



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0110345
(43) 공개일자 2021년09월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 35/761 (2014.01)
A61P 21/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 35/761 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7023871
- (22) 출원일자(국제) 2019년12월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/069048
- (87) 국제공개번호 WO 2020/142479
국제공개일자 2020년07월09일
- (30) 우선권주장
62/786,670 2018년12월31일 미국(US)

- (71) 출원인
더 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스
하스피탈
미국 43205 오하이오주 콜럼버스 칠드런스 드라이
브 700 룸 더블유172
- (72) 발명자
하퍼, 스코트, 킨톤
미국 43065 오하이오주 포웰 브라이어밴드 블러바
드 384
래쉬논제드, 아프루즈
미국 43202 오하이오주 컬럼버스 스티치콧 드라이
브 484 아파트먼트 #37
- (74) 대리인
양영준, 이상남

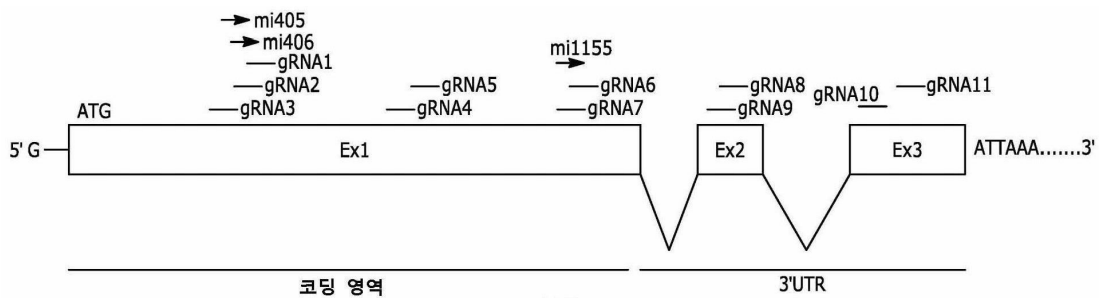
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 RNA 표적화 CRISPR-Cas13b를 사용한 DUX4 RNA 침묵화

(57) 요약

인간 염색체 4q35에서 이중 호메오박스 4 (DUX4) 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNA 간섭 기반의 산물 및 방법이 개시된다. 본 발명은 RNA의 Cas13 단백질 침묵화를 포함하고, 여기서 Cas13은 서열 특이적 가이드 RNA (gRNA)를 사용하여 관심있는 DUX4 영역에 특이적으로 표적화된다. 본 발명의 제조함 아데노 관련 바이러스는 Cas13 직접 반복서열과 함께 제작되어 DUX4 발현을 녹다운하는 억제성 gRNA를 인코딩하는 DNA를 전달한다. 본 방법은 안면건감상완 근육 디스트로피 (FSHD)을 포함하나 이에 한정되지 않는 근육 디스트로피, 및 DUX4 발현의 상승과 관련된 암을 포함한 기타 장애의 치료에 적용된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2750/14132 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산.

청구항 2

서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4)를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

Cas13b 직접 반복서열 서열을 추가로 포함하는, 핵산.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 Cas13b 직접 반복서열은 상기 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산의 하류 또는 3' 말단에 위치하는, 핵산.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항에 있어서,

상기 Cas13b 직접 반복서열은 서열번호 37에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 37에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 핵산.

청구항 6

제 5항에 있어서,

서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 핵산.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터 서열을 추가로 포함하는, 핵산.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 프로모터는 임의의 U6, U7, tRNA, H1, 최소 CMV, T7, EF1-알파, 최소 EF1-알파 또는 골격근 특이적 프로모터인, 핵산.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 근육 특이적 프로모터는 unc45b, tMCK, 최소 MCK, CK6, CK7, MHCK7 또는 CK1인, 핵산.

청구항 10

제 8항에 있어서,

서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 핵산.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 바이러스는 rep 및 cap 유전자가 결여된, 아데노 관련 바이러스.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서,

상기 바이러스는 재조합 AAV (rAAV) 또는 자가-상보적 재조합 AAV (scAAV)인, 아데노 관련 바이러스.

청구항 14

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스는 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-anc80 또는 AAV rh.74인, 아데노 관련 바이러스.

청구항 15

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스는 AAV-9인, 아데노 관련 바이러스.

청구항 16

제 11항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 17

세포에서 이중 호메오박스 4 (DUX4) 유전자의 발현을 억제하고/거나, 간섭하는 방법으로서, 상기 세포를

(a) 제 11항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스 또는 제 16항의 조성물; 및

(b) Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토크로 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스;

와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법:

청구항 18

제 18항에 있어서,

상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토크로 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 19

제 19항에 있어서,

상기 Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약

80%의 동일성을 포함하는 변이체에 의해 인코딩되는, 방법.

청구항 20

제 17항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포를 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인핸서-/MCK 인핸서-프로모터 (MHCK7) 또는 테스민 프로모터의 조절 하에 있는, 방법.

청구항 22

근육 디스트로피로 고생하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

(a) 제 11항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스 또는 제 16항의 조성물; 및

(b) Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서,

상기 Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 변이체에 의해 인코딩되는, 방법.

청구항 25

제 22항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포를 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서,

상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인핸서-/MCK 인핸서-프로모터 (MHCK7) 또는 테스민 프로모터의 조절 하에 있는, 방법.

청구항 27

근육 디스트로피를 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 아데노 관련 바이러스의 게놈은

(a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하

는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산;

(d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산; 또는

(e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합:

을 포함하는, 방법.

청구항 28

제 27항에 있어서,

Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서,

상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토토로그 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 30

제 28항 또는 제 29항에 있어서,

상기 Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 변이체에 의해 인코딩되는, 방법.

청구항 31

제 27항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서,

DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제 22항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 근육 디스트로피는 안면견갑상완 근육 디스트로피 (FSHD)인, 방법.

청구항 33

제조합 유전자 편집 복합체로서,

(a) Cas13 또는 Cas13 오르토토로그 또는 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산; 및

(b) 이중 호메오박스 4 (DUX4) 및 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 표적 핵산 서열에 특이적으로 혼성화하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산;

을 포함하고, 상기 복합체의 상기 표적 핵산 서열에 대한 결합은 DUX4 유전자 발현을 억제하는, 제조합 유전자 편집 복합체.

청구항 34

제 33항에 있어서,

상기 gRNA 및 상기 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상기 핵산은

(a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산;

(d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산; 또는

(e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합:

을 포함하는, 재조합 유전자 편집 복합체.

청구항 35

제 33항 또는 제 34항에 있어서,

상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체인, 재조합 유전자 편집 복합체.

청구항 36

제 35항에 있어서,

상기 Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 변이체에 의해 인코딩되는, 재조합 유전자 편집 복합체.

청구항 37

제 33항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서,

DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 재조합 유전자 편집 복합체.

청구항 38

암을 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 아데노 관련 바이러스의 계층은

(a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산;

(c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산;

(d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산; 또는

(e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합:

을 포함하는, 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서,

Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 40

제 39항에 있어서,

상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 41

제 39항 또는 제 40항에 있어서,

상기 Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 변이체에 의해 인코딩되는, 방법.

청구항 42

제 38항 내지 제 41항 중 어느 한 항에 있어서,

DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

제 38항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 폐암, 신장암, 난소암, 횡문근암 (또는 횡문근육종), 육종, 위암, 고환암, 흉선종, 흑색종 또는 전이성 흑색종인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 염색체 4q35에서 이중 호메오박스 4 (DUX4) 유전자의 발현을 침묵화하거나, 억제하기 위한 CRISPR/Cas13 산물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 재조합 유전자 편집 복합체로서, 재조합 유전자 편집화 단백질, 즉 Cas13, 및 DUX4 유전자의 영역을 인코딩하는 표적 핵산 서열에 특이적으로 혼성화하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 복합체의 상기 표적 핵산 서열에 대한 결합은 DUX4 유전자 발현을 억제시키는, 재조합 유전자 편집 복합체를 제공한다. 본 발명의 재조합 아데노 관련 바이러스는 DUX4 발현을 녹다운하는 이러한 gRNA를 인코딩하는 DNA를 전달한다. 본 방법은 안면견갑상완 근육 디스트로피 (FSHD)을 포함하나 이에 한정되지 않는 근육 디스트로피, 및 DUX4 억제가 나타나는 암과 같은 기타 장애의 치료에 적용된다.

[0002] 서열목록의 참고문헌으로 인용

[0003] 본 출원은, 본 발명의 별도의 부분으로서, 이의 전문이 참조문헌으로 인용되는 컴퓨터-판독가능한 형태의 서열목록 (파일명: 53307A_Seqlisting.txt; 34,420 바이트 - 2019년 12월 30일에 작성된 ASCII 텍스트 파일)을 포함한다.

배경 기술

[0004] 근육 디스트로피 (MD)는 유전병의 일군이다. 이 질환군은 운동을 조절하는 골격근의 진행성 약화 및 퇴화를 특징으로 한다. 일부 형태의 MD는 유아기 또는 아동기에 발생하는 반면, 다른 형태는 중년 이후까지 출현하지 않을 수 있다. 장애는 근육 약화의 분포 및 정도 (일부 형태의 MD는 심장 근육에도 영향을 미침), 발병 연령, 진행 속도 및 유전 양상의 견지에서 달라진다.

[0005] 안면견갑상완 근육 디스트로피 (FSHD)는 근육의 서서히 진행되는 쇠약을 특징으로 하는 유전성 근육 퇴화 질환이고, 얼굴, 견갑 및 상완의 근육이 가장 많이 침범을 받는다. 원래 란두지-드제린 (Landouzy-Dejerine)으로 명명되는 FSHD는 일반적으로 상염색체 우성이며, 처음에는 얼굴 (안면), 견갑골 (견갑골 또는 견갑) 및 상완

(상완골)의 골격근을 침범하는 유전성 형태의 근육 디스트로피 (MD)이다. FSHD는 골격근의 세 번째로 흔한 유전병이며, 100,000명 중 약 4 내지 12명의 인구에서 존재한다. 역사적으로, FSHD는 세 번째로 흔한 MD로 분류되어 전세계적으로 20,000명 중 1명에게 침범하였다. 그러나, 최근 데이터에 따르면 FSHD는 유럽에서 가장 일반적인 MD로서 전세계 발병률이 과소평가될 수 있음을 시사한다.

[0006] 증상은 아동기에 발생할 수 있으며, 보통 10대에 눈에 띄고, 침범을 받은 개인의 95%가 20세까지 질환 소견을 나타낸다. 진행성 골격근 약화는 보통 신체의 다른 부위에서도 발생하며, 종종 비대칭적이다. 호흡 부전으로 인해 기대 수명이 위협받을 수 있으며, 침범을 받은 개인의 최대 20%는 중증 장애가 되어 휠체어 또는 이동용 스쿠터를 필요로 한다. 현재까지 이 중증 장애에 대한 치료법이 없기 때문에, 환자는 증상 관리만 선택할 수 있다.

[0007] FSHD1 및 FSHD2로 불리는 두 가지 임상적으로는 구별되지 않는 FSHD 형태가 있다. 대부분의 경우 (~ 95%)가 FSHD1로 분류되는 반면, 나머지는 FSHD2로서 분류되거나 전형적인 FSHD 소견을 나타내지만 아직 유전적으로 특성화되지 않았다. 간단히 말해서, 2가지 형태의 FSHD는 독성 DUX4 유전자의 탈억압에 의해 유발된다. DUX4 개방 해독틀은 인간 염색체 4q 서브텔로미어에 위치한 D4Z4 반복서열 내에서 인코딩된다. 인간은 4q 대립유전자 둘 다에서 상이한 사본 수의 D4Z4 반복서열을 갖을 수 있다. 10개보다 많은 D4Z4 어레이가 전형적으로 헤테로 크로마틴에 포함되고, 결과적으로 각 반복서열에 위치한 DUX4 유전자는 억압된다.

[0008] FSHD1은 하나의 대립유전자에서 D4Z4 반복서열의 수 (1개 내지 10개의 D4Z4 사본)의 선천성 감소에 의해 유발되고, 이는 다시 해당 영역의 후생적 침묵화를 방해한다. FSHD2는 크로마틴 개질제 유전자 (SMCHD1, DNMT3B)의 돌연변이로 인해 생성되고, 또한 이는 D4Z4 반복서열의 후생적 탈억압을 유도한다. 둘 다의 경우에, DUX4 유전자는 DUX4 mRNA로 전사될 수 있다. 그러나, DUX4의 후생적 유전자 침묵화의 감소는 개별 반복서열이 DUX4 전사체를 안정화하는 폴리A 신호가 부족하기 때문에 FSHD를 유발하기에 충분하지 않다. FSHD를 야기하려면 마지막 반복서열에 인접한 pLAM 영역을 포함하는 4qA로 불리는 특이적 염색체 배경의 유전이 요구된다. pLAM 영역은 마지막 DUX4 사본에 폴리A 신호를 제공한다. 따라서, 4qA 반수체형에서 DUX4 전사가 발생하는 경우, 텔로미어에 가장 가까이 위치하는 전장의 DUX4 전사체가 안정화되고, 근육에 독성이 있는 DUX4 단백질로 번역된다. FSHD를 포함하는 이러한 근육 디스트로피의 치료 그리고 치료를 위한 산물 및 방법은 여전히 당 업계에 필요하다. 마찬가지로, DUX4가 다양한 암과 관련되기 때문에, DUX4의 억제제가 치료가 되는 DUX4의 발현과 관련된 암에 대한 치료가 여전히 당 업계에 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원에서는 이중 호메오박스 4 (DUX4)의 발현 또는 과다발현에 의해 유해한 침범을 받은 근육 디스트로피를 치료하기 위한 산물 및 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 근육 디스트로피는 FSHD이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 Cas13의 도움으로 DUX4 발현을 억제하도록 설계된 핵산을 포함하는 핵산, 조성물 및 바이러스성 벡터, 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 억제하고/거나 간섭하는데 이들 산물을 사용하는 방법, 근육디스트로피로 고생하는 대상체를 치료하는 방법, 그리고 재조합 유전자 편집 복합체로서, Cas13 또는 Cas13 오르토토그 또는 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 및 DUX4 및 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 표적 핵산 서열에 특이적으로 혼성화하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산을 포함하고, 상기 복합체의 표적 핵산 서열에 대한 결합은 DUX4 유전자 발현을 억제하는, 재조합 유전자 편집 복합체를 제공한다.

[0011] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산을 제공한다.

[0012] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산을 제공한다.

[0013] 일부 양태에서, 핵산은 Cas13b 직접 반복서열 서열을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, Cas13b 직접 반복서열은 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산의 하류 또는 3' 말단에 위치한다. 일부 양태에서, Cas13b 직접 반

복하는 서열은 서열번호 37에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 37에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

- [0014] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산을 제공한다.
- [0015] 일부 양태에서, 본 발명의 핵산은 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 프로모터는 임의의 U6, U7, tRNA, H1, 최소 CMV, T7, EF1-알파, 최소 EF1-알파 또는 골격근 특이적 프로모터이다. 일부 양태에서, 근육 특이적 프로모터는 unc45b, tMCK, 최소 MCK, CK6, CK7, MHCK7 또는 CK1이다.
- [0016] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 적어도 하나의 핵산을 제공한다.
- [0017] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공된 임의의 하나 이상의 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스(AAV)를 제공한다. 일부 양태에서, 상기 AAV는 동일한 핵산의 다중 사본을 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, AAV는 동일한 gRNA의 다중 사본을 포함한다. 일부 양태에서, AAV는 상이한 핵산의 다중 사본을 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, AAV는 gRNA 조합의 다중 사본을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 바이러스는 rep 및 cap 유전자를 포함한다. 일부 양태에서, 바이러스는 rep 및 cap 유전자가 결여된다. 일부 양태에서, 상기 아데노 관련 바이러스는 재조합 AAV (rAAV)이다. 일부 양태에서, 아데노 관련 바이러스는 자가-상보적 재조합 AAV (scAAV)이다. 일부 양태에서, AAV는 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-anc80 또는 AAV rh.74이다. 일부 양태에서, AAV는 AAV-9이다.
- [0018] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 하나 이상의 핵산 및 본 발명의 임의의 하나 이상의 AAV를 조성물로 제공한다. 일부 양태에서, 상기 조성물은 또한 희석제, 부형제 및/또는 허용가능한 담체를 포함한다. 일부 양태에서, 담체는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 생리학적으로 허용가능한 담체이다.
- [0019] 일부 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 억제하고/거나 간섭하는 방법으로서, 상기 세포를 임의의 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54; 25 내지 35 및 59 내지 62; 및 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및/또는 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스 또는 조성물; 및 Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스를 제공한다. 일부 양태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인헨서-/MCK 인헨서-프로모터 (MHCK7) 또는 데스민 프로모터의 조절 하에 있다.
- [0020] 일부 양태에서, 본 발명은 근육 디스트로피로 고생하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 임의의 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54; 25 내지 35 및 59 내지 62; 및 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및/또는 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스 또는 조성물; 및 Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인헨서-/MCK 인헨서-프로모터 (MHCK7) 또는 데스민 프로모터의 조절 하에 있다.

다. 다양한 양태에서 근육 디스트로피는 FSHD이다.

[0021]

일부 양태에서, 본 발명은 근육 디스트로피를 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 아데노 관련 바이러스의 계놈은 (a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; (d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; 또는 (e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합을 포함하는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인핸서-/MCK 인핸서-프로모터 (MHCK7) 또는 테스민 프로모터의 조절 하에 있다. 다양한 양태에서 근육 디스트로피는 FSHD이다.

[0022]

일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현 또는 DUX4 발현의 수준 상승과 관련된 암으로 고생하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 임의의 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54; 25 내지 35 및 59 내지 62; 및 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및/또는 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스 또는 조성물; 및 Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인핸서-/MCK 인핸서-프로모터 (MHCK7) 또는 테스민 프로모터의 조절 하에 있다. 다양한 양태에서, 상기 암은 DUX4+ 암이다. 다양 양태에서, 상기 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 폐암, 신장암, 난소암, 횡문근암 (또는 횡문근육종), 육종, 위암, 고환암, 흉선종, 흑색종 또는 전이성 흑색종이다.

[0023]

일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현 또는 DUX4 발현의 수준 상승과 관련된 암을 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 아데노 관련 바이러스의 계놈은 (a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; (d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; 또는 (e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합을 포함하는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 Cas13 단백질 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 양

태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스와 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인헨서-/MCK 인헨서-프로모터 (MHCK7) 또는 데스민 프로모터의 조절 하에 있다. 다양한 양태에서, 상기 암은 DUX4+ 암이다. 다양 양태에서, 상기 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 폐암, 신장암, 난소암, 횡문근암 (또는 횡문근육종), 육종, 위암, 고환암, 흉선종, 흑색종 또는 전이성 흑색종이다.

[0024] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 유전자 편집 복합체로서, Cas13 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산, 및 DUX4 및 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 표적 핵산 서열에 특이적으로 혼성화하는 gRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산을 포함하고, 상기 복합체의 상기 표적 핵산 서열에 대한 결합은 DUX4 유전자 발현을 억제하는, 재조합 유전자 편집 복합체를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 상기 핵산은 (a) 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중 호메오박스 4 (DUX4) 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (b) 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산; (c) 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; (d) 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산 또는 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 90%의 동일성을 포함하는 이의 변이체; 또는 (e) 임의의 이들 (a) 내지 (d)의 조합을 포함하는, gRNA 및 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 재조합 유전자 편집 복합체는 Cas13 단백질, 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13b 또는 Cas13b 오르토로그 또는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13b 단백질은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 80%의 동일성을 포함하는 이의 변이체에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 재조합 유전자 편집 복합체는 DUX4 저해성 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 아데노 관련 바이러스를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산의 발현은 U6 프로모터, U7 프로모터, T7 프로모터, tRNA 프로모터, H1 프로모터, 최소 EF1-알파 프로모터, 최소 CMV 프로모터, CMV 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 알파-미오신 중쇄 인헨서-/MCK 인헨서-프로모터 (MHCK7) 또는 데스민 프로모터의 조절 하에 있다. 다양한 양태에서, 재조합 유전자 편집 복합체는 근육 디스트로피의 치료 또는 근육 디스트로피 치료를 위한 약제의 생산에 사용된다. 일부 양태에서, 재조합 유전자 편집 복합체는 FSHD의 치료 또는 FSHD의 치료를 위한 약제의 생산에 사용된다.

[0025] 일부 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 발현 및/또는 DUX4 과다발현을 감소시키기 위한 약제의 생산 및/또는 근육 디스트로피의 치료를 위한 본원에 기재된 핵산 및 재조합 유전자 편집 복합체의 용도를 제공한다. 일부 양태에서, 근육 디스트로피는 FSHD이다.

[0026] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 상세한 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 반면, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변경 및 변형이 이러한 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명해질 것이기 때문에, 단지 예시로서 제공되는 것으로 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a 및 도 1b는 DUX4 mRNA에서 각 Cas13b gRNA의 표적화 부위를 나타낸다. 회색 박스는 DUX4 엑손 1, 엑손 2 및 엑손 3을 나타낸다. 인트론 1, 엑손 2, 인트론 2 및 엑손 3은 DUX4의 3' UTR로서 작용한다. DUX4 표적하는 miRNA 리드는 화살표로 표시된다. miRNA 위치 매칭된 gRNA는 선으로 표시된다. 가이드 RNA 1 내지 11은 도 1a에 제시된다. 가이드 RNA 1 내지 11 및 13 내지 16은 도 1b에 제시된다.

도 2a 내지 도 2d는 HEK293 세포에서 DUX4 유전자를 침묵화하도록 설계된 CRISPR-Cas13b gRNA 서열의 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 2a는 단백질 수준에서 DUX4 유전자를 효율적으로 침묵화하는 각 gRNA (본원에 기재된

gRNA 1 내지 12)의 능력에 대한 웨스턴 블롯 테스트의 결과를 나타낸다. 알파-튜블린은 로딩 대조군으로서 사용되었다. 도 2b는 형질감염 이후 48시간째 캐스파제 3/7 세포 사멸 검정법을 보여준다. DUX4는 세포 사멸을 유발하고, DUX4 단독을 발현하는 세포는 캐스파제 3/7 활성이 상승하여 세포가 아포토시스를 겪고 있음을 나타낸다. 대조적으로, 효과적인 가이드 RNA (gRNA 1 내지 12)와 함께 Cas13b를 수여받은 모든 DUX4 형질감염된 세포는 기저선 수준의 캐스파제 3/7 활성으로 표시되어 세포 사멸로부터 보호되었다. 도 2c는 도 2b의 데이터를 검증하는 세포 생존 검정법 결과를 보여준다. DUX4 단독을 수여받은 시료와 비교하여 Cas13b 및 gRNA로 처리된 DUX4 형질감염된 시료에서는 유의하게 더 많은 살아있는 세포가 있었다. 도 2d는 가이드 RNA 없이 Cas13b 자체가 DUX4 단백질 발현을 감소시키지 않는 것을 입증하도록 웨스턴 블롯을 사용한 대조군 실험의 결과를 보여준다.

도 3a 내지 도 3e는 처리된 및 처리되지 않은 근관 (myotube)의 RNAscope 영상을 나타낸다. 도 3a는 처리되지 않은 FSHD 근관을 보여준다. 도 3b는 처리되지 않은 건강한 근관을 보여준다. 도 3c는 Cas13b 형질감염된 FSHD 근관을 보여준다. 도 3d는 Cas13b + gRNA3로 처리된 FSHD 근관을 보여준다. 도 3e는 Cas13b + gRNA9로 처리된 FSHD 근관을 보여준다. DUX4 mRNA 초점은 화살표로 표시된 진한 천공점으로 검출된다. DUX4 RNA 초점은 CRISPR-Cas13b gRNA 처리된 시료에서 감소되었다 (도 3d 및 도 3e).

도 4는 Cas13b + gRNA 또는 대조군으로 처리된 FSHD 근관에서 DUX4 관련 바이오마커 PRAME 패밀리 구성원 12 (PRAMEF12)의 발현을 나타낸다. DUX4는 PRAMEF12를 포함한 다수의 하류 유전자를 활성화하는 것으로 알려진 전사인자이다. CRISPR-Cas13b gRNA1, gRNA2, gRNA3 및 gRNA9로 처리된 FSHD 근관은 Cas13b 단독 또는 Cas13b + gRNA12로 처리된 세포와 비교하여 PRAMEF12 발현이 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 DUX4 발현의 감소가 DUX4 활성화된 바이오마커의 감소와 관련된 것을 가리킨다. 각 개별 검정법은 각 조건에 대해 두 번씩 수행되었다.

도 5는 본 발명의 다양한 양태에서 개시된 바와 같이 gRNA 1 내지 11 및 13 내지 16 (서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58)의 DUX4 표적화 서열 그리고 인간 U6 프로모터, gRNA (서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54에 기재된 바와 같음) 및 Cas13b 직접 반복서열 (서열번호 37)을 포함하는 gRNA 1 내지 11 및 13 내지 16 발현 카세트 (서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66)를 나타낸다.

도 6a 내지 도 6c는 Cas13b 및 다양한 gRNA 플라스미드에 의한 형질감염 이후 DUX4 활성화에 대해, 다양한 DUX4 표적 (바이오마커), 즉 TRIM43 (도 6a), MBD3L2 (도 6b) 및 PRAMEF12 (도 6c)의 상대적 발현 수준의 감소에 의해 나타나는 바와 같은 DUX4 활성화 억제의 qRT-PCR 결과를 나타낸다. 인간 *RPL13A*를 참조 유전자로서 사용하였다. 이들 바이오마커의 발현 수준은 음성 대조군으로서 Cas13b 형질감염된 근관 단독으로 정규화되었다. 3가지 바이오마커 각각의 발현 수준은 Cas13b 형질감염된 세포 단독과 비교하여 Cas13b 및 gRNA로 형질감염시킨 이후 감소하였다.

도 7은 시험관내 유전자 침묵화 검정법의 결과를 나타낸다. 모든 gRNA는 DUX4를 표적하고, 레닐라 루시페라제 발현을 감소시킬 수 있었다. 이러한 특정한 검정법으로 관찰되는 가장 중요한 침묵화는 gRNA1, 2 및 15에 의해 달성되었다.

도 8은 mCherry 발현을 마커로서 사용하여 DUX4 발현의 감소를 측정하도록 수행된 시험관내 형광 검정법의 결과를 나타낸다. 비-표적화 gRNA (gRNA12) 또는 Cas13b 단독 형질감염된 세포와 비교하여 gRNA1 및 2로 처리된 세포에서 mCherry 발현이 유의하게 감소하였다.

도 9a 내지 도 9c는 TIC-DUX4 마우스 모델을 사용한 생체내 실험의 결과를 나타낸다. 도 9a는 TIC-DUX4 마우스가 타목시펜 치료 단독으로 시간 경과 시 마우스 근육 (전경골 (TA), 비복근 (GAS) 및 삼두근 (TRI))에서 WAP 4개 디설파이드 코아 도메인 단백질 3 (WFDC3)의 상대적 발현에 의해 표시되는 바와 같이 경증 진행성 근육 병리학을 발생시키도록 유도될 수 있음을 나타낸다. 도 9b는 1 mg/kg 타목시펜이 시간 경과 시 매주 3회 투여된 이후 (DUX4를 표적하는 gRNA의 투여 없음), TIC-DUX4 마우스의 TA 및 GAS 근육에서 증가하는 DUX4 발현 및 조직 손상을 나타낸다. 도 9c 내지 도 9e는 TIC-DUX4 마우스에서 AAV-CRISPR-Cas13 (gRNA1을 포함함)의 신생 마우스 근육내 주사의 결과를 나타낸다. 신생 TIC-DUX4 마우스 (1일 내지 2일령 신생 마우스)는 1일 내지 2일째 5e10 AAV.Cas13 및 AAV.gRNA1을 일방측으로 공동-주사하였다. 4주 후 마우스는 타목시펜 프로토콜 (1 mg/kg, 4주 동안 매주 3회)에 착수하였다. WFDC3의 발현은 gRNA1 및 Cas13b로 처리된 마우스에서 감소되었다.

도 10은 gRNA 1 내지 11 및 13 내지 16이 캐스파제 3/7 검정법으로 DUX4의 독성을 감소시키고, 아포토시스로부터 세포를 보호함을 나타낸다.

도 11은 sAAV6-Cas13b 및 scAAV6-gRNA1 (5e10)을 마우스 TA에 공동-주사한 이후 DUX4 (1e9)로 주사 3주 후 DUX4 mRNA 및 단백질의 감소 (WFDC3의 상대적 발현에 의해 표시되는 바와 같음)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 근육에서 DUX4의 발현이 이에 한정되지 않지만 안면견갑상완 근육 디스트로피 (FSHD)를 포함하는 근육 디스트로피를 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에, CRISPR/Cas13을 사용하여 mRNA 수준에서 이중 호메오박스 단백질 4 (DUX4) 유전자 침묵화를 달성하는 신규 전략을 제공한다. 따라서, 일부 양태에서, 본원에 기술된 산물 및 방법은 FSHD의 치료에 사용된다.
- [0029] FSHD의 중요한 전향적 치료 표적으로서 DUX4의 출현은 FSHD에 대한 번역 연구를 추구하는데 장벽을 낮추었다. Cas13b 시스템에 따라 DUX4 mRNA를 표적하는 가이드 RNA를 사용하여 DUX4 발현을 감소시킴으로써, 질환에 대한 치료를 제공하는 능력이 있다. 본 발명은 Cas13 시스템의 채용과 함께 조작된 인위적인 가이드 RNA에 의해 촉발되는 DUX4 유전자 침묵화가 DUX4 발현을 하향조절하여 세포 사멸로부터 보호하는 증거, 그리고 FSHD와 같은 근육 디스트로피를 치료하는 유망한 치료적 접근법을 제공한다.
- [0030] DUX4 유전자는 대략 45kDA 단백질을 인코딩한다. UniProtKB-Q9UBX2 (DUX4_HUMAN) 참조. DUX4 유전자의 탈억압은 FSHD의 질환 발병기전에 관여한다. 탈억압은 2가지의 알려진 메커니즘을 통해 일어날 수 있다: D4Z4 반복서열 수축 또는 크로마틴 개질제 유전자 SMCHD1 또는 DNMT3B의 돌연변이. 전자의 경우, 침범을 받지 않은 대상체에서 D4Z4 어레이는 11개 내지 100개의 반복서열로 구성되는 반면, FSHD1 환자에서는 어레이가 1개 내지 10개의 반복서열로 축소된다 (PubMed: 19320656). 둘 중 하나의 조건은 염색체 4q35에서 DNA 과소메틸화를 유발하고, 이로써 DUX4 발현을 허용하는 염색체 환경을 만든다.
- [0031] DUX4는 체세포 조직에서 후생적으로 억압되는 D4Z4 거대위성염색체에 위치한다. FSHD1에서 D4Z4 크로마틴 풀림은 골격근 핵의 하위집합에서 DUX4의 비-효율적인 후생적 억압 및 다양화된 양상의 DUX4 단백질 발현을 유도한다. 골격근에서 DUX4의 이소성 발현은 줄기 세포 및 생식계열 유전자의 발현을 활성화하고, 체세포에서 과발현될 때 DUX4는 궁극적으로 세포 사멸로 유도할 수 있다.
- [0032] 각 D4Z4 반복서열 단위는 2개의 호메오박스를 인코딩하는 개방해독틀 (DUX4로 명명됨)을 갖고, 반복서열 어레이 및 ORF는 다른 포유동물에서 보존된다. 인코딩된 단백질은 ZSCAN4, PRAMEF12, TRIM43 및 MBD3L2 (PMID: 24861551)를 포함하며 FSHD 질환 바이오마커로 간주되는 일부 유전자를 포함하여 수많은 유전자의 전사 활성인자로서 기능하는 것으로 보고되었다. 거대위성염색체 반복서열의 수축은 상염색체 우성 FSHD를 유발한다. 대안의 스플라이싱은 다수의 전사체 변이체를 생성한다.
- [0033] 일부 양태에서, 인간 DUX4를 인코딩하는 핵산은 서열번호 1에 기재된 뉴클레오티드 서열에 제시된다. 일부 양태에서, 인간 DUX4의 아미노산 서열은 서열번호 2에 개시된 아미노산 서열에 제시된다. 다양한 양태에서, 본 발명의 방법은 또한 서열번호 1에 기재된 뉴클레오티드 서열의 이소형 및 변이체를 표적한다. 일부 양태에서, 상기 변이체는 서열번호 1에 기재된 뉴클레오티드 서열과 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% 및 70%의 동일성을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산의 이소형 및 변이체를 표적한다. 일부 양태에서, 상기 변이체는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% 및 70%의 동일성을 포함한다.
- [0034] 현재까지 FSHD에 대한 치료법은 없으며, 근육 디스트로피 중에 상대적으로 많음에도 불구하고 FSHD 표적화된 번역 연구는 거의 발표되지 않았다. 여러 FSHD 후보 유전자가 확인되었지만, 최근 많은 연구는 FSHD 발병기전의 주요 원인이 전사인자를 인코딩하는 전구-아포토시스 DUX4 유전자인 것을 뒷받침한다. 따라서, 가장 간단하게 말하면 DUX4 과다발현은 FSHD의 근간이 되는 일차 병원성 공격이다.
- [0035] 본 발명은 이에 한정되지는 않지만 FSHD 또는 돌연변이된 DUX4 유전자 및 이로 인해 변경된 mRNA 버전으로부터 유도된 기타 장애를 포함하는 근육디스트로피에 걸린 대상체를 개선하고/거나, 치료하도록 DUX4 발현을 침묵화하거나 하향조절하여 CRISPR/Cas13의 용도를 포함한다. CRISPR-Cas 적응성 면역계는 RNA 안내된 엔도뉴클레아제를 통해 외래 핵산에 대하여 미생물을 방어한다. Cas13 효소는 정확한 RNA 편집화를 위해 CRISPR 분야에서 신속하게 주요 역할을 한다 (Cox *et al.*, RNA editing with CRISPR-Cas13, Science 358 (6366): 1019-27, 2017). 따라서, CRISPR/Cas13은 다양한 질환의 치료를 위해 고려되어 온 진핵세포의 유전자 조절

메커니즘이다.

- [0036] 본 발명은 DUX4 발현하는 암에 걸린 대상체를 개선하고/거나, 치료하도록 DUX4 발현을 침묵화하거나, 하향조절하는 CRISPR/Cas13의 용도를 포함한다. 전형적으로 정상 조직에서 침묵하는 초기 배아 전사인자인 DUX4가 방광, 유방, 폐, 신장, 위 및 기타 장기 부위의 많은 고품 종양에서 재발현되는 것으로 보고되었다 (Chew *et al.*, *Developmental Cell* 50 (5): 658-71.e7 (2019)). DUX4는 또한 흑색종 및 전이성 흑색종과 관련이 있다. **개인간 소통.** DUX4는 일반적으로 배아가 형성되고 발달할 때 발현되지만, 나중에 체세포 조직에서 후생적으로 억압되고 침묵화된다. 또한, DUX4가 육종에서 종양 발생 및 전이 과정에 역할을 담당하는 것으로 보고되었다 (Okimoto *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2019, 129 (8): 3401-3406). 대체적으로, DUX4는 방광암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 폐암, 신장암, 난소암, 횡문근암 (또는 횡문근육종), 육종, 위암, 고환암, 흉선종, 흑색종 또는 전이성 흑색종과 관련이 있다. 암 면역요법의 진보로 인해 항원 제시 및 종양 면역 상호작용을 조정하는 유전자를 식별하는 것이 중요하다. DUX4 발현이 MHC 클래스 I의 인터페론- γ 매개성 유도를 차단하여 DUX4 매개된 면역 회피에서 억압된 항원 제시를 암시하는 것이 입증되었다. 전이성 흑색종의 임상 데이터는 DUX4 발현이 항-CTLA-4에 반응하여 무-진행 및 전반적인 생존의 유의한 감소와 관련되는 것을 검증하였다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같이 DUX4 발현 또는 DUX4 과다발현을 억제하는 방법은 DUX4 관련 종양 또는 암의 치료 및 예방에서 치료적이다.
- [0037] 핵산 편집화는 특히 RNA 수준에서 유전병을 치료하는데 사용되며, 여기서 질환 관련 서열은 기능성 단백질 산물을 생성할 수 있다. 제 VI형 CRISPR-Cas 시스템은 프로그래밍 가능한 단일 효과기 RNA 안내된 리보뉴클레아제 Cas13을 포함한다. 강력한 녹다운이 가능한 Cas13 오르토로그를 조작하기 위해 제 VI형 시스템을 프로그래밍화하고 촉매적 불활성 Cas13 (dCas13)을 사용하여 ADAR2 (RNA 유형 2에 작용하는 아데노신 탈아미나제)에 의한 아데노신-이노신 탈아미나제 활성을 전사체로 안내함으로써 포유동물 세포에서 RNA 편집화를 입증하였다. 프로그래밍 가능한 A 대 I 대체 (복구)를 위한 RNA 편집화로서 지칭되는 이러한 시스템은 병원성 돌연변이를 포함하는 전장의 전사체를 편집하는데 사용될 수 있다 (Cox *et al.*, 상기).
- [0038] 일부 양태에서, 본 발명은 프로그래밍 가능한 단일 효과기 RNA 안내된 Rnase Cas13을 포함하는 제 VI형 CRISPR-Cas 시스템을 사용한다. 일부 양태에서, 본 발명은 2개의 crRNA 변이체를 갖는 CRISPR 관련 RNA 안내된 RNase 인 Cas13b (Smargon *et al.*, *Molecular Cell* 65: 618-30, 2017)를 사용한다. Cas13b는 장단의 직접 반복서열을 갖는 자체 CRISPR 어레이를 프로세싱하고, 표적 RNA를 절단하며, 부수적인 RNase 활성을 나타낸다.
- [0039] 본 발명은 본원에 기재된 다양한 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 구성되는 다양한 핵산을 포함한다. 일부 양태에서, 핵산은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 핵산은 뉴클레오티드 서열로 필수적으로 구성된다. 일부 양태에서, 핵산은 뉴클레오티드 서열로 구성된다.
- [0040] 본 발명은 Cas13, Cas13 오르토로그 및 Cas13 변이체 및 상기 Cas13, Cas13 오르토로그 및 Cas13 변이체를 사용하는 방법을 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, Cas13은 Cas13a, Cas13b 또는 Cas13c이다. 일부 양태에서, Cas13a, Cas13b 또는 Cas13c는 최적화된 포유동물 코돈이다. 일부 양태에서, Cas13b는 PspCas13b이다 (카탈로그 번호 pC0046, <https://www.addgene.org/103862/>; 또한 Cox *et al.*, *Science* 24: 358(6366): 1019-1027, 2017 참조). 예시적인 양태에서, Cas13은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 Cas13b 또는 서열번호 36에 기재된 서열과 적어도 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함하는 이의 변이체이다. 일부 양태에서, Cas13은 세포에서의 발현을 위한 바이러스성 벡터를 포함하는 포유동물 발현 벡터 내에 삽입된다. 일부 양태에서, Cas13a, Cas13b 또는 Cas13c 오르토로그에 대한 포유동물 gRNA는 세포에서의 발현을 위한 바이러스성 벡터를 포함하는 포유동물 발현 벡터 내에 클로닝된다. 일부 양태에서, 가이드 RNA 및/또는 Cas13을 인코딩하는 DNA는 프로모터의 발현 하에 있다. 일부 양태에서, 프로모터는 U6 프로모터이다.
- [0041] 일부 양태에서, Cas13 DUX4 RNA 침묵화는 DUX4 유전자가 동일한 D4Z4 DNA 반복서열 내에 내장되어 있고, 심지어 단일 부위 DNA 편집화 전략이 염색체 4번의 전체 말단을 절제할 수 있거나, 염색체 4번의 후생적 상태를 변경하여 가능하게 DUX4의 탈억압을 유도할 수 있는 D4Z4 반복서열의 단축된 어레이의 생산으로 인해 DNA 유도된 편집화 전략보다 우수하다. 중요하게, 본 발명은 DUX4 발현을 유의하게 감소시키는 Cas13 특이적 가이드 RNA를 제공한다.
- [0042] 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 RNA 표적화 가이드 RNA (gRNA)를 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 이들 서열은 다양한 크기의 발명의 안티센스 "가이드" 가닥 서열을

포함한다. 안티센스 가이드 가닥은 궁극적으로 서열 특이적 유전자 침묵화를 담당하는 RNA 유도된 침묵화 복합체의 RNA 구성요소가 되는 성숙한 miRNA 이중체의 가닥이다. Duan (Ed.)의 섹션 7.3, 제 7장의 섹션 7.3, Muscle Gene Therapy, Springer Science + Business Media, LLC (2010) 참조.

- [0043] 예를 들어, 제 1 안티센스 가이드 가닥, 즉 서열번호 3의 gRNA는 서열번호 14에 기재된 DUX4 서열에 상응한다 (이의 역상보체이고 이에 결합함). 도 5 및 표 1 참조, 이는 결합하는 gRNA 서열 및 DUX4 표적 서열을 나타낸다. 제 2 안티센스 가이드 가닥, 즉 서열번호 4의 gRNA는 서열번호 14 등에 기재된 DUX4 서열에 결합한다.
- [0044] 따라서, 본 발명은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4 인코딩하는 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 다양한 양태에서, 본 발명은 이들 gRNA를 각각 gRNA 1 내지 11 및 13 내지 16으로서 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 대조군으로서 사용되는 gRNA12를 제공한다. gRNA12는 Cas13b 비-표적화 gRNA이다 (Cox *et al.*, Science 24, 358 (6366): 1019-27, 2017).
- [0045] 다양한 양태에서, 본 발명은 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 또한, 본 발명은 Cas13b 직접 반복서열 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 (예로, 서열번호 37 또는 서열번호 37에 기재된 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함하는 이의 변이체)을 추가로 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 양태에서, Cas13b 직접 반복서열은 gRNA의 하류에 위치하거나, 3' 말단에 위치한다. 따라서, 일부 양태에서, 핵산은 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 구성된다. 일부 양태에서, 핵산은 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%의 동일성을 포함하는 변이체이다. 일부 양태에서, 본 발명은 프로모터, gRNA, 및 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 Cas13 직접 반복서열 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 양태에서, 핵산은 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함하는 변이체를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이 이러한 기능적 gRNA 및 gRNA를 포함하는 구조물은 DUX4 RNA를 표적하도록 설계된다.
- [0046] 본 발명은 희석제, 부형제 또는 완충액과 조합하여 본원에 기재된 임의의 핵산을 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다.
- [0047] Cas13b 직접 반복서열 서열을 갖는 gRNA를 Cas13 효소 (예로, Cas13b)를 발현하는 벡터와 함께 포함하는 이러한 gRNA의 전달은 DUX4 mRNA의 분해를 유발하여 DUX4 단백질을 감소시킨다. 일부 양태에서, Cas13b 효소를 인코딩하는 핵산은 서열번호 36에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 36에 기재된 서열 또는 이의 생물학적 활성 단편과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함하는 이의 변이체를 포함한다. 일부 양태에서, Cas13b 유전자 서열은 pC0046-EF1a-PspCas13b-NES-HIV 플라스미드 (애드진사)이다.
- [0048] 일부 양태에서, DUX4 유전자의 표적화를 위해, 하나 이상의 Cas13 구조물(들)은 하나 이상의 gRNA 구조물(들)과 함께 관심있는 세포 내에 공동-형질감염된다. 추가적인 양태에서, 하나 이상의 Cas13 구조물(들)은 관심있는 세포에서 DUX4 유전자 발현을 억제하도록 설계된 하나 이상의 gRNA 구조물(들) 및 하나 이상의 마이크로RNA (miRNA)와 공동-형질감염된다.
- [0049] 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현을 하향조절하거나 억제하기 위한 RNA 간섭의 사용을 포함한다. RNA 간섭 (RNAi)은 다양한 질환의 치료를 위해 고려되었던 진핵세포의 유전자 조절 메커니즘이다. RNAi는 miRNA에 의해 매개되는 유전자 발현의 전사-후 조절을 말한다. miRNA는 작은 (21개 내지 25개의 뉴클레오티드), 동족체 메신저 RNA (mRNA)의 3' 번역되지 않는 영역과 서열 상동성 및 염기쌍을 공유하는 비-코딩 RNA이다. miRNA 및 mRNA 사이의 상호작용은 mRNA의 번역을 방지하는 세포성 유전자 침묵화 기구를 안내한다.
- [0050] 예시적인 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현을 간섭하기 위한 gRNA의 사용을 포함한다. 추가적인 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현을 추가로 감소 또는 차단하도록 본원에 기재된 gRNA와 조합하여 사용되는 다른 억제성 RNA의 용도를 포함한다.
- [0051] 천연 RNAi 경로에 대한 이해가 발전함에 따라, 연구자들은 질환을 치료하는 표적 유전자의 발현을 조절하는데 사용되는 인위적인 shRNA 및 snRNA를 설계하였다. 여러 부류의 작은 RNA는 짧은 (또는 작은) 간섭 RNA

(siRNA), 짧은 (또는 작은) 헤어핀 RNA (shRNA) 및 마이크로RNA (miRNA)를 포함하여 포유동물 세포에서 RNAi 과정을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 이는 유사한 부류의 벡터 발현되는 촉발인자를 구성한다 [Davidson *et al.*, Nat. Rev. Genet. 12: 329-40, 2011; Harper, Arch. Neurol. 66: 933-8, 2009]. shRNA 및 miRNA는 플라스미드 또는 바이러스 기반의 벡터로부터 *생체내* 에서 발현되어, 단일 투여로 벡터가 표적 세포 핵 내에 존재하고 구동 프로모터가 활성을 갖는 한 장기간 유전자 침묵화를 달성할 수 있다 (Davidson *et al.*, Methods Enzymol. 392: 145-73, 2005). 중요하게, 이러한 벡터 발현된 접근법은 근육 유전자요법 분야에서 이미 이루어진 수십 년 동안의 진보를 활용하지만, 단백질 코딩 유전자를 발현시키는 대신 RNAi 요법 전략에서의 벡터 적하물은 관심있는 질환 유전자를 표적하는 인위적인 shRNA 또는 miRNA 카세트이다. 이 전략은 천연 miRNA를 발현시키는 데 사용된다. 각 shRNA/miRNA는 hsa-miR-30a 서열 및 구조를 기반으로 한다. 천연 mir-30a 성숙한 서열은 표적 유전자로부터 유래한 독특한 센스 및 안티센스 서열에 의해 대체된다.

[0052] 본원에 상기 기재된 바와 같이, 본 발명은 DUX4 발현을 추가로 감소 또는 차단하도록 본원에 기재된 gRNA와 조합하여 사용되는 다른 억제성 RNA의 용도를 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 본 발명의 산물 및 방법은 또한 DUX4 발현에 영향을 주는 (예를 들어, 발현을 녹다운하거나, 억제함) 짧은 헤어핀 RNA 또는 작은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 짧은 헤어핀 RNA (shRNA/헤어핀 벡터)는 RNA 간섭 (RNAi)을 통해 표적 유전자 발현을 침묵화하는 데 사용될 수 있는 치밀한 헤어핀 회전을 갖는 인위적인 RNA 분자이다. shRNA는 상대적으로 분해 및 전환율이 낮은 점에서 RNAi의 유리한 매개체이지만, 발현 벡터의 사용을 요구한다. 일단 벡터가 숙주 계능에 형질도입되면, shRNA는 프로모터 선택에 따라 중합효소 II 또는 중합 효소 III에 의해 핵에서 전사된다. 상기 산물은 프리-마이크로RNA (pri-miRNA)를 모방하고 Drosha에 의해 프로세싱된다. 생성된 전구-shRNA는 엑스포틴 5에 의해 핵에서 외수송된다. 다음으로 이 산물은 Dicer에 의해 프로세싱되고, RNA 유도된 침묵화 복합체 (RISC) 내로 로딩된다. 센스 (패신저) 가닥은 분해된다. 안티센스 (가이드) 가닥은 RISC를 상보적 서열을 갖는 mRNA로 안내한다. 완전한 상보성의 경우, RISC는 mRNA를 절단한다. 불완전한 상보성의 경우, RISC는 mRNA의 번역을 억압한다. 이들 둘 다의 경우, shRNA는 표적 유전자 침묵화를 유도한다. 일부 양태에서, 본 발명은 shRNA를 통해 DUX4 안티센스 서열을 발현하는 AAV 벡터의 생산 및 투여를 포함한다. shRNA의 발현은 다양한 프로모터의 사용에 의해 조절된다. 프로모터 선택은 강건한 shRNA 발현을 달성하는데 필수적이다. 다양한 양태에서, U6 및 H1과 같은 중합효소 II 프로모터 및 중합효소 III 프로모터가 사용된다. 일부 양태에서, U6 shRNA가 사용된다.

[0053] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 유전자 발현을 추가로 억제, 녹다운 또는 간섭하기 위해 U6 shRNA 분자를 사용한다. 전통적인 작은/짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 서열은 보통 U6과 같은 Pol III 프로모터를 포함하는 벡터로부터 세포 핵 내부에서 전사된다. 내인성 U6 프로모터는 정상적으로 스플라이싱에 관여하는 작은 핵 RNA (snRNA)인 U6 RNA의 발현을 조절하며, 잘 특성화되었다 [Kunkel *et al.*, Nature 322(6074): 73-7 (1986); Kunkel *et al.*, Genes Dev. 2(2): 196-204 (1988); Paule *et al.*, Nucleic Acids Res. 28(6): 1283-98 (2000)]. 일부 양태에서, U6 프로모터는 포유동물 세포에서 shRNA 분자의 벡터 기반의 발현을 조절하는데 사용되고 [Paddison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(3): 1443-8 (2002); Paul *et al.*, Nat. Biotechnol. 20(5): 505-8 (2002)], 이는 (1) 프로모터가 RNA 중합효소 III (폴리 III)에 의해 인식되어 shRNA의 높은 수준의 구성적 발현을 조절하고, (2) 프로모터가 대부분의 포유동물 세포 유형에서 활성을 갖기 때문이다. 일부 양태에서, 프로모터는 shRNA의 발현을 조절하는 데 필요한 모든 요소가 전사 시작 부위의 상류에 위치하는 점에서 제 III형 Pol III 프로모터이다 (Paule *et al.*, Nucleic Acids Res. 28(6): 1283-98). (2000)). 본 발명은 마우스 및 인간 U6 프로모터 모두를 포함한다. 루프로 연결된 표적 유전자로부터의 센스 및 안티센스 서열을 포함하는 shRNA는 핵으로부터 세포질로 이동하여 Dicer가 이를 작은/짧은 간섭 RNA (siRNA)로 프로세싱한다.

[0054] 일부 구현예에서, 본 발명의 산물 및 방법은 DUX4 유전자 발현을 녹다운하거나 추가로 억제하기 위해 공통적으로 U-RNA로도 지칭되는 작은 핵 리보핵산 (snRNA)을 포함한다. snRNA는 진핵 세포에서 세포핵의 스플라이싱 반점 및 카잘체 내에서 발견되는 작은 RNA 분자의 부류이다. 작은 핵 RNA는 특이적 단백질 세트와 연관되어 있으며, 복합체는 작은 핵 리보핵단백질 (snRNP, 종종 "스너프 (snurps)"로 발음됨)로서 지칭된다. 각 snRNP 입자는 snRNA 구성요소 및 여러 snRNP 특이적 단백질 (핵 단백질 패밀리인 Sm 단백질을 포함함)로 구성된다. snRNA는 관련 단백질과 함께 전구-mRNA 기질에서 특이적 서열에 결합하는 리보핵단백질 복합체 (snRNP)를 형성한다. 이들은 RNA 중합효소 II 또는 RNA 중합효소 III 둘 중 하나에 의해 전사된다. snRNA는 종종 공통적인 서열 특징 및 RNA 결합 LSm 단백질과 같은 관련 단백질 인자 둘 다를 기반으로 하여 두 부류로 나뉜다. Sm 부류의 snRNA로서 알려진 첫 번째 부류는 U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11 및 U12로 구성된다. Sm 부류의 snRNA는 RNA 중합효소 II에 의해 전사된다. Lsm 부류의 snRNA로서 알려진 두 번째 클래스는 U6 및 U6atac으로 구성된다. Lsm 부류의 snRNA는 Sm 부류의 snRNA와 달리 RNA 중합효소 III에 의해 전사되고, 핵을 이탈하지 않는다. 일부 양태

에서, 본 발명은 DUX4 안티센스 서열의 전달을 위한 U7 snRNA를 포함하는 AAV 벡터의 생산 및 투여를 포함한다.

[0055] 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 유전자 발현을 추가로 억제, 녹다운 또는 간섭하기 위해 U7 snRNA 분자를 사용한다. U7 snRNA는 정상적으로 히스톤 전구-mRNA 3' 말단 프로세싱에 관여하지만, 일부 양태에서 스플라이싱 조절을 위한 다목적 도구 또는 세포에서 지속적으로 발현되는 안티센스 RNA로서 전환된다 [Goyenville *et al.*, *Science* 306 (5702): 1796-9 (2004)]. 야생형 U7 Sm 결합 부위를 스플라이소좀 snRNA로부터 유래한 공통 서열로 대체함으로써 생성된 RNA는 스플라이소좀 snRNA에서 발견되는 7개의 Sm 단백질과 조립된다 (도 7). 결과적으로, 이러한 U7 Sm OPT RNA는 핵질에 더욱 효율적으로 축적되며, 여전히 히스톤 전구-mRNA에 결합할 수 있고 야생형 U7 snRNP에 대한 경쟁적 저해체로서 작용할 수 있지만 더 이상 히스톤 전구-mRNA 절단을 매개하지 않을 것이다. 히스톤 하류 요소에 결합하는 서열을 스플라이싱 기질에서 특이적 표적에 상보적인 것으로 추가로 대체함으로써, 특이적 스플라이싱 과정을 조절할 수 있는 U7 snRNA를 생성할 수 있다. U7 유도체를 사용하는 장점은 안티센스 서열이 작은 핵 리보핵단백질 (snRNP) 복합체에 내장되는 것이다. 더욱이, 유전자요법 벡터에 삽입될 때, 이들 작은 RNA는 단일 주사 후 표적 세포 내부에서 영구적으로 발현될 수 있다 [Levy *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* 18(9): 969-70 (2010); Wein *et al.*, *Hum. Mutat.* 31(2): 136-42, (2010); Wein *et al.*, *Nat. Med.* 20(9): 992-1000 (2014)]. AAV 접근법을 사용하는 신경근육 장애에서 U7snRNA 시스템의 잠재력은 *생체내*에서 조사되어 왔다 (AAV.U7) [Levy *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* 18(9): 969-70 (2010); Wein *et al.*, *Hum. Mutat.* 31(2): 136-42 (2010); Wein *et al.*, *Nat. Med.* 20(9): 992-1000 (2014)]. 듀첸 근육 디스트로피의 마우스 모델의 결합있는 RNA를 표적하는 이러한 AAV9.U7의 단일 주사는 심장과 횡격막을 포함한 모든 근육의 질환을 장기적으로 교정한다. DM1 환자가 심장 이상을 나타내기 때문에 심장을 표적하는 능력은 정말 중요하다.

[0056] U7 snRNA는 정상적으로 히스톤 전구-mRNA 3' 말단 프로세싱에 관여하지만, 스플라이싱 조절을 위한 다목적 도구 또는 세포에서 지속적으로 발현되는 안티센스 RNA로서도 사용된다. U7 유도체를 사용하는 장점은 안티센스 서열이 작은 핵 리보핵단백질 (snRNP) 복합체에 내장되는 것이다. 더욱이, 유전자요법 벡터에 삽입될 때, 이들 작은 RNA는 단일 주사 후 표적 세포 내부에서 영구적으로 발현될 수 있다.

[0057] 본 발명의 구현에는 벡터 (예를 들어, 아데노 관련 바이러스 (AAV), 아데노 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 말 관련 바이러스, 알파바이러스, 폭스 바이러스, 헤르페스 바이러스, 폴리오바이러스, 신드비스 바이러스 및 백시니아 바이러스와 같은 바이러스성 벡터)를 이용하여 본원에 개시된 DUX4 억제성 RNA 및 DUX4 gRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 전달한다. 일부 양태에서, 각 gRNA 및 각 Cas13b는 개별적으로 벡터 내에 클로닝된다. 따라서, 일부 양태에서 본 발명은 본 발명에서 상기 본원에 기재된 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 벡터는 AAV 벡터이다. 일부 양태에서, 상기 벡터는 단일가닥 AAV 벡터이다. 일부 양태에서 상기 AAV는 제조형 AAV (rAAV)이다. 일부 양태에서, 상기 rAAV는 rep 및 cap 유전자가 결합된다. 일부 양태에서, 상기 rAAV는 자가-상보적 (sc) AAV이다.

[0058] 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 발현을 녹다운 또는 억제하기 위해 DUX4 mRNA를 표적하는 gRNA를 포함하는 억제성 RNA를 인코딩하는 핵산을 전달하기 위해 아데노 관련 바이러스 (AAV)를 이용한다. 일부 양태에서, AAV는 Cas13 또는 Cas13 오르토로그 또는 변이체를 인코딩하는 핵산을 전달하는데 사용된다. AAV는 복제-결합 파보바이러스이며, 이의 단일가닥 DNA 게놈은 145개의 뉴클레오티드 역전된 말단 반복서열 (ITR)를 포함하여 약 4.7 kb 길이이다. AAV의 다수의 혈청형이 존재한다. AAV 혈청형의 게놈의 뉴클레오티드 서열이 공지되어 있다. 예를 들어, AAV-1의 완전한 게놈은 진뱅크 기탁번호 NC_002077에 제공되고; AAV-2의 완전한 게놈은 진뱅크 기탁번호 NC_001401 및 Srivastava *et al.*, *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983)에 제공되며; AAV-3의 완전한 게놈은 진뱅크 기탁번호 NC_1829에 제공되고; AAV-4의 완전한 게놈은 진뱅크 기탁번호 NC_001829에 제공되고; AAV-5 게놈은 진뱅크 기탁번호 AF085716에 제공되고; AAV-6의 완전한 게놈은 진뱅크 기탁번호 NC_001862에 제공되고; AAV-7 및 AAV-8 게놈의 적어도 일부는 진뱅크 기탁번호 AX753246 및 AX753249에 각각 제공된다 (또한 AAV-8에 관한 미국 특허 7,282,199 및 7,790,449 참조); AAV-9 게놈은 Gao *et al.*, *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004)에 제공되고; AAV-10 게놈은 *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006)에 제공되고; AAV-11 게놈은 *Virology*, 330(2): 375-383 (2004)에 제공된다. 바이러스성 DNA 복제 (rep), 캡시드화/패키징 및 숙주 세포 염색체 혼입을 유도하는 시스-작용 서열은 AAV ITR 내에 포함된다. 3개의 AAV 프로모터 (이들의 상대적 맵 위치에 대해 p5, p19 및 p40으로 지칭됨)는 rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 2개의 AAV 내부 개방 관독들의 발현을 구동한다. 단일 AAV 인트론 (뉴클레오티드 2107번 및 2227번)의 차등 스플라이싱과 결합된 2개의 rep 프로모터 (p5 및 p19)는 rep 유전자로부터 4개의 rep 단백질 (rep78, rep68, rep52 및 rep40)을 생성한다. Rep 단백질은 바이러스성 게놈 복제에 궁극적인 원인으로 작용하는 다중 효소 특성을 갖는다. cap 유전자는 p40 프로모터로부터 발현되며, 3개의 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 인코딩한다. 대안적 스플라이싱 및 비-공통 번역 개시 부위는 3가지 관

련 캡시드 단백질의 생산에 관여한다. 단일 공통 폴리아데닐화 부위는 AAV 계놈의 맵 위치 95번에 위치한다. AAV의 생애 주기 및 유전학은 Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992)에서 검토된다.

[0059] AAV는 예를 들어 유전자요법에서 세포에 외래 DNA를 전달하기 위한 벡터로서 이를 적당한 후보로 만드는 독특한 특성을 갖는다. 배양 중인 세포의 AAV 감염은 비-세포변성성이며, 인간과 기타 동물의 자연적 감염은 침묵성이고 증상이 없다. 더욱이, AAV는 생체내 많은 상이한 조직을 표적할 가능성이 존재하는 많은 포유동물 세포를 감염시킨다. 더욱이, AAV는 분할 및 비-분할 세포를 서서히 형질도입하고, 상기 세포의 생존 기간 동안 본질적으로 전사적으로 활성을 갖는 핵 에피솜 (염색체 외 요소)으로서 유지할 수 있다. AAV 프로바이러스 (proviral) 계놈은 플라스미드 내 클로닝된 DNA로서 삽입되며, 이는 재조합 계놈의 제작을 실현가능하도록 한다. 또한, AAV 복제 및 계놈 피막화 및 혼입을 지시하는 신호가 AAV 계놈의 ITR 내에 포함되기 때문에, (복제 및 구조 캡시드 단백질, rep-cap을 인코딩하는) 계놈의 내부 대략 4.3 kb의 일부 또는 전부가 외래 DNA에 의해 대체될 수 있다. rep 및 cap 단백질은 트랜스로 제공될 수 있다. AAV의 또 다른 중요한 특징은 이것이 매우 안정한 튼튼한 바이러스인 점이다. 이는 아데노바이러스를 불활성화하는데 사용되는 조건 (수 시간 동안 56°C 내지 65°C)을 용이하게 견딜 수 있게 하여 AAV의 저온 보존의 중요성을 감소시킨다. AAV는 동결건조될 수 있으며, AAV 감염된 세포는 슈퍼감염에 저항성이 없다. 일부 양태에서, AAV는 U6 프로모터의 조절 하에 gRNA를 포함한 억제성 RNA를 전달하는데 사용된다. 일부 양태에서, AAV는 U7 프로모터의 조절 하에 억제성 RNA를 전달하는데 사용된다. 일부 양태에서, AAV는 U7 및 U6 프로모터의 조절 하에 gRNA 및 기타 억제 RNA 둘 다를 전달하는데 사용된다. 일부 양태에서, AAV는 U6 프로모터의 조절 하에 gRNA, 억제성 RNA 및 Cas13 (또는 Cas13 오르토토그 또는 변이체)을 전달하는데 사용된다.

[0060] 본 발명의 재조합 AAV 계놈은 적어도 하나의 DUX4 표적화된 폴리뉴클레오티드 구조물에 인접하는 하나 이상의 AAV ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 gRNA이다. 일부 양태에서, gRNA는 DUX4를 표적하는 다른 폴리뉴클레오티드 구조물과 함께 투여된다. 다양한 양태에서, gRNA는 U6, U7, tRNA, H1, 최소 CMV (예로, 미니CMV), T7, EF1-알파, 최소 EF1-알파, 골격근 특이적 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 프로모터 하에서 발현된다. 일부 양태에서, 이러한 근육 특이적 프로모터는 unc45b, tMCK, 최소 MCK, CK6, CK7, MHCK7, CK1을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 구체적으로, 이러한 전략은 다양한 양태에서 단일 백본의 다중 사본에서 동일한 gRNA의 더욱 효율적인 발현을 달성하는데 사용된다. rAAV 계놈의 AAV DNA는 재조합 바이러스가 유래할 수 있는, AAV 혈청형 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-anc80 및 AAV rh.74를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 AAV 혈청형으로부터 나올 수 있다. 본원에서 상기 기재된 바와 같이, 다양한 AAV 혈청형의 계놈의 뉴클레오티드 서열은 당 업계에 공지되어 있다.

[0061] 본 발명의 DNA 플라스미드는 본 발명의 rAAV 계놈을 포함한다. DNA 플라스미드는 rAAV 계놈을 감염성 바이러스 입자 내에 조립하기 위해 AAV의 헬퍼 바이러스 (예로, 아데노바이러스, E1 결실된 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스)로의 감염이 허용되는 세포로 전달된다. 패키징된 AAV 계놈, rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능이 세포에 제공되는 rAAV 입자를 생산하는 기술은 당 업계에서 표준이다. rAAV의 생산은 다음의 구성요소, rAAV 계놈, rAAV 계놈으로부터 분리된 (즉, 계놈 내에 존재하지 않음) AAV rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능이 단일 세포 (본원에서 패키징 세포로서 지칭됨) 내에 존재할 것을 요구한다. AAV rep 유전자는 재조합 바이러스가 유래할 수 있는 임의의 AAV 혈청형으로부터 나올 수 있고, AAV 혈청형 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-anc80 및 AAV rh.74를 포함하나 이에 한정되지 않는, rAAV 계놈 ITR과 상이한 AAV 혈청형으로부터 나올 수 있다. 일부 양태에서, rAAV 계놈의 AAV DNA는 재조합 바이러스가 유래할 수 있는, AAV 혈청형 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-anc80 및 AAV rh.74를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 AAV 혈청형으로부터 나온다. 다른 유형의 rAAV 변이체, 예를 들어 캡시드 돌연변이를 갖는 rAAV도 본 발명에 포함된다. 예를 들어, Marsic *et al.*, *Molecular Therapy*, 22 (11): 1900-1909 (2014) 참조. 상기에 언급된 바와 같이, 다양한 AAV 혈청형의 계놈의 뉴클레오티드 서열은 당 업계에 공지되어 있다. 동족체 구성요소의 용도가 구체적으로 고려된다. 위유형의 rAAV의 생산은 예를 들어, 본원에 이의 전문이 참고문헌으로 인용되는 국제특허출원 WO 01/83692에 개시되어 있다.

[0062] 본 발명의 재조합 AAV 계놈은, 예를 들어 하나 이상의 DUX4 억제성 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 인접하는 하나 이상의 AAV ITR을 포함한다. 시판 공급업체 예컨대 엠비온사 (Ambion Inc., Austin, TX), 다마콘사 (Darmacon Inc., Lafayette, CO), 인비보젠사 (InvivoGen, San Diego, CA) 및 몰레클라 라서차 랩사

(Molecular Research Laboratories, LLC, Herndon, VA)는 맞춤형 억제성 RNA 분자를 생산한다. 또한, 사일렌서제 siRNA 제작 키트 (Ambion Inc., Austin, TX) 또는 psiRNA 시스템 (InvivoGen, San Diego, CA)과 같은 맞춤형 siRNA 분자를 생산하기 위해 시판 키트가 사용가능하다. 구현에는 임의의 서열번호 25 내지 36 및 59 내지 62에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 rAAV 계놈을 포함한다.

[0063] 패키징 세포를 생성하는 방법은 AAV 입자 생산에 필요한 모든 구성요소를 안정적으로 발현하는 세포주를 만드는 것이다. 예를 들어, AAV rep 및 cap 유전자가 결합된 rAAV 계놈, rAAV 계놈으로부터 분리된 AAV rep 및 cap 유전자, 및 선별가능한 마커, 예컨대 네오마이신 저항성 유전자를 포함하는 플라스미드 (또는 다수의 플라스미드)는 세포의 계놈 내에 혼입된다. AAV 계놈을 GC 테일링 (Samulski *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2081), 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 함유하는 합성 링커의 첨가 (Laughlin *et al.*, 1983, Gene, 23: 65-73)와 같은 절차에 의해 또는 직접 블런트 말단 라이게이션 (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259: 4661-4666)에 의해 박테리아 플라스미드 내에 도입하였다. 다음으로 패키징 세포주는 아데노바이러스와 같은 헬퍼 바이러스와 함께 감염된다. 이러한 방법의 장점은 세포가 선별가능하고, rAAV의 대량 생산에 적합한 것이다. 적합한 방법의 다른 예는 rAAV 계놈 및/또는 rep 및 cap 유전자를 패키징 세포 내에 도입하기 위해 플라스미드보다는 아데노바이러스 또는 바칼로바이러스를 이용한다.

[0064] rAAV 생산의 일반 원리는 예를 들어 Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; 및 Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158: 97-129에 검토된다. 다양한 접근법이 Ratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984); Hermonat *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 (1984); Tratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985); McLaughlin *et al.*, J. Virol., 62: 1963 (1988); and Lebkowski *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988); Samulski *et al.* (1989, J. Virol., 63: 3822-3828); 미국 특허 US 5,173,414; 국제특허출원 WO 95/13365 및 상응하는 미국 특허 US 5,658,776; 국제특허출원 WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin *et al.* (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul *et al.* (1993) Human Gene Therapy 4: 609-615; Clark *et al.* (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132; 미국 특허 US 5,786,211; US 5,871,982; 및 US 6,258,595에 기술되어 있다. 전술한 문헌은 rAAV 생산에 관한 문헌의 해당 섹션을 특히 강조하여 본원에 이의 전문이 참고문헌으로 인용된다.

[0065] 따라서 본 발명은 감염성 rAAV를 생산하는 패키징 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 패키징 세포는 HeLa 세포, 293 세포 및 PerC.6 세포 (동족체 293 계열)와 같은 안정적으로 형질전환된 암 세포이다. 또 다른 구현예에서, 패키징 세포는, 형질전환된 암 세포, 예컨대 낮은 계대 293 세포 (아데노바이러스의 E1으로 형질전환된 인간 태아 신장 세포), MRC-5 세포 (인간 태아 섬유모세포), WI-38 세포 (인간 태아 섬유모세포), 배로 세포 (원숭이 신장 세포) 및 FRhL-2 세포 (레서스원숭이 태아 폐 세포)가 아닌 세포이다.

[0066] 일부 양태에서, rAAV는 칼럼 크로마토그래피 또는 염화세슘 구배와 같은 당 업계의 표준 방법에 의해 정제된다. 헬퍼 바이러스로부터 rAAV 벡터를 정제하는 방법은 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Clark *et al.*, Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002); 미국 특허 US 6,566,118 및 국제특허출원 WO 98/09657에 기재되어 있다.

[0067] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 구조물을 포함하는 rAAV를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 gRNA를 전달하기 위한 rAAV를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 DUX4 억제성 RNA와 함께 본원에 기재된 하나 이상의 gRNA를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이, gRNA 및 Cas13를 전달하기 위한 rAAV를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이, gRNA 및 Cas13를 전달하기 위한 rAAV 및 하나 이상의 DUX4 억제성 RNA를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 조성물은 rAAV 및 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다. 허용가능한 담체 및 희석제는 수여자에게 비-독성이며, 바람직하게는 사용된 용량 및 농도에서 불활성이고, 인산염, 시트르산 또는 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산과 같은 항산화제; 저분자량 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 포도당, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 만니톨 또는 소비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 및/또는 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

- [0068] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 rAAV를 필요한 양으로 상기 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적절한 용매에 혼합시킨 이후 필터 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산제는 멸균된 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 이전의 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분의 분말 및 임의의 추가적인 원하는 성분을 수득하는 진공 건조화 및 동결건조 기법이다.
- [0069] 본 발명의 방법에서 투여될 rAAV의 역가는 예를 들어 특정한 rAAV, 투여 방식, 치료 목표, 개인 및 표적화되는 세포 유형(들)에 따라 달라질 것이며, 당 업계의 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. rAAV의 역가는 약 1×10^6 개, 약 1×10^7 개, 약 1×10^8 개, 약 1×10^9 개, 약 1×10^{10} 개, 약 1×10^{11} 개, 약 1×10^{12} 개, 약 1×10^{13} 개, 약 1×10^{14} 개 이상의 mL 당 DNase 저항성 입자 (DRP) 범위일 수 있다. 또한, 용량은 바이러스 게놈 (vg)의 단위 (즉, 각각 1×10^7 개 vg, 1×10^8 개 vg, 1×10^9 개 vg, 1×10^{10} 개 vg, 1×10^{11} 개 vg, 1×10^{12} 개 vg, 1×10^{13} 개 vg, 1×10^{14} 개 vg)로 표현될 수 있다.
- [0070] 일부 양태에서, 본 발명은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54; 25 내지 35 및 59 내지 62; 및 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 임의의 하나 이상의 핵산을 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 방법으로서, 본원에 기술된 DUX4 인코딩하는 gRNA를 인코딩하는 AAV를 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0071] 일부 양태에서, 본 발명은 DUX4 gRNA의 전달을 위한 AAV 형질도입 세포를 제공한다. *생체내* 또는 *시험관내*에서 rAAV로 표적 세포를 형질도입하는 방법은 본 발명에 포함된다. 방법은 본 발명의 rAAV를 포함하는 조성물의 유효 용량 또는 유효 다중 용량을 이를 필요로 하는 동물 (예컨대 인간)을 포함한 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 투약이 근육 디스트로피의 발병 이전에 투여되는 경우, 투여는 예방적이다. 투약이 근육 디스트로피의 발병 이후에 투여되는 경우, 투여는 치료적이다. 본 발명의 구현예에서, 유효 용량은 치료되는 근육 디스트로피와 관련된 적어도 하나의 증상을 경감 (제거 또는 감소)하고, 근육 디스트로피의 진행을 늦추거나 예방하고, 근육 디스트로피의 진행을 늦추거나 예방하고, 근육 디스트로피의 정도를 감축하고, 근육 디스트로피의 퇴행 (부분 또는 전체)를 유도하고, 그리고/또는 생존을 연장시키는 용량이다. 일부 양태에서, 근육 디스트로피는 FSHD이다.
- [0072] 유효 용량의 조성물의 투여는 근육내, 비경구, 혈관내, 정맥내, 경구, 협측, 비강, 폐, 두개내, 뇌실내, 경막내, 골내, 안구내, 직장 또는 질을 포함하나 이에 한정되지 않는 당 업계의 표준 경로에 의할 수 있다. 본 발명의 rAAV의 AAV 성분 (구체적으로, AAV ITR 및 캡시드 단백질)의 투여 경로 및 혈청형(들)은 감염 및/또는 치료되는 질환 상태 그리고 표적 세포/조직(들) 예컨대 DUX4를 발현하는 세포를 고려하여 당업자에 의해 선택되고/거나 매칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여 경로는 근육내이다. 일부 구현예에서, 투여 경로는 정맥내이다.
- [0073] 구체적으로, 본 발명의 rAAV의 실제 투여는 rAAV 재조합 벡터를 동물의 표적 조직 내로 전달할 임의의 물리적 방법을 사용함으로써 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 투여는 근육, 혈류, 중추 신경계 내로 및/또는 직접적으로 뇌 또는 다른 장기 내로 주사를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 인산염 완충 식염수에 rAAV를 단순히 재현탁하는 것은 근육 조직 발현에 유용한 비히클을 제공하기에 충분한 것으로 입증되었으며, rAAV와 함께 공동-투여될 수 있는 담체 또는 다른 성분에 관하여 (DNA를 분해하는 조성물이라면 rAAV를 사용한 정상적인 방식에서 피해야 하지만) 공지된 제한은 없다. rAAV의 캡시드 단백질은 rAAV가 근육과 같은 관심있는 특정한 표적 조직을 표적하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고문헌으로 인용되는 국제특허출원 WO 02/053703 참조. 약제학적 조성물은 경피적 전달에 의해 근육에 전달되는 주사가 가능한 제형물 또는 국소 제형물로서 제조될 수 있다. 근육내 주사 및 경피적 전달 둘 다를 위한 수많은 제형물이 이전에 개발되었고 본 발명의 관행에서 사용될 수 있다. rAAV는 용이한 투여 및 취급을 위해 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 사용될 수 있다.
- [0074] 근육내 주사를 위해, 멸균 용액뿐만 아니라 참기름 또는 땅콩유와 같은 아췌반트 또는 수용성 프로필렌 글리콜이 사용될 수 있다. 이러한 수용성 용액은 원하는 경우 완충화될 수 있고, 액체 희석제는 먼저 식염수 또는 포도당으로 등장성이 되게 한다. 유리산으로서 rAAV의 용액 (DNA가 산성 포스페이트기를 함유함) 또는 약제학적으로 허용가능한 염은 히드록시프로필셀룰로스와 같은 계면 활성제와 적절히 혼합된 물로 제조될 수 있다. rAAV의 분산제는 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 및 오일로 제조될 수 있다. 일반적

인 보관 및 사용 조건에서 이러한 조제물은 미생물의 성장을 방지하기 위해 방부제를 포함한다. 이와 관련하여, 사용된 멸균 수용성 매질은 모두 당업자에게 잘 알려진 표준 기법에 의해 쉽게 획득가능하다.

[0075] 주사용으로 적합한 약제학적 형태는 멸균 주사용 용액 또는 분산제의 즉석 제조를 위한 멸균 수용성 용액 또는 분산제 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 상기 형태는 멸균되어야 하며 용이하게 주사할 수 있는 정도까지 유동적이어야 한다. 이것은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 양태에서, 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 야기될 수 있다. 많은 경우에, 당 또는 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 야기될 수 있다.

[0076] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 rAAV를 필요한 양으로 상기 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적절한 용매에 혼합시킨 이후 필터 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산제는 멸균된 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 이전의 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분의 분말 및 임의의 추가적인 원하는 성분을 수득하는 진공 건조화 및 동결건조 기법이다.

[0077] 용어 "형질도입"은 수여자 세포에 의한 DUX4 억제성 RNA의 발현을 유도하는 본 발명의 복제-결합 rAAV를 통해, 생체내 또는 시험관내에서 수여자 세포로 gRNA를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 DUX4 억제성 RNA, 및 하나 이상의 Cas13 인코딩하는 뉴클레오티드의 투여/전달을 말하는데 사용된다.

[0078] 일 양태에서, rAAV를 사용한 형질도입은 시험관내에서 수행된다. 일 구현예에서, 원하는 표적 세포는 대상체로부터 제거되고, rAAV로 형질도입되고 대상체 내로 재도입된다. 대안적으로, 동종 또는 이종 세포는 이들 세포가 대상체에서 부적절한 면역 반응을 생성하지 않는 곳에서 사용될 수 있다.

[0079] 형질도입된 세포의 대상체 내로 형질도입 및 재도입에 적합한 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 일 구현예에서, 세포는 예로 적절한 배지에서 rAAV를 세포와 조합하고, 관심있는 DNA를 보유하는 세포를 서던 블롯 및/또는 PCR과 같은 통상적인 기법을 사용하여 또는 선별가능한 마커를 사용하여 스크리닝함으로써 시험관내 형질도입될 수 있다. 다음으로, 형질도입된 세포는 약제학적 조성물로 제형화될 수 있고, 조성물은 다양한 기법, 예컨대 근육내, 정맥내, 피하 및 복강내 주사에 의해, 또는 예로 카테터를 사용한 평활근 및 심장 근육 내 주사에 의해 대상체 내에 도입될 수 있다.

[0080] 본 발명은 DUX4 발현을 감소하도록 표적화된 gRNA를 인코딩하는 DNA 및 Cas13b 직접 반복서열 및 Cas13을 인코딩하는 DNA를 포함하는 rAAV의 유효 용량 (또는 필수적으로 동시에 투여되는 용량 또는 간격으로 주어진 용량)을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다.

[0081] 본 발명의 rAAV로의 세포의 형질도입은 DUX4 발현 및 Cas13b 직접 반복서열을 표적하는 가이드 RNA의 지속적인 발현을 유도한다. 따라서, 본 발명은 억제성 RNA를 발현하는 rAAV를 대상체에게 투여/전달하는 방법을 제공한다. 이러한 대상체는 동물 대상체이고, 일부 양태에서 대상체는 인간이다.

[0082] 이러한 방법에는 혈액 및 혈관계, 중추 신경계 및 조직 (이에 한정되지 않지만, 근육 세포 및 뉴런, 골격근을 포함한 근육과 같은 조직, 심장, 뇌, 피부, 눈과 같은 기관, 및 내분비샘 및 침샘과 같은 내분비계 및 샘을 포함함)을 본 발명의 하나 이상의 rAAV로 형질도입시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 형질도입은 조직 특이적 대조군 요소를 포함하는 유전자 카세트로 수행된다. 예를 들어, 본 발명의 일 구현예는 이에 한정되지 않지만 myoD 유전자 패밀리와 같은 액틴 및 미오신 유전자 패밀리를 포함한다 [Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991) 참조], 근세포 특이적 인핸서 결합인자 MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol. Cell Biol.* 11: 4854-4862 (1991)], 인간 골격 액틴 유전자로부터 유래한 조절요소 [Muscat *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 4089-4099 (1987)], 심장 액틴 유전자, 근육 크레아틴 서열 요소 [Johnson *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 9: 3393-3399 (1989) 참조] 및 마우스 크레아틴 키나제 인핸서 (mCK) 요소, 골격 고속 스위치 트로포닌 C 유전자, 저속 심장 트로포닌 C 유전자 및 저속 스위치 트로포닌 I 유전자로부터 유래한 조절요소: 하이포지아 유도성 핵인자 [Semenza *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5680-5684 (1991)], 글루코코르티코이드 반응 요소 (GRE)를 포함한 스테로이드 유도성 요소 및 프로모터 [Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5603-5607

(1993) 참조], tMCK 프로모터 [Wang *et al.*, Gene Therapy, 15: 1489-1499 (2008) 참조], CK6 프로모터 [Wang *et al.*, 상기] 및 기타 조절요소를 포함하는 근육 특이적 조절요소에 의해 구동되는 근육 세포 및 근육 조직을 형질도입하는 방법을 제공한다.

[0083] AAV는 DUX4를 발현하는 침범을 받은 모든 장기를 표적하기 때문에, 본 발명은 억제성 RNA를 인코딩하는 DNA를 대상체의 모든 세포, 조직 및 장기로 전달하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 혈액 및 혈관계, 중추 신경계, 근육 조직, 심장 및 뇌는 생체내 DNA 전달을 위한 매력적인 표적이다. 본 발명은 DUX4 발현에 영향을 주는 (예를 들어, 발현을 녹다운하거나 억제함) 형질도입된 세포로부터 DUX4 억제성 gRNA의 지속적인 발현을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 형질도입된 근섬유로부터 DUX4 억제성 gRNA의 지속적인 발현을 포함한다. "근육 세포" 또는 "근육 조직"은 임의의 종류의 근육 (예를 들어, 골격근 및 평활근, 예로 소화관, 방광, 혈관 또는 심장 조직으로부터 나옴)으로부터 유래한 세포 또는 세포군을 의미한다. 일부 양태에서, 이러한 근육 세포는 근모세포, 근세포, 근관, 심근세포 및 심근모세포와 같이 분화되거나 미분화될 수 있다.

[0084] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 방지하거나, 억제하는 방법으로서, 세포를 DUX4 억제성 gRNA를 인코딩하는 rAAV와 접촉시키는 단계를 포함하고, gRNA는 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 gRNA는 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54 중 어느 하나에 기재된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, DUX4의 발현은 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100%로 억제된다.

[0085] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 방지하거나, 억제하는 방법으로서, 세포를 DUX4 억제성 gRNA를 인코딩하는 rAAV와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 gRNA는 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DUX4를 인코딩하는 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, DUX4의 발현은 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100%로 억제된다.

[0086] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 방지하거나, 억제하는 방법으로서, 세포를 DUX4 억제성 gRNA 및 Cas13b 직접 반복서열을 인코딩하는 벡터, 예로 rAAV 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 gRNA 및 Cas13b 직접 반복서열은 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 이들의 변이체에 의해 인코딩되는, 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 DUX4 유전자의 발현을 방지하거나, 억제하는 방법으로서, 세포를 서열번호 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 이들의 변이체를 포함하는, 프로모터, DUX4 억제성 gRNA 및 Cas13b 직접 반복서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 이들의 변이체는 서열번호 25 내지 35 및 59 내지 62 또는 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 포함한다. 일부 양태에서, DUX4의 발현은 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 100%로 억제된다.

[0087] 또 다른 양태에서, 본 발명은 근육 디스트로피 (FSHD를 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 방지하거나, 치료하는 방법으로서, U6 프로모터 서열, DUX4를 표적하는 gRNA 서열 및 Cas13b 직접 반복서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 인코딩하는 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54, 25 내지 35 및 59 내지 62, 또는 38 내지 48 및 63 내지 66 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법을 제공한다. 일부 양태에서, Cas13b 직접 반복서열 서열은 서열번호 37에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 벡터는 AAV이다. 일부 양태에서, 상기 AAV는 재조합 AAV (rAAV)이다. 일부 양태에서, 상기 rAAV는 rep 및 cap 유전자가 결여된다. 일부 양태에서, rAAV는 자가-상보적 (sc) AAV이다. 일부 양태에서, AAV는 RNA를 편집하는 Cas13 단백질과 함께 사용된다. 일부 양태에서, Cas13은 서열 특이적 gRNA를 사용하여 관심있는 전사체에 특이적으로 안내된다.

[0088] 일부 양태에서, 본 발명은 Cas13 (예를 들어, Cas13b)과 조합하여 전달되어 DUX4 유전자를 편집하는 Cas13b 직접 반복서열 서열에 부착되는, 본원에 기재된 다양한 gRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 제조

합 유전자 편집 복합체를 제공한다. 이러한 유전자 편집 복합체는 DUX4의 발현을 조작하고, DUX4와 같은 질환 관련 서열이 몹시 발현되는 근육 디스트로피와 같은 비정상적 DUX4 발현과, 구체적으로 RNA 수준에서 관련된 유전병을 치료하는 데 사용된다. 제 VI형 CRISPR-Cas 시스템은 프로그래밍 가능한 단일 효과기 RNA 안내된 RNase Cas13을 포함한다. Cas13 효소는 강건한 녹다운을 할 수 있고, 촉매적 불활성 Cas13을 사용하여 포유동물 세포에서 전사체로 RNA 편집화를 입증할 수 있다 (Cox *et al.*, RNA Editing with CRISPR-Cas13, Science. 24, 358 (6366): 1019-1027, 2017).

- [0089] Cas13가 원핵생물 기원이고, 더욱 전통적인 유전자 치환 전략을 사용하여 표적 세포에 전달되기 때문에, CRISPR-Cas13은 표적 유전자 침묵화를 달성하기 위해 내인성 효소에 의존하지 않는다. DUX4를 표적하는 본원에 개시된 CRISPR-Cas13 시스템은 침묵화를 개선하는데 단독으로 또는 억제성 RNA (RNAi)와 조합하여 사용될 수 있다. RNAi가 DUX4 침묵화를 효율적으로 수행하지만, 상기 RNAi에 의한 침묵화는 표적 DUX4 유전자의 100% 침묵화를 거의 유도하지 못한다. 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 다른 RNAi 산물과 조합한 본원에 기재된 재조합 유전자 편집화 시스템 및 DUX4 유전자를 표적하는 방법 둘 다의 사용을 제공한다.
- [0090] "치료하는"은 근육 소모, 근육 약화, 근긴장, 골격근 문제, 망막의 이상, 고관절 쇠약, 안면 쇠약, 복부 근육 쇠약, 관절과 척추 이상, 하지 쇠약, 어깨 쇠약, 청력 상실, 근육 염증 및 비대칭 쇠약을 포함하나 이에 한정되지 않는 근육 디스트로피의 하나 이상의 증상을 개선하거나, 억제하는 것을 포함한다.
- [0091] 분자적, 생화학적, 조직학적 및 기능적 종결점은 인간 염색체 4q35에서 DUX4 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNA의 Cas13 단백질 편집화 및 본원에 개시된 방법을 포함하여 RNA 간섭 기반의 산물의 치료적 효능을 입증하고 있다. 본 발명에 의해 고려되는 종결점은 DUX4 단백질 발현의 감소 또는 제거 중 하나 이상을 포함하며, 이는 상승된 DUX4 발현과 관련된 이에 한정되지 않지만 FSHD 및 기타 장애를 포함하는 근육 디스트로피의 치료에 적용된다.
- [0092] 본 발명은 또한 본원에 기재된 장애의 치료에 사용되는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 약제학적으로 허용가능한 담체 내에 본원에 상기 기재된 임의의 핵산 또는 본원에 상기 기재된 임의의 바이러스성 벡터를 포함하는 적어도 제 1 멸균 조성물을 포함한다. 또 다른 구성성분은 선택적으로 치료적 조성물의 투여에 적합한 용기 및 비히클과 함께 장애의 치료를 위한 제 2 치료제이다. 키트는 선택적으로 제 1 및 제 2 조성물을 현탁하거나, 희석하거나, 아의 전달의 효과를 발휘하기 위한 용액 또는 완충액을 포함한다.
- [0093] 일 구현예에서, 이러한 키트는 밀봉된 병 또는 접시와 같은 용기에 포장된 희석제 중 핵산 또는 벡터를, 용기에 고정되거나 핵산 또는 벡터의 용도를 설명하는 포장에 포함된 라벨과 함께 포함한다. 일 구현예에서, 희석제는 용기의 상부공간 (예를 들어, 액체 제형물 및 용기의 최상단 사이의 공간의 양)이 매우 작도록 용기에 존재한다. 바람직하게, 상부공간의 양은 무시할만하다 (즉, 거의 없음).
- [0094] 일부 양태에서, 제형물은 안정화제를 포함한다. 용어 "안정화제"는 가열 또는 동결 동안 발생하는 것과 같은 불리한 조건으로부터 제형물을 보호하고/하거나, 안정한 상태에서 제형물의 안정성 또는 보관기간을 연장시키는 물질 또는 부형제를 말한다. 안정화제의 예는 슈크로스, 락토스 및 만노스와 같은 당; 만니톨과 같은 당 알코올; 글리신 또는 글루탐산과 같은 아미노산; 및 인간 혈청 알부민 또는 젤라틴과 같은 단백질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0095] 일부 양태에서, 제형물은 항균성 보존제를 포함한다. 용어 "항균성 보존제"는 사용되는 바이알 또는 용기의 반복적인 개방 시 도입될 수 있는 미생물의 성장을 억제하는, 조성물에 첨가되는 임의의 물질을 말한다. 항균성 보존제의 예는 티머로살, 2-펜옥시에탄올, 염화벤제토폴 및 페놀과 같은 물질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0096] 일부 양태에서, 키트는 키트에 제공된 시약의 용도를 설명하는 라벨 및/또는 설명서를 포함한다. 키트는 또한 임의로 본원에 기재된 방법에 사용되는 하나 이상의 조성물의 전달을 위한 카테터, 주사기 또는 기타 전달 장치를 포함한다.
- [0097] 본 출원 전체는 통합된 발명으로서 연관시키려고 의도되며, 본원에 기재된 특징의 모든 조합은, 이러한 특징의 조합이 본 출원의 동일한 문장 또는 단락 또는 섹션에서 발견되지 않는 경우에도 고려되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명은, 예를 들어 상기 구체적으로 언급된 변형보다 어떤 방식으로든 범위가 더 좁은 본 발명의 모든 구현예를 포함한다. 속으로 기재된 본 발명의 양태와 관련하여, 모든 개별 종은 본 발명의 별도의 양태로 간주된다. 단수형 ("a" 또는 "an")으로 기재되거나 청구된 본 발명의 양태와 관련하여, 문맥상 보다 제한된 의미를 명백하게 요구하지 않는 한, 이들 용어는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명

의 양태가 어떠한 특징을 "포함하는" 것으로 기재되는 경우, 구현에는 또한 상기 특징으로 "구성되는" 또는 상기 특징으로 "필수적으로 구성되는" 것으로 고려된다.

[0098] 본 명세서에서 인용된 모든 공보, 특허 및 특허출원은 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허출원이 구체적으로 및 개별적으로 이의 전문이 본 발명과 부합하는 정도로 참고문헌으로 인용되도록 표시된 바와 같이 본원에 참고문헌으로 인용된다.

[0099] 본원에 기재된 실시예 및 구현에는 단지 예시적인 목적이며, 이에 비추어 다양한 변형 및 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 본 출원의 정신 및 범위 그리고 첨부된 청구항의 범주 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다.

[0100] **실시예**

[0101] 본 발명의 양태 및 구현에는 하기 실시예에 의해 예시되고, 이는 임의의 방식으로 본 발명의 범위를 제한하도록 의미하지 않는다.

[0102] **실시예 1**

[0103] **DUX4 표적화 Cas13b-gRNA의 설계 및 테스트**

[0104] *DUX4 표적화 Cas13b-gRNA의 설계*

[0105] DUX4 표적화 Cas13b-gRNA가 설계되었다. *프레보텔라 (Prevotella)* 종으로부터의 Cas13b 효소, P5-125 (PspCas13b) 및 관련된 gRNA를 본 연구에 사용하였다. DUX4 특이적 gRNA를 설계하기 위해, mi405, mi406 및 mi1155와 같은 리드 마이크로RNA (miRNA) miDUX4 구조물과 위치 매칭되도록 표적화 서열을 선별하였다. 미국 특허 US 9,469,851 참조. PspCas13b gRNA의 구조와 이의 표적 부위는 도 1에 나타난다. 인간 U6 프로모터를 갖는 gRNA 서열은 통합된 DNA 테크놀로지사 (IDT) (Skokie, IL)에 의해 합성되었다. 인간 코돈 최적화된 PspCas13b (pc0046)를 발현하는 플라스미드는 애드진사 (매사추세츠주 캠브리지)로부터 구입하였다.

[0106] *웨스턴 블롯 검정법*

[0107] HEK293 세포 (250,000개 세포/웰)를 형질감염 16시간 전에 24-웰 플레이트에 접종하였다. 다음날 아침에, 세포를 리포펙타민 2000 (썬모피셔사, US)을 사용하여 900 ng의 PspCas13b 및 1800 ng gRNA 플라스미드로 공동-형질감염하였다. 형질감염 8 내지 10시간 후 배지를 교체하고, 세포를 180 ng DUX4 플라스미드로 재형질감염하였다. 형질감염 20시간 후, 세포를 프로테아제 저해제를 함유하는 각테일이 보충된 RIPA 완충액 (50 mM 트리스, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% 소듐데옥시콜레이트, 1% 트리톤 ×100)에 용해시켰다. 단백질 농도를 DC 단백질 검정 키트 (바이오래드랩사)에 의해 결정하였다. 총 단백질 시료 각각의 20 µg을 12% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 전개하였다. GE 헬스케어사 레인보우 분자량 마커 (피셔사이언티픽사, USA)를 사용하여 단백질 밴드의 분자량을 측정하였다. 단백질을 SDS-PAGE 젤로부터 반-건조된 트랜스퍼 방법을 통해 PVDF 막으로 트랜스퍼하였다. 막을 5% 무-지방 우유에서 차단시킨 다음 일차 단일클론 마우스 항-DUX4 (1 : 500; P4H2, 노부스 바이오로지칼사) 또는 토끼 다중클론 항-α 튜블린 항체 (1 : 1,000; ab15246, Abcam, 매사추세츠주 캠브리지)와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척 후 다음날, 블롯을 호스래디쉬 퍼옥시다제-결구게이트된 염소 항-마우스 또는 염소 항-토끼 이차 항체 (1 : 100,000; 잭슨 면역노리서치사, West Grove, PA)로 실온에서 1시간 동안 추적하였다. 상대적 단백질 밴드를 임모빌리온 화학발광성 HRP 기질 (밀리포아사, Billerica, MA)에서 단기간 배양 이후 X-선 필름 상에 현상하였다.

[0108] *세포 사멸 검정법*

[0109] HEK293 세포 (50,000개 세포/웰)를 리포펙타민 2000을 사용하여 DUX4, Cas13b 및 gRNA 발현하는 플라스미드로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 도말하였다. 세포 사멸을 형광 플레이트 판독기 (스펙트라 맥스 M2, 분자 장치사, Sunnyvale, CA)를 사용하여 형질감염 48시간 후 Apo-ONE 균질한 캐스파제 3/7 검정법 (프로메가사, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다. 개별 검정법은 3벌씩 (n = 3) 수행하였으며, 데이터는 DUX4 단독으로 형질감염된 대조군에 비해 평균 캐스파제 활성으로서 보고하였다. 결과는 도 2b에 나타난다.

[0110] *생존능 검정법*

[0111] HEK293 세포 (250,000개 세포/웰)를 리포펙 타민 2000을 사용하여 DUX4, Cas13b 및 gRNA 발현하는 플라스미드로 공동-형질감염시키고, 24-웰 플레이트에 도말하였다. 5% CO₂, 37°C에서 48시간 배양한 후, 세포를 트립신 처리하여 1 mL의 성장 배지에 수집하였다. 카운테스® 세포 선별 체임버 슬라이드 (썬모피셔사, US)를 사용하여 자동화된 세포 계수를 수행하였다. 다음으로 결과를 혈구계와 트립판 블루 염색을 사용하여 전통적인 세포

계수로 검증하였다. 데이터는 실험 당 평균 총 세포수로서 보고하였다. 오차 막대는 SD를 표시한다. 결과는 도 2c에 나타낸다.

[0112] *RNAscope* 검정법

[0113] Cas13b 및 gRNA 플라스미드, 각각 3 및 6 µg을 FSHD 근모세포 [15A 세포 (Jones *et al.*, Human Molecular Genetics 21 (20): 4419-30, 2012); 500,000개 세포/반응] 내에 론자 뉴클레오펙터 키트 (론자사, VVPD-1001)를 사용하여 공동-형질감염하였다. 다음으로 FSHD 근모세포를 근모세포 성장 배지를 포함하는 24-웰 플레이트의 2개의 웰에 있는 유리 커버슬립 상에서 배양하였다. 24시간 후, 성장 배지를 분화 배지로 교체하고, 7일 동안 세포를 근관으로 분화시켰다. 근관을 4% PFA (피셔 사이언티픽사, USA)에서 30분 동안 실온에서 고정하였다. 다음으로 이들을 실온에서 5분마다 50%, 70% 및 100% 에틸 알코올 구배에 의해 탈수하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라, 세포를 RNAscope 2.5 HD 갈색 검정법 (Advanced Cell Diagnostics)을 사용하여 설계된 DUX4 프로브로 염색하였다. 올림푸스 DP71 현미경으로 영상을 촬영하였다.

[0114] *DUX4* 바이오마커의 정량적 실시간 PCR 분석

[0115] Cas13b 및 gRNA 플라스미드, 각각 3 및 6 µg을 FSHD 근모세포 (15A; 500,000개 세포/반응) 내에 론자 뉴클레오펙터 키트 (론자사, VVPD-1001)를 사용하여 공동-형질감염시킨 다음 12-웰 플레이트에서 배양하였다. 24시간 후, 성장 배지를 버리고, 세포에 신선한 분화 배지를 첨가하여 근모세포를 근관으로 분화시켰다. 세포를 7일 내지 9일 동안 분화시켰다. 총 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라, 트리졸 (피셔사, Waltham, MA)을 사용하여 추출하였다. 단리된 RNA의 품질과 정량을 나노드롭™ (썬모피셔 사이언티픽사)에 의해 조사하였다. 다음으로 단리된 RNA를 DNase (무-DNA, 앰비온사, TX)로 처리하고, 무작위 육량체 (어플라이드 바이오시스템 cDNA 아카이브 키트; 어플라이드 바이오시스템사, Foster City, CA)를 사용하여 RT-PCR에 사용하였다. 다음으로 후속 cDNA 시료를 사전 설계된 PRAMEF12 (*DUX4* 활성의 바이오마커) 및 인간 RPL13A 대조군 프라이머/프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템사)를 사용하여 Taqman 검정법을 위한 주형으로서 사용하였다. 각 시료를 2벌씩 전개하였다. 모든 데이터는 Cas13b 발현하는 시료로 정규화하였다.

[0116] 실시예 2

[0117] *DUX4* mRNA 표적화 gRNA

[0118] 박테리아 면역계인 CRISPR-Cas 시스템을 포유동물 세포의 게놈 또는 RNA 편집화에 사용하였다. 본 연구의 목표는 *DUX4* 유전자 침묵화 RNA 표적화 CRISPR-Cas13 접근법을 사용하여 FSHD와 같은 근육 디스트로피에 대한 전향적 치료법을 개발하는 것이었다. 이를 위해, 인간 *DUX4* mRNA를 표적하는 11개의 서로 다른 Cas13b gRNA (도 1)를 조작하였다. 각 gRNA 서열을 U6 프로모터 구동된 발현 카세트에 클로닝하고, *시퀀스* 스크리닝 검정법을 수행하여 리드 *DUX4* 표적화된 gRNA를 확인하였다.

[0119] 상기 Cox *et al.*에 따르면, 본 연구에 사용된 *프리보텔라* 종로부터의 Cas13b 효소 P5-125 (PspCas13b)는 포유동물 RNA 편집화를 위한 매우 효율적인 Cas13 효소이다. Cas13b gRNA는 포유동물 세포에서 간섭하는 특정한 프로토스페이스 인접하는 서열 (PFS) 제한을 갖지 않지만, 5' 말단 또는 이중 3' 및 5' 말단의 G 염기는 PspCas13b 효소의 효율을 약간 증가시킬 수 있다 (Cox *et al.*, 상기). 강력한 PFS 선호도가 없기 때문에, 임의의 원하는 mRNA의 부분이 표적 서열로서 선택될 수 있고, 관련된 역상보적 서열이 Cas13b gRNA에 사용될 수 있다. 이전에, 연구자들은 shRNA 위치 매칭된 gRNA를 사용하여 각 방법의 효율성 간의 더 나은 비교를 용이하게 하였다 (Omar *et al.*, Nature 550(7675): 280-4, 2017).

[0120] 본 실험에서는, 표적화 서열을 mi405, mi406 및 mi1155 (미국 특허 US 9,469,851 참조)와 같은 여러 miDUX4 RNA 서열과 위치 매칭되도록 선택하였다. 이러한 miRNA는 *DUX4* mRNA의 양에서 유의한 감소를 보여 주었기 때문에, 표적 mRNA 서열이 miRNA 및 후속으로 위치 매칭된 gRNA를 표적하기 위한 양호한 접근성 (개방 또는 부분적 개방 구조)을 갖는 것으로 이론화되었다. PspCas13b gRNA의 표적 부위는 도 1a 및 도 1b에 나타낸다. 각 gRNA의 서열은 서열번호 3 내지 13 및 51 내지 54에 기재되어 있다. 각 gRNA에 대한 *DUX4* DNA 표적 서열은 서열번호 14 내지 24 및 55 내지 58에 기재되어 있다.

[0121] 실시예 3

[0122] *DUX4* mRNA 표적화 gRNA의 선별

[0123] 본원에 개시된 *DUX4* mRNA 표적화 gRNA 서열을 *DUX4* 단백질 및 이의 독성을 감소시키는 능력에 대해 선별하였다.

- [0124] 각 gRNA 플라스미드를 HEK293 세포에서 Cas13b 플라스미드 및 DUX4 플라스미드와 함께 형질감염하였다. 단백질 수준에서 DUX4를 침묵화하는 각 gRNA의 능력을 조사하였다 (도 2a). 테스트된 각 gRNA는 *시험관내*에서 DUX4 단백질 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0125] 다음으로 각 gRNA를 캐스파제 3/7 검정법을 통해 형질감염된 세포에서 DUX4 유도된 아포토시스를 감소시키는 능력에 대해 테스트하였다. 각 gRNA는 DUX4 단독으로 형질감염된 세포 (대조군)와 비교하여, 캐스파제 3/7 활성을 감소시켰다 (도 2b). 수행된 세포 생존능 검정법은 각 gRNA가 처리된 세포의 생존능을 증가시키고, 즉 DUX4 유도된 아포토시스를 감소시키는 것을 입증하였다 (도 2c).
- [0126] HEK293 세포를 다른 비율의 DUX4 : Cas13b 발현하는 플라스미드로 공동-형질감염하여 다른 비율이 더 잘 작동하는지 여부를 결정하고, 웨스턴 블롯 검정법을 수행하여 DUX 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 테스트된 모든 비율은 DUX4 단백질 양의 감소를 보여주었다 (도 2d).
- [0127] **실시예 4**
- [0128] **RNAscope 제자리 혼성화는 처리된 FSHD 근관에서 DUX4 mRNA 양의 유의한 감소를 입증하였다**
- [0129] RNA 수준에서 DUX4 침묵화를 조사하기 위하여, 근관으로 분화된 처리된 FSHD 근모세포 및 RNAscope 제자리 혼성화를 특이적으로 설계된 DUX4 표적화된 프로브를 사용하여 수행하였다.
- [0130] 처리되지 않은 FSHD 근관은 높은 수준의 DUX4 mRNA를 보여준 반면 (도 3a), Cas13b로 DUX4를 표적하는 gRNA로 처리된 모든 시료는 갈색 염색으로 입증된 바와 같이, 유의하게 감소된 DUX4 mRNA의 양을 나타내었다 (도 3d 및 도 3e). 사실상, Cas13b로 DUX4를 표적하는 gRNA로 처리된 시료는 건강한 근관에서 관찰된 수준과 유사한 DUX4 mRNA 수준을 나타내었다 (도 3b (대조군)). Cas13b 단독으로의 처리 (대조군)는 DUX4 mRNA 수준의 일부 감소를 유도하였지만 (도 3c), DUX4 mRNA 수준은 여전히 건강한 대조군 (도 3b)보다 높았으며, Cas13b 대조군 (도 3c) 및 DUX4 표적화된 gRNA-Cas13b로 처리된 시료 간에 유의한 차이가 있었다 (도 3d 및 도 3e).
- [0131] **실시예 5**
- [0132] **처리된 세포에서 PRAMEF12 바이오마커 발현 수준의 감소는 DUX4 활성의 감소를 나타낸다**
- [0133] Cas13b로 DUX4를 표적하는 gRNA의 도입에 의해 야기된 DUX4 표적의 유전자 발현에서 감소를 결정하기 위하여, 정량적 RT-PCR을 수행하여 DUX4 mRNA 표적화 gRNA-Cas13b 서열로 처리된 FSHD 근관에서 PRAMEF12 발현 (즉, DUX4 활성을 나타내는 바이오마커)을 PRAMEF12 특이적 프로브 및 프라이머를 사용하여 측정하였다. FSHD 침범을 받은 인간 근모세포 (15A)를 Cas13b 및 gRNA를 발현하는 플라스미드로 공동-형질감염한 다음 7일 이상 동안 근관으로 분화시켰다. 총 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 트리졸 (엠티온사)에 의해 단리하였다. 게놈 DNA를 제거한 이후, 상보적 DNA (cDNA)를 고성능 cDNA 역전사 키트 (어플라이드 바이오시스템사)를 사용하여 생성하였다. TaqMan 유전자 발현 마스터 믹스 프로토콜 (써모피서 사이언티픽사)을 사용하여 정량적 PCR (qPCR) 반응을 수행하였다. 다음의 프로그램, 95°C에서 10분 동안 변성 1회 주기, 60°C에서 1분 동안에 이어진 95°C에서 15초 동안 39회 주기, 및 40°C에서 냉각 1회 주기를 qPCR 분석에 사용하였다. 인간 리보솜 단백질 L13A (RPL13A)를 참조 유전자로서 사용하였다. 상대적인 유전자 발현을 계산하기 위하여 데이터를 델타-델타-CT($2^{-\Delta\Delta CT}$) 알고리즘에 의해 분석하였다. PRAMEF12의 발현을 음성 대조군으로서 Cas13b 형질감염된 근관 단독으로 정규화하였다.
- [0134] CRISPR-Cas13b gRNA1, gRNA2, gRNA3 및 gRNA9로 처리된 FSHD 근관은 Cas13b 단독 또는 Cas13b + gRNA12로 형질감염된 세포와 비교하여 PRAMEF12 발현이 유의하게 (gRNA3로 처리된 세포에서 최대 80%로) 감소하였다 (도 4 참조).
- [0135] **실시예 6**
- [0136] **유효 용량의 결정**
- [0137] Cas13b 및 gRNA 용량 상승 실험을 수행하여 DUX4 녹다운에 대한 유효 용량 범위를 정의한다. 본원에 기술된 CRISPR-Cas13b 방법을 사용하여 DUX4 유전자 침묵화의 효율을 높이기 위하여, 각 리드 gRNA의 조합을 동일한 플라스미드 백본 내에 클로닝하고, DUX4 발현 및 ZSCAN4, PRAMEF12, PRAMEF2, MBD3L2, KHDC1L, TRIM43, LEUTX 등과 같은 다양한 DUX4 바이오마커의 발현을 조사함으로써 FSHD 환자 근모세포 세포주에서 DUX4 발현을 억제하는 이들의 능력에 대해 테스트하였다. 이러한 FSHD 근모세포 세포주는 예를 들어 웰스톤 17A, 12A, 18A 등을 포함

하지만 이에 한정되지는 않는다 (Jones *et al.*, Human Mol. Genetics 21 (20): 4419-30, 2012). DUX4 발현 및 DUX4 바이오마커 발현 수준은 qRT-PCR 및/또는 RNAscope 제자리 혼성화에 의해 분석된다.

[0138] 실시예 7

[0139] Cas13b 및 gRNA 패키징

[0140] 본원에 기술된 Cas13b 및 다양한 gRNA는 생체내에서 DUX4 침묵화의 효능을 테스트하기 위해 AAV 벡터 내에 패키징된다. 일부 양태에서, Cas13b 및 gRNA는 2가지 상이한 AAV 벡터 내에 패키징된다. PspCas13b 유전자는 *프레보텔라* 중 P5-125 (PspCas13b)로도 지칭되며, 3270개의 뉴클레오티드 서열이다 (Cox *et al.*, RNA Editing with CRISPR-Cas13, Science. 24, 358 (6366): 1019-1027, 2017). 이 서열을 포함하는 플라스미드는 애드진사 (카탈로그 번호 103862, 플라스미드 명칭: pC0046-EF1a-PspCas13b-NES-HIV)로부터 구입했으며, 단일가닥 (ss) AAV 벡터 내에 패키징하기에 충분한 크기이다. 다양한 양태에서, Cas13b 유전자 발현 카세트는 미니CMV 프로모터와 같은 더 짧고 더 약한 프로모터, 또는 컴팩트 unc45b 및 CK6 또는 tMCK와 같은 최소 MCK 프로모터와 같은 골격근 특이적 프로모터를 사용하여 제작된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 Cas13b 서열의 시작 부분에 존재하는 코작 서열, 마모트 간염 바이러스 (WHP) 변역후 조절요소 (WPRE), HIV 핵 외수송 신호 (NES) 및 SV40 폴리A 신호와 같은 조절 서열이 변역의 효율성과 mRNA의 안정성을 증가시키도록 카세트 내에 첨가된다. 예를 들어, 코작, WPRE 및 HIV NES 서열이 Cas13b 플라스미드 (애드진사 (PC0046), 서열번호 36 참조)에 존재한다.

[0141] 다양한 양태에서, gRNA는 상이한 프로모터, 예를 들어 U6, U7, tRNA, H1, 미니CMV, T7, 또는 최소 EF1-알파와 같은 프로모터 하에서 발현된다. 구체적으로, 이러한 전략은 단일 골격의 다중 사본으로 동일한 gRNA의 더욱 효율적인 발현을 제공하는 것으로 고려된다. 각 gRNA의 다중 사본 또는 2개 이상의 gRNA의 조합을 포함하는 AAV 프로바이러스성 플라스미드를 제조하고, AAV 입자를 만드는데 사용한다. 각 gRNA는 자체 프로모터, 표적화 서열, Cas13b gRNA 직접 반복서열 및 종결 신호와 함께 클로닝된다. 이러한 구조물은 자가-상보적 AAV (scAAV) 벡터 내에 패키징하기에 충분히 작다. AAV6, AAV9 및 AAV2를 포함하나 이에 한정되지 않는 AAV 벡터의 상이한 혈청형이 생성되고, 테스트된다. 상기에 설명된 바와 같이, 본 발명의 산물 및 방법에 사용되는 모든 유형의 벡터가 포함되기 때문에, 본 발명은 이들 AAV 벡터에 한정되지 않는다. Cas13b 또는 gRNA 발현하는 카세트를 보유하는 AAV 입자는 라쉬노네자드 등 및 가오 등에 의해 기술된 바와 같이 HEK293 세포의 삼중 일시적 형질감염에 의해 만들어진다 (Rashnonejad *et al.*, Mol. Biotechnol. 58(1): 30-6, 2016; Gao *et al.*, Introducing genes into mammalian cells: Viral vectors. In: Green M.R., Sambrook J., 편집자. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. pp. 1209-1313).

[0142] 실시예 8

[0143] DUX4 마우스 모델의 테스트

[0144] AAV 벡터에 패키징된 Cas13b 및 다양한 gRNA를 다양한 마우스 모델, 예로 최근에 발표된 TIC-DUX4 마우스 모델 (Giesige *et al.*, JCI Insight, 3(22): e123538, 2018) 및/또는 이전에 발표된 iDUX4pA 마우스 모델 (Bosnakovski *et al.*, Nature Commun. 8(1): 550, 2017)에서 생체내 DUX4 침묵화에서 이들의 효능에 대해 테스트하였다. 근육내 주사 (IM) 또는 혈관내 주사를 AAV 벡터를 마우스에 전달하는데 사용한다. DUX4 발현은 경구 영양관을 통한 타목시펜 (TIC-DUX4) 또는 독시사이클린 (iDUX4pA) 투여에 의해 활성화된다. 처리된 마우스의 근육 조직학, 분자적 분석, 신체 활동 및 생리학적 분석은 설명된 바와 같이 수행된다 (Giesige *et al.*, 상기).

[0145] 실시예 9

[0146] DUX4 마우스 모델의 테스트

[0147] Cas13b 및 gRNA 벡터의 안전성, 독성학 및 효능을 결정하기 위하여, gRNA, Cas13 효소 및 이들의 조합을 발현하는 AAV 벡터의 용량 상승 실험을 수행한다.

[0148] 안전성 연구를 위해, gRNA, Cas13 효소 및 이들의 조합을 보유하는 다양한 용량의 AAV 벡터를 어린 마우스 (7주 내지 8주령)의 근육내 (IM, 40 µL = TA, 100 µL = GAS) 또는 꼬리 정맥 주사를 통해 야생형 C57BL/6J 마우스 내에 투여한다. IV 투여의 경우, 부피가 동물 총 체중의 10%를 초과하지 않도록 마우스 체중/혈액 부피에 의존한다. 일부 양태에서 AAV 용량은 1E8 DNase 저항성 입자 (DRP) 내지 1E13 DRP 이상의 범위가 되며, 야생형 마우스에서 무-독성으로 표시된 용량을 FSHD 동물에서 보호 특성에 대해 테스트한다.

[0149] 표현형, 조직병리학, 근육 퇴화, 근육 재생 및 분자적 분석은 서로 다른 시점에서 측정된다. 다양한 양태에서, 인산염 완충 식염수 (PBS) 주입된 마우스를 대조군으로서 사용한다. 마우스를 고용량의 케타민/자일라진을 투

여한 이후 상이한 시점에서 안락사시킨다. 조직학, 분자적 분석 및 병리학적 분석을 위해 다양한 근육과 장기를 적출하고, 단리한다.

[0150] TIC-DUX4 또는/및 iDux4pA 마우스에서 DUX4 발현을 유도시킨다. 야생형 마우스 용량 상승 연구에서 안전하고 독성을 유발하지 않는 것으로 나타났던 gRNA 및 Cas13의 최고 용량 중 몇 가지를 테스트하였다. gRNA 및 Cas13b와 같은 CRISPR-Cas 구성요소의 AAV 전달은 신생아 또는 청년 마우스에서 수행한다. 신생아 주사를 출생 후 1일부터 3일까지 수행한다. 10 마이크로리터 부피가 근육내 또는 일시 정맥 주사에 의해 신생아 주사에 사용된다. 어른 마우스 주사를 근육내 또는 꼬리 정맥 주사에 의해 수행한다. Cas13/gRNA 유전자 전달 이후 다양한 시점에서, 동물을 혈액, 장기 및 사지 근육을 테스트하고 (강도 및 활성 매개 변수의 측정을 포함함), 다양한 분자적, 조직학적, 기능적 및 생리학적 분석을 위해 수집하여 치료 효능을 결정한다.

[0151] **실시예 10**

[0152] **FSHD 근관의 DUX4 활성이 Cas13b 및 gRNA 플라스미드로의 형질감염 이후에 감소하였다**

[0153] 본원에 개시된 DUX4 mRNA 표적화 gRNA가 DUX4 단백질 활성을 감소시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 500,000개의 FSHD 근모세포 (15A)를 3 vg의 Cas13b 및 6 vg의 gRNA 플라스미드와 함께 전기천공하였다. 다음으로 세포를 분화 배지를 첨가한 이후 7일 동안 근관으로 분화시켰다. 총 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 트리졸® 방법을 사용하여 단리하고, 3가지 DUX4 활성 바이오마커, 즉 TRIM43, MBD3L2 및 PRAMEF12에 대해 qRT-PCR을 수행하였다.

[0154] *DUX4 바이오마커의 정량적 실시간 PCR 분석*

[0155] Cas13b 및 gRNA 플라스미드, 각각 3 및 6 µg을 FSHD 근모세포 (15A; 500,000개 세포/반응) 내에 론자 뉴클레오택터 키트 (론자사, VVPD-1001)를 사용하여 공동-형질감염시킨 다음 12-웰 플레이트에서 배양하였다. 24시간 후, 성장 배지를 버리고, 세포에 신선한 분화 배지를 첨가하여 근모세포를 근관으로 분화시켰다. 세포를 7일 내지 9일 동안 분화시켰다. 총 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 트리졸 (피셔사, Waltham, MA)을 사용하여 추출하였다. 단리된 RNA의 품질 및 정량을 나노드롭에 의해 조사한 다음, DNase (무-DNA, 앰비온사, TX)로 처리하고, 무작위 육량체 (어플라이드 바이오시스템 cDNA 아카이브 키트; 어플라이드 바이오시스템사, Foster City, CA)를 사용하여 RT-PCR에 사용하였다. 다음으로 후속 cDNA 시료를 사전 설계된 TRIM43, MBD3L2 및 PRAMEF12 (DUX4 활성의 바이오마커) 및 인간 RPL13A 대조군 프라이머/프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템사)를 사용하여 Taqman 검정법을 위한 주형으로서 사용하였다. 각 시료를 3벌씩 전개하고, 실험을 3회 반복하였다. 모든 데이터는 Cas13b 발현하는 시료로 정규화하였다.

[0156] 도 6a 내지 도 6c는 Cas13b 및 다양한 gRNA 플라스미드에 의한 형질감염 이후 DUX4 활성에 대해, 다양한 DUX4 표적 (바이오마커), 즉 TRIM43 (도 6a), MBD3L2 (도 6b) 및 PRAMEF12 (도 6c)의 상대적 발현 수준의 감소에 의해 나타나는 바와 같은 DUX4 활성 억제체의 qRT-PCR 결과를 나타낸다. 인간 RPL13A를 참조 유전자로서 사용하였다. 이들 바이오마커의 발현 수준은 음성 대조군으로서 Cas13b 형질감염된 근관 단독으로 정규화되었다. 3가지 바이오마커 각각의 발현 수준은 Cas13b 형질감염된 세포 단독과 비교하여 Cas13b 및 gRNA로 형질감염시킨 이후 감소하였다.

[0157] Cas13b 형질감염된 세포 (대조군)와 비교하여, 모든 테스트된 gRNA는 3가지 바이오마커 모두의 발현 수준을 감소시킬 수 있었다 (도 6a 내지 도 6c).

[0158] 이들 실험은 본원에 개시된 gRNA 서열이 DUX4에 대한 바이오마커의 발현 감소에 의해 표시되는 바와 같이 DUX4 활성을 감소시키는데 성공적이었음을 보여준다. 이러한 실험은 또한 하나의 AAV 벡터 플라스미드에서 gRNA 서열의 다중 사본이 DUX4 바이오마커의 발현을 감소시키는데 효과적임을 나타낸다.

[0159] **실시예 11**

[0160] **추가적인 DUX4 mRNA 표적화 gRNA의 선별**

[0161] 추가적인 DUX4 mRNA 표적화 gRNA 서열 (즉, gRNA 13 내지 16)은 DUX4 단백질 및 이의 독성을 감소시키는 능력을 위해 설계되고, 선별되었다.

[0162] 가이드 RNA 13 및 14는 DUX4 폴리A 신호 (PLAM)를 표적하도록 설계되었다:

[0163] gRNA 13 표적화 부위: TGTGCCCTTGTCTCCGTGAAATTCIGGC (서열번호 55); 및

- [0164] gRNA 14 표적화 부위: GTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGC (서열번호 56).
- [0165] 가이드 RNA 15 및 16는 DUX4 엑손 1을 표적하도록 설계되었다.
- [0166] gRNA 15 표적화 부위: TCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTC (서열번호 57); 및
- [0167] gRNA 16 표적화 부위: CTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGGCACCC (서열번호 58).
- [0168] 이러한 추가적인 gRNA는 또한 본원에 설명된 실험에서 테스트되었으며, DUX4 발현을 감소시키는데 효과적인 것으로 나타났다.
- [0169] **실시예 12**
- [0170] **Cas13b 및 gRNA에 의해 침묵화된 DUX4 mRNA 발현**
- [0171] DUX4를 침묵화하는 각 gRNA의 능력은 루시퍼라제 검정법 및 *시험관내* 형광 검정법을 사용하여 조사되었다.
- [0172] *루시퍼라제 검정법*
- [0173] 이중 루시퍼라제 리포터 플라스미드를 형질감염 대조군으로서 작용하는 반딧불이 루시퍼라제 카세트에 갖는 Psichcek2 (프로메가사)로부터 변형하였으며, 인간 DUX4 유전자 (코딩 영역 + 인트론을 포함한 3' UTR)를 3' UTR로서 작용하는 레닐라 루시퍼라제 종결 코돈의 하류에 클로닝하였다 (Wallace *et al.*, 2018, Pre-clinical Safety and Off-Target Studies to Support Translation of AAV-Mediated RNAi Therapy for FSHD, Mol. Ther. Methods Clin. Dev.). HEK293 세포를 1 : 6 : 28 몰비로 루시퍼라제 DUX4 리포터, Cas13b 및 개별 U6.gRNA 발현 플라스미드로 공동-형질감염 (리포펙타민 2000; 인비트로젠사)시켰다. DUX4 유전자 침묵화는 이전에 설명한 바와 같이 결정하였다 (Wallace *et al.*, RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity *in vivo*: implications for a targeted FSHD therapy. Mol. Ther. 2012; 20: 1417-1423). 실험 당 3벌의 데이터를 평균화하고, 개별 실험을 3회 수행하였다. 결과를 모든 조합된 실험에 대한 레닐라 대 반딧불이 루시퍼라제 활성의 평균 비율 \pm SD로서 보고하였다.
- [0174] 모든 gRNA는 DUX4를 표적하고, 레닐라 루시퍼라제 발현을 감소시킬 수 있었다. 이 특정한 검정법으로 볼 수 있는 가장 중요한 침묵화는 gRNA1, 2 및 15에 의해 달성되었다 (도 7).
- [0175] *시험관내 형광 검정법*
- [0176] HEK293 세포를 mCherry 종결 코돈의 하류에 3' UTR로서 클로닝된 인간 DUX4 유전자 (코딩 영역 + 인트론을 포함한 3' UTR)를 포함하는 플라스미드 그리고 Cas13b 및 gRNA 발현 플라스미드 (gRNA1 및 gRNA2)로 공동-형질감염 시켰다. 세포의 사진을 형질감염 후 48시간째 촬영하였다.
- [0177] 비-표적화 gRNA (gRNA 12) 또는 Cas13b 단독 형질감염된 세포와 비교하여, gRNA 1 및 2로 처리된 세포에서 (DUX4 발현의 지표인자로서) mCherry 발현이 유의하게 감소하였다 (도 8).
- [0178] 테스트된 각 gRNA는 *시험관내*에서 DUX4 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0179] **실시예 13**
- [0180] **신생아 TIC-DUX4 마우스 모델의 테스트**
- [0181] TIC-DUX4 마우스는 타목시펜에 의해 유도되어 경증 및 진행성 근육 병리학을 발병할 수 있다. 따라서, TIC-DUX4 마우스는 근육 병리학을 발병하도록 1 mg/kg 타목시펜을 매주 3회 투여한 다음 근육 병리학에 미치는 본 발명의 Cas13 및 gRNA의 투여 효과를 결정하였다. 마우스를 Cas13 및 gRNA 1로 처리하고, 처리한 이후 상이한 시간에 희생시켰다.
- [0182] WAP 4개 디설파이드 코아 도메인 단백질 3 (WFDC3) 발현 수준은 진행성 근육 병리학의 지표인자로서 타목시펜 치료 단독을 사용하여 마우스 근육 (전경골 (TA), 비복근 (GAS) 및 삼두근 (TRI))에서 시간 경과 시 (도 9a) 증가하였다. DUX4 매개성 근육 손상은 시간 경과 시 (30일, 37일 및 44일) 마우스 근육 (TA 및 GAS)에서 증가하였다 (도 9b).
- [0183] 1일 내지 2일령 TIC-DUX4 강아지가 5e10 AAV.Cas13 및 AAV.gRNA1의 일측방 공동-주사를 받았다. 4주 후 마우스에게 4주 동안 매주 3회 1 mg/kg 타목시펜을 투여하기 시작하였다. 처리된 근육에서 WFDC3의 발현은 동일한 마우스의 처리되지 않은 근육으로 정규화하였다. 신생아 마우스 근육 (TA (도 9c), Quad (도 9d) 및 가스 (도 9e))에서 WFDC3 발현 수준 (정량적 RT-PCR에 의해 결정됨)은 Cas13 및 gRNA 1로 처리한 이후 감소하였으며, 유

의한 감소를 보였다 (* P <0.02) (도 9d).

[0184] 본 연구는 생체내 CRISPR-Cas13-DUX4 시스템의 효능을 입증하고, 생체내 CRISPR-Cas13 매개성 DUX4 발현 억제에 대한 개념 증명을 보여준다.

[0185] **실시예 14**

[0186] **DUX4 독성의 감소 및 아폽토시스로부터 세포의 보호**

[0187] 다음으로 각 gRNA를 캐스파제 3/7 검정법을 통해 형질감염된 세포에서 DUX4 유도된 아폽토시스를 감소시키는 능력에 대해 테스트하였다.

[0188] 세포 사멸 검정법

[0189] DUX4 독성을 감소시키고 세포를 아폽토시스로부터 보호하는 gRNA 능력을 조사하기 위하여, 캐스파제 3/7 검정법을 수행하였다. HEK293 세포 (50,000개 세포/웰)를 리포펙타민 2000을 사용하여 30 ng DUX4 플라스미드, 80 ng Cas13b 플라스미드, 350 ng의 각 gRNA 발현하는 플라스미드로 공동-형질감염시키고, 96-웰 플레이트에 도말하였다. 세포 사멸을 형광 플레이트 판독기 (스펙트라 맥스 M2, 분자 장치사, Sunnyvale, CA)를 사용하여 형질감염 48시간 후 Apo-ONE 균질한 캐스파제 3/7 검정법 (프로메가사, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다. 3가지 개별 검정법은 3벌씩 (n = 3) 수행하였으며, 데이터는 DUX4 단독으로 형질감염된 대조군에 비해 평균 캐스파제 활성으로서 보고하였다.

[0190] 각 gRNA는 DUX4 (대조군)로 단독 형질감염된 세포와 비교하여 캐스파제 3/7 활성을 감소시켰고 (도 10), 이는 gRNA 1 내지 11 및 13 내지 16이 DUX4의 독성을 감소시키고 아폽토시스로부터 세포를 보호하였음을 나타낸다. 수행된 세포 생존능 검정법은 각 gRNA가 처리된 세포의 생존능을 증가시키고, 즉 DUX4 유도된 아폽토시스를 감소시키는 것을 입증하였다.

[0191] **실시예 15**

[0192] **생체내 마우스 근육에서 DUX4 발현의 억제**

[0193] 근육에서 DUX4를 표적하는 AAV.CRISPR-Cas13 요법의 능력을 조사하기 위하여, 어린 마우스를 DUX4 (1E9), ssAAV6-Cas13b (2.5 E10) 및 scAAV6-gRNA1 (5E10) 또는 DUX4 단독 (1E9)으로 TA 근육에 공동-주사하였다.

[0194] 주사 3주 후 마우스를 희생시키고, TA 근육을 적출하고, 조직학 및 분자적 분석을 위해 냉동시켰다. 본원에 설명된 바와 같이, DUX4 단백질은 인간 및 마우스 세포의 다른 유전자에 대한 전사 활성인자로서 기능할 수 있다. 따라서, DUX4 표적 유전자의 발현 수준의 임의의 변화는 인간과 마우스에서 DUX4 활성의 지표인자로서 널리 사용된다.

[0195] 마우스에서 DUX4 활성화된 바이오마커는 WFDC3 및 TRIM36이다. 본 실험에서는 WFDC3 프로브와 프라이머를 사용하여 처리된 근육과 처리되지 않은 근육으로부터 수확한 RNA/cDNA에 대해 QRT-PCR을 수행하였다. 도 11은 sAAV6-Cas13b 및 scAAV6-gRNA1 (5e10)을 마우스 TA에 공동-주사한 이후, DUX4 (1e9)로 주사 3주 후 DUX4 활성화된 바이오마커 발현 수준 (WFDC3의 상대적 발현에 의해 표시되는 바와 같음)dmf 나타낸다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 처리되지 않은 근육과 비교하여 처리된 근육에서 WFDC3 발현 수준의 80% 이상 감소가 검출되었다.

[0196] 본 발명은 구체적인 구현예의 견지에서 설명되는 반면, 변화 및 변형이 당업자에게 발생할 것으로 이해된다. 따라서, 청구범위에 서술한 바와 같은 단지 이러한 제한은 본 발명에 포함되어야 한다.

[0197] 본 출원에 언급된 모든 문헌은 이들의 전문이 본원에 참고문헌으로 인용된다.

[0198] 본원에 개시된 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 하기에 기재된 표 1에 제시되어 있다.

표 1 - 서열표

서열 식별 번호	서열
1	<p>DUX4 NT:</p> <p>atggcctcccacacctcggacagcacctccccgcggaagccggggacgaggacggcgacggag actcgtttggaccccagccaaagcaggccctgcgagcctgctttgagcggaaaccgtacccgggcatcg ccaccagagaacggctggcccagccatcggcattccggagccagggtccagatttggttcagaatgag aggtcacgcagctgaggcagaccggcgggaatctcgccctggcccggagacgcccggccagga aggccggcgaagcggaccgccgtaccggatcccaagaccgccctgctcctccgagcctttgagaaggat cgtttccaggcatcgcccgggagagctggccagagagacgggctcccggagtccaggattcag atctggttcagaatcgaaggccaggcaccgggacaggggtggcaggggcggccgcgagggcggcg cctgtgcaagcggccccggcgggggtcacctgctcctcgtgggtcgccttcgccacaccggcgcg tggggaacgggcttcccgaacccacgtgccctgcgcctggggctctcccacaggggctttcgtga gccaggcagcgaaggccgccccgcgctgcagcccagccaggccgcccggcagagggatccca acctgccccggcgcggggatttcgctacgcgccccggctcctccggacggggcgtctcccacct caggctcctcggtggcctcgcacccgggcaaaagccgggagggaccgggacccgacgcgcgacggcct gccgggccccctgcgctggcagcagcctgggcccctcaagcggggccgagggccaaggggtgcttg cgcaccccacgtcccaggggagtccgtggtggggctggggccggggtcccagggtcgcggggcgcg tgggaaccccaagccgggacgtccacctcccagcccgcgccccggagcctcgcctcgcgcg caggggcagatgcaaggcatcccggcctcccagggcctccaggagcgcggcgcctggtctgcactc ccctgcggcctgctgctgatgagctcctggcagcccggagtctcagcagggcgaacctctctagaa acggaggccccggggagctggaggctcggaaagggccctcgtggaagcaccctcagcaggga agaataccggctcgtctggaggagcttag</p>
2	<p>DUX4 AA:</p> <p>MALPTPSDSTLPAEARGRRRRRLVWTPSQSEALRACFERNPYPGIA TRERLAQAIGIPEPRVQIWFQNERSRQLRQHRRESRPWPGRRGPEGR RKRTAVTGSQTALLLRAFEKDRFPGIAAREELARETGLPESRIQIWFQ NRRARHPGQGGRAPAQAGGLCSAAPGGGHPAPSWVAFAHTGAWG TGLPAPHVPCAPGALPQGAQAFVSQAARAAPALQPSQAAPAEGISQPAP ARGDFAYAAPAPDGAALSHQPAPRWPPHPGKSREDRDPQRDGLPGP CAVAQPGPAQAGPQGGVLAAPPTSQGGSPWWGWGRGPQVAGAAWE PQAGAAPPQPAPPDASASARQGMQGIPAPSQALQEPAPWSALPCG LLLDELLASPEFLQQAQPLLETEAPGELEASEEAASLEAPLSEEEYRA LLEEL</p>
3	<p>gRNA1 서열:</p> <p>GGCCCTTCGATTCTGAAACCAGATCTGAAT</p>
14	<p>gRNA1 DUX4 표적화 서열:</p> <p>5'-ATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCC-3'</p>
4	<p>gRNA2 서열:</p>

[0199]

	GATTCTGAAACCAGATCTGAATCCTGGACT
15	gRNA2 DUX4 표적화 서열: 5'-AGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATC-3'
5	gRNA3 서열: GACTCCGGGAGGCCGTCTCTCTGGCCAGCT
16	gRNA3 DUX4 표적화 서열: 5'-AGCTGGCCAGAGAGACGGGCCTCCCGGAGTC-3'
6	gRNA4 서열: GAGGAGCCTGAGGGTGGGAGAGCGCCCCGT
17	gRNA4 DUX4 표적화 서열: 5'-ACGGGGCGCTCTCCCACCTCAGGCTCCTC-3'
7	gRNA5 서열: GCTTTTGCCCGGTGCGGAGGCCACCGAGGAG
18	gRNA5 DUX4 표적화 서열: CTCTCGGTGGCCTCCGCACCCGGGCAAAGC
8	gRNA6 서열: TCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCAGAACT
19	gRNA6 DUX4 표적화 서열: 5'-AGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGA-3'
9	gRNA7 서열: GTTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCAGAACT
20	gRNA7 DUX4 표적화 서열: 5'-AGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAAC-3'
10	gRNA8 서열: TGGCAGTTCTCCGCGGTGTGGAGTCTCTCA
21	gRNA8 DUX4 표적화 서열: 5'-TGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCA-3'
11	gRNA9 서열: GTTTCTCCGCGGTGTGGAGTCTCTCACCGGG
22	gRNA9 DUX4 표적화 서열:

[0200]

	5'-CCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAAC-3'
12	gRNA10 서열: GAACAAGGGCACAGAGAGGCCAGCGAGCTC
23	gRNA10 DUX4 표적화 서열: 5'-GAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTTTC-3'
13	gRNA11 서열: GACAGCGTCGGAAGGTGGGGGGAGACATTTCAG
24	gRNA11 DUX4 표적화 서열: 5'-CTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTC-3'
25	gRNA1 + Cas13b 직접 반복서열: GGCCCTTCGATTCTGAAACCAGATCTGAATGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC
26	gRNA2 + Cas13b 직접 반복서열: GATTCTGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC
27	gRNA3 + Cas13b 직접 반복서열: GACTCCGGGAGGCCCGTCTCTCTGGCCAGCTGTTGTGGAAGGTCC AGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
28	gRNA4 + Cas13b 직접 반복서열: GAGGAGCCTGAGGGTGGGAGAGCGCCCCGTGTTGTGGAAGGTCC AGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
29	gRNA5 + Cas13b 직접 반복서열: GCTTTTGCCCGGTGCGGAGGCCACCGAGGAGTTGTGGAAGGTC CAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
30	gRNA6 + Cas13b 직접 반복서열: TCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCAGAACTGTTGTGGAAGGTCC AGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
31	gRNA7 + Cas13b 직접 반복서열: GTTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCAGAACTGTTGTGGAAGG TCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
32	gRNA8 + Cas13b 직접 반복서열: TGGCAGTTCTCCGCGGTGTGGAGTCTCTCAGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC

[0201]

33	<p>gRNA9 + Cas13b 직접 반복서열:</p> <p>GTTCTCCGCGGTGTGGAGTCTCTCACCGGGGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC</p>
34	<p>gRNA10 + Cas13b 직접 반복서열:</p> <p>GAACAAGGGCACAGAGAGGCCAGCGAGCTCGTTGTGGAAGGTCC AGTTTTGAGGGGCTATTACAAC</p>
35	<p>gRNA11 + Cas13b 직접 반복서열:</p> <p>GACAGCGTCGGAAGGTGGGGGGAGACATTCAGGTTGTGGAAGGT CCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC</p>
36	<p>Cas13b 뉴클레오티드 서열:</p> <p>ATGAACATCCCCGCTCTGGTGGAAAACCAGAAGAAGTACTTTGGC ACCTACAGCGTGATGGCCATGCTGAACGCTCAGACCGTGCTGGAC CACATCCAGAAGGTGGCCGATATTGAGGGCGAGCAGAACGAGAA CAACGAGAATCTGTGGTTTCACCCCGTGATGAGCCACCTGTACAA CGCCAAGAACGGCTACGACAAGCAGCCCGAGAAAACCATGTTCA TCATCGAGCGGCTGCAGAGCTACTTCCATTCCTGAAGATCATGG CCGAGAACCAGAGAGAGTACAGCAACGGCAAGTACAAGCAGAAC CGCGTGGAAGTGAACAGCAACGACATCTTCGAGGTGCTGAAGCG CGCCTTCGGCGTGCTGAAGATGTACAGGGACCTGACCAACCACTA CAAGACCTACGAGGAAAAGCTGAACGACGGCTGCGAGTTCCTGA CCAGCACAGAGCAACCTCTGAGCGGCATGATCAACAACACTACTAC ACAGTGGCCCTGCGGAACATGAACGAGAGATACGGCTACAAGAC AGAGGACCTGGCCTTCATCCAGGACAAGCGGTTCAAGTTCGTGAA GGACGCCTACGGCAAGAAAAAGTCCCAAGTGAATACCGGATTCT TCCTGAGCCTGCAGGACTACAACGGCGACACACAGAAGAAGCTG CACCTGAGCGGAGTGGAATCGCCCTGCTGATCTGCCTGTTCTG GACAAGCAGTACATCAACATCTTTCTGAGCAGGCTGCCCATCTTC TCCAGCTACAATGCCAGAGCGAGGAACGGCGGATCATCATCAG ATCCTTCGGCATCAACAGCATCAAGCTGCCCAAGGACCGGATCCA CAGCGAGAAGTCCAACAAGAGCGTGGCCATGGATATGCTCAACG AAGTGAAGCGGTGCCCGACGAGCTGTTCAACAACACTGTCTGCCG AGAAGCAGTCCCGTTCAGAATCATCAGCGACGACCACAATGAA GTGCTGATGAAGCGGAGCAGCGACAGATTCTGTCCTCTGCTGCTG CAGTATATCGATTACGGCAAGCTGTTTCGACCACATCAGGTTCCAC GTGAACATGGGCAAGCTGAGATACCTGCTGAAGGCCGACAAGAC CTGCATCGACGGCCAGACCAGAGTCAGAGTGATCGAGCAGCCCC TGAACGGCTTCGGCAGACTGGAAGAGGCCGAGACAATGCGGAAG CAAGAGAACGGCACCTTCGGCAACAGCGGCATCCGGATCAGAGA CTTCGAGAACATGAAGCGGGACGACGCCAATCCTGCCAACTATCC CTACATCGTGGACACCTACACACACTACATCCTGGAAAACAACAA GGTCGAGATGTTTATCAACGACAAAGAGGACAGCGCCCCACTGCT GCCCCGTGATCGAGGATGATAGATACGTGGTCAAGACAATCCCCA GCTGCCGATGAGCACCTGGAAATTCAGCCATGGCCTTCCACA TGTTTCTGTTCCGGCAGCAAGAAAACCGAGAAGCTGATCGTGGACG</p>

[0202]

	<p>TGCACAACCGGTACAAGAGACTGTTCCAGGCCATGCAGAAAGAA GAAGTGACCGCCGAGAATATCGCCAGCTTCGGAATCGCCGAGAG CGACCTGCCTCAGAAGATCCTGGATCTGATCAGCGGCAATGCCCA CGGCAAGGATGTGGACGCCTTCATCAGACTGACCGTGGACGACAT GCTGACCGACACCGAGCGGAGAATCAAGAGATTCAAGGACGACC GGAAGTCCATTCGGAGCGCCGACAACAAGATGGGAAAGAGAGGC TTCAAGCAGATCTCCACAGGCAAGCTGGCCGACTTCTGGCCAAG GACATCGTGTGTTTCAGCCCAGCGTGAACGATGGCGAGAACA GATCACCGGCCTGAACTACCGGATCATGCAGAGCGCCATTGCCGT GTACGATAGCGGCGACGATTACGAGGCCAAGCAGCAGTTCAAGC TGATGTTTCGAGAAGGCCCGGCTGATCGGCAAGGGCACAACAGAG CCTCATCCATTTCTGTACAAGGTGTTTCGCCCCGAGCATCCCCGCCA ATGCCGTGAGTTCTACGAGCGCTACCTGATCGAGCGGAAGTTCT ACCTGACCGGCCTGTCCAACGAGATCAAGAAAGGCAACAGAGTG GATGTGCCCTTCATCCGGCGGGACCAGAACAAGTGGAAAACACC CGCCATGAAGACCCTGGGCAAGATCTACAGCGAGGATCTGCCCGT GGAACTGCCCAGACAGATGTTTCGACAATGAGATCAAGTCCCACCT GAAGTCCCTGCCACAGATGGAAGGCATCGACTTCAACAATGCCA ACGTGACCTATCTGATCGCCGAGTACATGAAGAGAGTGCTGGACG ACGACTTCCAGACCTTCTACCAGTGAACCGCAACTACCGGTACA TGGACATGCTTAAGGGCGAGTACGACAGAAAGGGCTCCCTGCAG CACTGCTTACCAGCGTGAAGAGAGAGAAGGCCTCTGGAAAAGA GCGGGCCTCCAGAACAGAGCGGTACAGAAAGCAGGCCAGCAACA AGATCCGACGCAACCGGCAGATGAGAAAACGCCAGCAGCGAAGAG ATCGAGACAATCCTGGATAAAGCGGCTGAGCAACAGCCGGAACGA GTACCAGAAAAGCGAGAAAGTGATCCGGCGCTACAGAGTGCAGG ATGCCCTGCTGTTTCTGCTGGCCAAAAGACCCTGACCGAACTGG CCGATTTTCGACGGCGAGAGGTTCAAACCTGAAAGAAATCATGCC GACGCCGAGAAGGGAATCCTGAGCGAGATCATGCCCATGAGCTT CACCTTCGAGAAAGGCGGCAAGAAGTACACCATCACAGCGAGG GCATGAAGCTGAAGAACTACGGCGACTTCTTTGTGTGGCTAGCG ACAAGAGGATCGGCAACCTGCTGGAACCTCGTGGGCAGCGACATC GTGTCCAAAGAGGATATCATGGAAGAGTTCAACAAATACGACCA GTGCAGGCCCGAGATCAGCTCCATCGTGTCAACCTGGAAAAGTG GGCTTCGACACATACCCCGAGCTGTCTGCCAGAGTGGACCGGGA AGAGAAGGTGGACTTCAAGAGCATCCTGAAAATCCTGCTGAACA ACAAGAACATCAACAAAGAGCAGAGCGACATCCTGCGGAAGATC CGGAACGCCTTCGATCACAACAATTACCCCGACAAAGGCCTGGTG GAAATCAAGGCCCTGCCTGAGATCGCCATGAGCATCAAGAAGGC CTTTGGGGAGTACGCCATCATGAAG</p>
37	<p>Cas13b 직접 반복서열: GTTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC</p>
38	<p>gRNA1 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT</p>

[0203]

	GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCggcccttcgattctgaaaccagatctgaatGTTGTG GAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
39	gRNA2 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgattctgaaaccagatctgaatcctggactGTTGTG GAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
40	gRNA3 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgactccgggagggcccctctctctggccagctGTTG TGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
41	gRNA4 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgaggagcctgagggtgggagagcggcccctGTTG TGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
42	gRNA5 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgcttttgcccgggtgaggagccaccgaggagGTT GTGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
43	gRNA6 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgtctaggagaggttgcgcctgctgcagaactGTTG

[0204]

<p>44</p>	<p>TGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p> <p>gRNA7 발현 카세트 서열:</p> <p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgtttctaggagaggttgcgctctgcagaaactGTT GTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p>
<p>45</p>	<p>gRNA8 발현 카세트 서열:</p> <p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgtggcagttctcegcggttggagtctcaGTTGT GGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p>
<p>46</p>	<p>gRNA9 발현 카세트 서열:</p> <p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgttctcegcggttggagtctcaccgggGTTGT GGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p>
<p>47</p>	<p>gRNA10 발현 카세트 서열:</p> <p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgaacaagggcacagagaggccagcgactcGTT GTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p>
<p>48</p>	<p>gRNA11 발현 카세트 서열:</p> <p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgacagcgtggaggtgggggagacattcagGTT GTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC TTTTT</p>

[0205]

49	gRNA12 서열 (대조군): GCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
50	gRNA12 발현 카세트 서열 (대조군): GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTCAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgcagggtttccagtcacgacgtgtaaaaGTTGT GGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
51	gRNA13 서열: GCCAGAATTCACGGAAGAACAAGGGCACA
55	gRNA13 DUX4 표적화 서열: 5'-TGTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCTGGC-3'
59	gRNA13 + Cas13b 직접 반복서열: GCCAGAATTCACGGAAGAACAAGGGCACAGTTGTGGAAGGTCC AGTTTTGAGGGGCTATTACAAC
63	gRNA13 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTCAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAGGACGAAACACCgccagaattcacggaagaacaaggcacaGTTG TGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
52	gRNA14 서열: GCTCCCTTGCACGTCAGCCGGGGTGCGCAC
56	gRNA14 DUX4 표적화 서열: 5'-GTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGC-3'
60	gRNA14 + Cas13b 직접 반복서열: GCTCCCTTGCACGTCAGCCGGGGTGCGCACGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC
64	gRNA14 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA

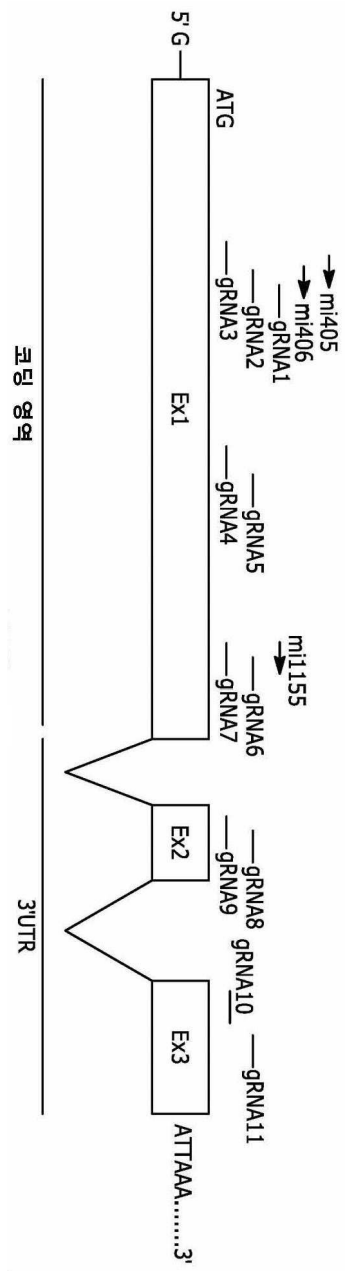
[0206]

	AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgctccctgcacgtcagccgggtgcgacGTTGT GGAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
53	gRNA15 서열: GAAACCAGATCTGAATCCTGGACTCCGGGA
57	gRNA15 DUX4 표적화 서열: 5'-TCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTC-3'
61	gRNA15 + Cas13b 직접 반복서열: GAAACCAGATCTGAATCCTGGACTCCGGGAGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC
65	gRNA15 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgaaaccagatctgaatcctggactccgggaGTTGT GGAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
54	gRNA16 서열: GGGTGCCTGGCCCTTCGATTCTGAAACCAG
58	gRNA16 DUX4 표적화 서열: 5'-CTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGGCACCC-3'
62	gRNA16 + Cas13b 직접 반복서열: GGGTGCCTGGCCCTTCGATTCTGAAACCAGGTTGTGGAAGGTCCA GTTTTGAGGGGCTATTACAAC
66	gRNA16 발현 카세트 서열: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAA AGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTG GGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATAT GCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC TTGTGGAAAGGACGAAACACCgggtgcctggccctcgattctgaaaccagGTTGT GGAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT

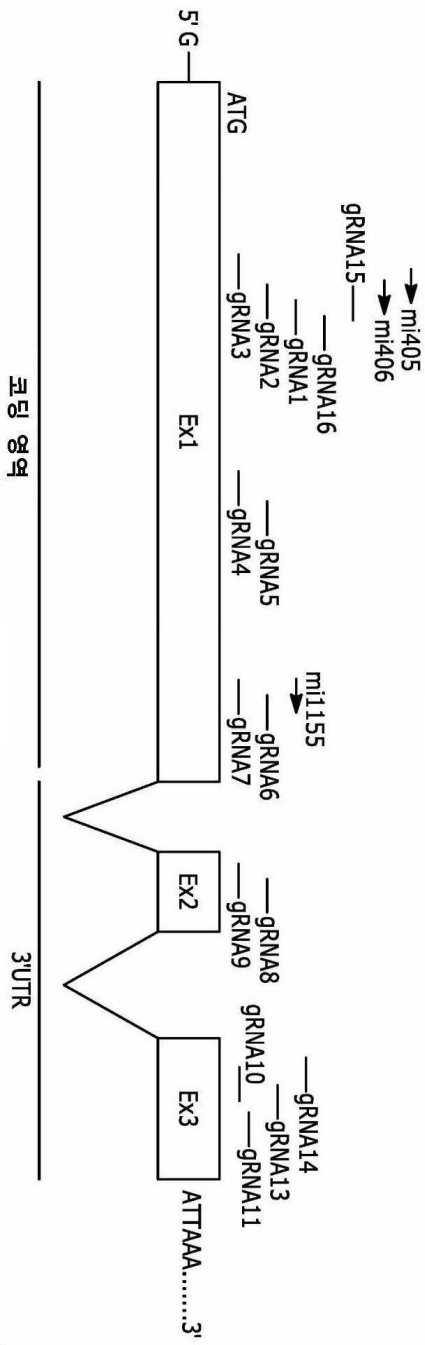
[0207]

도면

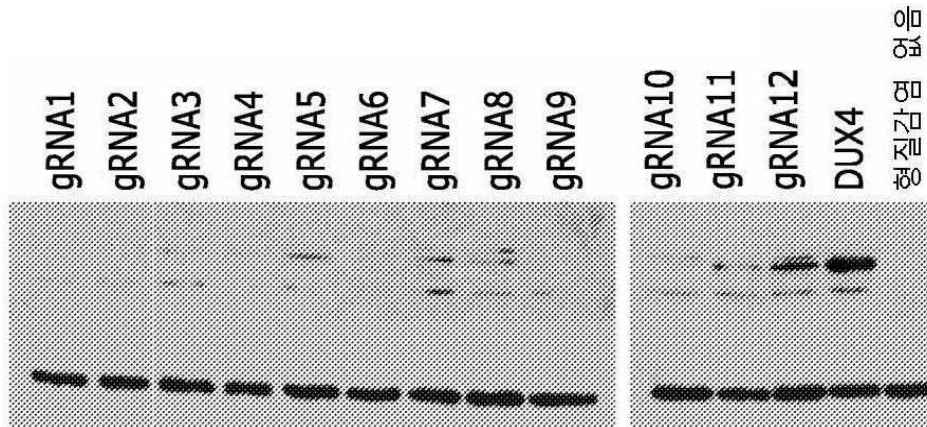
도면1a



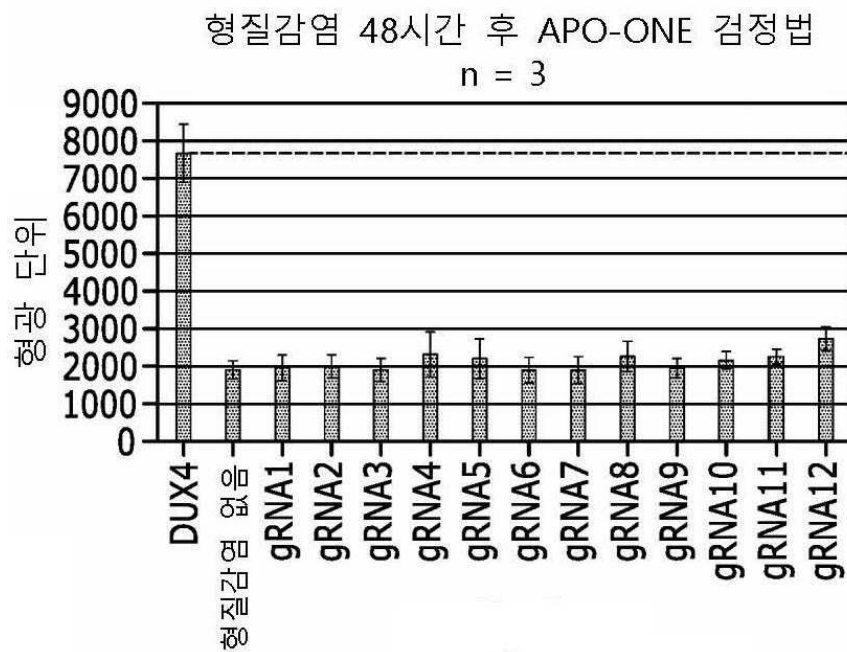
도면1b



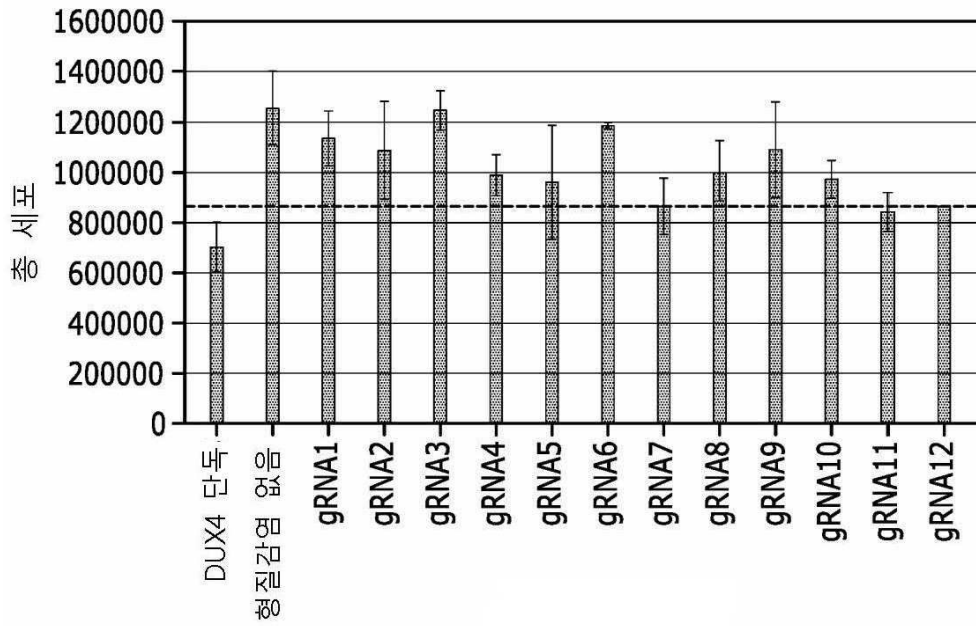
도면2a



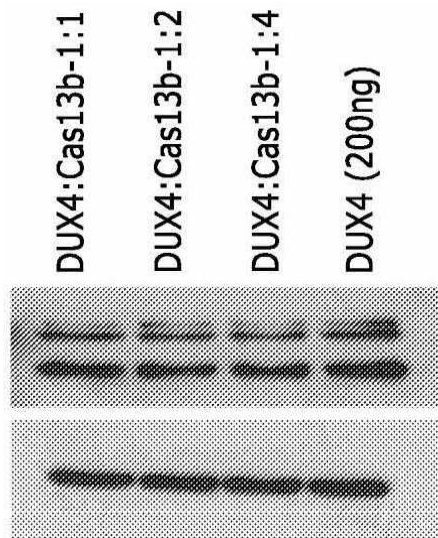
도면2b



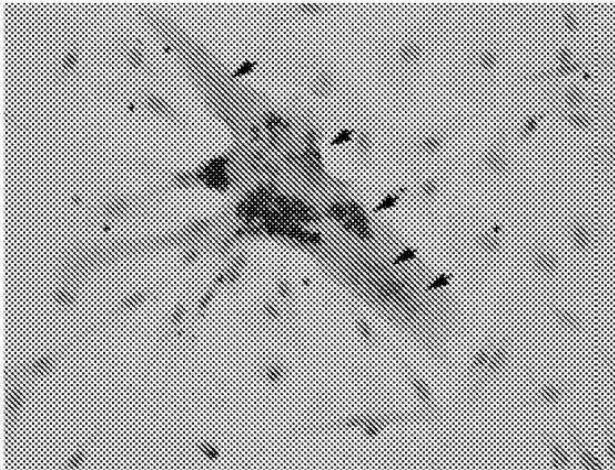
도면2c



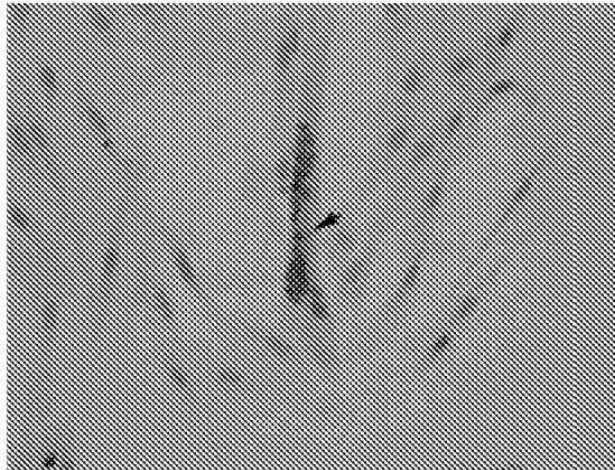
도면2d



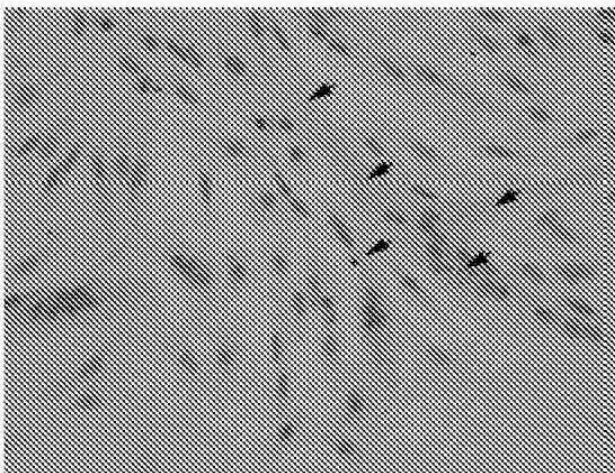
도면3a



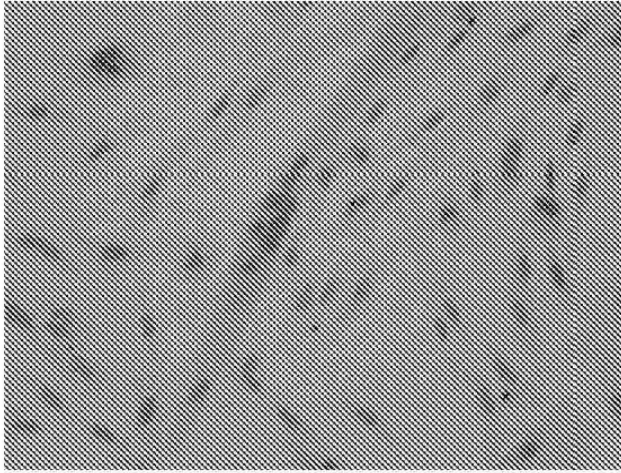
도면3b



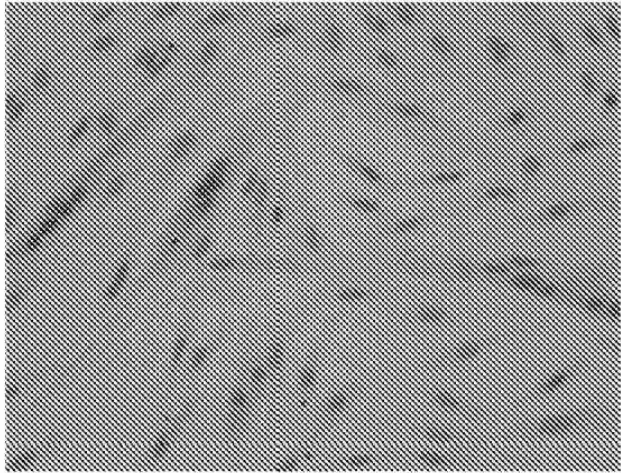
도면3c



도면3d

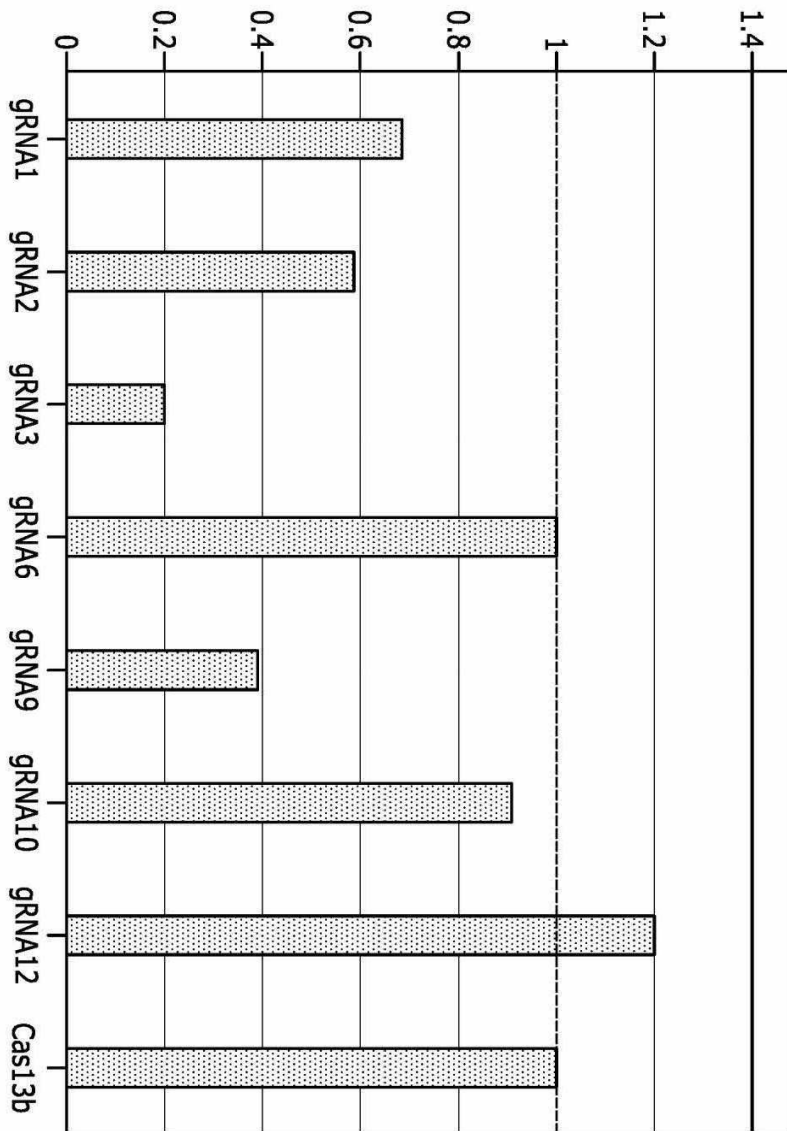


도면3e



도면4

상대 정규화 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



30개 nt 길이 gRNA 서열:
 각 부분의 설명

진한 대문자: 인간 U6 프로모터

소문자: 표적 부위의 역 상보체

밑줄 친 대문자: CAS13B 직접 반복서열

TTTTTT: 종결 신호

gRNA1: 표적 서열 5'-atcagatctggttcagaatcgaaggcc-3' (서열번호: 14)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACA
 AAGATATTAGTACAATAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGgactctgaaaccagatctgaaat
GTTGTGGAAGGTCACGTTTTGAGGGGCTAATACAACTTTTTT
 (서열번호: 38)

gRNA2: 표적 서열 5'-agtc~ ~~gactctggttcagaatc-3' (서열번호: 15)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACA
 AAGATATTAGTACAATAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGgactctgaaaccagatctgaaat
GTTGTGGAAGGTCACGTTTTGAGGGGCTAATACAACTTTTTT
 (서열번호: 39)

gRNA3: 표적 서열 5'-agctgcccagagagacgggctcccggagtc-3' (서열번호: 16)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACA
 AAGATATTAGTACAATAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGgactctgaaaccagatctgaaat
ctGTTGTGGAAGGTCACGTTTTGAGGGGCTAATACAACTTTTTT
 (서열번호: 40)

도면5a

gRNA4: 표적 서열 5'-acgggycgcctctcccaacctcaggtctctc-3' (서열번호: 17)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCCATATACGATACAAAGGCTGTTAGAGAGATTAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACACA
 AAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTTGACAGTTTAAATTAATGTTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgagagccttagggtagagcgccc
cgTGTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
 (서열번호: 41)

gRNA5: 표적 서열 5'-ctctctggtgycctccgcaccggycaaaagc-3' (서열번호: 18)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCCATATACGATACAAAGGCTGTTAGAGAGATTAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACACA
 AAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTTGACAGTTTAAATTAATGTTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgctttgcccgggtgcygaggccaccgag
gagGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
 (서열번호: 42)

gRNA6: 표적 서열 5'-agtttctgcaagcagcgcaacctctctagaac-3' (서열번호: 19)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCCATATACGATACAAAGGCTGTTAGAGAGATTAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACACA
 AAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTTGACAGTTTAAATTAATGTTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgctctagagaggtttgcccctgctcagaa
actGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
 (서열번호: 43)

gRNA7: 표적 서열 5'-agtttctgcaagcagcgcaacctctctagaac-3' (서열번호: 20)

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCCATATACGATACAAAGGCTGTTAGAGAGATTAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACACA
 AAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGTAGTTTGACAGTTTAAATTAATGTTTTAAATGGACTATCAT
 ATGCTTACCCTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgctctagagaggtttgcccctgctcagaa
aaactGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACCTTTTTT
 (서열번호: 44)

도면5b

gRNA8: 표적 서열 5'-tgagagacaccacaccgagaaactcca-3' (서열번호 : 21)
 GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTAGAGAGATAA TTGGAATTAATTTGACTGTA AACAC
 AAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATTTCTGGGTAGTTGCCAGTTTTAAATATATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCggtgcaggtctccggtgtaggt
 ctctcagttgtggaaaggtccagttttgaggggctattacaactttttt
 (서열번호 : 45)

gRNA9: 표적 서열 5'-cccgtgagagadccacaccgcgagaac-3' (서열번호 : 22)
 GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTAGAGAGATAA TTGGAATTAATTTGACTGTA AACAC
 AAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATTTCTGGGTAGTTGCCAGTTTTAAATATATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCggtctccggtgtaggtctctcaac
 cggggttgtggaaaggtccagttttgaggggctattacaactttttt
 (서열번호 : 46)

gRNA10: 표적 서열 5'-gagctgctgctctctctgtgacctgttc-3' (서열번호 : 23)
 GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTAGAGAGATAA TTGGAATTAATTTGACTGTA AACAC
 AAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATTTCTGGGTAGTTGCCAGTTTTAAATATATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgaaacaaggtcacaagaggtccag
 cgagctgttgtggaaaggtccagttttgaggggctattacaactttttt
 (서열번호 : 47)

gRNA11: 표적 서열 5'-ctgaatgctcccccaactccgagcgtgtc-3' (서열번호 : 24)
 GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTAGAGAGATAA TTGGAATTAATTTGACTGTA AACAC
 AAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATTTCTGGGTAGTTGCCAGTTTTAAATATATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCgacaagcgtcggaaggtggtggg
 gagacattcaggttgtggaaaggtccagttttgaggggctattacaactttttt
 (서열번호 : 48)

도면5c

gRNA13: 표적 서열 5'-gtgcccctgthctccgtaaattctg-3' (서열번호 : 55)

GAGGGCCTATTTC~~CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTA~~AAACAC
 AAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTAAGAAAGTAATATTTCTGGGAGTTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCCgcaaatccaagaaagaaag
ggcacaGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
 (서열번호 : 63)

gRNA14: 표적 서열 5'-gtgcgcaccccggctgacqctgcaaggagc-3' (서열번호 : 56)

GAGGGCCTATTTC~~CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTA~~AAACAC
 AAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTAAGAAAGTAATATTTCTGGGAGTTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCCgccccctgcaagccggtg
gcacGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
 (서열번호 : 64)

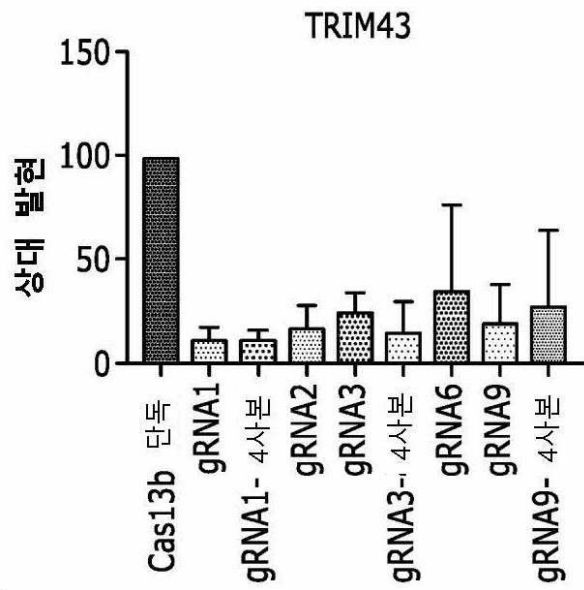
gRNA15: 표적 서열 5'-tcccggatccagatcaagatctg-3' (서열번호 : 57)

GAGGGCCTATTTC~~CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTA~~AAACAC
 AAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTAAGAAAGTAATATTTCTGGGAGTTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCCggaacaagatctgaatccctg
cggagGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
 (서열번호 : 65)

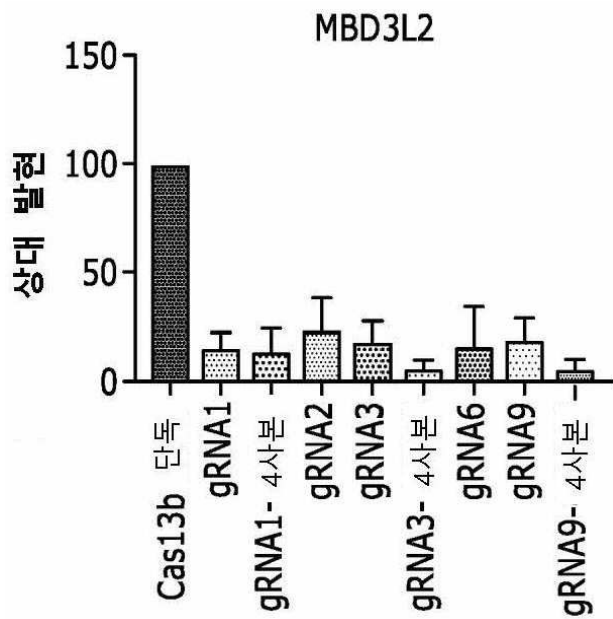
gRNA16: 표적 서열 5'-ctggttcagaatcgaagggccagggcacc-3' (서열번호 : 58)

GAGGGCCTATTTC~~CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTA~~AAACAC
 AAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTAAGAAAGTAATATTTCTGGGAGTTTGCAGTTTAAATTAATGTTTAAATGGACTATC
 ATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCCgggtgctgccccctgactg
ccagGTTGTGGAAAGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTT
 (서열번호 : 66)

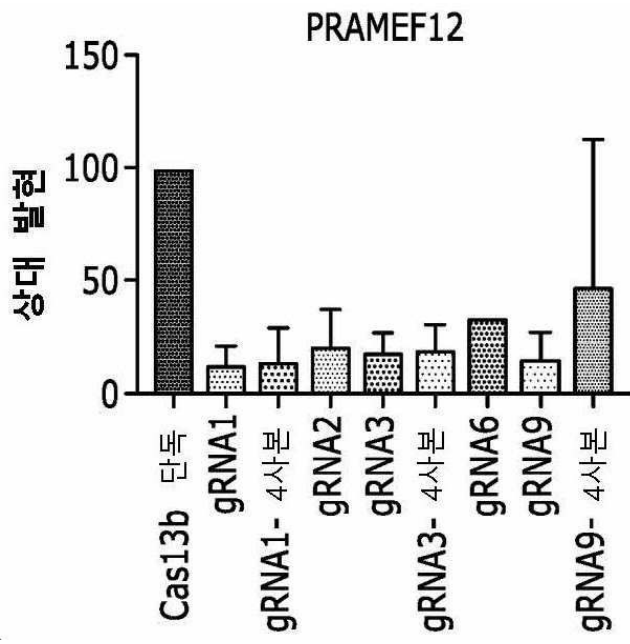
도면6a



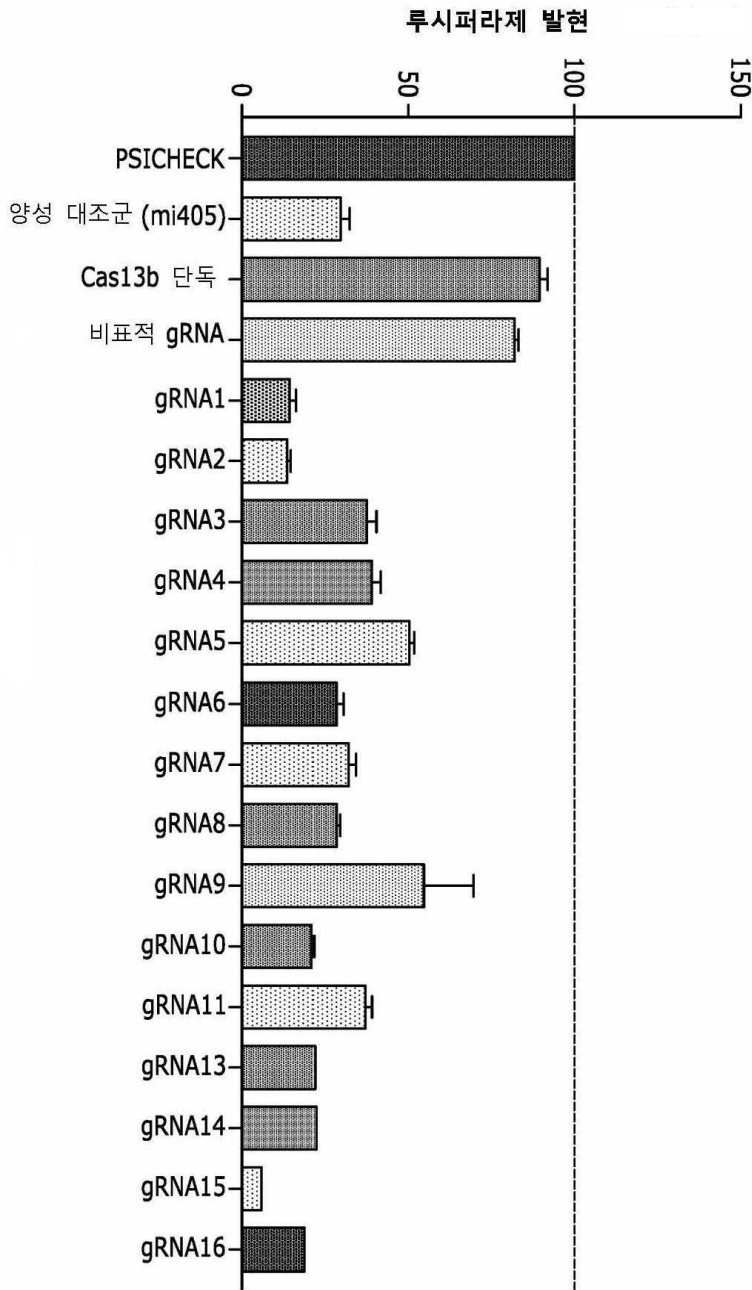
도면6b



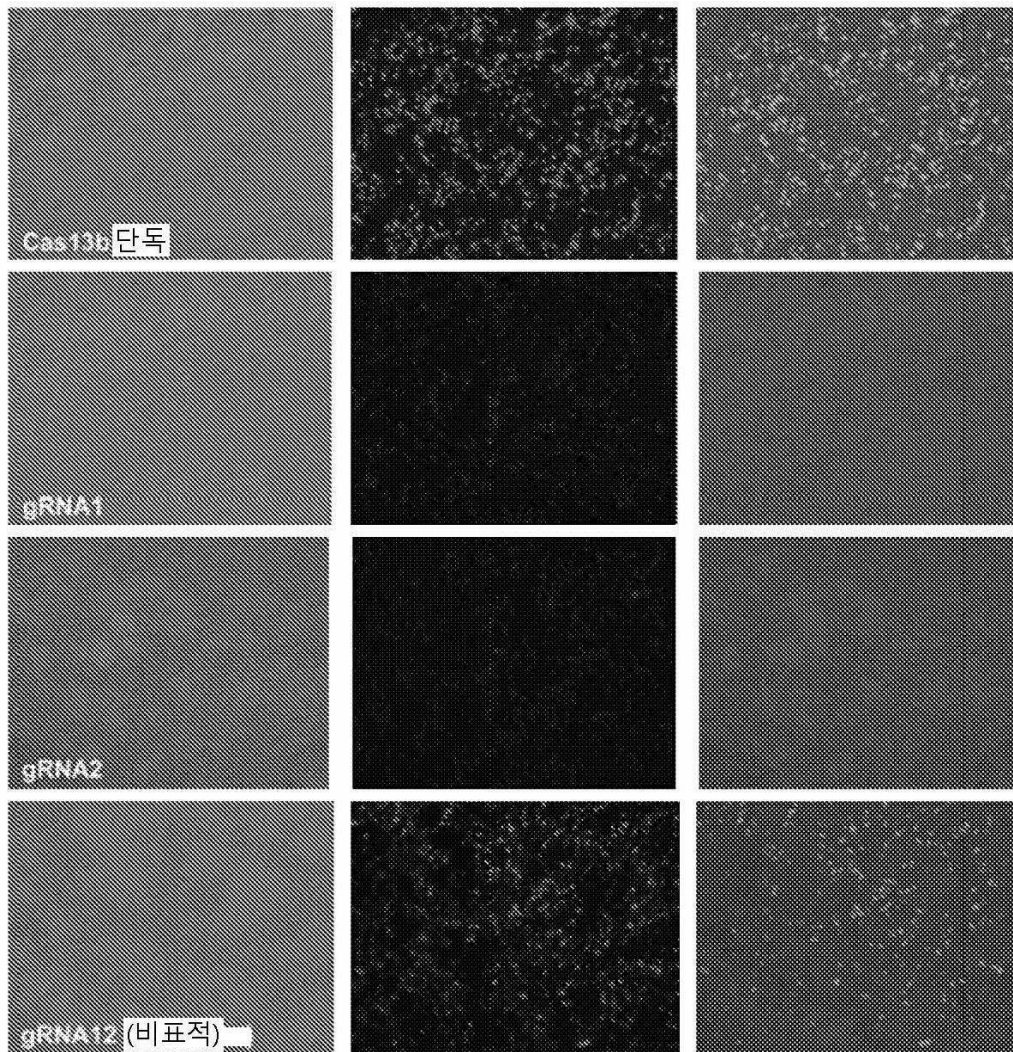
도면6c



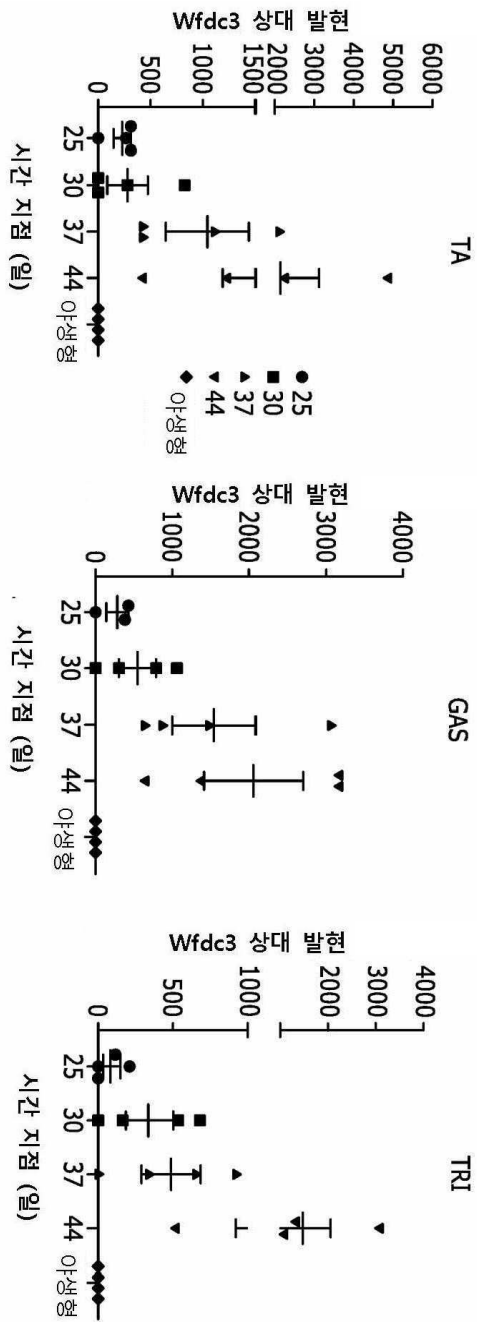
도면7



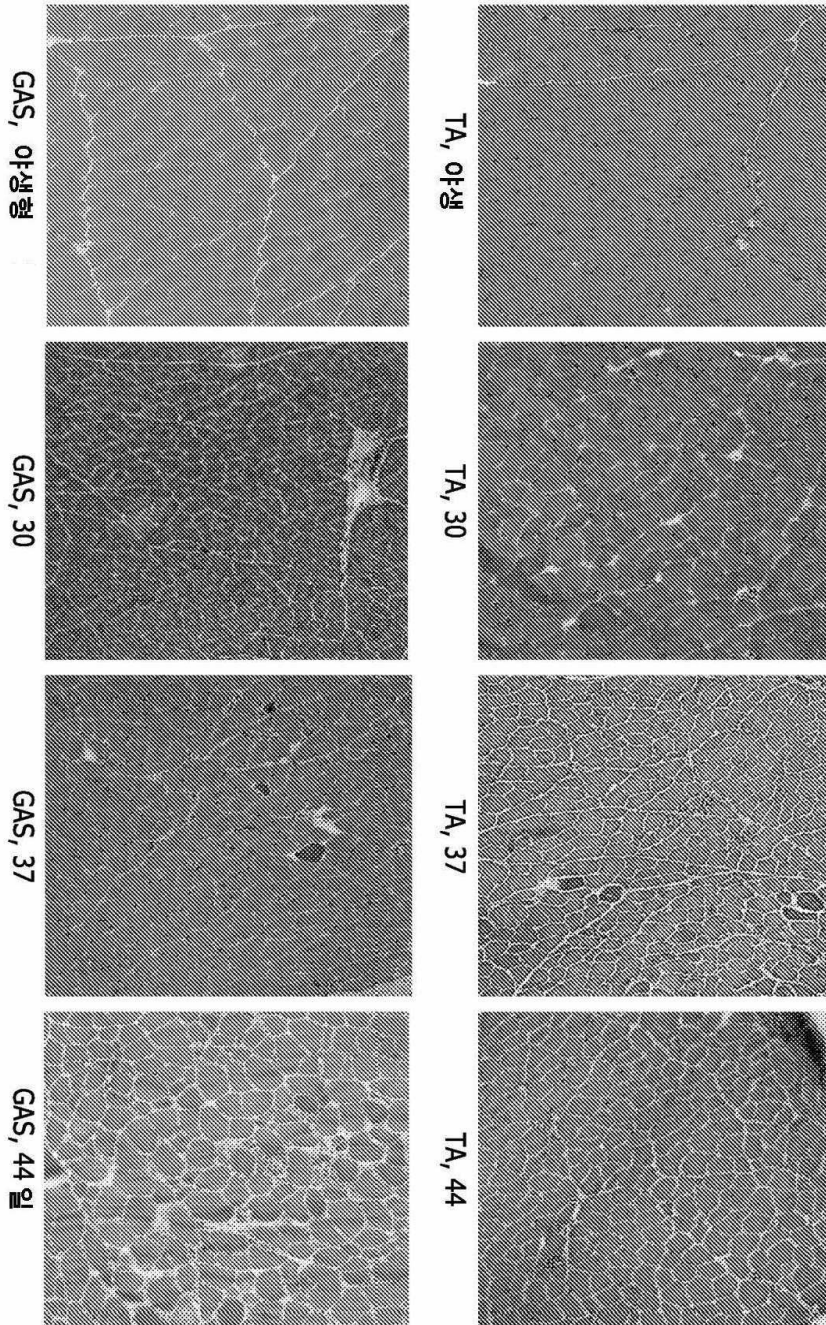
도면8



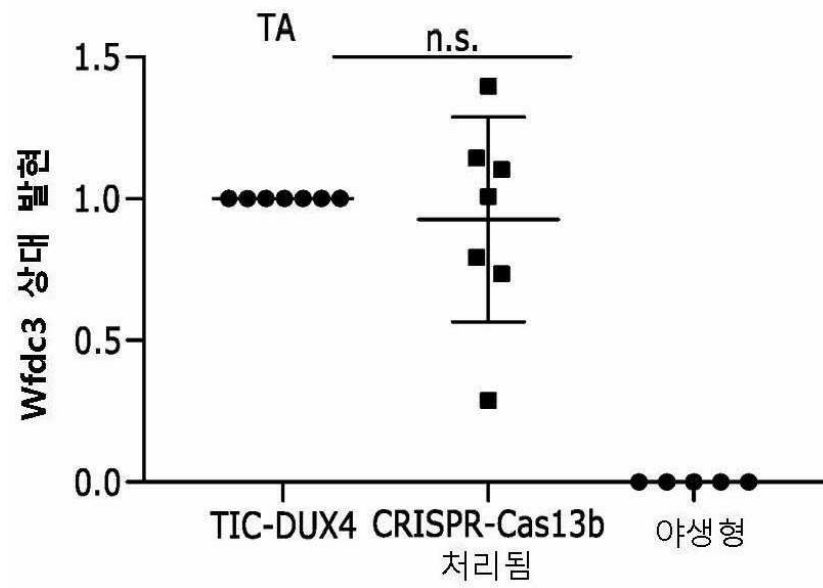
도면9a



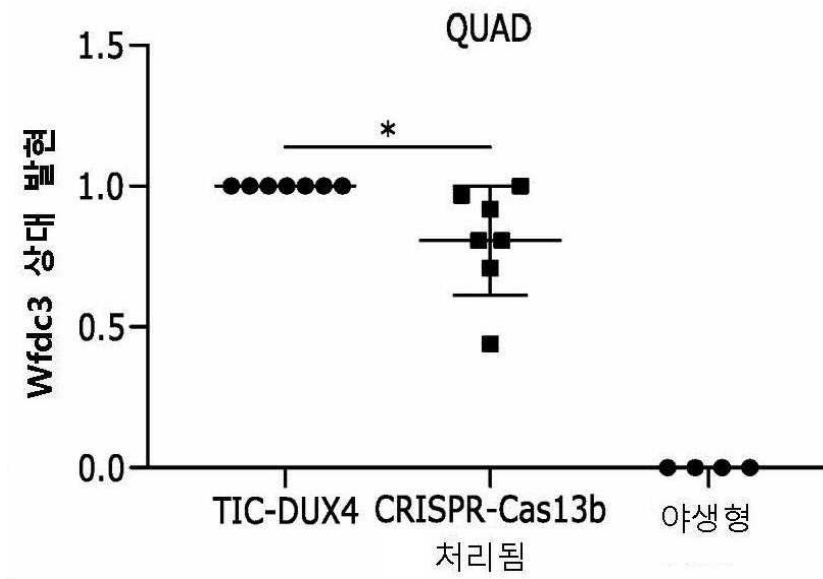
도면9b



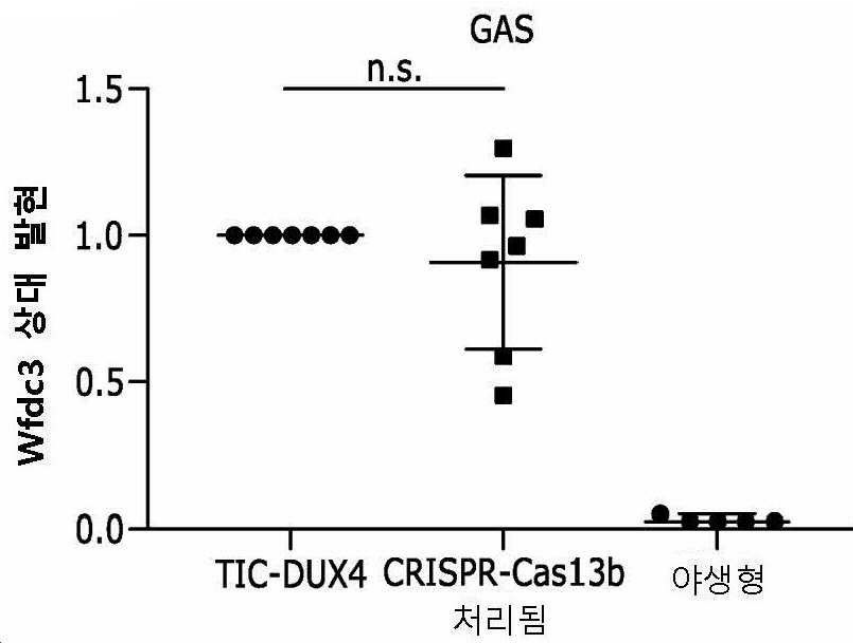
도면9c



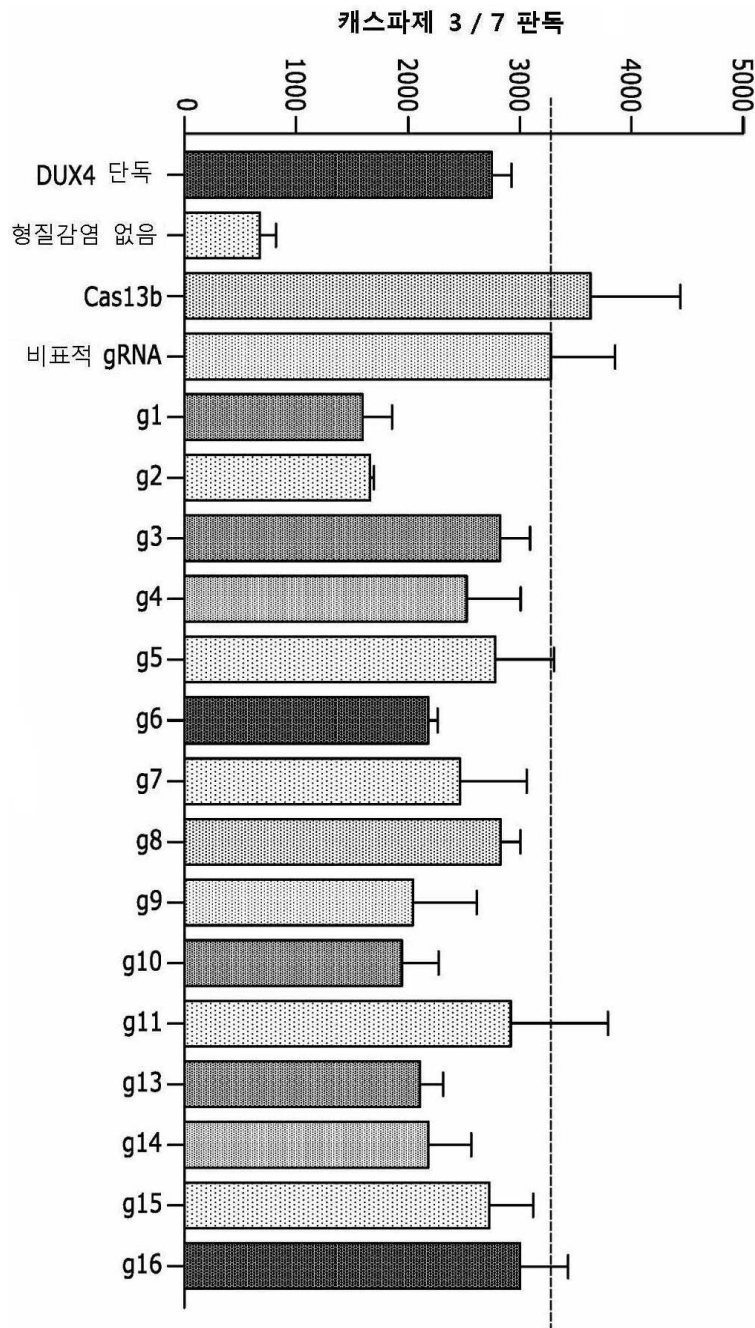
도면9d



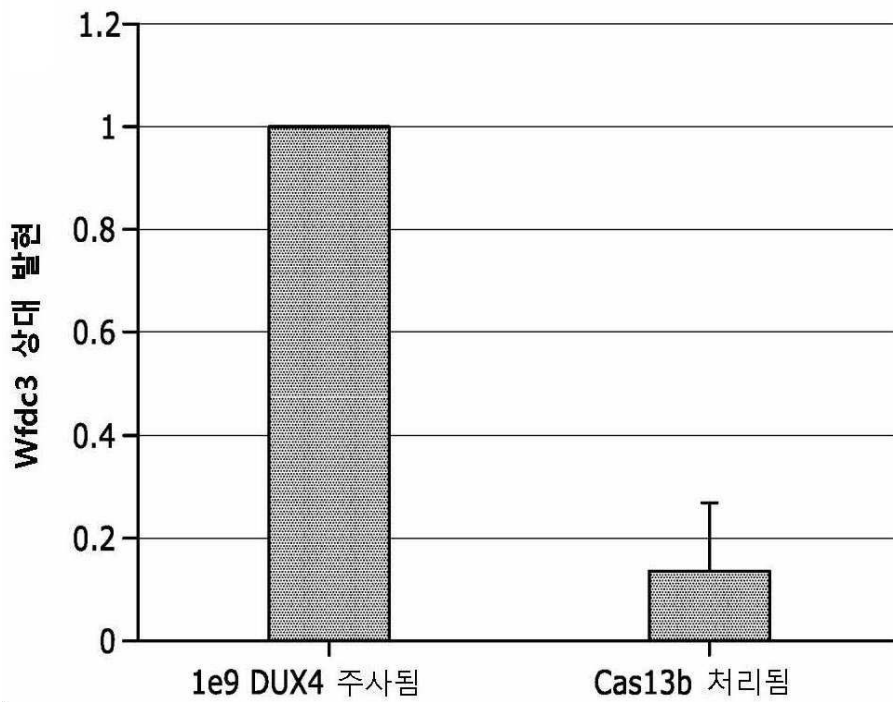
도면9e



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Research Institute at Nationwide Children's Hospital

<120> DUX4 RNA SILENCING USING RNA TARGETING CRISPR-CAS13B

<130> 28335/53307A

<150> US 62/786,670

<151> 2018-12-31

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> DUX4 NT

<400> 1

atggcctcc cgacaccctc ggacagcacc ctccccggg aagccccggg acgaggacgg 60

cgacggagac tcgtttggac cccgagccaa agcgaggccc tgcgagcctg ctttgagcgg 120

aacctgtacc cgggcatcgc caccagagaa cggctggccc aggccatcgg cattccggag 180

cccagggtcc agatttggtt tcagaatgag aggtcacgcc agctgaggca gcaccggcgg 240

gaatctcggc cctggcccgg gagacgcggc ccgccagaag gccggcgaaa gcggaccgcc 300

gtcacccgat cccagaccgc cctgtcctc cgagcctttg agaaggatcg ctttcaggc 360

atcgccgcc gggaggagct ggccagagag acgggcctcc cggagtccag gattcagatc 420

tggtttcaga atcgaagggc caggcaccgc ggacagggtg gcagggcgcc cgcgcaggca 480

ggcggcctgt gcagcgcggc ccccgccggg ggtcacctg ctcctcgtg ggtcgccttc 540

gcccacaccg gcgcgtgggg aacggggctt cccgcacccc acgtgccctg gcgcctggg 600

gctctccac agggggcttt cgtgagccag gcagcggagg ccgccccgc gctgcagccc 660

agccaggccg cgcggcaga ggggatctcc caacctgcc cggcgcggg ggatttcgcc 720

tacgccccc cggctcctcc ggacggggcg ctctccacc ctcaggctcc tcggtggcct 780

ccgcaccgg gcaaaagccg ggaggaccgg gaccgcagc gcgacggcct gccgggcccc 840

tgcgcggtgg cacagcctgg gcccgtcaa gcggggccgc agggccaagg ggtgcttgcg 900

ccaccacgt cccaggggag tccgtggtgg ggctggggcc ggggtccca ggtcgcggg 960

gcggcgtggg aaccccaagc cggggcagct ccacctcccc agcccgcgcc cccggacgcc 1020

tccgcctccg cgcggcaggg gcagatgcaa ggcatcccgg cgcctccca ggcgctccag 1080

gagccggcgc cctggtctgc actcccctgc ggctgtctgc tggatgagct cctggcgagc 1140

ccggagtttc tgcagcaggc gcaacctctc ctgaaacgg aggccccggg ggagctggag 1200

gcctcgaag agccgcctc gctggaagca ccctcagcg aggaagaata cgggctctg 1260

ctggaggagc tttag 1275

<210> 2

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> DUX4 AA

<400> 2

Met Ala Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ser Thr Leu Pro Ala Glu Ala Arg

1 5 10 15

Gly Arg Gly Arg Arg Arg Arg Leu Val Trp Thr Pro Ser Gln Ser Glu
 20 25 30
 Ala Leu Arg Ala Cys Phe Glu Arg Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Ala Thr
 35 40 45
 Arg Glu Arg Leu Ala Gln Ala Ile Gly Ile Pro Glu Pro Arg Val Gln

 50 55 60
 Ile Trp Phe Gln Asn Glu Arg Ser Arg Gln Leu Arg Gln His Arg Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Arg Pro Trp Pro Gly Arg Arg Gly Pro Pro Glu Gly Arg Arg
 85 90 95
 Lys Arg Thr Ala Val Thr Gly Ser Gln Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ala
 100 105 110
 Phe Glu Lys Asp Arg Phe Pro Gly Ile Ala Ala Arg Glu Glu Leu Ala

 115 120 125
 Arg Glu Thr Gly Leu Pro Glu Ser Arg Ile Gln Ile Trp Phe Gln Asn
 130 135 140
 Arg Arg Ala Arg His Pro Gly Gln Gly Gly Arg Ala Pro Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Cys Ser Ala Ala Pro Gly Gly Gly His Pro Ala Pro Ser
 165 170 175
 Trp Val Ala Phe Ala His Thr Gly Ala Trp Gly Thr Gly Leu Pro Ala

 180 185 190
 Pro His Val Pro Cys Ala Pro Gly Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Val
 195 200 205
 Ser Gln Ala Ala Arg Ala Ala Pro Ala Leu Gln Pro Ser Gln Ala Ala
 210 215 220
 Pro Ala Glu Gly Ile Ser Gln Pro Ala Pro Ala Arg Gly Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Pro Asp Gly Ala Leu Ser His Pro Gln Ala

 245 250 255
 Pro Arg Trp Pro Pro His Pro Gly Lys Ser Arg Glu Asp Arg Asp Pro

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA2 sequence
 <400> 4
 gattctgaaa ccagatctga atcctggact 30
 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA3 sequence

 <400> 5
 gactccggga ggcccgcttc tctggccagc t 31
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA4 sequence
 <400> 6
 gaggagcctg agggtgggag agcgccccgt 30
 <210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA5 sequence
 <400> 7

gcttttgccc ggggtgcggag gccaccgagg ag 32

<210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA6 sequence
 <400> 8

tctaggagag gttgcgcctg ctgcagaaac t 31

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA7 sequence
 <400> 9

gtttctagga gaggttgcgc ctgctgcaga aact 34

<210> 10
 <211> 30
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA8 sequence
 <400> 10

tggcagttct ccgcggtgtg gagtctctca 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature
 <223> gRNA9 sequence
 <400> 11
 gttctccgcg gtgtggagtc tctcaccggg 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA10 sequence
 <400> 12
 gaacaagggc acagagaggc cagcgagctc 30
 <210> 13
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA11 sequence
 <400> 13
 gacagcgtcg gaaggtgggg ggagacattc ag 32
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide

 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA1 DUX4 targeting sequence
 <400> 14
 attcagatct ggtttcagaa tcgaagggcc 30
 <210> 15
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA2 DUX4 targeting sequence
 <400> 15
 agtccaggat tcagatctgg tttcagaatc 30
 <210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide

 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA3 DUX4 targeting sequence
 <400> 16
 agctggccag agagacgggc ctcccggagt c 31
 <210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA4 DUX4 targeting sequence
 <400> 17
 acggggcgct ctcccacct caggtcctc 30
 <210> 18
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide

 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA5 DUX4 targeting sequence
 <400> 18

ctcctcgggtg gcctccgcac ccgggcaaaa gc 32

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA6 DUX4 targeting sequence

<400> 19

agtttctgca gcaggcgcaa cctctcctag a 31

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA7 DUX4 targeting sequence

<400> 20

agtttctgca gcaggcgcaa cctctcctag aaac 34

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA8 DUX4 targeting sequence

<400> 21

tgagagactc cacaccgagg agaactgcca 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature
 <223> gRNA9 DUX4 targeting sequence
 <400> 22
 cccggtgaga gactccacac cgcggagaac 30
 <210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA10 DUX4 targeting sequence
 <400> 23
 gagctcgctg gcctctctgt gcccttgttc 30
 <210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide

 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA11 DUX4 targeting sequence
 <400> 24
 ctgaatgtct cccccacct tccgacgtg tc 32
 <210> 25
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA1 + Cas13b direct repeat
 <400> 25
 ggcccttcga ttctgaaacc agatctgaat gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60
 tacaac 66
 <210> 26

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA2 + Cas13b direct repeat

<400> 26

gattctgaaa ccagatctga atcctggact gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60

tacaac 66

<210> 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA3 + Cas13b direct repeat

<400> 27

gactccggga ggcccgtctc tctggccagc tgtgtggaag ggtccagttt tgaggggcta 60

ttacaac 67

<210> 28

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA4 + Cas13b direct repeat

<400> 28

gaggagcctg aggggtggag agcgcgccgt gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60

tacaac 66

<210> 29

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA5 + Cas13b direct repeat

<400> 29

gcttttggccc ggggtgcggag gccaccgagg aggttgtgga aggtccagtt ttgaggggct 60

attacaac 68

<210> 30

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA6 + Cas13b direct repeat

<400> 30

tctaggagag gttgcgcctg ctgcagaaac tgttgtggaa ggtccagttt tgaggggcta 60

ttacaac 67

<210> 31

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA7 + Cas13b direct repeat

<400> 31

gtttctagga gaggttgcgc ctgctgcaga aactgttgtg gaaggtccag ttttgagggg 60

ctattacaac 70

<210> 32

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA8 + Cas13b direct repeat

<400> 32

tggcagttct ccgcggtgtg gagtctctca gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60
tacaac 66

<210> 33
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleoide
<220><221> misc_feature
<223> gRNA9 + Cas13b direct repeat

<400> 33

gttctccgcg gtgtggagtc tctcaccggg gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60
tacaac 66

<210> 34
<211> 66

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleoide
<220><221> misc_feature
<223> gRNA10 + Cas13b direct repeat

<400> 34

gaacaagggc acagagaggc cagcgagctc gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60
tacaac 66

<210> 35
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleoide
<220><221> misc_feature
<223> gRNA11 + Cas13b direct repeat

<400> 35

gacagcgtcg gaaggtgggg ggagacattc aggttgtgga aggtccagtt ttgaggggct 60

attacaac 68

<210> 36

<211> 3270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> Cas13b nucleotide sequence

<400> 36

atgaacatcc ccgctctggt ggaaaaccag aagaagtact ttggcaccta cagcgtgatg 60

gccatgctga acgctcagac cgtgctggac cacatccaga aggtggccga tattgagggc 120

gagcagaacg agaacaacga gaatctgtgg ttccaccccg tgatgagcca cctgtacaac 180

gccaaagaacg gctacgacaa gcagcccag aaaacatgt tcatcatcga gcggctgcag 240

agctacttcc cattctgaa gatcatggcc gagaaccaga gagagtacag caacggcaag 300

tacaagcaga accgcgtgga agtgaacagc aacgacatct tcgaggtgct gaagcgcgcc 360

ttcggcgtgc tgaagatgta cagggacctg accaaccact acaagaccta cgaggaaaag 420

ctgaacgacg gctgcgagtt cctgaccagc acagagcaac ctctgagcgg catgatcaac 480

aactactaca cagtggcctt gcggaacatg aacgagagat acggctacaa gacagaggac 540

ctggccttca tccaggacaa gcggttcaag ttcgtgaagg acgcctacgg caagaaaaag 600

tccaagtga ataccggatt ctctctgagc ctgcaggact acaacggcga cacacagaag 660

aagctgcacc tgagcggagt gggaatcgcc ctgctgatct gcctgttctt ggacaagcag 720

tacatcaaca tctttctgag caggetgccc atctttcca gctacaatgc ccagagcgag 780

gaacggcggga tcatcatcag atccttcggc atcaacagca tcaagctgcc caaggaccgg 840

atccacagcg agaagtcaa caagagcgtg gccatggata tgctcaacga agtgaagcgg 900

tgccccgacg agctgttcac aacctgtct gccgagaagc agtcccggtt cagaatcatc 960

agcgacgacc acaatgaagt gctgatgaag cggagcagcg acagattcgt gcctctgctg 1020

ctgcagtata tcgattacgg caagctgttc gaccacatca ggttccacgt gaacatgggc 1080

aagctgagat acctgctgaa ggccgacaag acctgcatcg acggccagac cagagtcaga 1140

gtgatcgagc agcccctgaa cggcttcggc agactggaag aggccgagac aatgcggaag 1200

caagagaacg gcacctcgg caacagcggc atccggatca gagacttca gaacatgaag 1260

cgggacgacg ccaatcctgc caactatccc tacatcgtgg acacctacac aactacatc 1320

ctggaaaaca acaaggtcga gatgtttatc aacgacaaag aggacagcgc cccactgctg 1380

cccgtgatcg aggatgatag atacgtggtc aagacaatcc ccagctgccg gatgagcacc 1440
 ctggaaattc cagccatggc cttccacatg tttctgttcg gcagcaagaa aaccgagaag 1500

 ctgatcgtgg acgtgcacaa ccggtacaag agactgttcc aggccatgca gaaagaagaa 1560
 gtgaccgccg agaatatcgc cagcttcgga atcgccgaga gcgacctgcc tcagaagatc 1620
 ctggatctga tcagcggcaa tgcccacggc aaggatgtgg acgccttcat cagactgacc 1680
 gtggacgaca tgctgaccga caccgagcgg agaatcaaga gattcaagga cgaccggaag 1740
 tccattcgga gcgccgacaa caagatggga aagagaggct tcaagcagat ctccacaggc 1800
 aagctggccc acttctctggc caaggacatc gtgctgtttc agcccagcgt gaacgatggc 1860
 gagaacaaga tcaccggcct gaactaccgg atcatgcaga gcgccattgc cgtgtacgat 1920

 agcggcgacg attacgaggc caagcagcag ttcaagctga tgttcgagaa ggccccgctg 1980
 atcggaagg gcacaacaga gcctcaccga tttctgtaca aggtgttcgc ccgcagcacc 2040
 cccgcaatg ccgtcgagtt ctacgagcgc tacctgatcg agcgggaagt ctacctgacc 2100
 ggctgtcca acgagatcaa gaaaggcaac agagtggatg tgccttcat ccggcgggac 2160
 cagaacaagt ggaaaacacc cgccatgaag accctgggca gaatctacag cgaggatctg 2220
 cccgtggaac tgcccagaca gatgttcgac aatgagatca agtcccacct gaagtcctg 2280
 ccacagatgg aaggcatcga cttcaacaat gccaacgtga cctatctgat cgccgagtac 2340

 atgaagagag tgctggacga cgacttccag accttctacc agtggaaacc caactaccgg 2400
 tacatggaca tgcttaaggc cgagtacgac agaaagggct ccctgcagca ctgcttacc 2460
 agcgtggaag agagagaagg cctctggaaa gagcgggcct ccagaacaga gcggtacaga 2520
 aagcaggcca gcaacaagat ccgcagcaac cggcagatga gaaacgccag cagcgaagag 2580
 atcgagacaa tcctggataa gcggctgagc aacagccgga acgagtacca gaaaagcgag 2640
 aaagtgatcc ggcgctacag agtgcaggat gcctgtctgt tttctgtggc caaaaagacc 2700
 ctgaccgaac tggccgattt cgacggcgag aggttcaaac tgaaagaaat catgcccgac 2760

 gccgagaagg gaatcctgag cgagatcatg cccatgagct tcaccttca gaaaggcggc 2820
 aagaagtaca ccatcaccag cgaggcatg aagctgaaga actacggcga cttctttgtg 2880
 ctggctagcg acaagaggat cggcaacctg ctggaactcg tgggcagcga catcgtgtcc 2940
 aaagaggata tcatggaaga gttcaacaaa tacgaccagt gcaggcccga gatcagctcc 3000
 atcgtgttca acctggaaaa gtggccttc gacacatacc ccgagctgtc tgccagagtg 3060
 gaccgggaag agaaggtgga cttcaagagc atcctgaaaa tcctgctgaa caacaagaac 3120

atcaacaag agcagagcga catcctgctg aagatccgga acgccttcga tcacaacaat 3180

taccccgaca aaggcgtggt ggaaatcaag gcctgctg agatgccat gagcatcaag 3240

aaggcctttg gggagtacgc catcatgaag 3270

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> Cas13b direct repeat

<400> 37

gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat tacaac 36

<210> 38

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220

><221> misc_feature

<223> gRNA1 expression cassette sequence

<400> 38

gagggcctat ttccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaata ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttgctt tataatctt gtggaagga 240

cgaaacaccg gcccttcgat tctgaaacca gatctgaatg ttgtggaagg tccagttttg 300

aggggctatt acaacttttt t 321

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA2 expression cassette sequence
 <400> 39
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttggaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg attctgaaac cagatctgaa tcctggactg ttgtggaagg tccagttttg 300

aggggctatt acaacttttt t 321

<210> 40

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA3 expression cassette sequence

<400> 40

gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttggaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg actccgggag gccctctct ctggccagct gttgtggaag gtccagtttt 300

gaggggctat tacaactttt tt 322

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA4 expression cassette sequence

<400> 41

gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaag gtatttcgat ttcttggctt tataatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg aggagcctga ggggtgggaga ggcgccctg ttgtggaagg tccagttttg 300

aggggctatt acaactttt t 321

<210> 42

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA5 expression cassette sequence

<400> 42

gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaagc tgtagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaag gtatttcgat ttcttggctt tataatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg cttttgcccg ggtgcggagg ccaccgagga ggttggtaa ggtccagttt 300

tgaggggcta ttacaacttt ttt 323

<210> 43

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA6 expression cassette sequence

<400> 43

gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaagc tgtagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaag gtatttcgat ttcttggctt tataatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg tctaggagag gttgcgcctg ctgcagaaac tgttggtaa ggtccagttt 300

tgaggggcta ttacaacttt ttt 323

<210> 44

<211> 325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA7 expression cassette sequence

<400> 44

```
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag      60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga      120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat      180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga      240
cgaaacaccg tttctaggag aggttgcgcc tgcctcagaa actgttgttg aaggtccagt      300
tttgaggggc tattacaact ttttt                                     325
```

<210> 45

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA8 expression cassette sequence

<400> 45

```
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag      60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga      120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat      180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga      240
cgaaacaccg tggcagttct ccgcggtgtg gagtctctca gttgtggaag gtccagtttt      300
```

```
gaggggctat tacaactttt tt                                     322
```

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA9 expression cassette sequence
 <400> 46
 gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tataatatctt gtggaaagga 240

 cgaaacaccg ttctccgagg tgtggagtct ctcaccgggg ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321
 <210> 47
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA10 expression cassette sequence
 <400> 47
 gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180

 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tataatatctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg aacaaggcca cagagaggcc agcgagctcg ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321
 <210> 48
 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleoide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA11 expression cassette sequence
 <400> 48
 gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg acagcgtcgg aagggtggggg gagacattca ggttgtggaa ggtccagttt 300

tgaggggcta ttacaacttt ttt 323

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA12 sequence (control)

<400> 49

gcagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa 30

<210> 50

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleoide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA12 expression cassette sequence (control)

<400> 50

gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaaagga 240

cgaaacaccg cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa gttgtggaag gtccagtttt 300

gaggggctat tacaactttt tt 322

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA13 sequence
 <400> 51
 gccagaattt cacggaagaa caagggcaca 30
 <210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA14 sequence
 <400> 52
 gctcccttgc acgtcagccg ggggtcgcac 30

 <210> 53
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA15 sequence
 <400> 53
 gaaaccagat ctgaatcctg gactccggga 30
 <210> 54
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA16 sequence
 <400> 54
 ggggtgcctgg cccttcgatt ctgaaaccag 30
 <210> 55
 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA 13 targeting site

<400> 55

tgtgcccttg ttcttccgtg aaattctggc 30

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA14 targeting site

<400> 56

gtgcgcaccc cggctgacgt gcaagggagc 30

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA15 targeting site

<400> 57

tcccggagtc caggattcag atctggtttc 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA16 targeting site

<400> 58

ctggtttcag aatcgaaggg ccaggcaccc 30

<210> 59

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA13 + Cas13b direct repeat

<400> 59

gccagaattt cacggaagaa caagggcaca gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60

tacaac 66

<210> 60

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA14 + Cas13b direct repeat

<400> 60

gtcccttgc acgtcagccg gggcgcgac gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60

tacaac 66

<210> 61

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA15 + Cas13b direct repeat

<400> 61

gaaaccagat ctgaatcctg gactccggga gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60

tacaac 66

<210> 62

<211> 66

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <223> gRNA16 + Cas13b direct repeat
 <400> 62
 ggggtgctgg cccttcgatt ctgaaaccag gttgtggaag gtccagtttt gaggggctat 60
 tacaac 66

<210> 63
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA13 expression cassette sequence
 <400> 63
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg ccagaatttc acggaagaac aagggcacag ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321

<210> 64
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> gRNA14 expression cassette sequence
 <400> 64
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tataatatctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg ctcccttgca cgtcagccgg ggtgcgcacg ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321

<210> 65

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA15 expression cassette sequence

<400> 65

gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tataatatctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg aaaccagatc tgaatcctgg actccgggag ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321

<210> 66

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> gRNA16 expression cassette sequence

<400> 66

gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttcagtt ttaaaattat gttttaaataat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tataatatctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccg ggtgcctggc ccttcgattc tgaaccagg ttgtggaagg tccagttttg 300
 aggggctatt acaacttttt t 321