



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0045285
(43) 공개일자 2024년04월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7008131
(22) 출원일자(국제) 2022년08월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년03월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/074941
(87) 국제공개번호 WO 2023/019269
국제공개일자 2023년02월16일
- (30) 우선권주장
63/232,723 2021년08월13일 미국(US)

- (71) 출원인
에멘도바이오 인코포레이티드
미국, 텔라웨어 19805, 윌밍턴, 스위트 403-비,
1013 센터 로드
- (72) 발명자
이자르 리오르
이스라엘 텔 아비브 6910414 바르트 스트리트 8
마르바흐 바르 나다브
이스라엘 레호보트 76466 하케렘 9/14
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리엔목특허법인

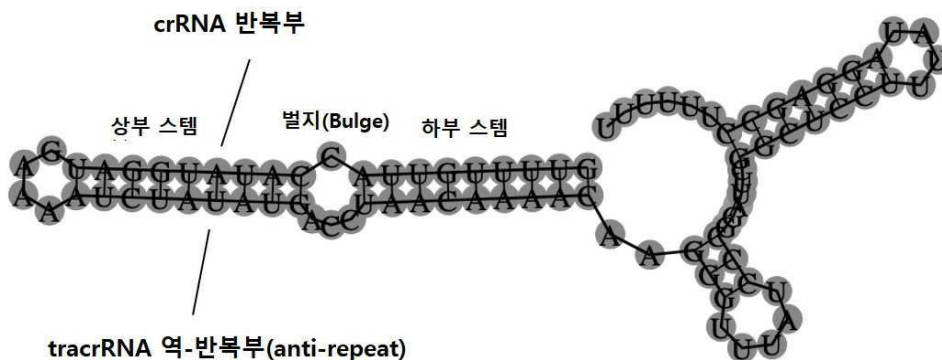
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 신규한 OMNI 115, 124, 127, 144-149, 159, 218, 237, 248, 251-253 및 259 CRISPR 뉴클레아제

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 비-천연 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

룩카 리아트

이스라엘 리손 레지온 7525941 하바'알 썸 토브 7

메론 누리트

이스라엘 라마트 간 5258302 하쇼샤님 블러바드 3

아디브 탈 오퍼르

이스라엘 레호보트 7647306 닥터 모스코비치 스트리트 18

기스판 아리엘

이스라엘 크파르 아두뎀 9061800 하메야스뎀 18

부흐 이디트

이스라엘 호드 하샤론 4502513 야이르 슈테른 스트리트 25

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3, 1, 또는 2 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제, 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 비-천연 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자 중 어느 하나를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 더 포함하고, 상기 하나 이상의 RNA 분자와 상기 CRISPR 뉴클레아제는 자연적으로 함께 발생하지 않고, 상기 하나 이상의 RNA 분자는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 및/또는 상기 복합체를 표적 부위에 표적화하도록 구성되는 것인 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 82-97로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 82-85, 및 96으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 서열번호 86-93 및 97로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 82-97로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 52-64로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 52-55로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 서열번호 56-63으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 52-64로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 11

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 65-81로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 65-68 및 80으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 서열번호 69-77 및 81로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 65-81로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 15

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4-9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 98-114로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4-9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 98-101 및 114로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 서열번호 102-111로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4-9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 98-114로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 19

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 115-127로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖

는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 115-118로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 서열번호 119-126으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 22

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 115-127로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 23

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 128-141로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 128-131로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 서열번호 132-140으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 128-141로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 27

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 142-155로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 142-145로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 서열번호 146-152 및 155로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 30

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 142-155로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 31

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 156-167 및 GCUUUAAGC로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 156-159로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 서열번호 160-166 및 GCUUUAAGC로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 156-167 및 GCUUUAAGC로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 35

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 168-176으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 168 및 169로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 서열번호 170-175로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 38

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 168-176으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 39

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 177-185로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 177 및 178로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 서열번호 179-184로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 42

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 177-185로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 43

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 186-202로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 186-189 및 201로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 서열번호 190-198 및 202로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

청구항 2에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 186-202로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자인 것인 조성물.

청구항 47

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 5에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 다키아제인 것인 조성물.

청구항 48

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 6에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 다키아제인 것인 조성물.

청구항 49

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 7에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인 및 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 촉매활성이 상실된(catalytically dead) 뉴클레아제인 것인 조성물.

청구항 50

청구항 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 3의 컬럼 2-4에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 PAM(protospacer adjacent motif)(PAM) 서열을 이용하는 것인 조성물

청구항 51

청구항 2 내지 50 중 어느 한 항의 조성물을 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 계층 중 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 3의 컬럼 2-4에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 PAM(protospacer adjacent motif) 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성하고 및/또는 상기 PAM 서열에 상보적인 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성하는 것인 방법.

청구항 53

청구항 51에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 5에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 니카아제이고, 상기 PAM 서열에 상보적인 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성하는 것인 방법.

청구항 54

청구항 51에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 6에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 니카아제이고, 상기 PAM 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성하는 것인 방법.

청구항 55

청구항 51 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포인 것인 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 것인 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2021년 8월 13일자로 출원된 미국 가출원 제63/232,723호의 우선권을 주장하며, 그의 내용은 참조에 의해 본원에 포함된다.

[0002] 본 출원 전반에 걸쳐, 괄호 안에 언급된 것을 포함하여, 다양한 간행물이 언급된다. 본 출원에서 언급된 모든 간행물의 개시는 그 전체로 본 발명이 속하는 기술 분야 및 본 발명과 함께 이용될 수 있는 당해 기술 분야의 특징에 대한 추가적인 설명을 제공하기 위해 본 출원에 참조에 의해 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 파일의 크기가 575 킬로바이트이고, MS-윈도우와 운영 시스템 호환성을 갖는 IBM-PC 머신 포맷으로 2022년 8월 12일자로 작성된, 파일명이 "210812_91769-A-PCT_Sequence_Listing_AWG.xml"인 파일에 존재하는 뉴클레오타이드 서열을 참조에 의해 포함하고, 이는 본 출원의 일부로 2022년 8월 12일자로 제출된 XML 파일에 포함되어 있다.

[0005] 본 발명의 분야

[0006] 본 발명은 특히 게놈 편집을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 박테리아 및 고세균 적응 면역의 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 시스템은 단백질 조성 및 게놈 로커스 아키텍처(genomic loci architecture)의 극도의 다양성을 나타낸다. CRISPR 시스템은 연구 및 게놈 조작(genome engineering)을 위한 중요한 도구가 되었다. 그럼에도 불구하고, CRISPR 시스템의 많은 세부사항이 결정되지 않았으며, CRISPR 뉴클레아제의 적용성은 서열 특이성 요건, 발현, 또는 전달 문제에 의해 제한될 수 있다. 상이한 CRISPR 뉴클레아제는 크기, PAM 부위, 온타겟(on target) 활성, 특이성, 절단 패턴(예를 들어, 평활(blunt), 점착(staggered) 말단), 및 절단 후 indel(insertion/deletion) 형성의 두드러진 패턴과 같은 다양한 특징을 갖는다. 상이한 특징들의 세트가 상이한 적용에 유용할 수 있다. 예를 들어, 일부 CRISPR 뉴클레아제는 PAM 부위의 제한으로 인해 다른 CRISPR 뉴클레아제가 표적화할 수 없는 특정 게놈 유

전자좌(locus)를 표적화할 수 있다. 또한, 현재 사용 중인 일부 CRISPR 뉴클레아제는 선제성 면역(pre-immunity)을 나타내고, 이는 생체 내 적용성을 제한할 수 있다. Charlesworth et al., Nature Medicine (2019) 및 Wagner et al., Nature Medicine (2019)을 참조한다. 따라서, 신규 CRISPR 뉴클레아제의 발현, 조작 및 개선이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 발명의 요약

[0009] 게놈 조작, 후생학적 조작(epigenomic engineering), 게놈 표적화, 세포의 게놈 편집, 및/또는 인 비트로 진단에 이용될 수 있는 조성물 및 방법이 본원에 개시된다.

[0010] 개시된 조성물은 게놈 DNA 서열을 변형시키는 데 이용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 게놈 DNA는 목적 세포 또는 세포들에 존재하는 선형 및/또는 염색체 DNA 및/또는 플라스미드 또는 기타 염색체의 DNA 서열을 의미한다. 일부 구체예에서, 목적 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 목적 세포는 원핵 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 게놈 DNA 서열의 미리 결정된 표적 부위에서 이중-가닥 절단(DSB)을 생성하여, 게놈의 표적 부위(들)에서 DNA 서열의 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 초래한다.

[0011] 따라서, 일부 구체예에서, 상기 조성물은 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 뉴클레아제를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 CRISPR-연관 단백질(CRISPR-associated protein)이다.

과제의 해결 수단

[0012] OMNI CRISPR 뉴클레아제

[0013] 본 발명의 구체예는 표 1에 제공된 "OMNI" 뉴클레아제로 명명된 CRISPR 뉴클레아제를 제공한다.

[0014] 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 CRISPR 뉴클레아제, 또는 서열번호 18 내지 51로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는, CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물, 및 (ii) 표적 DNA의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, DNA-표적화 RNA 분자, 또는 DNA-표적화 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 포유동물 세포의 게놈 내의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한,

[0016] a) 직접 반복 서열(direct repeat sequence)에 연결된 가이드 서열 부분(guide sequence portion)을 포함하고, 상기 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화할 수 있는 것인 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열; 및

[0017] b) 서열번호 1 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 Cas(CRISPR-associated) 시스템을 포함하는 비-천연(non-naturally occurring) 조성물로서,

[0018] 상기 하나 이상의 RNA 분자는 표적 서열에 혼성화하고, 상기 표적 서열은 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer Adjacent Motif: PAM)의 상보적 서열의 3' 말단에 인접하며, 상기 하나 이상의 RNA 분자는 RNA-가이드 뉴클레아제(RNA-guided nuclease)와 복합체를 형성하는 것인 비-천연 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한

[0020] a) 서열번호 1 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자; 및

[0021] b) i) 상기 CRISPR 뉴클레아제와 상호작용할 수 있는/CRISPR 뉴클레아제에 결합할 수 있는 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열; 및

[0022] ii) 표적 DNA 서열 중 서열에 상보적인 서열을 포함하는 DNA-표적화 RNA 뉴클레오티드 서열

- [0023] 중 적어도 하나를 포함하는, 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 하나 이상의 DNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 비-천연 조성물로서,
- [0024] 상기 CRISPR 뉴클레아제는 상기 하나 이상의 RNA 분자와 복합체를 형성하여 표적 DNA 서열과 혼성화할 수 있는 복합체를 형성할 수 있는 것인 비-천연 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1a-d: sgRNA_127, sgRNA_237 및 sgRNA_259의 단일 가이드 RNA(sgRNA)(crRNA-tracrRNA)의 예측된 2차 구조. 도 1a: OMNI-127에 대한 crRNA-tracrRNA 이중체의 도식(representation)이고, sgRNA의 crRNA 및 tracrRNA 부분이 표시된다. 도 1b: OMNI-237에 대한 V1 sgRNA 디자인의 예. 도 1c: OMNI-114에 대한 sgRNA V2의 디자인의 예. 도 1d: OMNI-259에 대한 sgRNA V1의 디자인의 예(표 2). 도 1e: OMNI-127에 대한 sgRNA V1의 디자인의 예(표 2).

도 2-18: OMNI 뉴클레아제에 대한 시험관 내 TXTL PAM 고갈 결과. PAM 로고는 고갈된 부위의 비율을 개략적 표현이다(상단 패널). PAM 플라스미드 라이브러리의 특정 PAM 서열(하단 패널, 오른쪽)의 고갈 비율(하단 패널, 왼쪽)은 TXTL 반응의 NGS 후 계산되었다. 각 OMNI에 대한 계산은 PAM 라이브러리의 8bp 서열에 따른 4N 창을 기반으로 한다. 테스트된 OMNI의 요구되는 PAM과 반응 조건 하의 뉴클레아제 활성 수준은 고갈 비율로부터 추론된다. 하기에 대한 시험관 내 PAM 고갈 결과: 도 2-18: OMNI-115. 도 3: OMNI-124. 도 4: OMNI-127. 도 5: OMNI-144. 도 6: OMNI-145. 도 7: OMNI-146. 도 8: OMNI-147. 도 9: OMNI-148. 도 10: OMNI-149. 도 11: OMNI-159. 도 12: OMNI-218. 도 13: OMNI-237. 도 14: OMNI-248. 도 15: OMNI-251. 도 16: OMNI-252. 도 17: OMNI-253. 도 18: OMNI-259.

도 19a-19c: U2OS 세포에서 RNP 복합체의 일부로서 OMNI-127 활성 및 스페이서 최적화. OMNI-127 뉴클레아제를 과발현시키고 정제하였다. 정제된 단백질은 합성 sgRNA와 복합체를 형성하여 RNP를 형성했다. 도 19a: 시험관내 분석을 위해, ELANE-표적화 g135 가이드(표 6에 나열됨)를 포함하는 감소하는 양의 RNP(4, 2, 1 및 0.5 pmol)를 40 ng ELANE DNA 표적 주형과 함께 인큐베이션했다. 선형 주형을 절단하는 RNP 능력에 의해 활성을 검증하였다. 도 19b-19c: 생체내 분석을 위해, (도 19b) 다양한 스페이서 길이(20-24개 뉴클레오타이드)의 ELANE-표적화 g135 및 g136 가이드를 포함하는 RNP를 U2OS 세포에 전기천공하고 편집 수준을 인델(indel) 형성에 근거하여 차세대 서열분석(NGS)으로 측정했다. 도 19c는 U2OS 세포에서 RNP 복합체의 일부로서 OMNI-127에 대한 활성 분석 결과를 보여준다. ELANE g134, g135 및 g136(22bp 스페이서 길이, 표 6)를 포함하는 RNP를 U2OS 세포주에 전기천공하고, 편집 수준(인델)을 NGS로 측정했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 상세한 설명
- [0027] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 조성물은 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 뉴클레아제 및/또는 이를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0028] 표 1은 신규한 CRISPR 뉴클레아제, 및 뉴클레아제를 닉카아제(nickase) 또는 촉매활성이 상실된(catalytically dead) 뉴클레아제로 전환시키는, 각각의 뉴클레아제 내의 하나 이상의 위치에서의 치환을 열거한다. 예를 들어, 본원에 제공된 CRISPR 뉴클레아제 중 어느 하나의 촉매 부위는 뉴클레아제가 닉카아제 활성을 갖고, 단일 가닥 DNA 절단을 수행할 수 있도록 변형될 수 있다. 대안적으로, 본원에 제공된 CRISPR 뉴클레아제 중 어느 하나의 촉매 부위는 뉴클레아제가 뉴클레아제 활성을 갖지 않도록, 즉 데드(dead) 뉴클레아제가 되도록 변형될 수 있다. 본원 전반에 걸쳐 CRISPR 뉴클레아제가 언급되나, 이러한 뉴클레아제는 닉카아제 활성(즉, 이중 가닥 절단과 대조적으로, 단일 가닥 DNA 절단을 생성하는 뉴클레아제)을 갖거나 뉴클레아제 활성이 없도록(즉, 촉매활성이 상실된 데드 뉴클레아제) 변형될 수 있다.
- [0029] 표 2는 각각의 열거된 CRISPR 뉴클레아제와 조화가능한(compatible), crRNA, tracrRNA, 및 단일-가이드 RNA(sgRNA) 서열, 및 crRNA, tracrRNA, 및 sgRNA 서열의 부분을 제공한다. 따라서, crRNA:tracrRNA 복합체의 일부로서 표 2에 열거된 OMNI 뉴클레아제에 결합하고 이를 표적화할 수 있는 crRNA 분자는 표 2에 열거된 임의의 crRNA 서열을 포함할 수 있다. 유사하게, crRNA:tracrRNA 복합체의 일부로서 표 2에 열거된 OMNI 뉴클레아제에 결합하고 이를 표적화할 수 있는 tracrRNA 분자는 표 2에 열거된 임의의 tracrRNA 서열을 포함할 수 있다. 또한, 표 2에 열거된 OMNI 뉴클레아제에 결합하고 이를 표적화할 수 있는 단일-가이드 RNA 분자는 표 2에 열거

된 임의의 서열을 포함할 수 있다.

- [0030] 예를 들어, OMNI-115 뉴클레아제(서열번호 1)의 crRNA 분자는 서열번호 52-55 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있고; OMNI-115 뉴클레아제의 tracrRNA 분자는 서열번호 56 내지 63 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있으며; OMNI-115 뉴클레아제의 sgRNA 분자는 서열번호 52 내지 64 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다. 각각의 OMNI 뉴클레아제에 대한 기타 crRNA 분자, tracrRNA 분자, 또는 sgRNA 분자는 동일한 방식으로 표 2에 열거된 서열로부터 유래될 수 있다.
- [0031] 이러한 뉴클레아제 중 어느 하나는 가이드 RNA 분자를 통해 원하는 DNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 뉴클레아제-가이드 복합체(nuclease-guide complex)는 또한 복합체에 부착된 임의의 분자를 표적 부위로 운반할 것이다. 따라서, 본 개시내용은 또한 CRISPR 뉴클레아제 및 DNA 변형 도메인(예를 들어, 데아미나아제, 뉴클레아제, 닉카아제, 재조합효소, 메틸트랜스퍼라아제, 메틸라아제, 아세틸라아제, 아세틸트랜스퍼라아제, 전사 활성화자(transcriptional activator), 또는 전사 억제자 도메인)을 포함하는 융합 단백질, 및 질병과 관련된 게놈(예를 들면, 인간 대상체의 게놈)의 돌연변이를 교정하거나 유전자의 발현을 감소시키거나 막기 위해 게놈(예를 들면, 인간 게놈)에 돌연변이를 생성하는데 있어서 이러한 융합 단백질의 용도를 고려한다.
- [0032] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 임의의 CRISPR 뉴클레아제는 효소 활성을 갖는 단백질에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 표적 DNA를 변형시킨다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 뉴클레아제 활성, 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제(demethylase) 활성, DNA 복구 활성, DNA 손상 활성, 탈아민화(deamination) 활성, 디스뮤타아제(dismutase) 활성, 알킬화 활성, 탈퓨린화 활성, 산화 활성, 피리미딘 이량체 형성 활성, 인테그라아제 활성, 트랜스포사아제(transposase) 활성, 재조합효소 활성, 폴리머라아제 활성, 리가아제 활성, 헬리카아제 활성, 포토리아아제(photolyase) 활성 또는 글리코실라아제 활성이다. 일부 경우에, 효소 활성은 뉴클레아제 활성이다. 일부 경우에, 뉴클레아제 활성은 표적 DNA에 이중 가닥 절단을 도입한다. 일부 경우에, 효소 활성은 표적 DNA와 연관된 표적 폴리펩티드를 변형시킨다. 일부 경우에, 효소 활성은 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, 아세틸트랜스퍼라아제 활성, 탈아세틸화효소 활성, 키나아제 활성, 포스파타아제 활성, 유비퀴틴 리가아제 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO일화(SUMOylating) 활성, 탈SUMO일화(deSUMOylating) 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 미리스토일화 활성 또는 탈미리스토일화(demyristoylation) 활성이다. 일부 경우에, 표적 폴리펩티드는 히스톤이고, 효소 활성은 메틸트랜스퍼라아제 활성, 데메틸라아제 활성, 아세틸트랜스퍼라아제 활성, 데아세틸라아제 활성, 키나아제 활성, 포스파타아제 활성, 유비퀴틴 리가아제 활성 또는 탈유비퀴틴화 활성이다.
- [0033] 따라서, CRISPR 뉴클레아제, 닉카아제 또는 데드 뉴클레아제(dead-nuclease) 중 임의의 하나는 데아미나제와 같은 염기교정 유전자가위(base editor), 역전사효소(예를 들면, 프라임 편집(prime editing)에서의 용도를 위한 역전사 효소, Anzaolone et al.(2019) 참조), DNA의 메틸화 상태를 변형하는 효소(예를 들면, 메틸트랜스퍼라아제) 또는 히스톤 변형제(예를 들면, 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 또 다른 DNA 조정(modulating) 또는 DNA 변형 효소에 융합될 수 있다(예를 들면, 직접 융합되거나 링커를 통해 융합될 수 있다). 실제로, 본원에 기술된 OMNI-50 뉴클레아제, 닉카아제, 불활성 뉴클레아제는 DNA 변형 효소 또는 그의 이펙터(effector) 도메인에 융합될 수 있다. DNA 변형제(DNA modifier)의 예는 데아미나아제, 뉴클레아제, 닉카아제, 재조합효소, 메틸트랜스퍼라아제, 메틸라아제, 아세틸라아제, 아세틸트랜스퍼라아제, 역전사효소, 헬리카아제, 인테그라아제, 리가아제, 트랜스포사아제, 데메틸라아제, 포스파타아제, 전사 활성화자 또는 전사 억제자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 임의의 CRISPR 뉴클레아제는 효소 활성을 갖는 단백질에 융합된다. 일부 구체예에서, 효소 활성은 표적 DNA 분자를 변형시킨다. 본원에 기술된 CRISPR 뉴클레아제 또는 그의 융합 단백질은 질병과 관련된 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 교정 또는 생성하기 위해, 또는 유전자 발현을 증가, 교정, 감소 또는 방지하기 위해 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 서열번호 1 내지 17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제, 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 비-천연(non-naturally occurring) 조성물을 제공한다.
- [0035] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자 중 어느 하나를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 더 포함하고, 상기 하나 이상의 RNA 분자 및 상기 CRISPR 뉴클레아제는 자연적으로 함께 발생하지 않고 상기 하나 이상의 RNA 분자는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 및/또는 상기 복합체를 표적 부위로 표적화하도록 구성된다.
- [0036] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는

서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 52-64로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

- [0037] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분(guide sequence portion) 및 서열번호 52-55로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자이다.
- [0038] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 52-63으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화(transactivating) CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 더 포함한다.
- [0039] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 52-64로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0040] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 65-81으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0041] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 65-68 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자이다.
- [0042] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 69-77 및 81로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0043] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 65-81으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0044] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 82-97로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 82-85 및 96으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA)이다.
- [0046] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 86-93 및 97로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0047] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 82-97로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0048] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4 내지 9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 98 내지 114로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0049] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4 내지 9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 98 내지 101 및 114로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA)이다.
- [0050] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 102 내지 111로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0051] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4 내지 9 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 98 내지 114로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0052] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 115 내지 127로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0053] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는

서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 115 내지 118로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA) 분자이다.

- [0054] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 119 내지 126으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0055] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 115 내지 127로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0056] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 128 내지 141로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0057] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 128 내지 131로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA) 분자이다.
- [0058] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 132 내지 140으로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0059] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 128 내지 141로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0060] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 142 내지 155로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0061] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 142 내지 145로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자이다.
- [0062] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 146 내지 152 및 155로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0063] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 142 내지 155로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0064] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 156 내지 167 및 GCUUUAAGC로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0065] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 156 내지 159로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자이다.
- [0066] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 160 내지 166 및 GCUUUAAGC로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0067] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 156 내지 167 및 GCUUUAAGC로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0068] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 168 내지 176으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0069] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성

을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 168 및 169로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA) 분자이다.

- [0070] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 170 내지 175로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0071] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14 또는 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 168 내지 176으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0072] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 177 내지 185로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0073] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 177 및 178로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA) 분자이다.
- [0074] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 179 내지 184로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0075] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 177 내지 185로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0076] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 서열번호 186 내지 202로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0077] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 186-189 및 201로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR RNA(crRNA) 분자이다.
- [0078] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 190-198 및 202로 구성된 군에 기재된 서열을 포함하는 트랜스활성화 CRISPR RNA(tracrRNA) 분자를 추가로 포함한다.
- [0079] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 하나 이상의 RNA 분자는 가이드 서열 부분 및 서열번호 186 내지 202로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 단일-가이드 RNA(sgRNA) 분자이다.
- [0080] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 5에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 닉카아제이다.
- [0081] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 6에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 닉카아제이다.
- [0082] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 7에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인 및 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 촉매활성이 상실된 데드 뉴클레아제이다.
- [0083] 예를 들어, OMNI-127의 아미노산 서열(서열번호 3)의 위치 9에서 아스파르트산 잔기(D)를 또 다른 아미노산, 예를 들어 알라닌(A)으로 치환함으로써 그의 RuvC 도메인을 불활성화시키는 것에 의해 OMNI-127 뉴클레아제에 대한 닉카아제가 생성될 수 있다. 표 1에 달리 표시되지 않은 경우, 표 1의 컬럼 5 내지 7에 표시된 아미노산 위치의 각각에 대해 임의의 다른 아미노산으로의 치환이 허용가능하다. 기타 닉카아제 또는 촉매 활성이 상실된 데드 뉴클레아제가 표 1의 동일한 표기를 이용하여 생성될 수 있다.
- [0084] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 3의 컬럼 2 내지 4의 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 프로토스페이스 인접 모티프(protospacer adjacent motif: PAM) 서열을 이용한다.
- [0085] 본 발명은 또한, 전술된 조성물 중 어느 하나를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템(cell-free

system) 또는 세포의 게놈의 DNA 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 CRISPR 뉴클레아제 및 crRNA:tracrRNA 복합체 또는 sgRNA 분자를 포함한다.

- [0086] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 3의 컬럼 2-4의 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 PAM(protospacer adjacent motif) 서열에 인접한 DNA 가닥에 DNA 절단을 생성하고, 상기 PAM 서열에 상보적인 서열에 인접한 DNA 가닥에 DNA 절단을 생성한다. 예를 들어, 적절한 표적화 sgRNA 또는 crRNA:tracrRNA 복합체를 갖는 OMNI-115 뉴클레아제는 NNRYTT 또는 NNRTTT 서열에 인접한 가닥 및 NNRYTT, 및 NNRTTT 서열에 상보적인 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 가닥은 세포의 핵 내에 있다.
- [0087] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 5에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 닉카아제이며, PAM 서열에 상보적인 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성한다.
- [0088] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 6에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 아미노산 치환에 의해 생성된 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 닉카아제이고, PAM 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성한다.
- [0089] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 표 1의 컬럼 7에서 CRISPR 뉴클레아제에 대해 제공된 위치에서 치환에 의해 생성된 불활성화된 RuvC 도메인 및 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 촉매활성이 상실된 데드 뉴클레아제이며, PAM 서열에 인접한 DNA 가닥에서 DNA 절단을 생성한다.
- [0090] 일부 구체예에서, 상기 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다.
- [0091] 일부 구체예에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다.
- [0092] 일부 구체예에서, 상기 세포는 인간 세포이다.
- [0093] 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1-17 중 어느 하나에 기재된 CRISPR 뉴클레아제와 적어도 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83% 또는 82% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 18-51로 구성된 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다.
- [0094] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 조성물은 CRISPR 뉴클레아제 또는 변이체 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 구조체(construct) 또는 벡터 시스템을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제 또는 변이체 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 목적 세포에서 작동 가능한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구체예에서, 조작된(engineered) CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 특정 유기체로부터의 세포에 사용하기 위해 코돈 최적화된다. 일부 구체예에서, 상기 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 대장균에 대해 코돈 최적화된다. 일부 구체예에서, 상기 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 진핵 세포에 대해 코돈 최적화된다. 일부 구체예에서, 상기 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열은 포유동물 세포에 대해 코돈 최적화된다.
- [0095] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 1-17 중 어느 하나와 적어도 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90% 동일성을 갖는 CRISPR 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 재조합 핵산을 포함한다. 각 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다.
- [0096] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 18 및 35로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0097] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 19 및 36으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0098] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 20 및 37로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.

- [0099] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 21 및 38로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0100] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 22 및 39로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0101] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 23 및 40으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0102] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 24 및 41로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0103] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 25 및 42로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0104] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 26 및 43으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0105] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 27 및 44로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0106] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 28 및 45로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0107] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 29 및 46으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0108] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 30 및 47로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0109] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 31 및 48로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0110] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 33 및 50으로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0111] 상기 조성물의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 갖거나, 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열은 서열번호 34 및 51로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 서열 동일성을 갖는다.
- [0112] 일부 구체예에 따르면, 서열번호 1-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 또는 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조작된 또는 비-천연 조성물이 제공된다. 각 가능성은 별도의 구체예를 나타낸다.
- [0113] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 조작되거나 비-천연이다. 상기 CRISPR 뉴클레아제는 또한 재조합된 것일 수 있다. 이러한 CRISPR 뉴클레아제는 복수의 출처로부터의 유전 물질을 조합하여, 생물학적 유기체에서

달리 발견되지 않는 서열을 생성하기 위해 실험실 방법(분자 클로닝)을 이용하여 제조된다.

- [0114] 일 구체예에서, 본 발명의 CRISPR 뉴클레아제는 하나 이상의 RNA 분자와 복합체화될 때 SpCas9 뉴클레아제에 비해 표적 부위에 대해 증가된 특이성을 보인다.
- [0115] 일 구체예에서, 본 발명의 CRISPR 뉴클레아제와 하나 이상의 RNA 분자의 복합체는 SpCas9 뉴클레아제와 비교하여 적어도 유지된 표적 부위의 온타겟(on-target) 편집 활성 및 감소된 오프타겟(off-target) 활성을 나타낸다.
- [0116] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 DNA-표적화 RNA 분자(gRNA)와 상호작용할 수 있는 RNA-결합 부분 및 부위 지정 효소 활성(site-directed enzymatic activity)을 나타내는 활성 부분을 추가로 포함한다.
- [0117] 일 구체예에서, 상기 조성물은 DNA-표적화 RNA 분자 또는 DNA-표적화 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 더 포함하고, 상기 DNA-표적화 RNA 분자는 가이드 서열 부분, 즉, 표적 영역 중 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 DNA-표적화 RNA 분자 및 상기 CRISPR 뉴클레아제는 자연적으로 함께 발생하지 않는다.
- [0118] 일 구체예에서, 상기 DNA-표적화 RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다.
- [0119] 본 발명은 또한 비-천연 조성물로서:
- [0120] a) 직접 반복 서열(direct repeat sequence)에 연결된 가이드 서열 부분을 포함하고, 상기 가이드 서열은 표적 서열에 혼성화할 수 있는 것인 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열; 및
- [0121] b) 서열번호 1-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자;를 포함하는 Cas 시스템(CRISPR associated system)을 포함하고,
- [0122] 상기 하나 이상의 RNA 분자는 상기 표적 서열에 혼성화되고, 상기 표적 서열은 PAM(Protospacer Adjacent Motif)의 3'이고, 상기 하나 이상의 RNA 분자는 RNA-가이드 뉴클레아제(RNA-guided nuclease)와 복합체를 형성하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0123] 일 구체예에서, 상기 조성물은 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA 분자(예를 들면, tracrRNA 분자) 또는 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 RNA 분자를 코딩하는 서열을 포함하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0124] 일 구체예에서, 상기 조성물은 상동성 기반 복구(homology directed repair: HDR)를 위한 공여체(donor) 주형을 추가로 포함한다.
- [0125] 일 구체예에서, 상기 조성물은 세포의 게놈 중 표적 영역을 편집할 수 있다.
- [0126] 일부 구체예에 따라, 비-천연 조성물로서:
- [0127] (a) CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는
- [0128] RNA-결합 부분; 및
- [0129] 부위-지정 효소 활성을 나타내는 활성 부분을 포함하고, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 서열번호 1-17 중 어느 하나와 적어도 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80% 동일성을 갖는 것인 CRISPR 뉴클레아제, 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및
- [0130] (b) 하나 이상의 RNA 분자 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드로서: 상기 하나 이상의 RNA 분자는
- [0131] i) 표적 DNA 서열 내의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, DNA-표적화 RNA 서열; 및
- [0132] ii) 상기 CRISPR 뉴클레아제의 RNA-결합 부분과 상호작용할 수 있는 단백질 결합 RNA 서열을 포함하는 것인 하나 이상의 RNA 분자 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 포함하고,
- [0133] 상기 DNA 표적화 RNA 서열과 상기 CRISPR 뉴클레아제는 자연적으로 함께 발생하지 않는 것인 비-천연 조성물이

제공된다. 각 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다.

- [0134] 일부 구체예에서, DNA-표적화 RNA 서열 및 단백질-결합 RNA 서열을 포함하는 단일 RNA 분자로서, 상기 RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 DNA 표적화 모듈로 작용할 수 있는 것인 단일 RNA 분자가 제공된다. 일부 구체예에서, RNA 분자는 최대 1000개 염기, 900개 염기, 800개 염기, 700개 염기, 600개 염기, 500개 염기, 400개 염기, 300개 염기, 200개 염기, 100개 염기, 50개 염기의 길이를 갖는다. 각 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. 일부 구체예에서, 상기 DNA-표적화 RNA 서열을 포함하는 제1 RNA 분자 및 상기 단백질-결합 RNA 서열을 포함하는 제2 RNA 분자는 염기쌍 형성에 의해 상호작용하거나 대안적으로 함께 융합되어 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 DNA 표적화 모듈로서 작용하는 하나 이상의 RNA 분자를 형성한다.
- [0135] 본 발명은 또한 비-천연 조성물로서:
- [0136] a) 서열번호 1-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 CRISPR 뉴클레아제, 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자; 및
- [0137] b) 하나 이상의 RNA 분자로서:
- [0138] i) 상기 CRISPR 뉴클레아제와 상호작용하고/그에 결합할 수 있는 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열; 및
- [0139] ii) 표적 DNA 서열 내의 서열에 상보적인 서열을 포함하는 DNA-표적화 RNA 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 것인 하나 이상의 RNA 분자, 또는 상기 하나 이상의 RNA 분자를 코딩하는 하나 이상의 DNA 폴리뉴클레오티드를 포함하고,
- [0140] 상기 CRISPR 뉴클레아제는 상기 하나 이상의 RNA 분자와 복합체를 형성하여 상기 표적 DNA 서열과 혼성화할 수 있는 복합체를 형성할 수 있는 것인 비-천연 조성물을 제공한다.
- [0141] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제 및 상기 하나 이상의 RNA 분자는 표적 DNA 서열에 결합하여 표적 DNA 서열의 절단을 일으킬 수 있는 CRISPR 복합체를 형성한다.
- [0142] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제와 상기 하나 이상의 RNA 분자 중 적어도 하나는 자연적으로 함께 발생하지 않는다.
- [0143] 일 구체예에서:
- [0144] a) 상기 CRISPR 뉴클레아제는 RNA 결합 부분 및 부위 지정 효소 활성을 나타내는 활성 부분을 포함하고;
- [0145] b) 상기 DNA-표적화 RNA 뉴클레오티드 서열은 표적 DNA 서열의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 및
- [0146] c) 상기 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열은 상기 CRISPR 뉴클레아제의 RNA 결합 부분과 상호작용하는 서열을 포함한다.
- [0147] 일 구체예에서, 상기 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열 및 상기 DNA 표적화 RNA 뉴클레오티드 서열은 단일-가이드 RNA 분자(sgRNA) 상에 있고, 상기 sgRNA 분자는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 DNA 표적화 모듈로 작용할 수 있다.
- [0148] 일 구체예에서, 상기 뉴클레아제-결합 RNA 뉴클레오티드 서열은 제1 RNA 분자 상에 있고 상기 DNA-표적화 RNA 뉴클레오티드 서열은 제2 RNA 분자 상에 있으며, 상기 제1 RNA 분자 및 상기 제2 RNA 분자는 염기쌍 형성에 의해 상호작용하거나 함께 융합되어 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성하고 DNA 표적화 모듈로 작용하는 RNA 복합체 또는 sgRNA를 형성한다.
- [0149] 일 구체예에서, 상기 sgRNA는 최대 1000개 염기, 900개 염기, 800개 염기, 700개 염기, 600개 염기, 500개 염기, 400개 염기, 300개 염기, 200개 염기, 100개 염기, 50개 염기의 길이를 갖는다.
- [0150] 일 구체예에서, 상기 조성물은 상동성 기반 복구(HDR)를 위한 공여체 주형을 추가로 포함한다.
- [0151] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 비-천연이다.
- [0152] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 조작되고(engineered), 비천연 또는 합성 아미노산을 포함한다.
- [0153] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 조작되고, 핵 국제화 서열(NLS), 세포 투과 펩티드 서열 및/또는 친

화성 태그(affinity tag) 중 하나 이상을 포함한다.

- [0154] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 진핵 세포의 핵에서 검출 가능한 양으로 상기 CRISPR 뉴클레아제를 포함하는 CRISPR 복합체의 축적을 유도하기에 충분한 강도의 하나 이상의 핵 국제화 서열을 포함한다.
- [0155] 본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 게놈의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0156] 일 구체예에서, 상기 세포는 진핵 세포이다.
- [0157] 또 다른 구체예에서, 상기 세포는 원핵 세포이다.
- [0158] 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 RNA 분자는 RNA 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 뉴클레오티드 분자를 포함하는 RNA 서열 (tracrRNA), 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0159] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 아미노 말단 또는 그 근처에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 NLS, 카르복시 말단 또는 그 근처에, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 NLS, 또는 아미노 말단 또는 그 근처에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상 및 카르복시 말단 또는 그 근처에, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 NLS의 조합을 포함한다. 일 구체예에서, 1-4개의 NLS가 상기 CRISPR 뉴클레아제와 융합된다. 일 구체예에서, NLS는 상기 CRISPR 뉴클레아제의 개방-해독 프레임(ORF) 내에 위치한다.
- [0160] 발현되는 단백질의 아미노 말단 또는 그 근처, 카르복시 말단 또는 그 근처, 또는 ORF 내에 NLS를 융합시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예로서, NLS를 CRISPR 뉴클레아제의 아미노 말단에 융합시키기 위해, NLS의 핵산 서열이 NLS-융합 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 핵산에서 CRISPR 뉴클레아제의 개시 코돈 바로 뒤에 배치된다. 반대로, NLS를 CRISPR 뉴클레아제의 카르복시 말단에 융합시키기 위해, NLS의 핵산 서열은 CRISPR 뉴클레아제의 마지막 아미노산을 코딩하는 코돈 뒤와 정지 코돈 앞에 배치된다.
- [0161] CRISPR 뉴클레아제의 ORF를 따라 임의의 위치에 있는 NLS, 세포 투과 펩티드 서열 및/또는 친화성 태그의 임의의 조합이 본 발명에서 고려된다.
- [0162] 본원에 제공된 CRISPR 뉴클레아제의 아미노산 서열 및 핵산 서열은 CRISPR 뉴클레아제의 인접한 아미노산 또는 핵산 서열에 개입(interrupt)하도록 삽입된 NLS 및/또는 태그(TAG)를 포함할 수 있다.
- [0163] 일 구체예에서, 상기 하나 이상의 NLS는 탠덤 반복(tandem repeat)으로 존재한다.
- [0164] 일 구체예에서, 상기 NLS의 가장 가까운 아미노산이 폴리펩티드 사슬을 따라 N- 또는 C-말단으로부터 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 또는 그 이상의 아미노산 내에 존재하는 경우, 상기 하나 이상의 NLS는 N- 또는 C-말단에 근접한 것으로 간주된다.
- [0165] 검토된 바와 같이, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 핵 국제화 서열(NLS), 세포 투과 펩티드 서열 및/또는 친화성 태그 중 하나 이상을 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0166] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 상기 하나 이상의 RNA 분자와 복합체를 형성한 경우, 상기 CRISPR 뉴클레아제의 야생형에 비해 표적 부위에 대해 증가된 특이성을 나타낸다.
- [0167] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제와 하나 이상의 RNA 분자의 복합체는 상기 CRISPR 뉴클레아제의 야생형과 비교하여 적어도 유지된 표적 부위의 온타겟 편집 활성 및 감소된 오프타겟 활성을 나타낸다.
- [0168] 일 구체예에서, 상기 조성물은 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 분자를 추가로 포함한다.
- [0169] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제 또는 상기 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자는 비-천연이거나 조작된 것이다.
- [0170] 본 발명은 또한 본 발명의 CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 또는 조작된 조성물을 제공한다.
- [0171] 본 발명은 또한 대상체의 게놈 내 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 단계를 포함하는, 게놈 돌연변이와 관련된 질병을 앓고 있는 대상체의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.
- [0172] 본 발명은 (i) 서열번호 1-17로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 CRISPR

뉴클레아제, 또는 서열번호 18-51로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는, CRISPR 뉴클레아제를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물 및 (ii) 표적 DNA의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA-표적화 RNA 분자, 또는 DNA-표적화 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 포유동물 세포의 게놈의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 제공한다.

[0173] 일부 구체예에서, 상기 방법은 생체 외에서(ex vivo) 수행된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 생체 내에서(in vivo) 수행된다. 일부 구체예에서, 상기 방법의 일부 단계는 생체 외에서 수행되고, 일부 단계는 생체 내에서 수행된다. 일부 구체예에서, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0174] 일 구체예에서, 상기 방법은 (iii) tracrRNA 서열을 포함하는 RNA 분자 또는 tracrRNA 서열을 포함하는 RNA 분자를 코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함한다.

[0175] 일 구체예에서, 상기 DNA-표적화 RNA 분자는 crRNA 반복 서열을 포함한다.

[0176] 일 구체예에서, 상기 tracrRNA 서열을 포함하는 RNA 분자는 상기 DNA-표적화 RNA 분자에 결합할 수 있다.

[0177] 일 구체예에서, 상기 DNA-표적화 RNA 분자 및 상기 tracrRNA 서열을 포함하는 RNA 분자는 상호작용하여 RNA 복합체를 형성하고, 상기 RNA 복합체는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 활성 복합체를 형성할 수 있다.

[0178] 일 구체예에서, 상기 DNA-표적화 RNA 분자 및 상기 뉴클레아제-결합 RNA 서열을 포함하는 RNA 분자는 상기 CRISPR 뉴클레아제와 활성 복합체를 형성하기에 적합한 단일-가이드 RNA 분자의 형태로 융합된다.

[0179] 일 구체예에서, 가이드 서열 부분(guide sequence portion)은 프로토스페이서 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0180] 일 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 상기 DNA-표적화 RNA 분자와 복합체를 형성하고 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)의 3' 또는 5'인 영역에서 이중 가닥 절단을 생성한다.

[0181] 본원에 기재된 임의의 방법의 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 게놈 내 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 단계를 포함하는, 게놈 돌연변이와 연관된 질병을 앓는 대상체를 치료하기 위한 것이다.

[0182] 일 구체예에서, 상기 방법은 먼저 게놈 돌연변이와 연관된 질병을 앓는 대상체를 선택하고, 상기 대상체로부터 세포를 획득하는 단계를 포함한다.

[0183] 본 발명은 또한 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 획득된 변형된 세포 또는 세포들을 제공한다. 일 구체예에서, 이들 변형된 세포 또는 세포들은 자손(progeny) 세포를 생성할 수 있다. 일 구체예에서, 이들 변형된 세포 또는 세포들은 생식 후에 자손 세포를 생성할 수 있다.

[0184] 본 발명은 또한 이들 변형된 세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한, 상기 세포를 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 상기 조성물을 제조하는 시험관 내(in vitro) 또는 생체외(ex vivo) 방법을 제공한다.

[0185] DNA-표적화 RNA 분자

[0186] RNA 분자의 "가이드 서열 부분(guide sequence portion)"은 특정 표적 DNA 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭하고, 예를 들어 가이드 서열 부분은 가이드 서열 부분의 길이를 따라 표적화되는 DNA 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 가이드 서열 부분은 길이가 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 대략 17 내지 50, 17 내지 49, 17 내지 48, 17 내지 47, 17 내지 46, 17 내지 45, 17 내지 44, 17 내지 43, 17 내지 42, 17 내지 41, 17 내지 40, 17 내지 39, 17 내지 38, 17 내지 37, 17 내지 36, 17 내지 35, 17 내지 34, 17 내지 33, 17 내지 31, 17 내지 30, 17 내지 29, 17 내지 28, 17 내지 27, 17 내지 26, 17 내지 25, 17 내지 24, 17 내지 22, 17 내지 21, 18 내지 25, 18 내지 24, 18 내지 23, 18 내지 22, 18 내지 21, 19 내지 25, 19 내지 24, 19 내지 23, 19 내지 22, 19 내지 21, 19 내지 20, 20 내지 22, 18 내지 20, 20 내지 21, 21 내지 22, 또는 17 내지 20개 뉴클레오티드이다. 가이드 서열 부분의 전체 길이는 가이드 서열 부분의 길이를 따라 표적화된 DNA 서열에 완전히 상보적이다. 가이드 서열 부분은 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 RNA 분자의 일부일 수 있으며, 상기 가이드 서열 부분은 CRISPR 복합체의 DNA 표적화 부분으로 작용한다. 가이드 서열 부분을 갖는 DNA 분자가 CRISPR 분자와 동시에 존재할 때, RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제를 특정 표적 DNA 서열에 표적화할 수 있다. 각

각의 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. RNA 분자는 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다. 따라서, "가이드 서열 부분"을 포함하는 분자는 표적화 분자의 한 유형이다. 본 출원 전체에 걸쳐, 용어 "가이드 분자", "RNA 가이드 분자", "가이드 RNA 분자", 및 "gRNA 분자"는 가이드 서열 부분을 포함하는 분자와 동의어이고, 용어 "스페이서"는 "가이드 서열 부분"과 동의어이다.

[0187] 본 발명의 구체예에서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드를 갖는 가이드 서열 부분을 포함하는 RNA 분자와 함께 사용될 때 가장 큰 절단 활성을 갖는다.

[0188] 단일 가이드 RNA(sgRNA) 분자는 CRISPR 뉴클레아제를 원하는 표적 부위로 유도하는 데 사용될 수 있다. 단일 가이드 RNA는 가이드 서열 부분 및 스캐폴드 부분을 포함한다. 스캐폴드 부분은 CRISPR 뉴클레아제와 상호작용하고, 가이드 서열 부분과 함께 CRISPR 뉴클레아제를 활성화하여 원하는 표적 부위로 표적화한다. 스캐폴드 부분은 예를 들어 감소된 크기를 갖도록 추가로 조작될 수 있다.

[0189] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 본원에 기재된 구체예 중 어느 하나의 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 무세포 시스템 또는 세포의 계놈 내 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 방법을 포함한다.

[0190] 일부 구체예에서, 상기 세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포 또는 식물 세포이다.

[0191] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 대상체의 계놈 내의 표적 부위에서 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 단계를 포함하는, 계놈 돌연변이와 연관된 질환을 앓고 있는 대상체의 치료를 위한 본원에 기재된 조성물 중 어느 하나의 용도를 포함한다.

[0192] 본 발명의 일부 양태에 따르면, 개시된 방법은 본원에 기재된 조성물 중 어느 하나를 돌연변이 장애와 연관된 대립유전자에 표적화하는 단계를 포함하는, 돌연변이 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0193] 일부 구체예에서, 상기 돌연변이 장애는 신생물, 연령-관련 황반 변성, 조현병, 신경학적, 신경변성, 또는 운동 장애, 취약 X 증후군, 세크레타제-관련 장애, 프리온-관련 장애, ALS, 중독, 자폐증, 알츠하이머병, 호중구감소증, 염증-관련 장애, 파킨슨병, 혈액 및 응고 질환 및 장애, 베타 탈라세미아(beta thalassemia), 겸상 적혈구 빈혈, 세포 조절장애 및 종양 질환 및 장애, 염증 및 면역-관련 질환 및 장애, 대사, 간, 고콜레스테롤혈증, 신장 및 단백질 질환 및 장애, 근육 및 골격 질환 및 장애, 피부 질환 및 장애, 신경학적 및 신경 질환 및 장애, 폐 질환 및 장애, 각막 질환 및 장애, 망막 질환 및 장애, 및 안구 질환 및 장애 중 임의의 것으로부터 선택되는 질환 또는 장애와 관련된다.

[0194] 질환 및 치료법

[0195] 본 발명의 특정 구체예는 유전자 편집, 치료 방법, 또는 치료법의 형태로서 질환 또는 장애와 연관된 특정 유전자좌로 뉴클레아제를 표적화한다. 예를 들어, 유전자의 편집 또는 녹아웃(knockout)을 유도하기 위해, 본원에 개시된 신규 뉴클레아제는 맞춤 설계된 가이드 RNA 분자를 사용하여 유전자의 병원성 돌연변이 대립유전자로 특이적으로 표적화될 수 있다. 가이드 RNA 분자는 바람직하게는 먼저 뉴클레아제의 PAM 요건을 고려하여 설계되며, 이는 또한 본원에서 확인된 바와 같이, 유전자 편집이 수행되는 시스템에 따라 달라진다. 예를 들어, 표적 부위로 OMNI-115 뉴클레아제를 표적화하도록 설계된 가이드 RNA 분자는 OMNI-115 PAM 서열, 예를 들어 "NNRYTT" 또는 "NNRTTT"의 근처에 있는 DNA 이중-가닥 영역의 DNA 가닥에 상보적인 스페이서 영역을 포함하도록 설계된다. 가이드 RNA 분자는 또한 바람직하게는 뉴클레아제의 특이적 활성을 증가시키고 오프타겟 효과를 감소시키기 위해 충분하고 바람직하게는 최적의 길이의 스페이서 영역(즉, 표적 대립유전자에 대해 상보성을 갖는 가이드 RNA 분자의 영역)을 포함하도록 설계된다.

[0196] 비-한정적인 예로서, 가이드 RNA 분자는 뉴클레아제에 의해 유발되는 DNA 손상 시 비-상동성 말단 연결(non-homologous end joining; NHEJ) 경로가 유도되고 프레임시프트(frameshift) 돌연변이의 도입에 의해 돌연변이 대립유전자의 침묵을 초래하도록, 돌연변이 대립 유전자의 특정 영역, 예를 들어 개시 코돈 근처에 대해 뉴클레아제를 표적화하도록 설계될 수 있다. 가이드 RNA 분자 설계에 대한 이러한 접근법은 우성 음성 돌연변이의 효과를 변경하고 이에 의해 개체를 치료하는 데 특히 유용하다. 별개의 비-한정적 예로서, 가이드 RNA 분자는, 뉴클레아제에 의해 유발된 DNA 손상 시 상동성 기반 복구(HDR) 경로가 유도되고 돌연변이 대립유전자의 주형 매개 교정을 초래하도록, 돌연변이된 대립유전자의 특정 병원성 돌연변이를 표적화하도록 설계될 수 있다. 가이드 RNA 분자 설계에 대한 이러한 접근법은 돌연변이된 대립유전자의 반수체 기능부전(haploinsufficiency) 효과를

변경하고 이에 의해 개체를 치료하는 데 특히 유용하다.

- [0197] 질환 또는 장애를 치료하기 위한 변경을 위해 표적화될 수 있는 특정 유전자의 비-한정적 예가 본원에서 하기에 제시되어 있다. 돌연변이 장애를 유도하는 특정 질환-연관 유전자 및 돌연변이는 문헌에 기재되어 있다. 이러한 돌연변이는 질환 연관 유전자의 대립유전자에 대해 CRISPR 조성물을 표적화하기 위해 DNA-표적화 RNA 분자를 설계하기 위해 이용될 수 있으며, 상기 CRISPR 조성물은 DNA 손상을 유발하고, DNA 복구 경로를 유도하여 대립유전자를 변경하고 이에 의해 돌연변이 장애를 치료한다.
- [0198] ELANE 유전자의 돌연변이는 호중구감소증과 연관된다. 따라서, 한정 없이, ELANE를 표적화하는 본 발명의 구체예는 호중구감소증을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0199] CXCR4는 인간 면역결핍 바이러스 1형(HIV-1) 감염에 대한 공동 수용체(co-receptor)이다. 따라서, 한정 없이, CXCR4를 표적화하는 본 발명의 구체예는 HIV-1를 앓고 있는 대상체를 치료하거나 대상체에서 HIV-1 감염에 대한 내성을 부여하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0200] PD-1(programmed cell death protein 1) 파괴는 종양 세포의 CAR-T 세포 매개 사멸을 증가시키고 PD-1은 다른 암 치료법에서 표적될 수 있다. 따라서, 한정 없이, PD-1을 표적화하는 본 발명의 구체예는 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 치료는 PD-1 결핍이 되도록 본 발명에 따라 변형된 T 세포를 이용한 CAR-T 세포 요법이다.
- [0201] 추가적으로, BCL11A는 헤모글로빈 생산의 억제에서 역할을 하는 유전자이다. 글로빈 생산은 BCL11A를 억제함으로써 탈라세미아 또는 겸상 적혈구 빈혈과 같은 질환을 치료하기 위해 증가될 수 있다. 예를 들어, PCT 국제 공개 WO 2017/077394A2; 미국출원 공개 US2011/0182867A1; Humbert et al. Sci. Transl. Med. (2019); 및 Canver et al. Nature (2015)를 참조한다. 따라서, 한정 없이, BCL11A의 인핸서를 표적화하는 본 발명의 구체예는 베타 탈라세미아 또는 겸상 적혈구 빈혈을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다.
- [0202] 본 발명의 구체예는 또한, 하기 표 A 또는 표 B에 열거된 질환 또는 장애를 연구, 변경, 또는 치료하기 위해, 임의의 질환-연관 유전자를 표적화하기 위해 이용될 수 있다. 실제로, 유전자좌와 연관된 임의의 질환은 본원에 개시된 뉴클레아제를 사용하여 적절한 질환-연관 유전자, 예를 들어 미국출원 공개 2018/0282762A1 및 유럽 특허 EP3079726B1에 열거된 것을 표적화함으로써 연구, 변경, 또는 치료될 수 있다.

표 A-질병, 장애 및 그들의 연관된 유전자

질병/장애	유전자
종양(Neoplasia)	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR alpha; PPAR gamma; WT1 (윌름스 종양); FGF Receptor Family members (5 members: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (망막모세포종); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (Androgen Receptor); TSG101; IGF; IGF Receptor; Igfl (4개의 변이체); gf2 (3개의 변이체); Igf 1 Receptor; Igf 2 Receptor; Bax; Bcl2; 카스파아제 패밀리 (9 members: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
노인성 황반변성	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (ceruloplasmin); Timp3; cathepsinD; Vldlr; Ccr2
조현병(Schizophrenia)	Neuregulin1 (Nrg1); Erb4 (뉴레굴린 수용체); Complexin1 (Cplx1); Tph1 Tryptophan hydroxylase; Tph2 Tryptophan hydroxylase 2; Neurexin 1; GSK3; GSK3a; GSK3b
신경계, 신경퇴행성, 및 운동 장애	5-HTT (S1c6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
삼염기 반복 질환(Trinucleotide Repeat Disorders)	HTT (헌팅틴병); SBMA/SMAX1/AR (케네디병); FXN/X25 (프리드리히 운동실조증); ATX3 (마카도 조셉병(MJD)); ATXN1 및 ATXN2 (척수소뇌운동실조증); DMPK (근긴장성 이영양증); Atrophin-1 및 Atn1 (DRPLA병); CBP (Creb-BP - 완전불안증(global instability)); VLDLR (알츠하이머병); Atxn7; Atxn10
취약 X 증후군(Fragile X Syndrome)	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
세크레타제 관련 질환(Secretase Related Disorders)	APH-1 (alpha and beta); Presenilin (Psen1); nicastrin (Ncstn); PEN-2
기타	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
프리온 관련 질환(Prion related disorders)	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
중독	Prkce (알코올); Drd2; Drd4; ABAT (알코올); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (알코올)
자폐증	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; Neurexin 1; Fragile X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
알츠하이머병	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; Clusterin; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, Aquaporin 1); Uchl1; Uchl3; APP
염증	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/CARD15 for IBD; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
파킨슨병	x-Synuclein; DJ-1; LRRK2; Parkin; PINK1

[0203]

표 B. 질병, 장애 및 그들의 연관된 유전자

질병 카테고리	질병 및 연관된 유전자
혈액 및 혈액응고 질병 및 장애 (Blood and coagulation diseases and disorders)	빈혈 (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 노출 림프구 증후군 (Bare lymphocyte syndrome) (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), Bleeding disorders (TBXA2R, P2RX1, P2X1); Factor H and factor H-like 1 (HF1, CFH, HUS); Factor V and factor VIII (MCFD2); Factor VII 결핍 (F7); Factor X 결핍 (F10); Factor XI 결핍 (F11); Factor XII 결핍 (F12, HAF); Factor XIII 결핍 (F13A1, F13A); Factor XIII 결핍 (F13B); 판코니 빈혈 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FADC, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 혈구탐식성 림프조직구 증식 장애 (Hemophagocytic lymphohistiocytosis disorders) (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); 혈우병 A (F8, F8C, HEMA); 혈우병 B (F9, HEMB), 출혈 장애 (PI, ATT, F5); 백혈구 결핍 및 질환 (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 겸상 적혈구성 빈혈 (HBB); 탈라세미아 (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1)
세포 조절장애 및 종양 질병 및 질환 (Cell dysregulation and oncology diseases and disorders)	B-세포 비호지킨 림프종 (BCL7A, BCL7); 백혈병 (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMP5, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN)
염증 및 면역 관련 질병 및 질환 (Inflammation and immune related diseases and Disorders)	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 자가면역 림프증식 증후군 (ALPS) (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 복합 면역결핍, (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV 감수성 (susceptibility) 또는 감염 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCKR5 (CCR5)); 면역결핍 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACT); Inflammation (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a,

[0204]

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

[0205]

질병 카테고리	질병 및 연관된 유전자
신경계 및 신경 질환 및 질환 (Neurological and Neuronal diseases and disorders)	ALS (SOD1, ALS2, STX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); 알츠하이머병 (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 자폐증 (Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, Neurexin 1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); Fragile X 증후군 (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); 헌팅턴병 및 헌팅턴병 유사 질환 (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); 파킨슨병 (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); 레트 증후군 (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-Synuclein, DJ-1); 조현병 (Neuregulin1 (Nrg1), Erb4 (receptor for Neuregulin), Complexin1 (Cplx1), Tph1 Tryptophan hydroxylase, Tph2, Tryptophan hydroxylase 2, Neurexin 1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); 세크레타제 관련 질환 (APH-1 (alpha and beta), Presenilin (Psen1), nicastrin, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2); 삼염기 반복 질환 (HTT (헌팅턴병), SBMA/SMAX1/AR (케네디병), FXN/X25 (프레드리히 운동실조증), ATX3 (마카도-조셉병), ATXN1 and ATXN2 (척수소뇌 운동실조증), DMPK (근긴장성 이영양증), Atrophin-1 and Atn1 (DRPLA병), CBP (Creb-BP - 완전불안증), VLDLR (알츠하이머병), Atxn7, Atxn10)
안구 질환 및 질환 (Ocular diseases and disorders)	노인성 황반변성 (Abcr, Ccl2, Cc2, cp (ceruloplasmin), Timp3, cathepsinD, Vldlr, Ccr2); 백내장 (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 각막 혼탁 및 이영양증 (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 선천성 편평 각막 (KERA, CNA2); 녹내장 (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); 레버 선천성 흑암시 (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 황반 이영양증 (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2)

[0206]

[0207]

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

[0208]

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

[0209]

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

[0210]

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

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

[0211] 본원에서 수치 범위가 기재되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 상한과 하한을 포함하여 이들 사이의 각각의 정수를 고려하는 것으로 이해된다.

[0212] 본 출원의 설명 및 청구범위에서, 동사 "포함하다(comprise)", "함유하다(include)" 및 "갖다" 각각 및 이들의 활용어는 동사의 목적어 또는 목적어들이 반드시 동사의 주어 또는 주어들의 구성요소, 요소 또는 부분의 완전한 열거가 아니라는 것을 나타내는 데 사용된다. 본원에서 사용되는 다른 용어는 당업계에 잘 알려진 의미로 정의되는 것으로 의도된다.

[0213] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 호환적으로 사용된다. 이들 용어는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중 어느 하나, 또는 그의 유사체인 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 알려지거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 비-한정적인 예는 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관(linkage) 분석으로부터 정의된 유전자좌, 엑손, 인트론, mRNA(messenger RNA), tRNA(transfer RNA), rRNA(ribosomal RNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short-hairpin RNA), miRNA(micro-RNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머이다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예를 들면, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 비-뉴클레오티드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예를 들면, 표지화 구성요소와의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0214] 용어 "뉴클레오티드 유사체(nucleotide analog)" 또는 "변형된 뉴클레오티드"는 뉴클레오시드의 질소 함유 염기(예를 들어, 시토신(C), 티민(T) 또는 우라실(U), 아데닌(A) 또는 구아닌(G))에 또는 그 위에, 뉴클레오시드의 당 모이어티(예를 들어, 리보오스, 데옥시리보오스, 변형된 리보오스, 변형된 데옥시리보오스, 6원 당 유사체, 또는 개방-사슬 당 유사체)에 또는 그 위에, 또는 인산염에 하나 이상의 화학적 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 뉴클레오티드를 의미한다. 본원에 기재된 RNA 서열 각각은 하나 이상의 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다.

[0215] 본원에서 사용되는 바와 같이, 하기 뉴클레오티드 식별자가 언급된 뉴클레오티드 염기(들)를 나타내기 위해 사용된다:

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

[0216]

- [0217] 본원에서 사용된, 용어 "표적화 서열(targeting sequence)" 또는 "표적화 분자"는 특정 표적 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 분자를 의미하고, 예를 들어, 표적화 서열은 표적화 서열의 길이에 따라 표적화되는 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 표적화 서열 또는 표적화 분자는 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 표적화 RNA 분자의 일부일 수 있으며, 상기 표적화 서열은 CRISPR 복합체의 표적화 부분(targeting portion)으로 작용한다. 표적화 서열을 갖는 분자가 CRISPR 분자와 동시에 존재하는 경우, RNA 분자는 CRISPR 뉴클레아제를 특정 표적 서열로 표적화할 수 있다. 각각의 가능성은 별개의 구체예를 나타낸다. 표적화 RNA 분자는 임의의 원하는 서열을 표적화하도록 맞춤 설계될 수 있다.
- [0218] 본원에 사용된, 용어 "표적(target)"은 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 표적화 서열 또는 표적화 분자의 우선적인 혼성화를 의미한다. 용어 "표적"은 표적화된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산의 우선적인 표적화가 존재하지만, 온타겟 혼성화 외에, 의도하지 않은 오프타겟 혼성화가 또한 일어날 수 있도록, 가변 혼성화 효율(variable hybridization efficiency)을 포괄하는 것으로 이해된다. RNA 분자가 서열을 표적화하는 경우, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제 분자의 복합체는 뉴클레아제 활성을 위해 상기 서열을 표적화하는 것으로 이해된다.
- [0219] 복수의 세포에 존재하는 DNA 서열을 표적화하는 상황에서, 표적화는 하나 이상의 세포에서 RNA 분자의 가이드 서열 부분과 상기 서열의 혼성화를 포함하고, 또한 복수의 세포에서 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 RNA 분자와 표적 서열의 혼성화를 포함하는 것으로 이해된다. 따라서, RNA 분자가 복수의 세포에서 서열을 표적화하는 경우, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체는 하나 이상의 세포에서 표적 서열과 혼성화하고, 또한 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 표적 서열과 혼성화할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체는 하나 이상의 세포에서 표적 서열과의 혼성화와 관련하여 이중 가닥 절단을 도입하고, 또한 모든 세포보다 적은 수의 세포에서 표적 서열과의 혼성화와 관련하여 이중 가닥 절단을 도입할 수 있는 것으로 이해된다. 본원에서 사용된, 용어 "변형된 세포(modified cell)"는 이중 가닥 절단이 표적 서열과의 혼성화, 즉 온타겟 혼성화의 결과로서 RNA 분자와 CRISPR 뉴클레아제의 복합체에 의해 생성된(affected) 세포를 의미한다.
- [0220] 본원에서 사용된, 용어 "야생형(wild type)"은 당업자에 의해 이해되는 당업계의 용어이며 돌연변이체 또는 변이체 형태와 구별되는 자연에서 발생하는 유기체, 스트레인(strain), 유전자 또는 특징의 전형적인 형태를 의미한다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 또는 뉴클레오티드의 서열이 야생형 서열을 지칭하는 경우, 변이체는, 예를 들어 치환, 결실, 삽입을 포함하는, 해당 서열의 변이체를 지칭한다. 본 발명의 구체예에서, 조작된 CRISPR 뉴클레아제는 표 1에 표시된 뉴클레아제 중 어느 하나의 CRISPR 뉴클레아제와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형(예를 들어, 치환, 결실, 및/또는 삽입)을 포함하는 변이체 CRISPR 뉴클레아제이다.
- [0221] 용어 "비-천연(non-naturally occurring)" 또는 "조작된(engineered)"은 호환적으로 사용되며 인간 조작을 나타낸다. 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 지칭할 때 상기 용어는 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 자연에서 자연적으로 회합되고 자연에서 발견되는 바와 같은 적어도 하나의 다른 구성요소가 적어도 실질적으로 없다는 것을 의미할 수 있다.
- [0222] 본원에서 사용된, 용어 "아미노산"은 글리신, 및 D 또는 L형 광학 이성질체 모두를 포함한 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산, 및 아미노산 유사체 및 펩티도미메틱(peptidomimetic)을 포함한다.
- [0223] 본원에서 사용된, "게놈 DNA"는 목적 세포 또는 세포들에 존재하는 선형 및/또는 염색체 DNA 및/또는 플라스미드 또는 기타 염색체의 DNA 서열을 지칭한다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 진핵 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 목적 세포는 원핵 세포이다. 일부 구체예에서, 방법은 게놈 DNA 서열의 미리-결정된 표적 부위에서 이중-가닥 절단(DSB)을 생성하여, 게놈의 표적 부위(들)에서 DNA 서열의 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 초래한다.
- [0224] "진핵" 세포는 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0225] 본원에서 사용된, 용어 "뉴클레아제"는 핵산의 뉴클레오티드 서브유닛 사이에서 포스포디에스테르 결합을 절단할 수 있는 효소를 지칭한다. 뉴클레아제는 천연 공급원으로부터 단리되거나 유래될 수 있다. 천연 공급원은 임의의 살아있는 유기체일 수 있다. 대안적으로, 뉴클레아제는 포스포디에스테르 결합 절단 활성을 유지하는 변형된 또는 합성 단백질일 수 있다.

- [0226] 본원에서 사용된, 용어 "PAM"은 표적화된 DNA 서열에 근접하게 위치하고 CRISPR 뉴클레아제에 의해 인식되는 표적 DNA의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. PAM 서열은 뉴클레아제 정체(identity)에 따라 다를 수 있다.
- [0227] 본원에서 사용된, 용어 "돌연변이 장애(mutation disorder)" 또는 "돌연변이 질환"은 돌연변이에 의해 유발된 유전자의 기능장애와 관련된 임의의 장애 또는 질환을 지칭한다. 돌연변이 장애로서 나타나는 기능장애 유전자는 그의 대립유전자의 적어도 하나에 돌연변이를 포함하고 "질환-연관 유전자(disease-associated gene)"로 지칭된다. 돌연변이는 질환-연관 유전자의 임의의 부분에, 예를 들어 조절, 코딩, 또는 비-코딩 부분에 있을 수 있다. 돌연변이는 돌연변이의 임의의 부류, 예컨대, 치환, 삽입, 또는 결실일 수 있다. 질환-연관 유전자의 돌연변이는 임의의 유형의 돌연변이, 예컨대, 열성, 우성 음성(dominant negative), 기능 획득(gain-of-function), 기능 손실(loss-of-function), 또는 유전자 산물의 반수체 기능부전(haploinsufficiency)을 야기하는 돌연변이의 메커니즘에 따라 장애 또는 질환으로 나타날 수 있다.
- [0228] 숙련된 기술자는 본 발명의 구체예가, PAM(protospacer adjacent motif) 옆에 목적 표적 게놈 DNA 서열과 회합하도록, 뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR 뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 RNA 분자를 개시한다는 것을 이해할 것이다. 그후, 상기 뉴클레아제는 표적 DNA의 절단을 매개하여 프로토스페이스 내에서 이중-가닥 절단을 생성한다.
- [0229] 본 발명의 구체예에서, CRISPR 뉴클레아제 및 표적화 분자는 표적 DNA 서열에 결합하여 표적 DNA 서열의 절단을 초래하는 CRISPR 복합체를 형성한다. CRISPR 뉴클레아제는 추가적인 별개의 tracrRNA 분자 없이 CRISPR 뉴클레아제 및 RNA 분자를 포함하는 CRISPR 복합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, CRISPR 뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제, RNA 분자, 및 tracrRNA 분자 간에 CRISPR 복합체를 형성할 수 있다.
- [0230] 용어 "단백질 결합 서열" 또는 "뉴클레아제 결합 서열"은 CRISPR 뉴클레아제와 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 서열을 지칭한다. 숙련된 기술자는 CRISPR 뉴클레아제와 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 tracrRNA가 단백질 또는 뉴클레아제 결합 서열을 포함한다는 것을 이해할 것이다.
- [0231] CRISPR 뉴클레아제의 "RNA 결합 부분"은 RNA 분자와 결합하여 CRISPR 복합체를 형성할 수 있는 CRISPR 뉴클레아제의 부분, 예를 들어 tracrRNA 분자의 뉴클레아제 결합 서열을 지칭한다. CRISPR 뉴클레아제의 "활성 부분(activity portion)" 또는 "활성이 있는 부분(active portion)"은, 예를 들어 DNA-표적화 RNA 분자와 복합체를 형성할 때, DNA 분자에서 이중 가닥 절단을 일으키는 CRISPR 뉴클레아제의 부분을 지칭한다.
- [0232] RNA 분자는 염기쌍 형성을 통해 tracrRNA에 혼성화하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키기 위해 tracrRNA 분자에 충분히 상보적인 서열을 포함할 수 있다. (미국 특허 제8,906,616호 참조). 본 발명의 구체예에서, 상기 RNA 분자는 tracr 메이트(mate) 서열을 갖는 부분을 더 포함할 수 있다.
- [0233] 본 발명의 구체예에서, 상기 표적화 분자는 tracrRNA 분자의 서열을 더 포함할 수 있다. 이러한 구체예는 함께 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 형성하는, RNA 분자의 가이드 서열 부분(gRNA 또는 crRNA) 및 트랜스활성화(trans-activating) crRNA (tracrRNA)를 포함하는 RNA의 합성 융합체로서 설계될 수 있다. (Jinek et al., Science (2012) 참조). 본 발명의 구체예는 또한 별개의 tracrRNA 분자 및 가이드 서열 부분을 포함하는 별개의 RNA 분자를 이용하는 활성 CRISPR 복합체를 형성하는 것을 포함한다. 이러한 구체예에서, tracrRNA 분자는 염기쌍 형성을 통해 RNA 분자와 혼성화할 수 있고 본원에 기재된 본 발명의 특정 적용에서 유리할 수 있다.
- [0234] 본 발명의 구체예에서, RNA 분자는 RNA 분자의 구조를 추가로 한정할 수 있는 "넥서스(nexus)" 영역 및/또는 "헤어핀" 영역을 포함할 수 있다. (Briner et al., Molecular Cell (2014) 참조).
- [0235] 본원에서 사용된, 용어 "직접 반복 서열(direct repeat sequence)"은 특정한 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 2개 이상의 반복부를 지칭한다.
- [0236] 본원에서 사용된, CRISPR 뉴클레아제와 "상호작용"하거나 CRISPR 뉴클레아제와 "결합"할 수 있는 RNA 서열 또는 분자는 CRISPR 뉴클레아제와 CRISPR 복합체를 형성하는 능력을 갖는 RNA 서열 또는 분자를 지칭한다.
- [0237] 본원에서 사용된, 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 2개의 서열 또는 분자 사이의 관계(즉, 융합, 혼성화)를 지칭한다. 본 발명의 구체예에서, RNA 분자가 프로모터에 작동 가능하게 연결될 때, RNA 분자 및 프로모터는 둘 다 의도된 방식으로 기능하도록 허용된다.
- [0238] 본원에서 사용된, 용어 "이종 프로모터(heterologous)"는 촉진되는 분자 또는 경로와 함께 자연적으로 발생하지 않는 프로모터를 지칭한다.

- [0239] 본원에서 사용되는 바와 같이, 분자 또는 서열 간에 염기 또는 아미노산의 X%가 동일하고 동일한 상대적 위치에 있는 경우, 서열 또는 분자는 또 다른 서열 또는 분자에 대해 X% "서열 동일성"을 갖는다. 예를 들어, 제2 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 제1 뉴클레오타이드 서열은 동일한 상대적 위치에서 나머지 서열(제2 뉴클레오타이드 서열)과 동일한, 적어도 95%의 염기를 가질 것이다.
- [0240] 핵 국재화 서열 (Nuclear Localization Sequence)
- [0241] 용어 "핵 국재화 서열" 및 "NLS"는 핵 외피 장벽을 가로질러 세포의 세포질로부터 그와 결합된 단백질의 수송을 지시하는 아미노산 서열/펩티드를 나타내기 위해 호환적으로 사용된다. 용어 "NLS"는 특정 펩티드의 핵 국재화 서열뿐만 아니라 핵 외피 장벽을 통과하는 세포질 폴리펩티드의 이동을 지시할 수 있는 그의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. NLS는 폴리펩티드의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 둘 다에 부착될 때 폴리펩티드의 핵 이동(nuclear translocation)을 지시할 수 있다. 추가적으로, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 따라 무작위로 위치한 아미노산 측쇄에 그의 N-말단 또는 C-말단에 의해 커플링된 NLS를 갖는 폴리펩티드는 이동될 것이다. 일반적으로, NLS는 단백질 표면에 노출된 양으로 하전된 라이신 또는 아르기닌의 하나 이상의 짧은 서열로 구성되나, 기타 유형의 NLS가 알려져 있다. NLS의 비-한정적 예는 SV40 바이러스 거대 T-항원(SV40 virus large T-antigen), 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin), c-myc, hRNPA1 M9 NLS, 임포틴-알파(importin-alpha) 유래 IBB, 근종 T 단백질, 인간 p53, 마우스 c-abl IV, 인플루엔자 바이러스 NS1, 간염 바이러스 델타 항원, 마우스 Mx1 단백질, 인간 폴리(ADP-리보스) 폴리머라아제, 및 스테로이드 호르몬 수용체 (인간) 글루코코르티코이드로부터 유래된 NLS 서열을 포함한다.
- [0242] 전달
- [0243] 본원에 기재된 CRISPR 뉴클레아제 또는 CRISPR 조성물은 단백질, DNA 분자, RNA 분자, 리보핵단백질(ribonucleoprotein: RNP), 핵산 벡터, 또는 이들의 임의의 조합으로서 전달될 수 있다. 일부 구체예에서, RNA 분자는 화학적 변형을 포함한다. 적합한 화학적 변형의 비-한정적 예는 2'-O-메틸(M), 2'-O-메틸, 3'-포스포티오에이트(MS) 또는 2'-O-메틸, 3'-티오PACE(MSP), 슈도우리딘, 및 1-메틸 슈도-우리딘을 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구체예를 나타낸다.
- [0244] 본원에 기재된 CRISPR 뉴클레아제 및/또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 선택적으로 추가적인 단백질(예를 들어, ZFP, TALEN, 전사 인자, 제한 효소) 및/또는 가이드 RNA와 같은 뉴클레오타이드 분자는 임의의 적합한 수단에 의해 표적 세포로 전달될 수 있다. 표적 세포는 임의의 환경에서, 예를 들어 단리되거나 단리되지 않은, 배양물에서 유지되는, 인 비트로, 엑스 비보, 인 비보, 또는 인 플랜타(in planta)인, 임의의 유형의 세포, 예를 들어 진핵 또는 원핵 세포일 수 있다.
- [0245] 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA 및 가이드의 RNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, 가이드의 RNA 및 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, 가이드 RNA, 및 예를 들어, 상동성 기반 복구(HDR)를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA 및 공여체 주형을 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 전달될 조성물은 CRISPR 뉴클레아제, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA, 및 예를 들어, 상동성 기반 복구(HDR)를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다.
- [0246] 임의의 적합한 바이러스 벡터 시스템이 RNA 조성물을 전달하는 데 사용될 수 있다. 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법이 세포(예를 들어, 포유동물 세포, 식물 세포 등) 및 표적 조직에서 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제를 도입하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 또한 CRISPR 뉴클레아제 단백질을 코딩하는 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제 단백질을 시험관 내에서 세포에 투여하는 데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 핵산 및/또는 CRISPR 뉴클레아제는 생체내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo) 유전자 치료법 용도를 위해 투여된다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 네이키드(naked) 핵산, 및 리포좀 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 유전자 치료법 절차에 대한 검토를 위해, Anderson, Science (1992); Nabel and Felgner, TIBTECH (1993); Mitani and Caskey, TIBTECH (1993); Dillon, TIBTECH (1993); Miller, Nature (1992); Van Brunt, Biotechnology (1988); Vigne et al., Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer and Perricaudet, British Medical Bulletin (1995); Haddada et al., Current Topics in

Microbiology and Immunology (1995); 및 Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)을 참조한다.

- [0247] 핵산 및/또는 단백질의 비-바이러스 전달의 방법은 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 바이올리스틱(biolistic), 입자 총 가속화, 비로솜(virosome), 리포솜, 면역리포솜, 다가양이온 또는 지질:핵산 접합체, 인공비리온, 및 핵산의 작용체-증강 흡수(agent-enhanced uptake)를 포함하거나 박테리아 또는 바이러스(예를 들어, 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 리조비움 종 NGR234(*Rhizobium* sp. NGR234), 시노리조보이움멜릴로티(*Sinorhizobium meliloti*), 메조리조비움 로티(*Mesorhizobium loti*), 담배 모자이크 바이러스, 감자 바이러스 X, 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 및 카사바 베인 모자이크 바이러스(cassava vein mosaic virus)에 의해 식물 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, Chung et al. Trends Plant Sci. (2006)을 참조한다. 예를 들어, Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 사용한 초음파천공(sonoporation)이 또한 핵산의 전달에 사용될 수 있다. 단백질 및/또는 핵산의 양이온성-지질 매개 전달이 또한 생체내, 또는 시험관내 전달 방법으로서 고려된다. Zuris et al., Nat. Biotechnol. (2015), Coelho et al., N. Engl. J. Med. (2013); Judge et al., Mol. Ther. (2006); 및 Basha et al., Mol. Ther. (2011)을 참조한다.
- [0248] 비-바이러스 벡터, 예컨대, 트랜스포존-기반 시스템(transposon-based system), 예를 들어 재조합 Sleeping Beauty 트랜스포존 시스템 또는 재조합 PiggyBac 트랜스포존 시스템이 또한 표적 세포로 전달될 수 있고, 표적 세포에서 조성물의 분자의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 조성물의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 전위(transposition)에 이용될 수 있다.
- [0249] 추가적인 예시적 핵산 전달 시스템은 Amaxa® Biosystems(독일 쾰른 소재), Maxcyte, Inc.(미국 메릴랜드주 록빌 소재), BTX Molecular Delivery Systems(미국 매사추세츠주 홀리스트인 소재) 및 Copernicus Therapeutics Inc.,(예를 들어, 미국 특허 제6,008,336호 참조)에 의해 제공되는 것을 포함한다. 리포펙션은, 예를 들어 미국 특허 제5,049,386호, 미국 특허 제4,946,787호; 및 미국 특허 제4,897,355호에 기재되어 있으며, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예를 들어, Transfectam.TM., Lipofectin.TM. 및 Lipofectamine.TM. RNAiMAX). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 PCT 국제 공개 WO/1991/017424 및 WO/1991/016024에 개시된 것들을 포함한다. 전달은 세포(생체의 투여) 또는 표적 조직(생체내 투여)에 대한 것일 수 있다.
- [0250] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하는, 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Crystal, Science (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. (1994); Gao and Huang, Gene Therapy (1995); Ahmad and Allen, Cancer Res., (1992); 미국 특허 제4,186,183호; 제4,217,344호; 제4,235,871호; 제4,261,975호; 제4,485,054호; 제4,501,728호; 제4,774,085호; 제4,837,028호; 및 제4,946,787호 참조).
- [0251] 추가적인 전달 방법은 전달될 핵산을 EnGeneIC 전달 비히클(EDV) 내로 패키징하는 것의 사용을 포함한다. 이들 EDV는 이중특이적 항체를 사용하여 표적 조직으로 특이적으로 전달되며, 상기 항체의 하나의 암(arm)은 표적 조직에 대한 특이성을 갖고, 나머지 암은 EDV에 대한 특이성을 갖는다. 항체가 EDV를 표적 세포 표면으로 가져간 다음, EDV가 엔도시토시스(endocytosis)에 의해 세포 내로 들어간다. 일단 세포 안에 들어가면, 내용물이 방출된다(MacDiamid et al., Nature Biotechnology (2009) 참조).
- [0252] 핵산 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 신체의 특정 세포에 바이러스를 표적화하고, 바이러스 페이로드(viral payload)를 핵으로 이동시키는 고도로 진화된 과정을 활용한다. 바이러스 벡터는 환자에게 직접 투여되거나(생체 내), 인 비트로에서 세포를 치료하는 데 사용될 수 있으며, 변형된 세포가 환자에게 투여된다(생체 외). 핵산의 전달을 위한 종래 바이러스 기반 시스템은 유전자 전달을 위한 재조합 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아 바이러스 및 단순 포진 바이러스(herpess simplex virus) 벡터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그러나, 본원에 기재된 RNA 조성물의 전달을 위해서는 RNA 바이러스가 바람직하다. 추가적으로, 높은 형질도입(transduction) 효율이 다수의 다양한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다. 본 발명의 핵산은 비-통합 렌티바이러스(non-integrating lentivirus)에 의해 전달될 수 있다. 선택적으로, 렌티바이러스를 이용한 RNA 전달이 이용된다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, 가이드의 RNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, 가이드의 RNA 및 공여체 주형을 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, 가이드 RNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, 가이드 RNA 및/또는, 예를 들어 상동성 기반 복구를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제의 mRNA, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA, 및 공여체 주형을 포함한다. 선택

적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, DNA-표적화 RNA 및 tracrRNA를 포함한다. 선택적으로, 렌티바이러스는 뉴클레아제 단백질, DNA-표적화 RNA, 및 tracrRNA, 및, 예를 들어 상동성 기반 복구를 통한, 유전자 편집을 위한 공여체 주형을 포함한다.

[0253] 전술된 바와 같이, 본원에 기재된 조성물은 비-통합 렌티바이러스 입자 방법, 예를 들어 LentiFlash® 시스템을 사용하여 표적 세포로 전달될 수 있다. 이러한 방법은 표적 세포로의 RNA의 전달이 표적 세포 내부에서 본원에 기재된 조성물의 조립을 초래하도록, 표적 세포 내로 mRNA 또는 다른 유형의 RNA를 전달하기 위해 이용될 수 있다. 또한, PCT 국제 공개 W02013/014537, W02014/016690, W02016185125, W02017194902, 및 W02017194903을 참조한다.

[0254] 레트로바이러스의 향성(tropism)은 외래 외피 단백질을 포함시킴으로써 변경되어, 표적 세포의 잠재적 표적 집단을 확장시킬 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 형질도입시키거나 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 벡터이고 전형적으로 높은 바이러스 역가를 가져온다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 다르다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6 내지 10 kb의 외래 서열에 대한 패키징 능력을 갖는 시스-작용 장형 말단 반복부(cis-acting long terminal repeats)로 구성된다. 최소 시스-작용 LTR이 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 그 후, 표적 세포 내로 치료용 유전자를 통합시켜 영구적인 이식유전자(transgene) 발현을 제공하기 위해 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 MuLV(murine leukemia virus), GaLV(gibbon ape leukemia virus), SIV(Simian Immunodeficiency virus), HIV(Human Immunodeficiency virus), 및 이들의 조합에 기반한 것들을 포함한다(예를 들어, Buchscher Panganiban, J. Virol. (1992); Johann et al., J. Virol. (1992); Sommerfelt et al., Virol. (1990); Wilson et al., J. Virol. (1989); Miller et al., J. Virol. (1991); PCT 국제 공개 WO/1994/026877A1 참조).

[0255] 적어도 6개의 바이러스 벡터 접근법이 현재 임상 시험에서 유전자 전달을 위해 이용 가능하며, 이는 형질도입체(transducing agent)를 생성하기 위해 헬퍼 세포주 내로 삽입된 유전자에 의한 결함 벡터(defective vector)의 보완을 포함하는 접근법을 이용한다.

[0256] pLASN 및 MFG-S는 임상 시험에서 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다(Dunbar et al., Blood (1995); Kohn et al., Nat. Med. (1995); Malech et al., PNAS (1997)). PA317/pLASN은 유전자 치료법 시험에서 사용된 최초의 치료용 벡터이었다(Blaese et al., Science (1995)). 50% 이상의 형질도입 효율이 MFG-S 패키징된 벡터에서 관찰되었다(Ellem et al., Immunol Immunother. (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. (1997)).

[0257] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는 데 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스, AAV를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 psi.2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료법에서 사용되는 바이러스 벡터는 일반적으로 바이러스 입자 내로 핵산 벡터를 패키징하는 생산체 세포주(producer cell line)에 의해 생성된다. 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 내로의 후속 통합(적용 가능한 경우)을 위해 요구되는 최소 바이러스 서열을 포함하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 결여된(missing) 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료법에서 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 게놈 내로의 통합을 위해 요구되는 AAV 게놈으로부터의 ITR(inverted terminal repeat) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 세포주에서 패키징되며, 이는 나머지 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 코딩하나, ITR 서열은 없는 헬퍼 플라스미드를 포함한다. 상기 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 유전자의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부재로 인해 유의한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다. 추가적으로, AAV는 바큘로바이러스(baculovirus) 시스템을 사용하여 임상 규모로 생산될 수 있다(미국 특허 번호 제7,479,554호 참조).

[0258] 여러 유전자 치료법 적용에서, 유전자 치료법 벡터는 특정 조직 유형으로 고도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 리간드를 바이러스의 외부 표면 상의 바이러스 코트(viral coat) 단백질과의 융합 단백질로서 발현시킴으로써 주어진 세포 유형에 대해 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 목적 세포 유형의 세포 상에 존재하는 것으로 알려진 수용체에 대해 친화도를 갖도록 선택된다. 예를 들어, Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995)은 MMLV(Molony murine leukemia virus)가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린(heregulin)을 발현하도록 변형될 수 있고, 재조합 바이러스가 인간 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시킨다는 것을 보고하였다. 이 원리는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 확장될 수 있고, 여기서 표적 세포는 수용체를 발현하고 바이러스는 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단

백질을 발현한다. 예를 들어, 사상 파아지(filamentous phage)는 실질적으로 임의의 선택된 세포성 수용체에 대해 특이적 결합 친화도를 갖는 항체 단편(예를 들어, FAB 또는 Fv)을 표시하도록 조작될 수 있다. 전술된 내용은 주로 바이러스 벡터에 적용되지만, 동일한 원리가 비-바이러스 벡터에 적용될 수 있다. 이러한 벡터는 특정 표적 세포에 의한 흡수에 유리한 특정 흡수 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.

[0259] 유전자 치료법 벡터는 하기 기재된 바와 같이, 전형적으로 전신 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 진피하, 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의해, 개별 환자에 대한 투여에 의해 생체 내 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 개별 환자로부터 외식된 세포(예를 들어, 림프구, 골수 흡입물, 조직 생검)와 같은 생체의 세포 또는 범용 공여체 조혈 줄기 세포(universal donor hematopoietic stem cell)로 전달되고, 일반적으로 벡터를 내포하는 세포에 대한 선택 후에, 환자 내로의 세포의 재이식이 이어질 수 있다. 일부 구체예에서, 생체내 및 생체의 mRNA의 전달, 및 RNP 전달이 이용될 수 있다.

[0260] 진단, 연구, 또는 유전자 치료법(예를 들어, 숙주 유기체 내로의 형질감염된 세포의 재주입을 통한 유전자 치료법)을 위한 생체의 세포 형질감염은 당업자에게 잘 알려져 있다. 바람직한 구체예에서, 세포를 대상 유기체로부터 분리하고, RNA 조성물로 형질감염시키고, 대상 유기체(예를 들어, 환자) 내로 다시 재주입한다. 생체의 형질감염에 적합한 다양한 세포 유형은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 환자로부터 세포를 분리하고 배양하는 방법의 논의에 대해, Freshney, "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (6th edition, 2010) 및 그에서 인용된 참조문헌 참조).

[0261] 적합한 세포는 진핵 및 원핵 세포 및/또는 세포주를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 세포 또는 이러한 세포로부터 생성된 세포주의 비-한정적 예는 COS, CHO(예를 들어, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293(예를 들어, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), 및 perC6 세포, 임의의 식물 세포(분화 또는 미분화), 및 곤충 세포, 예컨대, 스포도테라푸기페르다(*Spodoptera fugiperda*(Sf)), 또는 진균 세포, 예컨대, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pichia*) 및 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)를 포함한다. 특정 구체예에서, 세포주는 CHO-K1, MDCK 또는 HEK293 세포주이다. 추가적으로, 1차 세포가 분리되고, 뉴클레아제(예를 들어, ZFN 또는 TALEN) 또는 뉴클레아제 시스템(예를 들어, CRISPR)에 의한 처리 후 치료대상 개체 내로의 재도입을 위해 생체외에서 이용될 수 있다. 적합한 1차 세포는 말초혈액 단핵 세포(PBMC), 및 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포와 같은 기타 혈액 세포 서브셋을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 세포는 또한 예로서, 배아 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 조혈 줄기 세포(CD34+), 신경 줄기 세포 및 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포를 포함한다.

[0262] 일 구체예에서, 줄기 세포는 세포 형질감염 및 유전자 치료법을 위한 생체의 절차에서 사용된다. 줄기 세포를 사용하는 장점은 줄기 세포가 인 비트로에서 다른 세포 유형으로 분화될 수 있거나 골수에서 생착될 포유동물(예컨대, 세포의 공여체) 내로 도입될 수 있다는 것이다. 인 비트로에서 CD34+ 세포를 GM-CSF, IFN-감마 및 TNF-알파와 같은 사이토카인을 사용하여 임상적으로 중요한 면역 세포 유형으로 분화시키는 방법이 알려져 있다(비한정적인 예로서, Inaba et al., J. Exp. Med. (1992) 참조).

[0263] 줄기 세포는 알려진 방법을 이용하여 형질도입 및 분화를 위해 분리된다. 예를 들어, 줄기 세포는 원치 않는 세포, 예컨대, CD4+ 및 CD8+(T 세포), CD45+(panB 세포), GR-1(과립구), 및 Iad(분화 항원 제시 세포)에 결합하는 항체로 골수 세포를 패닝(panning)함으로써 골수 세포로부터 분리된다(비한정적인 예로서, Inaba et al., J. Exp. Med. (1992) 참조). 변형된 줄기 세포가 또한 일부 구체예에서 사용될 수 있다.

[0264] 특히, 본원에 기재된 CRISPR 뉴클레아제 중 임의의 하나는 유사분열-후(post-mitotic) 세포 또는 활발히 분열 중인 아닌 임의의 세포, 예를 들어 정지된(arrested) 세포에서 게놈 편집에 적합할 수 있다. 본 발명의 CRISPR 뉴클레아제를 사용하여 편집될 수 있는 유사분열-후 세포의 예는 근육세포, 심근세포, 간세포, 골세포 및 신경 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0265] 치료 RNA 조성물을 포함하는 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 리포솜 등)가 또한 생체내에서 세포의 형질도입을 위해 유기체에 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 RNA 또는 mRNA가 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용 및 전기천공을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 분자를 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적 접촉으로 도입하기 위해 보통 사용되는 임의의 경로에 의한다. 이러한 핵산을 투여하는 적합한 방법이 이용 가능하고 당업자에게 잘 알려져 있으며, 하나 초과 경로가 특정 조성물을 투여하는 데 이용될 수 있지만, 특정 경로가 종종 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

- [0266] 면역 세포(예를 들어, T-세포) 내로의 이식유전자의 도입에 적합한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2009/0117617호를 참조한다.
- [0267] 약학적으로 허용되는 담체는 부분적으로, 투여되는 특정 조성물 및 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 하기 기재된 바와 같이, 약학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 이용 가능하다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989 참조).
- [0268] 상동 재조합에 의한 DNA 복구
- [0269] 용어 "상동성 기반 복구(homology-directed repair)" 또는 "HDR"은, 예를 들어 DNA에서 이중-가닥 및 단일-가닥 절단의 복구 동안, 세포 내에서 DNA 손상을 복구하기 위한 메커니즘을 지칭한다. HDR은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하며 이중-가닥 또는 단일-가닥 절단이 일어난 서열(예를 들어, DNA 표적 서열)을 복구하기 위해 "핵산 주형"(핵산 주형 또는 공여체 주형은 본 명세서에서 호환적으로 사용됨)을 사용한다. 이는, 예를 들어 핵산 주형으로부터 DNA 표적 서열로 유전 정보의 전달을 초래한다. HDR은 핵산 주형 서열이 DNA 표적 서열과 상이하고 핵산 주형 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 일부 또는 전부가 DNA 표적 서열 내로 포함되는 경우, DNA 표적 서열의 변경(예를 들어, 삽입, 결실, 돌연변이)을 초래할 수 있다. 일부 구체예에서, 전체 핵산 주형 폴리뉴클레오타이드, 핵산 주형 폴리뉴클레오타이드의 일부, 또는 핵산 주형의 카피가 DNA 표적 서열의 부위에서 통합된다.
- [0270] 용어 "핵산 주형(nucleic acid template)" 및 "공여체(donor)"는 게놈 내로 삽입되거나 카피되는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 핵산 주형은, 표적 핵산에서 주형에 부가될 것이거나 변화의 주형이 될 것이거나 표적 서열을 변형하기 위해 사용될 수 있는, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 핵산 주형 서열은 임의의 길이, 예를 들어 2 내지 10,000개(또는 그 사이 또는 초과)의 임의의 정수 값) 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 약 100 내지 1,000개(또는 그 사이의 임의의 정수) 뉴클레오타이드 길이, 더 바람직하게는 약 200 내지 500개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 핵산 주형은 단일 가닥 핵산, 이중 가닥 핵산일 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은, 예를 들어 표적 위치의 표적 핵산의 야생형 서열에 상응하는, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은, 예를 들어 표적 위치의, 표적 핵산의 야생형 서열에 상응하는, 예를 들어 하나 이상의 리보뉴클레오타이드의, 리보뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산 주형은 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0271] 예를 들어, 돌연변이체 유전자의 교정을 위한 또는 야생형 유전자의 증가된 발현을 위한, 외인성 서열(또한 "공여체 서열", "공여체 주형" 또는 "공여체"로도 불림)의 삽입이 또한 수행될 수 있다. 공여체 서열은 전형적으로 이것이 배치되는 게놈 서열과 동일하지 않음은 용이하게 명백할 것이다. 공여체 서열은 목적 위치에서 효율적인 HDR을 가능하게 하기 위해 2개의 상동성 영역에 측접하는(flanking) 비-상동성 영역을 포함할 수 있다. 추가적으로, 공여체 서열은 세포 염색질 중 목적 영역과 상동성이 아닌 서열을 포함하는 벡터 분자를 포함할 수 있다. 공여체 분자는 세포 염색질과 상동성인 수개의 불연속 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일반적으로 목적 영역에 존재하지 않는 서열의 표적화된 삽입을 위해, 상기 서열은 공여체 핵산 분자에 존재하고, 목적 영역 내 서열과 상동성인 영역에 측접할 수 있다.
- [0272] 공여체 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 및/또는 이중-가닥일 수 있고, 선형 또는 환형 형태로 세포 내에 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2010/0047805호; 제2011/0281361호; 제2011/0207221호; 및 제2019/0330620호를 참조한다. 선형 형태로 도입되는 경우, 공여체 서열의 말단은 당업자에게 알려진 방법에 의해(예를 들어, 핵산말단 가수분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오타이드 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 부가되고 및/또는 자가-상보성 올리고뉴클레오타이드가 일 말단 또는 양 말단에 라이게이션된다. 예를 들어, Chang and Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987); Nehls et al., Science (1996)을 참조한다. 분해로부터 외인성 폴리뉴클레오타이드를 보호하기 위한 추가적인 방법은 말단 아미노기(들)의 부가 및, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 및 O-메틸 리보오스 또는 데옥시리보오스 잔기와 같은 변형된 뉴클레오타이드간 연결(internucleotide linkage)의 사용을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0273] 따라서, 복구를 위해 공여체 주형을 사용하는 본 발명의 구체예는 선형 또는 환형 형태로 세포 내에 도입될 수 있는 DNA 또는 RNA, 단일-가닥 및/또는 이중-가닥 공여체 주형을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체예에서 유전자-편집 조성물은 (1) 복구 전에 유전자에서 이중 가닥 절단을 생성하는(affect) 가이드 서열을 포함하는 RNA 분자 및 (2) 복구를 위한 공여체 RNA 주형을 포함하고, 상기 가이드 서열을 포함하는 RNA 분자는 제1 RNA 분자이고 공여체 RNA 주형은 제2 RNA 분자이다. 일부 구체예에서, 가이드 RNA 분자와 주형 RNA 분자는 단일 분자의 일

부로서 연결된다.

- [0274] 공여체 서열은 또한 올리고뉴클레오타이드일 수 있고 내인성 서열의 유전자 교정 또는 표적화된 변경에 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 벡터 상에서 세포로 도입될 수 있거나, 세포 내에 전기천공될 수 있거나, 당업계에 알려진 기타 방법을 통해 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 내인성 유전자 내의 돌연변이된 서열(예를 들어, 베타 글로빈 내 겸상(sickle) 돌연변이)을 '교정'하는 데 사용될 수 있거나, 내인성 유전자좌 내로 원하는 목적을 갖는 서열을 삽입하는 데 사용될 수 있다.
- [0275] 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 복제 원점, 프로모터 및 항생제 내성을 코딩하는 유전자와 같은 추가적인 서열을 갖는 벡터 분자의 일부로서 세포 내로 도입될 수 있다. 또한, 공여체 폴리뉴클레오타이드는 네이키드 핵산으로서, 리포좀, 엑소좀, 또는 폴록사머와 같은 작용제와 복합체화된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 재조합 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 인테그라제 결함 렌티바이러스(IDLV)) 또는 바이러스-유사 입자에 의해 전달될 수 있다.
- [0276] 공여체는 일반적으로 그 발현이 통합 부위에서 내인성 프로모터, 즉 공여체가 삽입되는 내인성 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 의해 구동되도록 삽입된다. 그러나, 공여체가 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어 구성적 프로모터 또는 유도성 또는 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있음이 명백할 것이다.
- [0277] 공여체 분자는 내인성 유전자의 전부, 일부가 발현되거나 전혀 발현되지 않도록 내인성 유전자 내로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 이식유전자는, 예를 들어 이식유전자좌와의 융합체로서, 내인성 서열의 일부(이식유전자좌에 대해 N-말단 및/또는 C-말단)가 발현되거나 전혀 발현되지 않도록, 내인성 유전자좌 내로 삽입될 수 있다. 다른 구체예에서, 이식유전자(예를 들어, 내인성 유전자를 위한, 추가적인 코딩 서열을 갖거나 갖지 않음)는 임의의 내인성 유전자좌, 예를 들어 세이프-하버(safe-harbor) 유전자좌, 예를 들어 CCR5 유전자, CXCR4 유전자, PPP1R12c(또한 AAVS1로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 또는 Rosa 유전자 내로 통합된다. 예를 들어, 미국 특허 제7,951,925호 및 제8,110,379호; 미국 공개 제2008/0159996호; 제2010/0218264호; 제2010/0291048호; 제2012/0017290호; 제2011/0265198호; 제2013/0137104호; 제2013/0122591호; 제2013/0177983호 및 제2013/0177960호 및 미국 가출원 제61/823,689호를 참조한다.
- [0278] 내인성 서열(내인성 또는 이식유전자의 일부)이 이식유전자와 함께 발현되는 경우, 내인성 서열은 전장 서열(야생형 또는 돌연변이체) 또는 부분적 서열일 수 있다. 바람직하게는, 내인성 서열은 기능적이다. 이러한 전장 또는 부분적 서열의 기능의 비-한정적 예는 이식유전자(예를 들어, 치료용 유전자)에 의해 발현되는 폴리펩티드의 혈청 반감기 증가 및/또는 담체로서의 작용을 포함한다.
- [0279] 또한, 발현을 위해 요구되지는 않지만, 외인성 서열은 또한 전사 또는 번역 조절 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 인슐레이터(insulator), 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site), 2A 펩티드를 코딩하는 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.
- [0280] 특정 구체예에서, 공여체 분자는 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들어, 세포에 또는 개체에 부재하는 단백질을 코딩하는 코딩 서열 또는 단백질을 코딩하는 유전자의 대안적 버전), 조절 서열 및/또는 microRNA 또는 siRNA와 같은 구조적 핵산을 코딩하는 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0281] 전술된 구체예에 있어서, 본원에 개시된 각각의 구체예는 각각의 다른 개시된 구체예에 적용 가능한 것으로 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 임의의 RNA 분자 또는 조성물이 본 발명의 임의의 방법에서 이용될 수 있음이 이해된다.
- [0282] 본원에서 사용된, 모든 표제는 단순히 구성을 위한 것이며 어떠한 방식으로든 본 개시를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 임의의 개별 섹션의 내용은 모든 섹션에 동일하게 적용 가능할 수 있다.
- [0283] 본 발명의 추가적인 목적, 장점, 및 신규한 특징은 하기 실시예의 조사 시 당업자에게 명백해질 것이며, 이는 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 추가적으로, 본원에서 상술되고, 하기 청구범위 섹션에서 청구된 바와 같은 본 발명의 각각의 다양한 구체예 및 양태는 하기 실시예에서 실험적 뒷받침이 확인된다.
- [0284] 명확성을 위해 별개의 구체예의 상황에서 기재되는, 본 발명의 특정 특징이 또한 단일 구체예에서 조합되어 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간결성을 위해, 단일 구체예의 상황에서 기재되는 본 발명의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위-조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 기재된 구체예에서 적합한 바와 같이 제공될 수 있다. 다양한 구체예의 상황에서 기재되는 특정한 특징들은 구체예가 이들 요소 없이 작동되지 않는 경우가 아닌 한, 이들 구체예의 필수적 특징으로 간주되어서는 안 된다.

- [0285] 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 명명법, 및 본 발명에서 이용되는 실험실 절차는 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기법을 포함한다. 이러한 기법은 문헌에서 상세하게(thoroughly) 설명되어 있다. 예를 들어, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (1989); Ausubel, R. M. (Ed.), "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시된 바와 같은 방법론; Cellis, J. E. (Ed.), "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III (1994); Freshney, "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" Third Edition, Wiley-Liss, N. Y. (1994); Coligan J. E. (Ed.), "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III (1994); Stites et al. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (Eds.), "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Clokie and Kropinski (Eds.), "Bacteriophage Methods and Protocols", Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (2009)]을 참조하며, 이들 모두 참조에 의해 인용된다. 기타 일반 참조문헌이 본 문헌 전체를 통해 제공된다.
- [0286] 본 발명의 보다 완전한 이해를 촉진하기 위해 실시예가 하기에 제공된다. 하기 실시예는 본 발명의 제조 및 실시의 예시적 방식을 예시한다. 그러나, 본 발명의 범주는 이들 실시예에 개시된 특정 구체예에 제한되지 않으며, 이는 단지 예시 목적을 위한 것이다.
- [0287] **실험 세부사항**
- [0288] 본 발명의 보다 완전한 이해를 촉진하기 위해 실시예가 하기에 제공된다. 하기 실시예는 본 발명의 제조 및 실시의 예시적 방식을 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위는 이들 실시예에서 개시된 특정 구체예에 한정되지 않으며, 이들은 단지 예시 목적을 위한 것이다.
- [0289] CRISPR 반복부(crRNA), 트랜스활성화 RNA(tracrRNA), 뉴클레아제 폴리펩티드(OMNI), 및 PAM(protospacer adjacent motif) 서열은 환경 샘플의 상이한 메타게놈 서열 데이터베이스로부터 예측되었다.
- [0290] OMNI 뉴클레아제 폴리펩티드의 제조
- [0291] 신규한 뉴클레아제 폴리펩티드(OMNI)의 제조를 위해, 다수의 확인된 OMNI의 개방 해독 프레임(ORF)을 인간 세포주 발현을 위해 코돈 최적화시켰다. ORF를 박테리아 발현 플라스미드 pET9a 내로 및 포유동물 발현 플라스미드 pmOMNI 내로 클로닝하였다(표 4).
- [0292] sgRNA의 예측 및 제조
- [0293] 각각의 OMNI에 대해, 단일-가이드 RNA(sgRNA)를 각각의 박테리아 게놈 내 CRISPR 반복부 어레이 서열 및 tracrRNA의 검출에 의해 예측하였다. 원형 미성숙(native premature) crRNA 및 tracrRNA 서열을 인실리코(*in silico*)로 테트라-루프 'gaaa' 서열과 연결하고 이중체(duplex)의 2차 구조 요소를 RNA 2차 구조 예측 툴을 이용하여 예측하였다.
- [0294] 전체 이중체 RNA 요소(crRNA-tracrRNA 키메라)의 예측된 2차 구조를 sgRNA의 설계를 위한 가능한 tracrRNA 서열의 확인을 위해 사용하였다. 상이한 위치에서 상부 스템(upper stem)에서의 이중체를 단축시켜 여러 가능한 sgRNA 스캐폴드 버전을 제조하였다(모든 OMNI의 sgRNA 설계는 표 2에 열거됨). 추가적으로, 잠재적인 전사 및 구조적 제약을 극복하고 인간 세포 환경 상황에서 sgRNA 스캐폴드의 유연성(plasticity)을 평가하기 위해, 일부 경우에 가능한 sgRNA의 뉴클레오티드 서열의 작은 변화를 도입했다(도 1, 표 2). 마지막으로, 각각의 OMNI에 대해 가능한 설계된 스캐폴드의 최대 3가지 버전을 합성하고 하류에 22개 뉴클레오티드 범용 고유 스페이스 서열(universal unique spacer sequence)(T2, 서열번호 268)을 연결하고, 포유동물 발현을 위한 U6 프로모터와 조합된 유도성 T7 프로모터 하에 박테리아 발현 플라스미드 내로 클로닝하였다(pShuttleGuide, 표 4).
- [0295] T2 - GGAAGAGCAGAGCCTTGGTCTC (서열번호 268)
- [0296] TXTL에 의한 인 비트로 고갈(In vitro depletion) 분석
- [0297] 인 비트로 PAM 서열의 고갈을 Maxwell et al, Methods. 2018에 기재된 바에 따라 수행하였다. 간략하게, T7 프

로모터 하에 OMNI 뉴클레아제 및 sgRNA를 발현하는 선형 DNA를 T7 중합효소를 발현하는 선형 구조체(linear construct)와 함께 무세포 전사-번역 인 비트로 시스템(TXTL mix, Arbor Bioscience)에 첨가하였다. TXTL 믹스에 의한 RNA 발현 및 단백질 번역은 리보핵단백질(RNP) 복합체의 형성을 초래한다. 선형 DNA를 사용하였으므로, Chi6 DNA 서열을 TXTL 반응 믹스에 첨가하여 RecBCD의 엑소뉴클레아제 활성을 저해하고, 이에 의해 선형 DNA를 분해로부터 보호하였다. 잠재적 PAM 서열의 8N 랜덤화된 세트가 축적된 표적 프로토스페이서를 포함하는 플라스미드의 라이브러리(pbPOS T2 라이브러리, 표 4)를 표적화하도록 sgRNA 스페이서가 설계된다. 절단된 라이브러리(cleaved library) 및 비-표적화 gRNA를 발현하는 대조군 라이브러리 모두에 필요한 어댑터 및 인덱스를 추가하는 PCR을 이용하여 고 처리량(high-throughput) 시퀀싱에 의해 라이브러리로부터의 PAM 서열의 고갈을 측정하였다. 딥 시퀀싱(deep sequencing) 후, 대조군에서의 발생 대비 동일한 PAM 서열을 갖는 고갈된 서열의 분율에 의해 인 비트로 활성을 확인하였고, 이는 OMNI 뉴클레아제에 의한 기능적 DNA 절단을 나타낸다(도 2 내지 도 18 및 표 3).

[0298] 내인성 게놈 표적에 대한 인간 세포의 활성

[0299] OMNI를 또한 인간 세포의 특정 게놈 위치에 대한 편집을 촉진하는 능력에 대해 분석하였다. 이를 위해, 각 OMNI에 대해, 상응하는 OMNI-P2A-mCherry 발현 벡터(표 4)를 인간 게놈의 특정 위치를 표적화하도록 설계된 sgRNA와 함께 HeLa 세포에 형질감염시켰다(pShuttle Guide - 표 4 및 스페이서 서열 - 표 5). 72시간차에, 세포를 회수했다. 회수된 세포의 절반은 mCherry 형광을 마커로 사용하여 FACS에 의한 형질감염 효율의 정량화에 사용했다. 회수된 세포의 나머지 절반을 용해시키고, 이들의 게놈 DNA를 사용하여 상응하는 추정 게놈 표적을 PCR 증폭시켰다. 앰플리콘에 차세대 시퀀싱(NGS)을 실시하고 결과적으로 수득된 서열을 사용하여 각 표적 부위의 편집 사건(editing event)의 비율을 계산했다. 절단 부위 주위의 짧은 삽입 또는 삭제(인델)가 뉴클레아제 유도 DNA 절단 후 DNA 말단 복구의 전형적인 결과이다. 따라서 편집 비율(percent editing)의 계산은 각 앰플리콘 내에서 인델(indel) 함유 서열의 분율에서 추론되었다.

[0300] 각 OMNI의 게놈 활성은 각각 상이한 게놈 위치를 표적화하도록 설계된 6개 이상의 고유 sgRNA의 패널을 사용하여 평가했다. 이러한 실험의 결과가 표 5에 요약된다. 표(컬럼 6, "% indels")에서 볼 수 있듯이, 여러 OMNI가 테스트된 대부분 또는 일부 표적 부위에서 높고 유의한 편집 수준을 나타낸다.

[0301] RNP 복합체의 일부로서 OMNI-127에 대한 추가 결과

[0302] **OMNI-127 단백질의 정제:** pET28a의 OMNI-127 구조체를 BL-21 세포(NEB)에서 발현시켰다. 세포를 AIM + 0.4% 글리세롤에서 성장시키고, 37°C에서 23시간 동안 발현시켰다. 화학적 용해를 이용하여 세포를 용해시키고 투명한 용해물을 Ni-NTA 수지 상에서 정제했다. Ni-NTA 용리 분획을 CEX(S03 fractogel) 수지에서 정제하고, 뒤이어 Superdex® 200 Increase 10/300 GL, AKTA Pure(GE Healthcare Life Sciences)에서 SEC 정제를 수행했다. OMNI-127 단백질을 함유한 분획을 모으고, 25 mg/ml 스톱으로 농축하고, 액체 질소에서 급속 냉동시키고, -80°C에서 보관했다.

[0303] **시험관 내에서 OMNI-127 RNP의 절단 활성:** 3' 및 5' 말단에 3개의 2'-O-메틸 3'-포스포로티오에이트를 갖는 OMNI-127의 합성 sgRNA를 합성했다(Agilent).

[0304] OMNI-127 RNP의 활성 분석은 ELANE g135 가이드를 사용하여 시험관 내에서 수행하였다(표 6, 도 2a). 요약하면, 10 pmol의 OMNI-127 뉴클레아제를 20 pmol의 합성 가이드와 혼합했다. 실온에서 10분간 인큐베이션한 후, RNP 복합체를 4, 2, 1, 0.5 pmol로 연속 희석하고, 추출된 게놈 DNA로부터 ELANE g135 표적을 증폭시켜 제조한 선형 DNA 주형 40 ng와 반응시켰다. OMNI-127은 ELANE 주형의 완전한 절단을 보였고, 이는 높은 절단 활성을 나타낸다(도 19a).

[0305] **U2OS 세포에서 RNP의 활성 편집을 통한 OMNI-127의 가이드 최적화:** 스페이서 길이 최적화를 포유류 세포 환경에서 테스트하였다. 100 μM의 뉴클레아제를 120 μM의 상이한 스페이서 길이(20-24 뉴클레오티드, 표 6)의 합성 가이드 및 100 μM의 Cas9 전기천공 인헨서(IDT)와 혼합하여 RNP를 조립했다. 실온에서 10분간 인큐베이션한 후, RNP 복합체를 200,000개의 사전 세척된 U2OS 세포와 혼합하고, 제조사의 프로토콜에 따라, DN100이 포함된 Lonza SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X 키트를 사용하여 전기천공했다. 전기천공 후 72시간차에, 세포를 용해시키고, 게놈 DNA 함유량을 추출했다. 상응하는 게놈 표적을 PCR로 증폭시켰다. 앰플리콘을 차세대 시퀀싱(NGS)에 적용하고, 결과적으로 수득된 서열을 사용하여 편집 사건의 비율을 계산했다. 도 19b 및 표 7에서 볼 수 있듯이, OMNI-127은 모든 스페이서 길이에서 높은 편집 수준을 나타냈다.

[0306] **인간 세포에서 RNP 복합체의 일부로서 OMNI-127 편집 활성:** RNP 복합체의 일부인 OMNI-127 단백질의 활성을

U2OS 세포에서 관찰했고(표 7, 도 19c), 유사한 활성이 HSC-MLP2 세포에서도 관찰되었다(표 8). HSC 실험에서, 100 μ M 뉴클레아제를 120 μ M 합성 가이드(표 6) 및 100 μ M Cas9 전기천공 인핸서(IDT)와 혼합하여 RNP를 조립했다. 실온에서 10분간 인큐베이션한 후, RNP 복합체를 250,000개의 사전 세척된 HSC-MLP2 세포와 혼합하고 제조사의 프로토콜에 따라 CA137이 포함된 Lonza P3 세포주 4D-Nucleofector™ X 키트를 사용하여 전기천공했다. 72시간차에 세포를 용해시키고 게놈 DNA 표적을 PCR로 증폭시켰다. 애플리콘에 NGS를 적용하고, 결과적으로 수득된 서열을 사용하여 편집 사건의 비율을 계산했다. ELANE-g135 및 g136용 가이드를 사용하여 OMNI-127을 테스트하였다. OMNI-127은 두 개의 ELANE 가이드(g135, g136)에 의한 편집을 보였다.

표 1 - OMNI CRISPR 뉴클레아제 서열

표 1

"OMNI" 명칭	OMNI 아미노산 서열의 서열번호	OMNI를 코딩하는 DNA 서열의 서열번호	인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 DNA 서열의 서열번호	불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 닉카아제	불활성화된 HNH 도메인을 갖는 닉카아제	불활성화된 RuvC 및 HNH 도메인을 갖는 데드 뉴클레아제
OMNI-115	1	18	35	(D9 또는 E532 또는 H755 또는 D758)	(D611 또는 H612 또는 N635)	(D9 또는 E532 또는 H755 또는 D758) 및 (D611 또는 H612 또는 N635)
OMNI-124	2	19	36	(D8 또는 E502 또는 H737 또는 D740)	(D589 또는 H590 또는 N613)	(D8 또는 E502 또는 H737 또는 D740) 및 (D589 또는 H590 또는 N613)
OMNI-127	3	20	37	(D9 또는 E480 또는 H704 또는 D707)	(D562 또는 H563 또는 N586)	(D9 또는 E480 또는 H704 또는 D707) 및 (D562 또는 H563 또는 N586)
OMNI-144	4	21	38	(D11 또는 E533 또는 H768 또는 D771)	(D618 또는 H619 또는 N642)	(D11 또는 E533 또는 H768 또는 D771) 및 (D618 또는 H619 또는 N642)
OMNI-145	5	22	39	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769)	(D616 또는 H617 또는 N640)	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769) 및 (D616 또는 H617 또는 N640)
OMNI-146	6	23	40	(D11 또는 E533 또는 H768 또는 D771)	(D618 또는 H619 또는 N642)	(D11 또는 E533 또는 H768 또는 D771) 및 (D618 또는 H619 또는 N642)
OMNI-147	7	24	41	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769)	(D616 또는 H617 또는 N640)	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769) 및 (D616 또는 H617 또는 N640)
OMNI-148	8	25	42	(D11 또는 E533 또는 H765 또는 D768)	(D618 또는 H619 또는 N642)	(D11 또는 E533 또는 H765 또는 D768) 및 (D618 또는 H619 또는 N642)
OMNI-149	9	26	43	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769)	(D616 또는 H617 또는 N640)	(D11 또는 E531 또는 H766 또는 D769) 및 (D616 또는 H617 또는 N640)

OMNI-159	10	27	44	(D8 또는 E508 또는 H727 또는 D730)	(D589 또는 H590 또는 N613)	(D8 또는 E508 또는 H727 또는 D730) 및 (D589 또는 H590 또는 N613)
OMNI-218	11	28	45	(D10 또는 E597 또는 H856 또는 D859)	(E683 또는 H684 또는 N707)	(D10 또는 E597 또는 H856 또는 D859) 및 (E683 또는 H684 또는 N707)
OMNI-237	12	29	46	(D14 또는 E778 또는 H990 또는 D993)	(D858 또는 H859 또는 N882)	(D14 또는 E778 또는 H990 또는 D993) 및 (D858 또는 H859 또는 N882)
OMNI-248	13	30	47	(D9 또는 E809 또는 H1033 또는 D1036)	(D892 또는 H893 또는 N916)	(D9 또는 E809 또는 H1033 또는 D1036) 및 (D892 또는 H893 또는 N916)
OMNI-251	14	31	48	(D11 또는 E846 또는 H1094 또는 D1097)	(D939 또는 H940 또는 N963)	(D11 또는 E846 또는 H1094 또는 D1097) 및 (D939 또는 H940 또는 N963)
OMNI-252	15	32	49	(D11 또는 E845 또는 H1093 또는 D1096)	(D938 또는 H939 또는 N962)	(D11 또는 E845 또는 H1093 또는 D1096) 및 (D938 또는 H939 또는 N962)
OMNI-253	16	33	50	(D11 또는 E846 또는 H1094 또는 D1097)	(D939 또는 H940 또는 N963)	(D11 또는 E846 또는 H1094 또는 D1097) 및 (D939 또는 H940 또는 N963)
OMNI-259	17	34	51	(D9 또는 E779 또는 H989 또는 D992)	(D857 또는 H858 또는 N881)	(D9 또는 E779 또는 H989 또는 D992) 및 (D857 또는 H858 또는 N881)

[0309]

표 1. OMNI 뉴클레아제 서열: 표 1에 OMNI 명칭, 그의 상응하는 뉴클레아제 단백질 서열, 그의 DNA 서열, 그의 인간 최적화 DNA 서열, 불활성화된 RuvC 도메인을 갖는 니카아제를 생성하기 위해 치환될 대안적인 위치, 불활성화된 HNH 도메인을 갖는 니카아제를 생성하기 위해 치환될 대안적인 위치, 및 불활성화된 RuvC 및 HNH 도메인을 갖는 촉매활성이 상실된(catalytically dead) 데드 뉴클레아제를 생성하기 위해 치환될 대안적인 위치가 열거된다. 컬럼 5-7에 표시된 아미노산 위치의 각각에 대해, 불활성화를 달성하기 위해, HNH 도메인에서 아스파르트산(D)의 글루탐산(E)으로의 치환 또는 글루탐산(E)의 아스파르트산(D)으로의 치환을 제외하고, 임의의 다른 아미노산으로의 치환이 허용된다.

[0310]

표 2 - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

표 2

		OMNI-115 의 sgRNA 115	OMNI-124 의 sgRNA 124
crRNA:tracrRNA 이중체 V1	crRNA (반복)	GUUUAUAGUUGCCUUUC (서열번호 52)	GUUUUAGUACCUGGAGAAA (서열번호 65)
	부분 crRNA 1	GUUUAUAGUUGCCUUU (서열번호 53)	GUUUUAGUACCUGGA (서열번호 66)
	부분 crRNA 2	GUUUAUAGUUGCC (서열번호 54)	GUUUUAGUACCU (서열번호 67)
	부분 crRNA 3	GUUUAUAGUUG (서열번호 55)	GUUUUAGUAC (서열번호 68)
	tracrRNA (역반복)	GAAAGGUAACUAUAAU (서열번호 56)	UUUCUUCAGACCUACUAAAAU (서열번호 69)
	부분 tracrRNA 1	AAAGGUAACUAUAAU (서열번호 57)	UUCAGACCUACUAAAAU (서열번호 70)

[0311]

		OMNI-115 의 sgRNA 115	OMNI-124 의 sgRNA 124
tracrRNA 서열	부분 tracrRNA 2	GGUAACUAUAAU (서열번호 58)	AGACCUACUAAAAU (서열번호 71)
	부분 tracrRNA 3	UAACUAUAAU (서열번호 59)	ACCUACUAAAAU (서열번호 72)
	tracrRNA Portion 1	AAUCGAGAAUUUCGAGU (서열번호 60)	AAGGAUUUUAUCCGAAAGA (서열번호 73)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	미열거	GGAUUUAUUCC (서열번호 74)
	tracrRNA Portion 2	AGGGCUCUAACUUUCGAGU UAUCCCUAAUUUC (서열번호 61)	AUUUUUGUAAAUGAAGAAAAUA AGGC (서열번호 75)
	tracrRNA Portion 3	AAGCAACUGUUUCAUACAG UUGCUUUUUU (서열번호 62)	GAGAAAGGAUGCUGACGGGCAU CCUUUUUU (서열번호 76)
sgRNA 버전	tracrRNA Portion 3 - polyI	AAGCAACUGUUUCAUACAG UUGC (서열번호 63)	GAGAAAGGAUGCUGACGGGCAU CC (서열번호 77)
	sgRNA V1	GTTATAGTTGCCTTTCgaaaGA AAGGTAACATAATAATCGA GAATTCGAGTAGGGCTCTA ACTTTCGAGTTATCCCTTATT TCAAGCAACTGTTTCATACA GTTGCTTTTTT (서열번호 64)	GTITTAGTACCTGGAGAAgaaaTT TCCTCAGACCTACTAAAATAAGG ATTTATTCGAAAGAATTTTGTGA AATGAAGAAAATAAGGCGAGAA AGGATGCTGACGGGCATCCTTTT TT (서열번호 78)
	sgRNA V2	미열거(Not listed)	GTITTAGTACCTGGAGAAgaaaT TTCTCAGACCTACTTAAATAAG GATTTATTCGAAAGAATTATTG TAAATGAAGAAAATAAGGCGAG AAAGGATGCTGACGGGCATCCTT TTTT (서열번호 79)
	sgRNA V2 crRNA (반복)	미열거	GUUUAAGUACCUGGAGAAA (서열번호 80)
	sgRNA V2 crRNA (역반복)	미열거	UUUCUUCAGACCUACUTAAAAU (서열번호 81)

표 2 (계속) - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

		OMNI-127 의 sgRNA 127	OMNI-144, 145, 146, 147, 148 및 149 의 sgRNA 1449
crRNA:tracrRNA 이중체 V1	crRNA (반복)	GUUUUGUUACCAUAUGGAU (서열번호 82)	GUUUUAGCUCAAUGUUGG (서열번호 98)
	부분 crRNA 1	GUUUUGUUACCAUAU (서열번호 83)	GUUUUAGCUCAAUGU (서열번호 99)

[0312]

		OMNI-127 의 sgRNA 127	OMNI-144, 145, 146, 147, 148 및 149 의 sgRNA 1449
	부분 crRNA 2	GUUUUGUUACCA (서열번호 84)	GUUUUAGCUCAA (서열번호 100)
	부분 crRNA 3	GUUUUGUUAC (서열번호 85)	GUUUUAGCUC (서열번호 101)
	tracrRNA (역반복)	AUCUAUAUGACCUAACAAAAC (서열번호 86)	CCAACAUGUUCUAAGAU (서열번호 102)
	부분 tracrRNA 1	AUAUGACCUAACAAAAC (서열번호 87)	ACAUGUUCUAAGAU (서열번호 103)
	부분 tracrRNA 2	UGACCUAACAAAAC (서열번호 88)	UGUUCUAAGAU (서열번호 104)
	부분 tracrRNA 3	ACCUAACAAAAC (서열번호 89)	GUUCUAAGAU (서열번호 105)
tracrRNA 서열	tracrRNA Portion 1	AAGGGUUUAUCCCGGAUUC (서열번호 90)	AAGGCAUUAUGGCC (서열번호 106)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	GGGUUUAUCCC (서열번호 91)	GGCAUUAUGGCC (서열번호 107)
	tracrRNA Portion 2	GGCUCCUUUAUAGGAGCCUUUUU (서열번호 92)	GUGGGGUUAAGCAGUAAACCGACA (서열번호 108)
	tracrRNA Portion 2 - polyT	GGCUCCUUUAUAGGAGCC (서열번호 93)	미결거
	tracrRNA Portion 3	미결거	AGCAAUCUGCUCCU (서열번호 109)
	tracrRNA Portion 4	미결거	GAAAGGCUGUAUGAAGAUUUUUUUU (서열번호 110)
	tracrRNA Portion 4 - polyT	미결거	GAAAGGCUGUAUGAAGAUUUUUUUU (서열번호 111)
sgRNA 버전	sgRNA V1	GTTTGTGTTACCATATGGATgaa aATCTATATGACCTAACAAAA CAAGGGTTTATCCCGGATTC GGCTCCTTTATAGGAGCCTTT TTT (서열번호 94)	GTTTGTGTTACCATATGGATgaa aATCTATATGACCTAACAAAA CAAGGGTTTATCCCGGATTC GGCTCCTTTATAGGAGCCTTT TTT (서열번호 94)
	sgRNA V2	GTTTGTGTTACCATATGGATgaa aATCTATATGACCTAACAAAA CAAGGGTTTATCCCGGATTC GGCTCCTTTATAGGAGCCTTT TTT (서열번호 95)	GTTTGTGTTACCATATGGATgaa aATCTATATGACCTAACAAAA CAAGGGTTTATCCCGGATTC GGCTCCTTTATAGGAGCCTTT TTT (서열번호 95)
	sgRNA V2 crRNA (반복)	GUUUAGUUACCAUAUGGAU (서열번호 96)	GUCUUAGCUCUAAUGUUGG (서열번호 114)

[0313]

		OMNI-127 의 sgRNA 127	OMNI-144, 145, 146, 147, 148 및 149 의 sgRNA 1449
	sgRNA V2 crRNA (역반복)	AUCUAUAUGACCUAACATAA C (서열번호 97)	미열거

표 2 (계속) - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

		OMNI-159 의 sgRNA 159	OMNI-218 의 sgRNA 218
crRNA:tracrRNA 이중체 V1	crRNA (반복)	GUUGUAGUCCCCUAUUUGU (서열번호 115)	GUUGUGGUUUGAUGAU (서열번호 128)
	부분 crRNA 1	GUUGUAGUCCCCUAU (서열번호 116)	GUUGUGGUUUGAUGA (서열번호 129)
	부분 crRNA 2	GUUGUAGUCCCC (서열번호 117)	GUUGUGGUUUGA (서열번호 130)
	부분 crRNA 3	GUUGUAGUUC (서열번호 118)	GUUGUGGUUU (서열번호 131)
	tracrRNA (역반복)	ACAAUUAGGUUACUAUGAU (서열번호 119)	AUCAUCAAUCACAAU (서열번호 132)
	부분 tracrRNA 1	UUAGGUUACUAUGAU (서열번호 120)	UCAUCAAUCACAAU (서열번호 133)
	부분 tracrRNA 2	GGUUACUAUGAU (서열번호 121)	UCAAUACACAAU (서열번호 134)
	부분 tracrRNA 3	UUACUAUGAU (서열번호 122)	AAUACACAAU (서열번호 135)
tracrRNA 서열	tracrRNA Portion 1	AAGGUAGUAUACCGC (서열번호 123)	AAGGCUAUAUGCC (서열번호 136)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	GGUAGUAUACC (서열번호 124)	GGCUAUAUGCC (서열번호 137)
	tracrRNA Portion 2	AAAGCUCUAACGCCCCGUCU UUGACGGGGCGUUAUCUUU UUU (서열번호 125)	GAAGGAUGAAUCCUAUC (서열번호 138)
	tracrRNA Portion 2 - polyT	AAAGCUCUAACGCCCCGUCU UUGACGGGGCGUUAUC (서열번호 126)	미열거
	tracrRNA Portion 3	미열거	GCCUCUCUUCUGGAGAGGCUUU UUU (서열번호 139)
	tracrRNA Portion 3 - polyT	미열거	GCCUCUCUUCUGGAGAGGC (서열번호 140)

[0314]

		OMNI-159 의 sgRNA 159	OMNI-218 의 sgRNA 218
sgRNA 버전	sgRNA V1	GTTGTAGTTCCTATTTGTgaa aACAATTAGGTTACTATGATA AGGTAGTATACCGCAAAGCT CTAACGCCCCGTCCTTGACGG GGCGTTATCTTTTT (서열번호 127)	GTTGTGGTTTGATGATgaaaATCAT CAAATCACAATAAGGCTATATGC CGAAGGATGAATTCTATCGCCT CTCTTCTGGAGAGGCTTTTT (서열번호 141)

표 2 (계속) - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

		OMNI-237 의 sgRNA 237	OMNI-248 의 sgRNA 248
crRNA:tracrRNA 이중체 V1	crRNA (반복)	GUUUGAGAGUAGUGUAA (서열번호 142)	GUUUGAGUGUAAUGUA (서열번호 156)
	부분 crRNA 1	GUUUGAGAGUAGUGU (서열번호 143)	GUUUGAGUGUAAUGU (서열번호 157)
	부분 crRNA 2	GUUUGAGAGUAG (서열번호 144)	GUUUGAGUGUAA (서열번호 158)
	부분 crRNA 3	GUUUGAGAGU (서열번호 145)	GUUUGAGUGU (서열번호 159)
	tracrRNA (역반복)	UUACACUACAAGUUCAAA (서열번호 146)	UACAUUACAAAGUUCAAA (서열번호 160)
	부분 tracrRNA 1	ACACUACAAGUUCAAA (서열번호 147)	ACAUUACAAAGUUCAAA (서열번호 161)
	부분 tracrRNA 2	CUACAAGUUCAAA (서열번호 148)	UUACAAAGUUCAAA (서열번호 162)
	부분 tracrRNA 3	ACAAGUUCAAA (서열번호 149)	ACAAAGUUCAAA (서열번호 163)
tracrRNA 서열	tracrRNA Portion 1	AAAAUUUAUUCAAAUCU UUUGCUGCAUUGUGCAGAA UCU (서열번호 150)	AAGCUUUAAAGCGAAAUCA (서열번호 164)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	미열거	GCUUUAAGC
	tracrRNA Portion 2	AAAGAUCUGGAAACAGAU UUUUUUU (서열번호 151)	GAGAAGCAGUGCUUCUUAUU UUU (서열번호 165)
	tracrRNA Portion 2 - polyT	AAAGAUCUGGAAACAGAU (서열번호 152)	GAGAAGCAGUGCUUCUCA (서열번호 166)

[0315]

		OMNI-237 의 sgRNA 237	OMNI-248 의 sgRNA 248
sgRNA 버전	sgRNA V1	GTTTGAGAGTAGTGTAAGaaaT TACACTACAAGTTCAAATAA AAATTTATTCAAATCCTTTTG CTGCATTGTGCAGAATCTAA AGATCTGGAAACAGATCTTT TTTT (서열번호 153)	GTTTGAGTGTAATGTAGaaaTACAT TACAAAGTTCAAATAAGCTTTAA GCGAAATCATAGAGAAGCAGTG CTTCTCATTTTTTT (서열번호 167)
	sgRNA V2	GTTTGAGAGTAGTGTAAGaaaT TACACTACAAGTTCAAATAA AAATTTATTCAAATCCTTCTG CTGCATTGTGCAGAATCTAA AGATCTGGAAACAGATCTTT TTTT (서열번호 154)	미열거
	sgRNA V2 변형된 tracrRNA Portion 1	AAAAAUUUAUCAAUCCU UCUGCUGCAUUGGCAGAA UCU (서열번호 155)	미열거

표 2 (계속) - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

		OMNI-251 및 OMNI-252 의 sgRNA 2512	OMNI-253 의 sgRNA 253
crRNA:tracrRNA 이중체 VI	crRNA (반복)	GUUUGCUAGGUG (서열번호 168)	GUUUGCUAGGUG (서열번호 177)
	부분 crRNA 3	GUUUGCUAGG (서열번호 169)	GUUUGCUAGG (서열번호 178)
	tracrRNA (역반복)	CACAGUUGCGUGC (서열번호 170)	CACAGCUGCGUGCAAU (서열번호 179)
	부분 tracrRNA 3	CAGUUGCGUGC (서열번호 171)	GCUGCGUGCAAU (서열번호 180)
tracrRNA 서열	tracrRNA Portion 1	AAAUAGUCACUUUGUGGC GCAUCCAUG (서열번호 172)	AAGUCACUUUGUGGCGUAUCCA UAACU (서열번호 181)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	GUCACUUUGUGGC (서열번호 173)	GUCACUUUGUGGC (서열번호 182)
	tracrRNA Portion 2	GCUCCAUUGGAACGGAGCAU UUUUU (서열번호 174)	CCCCAUUGGAACGGGCUUUUU U (서열번호 183)
	tracrRNA Portion 2 - polyT	GCUCCAUUGGAACGGAGCA (서열번호 175)	CCCCAUUGGAACGGGGC (서열번호 184)
sgRNA 버전	sgRNA VI	GTTTGCTAGGTGgaaCACAGT TGCGTGCAAATAAGTCACTTT GTGGCGCATCCATGGCTCCA TTGGAACGGAGCATTTTTT (서열번호 176)	GTTTGCTAGGTGgaaCACAGCTG CGTGCAAATAAGTCACTTTGTGG CGTATCCATAACTCCCCATTGGA ACGGGGCTTTTTT (서열번호 185)

[0316]

표 2 (계속) - OMNI 가이드 RNA 및 스캐폴드 RNA 서열

		OMNI-259 의 sgRNA 259
crRNA:tracrRNA 이중체 V1	crRNA (반복)	GUUUUAGUUCUAUGUC (서열번호 186)
	부분 crRNA 1	GUUUUAGUUCUAUGU (서열번호 187)
	부분 crRNA 2	GUUUUAGUUCUA (서열번호 188)
	부분 crRNA 3	GUUUUAGUUC (서열번호 189)
	tracrRNA (역반복)	GACAUAGAGAGUAAAAU (서열번호 190)
	부분 tracrRNA 1	ACAUAGAGAGUAAAAU (서열번호 191)
	부분 tracrRNA 2	UAGAGAGUAAAAU (서열번호 192)
	부분 tracrRNA 3	GAGAGUAAAAU (서열번호 193)
tracrRNA 서열	tracrRNA Portion 1	AAAGGAUUAACCUAAAAUA (서열번호 194)
	tracrRNA Portion 1 - 부분	AGGAUUACCU (서열번호 195)
	tracrRNA Portion 2	CUCAUUUAUGUGAUGAG (서열번호 196)
	tracrRNA Portion 3	AGGCUGCUUAGGCUAGCCUUUUUU (서열번호 197)
	tracrRNA Portion 3 - polyT	AGGCUGCUUAGGCUAGCC (서열번호 198)
sgRNA 버전	sgRNA V1	GTTTTAGTTCTATGTC ^{gaaa} GACATAGAGAGTTAAAAATAAAGGATTACCTAAATACTCATTATGTGATGAGAGGCTGCTTAGGCTAGCCTTTTTTTT (서열번호 199)

		OMNI-259 의 sgRNA 259
	sgRNA V2	GTTCTAGTTCTATGTC ^{gaaa} GACATAGAGAGTTAGAATAAAGGATTACCTAAATACTCATTATGTGATGAGAGGCTGCTTAGGCTAGCCTTTTTTTT (서열번호 200)
	sgRNA V2 crRNA (반복)	GUUCUAGUUCUAUGUC (서열번호 201)
	sgRNA V2 crRNA (역반복)	GACAUAGAGAGUAGAAU (서열번호 202)

표 3 -OMNI 뉴클레아제 PAM의 요약

표 3

명칭	허용적(Permissive) PAM	PAM 특이적 1	추가적인 허용적 PAM	PAM 특이적 2	PAM 특이적 3
OMNI-115	NNRYTT	NNRTTT	NNRYTTHN	NNRYTTTN	미 열거
OMNI-124	NNGNRC	미 열거	NNGNDCNN	NNGNRCNN	NNGNRMNN
OMNI-127	NYRRV	미 열거	NYARMNNN	NYAGCNNN	미 열거
OMNI-144	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNRCNNNN
OMNI-145	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNGCCANN
OMNI-146	NNRC	NNGC	NNRCDNNN	NNRCRCNY	NNDCNNNN
OMNI-147	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNRCNNNN
OMNI-148	NNRC	NNGC	NNRCNNNN	NNGCRANN	NNRCNANN

OMNI-149	NNRC	NNGC	NNDCNNNN	NNGCDNHN	NNRCNNCY
OMNI-159	NNNNCH	NNNNCM	NNNNCMAN	NNNNCMAN	NNNNCMNN
OMNI-218	NNGNKC	NGGRKC	NRGNCRN	SRGGNCRN	NRGGGCRN
OMNI-237	NNVVHY	NNRRHY	NNRVCYNN	NNRACTNN	NNRACYTN
OMNI-248	NRVA	NRMA	NRVANNNN	NAAANNNN	NRAANNNN
OMNI-251	NRNCC	미 열거	NRNCCNNN	NRNCCNNN	미 열거
OMNI-252	NRNCC	미 열거	NRNCCNNN	NRNCCNNN	NRNCCNNN
OMNI-253	NNNCC	미 열거	NNNCCNNN	NRNCCNNN	NNNCCNNN
OMNI-259	NNGAYA	미 열거	NDGHYAHN	NNGAYAHN	NKGWYAHN

[0321] 표 4 - 플라스미드 및 구조

표 4

플라스미드	목적	요소	예
pET9a	박테리아 시스템에서 OMNI 폴리펩티드 발현	T7 프로모터 HA 태그-링커-OMNI ORF (인간 최적화) -SV40 NLS-8XHisTag -T7 종결자 (terminator)	pET9a-OMNI-115 (서열번호)
pbShuttle Guide T2	박테리아 시스템에서 OMNI sgRNA 발현	U6 프로모터 - T7프로모터 - T2 스페이서 sgRNA 스캐폴드 - T7 종결자	pShuttle 가이드-T2-OMNI-97 V1 (서열번호)
pbPOS T2 라이브러리	박테리아/TXTL 고갈 분석(depletion assay)	T2 프로토스페이서 - 8N PAM 라이브러리 - 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제	pbPOS T2 라이브러리 (서열번호)
pmOMNI	인간 세포 시스템에서 OMNI 폴리펩티드 발현	CMV 프로모터 - Kozak - SV40 NLS - OMNI ORF (인간 최적화) - HA - SV40 NLS - P2A - mCherry - bGH poly(A) 신호	pmOMNI-OMNI-127 (서열번호)
pET28	박테리아 시스템에서 OMNI 폴리펩티드 발현	T7 프로모터 HA Tag-링커-OMNI ORF (박테리아 최적화) -SV40 NLS-8XHisTag -T7 종결자	pET28a-OMNI127

[0323] 표 5 - 포유동물 세포의 내인성 상황(endogenous context)에서 뉴클레아제 활성

표 5

뉴클레아제	유전자 표적	상응하는 스페이스 명칭	스페이스 서열	PAM	최대 활성 평균
OMNI-124	B2M	hB2M_s32_22bp_II	AGCGCGAGCACAGC UAAGGCCA (서열번호 269)	CGGAGCGA	87.0000
	CXCR4	hCXCR4_s85_2 2bp_II	CCUCGGUGAUGGAA AUCCACUU (서열번호 270)	GTGCACAG	54.0000
	B2M	hB2M_S52_22bp_II	CGUGAGUAAACCUG AAUCUUUG (서열번호 271)	GAGTACCT	51.0000
	ELANE	hELANE_g138_22bp_II	GGUGUCAAGCCCCA GAGGCCAC (서열번호 272)	AGGGACAG	39.0000
	CXCR4	hCXCR4_S100_22bp_II	UGCCUUGCAUAGGA AGUUCCCA (서열번호 273)	AAGTACCA	23.0000
	SARM1	hSARM1_g13_22bp_II	UGCUCAGACACGCG GUGCAGCA(서열번호 274)	GGGAGCGG	22.0000
	TRAC	hTRAC_S21_22bp_II	GGCCACUUUCAGGA GGAGGAUU (서열번호 275)	CGGAACCC	13.0000
	ELANE	hELANE_g39_22bp_II	CACAGCGGGUGUAG ACUCCGAG (서열번호 276)	GGGGACGT	13.0000
OMNI-218	ELANE	hELANE_g143_22bp_II	GCCUGUUGCUGCAG UCCGGGCU (서열번호 277)	GGGAGCGG	89.0000
	CXCR4	hCXCR4_S25_22bp_II	UGGCAAGAGACCCA CACACCGG (서열번호 278)	AGGAGCGC	89.0000
	B2M	hB2M_s32_22bp_II	AGCGCGAGCACAGC UAAGGCCA (서열번호 279)	CGGAGCGA	71.0000
	TRAC	hTRAC_s128_22bp_II	AGUCUCUCAGCUGG UACACGGC (서열번호 280)	AGGGTCAG	65.0000

[0324]

	TRAC	hTRAC_S22_22bp II	CAAGAGCAACAGUG CUGUGGCC (서열번호 281)	TGGAGCAA	27.0000
	TIGIT	hTIGIT_S24_22bp II	CAUCAGACAGCUGU GACAGCCA (서열번호 282)	TGGAGCTC	22.0000
	CTLA4	hCTLA4_S15_22bp II	CAAGGACUGAGGGC CAUGGACA (서열번호 283)	CGGGACTC	18.0000
	CXCR4	hCXCR4_S103_22bp II	CUGUUGGCUGCCUU ACUACAUU (서열번호 284)	GGGATCAG	15.0000
OMNI-237	B2M	hB2M_s12_22bp II	GUAUGCCUGCCGUG UGAACCAU (서열번호 285)	GTGACTTT	18.0000
OMNI-248	CXCR4	hCXCR4_s186_22bp II	UCCUGGUCAUGGGU UACCAGAA (서열번호 286)	GAAACTGA	25.0000
	CXCR4	hCXCR4_s187_22bp II	AUAAGGCCAACCAU GAUGUGCU (서열번호 287)	GAAACTGG	16.0000
	TRAC	hTRAC_S35_22bp II	GACCCUGCCGUGUA CCAGCUGA (서열번호 288)	GAGACTCT	14.0000
	B2M	hB2M_S83_22bp II	AUUCUCUGCUGGAU GACGUGAG (서열번호 289)	TAAACCTG	14.0000
OMNI-251	SAMD9L	hSAMD9L_g130alt 22bp II	GUCCAAAACAGAAC ACCAAAAA (서열번호 290)	AATCCAAA	1.0000
OMNI-252	TRAC	hTRAC_S72_22bp II	UUCAGAAAGACACC UUCUCCCC (서열번호 291)	CAGCCCAG	1.0000
	SAMD9L	hSAMD9L_g130 22bp II	GUCCAAAACAGAAC ACCAGAAA (서열번호 292)	AATCCAAA	1.0000
OMNI-253	CXCR4	hCXCR4_S65_22bp II	AGGGGACUAUGACU CCAUGAAG (서열번호 293)	GAACCCTG	4.0000
OMNI-159	GATA2	hGATA2_g71_22bp II	GAUCCAGACUCGGA ACCGGAAG (서열번호 294)	ATGTCCAA	91.0000
	CXCR4	hCXCR4_S36_22bp II	GUAAGGCAGCCAAC AGGCGAAG (서열번호 295)	AAAGCCAG	87.0000
	ELANE	hELANE_g139alt 22bp II	AGUCCAGCUGCGG GAAUGGGA (서열번호 296)	TTCCAGG	75.0000
	ELANE	hELANE_g133_22bp II	AGUCCGGGCUGGGA GCGGGUGG (서열번호 297)	GGAGCAGA	68.0000

[0325]

	SARM1	hSARM1_g12_2 2bp II	AGACACGCGGUGCA GCAGGGAG (서열번호 298)	CGGTCCAG	63.0000
	ELANE	hELANE_g146_22bp II	UGUUAUGGUCACAG CGGGUGUA (서열번호 299)	GACTCCGA	19.0000
	ELANE	hELANE_g48_2 2bp II	CCCUCGGAGUCUAC ACCCGCUG (서열번호 300)	TGACCATA	10.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_s130_2 2bp II	GGCCCCUCACCUCA GCUGGACC (서열번호 301)	ACAGCCGC	87.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g136_22bp II	CCACCCGCUCCAG CCCGGACU (서열번호 302)	GCAGCAAC	86.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g135_22bp II	GCGGGAAAGGGAUU CCCAGGAC (서열번호 303)	CCAGCCCC	67.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g135_22bp II	GCGGGAAAGGGAUU CCCAGGAC (서열번호 304)	CCAGCCCC	64.0000
OMNI-127	B2M	hB2M_S38_22bp II	CUCUUUCUGGCCUG GAGGCUAU (서열번호 305)	CCAGCGTG	48.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_s129_2 2bp II	GCAUGUGCAAACGC CUUCAACA (서열번호 306)	ACAGCATT	43.0000
OMNI-127	CXCR4	hCXCR4_s72_2 2bp II	GUGGAUUUCCAUCA CCGAGGCC (서열번호 307)	CTAGCTTT	41.0000
OMNI-127	CXCR4	hCXCR4_s73_2 2bp II	AGGAGGUCGGCCAC UGACAGGU (서열번호 308)	GCAGCCTG	40.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_S58_22bp II	AGAACCCUGACCCU GCCGUGUA (서열번호 309)	CCAGCTGA	39.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g134_22bp II	GGGUCCUGGAAUC CCUUUCCC (서열번호 310)	GCAGCTGG	23.0000

표 5. 포유동물 세포의 내인성 상황에서 뉴클레아제 활성: OMNI 뉴클레아제를 sgRNA 발현 플라스미드와 함께 DNA 형질감염에 의해 포유동물 세포 시스템(HeLa)에서 발현시켰다. 세포 용해물을 부위 특이적 게놈 DNA 증폭 및 NGS에 사용했다. 인델(indels)의 비율을 측정하고, 분석하여 편집 수준을 결정했다. 각 sgRNA는 tracrRNA(표 2 참조) 및 여기에서 상술된 스페이서로 구성된다. 스페이서 3' 게놈 서열은 각 OMNI 뉴클레아제에 대해 예상되는 적절한 PAM을 포함한다. 전술된 바와 같이, mCherry 신호의 유세포 분석에 의해 형질감염 효율(% 형질감염)을 측정했다. 모든 테스트는 3반복(triplicate)으로 수행했다. OMNI 뉴클레아제 단독(가이드 없음)으로 형질감염된 세포가 음성 대조군으로 작용했다(데이터는 표시되지 않음).

표 6 - ELANE을 표적으로 하는 OMNI-127 합성 sgRNA

표 6

부위	스페이서 길이	스페이서 서열	PAM	스캐폴드 sgRNA12 V2	전체 sgRNA
g134_alt	22	서열번호 311	GCAGCTGG	서열번호 324	서열번호 325
g134_ref	22	서열번호 312	GCAGCTGG	서열번호 324	서열번호 326
g135_alt	22	서열번호 313	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 327
g135_ref	20	서열번호 314	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 328
g135_ref	21	서열번호 315	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 329
g135_ref	22	서열번호 316	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 330
g135_ref	23	서열번호 317	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 331
g135_ref	24	서열번호 318	CCAGCCCC	서열번호 324	서열번호 332
g136	20	서열번호 319	GCAGCAAC	서열번호 324	서열번호 333
g136	21	서열번호 320	GCAGCAAC	서열번호 324	서열번호 334
g136	22	서열번호 321	GCAGCAAC	서열번호 324	서열번호 335
g136	23	서열번호 322	GCAGCAAC	서열번호 324	서열번호 336
g136	24	서열번호 323	GCAGCAAC	서열번호 324	서열번호 337

[0329]

[0330] 표 7 - 포유동물 U2OS 세포에서 OMNI-127 RNP 활성 및 스페이서 최적화

표 7

유전자	개놈 부위	스페이서 서열	PAM	스페이서 길이	% indels
ELANE	g134_ref	GGGUCCUGGGAUCCCUUCCCC (서열번호 338)	GCAGCTGG	22	46.0000
	g135_ref	GGGAAAGGGAUCCCAGGAC (서열번호 339)	CCAGCCCC	20	95.0000
	g135_ref	CGGGAAAGGGAUCCCAGGAC (서열번호 340)	CCAGCCCC	21	96.0000
	g135_ref	GCGGAAAGGGAUCCCAGGAC (서열번호 341)	CCAGCCCC	22	92.0000
	g135_ref	UGCGGAAAGGGAUCCCAGGAC (서열번호 342)	CCAGCCCC	23	93.0000
	g135_ref	CUGCGGAAAGGGAUCCCAGGAC (서열번호 343)	CCAGCCCC	24	95.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 344)	GCAGCAAC	20	97.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 345)	GCAGCAAC	21	91.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 346)	GCAGCAAC	22	98.0000
	g136_ref	CCCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 347)	GCAGCAAC	23	97.0000
	g136_ref	CCCCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 348)	GCAGCAAC	24	98.0000

[0331]

[0332] 표 7. U2OS 세포에서 RNP 복합체의 일부로서 OMNI-127 활성 및 스페이서 최적화. 합성 sgRNA(Agilent, 표 6)를 이용하여 OMNI-127 RNP를 조립하고 U2OS 세포에 전기천공했다. 유전자 명칭, 스페이서 서열 및 스페이서 길이가 NGS로 측정된 편집 수준 옆에 표시된다.

[0333] 표 8 - 포유동물 HSC-MLP2 세포에서의 OMNI-127 RNP 활성 및 스페이서 최적화

표 8

유전자	게놈 부위	스페이서 서열	PAM	스페이 서 길이	% indels
ELANE	g135_ref	GCGGGAAAGGGAUUCCCAGGAC (서열번호 349)	CCAGCCCC	22	39.0000
	g135_alt	GCGGGAAUGGGAUUCCCAGGAC (서열번호 350)	CCAGCCCC	22	49.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (서열번호 351)	GCAGCAAC	22	71.0000

[0334]

[0335]

표 8. HSC-MLP2 세포에 RNP로서의 OMNI-127 활성 및 스페이서 최적화. 합성 sgRNA(Agilent, 표 6)를 이용하여 OMNI-127 RNP를 조립하고 HSC-MLP2 세포에 전기천공했다. 유전자 명칭, 스페이서 서열 및 스페이서 길이가 NGS로 측정된 편집 수준 옆에 표시된다.

[0336]

[0337]

참조문헌

[0338]

1. Ahmad and Allen (1992) "Antibody-mediated Specific Binging and Cytotoxicity of Liposome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells *in Vitro*", Cancer Research 52:4817-20.

[0339]

2. Anderson (1992) "Human gene therapy", Science 256:808-13.

[0340]

3. Basha et al. (2011) "Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells", Mol. Ther. 19(12):2186-200.

[0341]

4. Behr (1994) "Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy", Bioconjugate Chem 5:382-89.

[0342]

5. Blaese et al. (1995) "Vectors in cancer therapy: how will they deliver", Cancer Gene Ther. 2:291-97.

[0343]

6. Blaese et al. (1995) "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years", Science 270(5235):475-80.

[0344]

7. Briner et al. (2014) "Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality", Molecular Cell 56:333-39.

[0345]

8. Buchschacher and Panganiban (1992) "Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes", J. Virol. 66:2731-39.

[0346]

9. Burstein et al. (2017) "New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes", Nature 542:237-41.

[0347]

10. Canver et al., (2015) "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis", Nature Vol. 527, Pgs. 192-214.

[0348]

11. Chang and Wilson (1987) "Modification of DNA ends can decrease end-joining relative to homologous recombination in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963.

[0349]

12. Charlesworth et al. (2019) "Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans", Nature Medicine, 25(2), 249.

[0350]

13. Chung et al. (2006) "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria", Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

[0351]

14. Coelho et al. (2013) "Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis" N. Engl. J. Med. 369, 819-829.

[0352]

15. Crystal (1995) "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success", Science

270(5235):404-10.

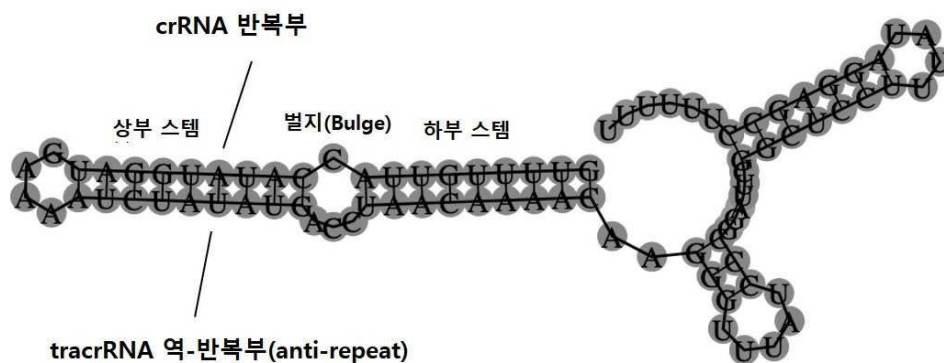
- [0353] 16. Dillon (1993) "Regulation gene expression in gene therapy" Trends in Biotechnology 11(5):167-173.
- [0354] 17. Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", Hum. Gene Ther. 8(1):111-23.
- [0355] 18. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", Blood 85:3048-57.
- [0356] 19. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy", Cancer Immunol Immunother 44:10-20.
- [0357] 20. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" Gene Ther. 2(10):710-22.
- [0358] 21. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis, ed. Doerfler and Böhlm, pp. 297-306.
- [0359] 22. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(21):9747-51.
- [0360] 23. Humbert et al., (2019) "Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates", Sci. Trans. Med., Vol. 11, Pgs. 1-13.
- [0361] 24. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", J Exp Med. 176(6):1693-702.
- [0362] 25. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", Science 337(6096):816-21.
- [0363] 26. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of Neurospora crassa and is expressed at high levels in the brain and thymus", J Virol 66(3):1635-40.
- [0364] 27. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", Mol Ther. 13(3):494-505.
- [0365] 28. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency", Nature Medicine 1:1017-23.
- [0366] 29. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", Br. Med. Bull. 51(1):31-44.
- [0367] 30. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", Nat Biotechnol. 27(7):643-51.
- [0368] 31. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease", PNAS 94(22):12133-38.
- [0369] 32. Maxwell et al. (2018) "A detailed cell-free transcription-translation-based assay to decipher CRISPR protospacer adjacent motifs", Methods 14348-57
- [0370] 33. Miller et al. (1991) "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus", J Virol. 65(5):2220-24.
- [0371] 34. Miller (1992) "Human gene therapy comes of age", Nature 357:455-60.
- [0372] 35. Mitani and Caskey (1993) "Delivering therapeutic genes - matching approach and application",

Trends in Biotechnology 11(5):162-66.

- [0373] 36. Nabel and Felgner (1993) "Direct gene transfer for immunotherapy and immunization", Trends in Biotechnology 11(5):211-15.
- [0374] 37. Nehls et al. (1996) "Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium" Science 272:886-889.
- [0375] 38. Remy et al. (1994) "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules", Bioconjugate Chem. 5(6):647-54.
- [0376] 39. Sentmanat et al. (2018) "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing", Scientific Reports 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8.
- [0377] 40. Sommerfelt et al. (1990) "Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19", J. Virol. 64(12):6214-20.
- [0378] 41. Van Brunt (1988) "Molecular framing: transgenic animals as bioactors" Biotechnology 6:1149-54.
- [0379] 42. Vigne et al. (1995) "Third-generation adenovectors for gene therapy", Restorative Neurology and Neuroscience 8(1,2): 35-36.
- [0380] 43. Wagner et al. (2019) "High prevalence of Streptococcus pyogenes Cas9-reactive T cells within the adult human population" Nature Medicine, 25(2), 242
- [0381] 44. Wilson et al. (1989) "Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the *gag* and *pol* proteins of Moloney murine leukemia virus", J. Virol. 63:2374-78.
- [0382] 45. Yu et al. (1994) "Progress towards gene therapy for HIV infection", Gene Ther. 1(1):13-26.
- [0383] 46. Zetsche et al. (2015) "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system" Cell 163(3):759-71.
- [0384] 47. Zuris et al. (2015) "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo" Nat Biotechnol. 33(1):73-80.

도면

도면1a



도면1b

V1 - 2 헤어핀



도면1c

V2 - 2 헤어핀



도면1d

V1 - 3 헤어핀



도면1e

V1

crRNA 반복부

별지

상부 스템

하부 스템

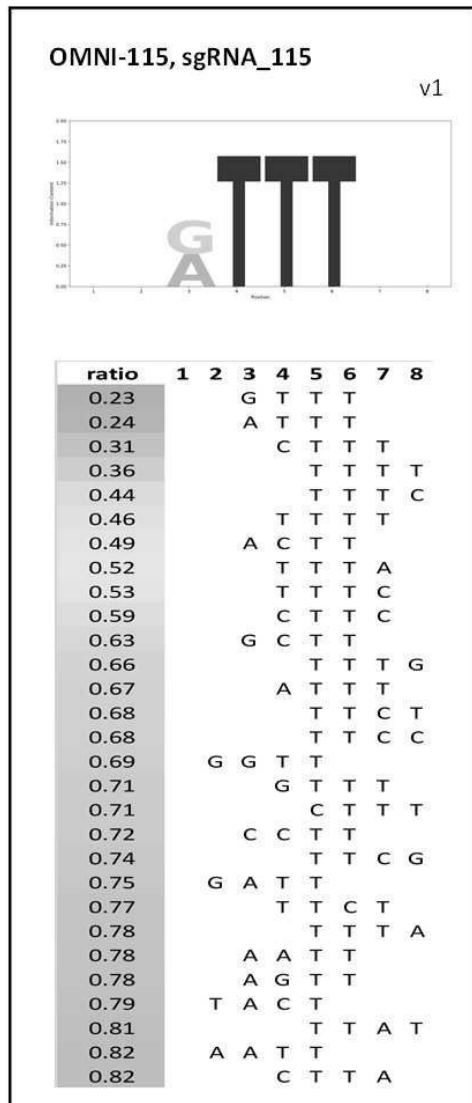
tracrRNA 역-반복부



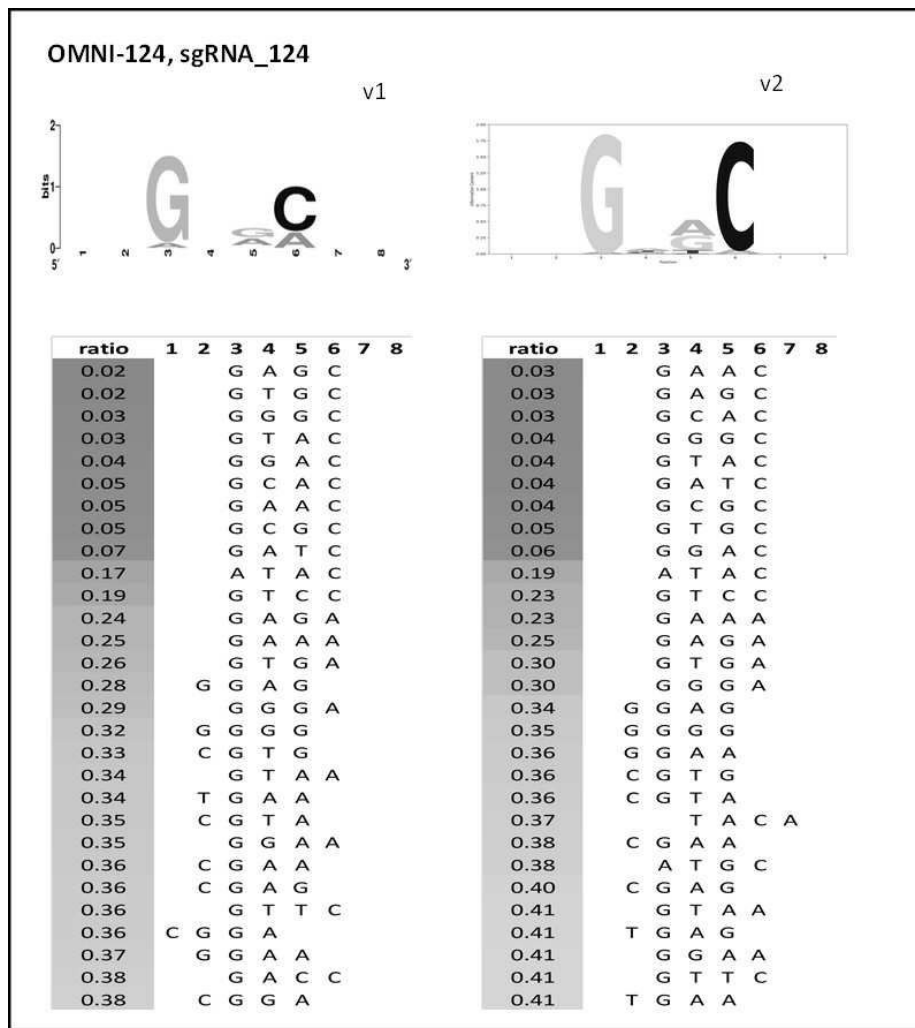
V2



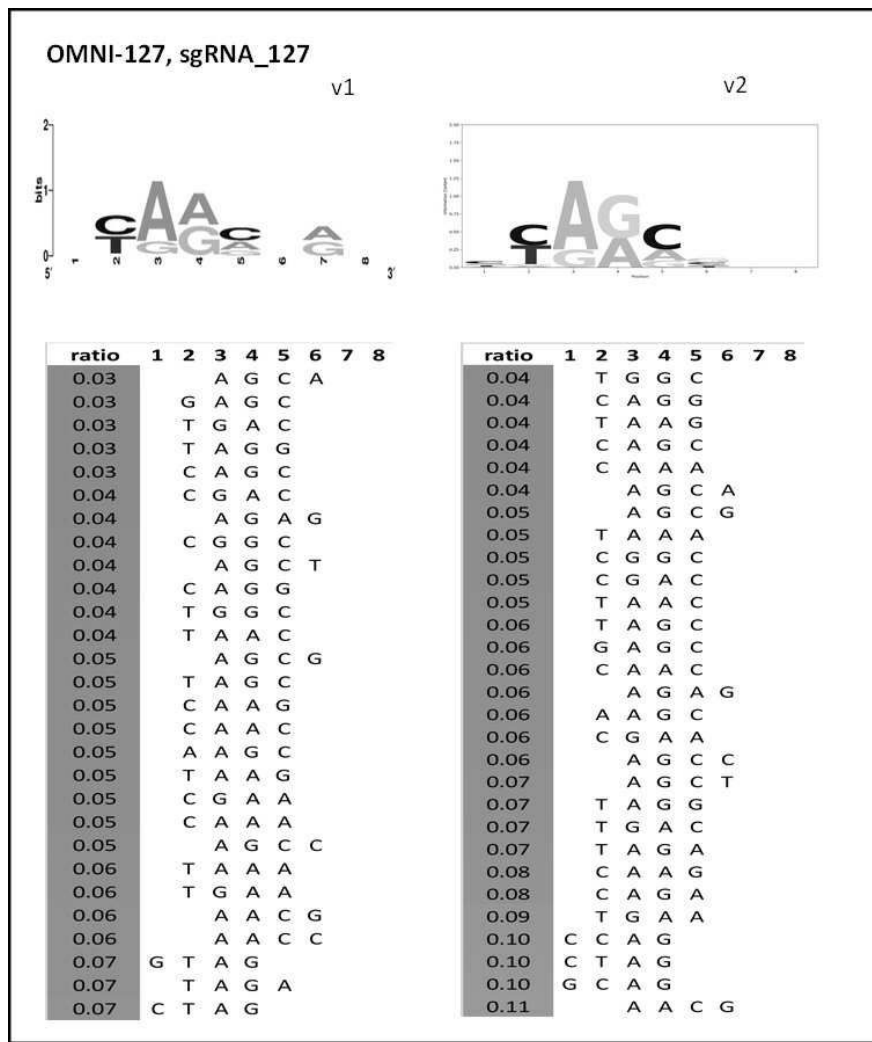
도면2



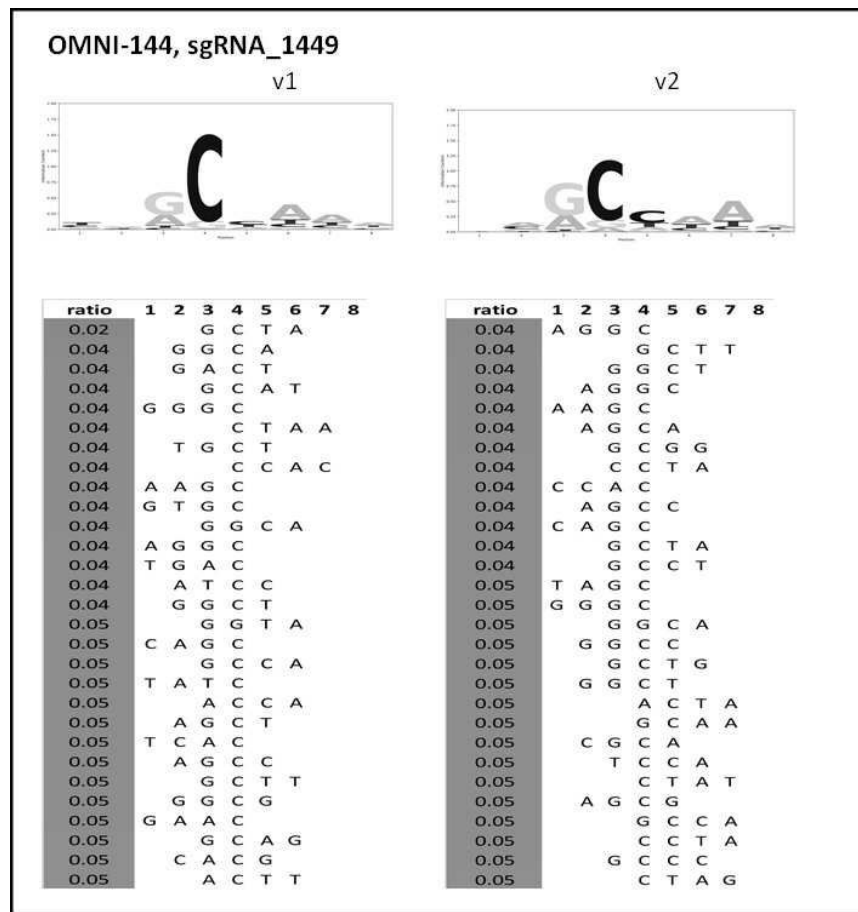
도면3



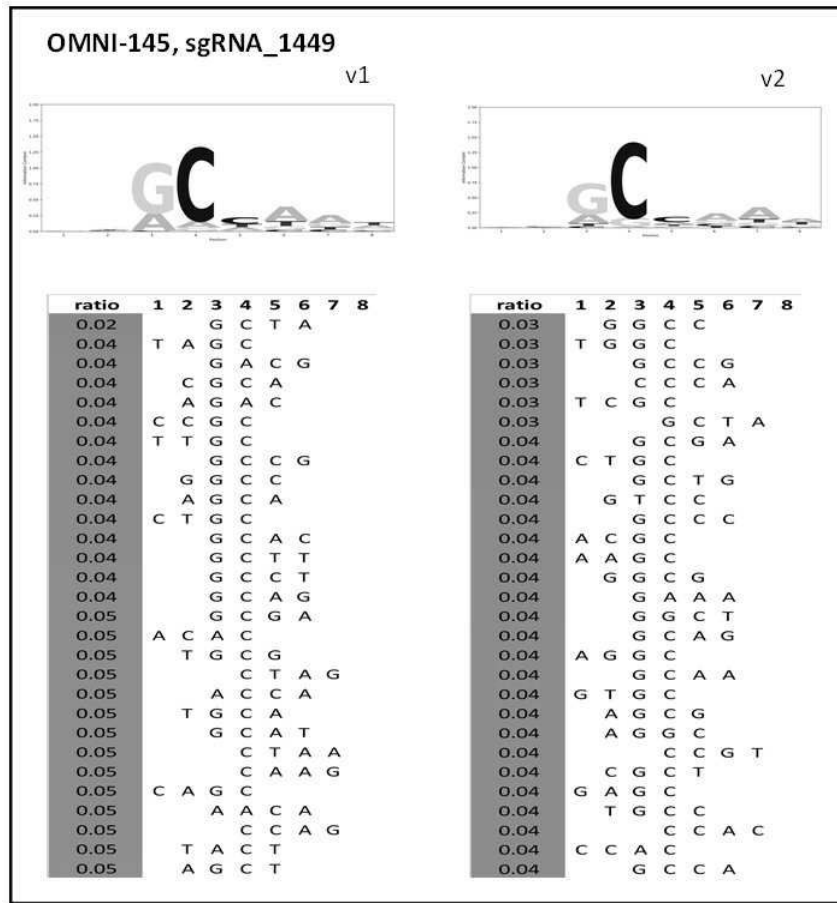
도면4



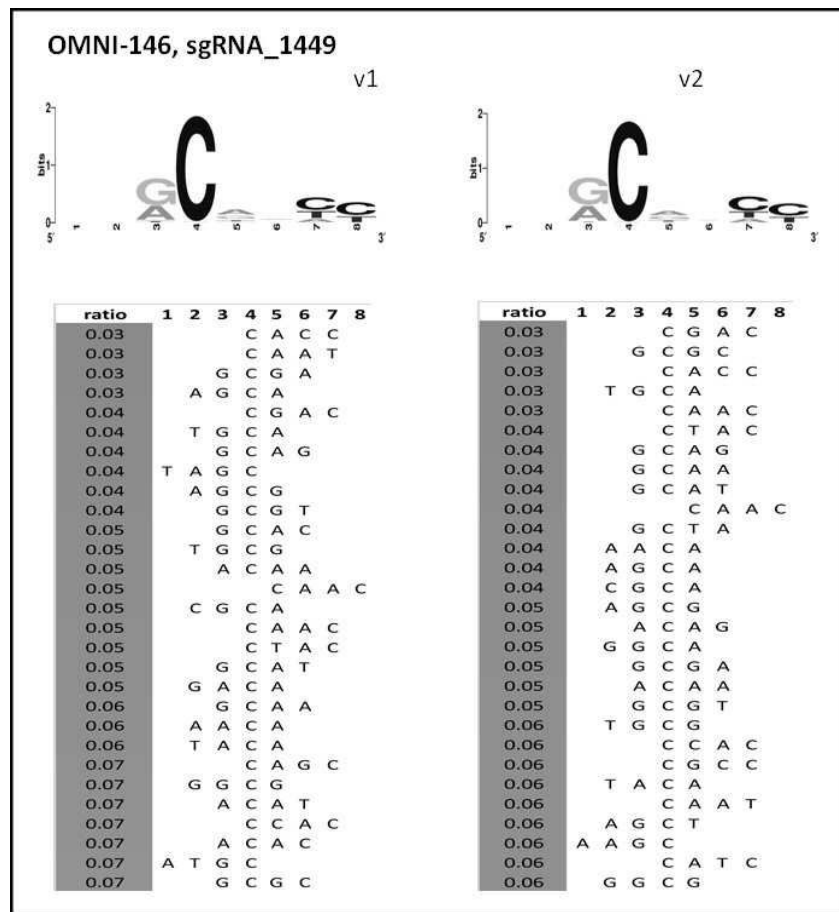
도면5



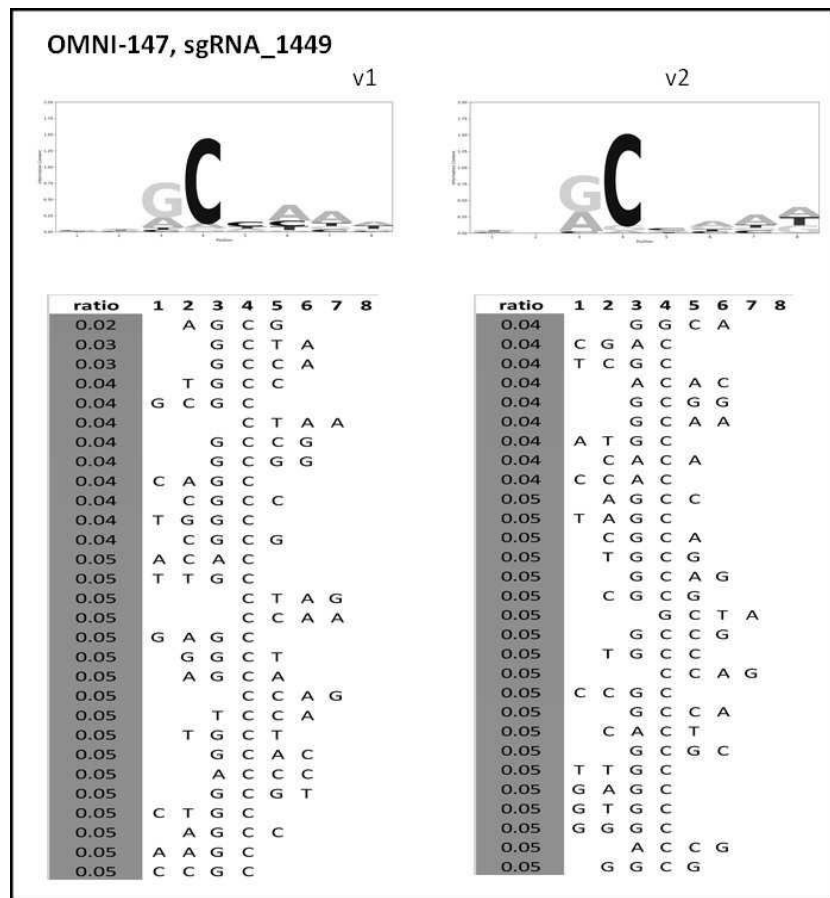
도면6



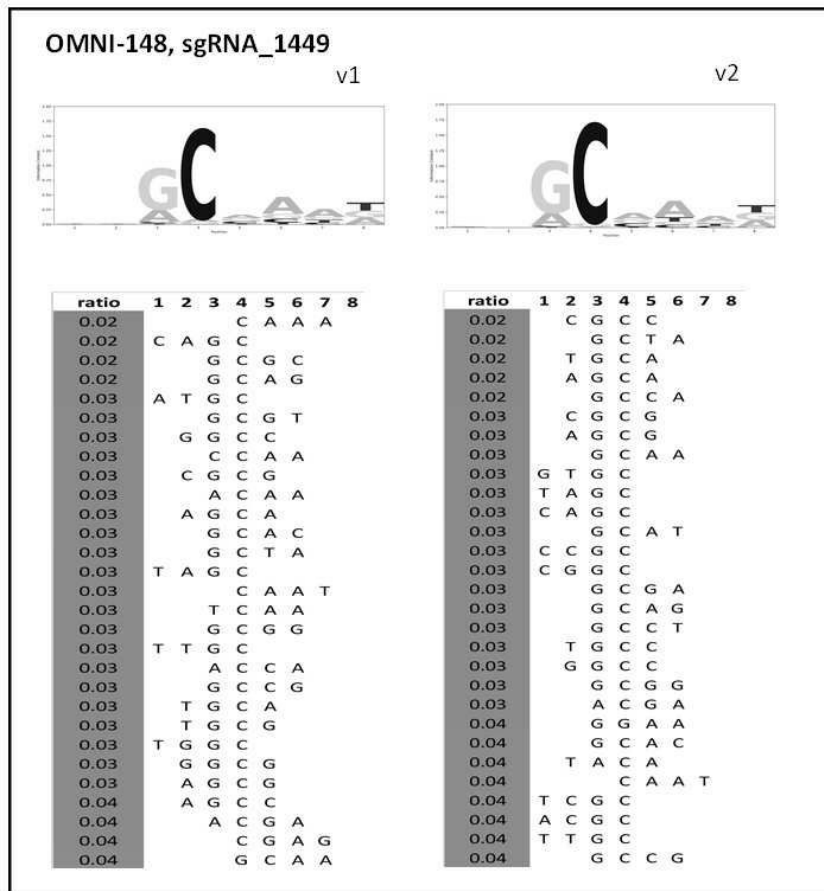
도면7



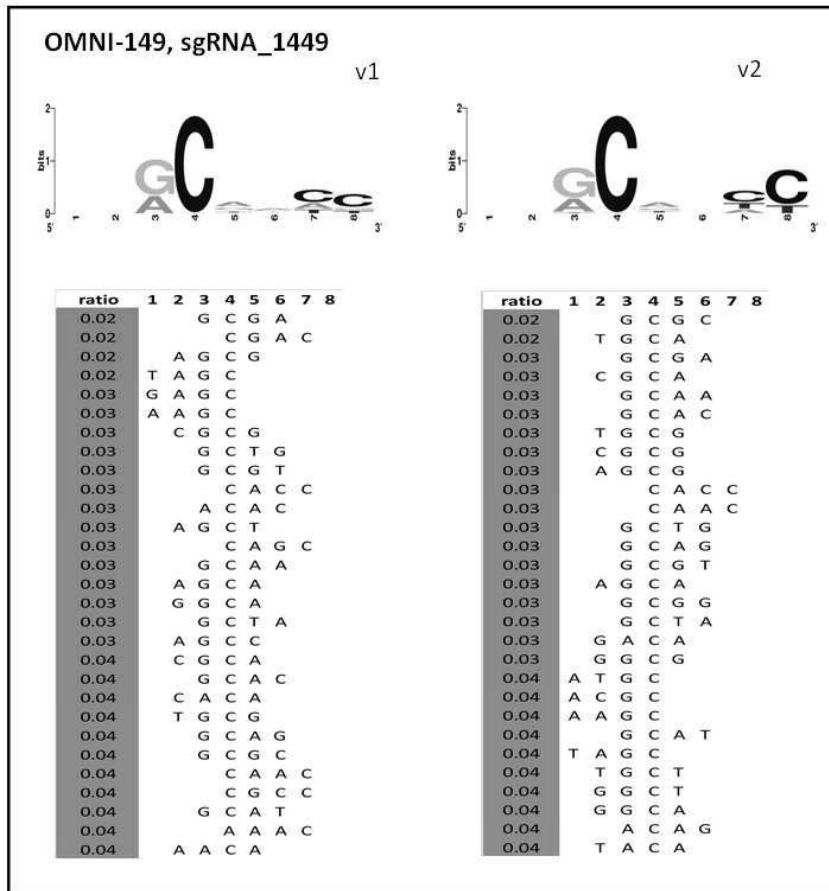
도면8



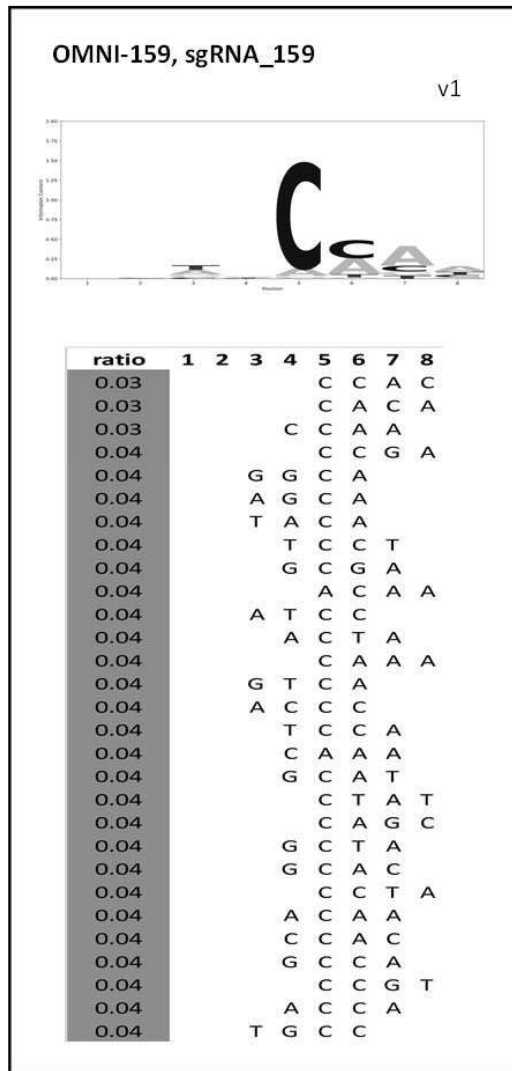
도면9



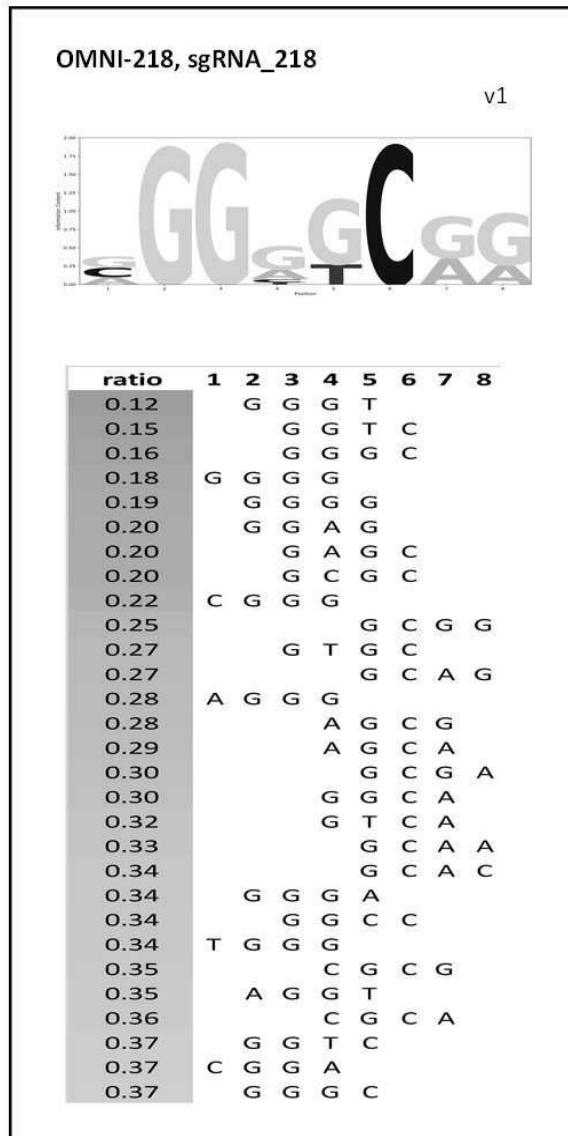
도면10



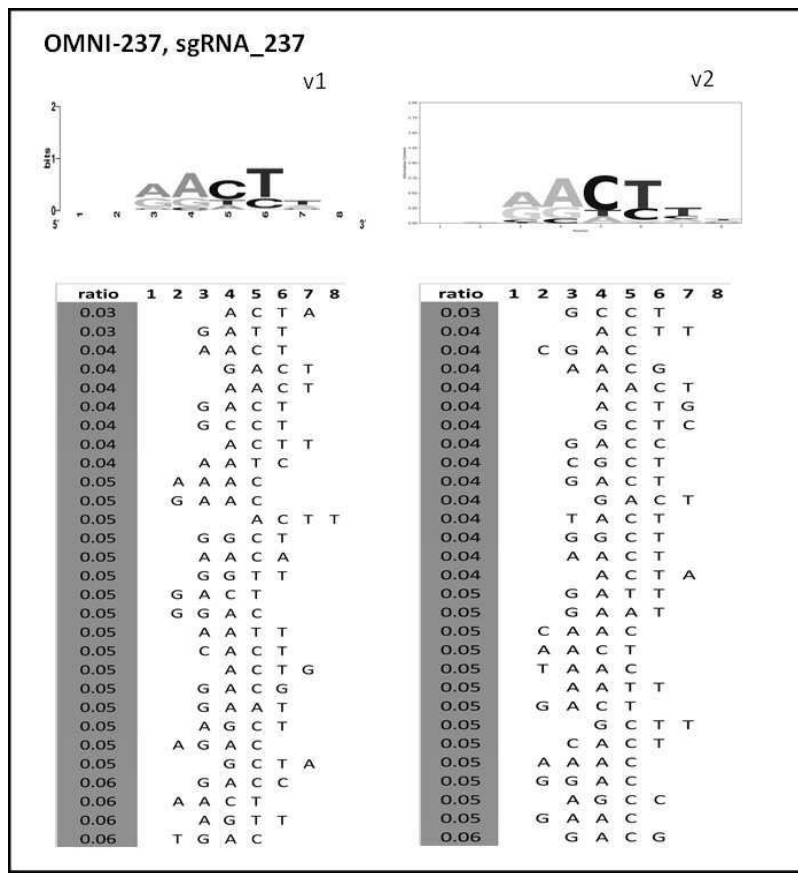
도면11



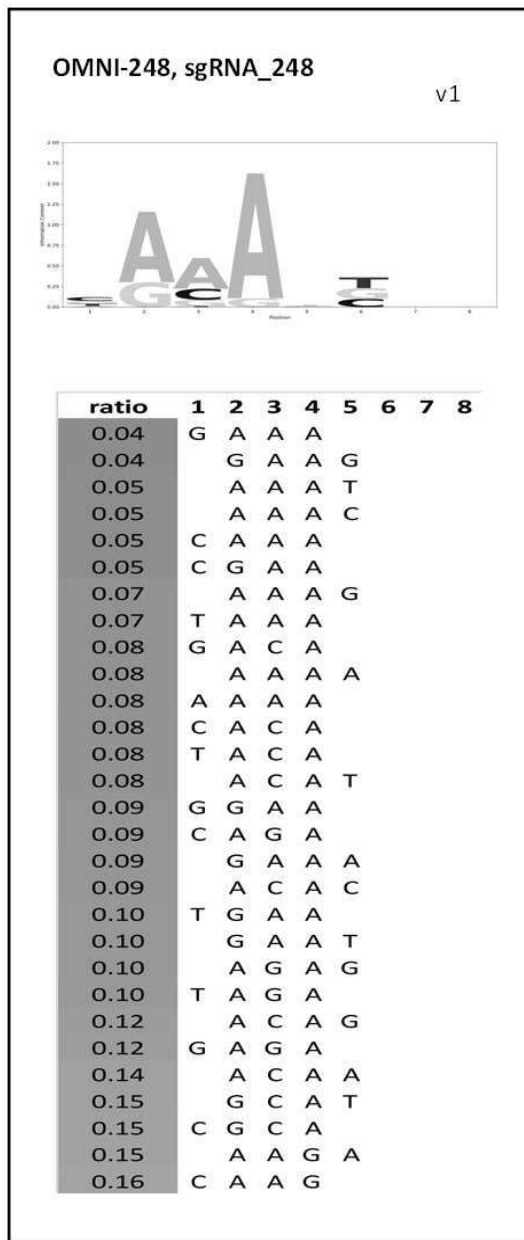
도면12



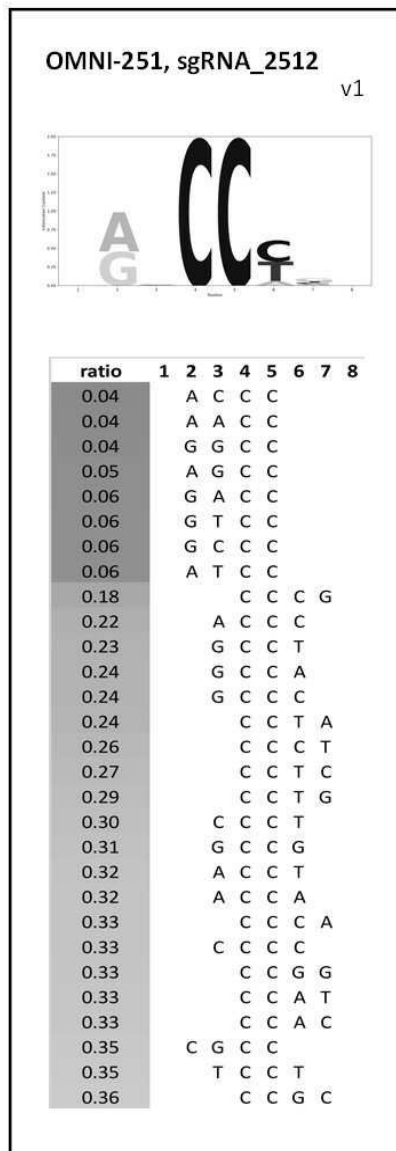
도면13



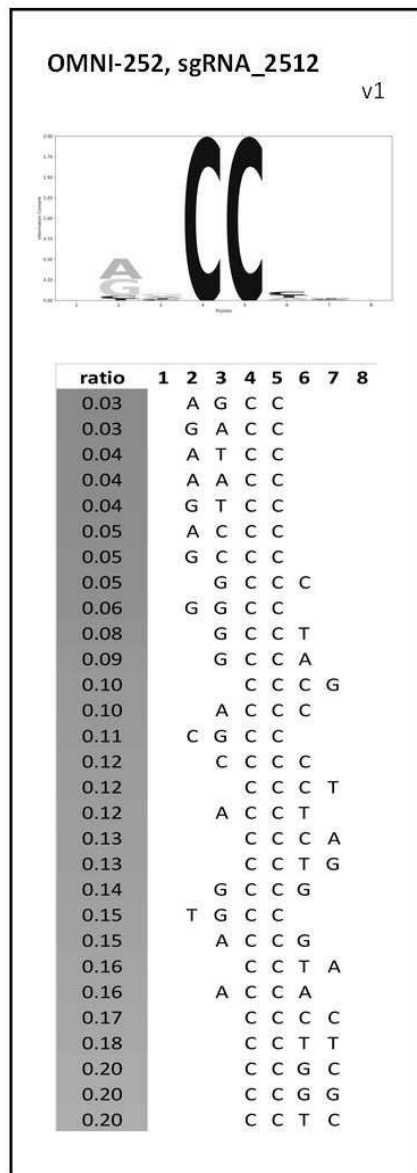
도면14



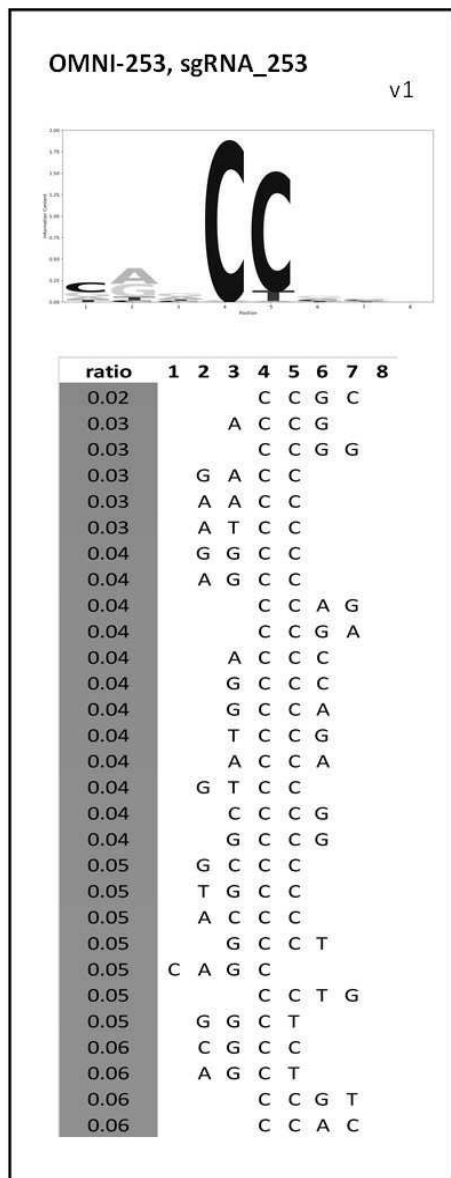
도면15



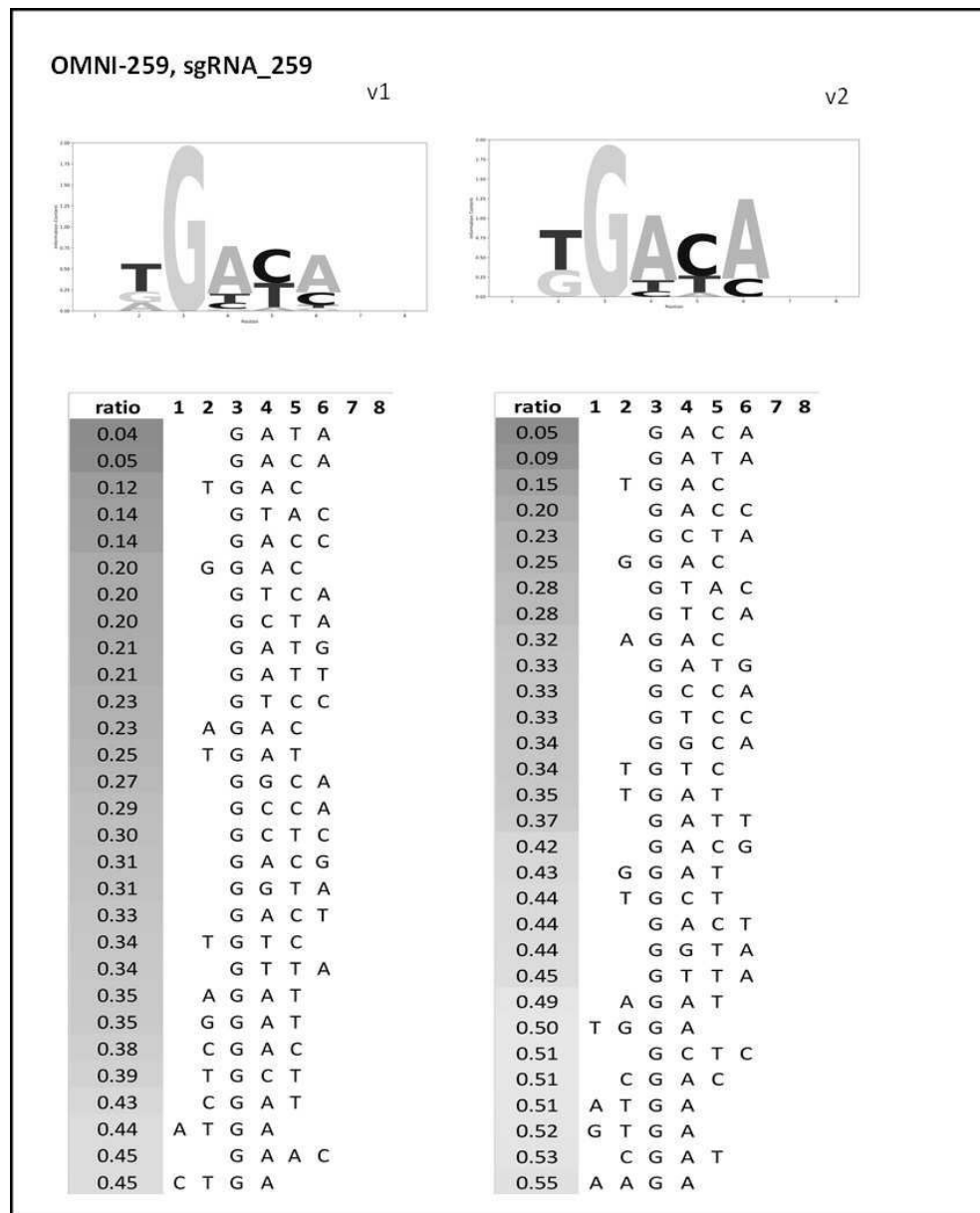
도면16



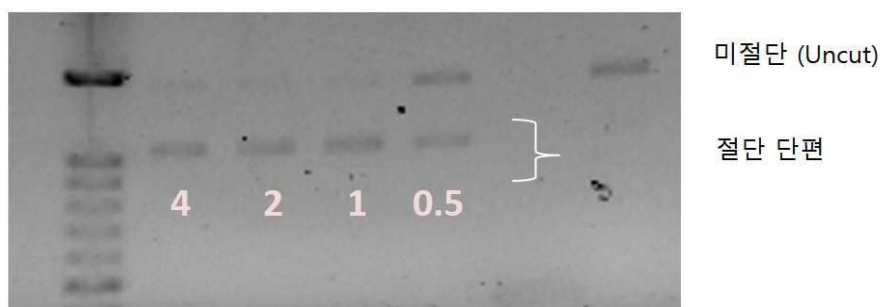
도면17



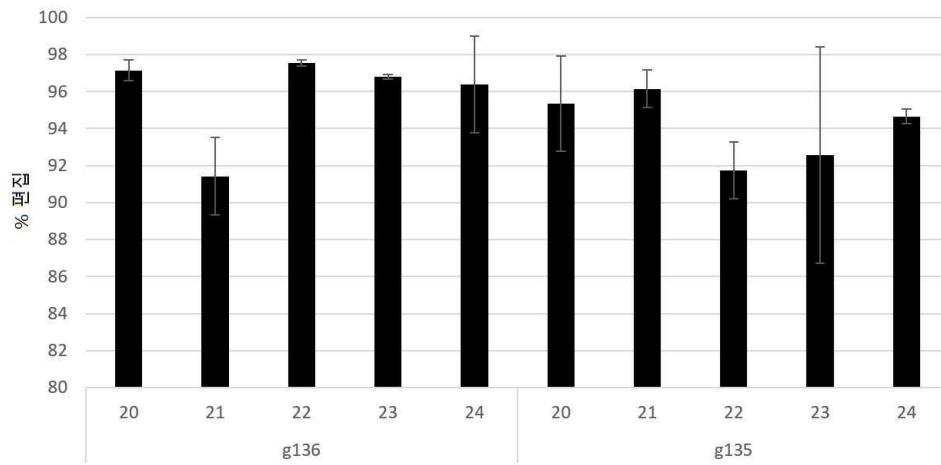
도면18



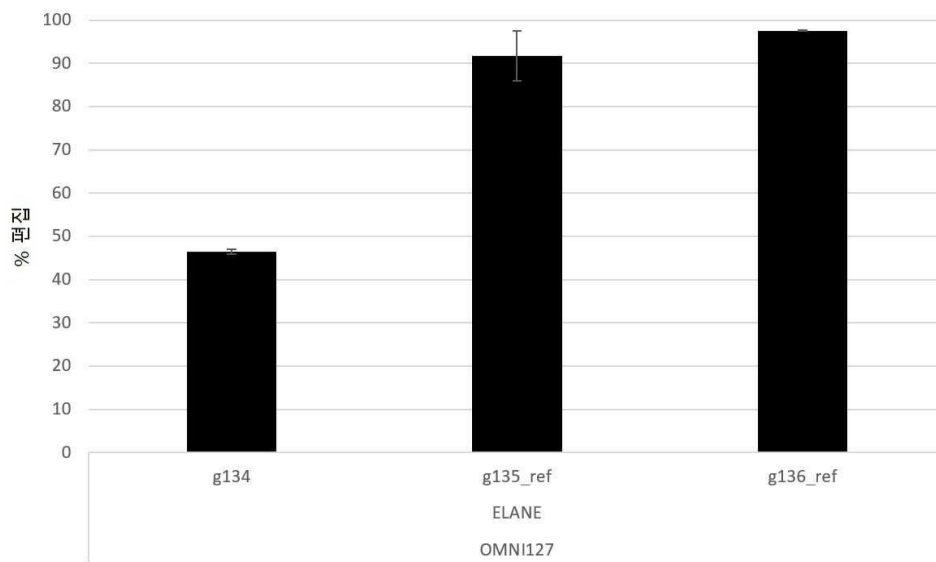
도면19a



도면19b



도면19c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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