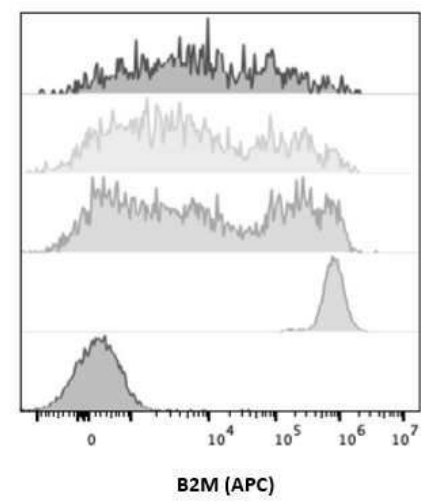
도면3



도면4

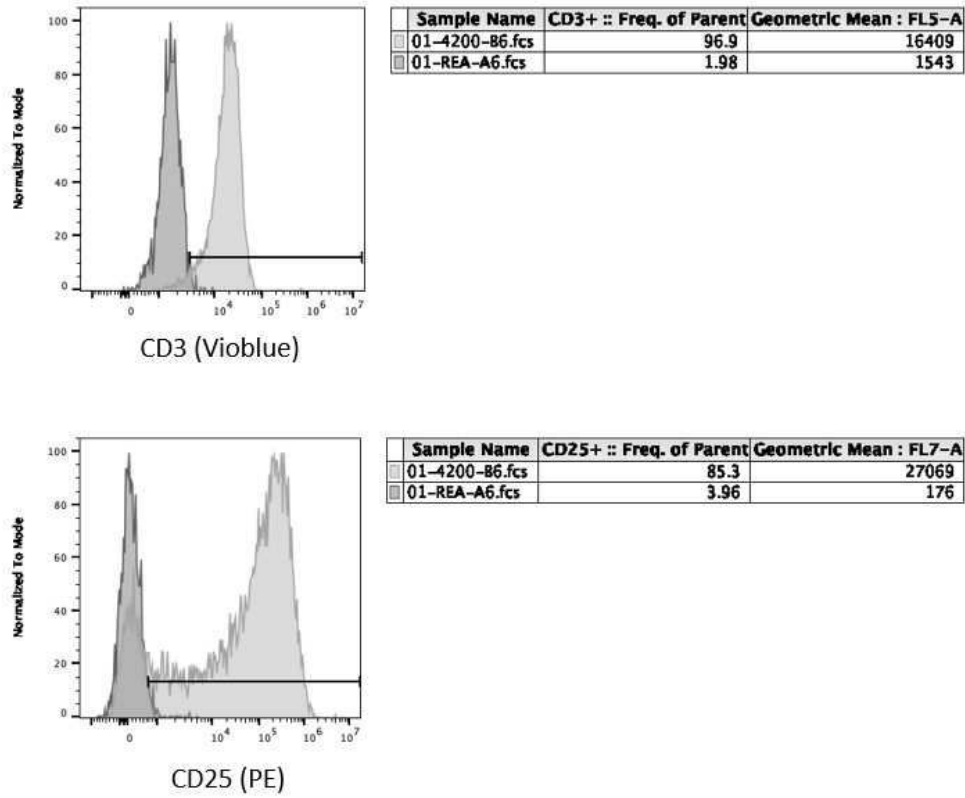


샘플 명칭	% TCR 음성 (% 편집)	GeoMean
V2.3	90.8	2511
V2.2	87.6	2621
V2	77.4	3324
미처리 (양성 대조군)	6.28	12617
IgG 대조군 (음성 대조군)	100	924

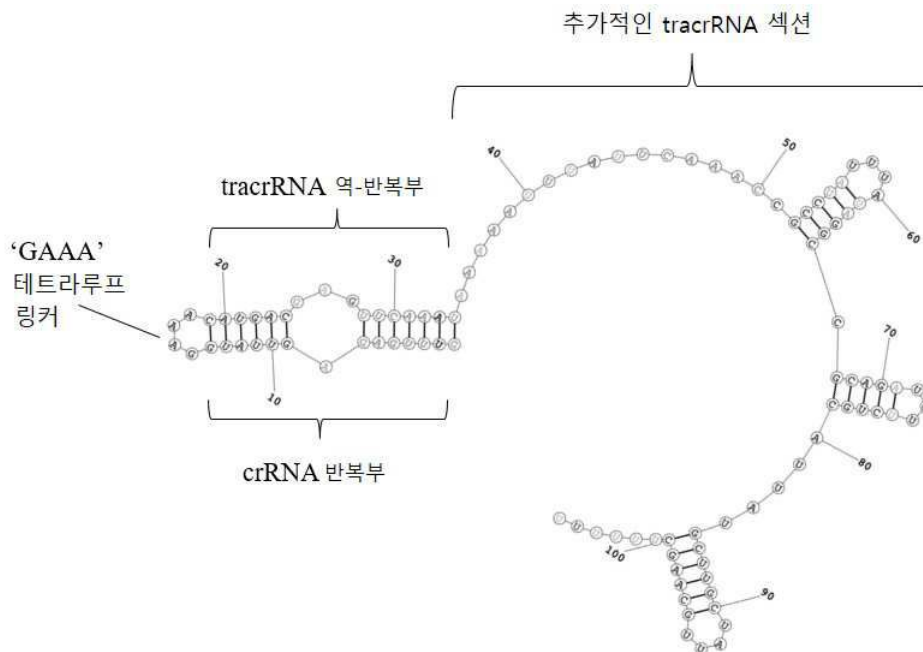


샘플 명칭	% TCR 음성 (% 편집)	GeoMean
V2.3	91.6	7710
V2.2	88	5581
V2	79.9	8029
미처리 (양성 대조군)	1.56	7.59E5
IgG 대조군 (음성 대조군)	99.8	257

도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.