



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월09일
(11) 등록번호 10-2805572
(24) 등록일자 2025년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 48/00 (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7018585
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월12일
심사청구일자 2019년11월05일
- (85) 번역문제출일자 2016년07월11일
- (65) 공개번호 10-2016-0089527
- (43) 공개일자 2016년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/070127
- (87) 국제공개번호 WO 2015/089462
국제공개일자 2015년06월18일
- (30) 우선권주장
61/915,145 2013년12월12일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
Nature Protocols. Oct 2013, 8(11):2281-2308.
W02013176772 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 메인 스트리트 415
매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 매사추세츠주 캠프리지 매사추세츠 애비뉴 77
- (72) 발명자
콩 레
미국 02142 매사추세츠주 캠프리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 씨/오
콕스 데이비드 벤자민 텔리츠
미국 02138 매사추세츠주 캠프리지 하버드 스트리트 375에이 아파트먼트 12에이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 20 항

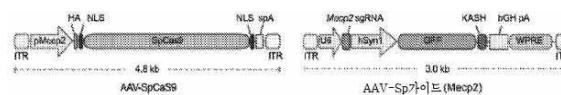
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **게놈 편집을 위한 CRISPR-CAS 시스템 및 조성물의 전달, 용도 및 치료적 응용**

(57) 요약

본 발명은 표적 서열의 서열 및/또는 활성의 조작을 위한 시스템, 방법, 및 조성물의 전달, 조작 및 최적화를 제공한다. 전달을 위한 부위로서 표적화된 전달 시스템 및 조직 또는 기관이 제공된다. 또한 CRISPR 복합체의 하나 이상의 성분을 인코딩하는 일부의 벡터 및 벡터 시스템뿐만 아니라 이러한 벡터를 설계 및 사용하는 방법도 또한 제공된다. 표적 인식을 위한 특이성 및 독성의 회피가 증가되도록 하고 관심 게놈 유전자좌에서 표적 부위를 편집 또는 변형시켜 질병 또는 질환의 상태를 변경시키거나 개선하도록 진핵 세포에서 CRISPR 복합체 형성을 유도하는 방법을 또한 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/1082 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/22 (2025.05)

(72) 발명자

하이덴라이히 마티아스

미국 02144 매사추세츠주 소머빌 체스터 스트리트
 53

플랫 랜덜 제프리

미국 02141 매사추세츠주 캠브리지 식스 스트리트
 72 아파트먼트 1

스비에흐 루카시

미국 02120 매사추세츠주 보스턴 그린위치 스트리트
 6 아파트먼트 3

장 평

미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 퍼시픽 스트리트
 100 아파트먼트 11

(30) 우선권주장

61/915,148	2013년12월12일	미국(US)
61/915,107	2013년12월12일	미국(US)
61/915,153	2013년12월12일	미국(US)
61/915,176	2013년12월12일	미국(US)
61/915,192	2013년12월12일	미국(US)
61/915,215	2013년12월12일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 눈에 국소화된 투여에 의해 안구 유전 질병을 치료하는데 사용하기 위한 CRISPR-Cas 시스템을 포함하는 조성물로서, 상기 CRISPR-Cas 시스템은 하기를 포함하고:

(A) 하나 이상의 핵 국소화 신호 (NLS) 에 융합된 Cas9 단백질, 또는 상기 Cas9 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, Cas9 는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) Cas9 (SaCas9) 임; 및

(B) CRISPR-Cas 시스템 RNA, 또는 상기 CRISPR-Cas 시스템 RNA 를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, CRISPR-Cas 시스템 RNA 는 안구 유전 질병과 연관된 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, tracr 메이트 서열 및 tracr 서열을 포함하고, CRISPR-Cas 시스템 RNA 는 상기 가이드 서열, tracr 메이트 서열 및 tracr 서열이 5' 에서 3' 방향으로 배열되어 있는 키메라 RNA 임;

(A) 및 (B) 는 전방내, 망막하, 안내 또는 유리체내 주입에 의한 전달 비히클 내에서 함께 전달되기 위해 제형화되고, 대상체의 눈에 함께 주입됐을 때, Cas9 및 CRISPR-Cas 시스템 RNA 를 포함하는 CRISPR-Cas 복합체를 형성할 수 있는 것인, 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, Cas9 는 2 개 이상의 NLS 에 융합되는, 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, Cas9 는 표적 서열의 위치에서 두 가닥 모두의 절단을 유도하는 뉴클레아제인, 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, Cas9 는 표적 서열의 위치에서 단일 가닥의 절단을 유도하는 니카아제인, 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, Cas9 는 RuvC 및/또는 HNH 도메인에 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, Cas9 는 이중 단백질 도메인에 융합된, 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 이중 단백질 도메인은 하기의 활성 중 하나 이상을 갖는, 조성물: 메틸라제 활성, 디메틸라제 활성, 전사 활성화 활성, 전사 억제 활성, 전사 방출 인자 활성, 히스톤 변형 활성, RNA 절단 활성 및 핵산 결합 활성.

청구항 7

제 1 항에 있어서, CRISPR-Cas 시스템은 2 개 이상의 CRISPR-Cas 시스템 RNA 를 포함하고, 각각은 다른 표적 서열을 표적화하는, 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, Cas9 는 CRISPR-Cas 시스템 RNA 와 복합되고, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화하고, 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하는, 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 안구 유전 질병은 망막 질병인, 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 안구 유전 질병은 유전성 망막 질병인, 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 안구 유전 질병은 레버씨 선천성 흑암시 (Leber's congenital amaurosis), 어셔 증후군 (Usher syndrome), 스타르가르트 질병 (Stargardt disease), 소르스비 이영양증 (Sorsby dystrophy), 색소성 망막염 또는 노인성 황반변성인, 조성물.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상동성-유도 수복을 위한 재조합 주형을 더 포함하는, 조성물.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 전달 비히클은 바이러스 벡터인, 조성물.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 전달 비히클은 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터인, 조성물.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 전달 비히클은 리포솜 또는 지질 입자인, 조성물.

청구항 16

제 1 항에 있어서, (A) 및 (B) 는 RNA 로서 전달되는, 조성물.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 조성물은 단일 용량 투여를 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 조성물은 망막하 또는 유리체내 주입에 의한 전달을 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 조성물은 AAV 벡터를 통해 눈에 망막하 또는 유리체내 주입에 의한 전달을 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 조성물은 단일 용량으로, 그리고 AAV 벡터를 통해 눈에 유리체내 주입 또는 망막하 주입을 통한 전달을 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원 및 참조에 의한 포함

[0002] 본 출원은 각각 2013년 12월 12일자로 출원된 US 가출원: 제61/915,176호; 제61/915,192호; 제61/915,215호; 제61/915,107호, 제61/915,145호; 제61/915,148호; 및 제61/915,153호에 대해 우선권을 주장한다.

[0003] 전술한 출원, 및 상기 출원에 또는 상기 출원의 절차 중에 인용된 모든 문헌("출원 인용 문헌") 및 상기 출원 인용 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌, 및 본원에서 인용되거나 참조된 모든 문헌("본원 인용 문헌") 및 본원 인용 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌은, 본원에 언급되거나 본원에 참고로 포함된 임의의 문헌에 언급된 임의의 제품에 대한 임의의 제조사의 지침서, 설명서, 제품 명세서 및 제품 시이트(sheet)와 함께, 본원에 참고로 포함되어 있으며, 그리고 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 모든 참조된 문헌은 마치 각각의 개별 문헌을 참고로 포함하는 것으로 특정적으로 그리고 개별적으로 나타내는 것과 동일한 정도로 참고로 포함된다.

[0004] 본 발명은 일반적으로 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드로믹 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR) 및 이의 성분에 관련된, 게놈 변동(genomic perturbation) 또는 유전자-편집(gene-editing)과 같은 서열 표적화에 관련된 유전자 발현의 조절을 위해 사용된 시스템, 방법, 및 조성물의 전달, 조작, 최적화 및 치료적 응용에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 포유류를 포함하는 동물에서의 게놈 편집을 통해 치료적 이점을 달성하기 위한 CRISPR-Cas 시스템의 전달을 위한 실험관내, 생체외 및/또는 생체내 시스템, 방법, 및 조성물에 관한 것이다.

[0005] 연방 정부가 후원하는 연구에 대한 성명

[0006] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 지급된 NIH 파ioni어 어워드(Pioneer Award) 1DP1MH100706 하에 정부 지원으로 수행되었으며 또한 보조금 1dP10D009552가 미국 국립 보건원에 의해 제공되었다. 정부는 본 발명에 소정의 권리를 갖는다.

배경 기술

[0007] 게놈 시퀀싱(sequencing) 기술 및 분석 방법의 최근의 진전에 의해, 다양한 생물학적 기능 및 질병(disease)과 관련된 유전적 요인을 분류하고 발견하는 능력이 상당히 촉진되었다. 개별 유전 요소의 선택적 변동을 가능하게 함으로써 원인이 되는 유전 변이의 체계적인 역의 조작을 가능하게 할 뿐 아니라, 합성 생물학, 생명공학 및 의학 응용을 진전시키기 위하여, 정밀한 게놈 표적화 기술이 필요하다. 게놈-편집 기술, 예를 들어, 디자이너 징크 핑거(ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터(effector)(TALE) 또는 귀소 메가뉴클레아제(homing meganuclease)가 표적화된 게놈 변동을 생성하는데 이용 가능하지만, 가격이 알맞고, 설립하기 용이하며, 확대 가능하고, 진핵

게놈 내의 다수의 위치를 표적화하는 데 부합되는 새로운 게놈 조작 기술이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 발명의 요약

[0009] 약물 개발에서 근거있는 치료적인 가설 및 강한 효과에도 불구하고, 소분자를 이용하여 강한 유전적 기여가 있는 질병을 치료하는 것은 제한된 수로만 성공하였다. 그러므로, 질병-발생 세포 및 조직 내의 핵산을 변형시킬 수 있는 치료적 전략에 관한 대안의 강력한 시스템이 시급하게 필요하다. 치료적 게놈 조작 방법의 레퍼토리에 CRISPR-Cas 시스템을 추가하여 방법을 상당히 단순화시켰으며 다양한 범위의 생물학적 기능 및 질병과 관련된 유전적 요인을 분류하고 발견하는 능력을 촉진시키고, 유전적 질병에 대한 동물 모델을 발전시키고, 안전하고 효과적인 치료적 대안을 개발하였다. 유해한 효과 없이 게놈 편집에 대해 효과적으로 CRISPR-Cas 시스템을 이용하기 위해, 청구된 발명의 양태인 이들 게놈 조작 도구의 조작, 최적화 및 세포-유형/조직/기관 특이 전달의 양태를 이해하는 것이 중요하다. 본 발명의 양태는 이러한 요구를 다루며 관련된 이점을 제공한다.

[0010] 예시적인 CRISPR 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열과 복합된 CRISPR 효소(예를 들어, Cas9)를 포함할 수 있다. 가이드 서열은 tracr 서열에 결국 혼성화하는 tracr 메이트 서열에 연결된다. 출원인은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)으로부터의 SaCas9를 사용하는 것을 포함하는, CRISPR-Cas 게놈 조작 시스템의 성분을 최적화하였다. 다양한 전달 수단이 생체의 및/또는 생체내에서 세포, 조직 및 기관에 CRISPR-Cas 시스템의 성분을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 출원인은 바이러스 전달 벡터, 예를 들어, AAV 내로 CRISPR-Cas 시스템 성분(예를 들어, SaCas9를 포함)을 효과적으로 패키징하였으며, 이것이 생체내에서 포유류 세포 내 내인성 게놈 서열을 변형시키는 데 사용될 수 있음을 입증하였다. 출원인의 본 발명의 핵심적인 특징은 (치료적 성분의) 생체내 전달의 낮은 효율 및 상동성 유도 수복(HDR)의 낮은 효율의 도전을 효과적으로 다루는 것이며 특히 공동-전달과 관련된 도전을 단일 아테노 연관 바이러스(AAV) 벡터 내로 쉽게 패키징되어 Cas9 단백질 및 이의 상응하는 sgRNA(들) 모두를 발현할 수 있는, 스태필로코커스 아우레우스로부터의 SaCas9인 작은 Cas9에 의해 해결된다. 또한, 중요하게, 출원인은 작은 SaCas9의 도입이 HDR을 실시하기 위해 요구되는 바이러스 벡터의 수를 3개 벡터로부터 2개 벡터까지 감소시켰음을 나타냈다. 본 발명의 양태에서 입자가 CRISPR-Cas 시스템의 하나 이상의 성분의 전달을 위해 사용될 수 있다. 그리고 접촉될 입자의 수는 하나 또는 두 개일 수 있다. 일 양태에서, 본 발명은 CRISPR-Cas 시스템의 하나 이상의 요소를 이용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 CRISPR 복합체는 게놈 유전자좌(genomic locus)에서의 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키기 위한 효과적인 수단을 제공하며, 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현과 연관되거나 질병 증상 또는 상태와 연관된 돌연변이를 포함하는 돌연변이와 연관된다. 본 발명의 CRISPR 복합체는 게놈 유전자좌 내의 표적 폴리뉴클레오티드의 변형 (예를 들어, 결실시키는, 삽입하는, 전위시키는, 불활성화시키는, 활성화시키는) 것을 포함하는 매우 다양한 유용성을 가지며, 이는 이러한 표적 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 이내를 포함한다. 이와 같이 본 발명의 CRISPR 복합체는 예를 들어, 유전자 또는 게놈 편집, 유전자 치료법, 약물 발견, 약물 스크리닝, 질병 진단, 및 예후에서의 광범위한 스펙트럼의 응용을 갖는다. 본 발명의 양태는 최적 활성을 갖는 가이드 RNA를 갖는 CRISPR-Cas9 시스템에서 개선된 표적화 특이성을 갖는, 야생형 Cas9보다 길이가 더 작은 Cas9 효소, 및 이를 코딩하는 핵산 분자, 및 키메라 Cas9 효소뿐만 아니라, Cas9 효소의 표적 특이성을 개선하는 방법 또는 최적 활성을 갖는 가이드 RNA를 설계하거나 제조하고 그리고/또는 야생형 Cas9 효소보다 더 작은 크기 또는 길이를 갖는 Cas9 효소를 선별하거나 제조하는 것을 포함하는 CRISPR-Cas9 시스템을 설계하는 방법에 관한 것으로, 야생형 Cas9에서보다 전달 벡터 내에 더 적은 코딩이 있으므로 전달 벡터 내로 이를 코딩하는 핵산의 패키징이 좀더 개선되고, 그리고/또는 키메라 Cas9 효소를 발생시킨다. 또한 의약에서 본 서열, 벡터, 효소 또는 시스템의 용도를 제공한다. 또한 유전자 또는 게놈 편집에서의 동일한 것의 용도를 제공한다.

[0011] 본 발명에서, Cas 효소는 임의의 천연-발생 박테리아 Cas9을 포함하는 야생형 Cas9일 수 있다. Cas9 오솔로그(orthologs)는 전형적으로 3-4 RuvC 도메인 및 HNH 도메인의 일반 구성을 공유한다. 5'의 대부분 RuvC 도메인은 비-상보적 가닥을 절개하고, HNH 도메인은 상보적 가닥을 절개한다. 모든 표기법은 가이드 서열에 대한 참조에 있다. 5' RuvC 도메인의 촉매 잔기는 (스트렙토코커스 피오게네스 제II형 CRISPR 유전자좌, 스트렙코커스 써모필러스 CRISPR 유전자좌 1, 스트렙코커스 써모필러스 CRISPR 유전자좌 3, 및 프란시스실리아 노비시다(*Franciscilla novicida*) 제II형 CRISPR 유전자좌로부터의) 다른 Cas9 오솔로그와 관심 Cas9의 상동 비교를 통해 확인되며, 보존된 Asp 잔기 (D10)는 알라닌으로 돌연변이되어 Cas9를 상보적-가닥 닉킹 효소로 전환시킨다. 유사하게, HNH 도메인의 보존된 His 및 Asn 잔기는 알라닌으로 돌연변이되어 Cas9를 비-상보적-가닥 닉킹 효소로 전환시킨다. 몇몇 구현예에서, 두 세트의 돌연변이 모두는 Cas9를 비-절단 효소로 전환하기 위해 만들어질

수 있다. 따라서, Cas 효소는 임의의 천연-발생 박테리아 Cas9를 포함하는 야생형 Cas9일 수 있다. CRISPR, Cas 또는 Cas9 효소는 특이 유형의 인간 세포, 또는 임의의 키메라, 돌연변이체, 상동체 또는 오솔로그를 포함하는 변형된 버전을 포함하는 인간 세포에 최적화된 코돈일 수 있다. 본 발명의 추가 양태에서, Cas9 효소는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있으며 작용성 도메인과 융합하거나 융합하지 않고 총칭적인 DNA 결합 단백질로서 사용될 수 있다. 돌연변이는 인공적으로 도입된 돌연변이 또는 기능-추가 또는 기능-손실 돌연변이일 수 있다. 돌연변이는 각각 RuvC 및 HNH 측매 도메인 내의 측매 도메인 (D10 및 H840) 중 하나 내에 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 돌연변이는 특성화되었다. 본 발명의 일 양태에서, 전사 활성화 도메인은 VP64일 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 전사 억제제 도메인은 KRAB 또는 SID4X일 수 있다. 본 발명의 다른 양태는 전사 활성화제, 억제제, 재조합효소, 전이효소, 히스톤 리모델, 디메틸라제, DNA 메틸트랜스퍼라제, 크립토크롬, 광 유도성/조절 도메인 또는 화학적 유도성/조절 도메인을 포함하나 이에 제한되지 않는 도메인에 융합되는 돌연변이된 Cas 9 효소에 관한 것이다. 본 발명은 sgRNAs 또는 tracrRNAs 또는 세포 내의 이들 RNA의 성능을 증가시키도록 하는 가이드 또는 키메라 가이드 서열을 포함할 수 있다. CRISPR 효소는 제I형 또는 제III형 CRISPR 효소, 바람직하게는 제II형 CRISPR 효소일 수 있다. 이러한 제II형 CRISPR 효소는 임의의 Cas 효소일 수 있다. 바람직한 Cas 효소는 이와 같은 Cas9가 제II형 CRISPR 시스템으로부터 다수의 뉴클레아제 도메인을 갖는 가장 큰 뉴클레아제에 대한 상동성을 공유하는 일반적인 효소 부류를 나타낼 수 있음이 확인될 수 있다. 가장 바람직하게는, Cas9 효소는 spCas9 또는 saCas9로부터 온 것이거나 유래된 것이다. 유래되는 것은, 출원인은 유래된 효소가 야생형 효소와 높은 정도의 서열 상동성을 가진다는 것에 있어서 대체로 근거하나 상기 기술된 바와 같이 일부 방식으로 돌연변이(변형)된 것이라는 것을 의미하는 것이다.

[0012] 용어 Cas 및 CRISPR 효소는 다른 방식으로 나타내지 않는 한, 일반적으로 서로 교환 가능하게 사용되는 것으로 인정될 것이다. 상기 언급된 바와 같이, 본원에 사용된 많은 잔기 넘버링은 스타필로코커스 피오게네스의 제II형 CRISPR 유전자좌로부터의 Cas9 효소에 대해 언급된다. 그러나, 본 발명이 SpCas9, SaCas9, St1cas9 등과 같은 다른 종의 미생물로부터의 더 많은 Cas9를 포함하는 것으로 인정될 것이다. 추가의 예가 본원에 제공된다. 숙련자는 관련 아미노산 서열에 비교에 의해 SpCas9외에 Cas9 효소에서의 적합한 상응 잔기를 결정할 수 있을 것이다. 그러므로, 특이 아미노산 대체가 SpCas9 넘버링을 사용하여 언급되면, 문맥이 이를 다른 Cas9 효소에 대해 언급되는 의도가 아님을 명백하게 하지 않는 한은, 본원은 다른 Cas9 효소에서의 상응하는 변형을 포함하는 의도이다. 인간에 대해서 최적화된 이러한 사례(즉, 인간에서의 발현에 대해 최적화됨)에서의 코돈 최적화 서열의 예는 본원에 제공되며, SaCas9 인간 코돈 최적화 서열을 참고하라. 이는 바람직하지만, 다른 예들이 가능하며 숙주 종에 대한 코돈 최적화가 공지됨이 인정될 것이다. 본 발명은 Cas9가 키메라 Cas9 단백질인 방법을 이해한다. 이들 방법은 하나 이상의 다른 또는 또다른 Cas9 상동체의 C-말단 단편(들)을 갖는 하나의 Cas9 상동체의 N-말단 단편(들)을 포함할 수 있다. 생물은 동물인 본 방법에서 변형은 생체의 또는 실험관내, 예를 들어 세포 배양 및 일부 실험에서는 생체내가 아닌 경우에서 발생할 수 있음이 이해될 것이다. 다른 구현예에서, 생체 내에서 발생할 수 있다. 본 발명은 몇몇 구현예에서 본 발명의 조성물 또는 이의 CRISPR 효소(CRISPR 효소를 포함하거나 대안적으로 이를 인코딩하는 mRNA를 포함함)를 포함하며, 표적 서열은 5'-모티프를 포함하는 PAM (프로토스페이서 인접 모티프) 서열이 이의 3' 말단의 측면에 위치하게 되며, 특히 Cas9는 스트렙토코커스 피오게네스 또는 스타필로코커스 아우레우스 Cas9이다(또는 이로부터 유래된 것이다). 예를 들어, 적합한 PAM은 SpCas9 또는 SaCas9 효소(또는 유래된 효소)에 대한 5'-NRG 또는 5'-NNGRR (N은 임의의 뉴클레오티드)이다. SpCas9 또는 SaCas9는 스트렙토코커스 피오게네스 또는 스타필로코커스 아우레우스 Cas9로부터 온 것이거나 이로부터 유래된 것이 이해될 것이다.

[0013] 일 양태에서, 본 발명은 관심있는 게놈 유전자좌의 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법을 제공하며, 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이에 연관된 것이고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0014] 하기를 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 전달함:

[0015] A) I. CRISPR-Cas 시스템 키메라 RNA (chiRNA) 폴리뉴클레오티드 서열, 여기에서 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함하며:

[0016] (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,

[0017] (b) tracr 메이트 서열, 및

[0018] (c) tracr 서열, 및

- [0019] II. 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함하는 CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열,
- [0020] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0021] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0022] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고 CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이며; 및
- [0023] 방법은 또한 임의로 HDR 주형을, 예를 들어, 바이러스 전달 벡터 또는 입자를 통해 전달하는 것을 포함하며, HDR 주형은 단백질의 정상 또는 적은 이상 형태의 발현을 제공하며; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으키는 단백질 발현일 수 있으며; 및
- [0024] 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 상기 이상 단백질을 발현하는 세포를 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고 바이러스 벡터 또는 입자(들)을 상기 세포와 접촉시켜 변형된 세포 집단을 수득하는 것을 실시하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고, 임의로 생물 또는 비-인간 생물로 변형된 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0025] 일 양태에서, 본 발명은 관심 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법을 제공하며, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질환 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 것이고, 상기 방법은 하기를 포함한다: 하기를 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물을 함유하는 바이러스 벡터 또는 입자와 세포를 접촉함: I. (a) HSC에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및 (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열, II. 임의로 하나 이상의 NLS를 갖는 CRISPR 효소, 및 III. tracr 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열로서 tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며, CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고; 및
- [0026] 방법은 임의로 HDR 주형을, 예를 들어, 바이러스 전달 벡터 또는 입자를 통해 전달하는 것을 또한 포함할 수 있으며, HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 및
- [0027] 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 상기 이상 단백질을 발현하는 세포를 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고, 바이러스 벡터 또는 입자(들)을 상기 세포와 접촉시켜 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고, 임의로 생물 또는 비-인간 생물로 변형된 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0028] 전달은 CRISPR-복합체 중 임의의 하나 이상 또는 모두를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 이는 유리하게는 예를 들어 조절 요소(들)에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드(들)을 함유하는 벡터를 함유하는, 입자(들)을 통해 생체내 발현을 위해 하나 이상의 조절 요소에 연결된다. CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 가이드 서열, tracr 메이트 서열 또는 tracr 서열 중 임의의 것 또는 모두는, RNA일 수 있다. RNA이고 tracr 메이트 서열과 같은 특징을 '포함한다'는 것으로 말해지는 폴리뉴클레오티드를 참조하는 경우, RNA 서열은 이 특징을 포함하는 것이 이해될 것이다. 폴리뉴클레오티드는 DNA이고 상기 tracr 메이트 서열과 같은 특징을 포함하는 것으로 말해지는 경우, DNA 서열은 이슈가 있는 특징을 포함하는 RNA이거나 이로 전사될 수 있다. 특징이 CRISPR 효소와 같은 단백질인 경우, DNA 또는 RNA 서열은 전사되거나 전사될 수 있는 것으로 언급된다(그리고 DNA의 경우에는 우선 전사됨).
- [0029] 특정 구현예에서 본 발명은 관심 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작에 의해 생물, 예를 들어, 인간 또는 비-인간 포유동물 또는 생물을 포함하는 포유동물을 변형시키는 방법을 제공하며, 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 것이고, 이 방법은 예를 들어, 비-천연 발생하거나 조작된 조성물을 세포 또는 세포 집단과 접촉시키는 것을 통해 전달하는 것을 포함하고, 조성물은 이의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 바이러스, 플라스미드, 또는 핵산 분자 벡터(들) (예를 들어 RNA)을 포함하는 하나 이상의 전달 벡터 또는 입자를 포함하고 조성물은 하기를 포함한다: (A) I. CRISPR-Cas 시스템 키메라 RNA (chiRNA) 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서 폴리뉴클레오티드 서열은 (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, (b) tracr 메이트 서열, 및 (c) tracr 서열을 포함하고, II. 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열 (또는 일부 구현예로서 임의로

적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열이 NLS를 포함하지 않을 수 있음)을 포함하는 CRISPR 효소를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고, 성분 I 및 II는 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고, 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며, CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, 또는 (B) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물 I. (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및 (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소, II. CRISPR 효소를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 및 III. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소로서 성분 I, II 및 III은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고, 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며, CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고; 방법은 임의로 예를 들어, HDR 주형을 함유하는 다른 전달 벡터 또는 입자를 갖는 세포 또는 세포 집단을 포함하거나 접촉하는 세포 또는 세포 집단을 접촉하는 전달 벡터 또는 입자를 통해 HDR 주형을 전달하는 것을 또한 포함할 수 있으며, HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 및 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 상기 이상 단백질을 발현하는 세포를 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고 전달 벡터 또는 입자(들)을 상기 이상 단백질을 발현하는 상기 세포와 접촉시켜 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고, 임의로 생물 또는 비-인간 생물에게 변형된 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 성분 I, II 및 III은 동일한 벡터 상에 위치한다. 다른 구현예에서, 성분 I 및 II는 동일한 벡터 상에 위치하며, 성분 III은 다른 벡터 상에 위치한다. 다른 구현예에서, 성분 I 및 III은 동일한 벡터 상에 위치하고, 반면에 성분 II는 다른 벡터 상에 위치한다. 다른 구현예에서, 성분 II 및 III은 동일한 벡터 상에 위치하고, 성분 I은 다른 벡터 상에 위치한다. 다른 구현예에서, 성분 I, II 및 III 각각은 다른 벡터 상에 위치한다. 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 바이러스 또는 플라스미드 벡터 시스템을 제공한다.

[0030] 표적 서열의 조작에서, 출원인은 또한 표적 서열의 후성적 조작을 의미한다. 이는 예컨대 표적 서열의 메틸화 상태 (즉 메틸화 또는 메틸화 패턴 또는 CpG 아이슬란드의 삽입 또는 제거), 표적 서열에 대한 접근성을 증가시키거나 감소시키는 히스톤 변형, 또는 3D 폴딩의 촉진에 의한 표적 서열의 염색질 상태일 수 있다. 관심 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작에 의한 인간 또는 비-인간 포유동물 또는 생물을 포함하는 생물 또는 포유동물을 변형시키는 방법을 언급할 경우, 이는 생물 (또는 포유류)에 그 생물(생물이 다세포일 경우)로부터의 전체 또는 단지 단일 세포 또는 세포 집단으로서 적용될 수 있음이 이해될 것이다. 인간의 경우, 예로서, 출원인은 그 중에서도 단일 세포 또는 세포의 집단을 예상하며 이들은 바람직하게는 생체의 변형된 후 재도입될 수 있다. 이 경우에, 생검 또는 다른 조직 또는 생물학적 유체 시료가 필요할 수 있다. 줄기 세포는 또한 특히 이에 대하여 바람직하다. 그러나, 물론, 생체내 구현에도 예상된다. 그리고 본 발명은 특히 안구 세포, 망막 세포, 혈관 세포, 상피 세포, 내피 세포, 및 달팽이관 세포에 유리하다.

[0031] 본 발명은 몇몇 구현예에서 세포 또는 세포 집단의 관심 게놈 유전자좌의 DNA 듀플렉스의 반대 가닥 상의 제1 및 제2 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법을 포함하며, 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 것으로, 방법은 예를 들어, 세포 또는 세포 집단을 전달 벡터, 예를 들어, 하기를 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물을 포함하는 바이러스 벡터 또는 입자와 접촉시켜 전달하는 것을 포함한다:

[0032] I. 제1 CRISPR-Cas 시스템 키메라 RNA (chiRNA) 폴리뉴클레오티드 서열, 여기에서 제1 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함하고:

[0033] (a) 제1 표적 서열에 혼성화할 수 있는 제1 가이드 서열,

[0034] (b) 제1 tracr 메이트 서열, 및

[0035] (c) 제1 tracr 서열,

[0036] II. 제2 CRISPR-Cas 시스템 chiRNA 폴리뉴클레오티드 서열, 여기에서 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함하고:

- [0037] (a) 제2 표적 서열에 혼성화할 수 있는 제2 가이드 서열,
- [0038] (b) 제2 tracr 메이트 서열, 및
- [0039] (c) 제2 tracr 서열, 및
- [0040] III. 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함하고 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고; 또는
- [0041] IV. I 내지 III의 하나 이상, 예를 들어, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열의 발현 산물(들)인 CRISPR 효소이고;
- [0042] 전사됐을 때, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열이 제1 및 제1 tracr 서열에 각각 혼성화하고 제1 및 제2 가이드 서열은 각각 제1 및 제2 표적 서열에 대한 제1 및 제2 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하고, 제1 CRISPR 복합체는 (1) 제1 표적 서열에 혼성화하는 제1 가이드 서열, 및 (2) 제1 tracr 서열에 혼성화하는 제1 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, 제2 CRISPR 복합체는 (1) 제2 표적 서열에 혼성화하는 제2 가이드 서열, 및 (2) 제2 tracr 서열에 혼성화하는 제2 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이고, 제1 가이드 서열은 제1 표적 서열 근처의 DNA 듀플렉스의 한 가닥의 절단을 유도하고 제2 가이드 서열은 이중 가닥 파손을 유도하는 제2 표적 서열 근처의 다른 가닥의 절단을 유도하여, 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키고; 방법은 예를 들어, HDR 주형을 포함하는 세포 또는 세포 집단과 접촉하거나 HDR 주형을 함유하는 다른 전달 벡터를 갖는 세포 또는 세포 집단과 접촉하는 전달 벡터를 통해 HDR 주형을 전달하는 단계를 또한 임의로 포함할 수 있으며, HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 세포 또는 세포 집단을 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고 전달 벡터 또는 입자(들)을 세포 또는 세포 집단과 접촉시켜 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하는 단계를 포함할 수 있다. 조성물의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 하나 이상의 바이러스 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물을 전달하는 것을 포함하는, 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하는 상기 게놈 유전자좌와 관련된 질병을 모델링하는 방법으로서, 여기에서 조성물은 하기를 포함한다:
- [0043] (A) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물
- [0044] I. CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함함
- [0045] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0046] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0047] (c) tracr 서열, 및
- [0048] II. 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 임의로 포함하는, SaCas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소,
- [0049] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0050] 성분 I 및 II는 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0051] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0052] 여기에서 CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 SaCas9를 포함하고,
- [0053] 또는
- [0054] (B) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물

- [0055] I. 하기에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소
- [0056] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0057] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0058] II. SaCas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 및
- [0059] III. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소,
- [0060] 여기에서 성분 I, II 및 III은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0061] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며, 및
- [0062] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 SaCas9를 포함하고, 임의로 생물 또는 비인간 생물에 변형된 세포를 투여한다. 본 발명의 몇몇 방법에서 임의의 또는 모든 CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 제1 및 제2 가이드 서열, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열 또는 제1 및 제2 tracr 서열은 RNA이다. 본 발명의 추가 구현예에서 CRISPR 효소를 인코딩하는 서열, 제1 및 제2 가이드 서열, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열 또는 제1 및 제2 tracr 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 RNA이고 리포솜, 나노입자, 엑소솜, 미세세포, 또는 유전자총을 통해 전달되나; 전달은 바이러스 벡터 또는 입자를 통한 것이 유리하다. 본 발명의 특정 구현예에서, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열은 100% 동일성을 공유하고 그리고/또는 제1 및 제2 tracr 서열은 100% 동일성을 공유한다. 몇몇 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 CRISPR 효소는 Cas9 효소, 예를 들어 SpCas9 또는 SaCas9이다. 본 발명의 양태에서 CRISPR 효소는 촉매 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 여기에서 SpCas9에 관한 하나 이상의 돌연변이는 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및 D986A로 이루어진 군으로부터 선택되며, 예를 들어, D10A 돌연변이이다. 바람직한 구현예에서, 제1 CRISPR 효소는 효소가 상보적 가닥 니킹 효소가 되도록 하는 하나 이상의 돌연변이를 가지며, 제2 CRISPR 효소는 효소가 비-상보적 가닥 니킹 효소가 되도록 하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 대안적으로 제1 효소는 비-상보적 가닥 니킹 효소일 수 있으며, 제2 효소는 상보적 가닥 니킹 효소일 수 있다. 본 발명의 바람직한 방법에서 제1 표적 서열 근처의 DNA 듀플렉스의 한 가닥의 절단을 유도하는 제1 가이드 서열 및 제2 표적 서열 근처의 다른 가닥의 절단을 유도하는 제2 가이드 서열은 5' 오버행을 야기한다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 최대 200개 염기쌍, 바람직하게는 최대 100개 염기쌍, 또는 좀 더 바람직하게는 최대 50개 염기쌍이다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 적어도 26개 염기쌍, 바람직하게는 적어도 30개 염기쌍 또는 좀 더 바람직하게는 34 내지 50개 염기쌍이다.
- [0063] CRISPR 효소의 돌연변이에 관하여, 효소가 SpCas9가 아닌 경우, 돌연변이는 SpCas9의 위치 10, 762, 840, 854, 863 및/또는 986에 상응하는 임의의 또는 모든 잔기에서 이루어질 수 있다(예를 들어, 표준 서열 비교 도구에 의해 확인될 수 있음). 특히, 임의의 또는 모든 하기의 돌연변이: D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A가 SpCas9에서 바람직하며; 대체 아미노산 중 임의의 것에 대한 보존적 치환도 또한 예상된다. 일 양태에서, 본 발명은 본원에 논의된 임의의 또는 각각의 또는 모든 구현예에 관하여, CRISPR 효소가 적어도 하나 이상의, 또는 적어도 2개 이상의 돌연변이를 포함하며, 적어도 하나 이상의 돌연변이 또는 적어도 2개 이상의 돌연변이가 SpCas9 단백질에 따른 D10, E762, H840, N854, N863 또는 D986, 예를 들어, SpCas9에 따른 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A, 또는 SaCas9에 따른 N580, 예를 들어, SaCas9에 따른 N580A, 또는 오솔로그의 Cas9에서 Sp 또는 Sa로의 임의의 상응하는 돌연변이(들)에 대한 것이거나, CRISPR 효소가 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 적어도 Sp Cas9에 따른 H840 또는 N863A, 또는 Sa Cas9에 따른 N580A가 돌연변이되고; 예를 들어, CRISPR 효소가 SpCas9 단백질에 따른 H840A, 또는 D10A 및 H840A, 또는 D10A 및 N863A, 또는 오솔로그의 Cas9에서 Sp 단백질 또는 Sa 단백질로의 임의의 상응하는 돌연변이(들)를 포함하는 것이 제공된다.
- [0064] 몇몇 구현예에서 본 발명은 세포 또는 세포 집단에서 관심 게놈 유전자좌 내의 DNA 듀플렉스의 반대 가닥 상의 제1 및 제2 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법을 포함하며, 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 연관된 돌연변이와 연관된 것으로, 방법은, 예를 들어, 하기를 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 포함하는 전달 벡터 또는 입자(들)과 세포 또는 세포 집단을 접촉시켜 전달하는 단계를 포함한다:
- [0065] I. 하기에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소

- [0066] (a) 제1 표적 서열에 혼성화할 수 있는 제1 가이드 서열, 및
- [0067] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0068] II. 하기에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소
- [0069] (a) 제2 표적 서열에 혼성화할 수 있는 제2 가이드 서열, 및
- [0070] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0071] III. CRISPR 효소를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소, 및
- [0072] IV. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제4 조절 요소,
- [0073] V. I. 내지 IV 중 하나 이상, 예를 들어, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열의 발현 산물인 CRISPR 효소;
- [0074] 여기에서 성분 I, II, III 및 IV는 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고, 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 제1 및 제2 가이드 서열은 각각 제1 및 제2 표적 서열에 대한 제1 및 제2 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하고, 제1 CRISPR 복합체는 (1) 제1 표적 서열에 혼성화하는 제1 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, 여기에서 제2 CRISPR 복합체는 (1) 제2 표적 서열에 혼성화하는 제2 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이고, 제1 가이드 서열은 제1 표적 서열 근처의 DNA 듀플렉스의 한 가닥의 절단을 유도하고 제2 가이드 서열은 이 중 가닥 파손을 유도하는 제2 표적 서열 근처의 다른 가닥의 절단을 유도하여, 생물 또는 비-인간 생물을 변형 시키고; 및 방법은 예를 들어, HDR 주형을 포함하는 세포 또는 세포 집단과 접촉하거나 HDR 주형을 함유하는 다른 입자를 갖는 세포 또는 세포 집단을 접촉하는 전달 벡터 또는 입자를 통해 HDR 주형을 전달하는 것을 또한 임의로 포함할 수 있으며, 여기에서 HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 및 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 세포 또는 세포 집단을 분리하거나 수득하고, 임의로 세포를 확장하고, 전달 벡터 또는 입자(들)를 세포 또는 세포 집단과 접촉시켜 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고, 임의로 생물 또는 비-인간 생물에 변형된 HSC를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 벡터 시스템을 제공한다. 시스템은 1개, 2개, 3개 또는 4개의 상이한 벡터를 포함할 수 있다. 그러므로 성분 I, II, III 및 IV는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 상이한 벡터 상에 위치될 수 있으며, 성분의 가능한 위치에 대한 모든 조합은 본원에서 예상되었으며, 예를 들어: 성분 I, II, III 및 IV는 동일한 벡터 상에 위치될 수 있으며; 성분 I, II, III 및 IV는 각각 상이한 벡터 상에 위치될 수 있으며; 성분 I, II, III 및 IV는 총 2개 또는 3개의 상이한 벡터 상에 위치될 수 있으며, 예상된 위치의 모든 조합을 갖는다. 본 발명의 몇몇 방법에서 CRISPR 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 제1 및 제2 가이드 서열, 제1 및 제2 tracr 메이트 서열 또는 제1 및 제2 tracr 서열 중 임의의 것 또는 전부는 RNA이다. 본 발명의 추가 구현예에서 제1 및 제2 tracr 메이트 서열은 100% 동일성을 공유하고 그리고/또는 제1 및 제2 tracr 서열은 100% 동일성을 공유한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 CRISPR 효소는 Cas9 효소, 예를 들어 SpCas9이다. 본 발명의 양태에서 CRISPR 효소는 촉매 도메인 내의 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 여기에서 SpCas9에 관한 하나 이상의 돌연변이는 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및 D986A로 이루어진 군으로부터 선택되고; 예를 들어, D10A 돌연변이이다. 바람직한 구현예에서, 제1 CRISPR 효소는 효소가 상보적 가닥 닉킹 효소가 되는 하나 이상의 돌연변이를 가지며, 제2 CRISPR 효소는 효소가 비-상보적 가닥 닉킹 효소가 되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 대안적으로 제1 효소는 비-상보적 가닥 닉킹 효소일 수 있고, 제2 효소는 상보적 가닥 닉킹 효소일 수 있다. 본 발명의 추가 구현예에서, 하나 이상의 바이러스 벡터는 리포솜, 나노입자, 엑소솜, 미세소포, 또는 유전자총을 통해 전달되나; 바이러스 전달 또는 입자 전달이 유리하다.
- [0076] 본 발명의 바람직한 방법에서 제1 표적 서열 근처의 DNA 듀플렉스의 한 가닥의 절단을 유도하는 제1 가이드 서열 및 제2 표적 서열 근처의 DNA 듀플렉스의 다른 가닥의 절단을 유도하는 제2 가이드 서열은 5'에 오버행을 야기한다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 최대한 200개 염기쌍, 바람직하게는 최대한 100개 염기쌍, 또는 좀 더 바람직하게는 최대한 50개 염기쌍이다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 적어도 26개 염기쌍, 바람직하게는 적어도 30개 염기쌍 또는 좀 더 바람직하게는 34 내지 50개 염기쌍이다.
- [0077] 몇몇 구현예에서 본 발명은, 예를 들어 세포 또는 세포 집단에서 DNA 분자의 제1 가닥 및 제2 가닥을 각각 표적화하는 두 가이드 RNA 및 하나 이상의 돌연변이를 갖는 Cas 단백질들을 포함하는 전달 벡터 또는 입자(들)과 세포

또는 세포 집단을 접촉시킴으로서, 세포 또는 세포 집단으로 도입하여, 가이드 RNA가 DNA 분자를 표적화하고 Cas 단백질이 DNA 분자의 제1 가닥 및 제2 가닥을 각각 니킹하여, 세포 또는 세포 집단에서의 표적이 변형되게 함으로써 세포 또는 세포 집단에서의 관심 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법을 포함하며, 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 것이며; 및 Cas 단백질 및 2개 가이드 RNA는 함께 자연적으로 발생하지 않으며 방법은 임의로 예를 들어 HDR 주형을 함유하는 다른 전달 벡터 또는 입자를 갖는 세포 또는 세포 집단을 포함하거나 접촉하는 세포 또는 세포 집단을 접촉하는 전달 벡터 또는 입자를 통해 HDR 주형을 전달하는 것을 포함하며, HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 및 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 세포를 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고, 전달 벡터 또는 입자(들)을 세포와 접촉하는 것을 실시하여, 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고 임의로 생물 또는 비-인간 생물에 변형된 세포를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 바람직한 방법에서 DNA 분자의 제1 가닥 및 제2 가닥 각각을 니킹하는 Cas 단백질은 5'에 오버행을 야기한다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 최대한 200개 염기쌍, 바람직하게는 최대한 100개 염기쌍, 또는 좀 더 바람직하게는 최대한 50개 염기쌍이다. 본 발명의 구현예에서 5' 오버행은 적어도 26개 염기쌍, 바람직하게는 적어도 30개 염기쌍 또는 좀 더 바람직하게는 34 내지 50개 염기쌍이다. 본 발명의 구현예에는 또한 tracr 메이트 서열 및 tracr 서열에 융합되는 가이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함한다. 본 발명의 양태에서 Cas 단백질은 진핵 세포, 바람직하게는 포유류 세포 또는 인간 세포에서 발현에 최적화된 코돈이다. 본 발명의 추가 구현예에서 Cas 단백질은 제II형 CRISPR-Cas 단백질, 예를 들어 Cas 9 단백질이다. 매우 바람직한 구현예에서 Cas 단백질은 Cas9 단백질, 예를 들어 SpCas9 또는 SaCas9이다. 본 발명의 양태에서 Cas 단백질은 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및 D986A로 이루어진 군으로부터 선택된 SpCas9에 대한 하나 이상의 돌연변이를 가지며; 예를 들어, D10A 돌연변이이다. 본 발명의 양태는 감소되는 유전자 산물의 발현 또는 유전자 산물을 인코딩하는 DNA분자 내로 추가로 도입되는 주형 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 5' 오버행이 제어닐링 및 라이게이션되게 함으로써 정밀하게 절단되는 개체 서열 또는 변경되는 유전자 산물의 활성 또는 작용 또는 증가되는 유전자 산물의 발현에 관한 것이다. 본 발명의 일 구현예에서, 유전자 산물은 단백질이다.

[0078] 몇몇 구현예에서 본 발명은, 예를 들어, 하기를 포함하는 전달 벡터 또는 입자(들)과 세포 또는 세포 집단을 접촉시킴으로써 세포 또는 세포 집단으로 도입되어, 세포 또는 세포 집단 내의 관심 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법을 포함하며 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌는 이상 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 것이다,

[0079] a) 세포 또는 세포 집단 내의 세포의 이중 가닥 DNA 분자의 제1 가닥 및 제2 가닥 각각을 표적으로 하는 두 CRISPR-Cas 시스템 가이드 RNA 각각에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소, 및

[0080] b) Cas 단백질에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 또는

[0081] c) a) 또는 b)의 발현 산물(들),

[0082] 여기에서 성분 (a) 및 (b)는 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하여, 가이드 RNA가 세포 또는 세포 집단 내의 세포의 DNA 분자를 표적화하게 하고 Cas 단백질은 세포 또는 세포 내의 세포의 DNA 분자의 제1 가닥 및 제2 가닥 각각을 니킹하게 하며; Cas 단백질 및 두 가이드 RNA는 함께 자연적으로 발생하지 않고; 방법은 임의로 또한 예를 들어 HDR 주형을 함유하는 다른 입자를 갖는 세포 또는 세포 집단을 포함하거나 접촉하는 세포 또는 세포 집단을 접촉하는 전달 벡터 또는 입자를 통해 HDR 주형을 전달하는 것을 임의로 포함하며 HDR 주형은 단백질의 정상 또는 더 적은 이상 형태의 발현을 제공하고; "정상"은 야생형이고, "이상"은 질환 또는 질병 상태를 일으킬 수 있는 단백질 발현일 수 있으며; 임의로 방법은 생물 또는 비-인간 생물로부터 상기 이상 단백질을 발현하는 세포를 분리하거나 수득하고, 임의로 세포 집단을 확장하고, 전달 벡터 또는 입자(들)을 세포와 접촉시키는 것을 실시하여 변형된 세포 집단을 수득하고, 임의로 변형된 세포의 집단을 확장하고, 임의로 변형된 세포를 생물 또는 비-인간 생물에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 양태에서 가이드 RNA는 tracr 메이트 서열 및 tracr 서열에 융합된 가이드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서 Cas 단백질은 제II형 CRISPR-Cas 단백질이다. 본 발명의 양태에서 Cas 단백질은 진핵 세포, 바람직하게는 포유류 세포 또는 인간 세포에서 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 본 발명의 추가 구현예에서 Cas 단백질 제II형 CRISPR-Cas 단백질, 예를 들어 Cas 9 단백질이다. 매우 바람직한 구현예에서 Cas 단백질은 Cas9 단백질, 예를 들어 SpCas9 또는 SaCas9이다. 본 발명의 양태에서 Cas 단백질은 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및 D986A로 이루어진 군으로부터 선택된 SpCas9에 대한 하나 이상의 돌연변이를 가지며; 예를 들어, D10A 돌연변이이다. 본 발명의 양태는 감소되는 유전자 산물의 발현 또는 유전자 산물을 인코딩하는 DNA 분자 내로 추가로 도입되는 주형 폴리뉴클레

오티드 또는 2개의 5' 오버행이 재어닐링되고 라이게이션되게 함으로써 정밀하게 절단되는 개재 서열 또는 변경되는 유전자 산물의 활성 또는 작용 또는 증가되는 유전자 산물의 발현에 관한 것이다. 본 발명의 일 구현예에서, 유전자 산물은 단백질이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 시스템의 벡터는 바이러스 벡터이다. 추가 구현예에서, 시스템의 벡터는 리포솜, 나노입자, 엑소솜, 미세소포, 또는 유전자총을 통해 전달되며; 입자가 바람직하다. 일 양태에서, 본 발명은 세포 또는 세포 집단에서의 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는 방법을 제공한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 CRISPR 복합체가 표적 폴리뉴클레오티드에 결합하게 하여 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 가져와 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는 것을 포함하며, CRISPR 복합체는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 내에서 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하고, 상기 가이드 서열은 tracr 서열에 결국 혼성화하는 tracr 메이트 서열에 연결된다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단은 상기 CRISPR 효소에 의해 표적 서열의 위치에서 하나 또는 두 가닥으로 절단하는 것을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단은 표적 유전자의 감소된 전사를 야기한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 외인성 주형 폴리뉴클레오티드와의 상동성 재조합에 의해 상기 절단된 표적 폴리뉴클레오티드를 수복하는 것을 추가로 포함하며, 상기 수복은 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 돌연변이를 야기한다. 몇몇 구현예에서, 상기 돌연변이는 표적 서열을 포함하는 유전자로부터 발현된 단백질에서의 하나 이상의 아미노산 변화를 야기한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 하나 이상의 벡터 또는 이의 발현 산물(들)을, 예를 들어, 전달 벡터 또는 입자(들)을 통해, 상기 세포 또는 세포 집단으로 전달하는 것을 추가로 포함하며, 여기에서 하나 이상의 벡터는 CRISPR 효소, tracr 메이트 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열 중 하나 이상의 발현을 유도한다. 몇몇 구현예에서, 상기 벡터는 대상체의 세포 또는 세포 집단으로 전달된다. 몇몇 구현예에서, 상기 변형은 세포 배양에서의 상기 세포 또는 세포 집단에서 일어난다. 몇몇 구현예에서, 방법은 상기 변형 전에 대상체로부터 상기 세포 또는 세포 집단을 분리하는 것을 추가로 포함한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 상기 대상체에 상기 세포 또는 세포 집단 및/또는 대상체로부터 유래된 세포를 되돌려 놓는 것을 추가로 포함한다.

[0083] 일 양태에서, 본 발명은 돌연변이된 질병 유전자를 포함하는 세포 또는 세포 집단을 발생시키는 방법을 제공한다. 몇몇 구현예에서, 질병 유전자는 질병을 갖거나 발병할 위험의 증가와 관련된 임의의 유전자이다. 몇몇 구현예에서, 방법은 (a) 하나 이상의 벡터 또는 이의 발현 산물(들)을, 예를 들어, 전달 벡터 또는 입자(들)를 통해, 세포 또는 세포 집단으로 도입하는 것을 포함하며, 여기에서 하나 이상의 벡터는 하나 이상의 CRISPR 효소, tracr 메이트 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열의 발현을 유도시키며; (b) CRISPR 복합체가 표적 폴리뉴클레오티드에 결합해 상기 질병 유전자 내의 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 가져오게 하며, 여기에서 CRISPR 복합체는 (1) 표적 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하며, 이로 인해 돌연변이된 질병 유전자를 포함하는 세포 또는 세포 집단을 발생시킨다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단은 상기 CRISPR 효소에 의해 표적 서열의 위치에서 하나 또는 두 가닥을 절단하는 것을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단은 표적 유전자의 감소된 전사를 야기한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 외인성 주형 폴리뉴클레오티드와의 상동성 재조합에 의해 상기 절단된 표적 폴리뉴클레오티드를 수복하는 것을 추가로 포함하며, 여기에서 상기 수복은 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 돌연변이를 야기한다. 몇몇 구현예에서, 상기 돌연변이는 표적 서열을 포함하는 유전자로부터 단백질 발현에서의 하나 이상의 아미노산 변화를 야기한다. 몇몇 구현예에서 변형된 세포 또는 세포 집단은 동물에 투여되어 동물 모델을 생성한다.

[0084] 일 양태에서, 본 발명은 세포 또는 세포 집단에서의 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는 방법을 제공한다. 몇몇 구현예에서, 방법은 CRISPR 복합체를 표적 폴리뉴클레오티드에 결합하여 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 가져와 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키게 하며, 여기에서 CRISPR 복합체는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함하며, 상기 가이드 서열은 tracr 서열에 결국 혼성화하는 tracr 메이트 서열에 연결된다. 다른 구현예에서, 본 발명은 이상 단백질을 발현하는 세포 또는 세포 집단으로부터 발생하는 진행 세포 내의 폴리뉴클레오티드의 발현을 변형시키는 방법을 제공한다. 방법은 세포 또는 세포 집단 내의 폴리뉴클레오티드에 결합하는 CRISPR 복합체를 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함하며; 유리하게는 CRISPR 복합체는 바이러스 전달 벡터 또는 입자(들)을 통해 전달된다.

[0085] 몇몇 방법에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 불활성화되어 세포 또는 세포 집단 내의 발현의 변형을 가져올 수 있다. 예를 들어, 세포 내의 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 결합에 따라, 표적 폴리뉴클레오티드는 불활성화되어 서열이 전사되지 않아, 코딩된 단백질이 생산되지 않거나 서열이 야생형 서열과 같이 작용하지 않는다.

[0086] 몇몇 구현예에서, 작용성 도메인은 전사 활성화 도메인, 바람직하게는 VP64이다. 몇몇 구현예에서, 작용성 도메

인은 전사 억제제 도메인, 바람직하게는 KRAB이다. 몇몇 구현예에서, 전사 억제제 도메인은 SID, 또는 SID의 연쇄체(concatemer)(예를 들어 SID4X)이다. 몇몇 구현예에서, 작용성 도메인은 후성적 변형 효소가 제공되도록 하는 후성적 변형 도메인이다. 몇몇 구현예에서, 작용성 P65 활성화 도메인일 수 있는 활성화 도메인이다.

[0087] 본 발명은 의학 또는 치료에서의 사용을 위한 본 발명의 조성물 또는 이의 CRISPR 복합체 또는 효소 또는 이의 RNA(대안적으로 CRISPR 효소를 인코딩하는 mRNA이거나 이를 포함함)를 추가로 포함한다. 몇몇 구현예에서 본 발명은 본 발명에 따른 방법에서의 사용을 위한 본 발명에 따른 조성물 또는 이의 성분을 포함한다. 몇몇 구현예에서 본 발명은 생체의 유전자 또는 게놈 편집, 특히 세포 또는 세포 집단에서 본 발명의 조성물 또는 이의 CRISPR 복합체 또는 효소 또는 이의 RNA(대안적으로 CRISPR 효소를 인코딩하는 mRNA이거나 이를 포함함)의 사용이 제공되며, 세포 또는 세포 집단은 그 후 임의로 세포 또는 세포 집단이 수득된 생물 또는 비-인간 생물에게 또는 동일 종의 다른 생물 또는 비-인간 생물로 도입될 수 있다. 특정 구현예에서 본 발명은 본 발명에 따른 방법에서의 사용을 위해 또는 생체의 유전자 또는 게놈 편집을 위해 약제의 제조에서 본 발명의 조성물 또는 이의 CRISPR 복합체 또는 효소 또는 이의 RNA(대안적으로 CRISPR 효소를 인코딩하는 mRNA이거나 이를 포함함)의 사용을 포함한다. 특정 구현예에서 본 발명은, 세포 또는 세포 집단에서의 표적 서열의 조작에 의해 대상체 또는 비-인간 대상체의 세포 또는 세포 집단을 변형시키고 변형된 세포를 대상체 또는 비-인간 대상체에 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 포유동물 또는 인간) 또는 비-인간 대상체(예를 들어, 포유동물)에서 관심 게놈 유전자좌에서의 표적 서열에서의 결함에 의해 발생한 질환을 치료하거나 저해하는 방법을 제공하며, 유리하게는 세포를 변형시키는 것은 CRISPR 복합체 또는 이의 성분을 함유하는 전달 벡터(예를 들어, 바이러스) 또는 입자를 세포와 접촉하는 것이고, 유리하게는 특정 구현예에서 전달 벡터(바이러스) 또는 입자는 또한 HDR 주형 또는 다른 입자를 제공하거나 벡터는 HDR 주형을 제공하며, 여기에서 질환은 표적 서열의 조작에 의한 치료 또는 저해에 민감하다.

[0088] CRISPR Cas 복합체의 특정 RNA는 또한 sgRNA(단일 가이드 RNA)로 알려지거나 명명된다. 유리한 구현예에서 CRISPR Cas 복합체의 RNA는 sgRNA이다. CRISPR-Cas9 시스템은 세포 또는 세포 집단에서의 표적 유전자좌 또는 표적 유전자좌들에 대해 조작되었다. Cas9 단백질, 유리하게는 진핵 세포 및 특히 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포(예를 들어, 안구 세포, 혈관 세포, 달팽이관 세포 등) 및 세포 내의 sgRNA 표적화 유전자좌 또는 표적화 유전자좌들, 예를 들어, 유전자 *RHO*, *ATOH1*, *VEGFA*에 대해 코돈-최적화된 Cas9 단백질이 제조되었으며 본원에서 예시되었다. 이들은 유리하게는 바이러스 전달(AAV)을 통해 전달된다. 입자를 통해 전달되었을 때, 입자는 혼합될 Cas9 단백질 및 sgRNA에 의해 형성된다. sgRNA 및 Cas9 단백질 혼합물은 계면활성제, 인지질, 생분해성 중합체, 지단백질 및 알코올을 포함하거나 필수적으로 구성되거나 구성된 혼합물과 혼합되어, sgRNA 및 Cas9 단백질을 함유하는 입자가 형성된다. 본 발명은 이렇게 만들어진 입자 및 이의 용도뿐만 아니라 이러한 방법으로부터의 입자를 포함한다. 좀더 일반적으로, 입자는 효율적인 과정을 사용하여 형성되었다. 우선, Cas9 단백질 및 유전자 또는 조절 유전자 LacZ를 표적화하는 sgRNA는 적절한, 예를 들어, 3:1 내지 1:3 또는 2:1 내지 1:2 또는 1:1 몰비로, 적절한 온도, 예를 들어, 15 내지 30°C, 예를 들어, 20 내지 25°C, 예를 들어, 실온에서, 적절한 시간 동안, 예를 들어, 15 내지 45분, 예컨대 30분 동안, 유리하게는 멸균 뉴클레아제 유리 버퍼, 예를 들어, 1X PBS 내에서 함께 혼합된다. 별도로, 하기와 같거나 하기를 포함하는 입자 성분은 알코올, 유리하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올과 같은 C1-6 알킬 알코올, 예를 들어, 100% 에탄올에 용해되었다: 계면활성제, 예를 들어, 양이온성 지질, 예를 들어, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP); 인지질, 예를 들어, 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC); 에틸렌-글리콜 중합체 또는 PEG와 같은 생분해성 중합체, 및 저-밀도 지질 단백질과 같은 지단백질, 예를 들어, 콜레스테롤. 두 용액은 혼합되어 Cas9-sgRNA 복합체를 함유하는 입자를 형성한다. 특정 구현예에서 입자는 HDR 주형을 포함할 수 있다. 이것은 sgRNA+Cas9 단백질-함유 입자와 함께 공동-투여되는 입자일 수 있거나, 즉, 세포 또는 세포 집단을 sgRNA+Cas9 단백질-함유 입자와 접촉하는 것에 더하여, 세포 또는 세포 집단이 HDR 주형을 함유하는 입자와 접촉되는 것이며; 또는 HSC가 sgRNA, Cas9 및 HDR 주형 모두를 함유하는 입자와 접촉된다. HDR 주형은 별개의 벡터에 의해 투여될 수 있으며, 이에 따라 우선 먼저 입자가 HSC 세포를 침투하고 별개의 벡터가 또한 세포를 침투하며, 여기에서 HSC 게놈이 sgRNA+Cas9에 의해 변형되고 HDR 주형이 또한 존재하여, 게놈 유전자좌가 HDR에 의해 변형되고; 예로서, 이는 돌연변이의 정정을 야기한다. 본원의 논의에서의 입자는 유리하게는 sgRNA(들) 및 Cas9 단백질 혼합물(임의로 HDR 주형(들)을 포함하거나 주형(들)에 대한 개별 입자가 바람직할 때 HDR 주형(들)만을 함유하는 이러한 혼합물을 포함함)을 계면활성제, 인지질, 생분해성 중합체, 지단백질 및 알코올(여기에서 하나 이상의 sgRNA는 단백질 발현 또는 질병 증상 또는 상태와 관련된 돌연변이와 관련된 유전자좌 또는 유전자좌들을 표적으로 함)을 포함하거나 필수적으로 구성되거나 구성된 혼합물과 혼합함에 의해 수득되거나 수득될 수 있다.

[0089] 일 양태에서, 본 발명은 상기 게놈 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하

는 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌와 관련된 질병을 모델링하는 방법을 제공하는 것으로 하기를 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 전달하는 것을 포함한다:

- [0090] (A) - I. 하기를 포함하는 CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열:
- [0091] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0092] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0093] (c) tracr 서열, 및
- [0094] II. Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로서, 임의로 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함함,
- [0095] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0096] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0097] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9을 포함하고 Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이고,
- [0098] 또는
- [0099] (B) I. 하기를 포함하는 폴리뉴클레오티드:
- [0100] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0101] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0102] II. Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 및
- [0103] III. tracr 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열,
- [0104] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0105] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9를 포함하고, Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이다.
- [0106] 특정 바람직한 구현예에서, Cas9는 SaCas9이다.
- [0107] 일 양태에서, 본 발명은 상기 게놈 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하는 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌와 관련된 질병을 모델링하는 방법으로 제공하는 것으로, 조성물의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 전달하는 단계를 포함하며, 여기에서 조성물은 하기를 포함한다:
- [0108] (A) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0109] I. 하기를 포함하는 CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소
- [0110] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0111] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0112] (c) tracr 서열, 및
- [0113] II. Cas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소로서, (바람직하게는 SaCas9) 임의로 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함함,
- [0114] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0115] 성분 I 및 II 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0116] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의

서열-특이적 결합을 유도하며,

- [0117] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9을 포함하고,
- [0118] 또는
- [0119] (B) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0120] I. 하기에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소
- [0121] (a) 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0122] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0123] II. Cas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 및
- [0124] III. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소,
- [0125] 여기에서 성분 I, II 및 III은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0126] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0127] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9을 포함한다.
- [0128] 일 양태에서 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체 또는 비-인간 대상체 내의 표적 서열 내에서 게놈 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하는 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌의 하나 이상의 돌연변이에 의해 발생하는 질환 또는 질병을 치료하거나 저해하는 방법을 제공하고 여기에서 질환 또는 질병은 하기를 포함하는 치료를 제공하는 것을 포함하는 표적 서열의 조작에 의한 치료 또는 저해에 민감하다:
- [0129] 조성물의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 하나 이상의 AAV 또는 렌티바이러스 벡터를 포함하는, AAV 또는 렌티바이러스 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 전달하며, 표적 서열은 발현되었을 때 조성물에 의해 조절되고, 조성물은 하기를 포함한다:
- [0130] (A) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0131] I. CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서, 여기에서 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함함
- [0132] (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0133] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0134] (c) tracr 서열, 및
- [0135] II. Cas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 바람직하게는 SaCas9로서, 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함함,
- [0136] 여기에서 (A), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0137] 성분 I 및 II 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0138] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0139] CRISPR 복합체는 (1) arget 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9을 포함하고,
- [0140] 또는

- [0141] (B) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0142] I. 하기에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소
- [0143] (a) 진핵 세포 내 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0144] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0145] II. Cas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 바람직하게는 SaCas9, 및
- [0146] III. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소,
- [0147] 여기에서 성분 I, II 및 III은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0148] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0149] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9을 포함한다.
- [0150] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 방법 중 임의의 것에 따른 용도를 위한 AAV 또는 렌티바이러스 벡터를 제조하는 방법을 제공하는 것으로, AAV 또는 렌티바이러스에 대해 코딩하는 핵산 분자(들)을 포함하거나 이들로 본질적으로 구성된 플라스미드(들)를 AAV-감염 또는 렌티바이러스-감염 세포에 트랜스펙션시키고, AAV 또는 렌티바이러스의 복제 및 패키징 의무가 있는 AAV AAV 또는 렌티바이러스 rep 및/또는 cap 및/또는 헬퍼 핵산 분자를 공급하는 것을 포함한다.
- [0151] 일 양태에서, 본 발명은 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하는 본 발명의 방법 중 임의의 것(예를 들어, 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌와 관련된 질병을 모델링하는 방법)에서의 사용을 위한 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 치료적 용도를 포함하는 생체의 또는 생체내 유전자 또는 게놈 편집에서의 조성물의 사용을 위해 제공된다.
- [0152] 일 양태에서, 본 발명은 실험관내, 생체의 또는 생체내 유전자 또는 게놈 편집을 위한 약제의 제조에서의 용도 또는 질병과 관련된 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법 또는 진핵 생물 또는 비-인간 생물의 게놈 유전자좌에서 하나 이상의 돌연변이에 의해 발생하는 질환 또는 질병을 치료하거나 저해하는 방법에서의 용도를 위한 조성물을 제공한다.
- [0153] 일 양태에서, 본 발명은 의약 또는 치료에서의 용도를 위해; 또는 질병 또는 장애와 관련된 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작에 의해 생물 또는 비-인간 생물을 변형시키는 방법에서의 용도를 위해; 또는 진핵 생물 또는 비-인간 생물에서 질병과 관련된 게놈 유전자좌에서의 하나 이상의 돌연변이에 의해 발생하는 질환을 치료하거나 저해하는 방법에서의 용도를 위해; 또는 실험관내, 생체의 또는 생체내 유전자 또는 게놈 편집에서의 용도를 위해, 하기를 포함하는 조성물을 제공한다:
- [0154] (A) - I. CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열로서, 여기에서 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함함:
- [0155] (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0156] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0157] (c) tracr 서열, 및
- [0158] II. Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 SCas9로서, 임의로 적어도 하나 이상의 핵 소화 서열을 포함함,
- [0159] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0160] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0161] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9를 포함하고 Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이고,

- [0162] 또는
- [0163] (B) I. 하기를 포함하는 폴리뉴클레오티드:
- [0164] (a) 진핵 세포 내 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0165] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,
- [0166] II. Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 SaCas9, 및
- [0167] III. tracr 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열,
- [0168] 여기에서 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0169] 여기에서 CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 SaCas9를 포함하고, Cas9를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA이다.
- [0170] 일 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체 또는 비-인간 대상체의 표적 서열 내의 게놈 유전자좌의 코딩, 비-코딩 또는 조절 요소 내의 표적 서열의 조작을 포함하는, 진핵 생물 또는 비-인간 생물에서의 게놈 유전자좌에서의 하나 이상의 돌연변이에 의해 발생하는 질환 또는 질병을 치료하거나 저해하기 위한 치료적 게놈 편집 방법을 제공하는 것으로, 표적 서열의 조작에 의해 대상체 또는 비-인간 대상체를 변형시키는 것을 포함하며 여기에서 질환 또는 질병은 하기를 포함하는 치료를 제공하는 것을 포함하는 표적 서열의 조작에 의한 치료 또는 저해에 민감하다:
- [0171] 조성물의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 하나 이상의 AAV 또는 렌티바이러스 벡터를 포함하는 AAV 또는 렌티바이러스 벡터 시스템을 포함하는, 비-천연 발생 또는 조작된 조성물을 전달하며, 여기에서 표적 서열은 발현됐을 때 조성물에 의해 조작되고, 여기에서 조성물은 하기를 포함한다:
- [0172] (A) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0173] I. CRISPR-Cas 시스템 RNA 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서, 여기에서 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함함
- [0174] (a) 진핵 세포 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0175] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0176] (c) tracr 서열, 및
- [0177] II. Cas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 바람직하게는 SaCas9로서, 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함함,
- [0178] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0179] 여기에서 성분 I 및 II는 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0180] 여기에서 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0181] 여기에서 CRISPR 복합체는 (1) arget 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9를 포함하고,
- [0182] 또는
- [0183] (B) 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0184] I. 하기에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소
- [0185] (a) 진핵 세포 내 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열, 및
- [0186] (b) 적어도 하나 이상의 tracr 메이트 서열,

- [0187] II. SaCas9를 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소, 및
- [0188] III. tracr 서열에 작동 가능하게 연결된 제3 조절 요소,
- [0189] 여기서 성분 I, II 및 III은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0190] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0191] CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr에 혼성화되는 tracr 메이트 서열과 복합된 Cas9를 포함한다.
- [0192] 일 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서의 유전자 질병의 개별 또는 개인 맞춤 치료 방법을 제공한다:
- [0193] (a) 본원에서 언급된 바와 같이 벡터를 조직, 기관 또는 포유류의 세포에 전달하는 것을 포함하여, Cas9-발현 진핵 세포(들)(바람직하게는 SCas9)을 포함하는 조직, 기관 또는 세포주에서의 생체외, 또는 생체내에서 Cas9를 발현하는 세포를 갖는 트랜스제닉 비-인간 포유류에서의 생체내 다중 돌연변이를 도입하고, 여기서 특이 돌연변이 또는 정밀한 서열 치환은 유전 질병과 관련되거나 관련되어 온 것이며;
- [0194] (b) 유전 질병과 관련된 특이 돌연변이 또는 정밀한 서열 치환을 갖는, 벡터가 전달되는 세포 상의 유전 질병을 위한 치료(들)을 시험하고; 및
- [0195] (c) 단계 (b)의 치료(들)의 시험으로부터의 결과에 근거하여 대상체를 치료한다.
- [0196] 상술한 양태의 임의의 특정 구현예 및 본 발명의 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV DJ 또는 이의 임의의 조합일 수 있다.
- [0197] 돌연변이 또는 질병 증상과 관련되는 표적에 관한 본원의 논의에서, 이러한 돌연변이 또는 질병 증상은 예를 들어 신경 질병; 안구 질병 (예를 들어, 망막 질병, 예를 들어, 색소성 망막염; 색맹; 노인성 황반변성; 시각 장애), 청각 질병 (예를 들어, 달팽이관 세포 관련 질병, 청각 장애, 난청) 등일 수 있다
- [0198] 따라서, 임의의 이전에 공지된 제품, 제품의 제조방법 또는 제품의 사용 방법을 본 발명 내에 포함하지 않는 것이 본 발명의 목적이므로 출원인은 권리를 보존하며 이로써 임의의 이전에 공지된 산물, 공정 또는 방법에 대한 권리 포기를 드러낸다. 본 발명은 USPTO(35 U.S.C. § 112, 제1항) 또는 EPO(EPC의 83조)의 기재된 설명 및 실시가능요건을 충족하지 않는 임의의 제품, 공정 또는 제품의 제조 또는 제품의 사용 방법을 본 발명의 범위 내에 포함하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 추가로 언급되므로 출원인은 권리를 보존하고 이로써 임의의 이전에 기재된 제품, 제품의 제조 방법 또는 제품의 사용 방법에 대한 권리 포기를 드러낸다.
- [0199] 본 개시내용 및 청구범위 및/또는 단락에서, "함유한다", "함유된", "함유하는" 등과 같은 용어가 미국 특허법에 귀속되는 의미를 가질 수 있고; 예를 들어, 그들은 "포함한다", "포함된", "포함하는" 등을 의미할 수 있으며; "본질적으로 이루어지는" 및 "본질적으로 이루어진다"와 같은 용어가 미국 특허법에 귀속되는 의미를 갖고, 예를 들어, 그들은 명백하게 열거되지 않는 요소를 허용하지만, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본적인 또는 새로운 특징에 영향을 미치는 요소를 배제함이 주목된다. 53(c)조 EPC 및 28(b) 및 (c)항 EPC에 따르는 것이 본 발명의 실시에서 유리할 수 있다. 본 문헌에서는 가망성이 없다.
- [0200] 이들 및 다른 구현예가 개시되거나 하기의 상세한 설명으로부터 명백하고 그에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0201] 본 발명의 신규한 특징은 특히 첨부된 청구범위에 개시되어 있다. 본 발명의 원리가 이용된 예시적인 구현예를 설명하는 하기의 상세한 설명을 참조함으로써 본 발명의 특징 및 이점을 더욱 잘 이해할 것이며, 첨부된 도면은 다음과 같다:

도 1a 내지 도 1h는 마우스 뇌에서 CRISPR-Cas9 시스템 전달 및 *Mecp2* 유전자좌의 표적화를 나타낸다. (a) AAV-SpCas9 및 AAV-SpGuide(*Mecp2*) 발현 벡터. SgRNA 벡터는 형질도입된 뉴런의 확인을 위한 GFP-KASH 융합 단백질의 인코딩 서열을 함유한다. (b) 마우스 해마의 등 치상회(DG)에서의 HA-Cas9 및 GFP-KASH의 발현. 스케일 바, 100 μm. (c) 이중-벡터 Cas9-CRISPR 시스템에 의해 효율적으로 표적화된 세포의 정량화. (d) Cas9 표적 위치를 보이는 마우스 *Mecp2* 유전자좌의 그래프 묘사; sgRNA는 청색으로 나타났다. PAM 서열은 보라색으로 표시됐다. *Mecp2* 유전자좌의 시퀀싱에 의해 검출된 대표적인 돌연변이 패턴은 하기와 같이 보여졌다: 녹색 - 야생형 서열;

적색 대쉬선- 결실된 염기; 적색 염기: 삽입 또는 돌연변이; 적색 화살표는 CRISPR-Cas9 절단 사이트를 나타낸다. (e) DG 영역에서 AAV 전달 2주 후의 *Mecp2* 유전자좌의 변형을 보이는 서베이어(SURVEYOR™) 검정 겔. (f) 표적 뇌 영역에서의 MeCP2 단백질 발현의 웨스턴 블롯 분석 및 등 DG에서의 MeCP2 단백질 수준의 정량화 (t-test, **p<0.001, 3마리 동물로부터 n=4, 오류 바: s.e.m.). (g) *Mecp2* 유전자좌의 CRISPR-Cas9 표적화 2주 후 등 DG 영역의 이미지. 스케일 바, 150 μm. (h) 대조 부수적 부위와 비교한 표적화된 뇌 영역에서의 모든 검출된 세포(DAPI 염색) 내의 MeCP2 양성 세포 집단의 정량화 (t-test, ****p<0.0001, 2마리 동물로부터 각각 n=290 및 249 세포; 오류 바: s.e.m). (ITR-역전된 말단 반복부(inverted terminal repeat); HA-헤마글루티닌 태그(hemagglutinin tag); NLS-핵 국소화 신호(nuclear localization signal); spA-합성 폴리아데닐화 신호(synthetic polyadenylation signal); U6-PolIII 프로모터; sgRNA-단일 가이드 RNA; hSyn-인간 시냅신 1 프로모터; GFP- 녹색 형광 단백질; KASH - Klarsicht, ANCl, Syne 상동성 핵 막투과 도메인; bGH pA-보빈 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호; WPRE-우드처크 간염(Woodchuck Hepatitis) 바이러스 전사후 조절 요소).

도 2a 및 도 2b는 Cas9-매개 MeCP2 낙다운 뉴런에서의 유전자 발현의 분석을 보인다. (a) 마우스 뇌로부터 CRISPR-Cas9 표적화 세포의 세포 핵 정제를 위한 전략. (b) RNAseq에 의해 검출된 상이하게 발현된 유전자의 계층적 클러스터링(Hierarchical clustering)(t-test, p<0.01, 8마리 동물로부터 분류된 핵의 n=19 집단). 유전자의 상대적 log2(TPM+1) 발현 수준은 각 열에 정규화되고 적색-청색 색상 스케일로 나타냈다. 각 컬럼은 나타낸 바와 같이 대조 또는 *Mecp2* sgRNA 형질도입된 동물로부터의 분리된 세포의 치상회으로부터 분류된 표적화된 100 뉴런 핵FACS의 집단을 나타낸다.

도 3의 a 내지 도 3의 e는 CRISPR-매개 MeCP2 낙다운 후 뉴런의 세포 반응 특성에서의 세포-자율적 결함을 보인다. (a) 마우스 시각 피질 및 시각 자극 파라미터로부터의 생체내 실험 배열을 보인다. GFP+ 뉴런을 보이는 그림. 스케일 바, 20 μm. (b) 반대-눈 특이 입력 및 동측-눈 특이 입력 둘 다를 받은 2/3 층 흥분성 뉴런에서의 구성에 관한 그림. 계층 변형된 GFP+ 세포는 녹색인 반면 비변형된 세포는 회색이다. 정규화된 스파이크 형상은 규칙적인 스파이킹 흥분성 뉴런을 나타낸다. (c,d) 평균OSI(c) 및 유발된 FR(d)은 각각 *Mecp2* 및 대조 sgRNA를 발현하는 GFP+ 세포로부터 측정되었다 (t-test, *p<0.05; 그래프 내의 수는 기록된 세포의 수를 나타냄; n=2-3마리 동물; 오류 바: s.e.m).

도 4a 내지 도 4f는 마우스 뇌에서의 동시 다중 유전자 편집을 보인다. (a) 다중 계층 표적화에 대해 설계된 CRISPR-Cas9 시스템의 도식. (b) 표적화된 DNMT 마우스 유전자좌의 그래프 묘사. 가이드 RNA는 청색으로 나타냈다. PAM 서열은 보라색으로 나타냈다. (c) DG 영역에서의 AAV 전달 4주 후, FACS 분류된 GFP-KASH 양성 세포에서 DNMT 유전자좌의 변형을 보이는 서베이어™ 검정 겔. (d) 다수 유전자좌에서의 변형의 공동-발생을 보이는, 단일 세포에서의 DNMT 유전자좌 변형의 딥 시퀀싱(딥 시퀀싱)-기반 분석. (e) DNMT 패밀리를 표적으로 하는 CRISPR-Cas9 시스템의 생체내 전달 후에 *Dnmt3a* 및 *Dnmt1* 단백질의 웨스턴 블롯 분석(상부). 생체내 CRISPR-Cas9 표적화 후 DG에서 *Dnmt3a* 및 *Dnmt1* 단백질 수준의 웨스턴 블롯 정량화(하부; t-test, **p<0.001, *p<0.05, *Dnmt3a*: n=7; *Dnmt1*: 5마리 동물로부터의 n=5; 오류 바: s.e.m). (f) 훈련 및 변경된 맥락에서 시험된, 해마의 DG 영역에서의 SpCas9를 사용하여 DNMT 유전자의 표적화 8주 후, 맥락 관련 학습 결함 (t-test, ****p<0.0001, n=18마리 동물, 2개의 독립 실험; 오류 바: s.e.m).

도 5a 내지 도 5f는 AAV 패키징을 위한 HA-태그SpCas9 (HA-SpCas9)의 클로닝 및 발현을 보인다. (a) 짧은 래트 *Map1b* 프로모터 (pMap1b), 마우스 *Mecp2* 프로모터 (pMecp2) 및 짧은 polyA 모티프(spA)의 절단된 버전을 사용하여 SpCas9 발현 카세트 크기를 최소화하는 상이한 클로닝 전략의 도식 개요. (b) 상이한 SpCas9 발현 카세트를 사용한 HA-SpCas9를 발현하는 원발성 피질 뉴런 배양의 웨스턴 블롯 분석. (c) *Mecp2* 프로모터는 성장교세포(GFAP, 화살표)가 아닌 뉴런 (Map1b, NeuN; 화살표)에서 HA-SpCas9 (적색) 발현을 구동한다. GFP-KASH와의 HA-SpCas9의 공동-발현이 보여진다(하부). 핵은 DAPI (청색)으로 표지화되었다. 스케일 바, 20 μm. (d) GFP-표지화의 도식 개요. 핵 막투과 KASH 도메인에 융합된 증가된 녹색 형광 단백질(GFP) 및 외부 핵막으로의 GFP-KASH의 통합이 도시된다. (e) HA-SpCas9 및 GFP-KASH 둘 다를 발현하는 세포의 집단을 보이는, 공동-감염 효율 계산(3개 배양으로부터의 n=973 뉴런; 오류 바: s.e.m). (f) 세포는 바이러스 전달 7일 후 LIFE/DEAD® 키트로 염색되었다. DAPI+ 및 죽은(DEAD+) 세포(대조 n=518 DAPI+ 핵; 2개의 배양으로부터의 SpCas9/GFP-KASH n=1003 DAPI+ 핵; 오류 바: s.e.m)의 정량화. (ITR-역전된 말단 반복; HA-헤마글루티닌 태그; NLS-핵 국소화 신호; spA-합성 폴리아데닐화 신호; U6-PolIII 프로모터; sgRNA-단일 가이드 RNA; hSyn-인간 시냅신 1 프로모터; GFP- 녹색 형광 단백질; KASH - Klarsicht, ANCl, Syne 상동성 핵 막투과 도메인; bGH pA-보빈 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호; WPRE-우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소).

도 6a 및 도 6b은 Neuro-2a 세포에서의 *Mecp2*의 표적화를 보인다. (a) *Mecp2* 표적화 서열 및 상응하는 모티프 근접 프로토스페이스(protospacer adjacent modifs; PAM). (b) Neuro-2a 세포 내로 SpCas9와 함께 공동-트랜스펙션된 6개 *Mecp2* sgRNA의 평가. 서베이어™ 검정을 사용하여 트랜스펙션 48시간 후 분석된 유전자좌 변형 효능.

도 7a 내지 도 7d는 원발성 피질 뉴런에서의 *Mecp2*의 CRISPR-SpCas9 표적화를 보인다. (a) AAV-CRISPR 형질도입(녹색, GFP-KASH) 7일 후 배양된 뉴런에서의 MeCP2(적색)의 면역형광 염색. 핵은 DAPI로 표지화되었다(청색). 스케일 바, 20 μ m. (b) 서베이어™ 검정 겔을 이용하여, *Mecp2* sgRNA 또는 대조(박테리아 *lacZ* 유전자 표적화) sgRNA와 함께 SpCas9 또는 dSpCas9를 사용한 *Mecp2* 유전자좌 표적화의 평가. (c) 뉴런(GFP+)의 표적화 집단에서의 MeCP2 양성 핵의 정량화. (d) *Mecp2* 유전자좌의 CRISPR-SpCas9 표적화 후 MeCP2 단백질 수준의 웨스턴 블롯 및 MeCP2 단백질 수준의 정량화(t-test, ** $p < 0.001$, 3개 배양으로부터의 n=5, 오류 바: s.e.m).

도 8a 내지 도 8e는 실험관내 SpCas9-매개 MeCP2 낙다운 후 뉴런의 수상돌기 트리(dendritic tree)에서의 형태 변화를 보인다. (a) *Mecp2* 유전자좌의 CRISPR-SpCas9 표적화 후의 뉴런에서의 수상돌기 트리의 감소된 복잡성. 스케일 바, 20 μ m. (b) SpCas9 및 *Mecp2* sgRNA로 표적화된 뉴런에서의 수상돌기 가지(dendritic spine) 형태에서의 변화. 스케일 바, 10 μ m. 세포의 형태는 mCherry 작제물과 공동-트랜스펙션되어 시각화되었다. 형태 분석을 위한 세포는 *Mecp2* 염색의 결과에 근거하여 선택되었다. (c) 수상돌기 말단의 수로 평가된 수상돌기 나무 형태 및 (d) Sholl 분석(t-test, *** $p < 0.0001$, 2개 배양으로부터 n=40). (e) 가지(Spine) 밀도 정량화 (t-test, *** $p < 0.0001$, 2개 배양으로부터 n=40, 오류 바: s.e.m).

도 9는 대조 동물 및 SpCas9-매개 *Mecp2* 낙다운으로부터의 뉴런 핵의 RNAseq를 보인다. 박스 플롯은 발현 수준의 변위치(quantile) 당 RNA-seq 라이브러리(대조 sgRNA 또는 *Mecp2* sgRNA 형질도입된 핵으로부터 수득된 100개의 핵 각각의 19개 라이브러리; n=4 동물/그룹) 전체의 검출된 유전자의 수를 나타낸다. 모든 유전자는 그들의 평균 $\log_2(TPM+1)$ 발현 수준에 의해 10개 변위치로 분배된 후, 각 변위치에 대해 검출된 유전자의 수 ($\log_2(TPM+1) > 2$)를 각 시료마다 계수하였다. *Dnmt3a*, *Dnmt1* 및 *Dnmt3b*에 대해 각각 3개의 표적 서열이 서열번호: ____, 서열번호: ____, 및 서열번호: ____로 보여졌다.

도 10a 및 도 10b는 실험관내 DNMT 패밀리 멤버의 다중 게놈 표적화를 보인다. (a) *Dnmt3a*, *Dnmt1* 및 *Dnmt3b* 표적화 서열 및 상응하는 모티프 근접 프로토스페이스(PAM). (b) *Dnmt3a*, *Dnmt1* 및 *Dnmt3b* 유전자좌를 표적으로 하는 SpCas9 및 DNMT 3xsgRNA 벡터로 트랜스펙션시킨 지 48시간 후에 Neuro-2a 세포의 서베이어™ 뉴클레아제 검정 분석. 3개 표적화된 유전자 모두의 효율적인 게놈 편집이 보여진다.

도 11a 내지 도 11c는 표적화된 *Dnmt3a*, *Dnmt1* 및 *Dnmt3b* 유전자좌의 차세대 시퀀싱을 보인다. 마우스 치상회로의 SpCas9 및 DNMT 3xsgRNA의 생체내 전달 후 돌연변이된 *Dnmt3a* (a), *Dnmt1* (b) 및 *Dnmt3b* (c) 유전자좌의 시퀀싱 결과의 예. 녹색: 야생형 서열, 적색 대쉬 선: 검출된 염기, 적색 염기: 삽입 또는 돌연변이. 적색 화살표는 CRISPR-SpCas9 절단 부위를 나타낸다. *Dnmt3a*, *Dnmt1* 및 *Dnmt3b* 유전자좌에 대해 각각, 이 도면에 사용된 전체 서열은 서열번호: ____, 서열번호: ____, 및 서열번호: ____로서 제공된다. 이들은 하기와 같다: 서열번호: (*Dnmt3a*): CCT CCG TGT CAG CGA CCC ATG CCA A, 서열번호: (*Dnmt1*): CCA GCG TCG AAC AGC TCC AGC CCG 및 서열번호: (*Dnmt3B*) AGA GGG TGC CAG CGG GTA TAT GAG G.

도 12는 상이하게 프로그램될 수 있는 뉴클레아제 플랫폼의 비교를 보인다.

도 13a 내지 도 13c는 치료적 게놈 변형의 유형을 보인다. 특정 유형의 게놈 편집 치료요법은 질병 유발 돌연변이의 성질에 좌우된다. a, 유전자 분열에서, 단백질의 병원성 기능은 NHEJ를 갖는 유전자좌를 표적화하여 침묵되었다. 관심 유전자의 삽입결실(indel)의 형성은 종종 이른 종료 코돈 및 비-작용성 단백질 산물, 또는 유전자 기능을 억제하는 전사의 논-센스 매개 붕괴를 일으키는 프레임쉬프트 돌연변이를 야기한다. b, HDR 유전자 교정은 유해한 돌연변이를 교정하는데 사용될 수 있다. DSB는 외인성 제공된, 교정용 HDR 주형의 존재시 돌연변이 부위 근처를 표적으로 한다. 외인성 주형을 이용한 파손된 부위의 HDR 수복은 돌연변이를 교정하여, 유전자 기능을 회복시킨다. c, 유전자 교정에 대한 대안은 유전자 추가이다. 이러한 모드의 치료는 게놈의 세이프 하버(safe-harbor) 유전자좌로 치료적 트랜스유전자를 도입한다. DSB는 세이프 하버 유전자좌 및 파손된 부위에 대한 상동성을 함유하는 HDR 주형에 대해 표적화된 것이고, 프로모터 및 트랜스유전자는 핵으로 도입된다. HDR 수복은 세이프 하버 유전자좌로 프로모터-트랜스유전자 카세트를 복사하여, 유전자 발현 상에 진정한 생리학적 조절이 없더라도 유전자 기능을 회복시킨다.

도 14는 생체의 대 생체내 편집 치료요법의 도식 묘사를 보인다. 생체의 편집 치료요법에서 세포는 환자로부터

제거되어 편집된 후 재-접목된다(상부 패널). 이러한 모드의 치료요법의 성공을 위해, 표적 세포는 신체 외부에서의 생존 및 이식후 표적 조직으로의 귀소(homing)가 가능해야 한다. 생체내 치료요법은 원위치 세포의 게놈 편집을 포함한다(하부 패널). 생체내 시스템 치료요법에서, 세포 신원 또는 상태에 상대적으로 상관 없는 전달 체제가 광범위한 조직 유형에서의 편집을 가져오는 데 사용될 것이다. 이러한 모드의 편집 치료요법이 미래에는 가능할 수 있으나, 현재 이를 실현 가능하게 만들기에는 충분한 전달 시스템은 존재하지 않는다. 생체내 표적화 치료요법은, 특정 기관 시스템에 대해 친화성을 갖는 전달 체제가 환자에게 투여될 때, 임상적으로 관련된 바이러스 벡터를 이용해 실현 가능하다.

도 15는 안구 유전자 치료를 위한 SaCas9 시스템을 보인다.

도 16은 Cas9 상동성 재조합(HR) 벡터를 통한 유전자 치료의 도식 묘사를 보인다.

도 17은 안구 유전자 치료를 위한 예시 프로토콜을 보인다.

도 18a 및 도 18b는 인간 RHO 유전자좌 (P23H 돌연변이를 보이는 대립 형질)을 보인다. 도 7a는 RHO 유전자좌에 대한 가이드 설계를 보인다. 도 7b는 서베이어 검정을 사용한 실험관내 가이드 스크리닝 결과를 보인다.

도 19는 RHO HR AAV 벡터를 보인다.

도 20a 및 도 20b는 CNGA3 및 CNGB3에 대한 가이드 선별을 보인다. (a)는 인간 CNGA3 유전자좌 (두 질병 돌연변이를 보이는 대립 형질) 및 가이드 선별을 보인다. (b)는 인간 CNGB3 유전자좌 (질병 돌연변이를 보이는 대립 형질) 및 가이드 선별을 보인다.

도 21은 CNGA3 HR AAV 벡터를 보인다.

도 22는 CNGB3 HR AAV 벡터를 보인다.

도 23a 및 도 23b는 VEGFA에 대한 가이드 선별을 보인다. (a)는 인간 VEGFA 유전자좌(공통 영역 1)를 보이고; (b)는 인간 VEGFA 유전자좌(공통 영역 2)를 보인다;

도 24는 dCas9-기반 후성적 조정 시스템의 설계를 보인다(시스템의 3 개 성분, dSaCas9, 융합 이펙터, 및 sgRNA가 보여졌다).

도 25a 내지 도 25c는 ATOH1에 대한 가이드 선별을 보인다. (a)는 선별된 매우 접근 가능한 2개의 영역을 보이며; (b)는 매우 접근 가능한 영역 1-청색선이 가이드 서열을 나타내고 자홍색선이 PAM을 나타내고; (c)는 매우 접근 가능한 영역 2-청색선은 가이드 서열을 나타내고 자홍색선은 PAM을 나타낸다.

본원의 도면은 오직 예시의 목적만을 위한 것이며, 본질적으로 축척으로 도시되지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용


[0202] 상세한 설명


[0203]


본 발명의 실시예에 유용한 모든 것, 양 및 제형에 관한 것을 포함하여, 방법, 재료, 전달 비히클, 벡터, 입자, AAV 및 그의 제조 및 이용을 포함하는, CRISPR-Cas 시스템, 그의 성분, 및 그러한 성분의 전달에 대한 일반적 정보에 관하여, 다음에 대하여 참조가 이루어진다: 미국 특허 제8,697,359호, 제8,771,945호, 제8,795,965호, 제8,865,406호, 제8,871,445호, 제8,889,356호, 제8,889,418호 및 제8,895,308호; 미국 특허 공개 US 2014-0310830호(미국 출원 제14/105,031호), US 2014-0287938 A1호(미국 출원 제14/213,991호), US 2014-0273234 A1호(미국 출원 제14/293,674호), US2014-0273232 A1호(미국 출원 제14/290,575호), US 2014-0273231호(미국 출원 제14/259,420호), US 2014-0256046 A1호(미국 출원 제14/226,274호), US 2014-0248702 A1호(미국 출원 제14/258,458호), US 2014-0242700 A1호(미국 출원 제14/222,930호), US 2014-0242699 A1호(미국 출원 제14/183,512호), US 2014-0242664 A1호(미국 출원 제14/104,990호), US 2014-0234972 A1호(미국 출원 제14/183,471호), US 2014-0227787 A1호(미국 출원 제14/256,912호), US 2014-0189896 A1호(미국 출원 제14/105,035호), US 2014-0186958호(미국 출원 제14/105,017호), US 2014-0186919 A1호(미국 출원 제14/104,977호), US 2014-0186843 A1호(미국 출원 제14/104,900호), US 2014-0179770 A1호(미국 출원 제14/104,837호) 및 US 2014-0179006 A1호(미국 출원 제14/183,486호), US 2014-0170753호(미국 출원 제14/183,429호); 유럽 특허 출원 EP 2 771 468호(EP13818570.7호), EP 2 764 103호(EP13824232.6호) 및 EP 2 784 162호(EP14170383.5호); 및 PCT 특허 공개 WO 2014/093661호(PCT/US2013/074743호), WO 2014/093694호(PCT/US2013/074790호), WO 2014/093595호(PCT/US2013/074611호), WO 2014/093718호(PCT/US2013/074825호), WO 2014/093709호














(PCT/US2013/074812호), WO 2014/093622호(PCT/US2013/074667호), WO 2014/093635호(PCT/US2013/074691호), WO 2014/093655호(PCT/US2013/074736호), WO 2014/093712호(PCT/US2013/074819호), WO2014/093701호(PCT/US2013/074800호) 및 WO2014/018423호(PCT/US2013/051418호). 또한, 각각 2013년 1월 30일; 2013년 3월 15일; 2013년 3월 28일; 2013년 4월 20일; 2013년 5월 6일 및 2013년 5월 28일에 출원된 미국 가출원 제 61/758,468호; 제61/802,174호; 제61/806,375호; 제61/814,263호; 제61/819,803호 및 제61/828,130호에 대하여 참조가 이루어진다. 또한, 2013년 6월 17일에 출원된 미국 가출원 제61/836,123호에 대하여 참조가 이루어진다. 또한, 각각 2013년 6월 17일에 출원된 미국 가출원 제61/835,931호, 제61/835,936호, 제61/836,127호, 제61/836,101호, 제61/836,080호 및 제61/835,973호에 대하여 참조가 이루어진다. 추가로, 2013년 8월 5일에 출원된 미국 가출원 제61/862,468호 및 제61/862,355호; 2013년 8월 28일에 출원된 제61/871,301호; 2013년 9월 25일에 출원된 제61/960,777호 및 2013년 10월 28일에 출원된 제61/961,980호에 대하여 참조가 이루어진다. 각각 2014년 6월 10일, 6/10/14에 출원된 PCT 특허 출원 PCT/US2014/041803호, PCT/US2014/041800호, PCT/US2014/041809호, PCT/US2014/041804호 및 PCT/US2014/041806호; 2014년 6월 11일에 출원된 PCT/US2014/041808호; 및 2014년 10월 28일에 출원된 PCT/US2014/62558호 및 각각 2013년 12월 12일에 출원된 미국 가출원 제61/915,150호, 제61/915,301호, 제61/915,267호 및 제61/915,260호; 2013년 1월 29일 및 2013년 2월 25일에 출원된 제61/757,972호 및 제61/768,959호; 2013년 6월 17일에 출원된 제61/835,936호, 제61/836,127호, 제61/836,101호, 제61/836,080호, 제61/835,973호 및 제61/835,931호; 둘 모두 2014년 6월 11일에 출원된 제62/010,888호 및 제62/010,879호; 각각 2014년 6월 10일에 출원된 제62/010,329호 및 제62/010,441호; 및 각각 2014년 2월 12일에 출원된 제61/939,228호 및 제61/939,242호; 2014년 4월 15일에 출원된 제61/980,012호; 2014년 8월 17일에 출원된 제62/038,358호; 각각 2014년 9월 25일에 출원된 제62/054,490호, 제62/055,484호, 제62/055,460호 및 제62/055,487호; 및 2014년 10월 27일에 출원된 제62/069,243호에 대하여 추가로 참조가 이루어진다. 또한, 2014년 9월 25일에 출원된 미국 가출원 제62/055,484호, 제62/055,460호 및 제62/055,487호; 2014년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 제61/980,012호; 및 2014년 2월 12일에 출원된 미국 가출원 제61/939,242호에 대하여 참조가 이루어진다. 특히 미국에 지정된 PCT 출원, 2014년 6월 10일에 출원된 출원 PCT/US14/41806호에 대하여 참조가 이루어진다. 2014년 1월 22일에 출원된 미국 가출원 제61/930,214호에 대하여 참조가 이루어진다. 각각 2013년 12월 12일에 출원된 미국 가출원 제61/915,251호; 제61/915,260호 및 제61/915,267호에 대하여 참조가 이루어진다. 2014년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 USSN 61/980,012호에 대하여 참조가 이루어진다. 특히 미국에 지정된 PCT 출원, 2014년 6월 10일에 출원된 출원 PCT/US14/41806호에 대하여 참조가 이루어진다. 2014년 1월 22일에 출원된 미국 가출원 제61/930,214호에 대하여 참조가 이루어진다. 각각 2013년 12월 12일에 출원된 미국 가출원 제61/915,251호; 제61/915,260호 및 제61/915,267호에 대하여 참조가 이루어진다. 2014년 1월 22일에 출원된 미국 가출원 제61/930,214호에 대하여 참조가 이루어진다. 각각 2013년 12월 12일에 출원된 미국 가출원 제61/915,251호; 제61/915,260호 및 제61/915,267호에 대하여 참조가 이루어진다. 이들 특허, 특허 공보 및 출원 각각, 및 거기에 또는 그들 절차 중에 인용된 모든 문헌("출원 인용 문헌") 및 상기 출원 인용 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌은 상기 출원 인용 문헌에 또는 상기 출원 인용 문헌의 임의의 문헌 및 본원에 참조로서 포함된 임의의 문헌에서 언급된 임의의 제품에 대한 임의의 지침서, 설명서, 제품 명세서, 및 제품 시이트와 함께, 참조로서 본원에 포함되며, 본 발명의 실시예에 이용될 수 있다. 모든 문헌(예를 들어, 이들 특허, 특허 공보 및 출원 및 출원 인용 문헌)은 각각의 개별적 문헌이 참조로서 포함하는 것이 구체적으로 그리고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로서 본원에 포함된다.

[0204] 또한, CRISPR-Cas 시스템에 대한 일반적 정보와 관련하여, 하기가 언급되며(또한, 본원에 참조로 포함된다):

[0205]  *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.* Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. *Science* Feb 15;339(6121):819-23 (2013);

[0206]  *RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems.* Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F, Marraffini LA. *Nat Biotechnol* Mar;31(3):233-9 (2013);

[0207]  *One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering.* Wang H., Yang H., Shivalila CS., Dawlaty MM., Cheng AW., Zhang F., Jaenisch R. *Cell* May 9;153(4):910-8 (2013);

- [0208]  *Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states.* Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):472-6. doi: 10.1038/Nature12466. Epub 2013 Aug 23;
- [0209]  *Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity.* Ran, FA., Hsu, PD., Lin, CY., Gootenberg, JS., Konermann, S., Trevino, AE., Scott, DA., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. *Cell* Aug 28. pii: S0092-8674(13)01015-5. (2013);
- [0210]  *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases.* Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, FA., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, TJ., Marraffini, LA., Bao, G., & Zhang, F. *Nat Biotechnol* doi:10.1038/nbt.2647 (2013);
- [0211]  *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.* Ran, FA., Hsu, PD., Wright, J., Agarwala, V., Scott, DA., Zhang, F. *Nature Protocols* Nov;8(11):2281-308. (2013);
- [0212]  *Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells.* Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, DA., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, BL., Root, DE., Doench, JG., Zhang, F. *Science* Dec 12. (2013). [Epub ahead of print];
- [0213]  *Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA.* Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. *Cell* Feb 27. (2014). 156(5):935-49;
- [0214]  *Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells.* Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. *Nat Biotechnol*. (2014) Apr 20. doi: 10.1038/nbt.2889,
- [0215]  *CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling,* Platt et al., *Cell* 159(2): 440-455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014,
- [0216]  *Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering,* Hsu et al, *Cell* 157, 1262-1278 (June 5, 2014) (Hsu 2014),
- [0217]  *Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system,* Wang et al., *Science*. 2014 January 3; 343(6166): 80-84. doi:10.1126/science.1246981,
- [0218]  *Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation,* Doench et al., *Nature Biotechnology* published online 3 September 2014; doi:10.1038/nbt.3026, 및
- [0219]  *In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9,* Swiech et al, *Nature Biotechnology*; published online 19 October 2014; doi:10.1038/nbt.3055.
- [0220] 그의 각각은 본원에 참조로 포함되고, 하기에 간단히 논의된다:
- [0221]  Cong 등은 스트렙토코커스 썬모필러스 Cas9 및 또한 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9 둘 모두를 기초로 하여 진핵 세포에서 사용하기 위해 II형 CRISPR/Cas 시스템을 조작하였고, Cas9 뉴클레아제가 짧은 RNA에 의해 유도되어 인간 및 마우스 세포에서 DNA의 정밀한 절단을 유도할 수 있는 것을 입증하였다. 이들의 연구는 니킹 효소로 전환됨에 따라 Cas9가 최소의 돌연변이유발 활성을 갖는 진핵 세포에서 상동성-유도된 수복을 촉진하는데 이용될 수 있음을 추가로 보여준다. 또한, 그들의 연구는 다수의 가이드 서열이 단일의 CRISPR 어레이로 인코딩 되어 포유류 계통 내의 내인성 계통 유전자좌 위치에서 몇몇의 동시 편집을 가능하게 할 수 있음을 입증하였으

며, 이는 RNA-안내된 뉴클레아제 기술의 용이한 프로그램화가능성 및 폭넓은 응용 가능성을 입증한다. 세포에서 서열 특이적 DNA 절단을 프로그램화하기 위해 RNA를 이용하는 이러한 능력은 게놈 조작 도구의 새로운 부류를 규정하였다. 이들 연구는 다른 CRISPR 유전자좌가 포유류 세포로 이식될 수 있고, 또한 포유류 게놈 절단을 매개할 수 있음을 추가로 보여준다. 중요하게는, CRISPR/Cas 시스템의 여러 양태가 그의 효능 및 다능성을 증가시키기 위해 추가로 개선될 수 있음이 예견될 수 있다.

[0222] Jiang 등은 스트렙토코커스 뉴모니에 및 에스케리키아 콜라이의 게놈에서 정밀한 돌연변이를 도입시키기 위해 이중-RNA와 복합체화된 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드로믹 반복부(CRISPR)-회합된 Cas9 엔도뉴클레아제를 이용하였다. 상기 접근법은 돌연변이되지 않은 세포를 사멸시키기 위해 표적화된 게놈 부위에서의 이중-RNA:Cas9-유도된 절단에 의존하며, 선택 마커 또는 반대-선택 시스템의 필요를 회피한다. 상기 연구는 편집 주형에서 수행되는 단일- 및 다중 뉴클레오티드 변화를 만들기 위해 짧은 CRISPR RNA(crRNA)의 서열을 변화시킴에 의한 이중-RNA:Cas9 특이성의 재프로그램화를 보고하였다. 상기 연구는 2개의 crRNA의 동시 사용이 멀티플렉스 돌연변이유발을 가능하게 하는 것을 보여준다. 또한, 상기 접근법이 리컴비니어링(recombineering)과 병용하여 이용된 경우, 스트렙토코커스 뉴모니에에서 기재된 접근법을 이용하여 회수된 세포의 거의 100%가 요망되는 돌연변이를 함유하였고, 에스케리키아 콜라이에서, 회수된 65%가 돌연변이를 함유하였다.

[0223] Konermann 등은 DNA-결합 도메인 기반 CRISPR Cas9 효소 및 또한 전사 활성화제 유사 이펙터의 광학적 및 화학적 조절을 가능하게 하는 다능성이고 강력한 기술에 대한 해당 분야의 요구를 다루었다.

[0224] 미생물 CRISPR-Cas 시스템으로부터의 Cas9 뉴클레아제는 20 nt 가이드 서열에 의해 특정 게놈 유전자좌로 표적화되며, 이는 DNA 표적에 대한 특정 미스매치를 용인할 수 있고, 그에 의해 요망되지 않는 표적의 돌연변이 유발을 촉진할 수 있다. 이를 다루기 위해, Ran 등은 표적화된 이중-가닥 파손을 도입시키기 위해 쌍을 형성하는 가이드 RNA와 Cas9 니카아제 돌연변이체를 병용한 접근법을 기재하였다. 게놈 내의 개별의 Nick은 높은 정확도로 수복되므로, 적절한 오프셋 가이드 RNA를 통한 동시 Nicking이 이중-가닥 파손에 필요하고, 표적 절단을 위한 특이적으로 인식된 염기의 수를 연장시킨다. 상기 저자는 쌍을 형성한 Nick을 이용하는 것이 세포주에서 50 내지 1,500배까지 표적의 활성을 감소시킬 수 있고, 표적에 대한 절단 효율을 회생시키지 않고 마우스 접합체에서 유전자 낙아웃을 촉진하는 것을 입증하였다. 이러한 다능성 전략은 높은 특이성을 필요로 하는 매우 다양한 게놈 편집 응용을 가능하게 한다.

[0225] Hsu 등은 표적 부위의 선택을 알아내고, 표적의 효과를 피하기 위해 인간 세포에서 SpCas9 표적화 특이성을 특성화하였다. 상기 연구는 293T 및 293FT 세포에서 100개 초과 예측 게놈 표적의 유전자좌에서 SpCas9-유도된 삽입-결실 돌연변이 수준 및 700개 초과 가이드 RNA 변이체를 평가하였다. 상기 저자는 SpCas9가 미스매치의 수, 위치 및 분포에 민감한 서열-의존성 방식으로 상이한 위치에서 가이드 RNA와 표적 DNA 사이의 미스매치를 용인하는 것을 나타내었다. 상기 저자는 SpCas9-매개 절단이 DNA 메틸화에 의해 영향을 받지 않고, SpCas9 및 sgRNA의 투여량을 적정하여 표적의 변형을 최소화시킬 수 있음을 추가로 나타내었다. 또한, 포유류 게놈 조작 응용을 용이하게 하기 위해, 상기 저자는 표적 서열의 선택 및 확인뿐만 아니라 표적의 분석을 안내하기 위해 웹-기반 소프트웨어 도구를 제공한 것을 보고하였다.

[0226] Ran 등은 포유류 세포에서 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 또는 상동성-유도 수복(HDR)뿐만 아니라 하류 작용성 연구를 위한 변형된 세포주의 생성을 통한 Cas9-매개 게놈 편집을 위한 일련의 도구를 기재하였다. 표적의 절단을 최소화시키기 위해, 상기 저자는 쌍을 형성한 가이드 RNA와 함께 Cas9 니카아제 돌연변이체를 이용한 이중-Nicking 전략을 추가로 기재하였다. 상기 저자에 의해 제공된 프로토콜은 표적 부위의 선택, 절단 효율의 평가 및 표적의 활성의 분석을 위한 가이드를 실험적으로 유래하였다. 상기 연구는 표적 설계로 시작하여, 유전자 변형은 1 내지 2주만 걸리는 기간 내에 달성될 수 있고, 변형된 클론성 세포주가 2 내지 3주 내에 유래될 수 있음을 나타내었다.

[0227] Shalem 등은 게놈-와이드 규모에서 유전자 작용을 질의하기 위한 새로운 방식을 기재한다. 그들의 연구는 64,751개의 독특한 가이드 서열을 이용하여 18,080개 유전자를 표적화시킨 게놈-규모의 CRISPR-Cas9 낙아웃(GeCKO) 라이브러리의 전달이 인간 세포에서 음성 및 양성 선택 스크리닝 둘 모두를 가능하게 하는 것을 보여주었다. 먼저, 상기 저자는 암 및 만능성 줄기 세포에서 세포 생존력에 필수적인 유전자를 확인하기 위한 GeCKO

라이브러리의 사용을 보여주었다. 다음으로, 흑색종 모델에서, 상기 저자는 유전자의 소실이 돌연변이 단백질 키나제 BRAF를 억제하는 치료제인 베무라페닙(vemurafenib)에 대한 내성과 관련된 유전자를 스크리닝하였다. 그들의 연구는 가장 높은 순위의 후보물질이 이전에 확인된 유전자 NF1 및 MED12뿐만 아니라 새로운 히트(hit) NF2, CUL3, TADA2B, 및 TADA1을 포함한 것을 나타내었다. 상기 저자는 동일한 유전자를 표적으로 하는 독립적 가이드 RNA와 높은 비율의 히트 확인 사이에 높은 수준의 일치를 관찰하였고, 따라서 Cas9를 이용한 게놈-규모 스크리닝의 가망성을 입증하였다.

[0228] Nishimasu 등은 2.5 Å 해상도로 sgRNA 및 그의 표적 DNA와의 복합체에서 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9의 결정 구조를 보고하였다. 상기 구조는 그들의 계면에서 양으로 하전된 홈에서 sgRNA:DNA 헤테로듀플렉스를 수용하는 표적 인식 및 뉴클레아제 엮으로 구성된 2엽 구조를 나타내었다. 인식 엮이 sgRNA 및 DNA 결합에 필수적인 반면, 뉴클레아제 엮은 각각 표적 DNA의 상보적 및 비-상보적 가닥의 절단을 위해 적절하게 위치된 HNH 및 RuvC 뉴클레아제 도메인을 함유한다. 뉴클레아제 엮은 또한 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)와의 상호작용을 담당하는 카르복실-말단 도메인을 함유한다. 이러한 고-해상도 구조 및 수반하는 기능 분석은 Cas9에 의한 RNA-안내된 DNA 표적화의 분자 메커니즘을 나타내었고, 이에 따라 새로운 다능성 게놈-편집 기술의 합리적 설계를 용이하게 한다.

[0229] Wu 등은 마우스 배아 줄기 세포(mESC)에서 단일 가이드 RNA(sgRNA)가 로딩된 스트렙토코커스 피오게네스 유래의 촉매적 비활성 Cas9(dCas9)의 게놈-와이드 결합 부위를 맵핑하였다. 저자는 4개의 sgRNA 각각이 NGG 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 및 sgRNA 내의 5-뉴클레오티드 씨드 영역을 종종 특징으로 하는 수십 내지 수천 개의 게놈 부위에 대하여 표적 dCas9를 시험한 것을 보여주었다. 염색질 비접근성은 씨드 서열과 일치하는 다른 부위로의 dCas9 결합을 감소시키고; 따라서 표적외 부위의 70%가 유전자와 회합된다. 상기 저자는 촉매적 활성 Cas9로 트랜스펙션된 mESC 내의 295개의 dCas9 결합 부위의 표적화된 시퀀싱에 의해, 백그라운드 수준 초과로 돌연변이된 단지 하나의 부위가 확인된 것을 나타내었다. 상기 저자는 씨드 매치가 결합을 촉발하나, 표적 DNA와의 광범위한 쌍형성이 절단에 필요한 Cas9 결합 및 절단을 위한 2-상태 모델을 제안하였다.

[0230] Hsu(2014)는 요거트부터 세포의 유전적 스크리닝을 포함하는 게놈 편집까지 CRISPR-Cas9 전력을 일반적으로 논의하는 리뷰 기사이며, 이는 2014년 6월 5일 이전에 출원된 본 명세서 계통의 출원의 정보, 데이터 및 결과에 속한다. Hsu(2014)의 전반적 교시내용은 본 명세서의 특정 모델, 동물을 포함하지 않는다.

[0231] 또한, 본 발명 또는 출원에 대한 종래 기술인 것으로 여겨지지 않지만 본 발명의 실시예 고려될 수 있는 문헌 [Tsai et al, "Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing," Nature Biotechnology 32(6): 569-77 (2014)]이 언급된다.

[0232] 게다가, sgRNA 및 Cas9 단백질 (및 임의로 HDR 주형)을 계면활성제, 인지질, 생분해성 중합체, 지단백질 및 알코올을 포함하거나 필수적으로 구성되거나 구성된 혼합물과 혼합함을 포함하는, 입자 함유 sgRNA-및-Cas9 단백질을 제조하는 방법; 및 이러한 공정으로부터의 입자에 관하여, "DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS"(하기 미국 가출원 중 하나 이상의 또는 모두로부터 우선권을 주장함: 2014년 9월 24일자 출원된 제62/054,490호; 2014년 6월 10일자 출원된 제62/010,441호; 및 2013년 12월 12일자로 각각 출원된 제61/915,118호, 제61/915,215호 및 제61/915,148호)("the Particle Delivery PCT")의 명칭을 가지며 대리인 참조번호 47627.99.2060 및 BI-2013/107의 동시에 제출된 PCT 출원 _____이 언급되며, 이는 본원에 참조로 통합된다. 예를 들어, 여기에서 Cas9 단백질 및 sgRNA는 적절한, 예를 들어, 3:1 내지 1:3 또는 2:1 내지 1:2 또는 1:1 몰비에서, 적절한 온도, 예를 들어, 15 내지 30°C, 예를 들어, 20 내지 25°C, 예를 들어, 실온에서, 적절한 시간, 예를 들어, 15 내지 45분, 예컨대 30분 동안, 유리하게는 멸균된 뉴클레아제 유리 버퍼, 예를 들어, 1X PBS 내에서 함께 혼합되었다. 별도로, 하기와 같은 또는 하기를 포함하는 입자 성분은 알코올, 유리하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올과 같은 C1-6 알킬 알코올, 예를 들어, 100% 에탄올에 용해되었다: 계면활성제, 예를 들어, 양이온성 지질, 예를 들어, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP); 인지질, 예를 들어, 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC); 에틸렌-글리콜 중합체 또는 PEG와 같은 생분해성 중합체, 및 저밀도 지단백질과 같은 지단백질, 예를 들어, 콜레스테롤. 두 용액을 서로 혼합하여 Cas9-sgRNA 복합체를 포함하는 입자를 형성하였다. 따라서, sgRNA는 입자 내에 전체 복합체를 제형하기 전에 Cas9 단백질과 미리 혼합될 수 있다. 제형은 세포 내로 핵산의 전달을 촉진하는 것으로 알려진 상이한 물비의 다른 성분으로 만들어질 수 있다 (예를 들어 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), 1,2-디테트라데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린

(DMPC), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 및 콜레스테롤). 예를 들어 DOTAP : DMPC : PEG : 콜레스테롤 몰비는 DOTAP 100, DMPC 0, PEG 0, 콜레스테롤 0; 또는 DOTAP 90, DMPC 0, PEG 10, 콜레스테롤 0; 또는 DOTAP 90, DMPC 0, PEG 5, 콜레스테롤 5. DOTAP 100, DMPC 0, PEG 0, 콜레스테롤 0일 수 있다. 따라서 본 출원은 sgRNA, Cas9 단백질 및 입자를 형성하는 성분을 혼합하는 것 뿐만 아니라; 이러한 혼합으로부터의 입자를 포함한다. 본 발명의 양태는 입자; 예를 들어, Particle Delivery PCT의 공정과 유사한 공정을 사용하여, 예를 들어, 본 발명에서와 같은 sgRNA 및/또는 Cas9를 포함하는 혼합물 및 예를 들어 Particle Delivery PCT에서와 같은 입자를 형성하는 성분을 혼합하여, 입자를 형성하는 공정을 사용한 입자 및 이러한 혼합으로부터의 입자(또는, 물론, 본 발명에서와 같이 sgRNA 및/또는 Cas9를 포함하는 다른 입자)를 포함한다.

[0233] 본 발명은 CRISPR-Cas 시스템 및 이의 성분에 관한, 게놈 변동 또는 유전자-편집과 같은 서열 표적화와 연류된 유전자 발현의 조절을 위해 사용된 시스템, 방법 및 조성물의 조작 및 최적화에 관한 것이다. 유리한 구현예에서, Cas 효소는 Cas9, 바람직하게는 SpCas9 또는 SaCas9이다.

[0234] 본 발명의 이점은 CRISPR 시스템이 표적외(off-target) 결합 및 이의 결과적인 부작용을 피하는 것이다. 이는 표적 DNA에 대한 높은 정도의 서열 특이성을 갖도록 배열된 시스템을 사용하여 달성된다.

[0235] 아연 핑거 뉴클레아제, 이펙터 뉴클레아제와 같은 전사 활성화제, 및 CRISPR-Cas9와 같은 프로그램될 수 있는 뉴클레아제에 근거한 게놈 편집 기술의 발달에서의 최근의 진보는 진핵 세포의 게놈에서의 정밀한 변화를 만들어낸 출원인의 능력을 상당히 개선하였다. 게놈 편집은 생리학적 과정의 좀더 정확한 세포 및 동물 모델의 생성을 촉진하여 질병에 대한 유전학의 기여를 밝히는 출원인의 능력을 이미 넓히고 있다. 프로그램될 수 있는 뉴클레아제의 특히 관심을 끄는 응용은 통상적인 치료법에 반응하지 않는 유전 질병을 치료하기 위해 영향을 받은 조직 및 세포에서의 유전 돌연변이를 직접 고칠 수 있는 잠재력이다. 출원인은 프로그램될 수 있는 뉴클레아제-기반 치료법의 발달을 위한 현재의 추이뿐만 아니라, 미래의 전망 및 도전을 제공한다.

[0236] 인간 게놈에서의 대략 25,000개의 주석달린(annotated) 유전자 중, 3,000개 이상의 유전자의 돌연변이가 이미 질병 표현형(www.omim.org/statistics/geneMap)과 연관되어 있으며, 더 많은 질병-관련 유전 변이가 경이적인 빠른 속도로 밝혀지고 있다. 현재, 시퀀싱 비용의 빠른 감소, 인간 게놈 프로젝트의 완료, 및 환자로부터의 게놈 시퀀싱 데이터의 기하급수적인 성장으로 인해, 인간 건강에서의 유전학의 역할이 연구, 임상 의학 및 표적 치료학의 발달에서의 주요 영역이 되었다[Lander, E.S. Nature 470, 187-197 (2011)]. 질병의 유전적 기초에 대한 출원인의 이해에서의 이러한 진전은 질병 메커니즘에 대한 출원인의 이해를 개선시켰으며 잠재적인 치료 전략으로의 경향을 나타내게 되었다. 그러나, 확실한 치료적 가설 및 약물 발달에서의 많은 노력에도 불구하고, 강한 유전적 기여를 갖는 질병의 치료에 소분자를 사용하는 것은 아주 제한된 수만이 성공하였다[Thoene, J.G. Small molecule therapy for genetic disease, (Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York, 2010)]. 그러므로, 대안적인 접근이 요구된다. 질병-영향을 받은 세포 및 조직 내의 핵산을 변형할 수 있는 신흥 치료 전략은 치료에 대한 막대한 가능성을 갖는다. 중증-합병성 면역결핍(SCID), 혈우병, 및 특정 효소 결핍과 같은 단일유전자의 고침투성 질병은 이들의 잘 알려진 유전적 특질 및 종종 안전하고 유효한 치료적 대안의 부족 때문에 이러한 치료법에 초점을 맞춰왔다.

[0237] 이제까지 개발된 가장 강력한 유전 치료 전략 중 두 개는 트랜스유전자 발현을 통한 결실된 유전자 기능의 상보성을 가능하게 하는 바이러스 유전자 치료, 및 표적 mRNA의 낙다운에 의한 결함이 있는 유전자의 표적 억제를 매개하는 RNA 간섭(RNAi)이다(문헌[Kay, M.A. Nature reviews. Genetics 12, 316-328 (2011)] 및 문헌[Vaishnav, A.K., et al. Silence 1, 14 (2010)]에서 리뷰됨). 바이러스 유전자 치료는 조혈 줄기/간세포의 게놈으로 영향받은 유전자의 반-무작위 통합 작용성 복사에 의해 SCID 및 위스코트-알드릭 증후군과 같은 조혈 시스템에 영향을 주는 단일유전자의 열성 장애를 성공적으로 치료하는데 사용되어 왔다[Gaspar, H.B., et al. Science translational medicine 3, 97ra79 (2011), Howe, S.J., et al. The Journal of clinical investigation 118, 3143-3150 (2008), Aiuti, A., et al. Science 341, 1233151 (2013)]. RNAi는 그중에서도 암, 노인성 황반변성 및 TTR-아밀로이드증에 관련된 유전자의 기능을 억제하여 임상 시험에서 치료 효과를 나타내기 위해 사용되어 왔다(www.clinicaltrials.gov, 임상 번호: NCT00689065, NCT01961921 및 NCT00259753). 희망 및 최근의 성공에도 불구하고, 바이러스 유전자 치료 및 RNAi는 많은 질병에 대한 이들의 사용을 막는 제한을 갖는다. 예를 들어, 바이러스 유전자 치료는 삼입성 돌연변이 유발 및 조절되지 않는 트랜스유전자 발현을 일으킬 수 있다[Howe, S.J., et al. The Journal of clinical investigation 118, 3143-3150 (2008)]. 대안적으로, RNAi는 표적 유전자의 발현만을 억제할 수 있으므로, 낙다운이 유리한 경우에는 표적에 대해 이를 사용하는 것이 제한된다. 또한, RNAi는 종종 유전자 발현을 완전히 억제할 수 없으며, 따라서 유전자 기능의 완전한 제거가 치료법을 위해 필수적인 경우 질병에 대해 이점을 제공할 수 없다. 이러한 제한을 극복할 수 있는 흥미

로운 대안은 표적 세포의 게놈을 정밀히 변형시켜 해로운 돌연변이의 제거 또는 정정 또는 보호성 돌연변이의 삽입을 야기할 수 있다. Cartier.

- [0238] 자세히 설명되는 바와 같이, 이것이 인용하는 문서에 따라 본원에 참조로서 통합된 Watts의 문헌은, 혈액학적 질환, HIV/AIDS를 포함하는 면역결핍, 및 SCID-X1, ADA-SCID, β -탈라세미아, X-연결 CGD, 위스코트-알드릭 증후군, 판코니 빈혈증, 부신백질이영양증 (ALD), 및 이염백질이영양증 (MLD)을 포함하는, 리소솜 축적 질환과 같은 그의 유전 장애를 포함하는 많은 장애에 대한 매우 매력적인 치료 옵션으로서 조혈 줄기 세포 (HSC) 유전자 치료, 예를 들어, 바이러스-매개 조혈 줄기 세포 (HSC) 유전자 치료법을 논의한다["Hematopoietic Stem Cell Expansion and Gene Therapy" *Cytotherapy* 13(10): 1164-1171. doi:10.3109/14653249.2011.620748 (2011)].
- [0239] 자세히 설명되는 바와 같이, 이것이 인용하는 문서에 따라 본원에 참조로서 통합된 Williams의 문헌은, 신경 탈수초화를 야기하는, 리소솜 축적 질환, 이염백질이영양증 질병(MLD), 아실술파타제 A(ARSA)의 결핍에 의해 야기되는 유전 질병을 갖는 환자로부터의 HSC/P 세포 내로의 렌티바이러스-매개 유전자의 이동; 및 위스코트-알드릭 증후군(WAS)을 갖는 환자(혈액 세포 계통에서의 세포골격 기능을 조절하여 회귀성 감염, 자가면역 증상 및 과도한 출혈 및 백혈병과 림프종의 증가된 위험을 초래하는 비정상적으로 작고 기능부전인 혈소판을 갖는 혈소판감소증에 걸리는, 결합있는 WAS 단백질, 작은 GTPase CDC42의 이펙터를 갖는 환자)의 HSC로의 렌티바이러스-매개 유전자 이동을 보고한다["Broadening the Indications for Hematopoietic Stem Cell Genetic Therapies," *Cell Stem Cell* 13:263-264 (2013)]. 렌티바이러스의 사용과 달리, 당 분야에서의 지식 및 본원 상세한 설명에서의 개시를 가지고, 숙련자는 (예를 들어, ARSA에 대한 코딩 서열을 전달하는 적절한 HDR 주형으로) 돌연변이(아실술파타제 A(ARSA)의 결핍)를 표적으로 하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 MLD(아실술파타제 A(ARSA)의 결핍)에 관하여 HSC를 교정할 수 있다. 렌티바이러스의 사용과 달리, 당 분야에서의 지식 및 본원 상세한 설명에서의 개시를 가지고, 숙련자는 (예를 들어, WAS 단백질에 대한 코딩 서열을 전달하는 적절한 HDR 주형으로) 돌연변이(WAS 단백질의 결핍)를 표적으로 하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 WAS에 관하여 HSC를 교정할 수 있으며; 특히, sgRNA는 WAS(결핍성 WAS 단백질)를 일으키는 돌연변이를 표적으로 할 수 있고, HDR은 WAS 단백질의 적당한 발현을 위한 코딩을 제공할 수 있다.
- [0240] 당 분야에서의 지식 및 본원 상세한 설명에서의 개시를 가지고, 숙련자는 CCR5를 표적으로 하고 낙아웃시키는 CRISPR-Cas9 시스템과 HSC를 접촉하는 것을 포함하는, HIV/AIDS와 같은 면역결핍 질환에 관하여 HSC를 교정할 수 있다. sgRNA(및 유리하게는 이중 가이드 접근, 예를 들어, 한 쌍의 상이한 sgRNAs; 예로서, CCR5-및-Cas9 단백질을 표적으로 하고 낙아웃시킬 수 있는 원발성 인간 CD4+ T 세포 및 CD34+ 조혈 줄기 및 간세포(HSPC)에서의 2개의 임상학적 관련 유전자인 B2M 및 CCR5의 sgRNA 표적화)는 HSC로 도입될 수 있다. 세포는 투여될 수 있고; 임의로 치료/확장될 수 있다; Cartier와 비교하라. 또한 이것이 인용하는 문서에 따라 본원에 참조로서 통합된 Kiem의 문헌["Hematopoietic stem cell-based gene therapy for HIV disease," *Cell Stem Cell*. Feb 3, 2012; 10(2): 137-147]; 이것이 인용하는 문서에 따라 본원에 참조로서 통합된 Mandal 등의 문헌["Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9," *Cell Stem Cell*, Volume 15, Issue 5, p643-652, 6 November 2014]을 참조하라. 또한 이것이 인용하는 문서에 따라 본원에 참조로서 통합된, Ebina의 문헌["CRISPR/Cas9 system to suppress HIV-1 expression by editing HIV-1 integrated proviral DNA" *SCIENTIFIC REPORTS* | 3: 2510 | DOI: 10.1038/srep02510]에서 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 HIV/AIDS와 싸우는 다른 수단으로서 언급되었다.
- [0241] 아연 핑거 뉴클레아제[Urnov, F.D. 등에 의해 리뷰됨(Nature reviews. Genetics 11, 636-646 (2010))], 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제[Bogdanove에 의해 리뷰됨(A.J. & Voytas, D.F. Science 333, 1843-1846 (2011))], 및 클러스터된 규칙적으로 이격된 짧은 재발성 반복(clustered interspaced short palindromic repeat, CRISPR)-연관 뉴클레아제 Cas9[Hsu, P.D. 등에 의해 리뷰됨(*Cell* 157, 1262-1278 (2014))]와 같은 프로그래밍될 수 있는 뉴클레아제에 근거한 게놈 편집 기술은 병에 걸린 세포 및 조직에서의 치료적 게놈 편집을 달성하는 가능성을 열고 있다. 출원인은 본원에 최근의 리뷰를 제공한다.
- [0242] **게놈 편집 기술**
- [0243] 프로그래밍될 수 있는 뉴클레아제는 특정 게놈 유전자좌에서의 표적화 DNA 이중 가닥 파손(DSB)을 도입하여 정확한 게놈 편집을 가능하게 한다. DSB는 뒤이어 DNA 손상을 신호화하고 DSB로 비-상동성 말단 연결(non-homologous end-joining, NHEJ) 또는 상동성 유도 수복(HDR) 중 하나에 대한 내인성 수복 조직을 보충하여 게놈 편집을 매개한다.
- [0244] 현재까지, 뉴클레아제의 주요한 세 개의 클래스인, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFNs, 도 12, 좌측 패널)[Kim, Y.G.,

et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 1156-1160 (1996); Wolfe, S.A., et al. Annual review of biophysics and biomolecular structure 29, 183-212 (2000); Bibikova, M., et al. Science 300, 764 (2003); Bibikova, M., et al. Genetics 161, 1169-1175 (2002); Miller, J., et al. The EMBO journal 4, 1609-1614 (1985); Miller, J.C., et al. Nature bio기술 25, 778-785 (2007)], 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN, 도 1 중간 패널)[Boch, J., et al. Science 326, 1509-1512 (2009); Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J. Science 326, 1501 (2009); Christian, M., et al. Genetics 186, 757-761 (2010); Miller, J.C., et al. Nature biotechnology 29, 143-148 (2011)], 및 CRISPR-연관 뉴클레아제 Cas9(도 1, 우측 패널)[Bolotin, A., et al. Microbiology 151, 2551-2561 (2005); Barrangou, R., et al. Science 315, 1709-1712 (2007); Garneau, J.E., et al. Nature 468, 67-71 (2010); Deltcheva, E., et al. Nature 471, 602-607 (2011); Sapranaszkas, R., et al. Nucleic acids research 39, 9275-9282 (2011); Jinek, M., et al. Science 337, 816-821 (2012); Gasiunas, G., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, E2579-2586 (2012); Cong, L., et al. Science 339, 819-823 (2013); Mali, P., et al. Science 339, 823-826 (2013)]은, 위치-특이적 게놈 편집이 가능하도록 발전되었다. 이러한 3개 유형의 뉴클레아제 시스템은 DNA 인식의 이들의 모드에 근거하여 2개의 카테고리로 크게 분류될 수 있으며- ZFN 및 TALEN이 단백질-DNA 상호작용을 통해 특이 DNA 결합을 달성하였으나, Cas9는 표적 DNA와 직접적으로 염기-쌍을 형성하는 짧은 RNA 가이드 분자를 통해 특정 DNA 서열에 표적화된다(도 13). ZFN 및 TALEN은 서열 불가지론적(agnostic) 뉴클레아제 도메인, *FokI*에 융합된 DNA 결합 도메인으로 구성된 키메라 효소이다[Kim, Y.G., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 1156-1160 (1996); Christian, M., et al. Genetics 186, 757-761 (2010)]. 재-표적화 ZFN 및 TALEN은 ZFN에 대해 특히 도발적이며 TALEN에 대해서는 여전히 어려운, DNA 결합 도메인의 단백질 조작을 필요로 한다[Isalan, M. Nature methods 9, 32-34 (2012); Sun, N. & Zhao, H. Biotechnology and bioengineering 110, 1811-1821 (2013)]. 반대로, Cas9 단백질은 불변이며 수반하는 RNA 가이드의 서열의 작은 부분의 변화에 의해 새로운 게놈 유전자좌로 쉽게 재표적화될 수 있다. 3개 뉴클레아제 모두 광범위한 모델 생물 및 포유류 세포에서 효율적인 게놈 편집을 달성함이 입증되었으며 치료제로서 이들 수단을 발달시키기 위해 산업 및 학계 모두에서 현재 노력 중이다[Tebas, P., et al. The New Engl and journal of medicine 370, 901-910 (2014); Genovese, P., et al. Nature 510, 235-240 (2014); Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011); Yin, H., et al. Nature biotechnology 32, 551-553 (2014)].

[0245] DSB가 만들어지면, 병변은 세포 상태 및 수복 주형의 존재에 따라 NHEJ 또는 HDR에 의해 수복될 수 있다. NHEJ는 수복 주형을 요구하지 않는 공정에서 2개의 DSB 말단에 직접 재결합하여 병변을 수복할 수 있다. NHEJ-매개 DSB 수복은 정확할 수 있지만, 뉴클레아제 활성화에 기인한 NHEJ 기구에 의한 동일 DSB의 반복된 수복은 결국에는 파손 부위에 가교된 작은 삽입 또는 결실 돌연변이의 형성을 야기한다[Bibikova, M., et al. Genetics 161, 1169-1175 (2002)]. 유전자의 코딩 서열로 도입되는 이러한 삽입 또는 결실 (삽입결실)은 논센스-매개 쇠퇴를 통해 mRNA 변성을 초래하여 있으며 작용적 유전자를 격감시키거나 비작용성 말단-절단 단백질의 생산을 야기하는 프레임쉬프트 돌연변이를 일으킬 수 있다[Hentze, M.W. & Kulozik, A.E. Cell 96, 307-310 (1999)]. 그러므로, NHEJ는 RNAi와 유사한 유전자 기능을 억제하는데 사용될 수 있으나, 이는 게놈으로 영구적인 공유 변형을 도입하여 표적화 세포에 유전자 발현의 지속적인 억제를 유도한다.

[0246] 비교하면, HDR은 연구자가 외인성 DNA 주형을 사용하여 DSB 수복의 결과를 명시하도록 한다[Bibikova, M., et al. Science 300, 764 (2003); Choulika, A., et al. Molecular and cellular biology 15, 1968-1973 (1995); Bibikova, M., et al. Molecular and cellular biology 21, 289-297 (2001); Krejci, L., et al. Nucleic acids research 40, 5795-5818 (2012); Plessis, A., et al. Genetics 130, 451-460 (1992); Rouet, P., et al. Molecular and cellular biology 14, 8096-8106 (1994); Rudin, N., et al. Genetics 122, 519-534 (1989)]. 표적화 DSB의 도입에 따라, HDR 기구는 주형 DNA에서 인코딩되는 임의의 변화를 통합하는 과정에서, 파손 부위에 서열 상동성을 갖는 외인성으로 제공된 단일 또는 이중 가닥 DNA 주형을 이용하여 병변을 수복하는데 사용되는 DNA를 합성할 수 있다. 예를 들어, HDR은 적절하게 설계된 수복 주형과 함께 사용되어 유해한 돌연변이를 직접 교정하여, 유전자 발현의 생리학적 조절을 유지하면서 유전자 기능을 복원할 수 있다.

[0247] **치료적 적용을 위한 고려사항**

[0248] 게놈 편집 치료법에서의 첫번째 고려사항은 서열-특이적 뉴클레아제의 선택이다. 각 뉴클레아제 플랫폼은 치료적 이점을 최대화하기 위해 치료의 맥락에서 균형을 맞춰야하는 많은 것 중 강함 및 약함의 이들 자체의 독특한 세트를 갖는다(도 12).

[0249] 지금까지는, 뉴클레아제의 두 가지 치료적 편집 접근법은 상당한 가능성을 보여왔다: 유전자 파괴 및 유전자 교정. 유전자 파괴는 유전 요소에서의 표적화 삽입결실을 생성하여 종종 환자에게 이로운 기능 돌연변이의 손실을 야기하는 NHEJ의 자극을 포함한다(도13a). 그에 반해, 유전자 교정은 HDR을 사용하여 질병 유발 돌연변이를 역전시켜 교정된 요소의 생리학적 조절을 보존하는 동안 기능을 복원한다(도 13b). HDR은 또한 치료적 트랜스유전자를 게놈 내의 규정된 '세이프 하버(safe harbor)' 유전자좌로 삽입하여 손실된 유전자 기능을 회복하는 데 사용될 수 있다(도 13c).

[0250] 효과적일 수 있는 특정 편집 치료법에서, 충분히 높은 수준의 변형이 표적 세포 집단에서 달성되어 질병 증상을 역전해야 한다. 이러한 치료적 변형 '역치'는 치료 후 편집된 세포의 적합성 및 증상을 역전하기 위해 필수적인 유전자 산물의 양에 의해 결정된다.

[0251] **세포 적합성 및 결과**

[0252] 적합성에 대하여, 편집은 이들의 편집되지 않은 대응부에 관하여 처리된 세포에 대해 3개의 가능성있는 결과를 생성한다: 증가되거나, 중립이거나 감소된 적합성. 증가된 적합성의 경우에서, 예를 들어 SCID-X1의 치료에서, 변형된 조혈 간세포는 선택적으로 편집되지 않은 상대에 관하여 상대적으로 확대된다. SCID-X1는 조혈 림프구 계통의 적합한 발달을 위해 요구되는 기능인, IL2RG 유전자에서 돌연변이에 의해 발생하는 질병이다[Leonard, W.J., et al. Immunological reviews 138, 61-86 (1994); Kaushansky, K. & Williams, W.J. Williams hematology, (McGraw-Hill medical, New York, 2010)]. SCID-X1에 대해 바이러스 유전자 치료를 받은 환자의 임상 시험, 및 SCID-X1 돌연변이의 자연적인 교정의 드문 예에서, 교정된 조혈 간세포는 또한 이러한 발달의 차단물을 해소하고 이들의 질병에 걸린 대상에 대해 상대적으로 확대되어 치료법을 매개할 수 있다[Bouso, P., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 274-278 (2000); Hacein-Bey-Abina, S., et al. The New England journal of medicine 346, 1185-1193 (2002); Gaspar, H.B., et al. Lancet 364, 2181-2187 (2004)]. 이러한 경우에서, 편집된 세포가 선택적인 이점을 갖는 경우, 매우 적은 수의 편집된 세포는 확대를 통해 증폭될 수 있으며, 환자에게 치료적 이익을 제공한다. 대조적으로, 만성 육아종 장애(CGD)와 같은 다른 조혈 질병을 위한 편집은, 편집된 조혈 간세포에 대한 적합성에서의 변화를 유도하지 않아, 치료적 변형 역치를 증가시킬 것이다. CGD는 식세포 옥시다아제 단백질을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이에 의해 발생하며, 이는 호중구에 의해 일반적으로 사용되어 병원균을 죽이는 활성산소종을 생성한다[Mukherjee, S. & Thrasher, A.J. Gene 525, 174-181 (2013)]. 이러한 유전자의 기능부전이 조혈 간세포 적합성 또는 발달에 영향을 주지 않으나, 감염과 싸우는 성숙된 조혈 세포 유형의 능력에만 영향을 주므로, 이러한 질환에서 편집된 세포의 우선적 확대가 없을 가능성이 있을 것이다. 사실은, CGD에서 유전자 교정 세포에 대한 선택적인 이점이 유전자 치료 시험에서 관찰되지 않았으며, 이는 장기간 세포 접목의 어려움을 이끌어 낸다[Malech, H.L., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 12133-12138 (1997); Kang, H.J., et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 19, 2092-2101 (2011)]. 이와 같이, 상당히 높은 수준의 편집은, 편집이 표적 세포에 대해 증가된 적합성을 생성하는 질병에 비해, 편집이 중립 적합성 이점을 생성하는 CGD와 같은 질병을 치료하는데 필요할 것이다. 암 세포에서의 종양 억제 유전자에 대한 기능을 회복하기 위한 경우일 수 있기 때문에, 편집이 적합성 단점을 부과할 경우, 변형된 세포는, 편집 비율에 비해 낮은 치료의 이득이 발생하는 이들의 질병 상대에 비해 더 성공적일 것이다. 이러한 후자 부류의 질병은 게놈 편집 치료법으로 치료하는 것이 특히 어려울 것이다. X-관련 만성 육아종증(CGD)은 식세포 NADPH 산화효소가 없거나 이의 감소된 활성에 의해 숙주 방어의 유전 장애이다. 본원의 기재 및 당 분야의 지식으로부터, 숙련자는 (예를 들어, 식세포 NADPH 산화효소에 대한 코딩 서열을 전달하는 적합한 HDR 주형을 가지고) 돌연변이(식세포 NADPH 산화효소가 없거나 이의 활성이 감소)를 표적화하거나 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용할 수 있으며; 특별히, sgRNA는 CGD(결핍된 식세포 NADPH 산화효소)가 생기게 하는 돌연변이를 표적화할 수 있으며, HDR은 식세포 NADPH 산화효소의 적절한 발현에 대한 코딩을 제공할 수 있다.

[0253] 세포 적합성이외에, 질병을 치료하는 데 필수적인 유전자 산물의 양은 또한 증상을 역전하기 위해 달성되어야 하는 치료적 게놈 편집의 최소 수준에 영향을 미친다. 혈우병 B는 유전자 산물 수준에서의 작은 변화가 임상 결과에서의 상당한 변화를 야기할 수 있는 한 질병이다. 이러한 질병은, 응고 연쇄반응에서의 성분으로서 기능하는, 간에서 혈액으로 일반적으로 분비되는 단백질인 유전자 인코딩 인자 IX에서의 돌연변이에 의해 생성한다. 혈우병 B의 임상적 심각성은 인자 IX 활성의 양에 관련된다. 심각한 질병은 정상 활성의 1% 미만인 것에 관련이 있으며, 질병의 좀더 완화된 형태는 인자 IX 활성의 1% 초과인 것에 관련이 있다[Kaushansky, K. & Williams, W.J. Williams hematology, (McGraw-Hill Medical, New York, 2010); Lofqvist, T., et al. Journal of

internal medicine 241, 395-400 (1997)]. 이는 적은 비율의 간(liver) 세포에 대해서라도 인자 IX 발현을 회복할 수 있는 편집 치료법이 임상적 결과에서 큰 영향을 가질 수 있음을 제안한다. 출생 후 바로 혈우병 B를 갖는 마우스 모델을 교정하기 위해 ZFN을 사용하는 연구는 3 내지 7%의 교정이 질병 증상을 역전하는데 충분함을 입증하였으며, 이는 이러한 가설에 임상전 증거를 제공한다[Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011)].

[0254] 유전자 산물 수준에서의 작은 변화가 편집된 세포에 대한 적합성 이점이 있는 임상 결과 및 질병에 영향을 줄 수 있는 장애는, 치료적 변형 역치가 현재 기술에 의해 주어진 높은 기회의 성공을 가능하게 하기에 충분히 낮으므로 게놈 편집 치료법을 위한 이상적인 표적이다.

[0255] 이러한 질병을 표적화하는 것은 현재 임상전 수준 및 1상 임상 실험에서 편집 치료법을 이용하여 성공한 결과를 나타낸다(하기 표 참조). DSB 수복 경로 조작 및 뉴클레아제 전달에서의 향상은 편집된 세포에 대한 중립 적합성 이점을 갖는 질병, 또는 다량의 유전자 산물이 치료를 위해 필요한 질병에 대한 이러한 유망한 결과를 확장시키는 데 필요하다. 하기 표는 치료적 모델에 대한 게놈 편집의 적용의 예를 보인다.

질병 유형	사용된 뉴클레아제 플랫폼	치료 전략	참조
혈우병 B	ZFN	정확한 유전자 서열의 HDR-메개 삽입	Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011)
HIV	ZFN 및 CRISPR	CCR5의 NHEJ-메개된 불활성화	Tebas, P., et al. The New England journal of medicine 370, 901-910 (2014), Holt, K., et al. Nature biotechnology 28, 839-847 (2010), Perez, E.E., et al. Nature biotechnology 26, 808-816 (2008), Ye, L., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 9591-9596 (2014)
DMD	CRISPR 및 TALEN	정지 코돈의 NHEJ-메개 제거, 및 HDR-메개 유전자 교정	Ousterout, D.G., et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 21, 1718-1726 (2013), Long, C., et al. Science 345, 1184-1188 (2014)
HBV	TALEN 및 CRISPR	바이러스 DNA의 NHEJ-메개 결실	Bloom, K., et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 21, 1889-1897 (2013), Lin, S.R., et al. Nucleic acids 3, c186 (2014)
SCID	ZFN	정확한 유전자 서열의 HDR-메개 삽입	Genovese, P., et al. Nature 510, 235-240 (2014)
백내장	CRISPR	마우스 접합체에서의 돌연변이의 HDR-메개 교정	Wu, Y., et al. Cell stem cell 13, 659-662 (2013)
당포성 섬유증	CRISPR	장 줄기 세포 오르가노이드에서의 CFTR의 HDR-메개 교정	Schwank, G., et al. Cell stem cell 13, 653-658 (2013)
유전성 티로신혈증	CRISPR	간에서 돌연변이의 HDR-메개 교정	Yin, H., et al. Nature biotechnology 32, 551-553 (2014)

[0256]

[0257] 구현예는 혈우병 B, SCID(예를 들어, SCID-X1, ADA-SCID) 또는 유전성 티로신혈증 돌연변이-운반 조혈 줄기 세포를 혈우병 B, SCID(예를 들어, SCID-X1, ADA-SCID) 또는 유전성 티로신혈증(예를 들어, Li, Genovese 또는 Yin에 기재된 것과 같음)에 대해 관심 게놈 유전자좌를 표적화하는 sgRNA 및 Cas9 단백질과 접촉하는 것을 포함하며; 이는 유리하게는 적합한 HDR 주형으로 돌연변이를 교정한다.

[0258] **DSB 수복 경로의 효율**

[0259] NHEJ 및 HDR DSB 수복의 활성화는 세포 유형 및 세포 상태에 의해 상당히 달라진다. NHEJ는 세포 주기에 의해 고도로 조절되지 않으며 세포 유형 전체에 효율적이어서, 접근 가능한 표적 세포 집단에서 높은 수준의 유전자 파괴를 가능하게 한다. 대조적으로, HDR은 S/G2 상 동안 주로 작용하므로, 활발하게 분열하는 세포로 한정되며, 이는 유사 분열 세포에 대한 정확한 게놈 변형을 필요로 하는 치료를 제한한다[Ciccia, A. & Elledge, S.J. *Molecular cell* 40, 179-204 (2010); Chapman, J.R., et al. *Molecular cell* 47, 497-510 (2012)].

[0260] HDR을 통한 교정의 효율은 표적화된 유전자좌의 후성적 상태 또는 서열, 또는 사용된 특이 수복 주형 배치(단일 가닥 대 이중 가닥, 긴 상동성 부위 대 짧은 상동성 부위)에 의해 조절될 수 있다[Hacein-Bey-Abina, S., et al. *The New Engl and journal of medicine* 346, 1185-1193 (2002); Gaspar, H.B., et al. *Lancet* 364, 2181-2187 (2004); Beumer, K.J., et al. *G3* (2013)]. 표적 세포에서의 NHEJ 및 HDR 기구의 상대적 활성화 또한, 이러한 경로들이 DSB를 해결하기 위해 경쟁하므로 유전자 교정 효율에 영향을 준다[Beumer, K.J., et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19821-19826 (2008)]. HDR은 또한, 이것이 뉴클레아제 및 수복 주형의 공존 전달을 필요로 하기 때문에, NHEJ 전략을 보이지 않는 전달 도전을 도입한다. 실제로, 이러한 제약은 현재까지 치료적으로 관련된 세포 유형에서의 낮은 수준의 HDR을 갖는다. 그러므로, 개념 증명(proof-of-concept) 임상전 HDR 치료가 혈우병 B 및 유전성 티로신혈증의 마우스 모델에 대해 현재 기술되었지만, 임상적 번역은 질병을 치료하는 NHEJ 전략에 크게 초점을 맞추고 있다[Li, H., et al. *Nature* 475, 217-221 (2011); Yin, H., et al. *Nature biotechnology* 32, 551-553 (2014)].

[0261] **세포 및 조직 표적화**

[0262] 임의의 주어진 유전자 편집 응용은, 소분자 치료제보다 실질적으로 더 도전적인 이러한 다중 부분의 전달을 만드는 단백질, 작은 RNA 분자, 및/또는 수복 주형의 조합을 포함할 수 있다. 게놈 편집 도구의 전달을 위한 두 가지의 주요 전략이 개발되었다: 생체의 및 생체내. 생체의 치료에서, 질병 세포는 신체로부터 제거되어 편집된 후 환자에게 다시 이식된다(도 14, 상부 패널). 생체의 편집은 표적 세포 집단이 잘 규정되고 세포로 전달된 치료 분자의 특이 용량이 특정화되도록 하는 이점을 갖는다. 후자의 고려사항은, 뉴클레아제의 양을 적정하는 것이 이러한 돌연변이를 감소시킬 수 있으므로, 특히 표적화하지 않은 변형이 관심사일 때 중요할 것이다(Hsu et al., 2013). 생체의 접근의 다른 이점은 통상적으로 연구 및 유전자 치료 적용을 위한 배양에서의 세포 내로의 단백질 및 핵산의 효율적인 전달 시스템의 발달에 의해 달성될 수 있는 높은 편집 비율이다.

[0263] 그러나, 소수의 질병으로의 이의 적용을 제한하는 생체의 접근의 큰 결점 두 가지가 있다. 첫째는, 표적 세포가 신체 외부에서 조작에서 생존할 수 있어야 한다. 뇌와 같은 많은 조직에서, 신체 외부에서 세포를 배양했을 때, 이 세포가 생존에 실패하거나 이의 생체내 기능을 위해 필수적인 특성이 손실되므로 중대한 도전이다. 그러므로, 생체의 치료법은 조절 시스템과 같은 생체의 배양 및 조작을 할 수 있는 성인 줄기 세포 집단을 갖는 조직으로 매우 한정된다. 두번째로는, 배양된 세포는 종종 환자에게 재도입시 잘 접목되지 않아, 치료의 효율이 감소한다. 그러나, 접목은, 임상적으로 실현 가능하나 환자에게 상당한 위험을 일으키는 이식 전에 숙주 세포를 격감시키는 제거 조건화 양생법(ablative conditioning regimens)에 의해 향상될 수 있다[Bunn, H.F. & Aster, J. *Pathophysiology of blood disorders*, (McGraw-Hill, New York, 2011)].

[0264] 생체내 게놈 편집은 이들의 본래 조직에서의 세포 유형으로 편집 시스템의 직접 전달을 포함한다(도 14, 하부 패널). 생체내 편집은 영향을 받은 세포 집단이 생체의 조작을 할 수 없는 질병이 치료될 수 있게 한다. 뿐만 아니라, 뉴클레아제를 세포로 정위치(in situ) 전달하는 것은 다수의 조직 및 세포 유형의 치료를 가능하게 한다. 이들 특성은 생체의 치료법보다 더 넓은 범위의 질병에 생체내 치료를 적용할 수 있도록 할 것이다.

[0265] 현재까지, 생체내 편집은 규정된, 조직-특이적 친화성을 갖는 바이러스 벡터의 사용을 통해 주로 달성되어 왔다. 이러한 벡터는 현재 카고 운반 능력 및 친화성에 따라 제한되며, 이는 간, 근육 및 눈에서와 같이 임상적으로 유용한 벡터를 이용한 형질도입이 효율적인 기관시스템으로의 치료법의 이러한 모드를 한정한다[Kotterman, M.A. & Schaffer, D.V. *Nature reviews. Genetics* 15, 445-451 (2014); Nguyen, T.H. & Ferry, N. *Gene therapy* 11 Suppl 1, S76-84 (2004); Boye, S.E., et al. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 509-519 (2013)].

[0266] 생체내 전달에서의 주요 잠재적 장벽은 치료를 위해 필수적인 다량의 바이러스에 반응하여 생성될 수 있는 면역 반응이나, 이러한 현상은 게놈 편집에서는 특유의 현상이 아니고 다른 바이러스 기반 유전자 치료법에서 관찰되었다[Bessis, N., et al. *Gene therapy* 11 Suppl 1, S10-17 (2004)]. 또한 편집 뉴클레아제 자체로부터의 웹티

드가 MHC 클래스 I 분자 상에 존재하여 면역 반응을 자극하는 것이 가능하나, 임상전 수준에서 이러한 사건을 뒷받침하는 증거가 거의 없다. 이러한 모드의 치료법에서의 다른 주요 어려움은 생체내 게놈 편집 뉴클레아제의 분배 및 이에 따른 용량을 조절하는 것으로, 예상하기 어려울 수 있는 표적의 돌연변이 프로파일을 이끌어낸다.

[0267] **성공적인 게놈 편집 치료 전략의 예**

[0268] **생체의 편집 치료법**

[0269] 조혈 세포의 정제, 배양 및 이식에 대한 장기간의 지속적인 임상 전문지식은 SCID, 판코니 빈혈증, 위스코트-알드릭 증후군 및 겸상 적혈구 빈혈증과 같은 혈액 시스템에 영향을 주는 질환이 생체의 편집 치료법에 주목하도록 하였다. 조혈 세포에 주목하는 다른 이유는, 혈액 장애에 대한 유전자 치료를 설계하려는 이전의 노력 덕분에, 상대적으로 높은 효율의 전달 시스템이 이미 존재한다는 것이다. 이들 이점에도 불구하고, 이식에 따른 세포 접목의 흔한 낮은 효율로 인해, 편집된 세포가 적합성 이점을 갖는 질병에 대해 이러한 모드의 치료법이 적용되어 적은 수의 접목된 편집된 세포가 확장되어 질병을 치료하도록 하는 것이 필요해졌다.

[0270] 판코니 빈혈증: 적어도 15개 유전자에서의 돌연변이(*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL/BACH1/BRIP1*, *FANCL/PHF9/POG*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C*, 및 *FANCP/SLX4/BTBD12*) 가 판코니 빈혈증을 발생시킬 수 있다. 이러한 유전자들로부터 생산된 단백질은 FA 경로와 같이 알려진 세포 공정에 관련된다. FA 경로는, DNA 복제라고 불리는 DNA의 새로운 카피를 만드는 공정이 DNA 손상에 의해 차단됐을 때 시작(활성화)된다. FA 경로는 손상된 영역으로 특정 단백질을 보내, DNA 수복을 유발하여 DNA 복제를 지속할 수 있다. FA 경로는 서열간 교차 결합(ICL)으로서 알려진 DNA 손상의 특정 유형에 특히 반응한다. ICL은 DNA의 반대 가닥 상의 두 DNA 구성 블록(뉴클레오티드)이 비정상적으로 부착되거나 서로 연결됐을 때 발생하며, 이는 DNA 복제 공정을 중단시킨다. ICL은 체내에서 생산되는 독성 성분의 증가 또는 특정 암 치료법 약물로의 치료에 의해 발생할 수 있다. 8개 단백질은 판코니 빈혈증 그룹과 함께 결합하여 FA 코어 복합체로서 알려진 복합체를 형성한다. FA 코어 복합체는 *FANCD2* 및 *FANCI*로 명명된 2개의 단백질을 활성화시킨다. 이러한 2개의 단백질의 활성화는 ICL의 영역으로 DNA 수복 단백질을 제공하여 교차 결합이 제거될 수 있도록 하여 DNA 복제를 지속시킬 수 있다. FA 코어 복합체. 좀더 상세하게는, FA 코어 복합체는 *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL*, 및 *FANCM*로 이루어진 핵 다중 단백질 복합체로서, E3 유비퀴틴 리가아제로서 기능하며 *FANCD2* 및 *FANCI*로 구성된 이중이량체인 ID 복합체의 활성화를 매개한다. 단일유비퀴틴화(monoubiquitinated)되면, *FANCD1/BRCA2*, *FANCN/PALB2*, *FANCL/BRIP1*, 및 *FANCO/RAD51C*를 포함하는 FA 경로와 고전적인 중앙 억제 하류와 상호작용하여 상동성 재조합(HR)을 통한 DNA 조합에 기여한다. FA 경우 중 80 내지 90%는 *FANCA*, *FANCC*, 및 *FANCG*의 3개 유전자 중 하나의 돌연변이에 기인한다. 이러한 유전자는 FA 코어 복합체의 성분을 생산하기 위한 지시를 제공한다. FA 코어 복합체와 결합된 이러한 유전자에서의 돌연변이는 비작용성인 복합체를 발생시키고 전체 FA 경로를 방해할 것이다. 결과로서, DNA 손상은 효율적으로 수복되지 않으며 ICL은 시간이 흐르면서 증강된다. Geiselhart는 생체내 HSC의 교정을 야기하는 렌티바이러스 인코딩 *FANCC* 유전자의 대퇴부내 주입에 관련된 FA 및 동물 실험을 논의했다["Review Article, Disrupted Signaling through the Fanconi Anemia Pathway Leads to Dysfunctional Hematopoietic Stem Cell Biology: Underlying Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies," Anemia Volume 2012 (2012), Article ID 265790, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/265790>]. 이러한 기재 및 당 분야의 지식으로부터, FA과 결부된 하나 이상의 돌연변이를 표적화하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용할 수 있으며, 예를 들어, CRISPR-Cas9 시스템은 FA가 생기게 하고 하나 이상의 *FANCA*, *FANCC* 또는 *FANCG*의 교정 발현을 제공하는 *FANCA*, *FANCC*, 또는 *FANCG*의 하나 이상의 돌연변이를 각각 표적화하는 sgRNA(들) 및 HDR 주형(들)을 갖는다.

[0271] 이러한 질환은, 감염이 CD4+ T 세포에 대한 적합성 단점을 야기하는 HIV이다.

[0272] HIV 치료를 위한 게놈 편집의 근거는 바이러스에 대해 세포성 공동-수용체인 CCR5에서의 기능 돌연변이의 손실에 동형인 대상체가 감염에 매우 저항성을 가지고 있어 건강하다는 발견으로부터 기원한 것으로, 이는 게놈 편집으로 이러한 돌연변이를 모방하는 것이 안전하고 효과적인 치료 전략일 수 있음을 제안하는 것이다[Liu, R., et al. Cell 86, 367-377 (1996)]. 이러한 발상은, HIV 감염된 환자가 기능 CCR5 돌연변이의 손실에 동형인 기증자로부터의 동종이계 골수 이식을 받았을 때 임상적으로 입증되며, 이는 HIV의 탐지되지 않는 수준 및 정상적인 CD4 T-cell 계수의 회복을 야기한다[Hutter, G., et al. The New England journal of medicine 360, 692-698 (2009)]. 비용 및 잠재적인 이식편 대 숙주병 때문에 골수 이식 대부분의 HIV 환자에 대한 현실적인 치료 전략이 아니지만, 환자의 자체 T-세포를 전환시키는 HIV 치료법이 현실적이다.

[0273] HIV의 인간화 마우스 모델에서의 CCR5를 낙아웃시키기 위해 ZFNs 및 NHEJ를 사용하는 초기 연구는 CCR5 편집된

CD4 T 세포의 이식이 바이러스 로딩 및 CD4 T-세포 계수를 개선함을 보였다[Perez, E.E., et al. Nature biotechnology 26, 808-816 (2008)]. 중요하게는, 이러한 모델은 또한 HIV 감염이 CCR5 nul1 세포의 선별을 야기함을 보이며, 이는 편집이 적합성 이점을 부여하고 소수의 편집된 세포가 치료 효과를 잠재적으로 나타내도록 함을 제안한다.

[0274] 이러한 결과 및 다른 유망한 임상전 연구로서, 환자 T 세포에서 CCR5를 낮아짓시키는 게놈 편집 치료법은 현재 인간에서 테스트되고 있다[Holt, N., et al. Nature biotechnology 28, 839-847 (2010); Li, L., et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 21, 1259-1269 (2013)]. 최근 I상 임상 시험에서, HIV 환자로부터 CD4+ T 세포가 제거되고 CCR5 유전자를 낮아짓시키기 위해 설계된 ZFN으로 편집되고, 환자에게 다시 자가조직적으로 이식했다[Tebas, P., et al. The New England journal of medicine 370, 901-910 (2014)]. 이러한 시험으로부터의 초기 결과는, 치료의 위험 및 효율을 완전히 이해하기에는 탐구 시간이 너무 짧기는 했지만, CCR5 유전자좌의 ZFN을 통한 게놈 편집이 안전함을 제안한다.

[0275] 생체의 편집 치료법은 최근에 유전자 교정 전략을 포함하는 것으로 확장되었다. 생체의 HDR에 대한 장벽은 SCID-X1을 앓고 있는 환자로부터 수득된 조혈 줄기 세포 (HSC)에서의 돌연변이된 IL2RG 유전자의 유전자 교정을 달성한 Genovese와 동료로부터의 최근 논문에서 극복되었다[Genovese, P., et al. Nature 510, 235-240 (2014)]. Genovese 등은 다중모드 전략을 사용하여 HSC에서의 유전자 교정을 성취했다. 첫째로, HSC는 IL2RG에 대한 치료적 cDNA를 인코딩하는 HDR 주형 인코딩을 포함하는 통합-결핍 렌티바이러스를 사용하여 형질도입되었다. 형질도입 후, 세포는 IL2RG에서의 돌연변이 핫스팟을 표적화하는 ZFN을 인코딩하는 mRNA로 전기천공되어 HDR 기반 유전자 교정을 자극하였다. HDR 비율을 증가시키기 위해, 배양 조건이 HSC 절단을 고무시키는 소분자로 최적화되었다. 최적화된 배양 조건, 뉴클레아제 및 HDR 주형으로, SCID-X1 환자로부터의 유전자 교정된 HSC를 치료적으로 적절한 비율로 배양에서 수득되었다. 동일한 유전자 교정 과정을 겪은 영향받지 않은 대상체로부터의 HSC는 HSC 기능에 대한 표준인 마우스에서의 장기간 조혈을 지속시킬 수 있다. HSC는 모든 조혈 세포 유형을 일으킬 수 있으며 자가 조직적으로 이식되어, 이들을 모든 조혈 유전자 장애에 대한 매우 가치있는 세포 집단으로 만들었다[Weissman, I.L. & Shizuru, J.A. Blood 112, 3543-3553 (2008)]. 유전자 교정된 HSC는 원칙적으로, 광범위한 유전적 혈액 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 이 연구를 게놈 편집에서 흥미로운 돌파구로 만들었다.

[0276] *생체내 편집 치료법*

[0277] 생체내 편집 치료법은 생체의 전략에 대한 유사한 도전에 직면하며, 또한 소수의 효율적인 전달 시스템에 의해 제한된다. 표적 유전자좌의 비효율적인 변형은 전달에서의 임의의 비효율성에 의해 약화되어, 강력한 전달 플랫폼이 결여된 조직을 이 모드의 치료법으로 치료하기가 특히 어렵게 만들었다. 그러나, 전달이 효율적인 기관시스템에서는, 다수의 흥미로운 임상전 치료적 성공이 이미 존재한다.

[0278] 성공적인 생체내 편집 치료법의 첫 번째 예는 혈우병 B의 마우스 모델에서 입증되었다[Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011)]. 더 이전에 언급된 바와 같이, 응고 캐스케이드의 결정적인 성분인 유전자 인코딩 인자 IX에서의 기능-손실 돌연변이에 의해 발생한 혈우병 B는 X-연관 열성 장애이다. 심하게 영향을 받은 대상체에서의 이의 수준의 1%로 인자 IX 활성을 회복하는 것은, 이러한 수준을 달성하기 위해 어린 연령에서부터 예방적으로 이러한 환자로의 재조합 인자 IX의 주입이 임상적 합병증을 상당히 개선하기 때문에, 질병을 상당히 완화된 형태로 변형시킬 수 있다[Lofqvist, T., et al. Journal of internal medicine 241, 395-400 (1997)]. 그러므로, 단지 낮은 수준의 HDR 유전자 교정이 환자의 임상 결과를 변화시키는데 필수적일 것이다. 게다가, 인자 IX는 바이러스 벡터 인코딩 편집 시스템에 의해 효율적으로 형질도입될 수 있는 기관인 간에서 합성되고 분비된다. 당 분야에서의 지식 및 본원에서의 기재를 이용하여, 숙련자는 (예를 들어, 인자 IX에 대한 코딩 서열을 전달하는 적합한 HDR 주형을 가지고) 돌연변이(유전자 인코딩 인자 IX에서의 기능-손실 돌연변이에 의해 발생하는 X-연관 열성 장애)를 표적화하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 혈우병 B에 관한 HSC를 교정할 수 있으며; 특히, sgRNA는 혈우병 B를 일으키는 돌연변이를 표적화할 수 있으며, HDR은 인자 IX의 적절한 발현을 위한 코딩을 제공할 수 있다.

[0279] 간친화성 아데노-관련 바이러스(AAV) 혈청형 인코딩 ZFN 및 교정 HDR 주형을 사용하여, 무린 간에서의 돌연변이된 인간화 인자 IX 유전자의 7%까지의 유전자 교정이 달성되었다[Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011)]. 이는 응고 캐스케이드의 기능의 측정인, 응고 형성 역학의 개선을 야기하며, 이는 생체내 편집 치료법이 실현 가능할 뿐만 아니라 효과적임을 처음으로 입증한 것이다.

[0280] 이 연구를 기반으로 하여, 다른 그룹이 최근에 CRISPR-Cas9로 간의 생체내 게놈 편집을 사용하여 유전성 티로신

혈증의 마우스 모델을 성공적으로 치료하고 심혈관 질병에 대한 보호를 제공하는 돌연변이를 생성하였다. 이러한 두 가지의 별개의 적용은 간 기능 부전에 관련된 장애에 대한 이 접근의 다재다능을 입증한다[Yin, H., et al. Nature biotechnology 32, 551-553 (2014); Ding, Q., et al. Circulation research 115, 488-492 (2014)]. 다른 기관 시스템으로의 생체내 편집의 응용은 이 전략이 폭넓게 적용 가능함을 입증하는데 필수적이다. 현재, 바이러스 및 비-바이러스 벡터 둘 다를 최적화하기 위한 노력은 이 모드의 치료법으로 치료될 수 있는 장애의 범위를 확장시키기 위해 진행 중이다[Kotterman, M.A. & Schaffer, D.V. Nature reviews. Genetics 15, 445-451 (2014); Yin, H., et al. Nature reviews. Genetics 15, 541-555 (2014)].

[0281] 편집 뉴클레아제의 특이성

[0282] 게놈 편집 도구의 특이성은 임상 적용을 위한 주요 안전성 고려사항 중 하나이다. 유전적 변형은 영구적이며, 유해한 표적의 돌연변이는 종양원성 잠재성 및 그외 원하지 않는 부작용을 갖는 세포를 생성할 가능성을 갖는다. 더욱이, 표적외 편집으로부터 야기된 종양원성 돌연변이는 편집된 세포의 확장을 이끌어 낼 수 있으므로, 낮은 수준의 표적외 돌연변이유발이라도 대단히 파괴적인 결과를 가질 수 있다.

[0283] 두 가지 이슈가 미해결로 남아있다: 표적외 효과의 평가 및 감소. 많은 연구가 ZFN, TALEN, 및 Cas9 뉴클레아제의 표적화 특이성을 평가하기 위해 시도되었다. ZFN[Pattanayak, V., et al. Nature methods 8, 765-770 (2011); Gabriel, R., et al. Nature biotechnology 29, 816-823 (2011)] 및 TALEN[Guilinger, J.P., et al. Nature methods 11, 429-435 (2014)] 특이성을 특성화하는 제한된 수의 연구만이 ZFN 및 TALEN 표적외 활성을 탐지하려는 도전을 강조하였다. 중요하게는, CCR5-표적화 ZFN의 동일한 쌍의 표적외 프로파일의 특성화를 시도하는 2개의 독립적인 연구가 개별적이고 중복되지 않는 표적외 부위로 돌아갔으며, 이는 뉴클레아제 특이성의 분석과 관련된 도전을 강조하는 것이다.

[0284] 많은 연구가 부분적으로 Cas9의 RNA-가이드 DNA 표적화 메커니즘의 간단함 때문에 Cas9의 특이성의 평가를 시도 하였으며, 이는 왓슨-크릭 염기쌍 규칙에 근거하는 가능한 표적외화 메커니즘에 관한 가설을 확립하기가 상당히 쉬워지게 만들었다. 초기 박테리아[Sapranuskas, R., et al. Nucleic acids research 39, 9275-9282 (2011)], 생화학[Jinek, M., et al. Science 337, 816-821 (2012); Gasiunas, G., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, E2579-2586 (2012)], 및 포유류 [Cong, L., et al. Science 339, 819-823 (2013)] 실험은 가이드 서열의 3' 8-12bp 시드(seed) 영역이 단일 염기 미스매치에 민감할 수 있음을 제안하였으며, 추가 작업은 특히 고농도의 Cas9 및 가이드 RNA가 있는 상황에서 이러한 경험에 입각한 방법이 필연적으로 정확하지 않음을 보였다[Fu, Y., et al. Nature biotechnology 31, 822-826 (2013); Cho, S.W., et al. Genome research 24, 132-141 (2014); Hsu, P.D., et al. Nature biotechnology 31, 827-832 (2013); Mali, P., et al. Nature biotechnology 31, 833-838 (2013); Pattanayak, V., et al. Nature biotechnology 31, 839-843 (2013)]. 많은 이러한 연구들은 세포주에서 실행되었으며 온-표적 서열에 대한 높은 수준의 상동성을 갖는 게놈 부위에서의 Cas9-매개 돌연변이유발을 시험하였으며 놀랄 것도 없이, 높은 상동성의 표적외 부위의 부분집합이 뉴클레아제에 의해 상당히 돌연변이됨이 발견됐다. 그러나, 이 연구들에 의해 평가된 가능한 표적외 부위의 범주는 컴퓨터로 예상된 부위로 한정된다. 더 최근에는, Cas9-편집 세포주의 전체-게놈 시퀀싱이 표적외 돌연변이의 낮은 발생 정도를 나타냈으며, 이는 Cas9-매개 게놈 편집이 특이적일 수 있음을 제안한다[Veres, A., et al. Cellstem cell 15, 27-30 (2014)]. 이 연구들에도 불구하고, DSB의 직접 포획과 같은 좀 더 개선된 방법[Crosetto, N., et al. Nature methods 10, 361-365 (2013)] 및 뉴클레아제 치료에 의해 잠재적으로 부과된 더 큰 구조 변이(즉 전좌)를 탐지할 수 있는 기술을 사용하여 넓은 표적외 게놈의 공평한 평가가 시급한 요구로 남아있으며 프로그램될 수 있는 뉴클레아제에 의해 부과된 돌연변이유발의 진정한 위험을 이해하기 위해 착수될 수 있을 것이다. 표적외 효과가 세포-유형 특이적일 수 있음이 주목할 가치가 있으며; 예를 들어 불규칙한 DSB 수복 경로를 갖는 변형된 세포주 표적외 효과가 원래 건강한 세포에서 발견될 수 있는 표적외 효과를 과대평가할 수 있다.

[0285] 표적외 효과의 빈도를 감소하기 위해, 많은 그룹이 Cas9의 표적 특이성을 급격히 개선한다. 예를 들어, 불가피한 이중이량체로서 기능하는 단일-가닥 DNA 니카아제로의 Cas9의 변형은 컴퓨터적으로 예측된 오프 표적 부위에서 표적외 삽입결실 형성을 극적으로 감소시킨다[Mali, P., et al. Nature biotechnology 31, 833-838 (2013); Ran, F.A., et al. Cell 154, 1380-1389 (2013)]. 게다가, 가이드 RNA의 트렁케이션 뿐만 아니라 촉매적 불활성화 Cas9 및 FokI 뉴클레아제 도메인 사이의 융합에 근거한 RNA-가이드 FokI 뉴클레아제 또한 표적화 특이성의 개선된 수준을 달성할 수 있다 [Fu, Y., et al. Nature biotechnology 32, 279-284 (2014); Guilinger, J.P., et al. Nature biotechnology 32, 577-582 (2014); Tsai, S.Q., et al. Nature biotechnology 32, 569-576 (2014)]. 이들 뉴클레아제 전략, 및 미래의 개선된 뉴클레아제 전략이 치료적 적용을 위해 가능할 때는 언제든지

지 고려된다.

[0286] **치료적 적용을 위한 Crispr-Cas 시스템 및 조성물, 예를 들어, 게놈 편집**

[0287] 일반적으로, CRISPR-Cas 또는 CRISPR 시스템에 관련된 본 문헌 전반에 걸친 논의 이외에, CRISPR-Cas 또는 CRISPR 시스템은 여기서 인용된 문헌, 예를 들어, WO 2014/093622호(PCT/US2013/074667호)에 사용되는 바와 같으며, 집합적으로 Cas 유전자를 인코딩하는 서열, tracr(전사-활성화 CRISPR) 서열(예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr-메이트 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "직접 반복부" 및 tracrRNA-가공 부분 직접 반복부 포함), 가이드 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서"로도 지칭) 또는 당해 용어가 본원에 사용되는 바와 같은 "RNA(들)"(예를 들어, 가이드 Cas9에 대한 RNA(들), 예를 들어, CRISPR RNA 및 전사활성화(tracr) RNA 또는 단일의 가이드 RNA(sgRNA)(키메라 RNA)) 또는 CRISPR 유전자좌로부터의 기타 서열 및 전사물을 포함하는 CRISPR-관련("Cas") 유전자의 발현에 수반되거나, 그의 활성을 유도하는 전사물 및 다른 요소를 지칭한다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열의 위치에서 CRISPR 복합체의 형성을 증진시키는 요소(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 프로토스페이서로도 지칭)를 특징으로 한다. CRISPR 복합체의 형성의 맥락에서, "표적 서열"은 가이드 서열이 상보성을 갖도록 설계된 서열을 지칭하며, 여기서, 표적 서열과 가이드 서열 간의 혼성화는 CRISPR 복합체의 형성을 증진시킨다. 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질 내에 위치한다. 일부 구현예에서, 직접 반복부는 다음의 기준을 일부 또는 전부 만족하는 반복 모티프를 검색함으로써 가상 환경에서 확인될 수 있다: 1. II형 CRISPR 유전자좌의 측부 배치된 게놈 서열의 2 Kb 창에서 발견됨; 2. 20 내지 50 bp에 걸쳐 있음; 3. 20 내지 50 bp 이격되어 있음. 일부 구현예에서, 이들 기준 중 2개가 사용될 수 있으며, 예를 들어 1과 2, 2와 3, 또는 1과 3이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 3개 모두의 기준이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR 복합체에서 tracr 서열이 하나 이상의 헤어핀을 가지며, 30개 이상의 뉴클레오티드 길이, 40개 이상의 뉴클레오티드 길이 또는 50개 이상의 뉴클레오티드 길이이고; 가이드 서열이 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이이며, CRISPR/Cas 효소가 II형 Cas9 효소인 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 용어 가이드 서열 및 가이드 RNA는 상기 언급된 문헌, 예를 들어, WO2014/093622호(PCT/US2013/074667호)에서 상호교환 가능하게 사용된다. 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화하고, 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열과 그의 상응하는 표적 서열 간의 상보성의 정도는 적절한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬되는 경우, 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 최적의 정렬은 서열을 정렬하기에 적절한 임의의 알고리즘의 사용으로 결정될 수 있으며, 그의 비제한적인 예는 스미스-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘, 니들만-분쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘, 버로우즈-휠러 트랜스포름(Burrows-Wheeler Transform)에 기초한 알고리즘(예를 들어, 버로우즈 휠러 얼라이너(Burrows Wheeler Aligner)), ClustalW, Clustal X, BLAT, 노보얼라인(Novoalign)(노보크라프트 테크놀로지즈(Novocraft Technologies)(www.novocraft.com에서 이용 가능함), ELAND(일루미나(Illumina), 미국 캘리포니아주 샌 디에고), SOAP(soap.genomics.org.cn에서 이용 가능) 및 Maq(maq.sourceforge.net에서 이용 가능)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 이하의 뉴클레오티드 길이이다. 바람직하게는 가이드 서열은 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이이다. 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하는 가이드 서열의 능력은 임의의 적절한 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 시험되는 가이드 서열을 포함하는 CRISPR 복합체를 형성하기에 충분한 CRISPR 시스템의 성분은 예를 들어, CRISPR 서열의 성분을 인코딩하는 벡터로의 트랜스펙션에 의해서와 같이 상응하는 표적 서열을 갖는 숙주 세포로 제공될 수 있으며, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 서베이어 검정에 의해서와 같은 표적 서열 내의 우선적인 절단의 평가로 이어질 수 있다. 유사하게, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 절단은 표적 서열, 시험되는 가이드 서열 및 시험 가이드 서열과 상이한 대조군 가이드 서열을 포함하는 CRISPR 복합체의 성분을 제공하고, 표적 서열에서 시험 및 대조군 가이드 서열 반응 간의 결합 또는 절단 비율을 비교함으로써 시험판에서 평가될 수 있다. 다른 검정이 가능하며, 해당 분야의 숙련자에게 떠오를 것이다. 가이드 서열은 임의의 표적 서열을 표적화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 게놈 내의 서열이다. 예시적인 표적 서열은 표적 게놈에서 독특한 것들을 포함한다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9에 대하여, 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXGG의 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서, NNNNNNNNNNNXGG(N은 A, G, T 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXGG의 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서,

NNNNNNNNNNXXGG(N은 A, G, T 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 스트렙토코커스 써모필러스 CRISPR1 Cas9에 대하여, 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXXAGAAGW의 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서, NNNNNNNNNNNXXAGAAGW(N은 A, G, T 또는 C이고; X는 임의의 것일 수 있으며; W는 A 또는 T임)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXXAGAAGW의 스트렙토코커스 써모필러스 CRISPR1 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서, NNNNNNNNNNNXXAGAAGW(N은 A, G, T 또는 C이고; X는 임의의 것일 수 있으며; W는 A 또는 T임)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 스트렙토코커스 피오케네스 Cas9에 대하여, 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXXGGXG의 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서, NNNNNNNNNNNXXGGXG(N은 A, G, T 또는 C이고; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 게놈 내의 독특한 표적 서열은 형태 MMMMMMMNNNNNNNNNNXXGGXG의 스트렙토코커스 피오케네스 Cas9 표적 부위를 포함할 수 있으며, 여기서, NNNNNNNNNNNXXGGXG(N은 A, G, T 또는 C이고; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈 내에 단일의 존재를 갖는다. 이들 서열 각각에서, "M"은 A, G, T 또는 C일 수 있으며, 서열을 독특한 것으로 확인하는데 고려될 필요는 없다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 가이드 서열 내의 2차 구조의 정도를 감소시키도록 선택된다. 일부 구현예에서, 가이드 서열의 뉴클레오티드의 약 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 이하가 최적으로 폴딩되는 경우 자가-상보성 염기 쌍형성에 참여한다. 최적의 폴딩은 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드 폴딩 알고리즘에 의해서 결정될 수 있다. 일부 프로그램은 최소 깃스 자유 에너지의 계산에 기초한다. 그러한 한 알고리즘의 예는 mFold로서, 문헌[Zuker and Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148)]에서 설명되었다. 폴딩 알고리즘의 다른 예는 온라인 웹서버인 RNAfold인데, 이것은 중심 구조 예측 알고리즘을 사용하여, 비엔나 대학(University of Vienna)의 이론 화학 연구소(Institute for Theoretical Chemistry)에서 개발되었다(예를 들어, 문헌[A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24]; 및 문헌[PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1151-62] 참조).

[0288]

일반적으로, tracr 메이트 서열은 다음 중 하나 이상을 증진시키기에 충분한, tracr 서열과의 상보성을 갖는 임의의 서열을 포함한다: (1) 상응하는 tracr 서열을 함유하는 세포에서 tracr 메이트 서열이 측부 배치된 가이드 서열의 절제; 및 (2) CRISPR 복합체가 tracr 서열에 혼성화되는 tracr 메이트 서열을 포함하는 표적 서열에서의 CRISPR 복합체의 형성. 일반적으로, 상보성의 정도는 2개의 서열 중 더 짧은 서열의 길이에 따른 tracr 메이트 서열과 tracr 서열의 최적의 정렬을 참조하여 이루어진다. 최적의 정렬은 임의의 적절한 정렬 알고리즘에 의해 결정될 수 있으며, tracr 서열 또는 tracr 메이트 서열 중 어느 하나에서의 자가-상보성과 같이 2차 구조를 추가로 설명할 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 중 보다 짧은 것의 길이를 따른 tracr 서열과 tracr 메이트 서열 간의 상보성의 정도는 최적으로 정렬되는 경우, 약 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 일부 구현예에서, tracr 서열은 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, tracr 서열 및 tracr 메이트 서열은 2개 간의 혼성화가 헤어핀과 같은 2차 구조를 갖는 전사물을 생성하도록 단일의 전사물 내에 함유된다. 본 발명의 일 구현예에서, 전사물 또는 전사된 폴리뉴클레오티드 서열은 적어도 2개 이상의 헤어핀을 갖는다. 바람직한 구현예에서, 전사물은 2, 3, 4 또는 5개의 헤어핀을 갖는다. 본 발명의 추가의 구현예에서, 전사물은 최대 5개의 헤어핀을 갖는다. 헤어핀 구조에서, 루프의 상류 및 마지막 "N"의 5' 서열의 부분은 tracr 메이트 서열에 상응하며, 루프의 3' 서열의 부분은 tracr 서열에 상응한다. 가이드 서열, tracr 메이트 서열 및 tracr 서열을 포함하는 단일의 폴리뉴클레오티드의 추가의 비제한적인 예는 하기와 같으며(5'에서 3'으로 표기), 여기서, "N"은 가이드 서열의 염기를 나타내고, 소문자의 제1 블록은 tracr 메이트 서열을 나타내며, 소문자의 제2 블록은 tracr 서열을 나타내고, 마지막 폴리-T 서열은 전사 종결자를 나타낸다: (1)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaagatttaGAAAtaatctgcagaagctacaagataa
ggcttcatgccgaaatcaacacctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT; (2)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaagataaaggcttcatgccg
aatcaacacctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT; (3)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaagataaaggcttcatgccg
aatcaacacctgtcattttatggcagggtgtTTTTTT; (4)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagactaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaactt
gaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTT; (5)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagactaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtcggttatcaac ttgaaaaagtgtTTTTTT; 및 (6)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagactagAAATAGcaagttaaaataaggctagtcggttatcaTT TTTTTT. 일부 구현예에서, 서열 (1) 내지 (3)은 스트렙토코커스 써모필러스 CRISPR1 유래의 Cas9와 병용하여 사용된다. 일부 구현예에서, 서열

(4) 내지 (6)은 스트렙토코커스 피오게네스 유래의 Cas9와 병용하여 사용된다. 일부 구현예에서, tracr 서열은 tracr 메이트 서열을 포함하는 전사물과 별개의 전사물이다.

[0289] 일부 구현예에서, 후보 tracrRNA가 다음의 기준을 일부 또는 전부 만족하는 서열에 의해서 연속하여 예측될 수 있다: 1. 직접 반복부에 대한 서열 상동성(최대 18-bp 미스매치를 사용하여 Geneious에서 모티프 검색); 2. 전사 방향에서 예측된 Rho-독립적 전사 종결자의 존재; 및 3. tracr RNA와 직접 반복부 사이의 안정적인 헤어핀 2차 구조. 일부 구현예에서, 이들 기준 중 2개가 사용될 수 있으며, 예를 들어 1과 2, 2와 3, 또는 1과 3이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 3개의 기준이 모두 사용될 수 있다.

[0290] 일부 구현예에서, 키메라 합성 가이드 RNA(sgRNA) 설계는 직접 반복부와 tracr RNA 사이에 적어도 12 bp의 듀플렉스 구조를 혼입할 수 있다.

[0291] 독성 및 표적외 효과의 최소화를 위해, 전달되는 CRISPR 효소 mRNA 및 가이드 RNA의 농도를 조절하는 것이 중요할 것이다. CRISPR 효소 mRNA 및 가이드 RNA의 최적의 농도는 세포 또는 비-인간 진핵 동물 모델에서 상이한 농도를 시험함으로써, 그리고 잠재적인 표적외 게놈 유전자좌에서의 변형 정도를 분석하는 딥 시퀀싱(deep sequencing)을 사용함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 인간 게놈의 EMX1 유전자에서 5'-GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA-3'을 표적화하는 가이드 서열에 대해, 딥 시퀀싱은 다음의 2개의 표적외 유전자좌, 즉 1: 5'-GAGTCTAGCAGGAGAAGAA-3' 및 2: 5'-GAGTCTAAGCAGAAGAAGAA-3'에서 변형 수준을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 표적 상의 변형의 가장 높은 수준을 제공하는 한편 표적외 변형의 수준을 최소화하는 농도가 생체내 전달을 위해 선택되어야 한다. 대안적으로, 독성 수준 및 표적외 효과를 최소화하기 위해, CRISPR 효소 닉카아제 mRNA (예를 들어 D10A 돌연변이를 지니는 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9)는 관심 부위를 표적화하는 가이드 RNA의 쌍과 함께 전달될 수 있다. 2개의 가이드 RNA는 다음과 같이 이격될 필요가 있다. 독성 및 표적외 효과를 최소화하기 위한 가이드 서열 및 전략은 WO 2014/093622호(PCT/US2013/074667호)에서와 같을 수 있다.

[0292] CRISPR 시스템은 유리하게는 II형 CRISPR 시스템으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체, 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래된다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, CRISPR 시스템은 II형 CRISPR 시스템이며, Cas 효소는 Cas9이고, 이는 DNA 절단을 촉매작용시킨다. Cas 단백질의 비제한적인 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9(Csn1 및 Csx12로도 알려짐), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 그의 상동체 또는 그의 변형된 버전을 포함한다.

[0293] 일부 구현예에서, 비변형 CRISPR 효소, 예를 들어, Cas9는 DNA 절단 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 표적 서열 내 및/또는 표적 서열의 상보물 내와 같은 표적 서열의 위치에서 1개 또는 둘 모두의 가닥의 절단을 유도한다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 표적 서열의 처음 또는 마지막 뉴클레오티드로부터 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500개 이상의 염기쌍에서 1개 또는 둘 모두의 가닥의 절단을 유도한다. 일부 구현예에서, 벡터는 상응하는 야생형 효소에 대하여 돌연변이되어, 돌연변이된 CRISPR 효소에 표적 서열을 함유하는 표적 폴리뉴클레오티드의 1개 또는 둘 모두의 가닥의 절단 능력이 결여되게 한 CRISPR 효소를 인코딩한다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스로부터의 Cas9의 RuvC I 촉매 도메인 내에서의 아스파르트산에서 알라닌으로의 치환(D10A)은 Cas9를 두 가닥 모두를 절단하는 뉴클레아제에서 닉카아제(단일 가닥 절단)로 전환시킨다. Cas9가 닉카아제가 되게 하는 돌연변이의 다른 예는 제한 없이, H840A, N854A 및 N863A를 포함한다. 추가의 예로서, Cas9의 2개 이상의 촉매 도메인(RuvC I, RuvC II 및 RuvC III 또는 HNH 도메인)을 돌연변이시켜, 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 돌연변이된 Cas9를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, D10A 돌연변이를 H840A, N854A 또는 N863A 돌연변이 중 하나 이상과 조합하여, 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 Cas9 효소를 생성한다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 돌연변이된 효소의 DNA 절단 활성이 비-돌연변이 형태의 효소의 DNA 절단 활성의 약 25%, 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.01% 이하인 경우 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 것으로 여겨지며; 예는 돌연변이된 형태의 DNA 절단 활성이 0이거나, 비-돌연변이 형태에 비하여 무시해도 될 정도인 경우일 수 있다. 효소가 SpCas9가 아닌 경우, 돌연변이는 SpCas9의 위치 10, 762, 840, 854, 863 및/또는 986에 상응하는 임의의 또는 모든 잔기에서 이루어질 수 있다(이것은 예를 들어 표준 서열 비교 도구에 의해서 확인될 수 있다). 특히, 다음의 돌연변이 중 일부 또는 전부가 SpCas9에서 바람직하며: D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A; 뿐만 아니라 대체 아미노산 중 임의의 것에 대한 보존적 치환도 예상된다. 다른 Cas9의 상응하는 위치에서의 동일한 돌연변이 (또는 이들 돌연변이의 보존적 치환)도 바람직하다. D10 및 H840이 SpCas9에서 특히 바람직하다. 그러나, 다른 Cas9에서도 SpCas9 D10 및 H840

에 상응하는 잔기가 또한 바람직하다. Sa Cas9의 경우에서, 예를 들어, N580A인 N580에서 돌연변이는 유리하다. SpCas9의 오솔로그가 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다. Cas 효소는 이것이 II형 CRISPR 시스템으로부터의 다중의 뉴클레아제 도메인을 가진 가장 큰 뉴클레아제에 대한 상동성을 공유하는 일반적인 효소 부류를 말할 수 있음에 따라, 확인된 Cas9일 수 있다. 가장 바람직하게, Cas9 효소는 spCas9(스트렙토코커스 피오게네스 Cas9) 또는 saCas9(스타필로코커스 아우레우스(S. aureus) Cas9)로부터의 것이거나, 또는 그로부터 유래된다. StCas9"는 스트렙토코커스 써모필러스로부터의 야생형 Cas9를 말하며, 이것의 단백질 서열은 수탁 번호 G3ECR1로서 스위스프로트(SwissProt) 데이터베이스에 제공된다. 유사하게, 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9 또는 spCas9도 수탁 번호 Q99ZW2로서 스위스프로트에 포함된다. 본 발명자에 의하면, 유래된다는 것은 그 유래된 효소가 야생형 효소와 높은 정도의 서열 상동성을 가진다는 의미에 상당히 기초하지만, 그것이 본원에 기재된 바와 같이 몇몇 방식으로 돌연변이(변형)되었다는 것을 의미한다. 명백히 다르지 않다면, 용어 Cas 및 CRISPR 효소가 본원에 일반적으로 상호교환 가능하게 사용된다는 것이 인식될 것이다. 상기 언급된 대로, 본원에 사용된 잔기 넘버링의 다수는 스트렙토코커스 피오게네스에서 II형 CRISPR 유전자좌로부터의 Cas9 효소를 말한다. 그러나 본 발명은 SpCas9, SaCa9, St1Cas9 등과 같은 다른 미생물 종들로부터의 더 많은 Cas9를 포함한다는 것이 인식될 것이다. 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래된 Cas9 또는 임의의 밀접하게 관련된 Cas9에 의한 효소 작용은 표적 부위 서열에 이중 가닥 파단을 생성하며, 표적 부위 서열은 가이드 서열의 20개 뉴클레오티드와 혼성화하고, 표적 서열의 20개 뉴클레오티드 뒤에 프로토스페이서-인접 모티프(PAM) 서열(예는 NGG/NRG 또는 본원에 기재된 바와 같이 결정될 수 있는 PAM을 포함함)을 가진다. 위치-특이적 DNA 인식 및 절단에 대한 Cas9를 통한 CRISPR 활성은 가이드 서열, 가이드 서열과 부분적으로 혼성화하는 tracr 서열 및 PAM 서열에 의해서 한정된다. CRISPR 시스템의 더 많은 양태는 문헌[Karginov and Hannon, The CRISPR system: small RNA-guided defence in bacteria and archaea, Mole Cell 2010, January 15; 37(1): 7]에 기재되어 있다. 스트렙토코커스 피오게네스 SF370으로부터의 II형 CRISPR 유전자좌는 4개 유전자 Cas9, Cas1, Cas2 및 Csn1의 클러스터뿐만 아니라 2개의 비-코딩 RNA 요소, tracr RNA 및 비-반복 서열의 짧은 스트레치(스페이서, 각각 약 30bp)가 개재된 반복 서열(직접 반복부)의 특징적인 어레이를 함유한다. 이 시스템에서, 표적화된 DNA 이중-가닥 파단(DSB)이 순차적 4단계에서 생성된다. 먼저, 2개의 비-코딩 RNA, 예비-crRNA 어레이 및 tracr RNA가 CRISPR 유전자좌로부터 전사된다. 두 번째로, tracrRNA가 예비-crRNA의 직접 반복부와 혼성화하고, 이것은 이어서 개별 스페이서 서열을 함유하는 성숙 crRNA로 가공된다. 세 번째로, 성숙 crRNA:tracrRNA 복합체는 crRNA의 스페이서 영역과 프로토스페이서 DNA 간의 헤테로듀플렉스 형성을 통해 프로토스페이서와 상응하는 PAM으로 구성된 DNA 표적으로 Cas9를 지향시킨다. 마지막으로, Cas9는 PAM의 상류 표적 DNA의 절단을 매개하여 프로토스페이서 내에 DSB를 생성한다. 2개의 직접 반복부(DR)가 측부 배치된 단일 스페이서로 구성된 예비-crRNA 어레이도 용어 "tracr-메이트 서열"에 의해서 포함된다. 특정 구현예에서, Cas9는 구성적으로 존재하거나 유도 가능하게 존재하거나, 조건부로 존재하거나 투여되거나 전달될 수 있다. Cas9 최적화를 사용하여 기능을 증진시키거나 신규한 기능을 발생시킬 수 있으며, 키메라 Cas9 단백질을 생성할 수 있다. 그리고 Cas9는 총칭적인 DNA 결합 단백질로 사용될 수 있다.

[0294] 통상적으로, 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서, CRISPR 복합체(표적 서열에 혼성화되고, 하나 이상의 Cas 단백질과 복합체화되는 가이드 서열을 포함)의 형성은 표적 서열 내의 또는 그 근처의(예를 들어, 그로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 이상의 염기쌍 내의) 하나 또는 두 가닥 모두의 절단을 야기한다. 이론에 구속되지 않으면서, 야생형 tracr 서열의 전부 또는 그의 일부(예를 들어, 야생형 tracr 서열의 약 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85개 이상의 뉴클레오티드)를 포함하거나 그로 이루어질 수 있는 tracr 서열은 또한, 가이드 서열에 작동 가능하게 연결된 tracr 메이트 서열의 전부 또는 일부로의 tracr 서열의 적어도 일부에 따른 혼성화에 의해서와 같이 CRISPR 복합체의 일부를 형성할 수 있다.

[0295] 코돈 최적화된 서열의 예는, 이러한 예에서, 진핵생물, 예를 들어, 인간(즉, 인간에서의 발현을 위해 최적화된) 또는 본원에 논의된 바와 같은 다른 진핵생물, 동물 또는 포유류에서의 발현을 위해 최적화된 서열이며; 예를 들어, WO 2014/093622호(PCT/US2013/074667호)에서의 SaCas9 인간 코돈 최적화 서열을 참조한다. 이것이 바람직하지만, 다른 예들도 가능하며, 인간 이외의 숙주 종에 대한 코돈 최적화 또는 특정 기관에 대한 코돈 최적화가 공지되어 있다는 것이 인식될 것이다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소를 인코딩하는 효소 코딩 서열이 진핵세포와 같은 특정 세포에서의 발현에 대해 코돈 최적화된다. 진핵 세포는, 특정 유기체, 예를 들어, 제한은 아니지만, 인간 또는 본원에 논의된 바와 같은 비-인간 진핵생물 또는 동물 또는 포유류, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 개, 가축 또는 비인간 포유류 또는 영장류를 포함하는 포유류의 것들이거나 또는 그로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간이나 동물에 임의의 실질적인 의학적인 이익 없이 그들을 고통스럽게 할 수 있는 인간의 생식계열 유전자 아이덴티티를 변형하기 위한 과정 및/또는 동물의 유전자 아이덴티티를 변형하기 위한 과정과 또한 이러한 과정으로부터 생긴 동물이 배제될 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는 고유 아미노산 서열

을 유지하면서, 고유 서열의 적어도 하나의 코돈(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50개 이상의 코돈)을 숙주 세포의 유전자에 더욱 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써, 관심 숙주 세포에서의 발현의 증진을 위해 핵산 서열을 변형시키는 과정을 지칭한다. 다양한 종은 특정 아미노산의 특정 코돈에 대하여 특정 편향을 나타낸다. 코돈 편향(유기체 간의 코돈 사용의 차이)은 종종 전령 RNA(mRNA)의 번역의 효율과 상호관련되며, 이는 차례로, 다른 것들 중에, 번역되는 코돈의 특성 및 특정 운반 RNA(tRNA) 분자의 이용 가능성에 좌우되는 것으로 여겨진다. 세포에서의 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩티드 합성에 가장 빈번하게 사용되는 코돈을 반영하는 것이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화에 기초하여 주어진 유기체에서의 최적의 유전자 발현을 위해 맞춤화될 수 있다. 코돈 사용 표는 예를 들어, "코돈 사용 데이터베이스"(www.kazusa.or.jp/codon/에서 이용 가능함)에서 용이하게 이용 가능하며, 이들 표는 다수의 방식으로 적합하게 될 수 있다. 문헌[Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)]을 참조한다. 특정 숙주 세포에서의 발현을 위해 특정 서열을 코돈 최적화시키는 컴퓨터 알고리즘도 또한 이용 가능하며, 예를 들어, 진 포르지(Gene Forge)(압타젠(Aptagen); 미국 펜실베이니아주 야코부스)도 또한 이용 가능하다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소를 인코딩하는 효소 내의 하나 이상의 코돈(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50개 이상의 또는 모든 코돈)은 특정 아미노산에 대하여 가장 빈번하게 사용되는 코돈에 상응한다.

[0296]

일부 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 핵 국소화 서열(NLS), 예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 NLS를 포함하는 CRISPR 효소를 인코딩한다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 아미노-말단에 또는 그 근처에 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 NLS, 카르복시-말단에 또는 그 근처에 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 NLS, 또는 이들의 조합(예를 들어, 아미노 말단에 0개 또는 적어도 하나 이상의 NLS 및 카르복시 말단에 0개 또는 하나 이상의 NLS)을 포함한다. 1개 초과 NLS가 존재하는 경우, 각각은 단일의 NLS가 1개 초과 카피로 존재하고/존재하거나 1개 이상의 카피로 존재하는 하나 이상의 다른 NLS와 병용될 수 있도록 다른 것들로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, CRISPR 효소는 최대 6개의 NLS를 포함한다. 일부 구현예에서, NLS는 NLS의 가장 가까운 아미노산이 N- 또는 C-말단으로부터 폴리펩티드 쇄를 따라 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 이상의 아미노산 내에 존재하는 경우 N- 또는 C-말단 근처에 있는 것으로 여겨진다. NLS의 비제한적인 예는 하기로부터 유래된 NLS 서열을 포함한다: 아미노산 서열 PKKKRKY를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKAGQAKKKK를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD 또는 RQRRNELKRSP를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY를 갖는 hRNPA1 M9 NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNGKDTAELRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 마이오마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP 및 PPKKARED; 인간 p53의 서열 POPKKKPL; 마우스 c-ab1 IV의 서열 SALIKKKKMAP; 인플루엔자 바이러스 NS1의 서열 DRLRR 및 PKQKKRK; 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL; 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR; 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGEVDGVDVAKKSKK; 및 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNEARKTKK. 일반적으로, 하나 이상의 NLS는 진핵 세포의 핵에서 검출 가능한 양의 CRISPR 효소의 축적을 유도하기에 충분한 세기의 것이다. 일반적으로, 핵 국소화 활성의 세기는 CRISPR 효소 내의 NLS의 수, 사용되는 특정 NLS(들) 또는 이들 인자의 조합으로부터 유래할 수 있다. 핵에서의 축적의 검출은 임의의 적절한 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 검출 가능한 마커는 예를 들어, 핵의 위치를 검출하기 위한 수단(예를 들어, 핵에 특이적인 염색제, 예를 들어, DAPI)과 함께 세포 내의 위치가 가시화될 수 있도록 CRISPR 효소에 융합될 수 있다. 또한, 세포 핵을 세포로부터 분리할 수 있으며, 그 다음, 그의 내용물을 단백질을 검출하기 위한 임의의 적절한 과정, 예를 들어, 면역조직화학, 웨스턴 블롯 또는 효소 활성 검정에 의해 분석할 수 있다. 또한, 핵에서의 축적은 예를 들어, CRISPR 효소 또는 복합체에 노출되지 않거나, 하나 이상의 NLS가 결여된 CRISPR 효소에 노출된 대조군과 비교하여, 간접적으로, 예를 들어, CRISPR 복합체 형성의 영향에 대한 검정(예를 들어, 표적 서열에서의 DNA 절단 또는 돌연변이에 대한 검정, 또는 CRISPR 복합체 형성 및/또는 CRISPR 효소 활성화에 의해 영향을 받는 변경된 유전자 발현 활성화에 대한 검정)에 의해 결정될 수 있다.

[0297]

본 발명의 양태는 감소되는 유전자 산물의 발현 또는 유전자 산물을 인코딩하는 DNA 분자 내로 추가로 도입되는 주형 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 5' 오버행이 제어닐링 및 라이게이션되게 함으로써 정밀하게 절단되는 개체 서열 또는 변경되는 유전자 산물의 활성 또는 작용 또는 증가되는 유전자 산물의 발현에 관한 것이다. 본 발명의 구현예에서, 유전자 산물은 단백질이다. 가이드 서열 사이에 8 bp 미만의 중첩(-8 bp 초과 상쇄)을 갖는 5' 오버행을 생성하는 sgRNA 쌍만이 검출 가능한 삽입결실 형성을 매개할 수 있었다. 중요하게는, 이들 검정에서 사용되는 각각의 가이드는 야생형 Cas9와 쌍을 형성하는 경우 삽입결실을 효율적으로 유발할 수 있는데, 이

는 가이드 쌍의 상대적 위치가 이중 니킹 활성을 예측함에 있어 가장 중요한 파라미터임을 나타낸다. Cas9n 및 Cas9H840A가 DNA의 반대 가닥을 니킹시키기 때문에, 주어진 sgRNA 쌍을 지니는 Cas9H840A로의 Cas9n의 치환은 오버행 유형의 역전을 초래할 것이나; 삽입결실 형성이 Cas9H840A를 사용하여 관찰되지 않으며, 이는 Cas9H840A가 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 CRISPR 효소임을 나타낸다(이는 돌연변이된 효소의 DNA 절단 활성이 효소의 비-돌연변이 형태의 DNA 절단 활성의 약 25%, 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.01% 이하인 경우이며; 그에 의해, 예는 돌연변이된 형태의 DNA 절단 활성이 0이거나 비-돌연변이된 형태와 비교하여 무시해도 될 정도인 경우, 예를 들어, 삽입결실 형성이 생화학적 또는 원핵 시스템과 대조적으로 진핵 시스템에서 Cas9H840A를 사용하여 관찰되지 않는 경우일 수 있음). 그럼에도 불구하고, Cas9n을 사용하여 5' 오버행을 생성할 sgRNA의 쌍은 대신에 원칙적으로 상응하는 3' 오버행 및 이중 니킹을 생성하여야 한다. 따라서, Cas9n를 사용하여 3' 오버행의 생성을 야기하는 sgRNA 쌍은 다른 돌연변이된 Cas9와 함께 사용되어 5' 오버행 및 이중 니킹을 생성할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 주형도 또한 제공된다. 재조합 주형은 개별 벡터에 포함되거나, 개별 폴리뉴클레오티드로서 제공되는 본원에 기술된 바와 같은 다른 벡터의 성분일 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 주형은 상동성 재조합에서, 예를 들어, CRISPR 복합체의 일부로서 CRISPR 효소에 의해 니이 생기거나 절단되는 표적 서열 내 또는 그 근처에서 주형으로 소용되도록 설계된다. 주형 폴리뉴클레오티드는 임의의 적절한 길이, 예를 들어, 약 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000개 이상의 뉴클레오티드 길이의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 부분에 상보적이다. 최적으로 정렬되는 경우, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 서열의 하나 이상의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 1, 5, 10, 15, 20개 이상의 뉴클레오티드)와 중첩할 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 서열 및 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 최적으로 정렬되는 경우, 주형 폴리뉴클레오티드의 가장 가까운 뉴클레오티드는 표적 서열로부터 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000개 이상의 뉴클레오티드 이내이다.

[0298] 일부 구현예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터는 CRISPR 시스템의 요소의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 유도하도록 숙주 세포 내로 도입된다. 예를 들어, Cas 효소, tracr-메이트 서열에 연결된 가이드 서열 및 tracr 서열은 각각 개별 벡터 상의 개별 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 또는, CRISPR 시스템의 RNA(들)는 트랜스제닉 Cas9 동물 또는 포유류, 예를 들어, 구성적으로 또는 유도에 의해 또는 조건부로 Cas9를 발현하는 동물 또는 포유류; 또는 예를 들어, Cas9를 코딩하고, 생체내에서 Cas9를 발현하는 벡터 또는 벡터들의 동물 또는 포유류로의 이전의 투여의 방식에 의해 Cas9를 함유하는 숙주 세포를 갖거나 다르게 Cas9를 발현하는 동물 또는 포유류로 전달될 수 있다. 대안적으로, 동일하거나 상이한 조절 요소로부터 발현되는 요소 중 둘 이상은 단일의 벡터에서 조합될 수 있으며, 하나 이상의 추가의 벡터는 제1 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 성분을 제공한다. 단일의 벡터에서 조합되는 CRISPR 시스템 요소는 임의의 적절한 방향으로 배열될 수 있으며, 예를 들어, 하나의 요소는 제2 요소에 대하여 5'에(그의 "상류"에) 위치하거나 그에 대하여 3'에(그의 "하류"에) 위치한다. 하나의 요소의 코딩 서열은 제2 요소의 코딩 서열의 동일한 가닥 또는 마주하는 가닥에 위치할 수 있으며, 동일한 또는 반대 방향으로 배향될 수 있다. 일부 구현예에서, 단일의 프로모터는 CRISPR 효소를 인코딩하는 전사물 및 하나 이상의 인트론 서열 내에(예를 들어, 각각이 상이한 인트론 내에, 2개 이상이 적어도 하나의 인트론 내에 또는 전부가 단일의 인트론 내에) 매립된 가이드 서열, tracr 메이트 서열(임의로 가이드 서열에 작동 가능하게 연결), 및 tracr 서열 중 하나 이상의 발현을 유도한다. 일부 구현예에서, CRISPR 효소, 가이드 서열, tracr 메이트 서열 및 tracr 서열이 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 그로부터 발현된다. CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 위한 전달 비히클, 벡터, 입자, 나노입자, 제형 및 그의 성분은 전술한 문헌, 예를 들어, WO 2014/093622호(PCT/US2013/074667호)에 사용된 바와 같다. 일부 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 삽입 부위, 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열("클로닝 부위"로도 지칭)을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 삽입 부위(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 삽입 부위)는 하나 이상의 벡터의 하나 이상의 서열 요소의 상류 및/또는 하류에 위치한다. 일부 구현예에서, 벡터는 tracr 메이트 서열의 상류에 있고, 임의로 tracr 메이트 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소의 하류에 있는 삽입 부위를 포함하여, 삽입 부위의 가이드 서열의 삽입 후에, 그리고 발현 시에, 가이드 서열이 진핵 세포 내의 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하게 한다. 일부 구현예에서, 벡터는 2개 이상의 삽입 부위를 포함하며, 각각의 삽입 부위는 2개의 tracr 메이트 서열 사이에 위치하여, 각 부위에서 가이드 서열의 삽입을 가능하게 한다. 이러한 배열에서, 2개 이상의 가이드 서열은 단일의 가이드 서열의 2개 이상의 카피, 2개 이상의 상이한 가이드 서열 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다중의 상이한 가이드 서열이 사용되는 경우, 단일의 발현 작제물을 사용하여 세포 내의 다중의 상이한 상응하는 표적 서열에 CRISPR 활성을 표적화할 수 있다. 예를 들어, 단일의 벡터

는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개 이상의 가이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 이러한 가이드-서열-함유 벡터가 제공될 수 있으며, 임의로 세포로 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 CRISPR 효소, 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결되는 조절 요소를 포함한다. CRISPR 효소 또는 CRISPR 효소 mRNA 또는 CRISPR 가이드 RNA 또는 RNA(들)는 개별적으로 전달될 수 있으며; 유리하게는 이들 중 적어도 하나는 나노입자 복합체를 통해 전달된다. CRISPR 효소 mRNA는 가이드 RNA 이전에 전달되어 CRISPR 효소가 발현될 시간을 제공할 수 있다. CRISPR 효소 mRNA는 가이드 RNA의 투여 전 1 내지 12시간(바람직하게는 약 2 내지 6시간)에 투여될 수 있다. 대안적으로, CRISPR 효소 mRNA 및 가이드 RNA는 함께 투여될 수 있다. 유리하게는, 가이드 RNA의 제2 부스터 용량은 CRISPR 효소 mRNA + 가이드 RNA의 초기 투여 후 1 내지 12시간(바람직하게는 약 2 내지 6시간)에 투여될 수 있다. CRISPR 효소 mRNA 및/또는 가이드 RNA의 추가 투여는 가장 효율적인 게놈 변형 수준을 달성하는데 유용할 수 있다.

[0299]

일 양태에서, 본 발명은 CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 이용 방법을 제공한다. 본 발명의 CRISPR 복합체는 효율적인 표적 폴리뉴클레오티드의 변형 수단을 제공한다. 본 발명의 CRISPR 복합체는 다수의 세포 유형에서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는(예를 들어, 결실시키는, 삽입하는, 전위시키는, 불활성화시키는, 활성화시키는) 것을 포함하는 매우 다양한 유용성을 갖는다. 이와 같이, 본 발명의 CRISPR 복합체는 예를 들어, 유전자 치료법, 약물 스크리닝, 질병 진단 및 예후에서 넓은 스펙트럼의 응용을 갖는다. 예시적인 CRISPR 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열에 혼성화되는 가이드 서열과 복합체화되는 CRISPR 효소를 포함한다. 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결되며, tracr 메이트 서열은 차례로 tracr 서열에 혼성화된다. 일 구현예에서, 본 발명은 표적 폴리뉴클레오티드를 절단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 표적 폴리뉴클레오티드와 결합하여 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 행하는 CRISPR 복합체를 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 것을 포함한다. 전형적으로, 본 발명의 CRISPR 복합체는 세포 내로 도입되는 경우 게놈 서열에 파단(예를 들어, 단일 가닥 또는 이중 가닥 파단)을 생성한다. 예를 들어, 상기 방법은 세포에서 질병 유전자를 절단하기 위하여 사용될 수 있다. CRISPR 복합체에 의해서 생성된 파단은 오류 유발 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 경로 또는 고 충실도 상동성-유도 수복(HDR)과 같은 수복 과정에 의해서 수복될 수 있다. 이들 수복 과정 동안, 외인성 폴리뉴클레오티드 주형이 게놈 서열에 도입될 수 있다. 일부 방법에서, HDR 과정은 게놈 서열을 변형하기 위해서 사용된다. 예를 들어, 상류 서열과 하류 서열이 측부 배치된 통합될 서열을 포함하는 외인성 폴리뉴클레오티드 주형이 세포에 도입된다. 상류 서열과 하류 서열은 염색체 내의 통합 부위의 어느 측과 서열 유사성을 공유한다. 요망되는 경우, 공여자 폴리뉴클레오티드는 DNA, 예를 들어 DNA 플라스미드, 박테리아 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC), 바이러스 벡터, DNA의 선형 조각, PCR 단편, 네이키드 핵산, 또는 리포좀 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산일 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드 주형은 통합될 서열을 포함한다(예를 들어, 돌연변이된 유전자). 통합을 위한 서열은 세포에 대해 내인성 또는 외인성인 서열일 수 있다. 통합될 서열의 예들은 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 비-코딩 RNA(예를 들어, 마이크로RNA)를 포함한다. 따라서, 통합을 위한 서열은 적절한 조절 서열 또는 서열들에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, 통합될 서열은 조절 기능을 제공할 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드 주형에서 상류 및 하류 서열은 관심 염색체 서열과 공여자 폴리뉴클레오티드 사이의 재조합을 촉진하도록 선택된다. 상류 서열은 통합을 위해 표적화된 부위의 상류 게놈 서열과 서열 유사성을 공유하는 핵산 서열이다. 유사하게, 하류 서열은 통합의 표적화된 부위의 하류 염색체 서열과 서열 유사성을 공유하는 핵산 서열이다. 외인성 폴리뉴클레오티드 주형의 상류 및 하류 서열은 표적화된 게놈 서열과 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게, 외인성 폴리뉴클레오티드 주형의 상류 및 하류 서열은 표적화된 게놈 서열과 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 일부 방법에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 주형의 상류 및 하류 서열은 표적화된 게놈 서열과 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 상류 또는 하류 서열은 약 20bp 내지 약 2500bp, 예를 들어, 약 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 또는 2500 bp를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, 예시적인 상류 또는 하류 서열은 약 200 bp 내지 약 2000 bp, 약 600 bp 내지 약 1000 bp, 또는 더 구체적으로 약 700 bp 내지 약 1000 bp를 가진다. 일부 방법에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 주형은 마커를 더 포함할 수 있다. 이러한 마커는 표적화된 통합의 스크리닝을 용이하게 할 수 있다. 적합한 마커의 예들은 제한 부위, 형광 단백질, 또는 선택성 마커를 포함한다. 본 발명의 외인성 폴리뉴클레오티드 주형은 재조합 기술을 사용하여 작제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., 2001] 및 문헌[Ausubel et al., 1996] 참조). 외인성 폴리뉴클레오티드 주형을 통합함으로써 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법에서, 이중 가닥 파단이 CRISPR 복합체에 의해서 게놈 서열에 도입되며, 이 파단은 주형이 게놈에 통합되도록 외인성 폴리뉴클레오티드 주형의 상

동성 재조합을 통해서 수복된다. 이중-가닥 과단의 존재는 주형의 통합을 촉진한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 진핵 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 변형하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 폴리뉴클레오티드에 결합하는 CRISPR 복합체를 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키거나 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 방법에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 세포에서 발현의 변형을 행하기 위해 불활성화될 수 있다. 예를 들어, 세포에서 CRISPR 복합체와 표적 서열의 결합시, 표적 폴리뉴클레오티드가 불활성화되며, 이로써 서열이 전사되지 않거나, 코딩된 단백질이 생성되지 않거나, 또는 서열이 야생형 서열처럼 기능하지 않는다. 예를 들어, 단백질 또는 마이크로RNA 코딩 서열은 단백질 또는 마이크로RNA 또는 예비-마이크로RNA 전사물이 생성되지 않도록 불활성화될 수 있다. 일부 방법에서, 조절 서열이 더 이상 조절 서열로서 기능하지 않도록 불활성화될 수 있다. 본원에서 사용된 "조절 서열"은 전사, 번역 또는 핵산 서열의 접근성을 가져오는 임의의 핵산 서열을 말한다. 조절 서열의 예들은 프로모터, 전사 종결자, 및 인핸서를 포함하며 이들이 조절 서열이다. CRISPR 복합체의 표적 폴리뉴클레오티드는 진핵 세포에 내인성이거나 외인성인 임의의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드는 진핵 세포의 핵에 존재하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드는 유전자 산물(예를 들어, 단백질)을 코딩하는 서열 또는 비-코딩 서열(예를 들어, 조절 폴리뉴클레오티드 또는 정크(junk) DNA)일 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드의 예는 신호전달 생화학 경로와 관련된 서열, 예를 들어, 신호전달 생화학적 경로-관련 유전자 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 표적 폴리뉴클레오티드의 예는 질병 관련 유전자 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. "질병-관련" 유전자 또는 폴리뉴클레오티드는 질병이 없는 대조군의 조직 또는 세포와 비교하여, 질병-발생 조직으로부터 유래된 세포에서 비정상적인 수준 또는 비정상적인 형태로 전사 또는 번역 산물을 생성하는 임의의 유전자 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 그것은 비정상적으로 높은 수준으로 발현되는 유전자일 수 있으며; 그것은 비정상적으로 낮은 수준으로 발현되는 유전자일 수 있고, 여기서 변경된 발현은 질병의 발생 및/또는 진행과 관련이 있다. 또한, 질병-관련 유전자는 질병의 병인에 직접적인 원인이 있거나, 그에 원인이 있는 유전자(들)와 연관 불균형이 있는 돌연변이(들) 또는 유전적 변이를 갖는 유전자를 지칭한다. 전사 또는 번역된 산물은 공지된 것이거나 미공지된 것일 수 있으며, 정상 또는 비정상 수준으로 존재할 수 있다. CRISPR 복합체의 표적 폴리뉴클레오티드는 진핵 세포에 대해 내인성이거나 외인성인 임의의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드는 진핵 세포의 핵에 존재하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드는 유전자 산물(예를 들어, 단백질)을 코딩하는 서열 또는 비-코딩 서열(예를 들어, 조절 폴리뉴클레오티드 또는 정크 DNA)일 수 있다. 이론에 구속되지 않으면서, 표적 서열이 PAM(프로토스페이스서 인접 모티프); 즉, CRISPR 복합체에 의해 인식되는 짧은 서열과 회합될 것으로 여겨진다. PAM에 대한 정밀한 서열 및 길이 요건은 사용되는 CRISPR 효소에 따라 달라지지만, PAM은 통상적으로 프로토스페이스서(즉, 표적 서열)에 인접한 2 내지 5개 염기쌍 서열이다. PAM 서열의 예는 하기 실시예 섹션에 제공되어 있으며, 해당 분야의 숙련자는 주어진 CRISPR 효소와 함께 사용하기 위한 추가의 PAM 서열을 확인할 수 있을 것이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 CRISPR 복합체가 표적 폴리뉴클레오티드에 결합되게 하여, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 초래하여, 그에 의해 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는 단계를 포함하며, CRISPR 복합체는 상기 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열과 혼성화된 가이드 서열과 복합체화된 CRISPR 효소를 포함하고, 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결되고, 이어서 tracr 서열에 혼성화된다. 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서의 폴리뉴클레오티드의 발현의 변형 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 CRISPR 복합체가 폴리뉴클레오티드에 결합되게 하여, 상기 결합이 상기 폴리뉴클레오티드의 증가된 또는 감소된 발현을 초래하게 하는 단계를 포함하며; 여기서 CRISPR 복합체는 상기 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열과 혼성화되는 가이드 서열과 복합체화되는 CRISPR 효소를 포함하고, 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열과 연결되고, tracr 메이트 서열은 이어서 tracr 서열에 혼성화된다. 유사한 고려사항 및 조건이 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법을 위해 상기 설명된 것과 같이 적용된다. 사실상, 이들 시료추출, 배양 및 재도입 선택사항은 본 발명의 전 양태에 적용된다. 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법을 제공하며, 이것은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 인간 또는 비인간 동물로부터 세포 또는 세포 집단을 시료추출하는 단계, 및 세포 또는 세포들을 변형하는 단계를 포함한다. 배양은 생체외에서 임의의 단계에서 일어날 수 있다. 세포 또는 세포들은 심지어 비인간 동물 또는 식물에 재도입될 수 있다. 재도입된 세포의 경우, 세포가 줄기 세포인 것이 특히 바람직하다.

[0300] 실제로, 본 발명의 임의의 양태에서, CRISPR 복합체는 표적 서열과 혼성화된 가이드 서열과 복합체화된 CRISPR 효소를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결될 수 있으며, tracr 메이트 서열은 이어서 tracr 서열에 혼성화될 수 있다.

[0301] 본 발명은 CRISPR-Cas 시스템 및 그의 성분에 관한 서열 표적화를 수반하는 유전자 발현의 조절, 예컨대 게놈 변동 또는 유전자 편집을 위해 사용되는 시스템, 방법 및 조성물의 조작 및 최적화에 관한 것이다. 유리한 구현

예에서, Cas 효소는 Cas9이다. 본 방법의 이점은 CRISPR 시스템이 표적의 결합 및 그 결과의 부작용을 최소화시키거나 회피한다는 점이다. 이는 표적 DNA에 대하여 고도의 서열 특이성을 갖도록 배열된 시스템을 사용하여 달성된다.

[0302] *자체-불활성화 시스템*

[0303] 예컨대 세포의 계놈에서의 유전자의 의도된 카피를 편집하는 것에 의해서 의도된 개조가 도입되면, 그 세포에서의 지속된 CRISPR/Cas9 발현은 더 이상 필수적이지 않다. 실제로, 일관된 발현은 의도하지 않은 계놈 부위 등에서 표적의 효과의 특정 카제인 경우에서 바람직하지 않을 것이다. 그러므로 시간-제한 발현이 유용할 것이다. 유도할 수 있는 발현은 일 접근법을 제외하나, 게다가 CRISPR 벡터 자체 내의 비-코딩 가이드 표적 서열의 사용에 의존하는 자체-불활성화 CRISPR-Cas9 시스템을 조작하였다. 그러므로, 발현이 시작한 후, CRISPR 시스템은 자체의 파괴를 이끌어낼 것이나, 파괴가 완료되기 전에 표적 유전자(이배체 세포에서의 정상 점 돌연변이를 가지고 최대한 2개의 편집을 필요로 함)의 계놈 카피를 편집하기 위한 시간을 가질 것이다. 간단하게는, 자체 불활성화 CRISPR-Cas 시스템은 CRISPR 효소 자체에 대한 코딩 서열을 표적화하거나 하나 이상의 하기 것에 존재하는 독특한 서열에 상보적인 하나 이상의 비-코딩 가이드 표적 서열을 표적화하는 추가 RNA(즉, 가이드 RNA)를 포함한다: (a) 비-코딩 RNA 요소의 발현을 구동하는 프로모터 내, (b) Cas9 유전의 발현을 구동하는 프로모터 내, (c) Cas9 코딩 서열에서의 ATG 번역 시작 코돈의 100 bp 내, (d) 역전된 바이러스 전달 벡터의 역전된 말단 반복(iTR) 내, 예를 들어, AAV 계놈 내.

[0304] *HDR의 효율*

[0305] 치료적 효과를 생성하기 위해 필요한 표적 세포 집단에서의 계놈 변형의 양이 질병에 따라 달라지지만, 대부분의 편집 치료의 효능은 증가된 편집 비율로 개선된다. 이전에 언급된 바와 같이, 편집 비율은 DSB 수복 경로의 활성 및 관심 세포로의 전달 효율에 의해 조절된다. 그러므로, 이러한 인자들 중 하나에 대한 개선은 편집 치료의 효능을 개선할 가능성이 있다.

[0306] DSB 수복 경로의 활성 비율을 증가시키고자 하는 시도는, 세포 주기 조절 및 뉴클레아제를 갖는 HDR 주형의 전달 도전이 NHEJ보다 덜 효과적인 이 경로를 사용하는 전략을 만들기 때문에, HDR에 주로 초점을 맞추어 왔다. 세포 주기 조절은 현재 생체의 약리학 제제로 유사분열의 자극을 통해 세포 유형을 서서히 사이클링하기 위해 어느 정도 우회하였다[Kormann, M.S., et al. Nature biotechnology 29, 154-157 (2011)]. 그러나, 엄밀히 유사분열 후 세포가 이러한 조작을 할 수 있을 가능성이 낮으며, 이는 이 전략의 적용 가능성을 한정한다. 시도는 표적화 DSB로의 치료 트랜스유전자를 함유하는 DNA 주형의 직접 라이게이션을 통해 HDR에 대한 요구를 완전히 회피하기 위해 만들어졌다. 이러한 라이게이션 사건이 관찰되었지만, 비율이 치료법에 유용하기에는 너무 낮았다[Ran, F.A., et al. Cell 154, 1380-1389 (2013); Orlando, S.J., et al. Nucleic acids research 38, e152 (2010)]. 그럴듯한 극적으로 새로운 접근법은 HDR 효율을 개선시키고 정확한 계놈 교정을 필요로 하는 전략의 치료적 효율을 증가시키기 위해 필수적이다.

[0307] 계놈 편집은 다수의 난치성 질병과 맞붙기 위한 흥미로운 적용을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 기술은 여전히 이의 초창기에 있으며 이의 효율, 안정성, 및 특이성을 조직적으로 최적화하기 위한 다수의 반복을 필요로 한다. 게다가, 계놈 편집 주위의 거대한 흥분에도 불구하고, 전략 계획 및 엄격하지만 가능한 조절 공정이 잠재적으로 생명-변화 의약의 이러한 부류의 성공적인 발달을 보장하는데 필수적이다.

[0308] *일반적으로 전달을 포함하는 전달*

[0309] 다양한 핵산 또는 단백질 전달 방법은 생체의 또는 생체내 표적 세포 내로 계놈 편집 뉴클레아제를 도입하는 데 사용될 수 있다. 전달 방법의 선택에 따라, 뉴클레아제는 일시적으로 또는 영구적으로 표적 세포에서 발현될 수 있다. 뉴클레아제가 표적의 절단 활성을 나타낼 수 있거나 면역 반응을 유발할 수 있음을 고려하면, 전달 시스템은 주의깊게 선택되어야 한다. 조혈 줄기 세포의 편집과 같은 생체의 적용에서, 전기천공법이 DNA-기반 뉴클레아제 발현 벡터, mRNA, 또는 단백질의 전달을 통해 일시적인 뉴클레아제 발현을 달성하는 데 사용될 수 있다. 통합-컴피던트(competent) 렌티바이러스 벡터 및 결핍 렌티바이러스 벡터 둘 다 또한 뉴클레아제 발현을 구동하는 데 성공적으로 사용되었다. 그러나, 통합된 렌티바이러스 벡터는, 이들이 구성요소 발현을 구동하고 더 많은 표적의 활성을 야기하기 때문에 덜 바람직할 수 있다. 게다가, 3 개 뉴클레아제 플랫폼 모두 또한 변형을 할 수 있어 단백질이 조작된 세포-침투 또는 화학 컨주게이션을 통해 세포 내로 직접 전달될 수 있도록 함이 입증되었다 [Guilinger, J.P., et al. Nature methods 11, 429-435 (2014); Zuris, J.A., et al. Nature biotechnology (2014); Gaj, T., et al. Nature methods 9, 805-807 (2012)].

- [0310] 생체내 적용에서, 대부분의 유망한 전달 시스템은 바이러스 벡터, 상세하게는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터이며, 이는 최근에 임상적 용도로 허가되었다[Wirth, T., et al. Gene 525, 162-169 (2013)]. AAV는 많은 혈청형에 관여하며 눈, 뇌, 간 및 근육을 포함하는 다양한 조직에 대한 고 전달 효율을 갖는 것으로 보여졌다 [Samulski, R.J. & Muzyczka, N. Annual Review of Virology 1, 427-451 (2014)]. 그러나, AAV 벡터의 상대적으로 작은 패키징 능력은 뉴클레아제 전달에 대한 일부 도전을 공고한다. ZFN가 상대적으로 작고 이량체 ZFN 쌍이 단일 AAV 내로 패키징될 수 있으나, 이량체 TALEN 쌍은 더 크고 별개의 2개의 AAV 벡터 내로 패키징되어야 할 가능성이 있다. Cas9에서, 짧은 오솔로그는 단일 AAV 내로 가이드 RNA에 따라 패키징될 수 있다. 지금까지, AAV-매개 뉴클레아제 발현이 간 및 뇌를 포함하는 여러 조직 유형에서 성공적임이 입증되었다 [Li, H., et al. Nature 475, 217-221 (2011); Swiech, L., et al. Nature biotechnology (2014)].
- [0311] AAV-매개 생체내 뉴클레아제 발현의 잠재성에도 불구하고, 추가 개발을 필요로 하는 여러 도전이 있다. 첫째로, AAV-매개 뉴클레아제 발현은 종종 구성적이고 이는 게놈 편집 사건이 표적 세포에서 성공적으로 발생한 후 뉴클레아제 발현을 정지시킬 수 있는 것이 더 바람직할 것이다. 둘째로는, AAV에 자연적으로 이미 노출된 환자가 특이 혈청형에 대한 면역성을 발달시킬 가능성이 있다. 그러므로, AAV는 이들 환자에 대해 적절한 전달 비히클이 아닐 수 있다. 바이러스 벡터에 의해 직면한 이러한 도전을 극복하기 위해, 나노입자- 및 지질-기반 생체내 mRNA 또는 단백질 전달 시스템이 매력적인 대안을 제공할 수 있다[Zuris, J.A., et al. Nature biotechnology (2014); Kormann, M.S., et al. Nature biotechnology 29, 154-157 (2011)].
- [0312] 이러한 기재 및 당 분야의 지식을 통해, CRISPR-Cas 시스템, 또는 이의 성분 또는 이의 핵산 분자(예를 들어 HDR 주형을 포함) 또는 이의 성분을 인코딩하거나 제공하는 핵산 분자가 일반적으로 그리고 상세하게 본원에 기술된 전달 시스템에 의해 전달될 수 있다.
- [0313] 벡터 전달, 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 전달: CRISPR 효소, 예를 들어 Cas9, 및/또는 임의의 본 발명의 RNA, 예를 들어 가이드 RNA는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노 연관 바이러스(AAV), 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 다른 바이러스 벡터 유형, 또는 그들의 조합을 사용하여 전달될 수 있다. Cas9 및 하나 이상의 가이드 RNA는 하나 이상의 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내로 패키징될 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터는, 예를 들어 근육내 주사에 의해 관심 조직에 전달되는 한편, 다른 때에, 전달은 정맥내, 경피, 비강내, 구강, 점막 또는 다른 전달 방법을 통한다. 그러한 전달은 단일 용량 또는 다회 용량을 통한 것일 수 있다. 해당 분야의 숙련자는 본원에서 전달될 실제 투여량이 다양한 인자, 예컨대 선택된 벡터 선택, 표적 세포, 유기체 또는 조직, 치료될 대상체의 일반적 질환, 추구되는 형질전환/변형 정도, 투여 경로, 투여 방식, 추구되는 형질전환/변형 유형 등에 따라서 크게 달라질 수 있다는 것을 이해한다.
- [0314] 그러한 투여량은, 예를 들어 담체(물, 식염수, 에탄올, 글리세롤, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참깨유 등), 희석제, 약제학적으로 허용 가능한 담체(예를 들어, 인산염 완충 식염수), 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 및/또는 해당 분야에 공지된 다른 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 투여량은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 염, 예를 들어 무기산 염, 예컨대 염산염, 브롬화수소산염, 인산염, 황산염 등; 및 유기산의 염, 예컨대 아세트산염, 프로피온산염, 말론산염, 벤조산염 등을 추가로 함유할 수 있다. 추가적으로, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질, 겔 또는 겔화 물질, 향미제, 착색제, 미소구체, 중합체, 현탁제 등은 또한 본원에 존재할 수 있다. 추가로, 특히 투여형이 재구성 가능한 형태라면 하나 이상의 다른 통상적인 약제학적 성분, 예컨대 보존제, 습윤제, 현탁화제, 계면활성제, 항산화제, 고화방지제, 충전제, 킬레이트제, 코팅제, 화학적 안정화제 등이 또한 존재할 수 있다. 적합한 예시적 성분은 미정질 셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨, 폴리소르베이트 80, 페닐에틸 알코올, 클로로부탄올, 소르브산칼륨, 소르브산, 이산화황, 갈산프로필, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀, 파라클로로페놀, 젤라틴, 알부민 및 그들의 조합을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제의 철저한 논의는 본원에 참고로 포함되는 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에서 이용 가능하다.
- [0315] 본원의 구현예에서, 전달은 적어도 1×10^5 개 입자(또한 단위 입자로서 pu로 지칭됨)의 아데노바이러스 벡터를 함유하는 단일 부스터 용량에 있을 수 있는 아데노바이러스를 통한다. 본원의 구현예에서, 용량은 바람직하게는 적어도 약 1×10^6 개 입자(예를 들어, 약 1×10^6 내지 1×10^{12} 개 입자), 더 바람직하게는 적어도 약 1×10^7 개 입자, 더 바람직하게는 적어도 약 1×10^8 개 입자(예를 들어, 약 1×10^8 내지 1×10^{11} 개 입자 또는 약 1×10^8 내지 1×10^{12} 개 입자), 및 가장 바람직하게는 적어도 약 1×10^9 개 입자(예를 들어, 약 1×10^9 내지 1×10^{10} 개

입자 또는 약 1×10^9 내지 1×10^{12} 개 입자), 또는 심지어 적어도 약 1×10^{10} 개 입자(예를 들어, 약 1×10^{10} 내지 1×10^{12} 개 입자)의 아데노바이러스 벡터이다. 대안적으로, 용량은 1×10^{14} 개 이하의 입자, 바람직하게는 약 1×10^{13} 개 이하의 입자, 더더욱 바람직하게는 약 1×10^{12} 개 이하의 입자, 더더욱 바람직하게는 약 1×10^{11} 개 이하의 입자, 가장 바람직하게는 약 1×10^{10} 개 이하의 입자(예를 들어, 약 1×10^9 개 이하의 입자)를 포함한다. 따라서, 용량은, 예를 들어 약 1×10^6 개 입자 단위(pu), 약 2×10^6 pu, 약 4×10^6 pu, 약 1×10^7 pu, 약 2×10^7 pu, 약 4×10^7 pu, 약 1×10^8 pu, 약 2×10^8 pu, 약 4×10^8 pu, 약 1×10^9 pu, 약 2×10^9 pu, 약 4×10^9 pu, 약 1×10^{10} pu, 약 2×10^{10} pu, 약 4×10^{10} pu, 약 1×10^{11} pu, 약 2×10^{11} pu, 약 4×10^{11} pu, 약 1×10^{12} pu, 약 2×10^{12} pu, 또는 약 4×10^{12} pu의 아데노바이러스 벡터를 갖는 단일 용량의 아데노바이러스 벡터를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 2013년 6월 4일 등록된 Nabel 등의 미국 특허 제8,454,972 B2호에서의 아데노바이러스 벡터, 및 이의 29 칼럼, 36 내지 58줄에서의 투여량을 참조한다. 본원의 구현예에서, 아데노바이러스는 다회 용량을 통해 전달된다.

[0316] 본원의 구현예에서, 전달은 AAV를 통한다. 인간에 대한 AAV의 생체내 전달을 위한 치료적 유효량은 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{10} 개의 작용성 AAV/ml(용액)을 함유하는 약 20 내지 약 50 ml의 범위의 식염수 용액인 것으로 여겨진다. 투여량은 임의의 부작용에 대해 치료적 이점의 균형을 맞추도록 조절될 수 있다. 본원의 구현예에서, AAV 용량은 일반적으로 약 1×10^5 내지 1×10^{50} 개 게놈 AAV, 약 1×10^8 개 내지 1×10^{20} 개 게놈 AAV, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{16} 개 게놈, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 개 게놈 AAV의 농도 범위이다. 인간 투여량은 약 1×10^{13} 개 게놈 AAV일 수 있다. 이러한 농도는 약 0.001 ml 내지 약 100 ml, 약 0.05 내지 약 50 ml, 또는 약 10 내지 약 25 ml의 담체 용액에서 전달될 수 있다. 다른 유효한 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 일상적 시도를 통해 해당 분야의 숙련자에 의해 용이하게 확립될 수 있다. 예를 들어, 2013년 3월 26일 등록된 Hajar 등의 미국 특허 제8,404,658 B2호, 27 칼럼 45 내지 60줄을 참조한다.

[0317] 본원의 구현예에서, 전달은 플라스미드를 통한다. 이러한 플라스미드 조성물에서, 투여량은 반응을 유발하는데 충분한 양의 플라스미드여야한다. 예를 들어, 플라스미드 조성물 중의 플라스미드 DNA의 적합한 양은 70 kg의 개체당 약 0.1 내지 약 2 mg, 또는 약 1 μ g 내지 약 10 μ g일 수 있다. 본 발명의 플라스미드는 일반적으로 (i) 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 CRISPR 효소를 인코딩하는 서열; (iii) 선택 가능선택 가능 (iv) 복제 원점; 및 (v) (ii)에 작동 가능하게 연결되는 (ii)의 하류 전사 종결자를 포함할 것이다. 플라스미드는 또한 CRISPR 복합체의 RNA 성분을 인코딩할 수 있지만, 대신에 이들 중 하나 이상은 상이한 벡터상에서 인코딩될 수 있다.

[0318] 본원의 용량은 평균 70 kg 개체를 기준으로 한다. 투여 빈도는 해당 분야의 숙련된 의학적 또는 수의학적 실험자(예를 들어, 의사, 수의사) 또는 과학자의 영역 내이다. 또한, 실험에 사용된 마우스는 전형적으로 약 20 g이며, 마우스 실험으로부터 70 kg 개체까지 증대될 수 있음이 주목된다.

[0319] 일부 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 리포솜 또는 리포펙틴 제형 등으로 전달되며, 해당 분야의 숙련자에게 잘 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제 5,593,972호, 제5,589,466호, 및 제5,580,859호에 기재되어 있다. 포유류 세포 내로의 siRNA의 향상 및 개선된 전달을 구체적으로 목표로 하는 전달 시스템이 개발되었고, (예를 들어, 문헌[Shen et al FEBS Let. 2003, 539:111-114]; 문헌[Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010]; 문헌[Reich et al., Mol. Vision. 2003, 9: 210-216]; 문헌[Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003, 327: 761-766]; 문헌[Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108] 및 문헌[Simeoni et al., NAR 2003, 31, 11: 2717-2724] 참조) 본 발명에 적용될 수 있다. siRNA는 최근에 영장류에서 유전자 발현의 저해를 위해 성공적으로 사용되었다(예를 들어, 또한 본원에 적용될 수 있는 문헌[Tolentino et al., Retina 24(4):660] 참조).

[0320] 실제로, RNA 전달은 생체내 전달의 유용한 방법이다. 리포솜 또는 나노입자를 사용하여 Cas9 및 gRNA(예를 들어, HR 수복 주형)를 세포 내로 전달할 수 있다. 따라서 Cas9와 같은 CRISPR 효소의 전달 및/또는 본 발명의 RNA의 전달은 RNA 형태로, 그리고 미세소포, 리포솜 또는 나노입자를 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, Cas9 mRNA 및 gRNA는 생체내 전달을 위해 리포솜 입자 내로 패키징될 수 있다. 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies)로부터의 리포펙타민과 같은 리포솜 트랜스펙션 시약 및 시판 중인 다른 시약은 RNA 분자를 간에

효과적으로 전달할 수 있다.

- [0321] RNA의 전달 수단은 또한 바람직하게는 나노입자(문헌[Cho, S., Goldberg, M., Son, S., Xu, Q., Yang, F., Mei, Y., Bogatyrev, S., Langer, R. and Anderson, D., Lipid-like nanoparticles for small interfering RNA delivery to endothelial cells, *Advanced Functional Materials*, 19: 3112-3118, 2010]) 또는 엑소좀(문헌[Schroeder, A., Levins, C., Cortez, C., Langer, R., and Anderson, D., Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery, *Journal of Internal Medicine*, 267: 9-21, 2010, PMID: 20059641])을 통한 RNA의 전달을 포함한다. 사실, 엑소좀은 CRISPR 시스템과 조금 유사한 시스템인 전달 siRNA에서 특히 유용한 것으로 나타났다. 예를 들어, El-Andaloussi S, 등(문헌["Exosomes-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo." *Nat Protoc.* 2012 Dec;7(12):2112-26. doi: 10.1038/nprot.2012.131. Epub 2012 Nov 15.])은 엑소좀이 상이한 생물학적 장벽을 가로질러 약물을 전달하기 위한 촉망받는 도구가 되고 시험관내 및 생체내에서 siRNA의 전달을 위해 이용될 수 있는 방법을 기재한다. 그들의 접근법은 펩티드 리간드와 융합된 엑소좀 단백질을 포함하여, 발현 벡터의 트랜스펙션을 통해 표적화된 엑소좀을 생성하는 것이다. 이어서, 엑소좀은 트랜스펙션된 세포 상청액으로부터 정제 및 특성화된 다음, RNA는 엑소좀에 로딩된다. 본 발명에 따른 전달 또는 투여는 엑소좀을 사용하여, 특히 비제한적으로 뇌로 수행될 수 있다. 비타민 E(α -토코페롤)는 CRISPR Cas와 컨쥬게이트될 수 있고, 예를 들어 뇌에 짧은 간섭 RNA(siRNA)를 전달하기 위해 Uno 등(문헌[HUMAN GENE THERAPY 22:711-719 (June 2011)])에 의해 행해지는 것과 유사한 방식으로 고밀도 지단백질(HDL)과 함께 뇌에 전달될 수 있다. 마우스에 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 유리 TocsiBACE 또는 Toc-siBACE/HDL이 충전되고, 뇌 주입 키트 3(Brain Infusion Kit 3)(알제트(Alzet))과 연결된 삼투 미니펌프(Osmotic minipump)(모델 1007D; 알제트, 미국 캘리포니아주 쿠퍼티노 소재)를 통해 주입하였다. 뇌 주입 캐놀라를 등쪽의 제3 뇌실 내로의 주입을 위해 중앙에서 브레그마(bregma)보다 약 0.5 mm 뒤에 위치시켰다. Uno 등은 HDL과 함께 3 nmol만큼 적은 Toc-siRNA가 동일한 ICV 주입 방법에 의해 유사한 정도로 표적 감소를 유도할 수 있었다는 것을 발견하였다. α -토코페롤에 컨쥬게이트되고 뇌에 표적화된 HDL과 동시-투여되는 유사한 투여량의 CRISPR Cas가 본 발명에서 인간에 대해 고려될 수 있으며, 예를 들어, 뇌에 표적화된 약 3 nmol 내지 약 3 μ mol의 CRISPR Cas가 고려될 수 있다. Zou 등(문헌[HUMAN GENE THERAPY 22:465-475 (April 2011)])은 래트트의 척수에서 생체내 유전자 침묵화를 위한 PKC γ 를 표적화하는 짧은 헤어핀 RNA의 렌티바이러스-매개의 전달 방법을 기재한다. Zou 등은 척추강내 카테터에 의해 1×10^9 형질도입 단위(TU)/ml의 역가를 갖는 재조합 렌티바이러스 약 10 μ l를 투여하였다. 뇌에 표적화된 렌티바이러스 벡터에서 발현된 유사한 투여량의 CRISPR Cas가 본 발명에서 인간에 대해 고려될 수 있으며, 예를 들어, 1×10^9 형질도입 단위(TU)/ml의 역가를 갖는 렌티바이러스에서 뇌에 표적화된 약 10 내지 50 ml의 CRISPR Cas가 고려될 수 있다.
- [0322] 뇌로의 국소 전달에 관하여, 이는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 물질은 예를 들어, 주사에 의해 선상체 내로 전달될 수 있다. 주사는 개두술을 통해 정위적으로 수행될 수 있다.
- [0323] 몇몇 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 벡터, 하나 이상의 이의 전사체, 및/또는 이로부터 전사된 하나 또는 복수의 단백질이거나 이와 같은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 전달하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 본 발명은 이러한 방법에 의해 생산된 세포, 및 이러한 세포를 포함하는 동물 또는 이러한 세포로부터 생산된 동물을 추가로 제공한다. 몇몇 구현예에서, 가이드 서열과의 조합으로 (및 임의로 이와 복합된) CRISPR 효소가 세포로 전달된다. 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전송 방법은 포유류 세포 또는 표적 조직에서 핵산을 도입하기 위해 사용될 수 있다.
- [0324] 이러한 방법은 배양 중의 세포 또는 숙주 생물 내의 세포에 CRISPR 시스템의 성분을 인코딩하는 핵산을 투여하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, RNA (예를 들어 본원에 기재된 벡터의 전사체), 네이키드 핵산, 및 리포솜과 같은 전달 비히클과 복합된 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 세포로의 전달 후 에피솜 또는 통합된 게놈을 갖는 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다. 유전자 치료 과정의 리뉴를 위해, 문헌[Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Bohm (eds) (1995); 및 Yu et al., *Gene Therapy* 1:13-26 (1994)]을 참고하라. 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 리포펙션, 마이크로인젝션, 바이오리스틱스(biolistics), 비로솜(virosome), 리포솜, 면역리포솜, 다가양이온 또는 지질:핵산 컨쥬게이트, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제-증강 흡수를 포함한다. 리포펙션은 예를 들어, 미국 특허 제

5,049,386호, 제4,946,787호; 및 제4,897,355호에 기재되며 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예를 들어, Transfectam™ 및 Lipofectin™). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 대해 적합한 양이온성 및 중성 지질은 Felgner의 문헌[WO 91/17424; WO 91/16024]의 양이온성 및 중성 지질들을 포함한다. 전달은 세포 내로 될 수 있거나(예를 들어 실험관내 또는 생체의 투여) 또는 표적 조직 내로 될 수 있다(예를 들어 생체내 투여). 면역지질 복합체와 같은 표적화 리포솜을 포함하는 지질:핵산 복합체의 제조는 당 분야의 숙련자에게 널리 공지되었다(예를 들어, Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (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 제4,946,787호를 참고하라). 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 체내 특이 세포로 바이러스를 표적화하고 핵으로의 바이러스 탑재량을 운송하기 위한 매우 진화된 공정의 이점을 갖는다. 바이러스 벡터는 환자(생체내)에게 직접 투여될 수 있거나 이들은 실험관내 세포를 치료하는 데 사용될 수 있으며, 변형된 세포는 임의로 환자(생체외)에게 투여될 수 있다. 통상적인 바이러스 기반 시스템은 유전자 이동을 위해 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 숙주 게놈에서의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-관련 바이러스 유전자 이동 방법으로 가능하며, 이는 종종 삽입된 트랜스유전자의 장기간 발현을 야기한다. 게다가, 높은 형질도입 효율은 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다. 레트로바이러스의 친화성은 외부 외피 단백질을 통합하여 변경될 수 있으며, 이는 표적 세포의 잠재적 표적 집단을 확장한다. 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 형질도입하거나 감염하고 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생산할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 그러므로, 레트로바이러스 유전자 이동 시스템의 선별은 표적 조직에 의존할 것이다. 레트로바이러스 벡터는 6 내지 10 kb까지의 외부 서열에 대한 패키징 능력을 갖는 cis-작용의 긴 말단 반복으로 구성된다. 최소한의 cis-작용 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 적하하며, 이들은 그 후 표적 세포 내로 치료적 유전자를 통합하는 데 사용되어 영구적인 트랜스유전자 발현을 제공한다. 널리 사용된 레트로바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스(MuLV), 기본 아페(gibbon ape) 백혈병 바이러스(GaLV), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 및 이들의 조합에 근거한 벡터를 포함한다(예를 들어, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700호를 참조하라). 다른 구현예에서, 코칼 베시쿨로(Cocal vesiculo) 바이러스 외피 유형 레트로바이러스 벡터 입자가 고려된다(예를 들어, Fred Hutchinson Cancer Research Center로 양도된 미국 특허 공개 제20120164118호를 참조하라). 코칼 바이러스는 베시쿨로바이러스 속에 포함되며, 포유류에서 수포성 구내염의 원인 인자이다. 코칼 바이러스는 트리니다드에서의 진드기로부터 본래 분리되었으며(Jonkers et al., Am. J. Vet. Res. 25:236-242 (1964)), 및 감염이 곤충, 소 및 말로부터 트리니다드, 브라질, 및 아르헨티나에서 확인되었다. 포유류에 감염되는 많은 베시쿨로바이러스는 자연적으로 감염된 절지동물로부터 분리되었으며, 이는 이들의 벡터를 갖고 있음을 제안한다. 베시쿨로바이러스에 대한 항체는 바이러스가 풍토적이고 실험실-획득되는 시골 지방에서 거주하는 사람 중에 일반적이며; 인간에서의 감염은 일반적으로 인플루엔자-유사 증상을 야기한다. 코칼 바이러스 외피 글리코단백질은 VSV-G 인디아나와 아미노산 수준에서 71.5% 동일성을 공유하며, 베시쿨로바이러스의 외피 유전자의 계통발생적 비교는 코칼 바이러스가 베시쿨로바이러스 중에서 VSV-G 인디아나 균주와 혈청학적으로 구별되지만 대부분 밀접하게 관련됨을 보인다[Jonkers et al., Am. J. Vet. Res. 25:236-242 (1964) 및 Travassos da Rosa et al., Am. J. Tropical Med. & Hygiene 33:999-1006 (1984)]. 코칼 베시쿨로 바이러스 외피 유형 레트로바이러스 벡터 입자는 예를 들어, 레트로바이러스 Gag, Pol, 및/또는 하나 이상의 보조 단백질(들) 및 코칼 베시쿨로바이러스 외피 단백질을 포함할 수 있는 렌티바이러스, 알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스, 감마레트로바이러스, 델타레트로바이러스, 및 입실론레트로바이러스 벡터 입자를 포함할 수 있다. 이들 구현예의 특정 양태에서, Gag, Pol, 및 보조 단백질은 렌티바이러스 및/또는 감마레트로바이러스이다. 일시적인 발현이 바람직한 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율을 가능하게 하며 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터로, 높은 역가 및 발현 수준이 수득되었다. 이 벡터는 상대적으로 간단한 시스템에서 다량으로 생산될 수 있다. 아데노-관련 바이러스("AAV") 벡터는 또한 예를 들어 핵산 및 펩티드의 실험관내 생산에서 그리고 생체내 및 생체의 유전자 치료 과정을 위해 표적 핵산을 갖는 세포를 형질도입시키는 데 사용될 수 있다(예를 들어, West et al., Virology 160:38-47 (1987); 미국 특허 제4,797,368호; WO 93/24641호; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)을 참조하라). 재조합 AAV 벡터의 작제는 문헌[미국 특허 제5,173,414호; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et

al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)]을 포함하는 다수의 공개물에 기재되어 있다. 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하기 위해 통상적으로 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는 Ψ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료에서의 바이러스 벡터는 일반적으로 바이러스 입자로 핵산 벡터를 패키징하는 프로듀서 세포주에 의해 생성한다. 벡터는 통상적으로 패키징 및 뒤이은 숙주로의 통합을 위해 요구되는 최소 바이러스 서열을 함유하며, 발현될 폴리뉴클레오티드(들)에 대한 발현 카세트에 치환되는 다른 바이러스 서열이 있다. 실종된 바이러스 기능은 통상적으로 패키징 세포주에 의해 전달중(in trans) 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료에 사용되는 AAV 벡터는 패키징 및 숙주 게놈 내로의 통합을 위해 요청된 AAV 게놈으로부터의 ITR 서열만을 소유한다. 바이러스 DNA는 세포주에서 패키징되며, 이는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 인코딩하나, ITR 서열이 결여된 헬퍼 플라스미드를 함유한다. 세포주 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염될 수 있다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터의 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부족에 기인하여 상당량이 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로의 오염은 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 좀 더 민감한 열처리에 의해 감소될 수 있다. 따라서, AAV는 형질도입 벡터로서 사용하기 위한 이상적인 후보로 고려된다. 이러한 AAV 형질도입 벡터는 적합한 cis-작용 기능을 포함하여 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스 또는 포크바이러스(예를 들어, 백시니아 바이러스)의 존재 하에서 전달중 제공되는 헬퍼 기능을 복제할 수 있다. 재조합 AAV(rAAV)은 외인성 유전자를 다양한 계통의 세포 내로 운반하는 데 사용될 수 있다. 이들 벡터에서, AAV cap 및/또는 rep 유전자는 바이러스 게놈으로부터 삭제되며 선택된 DNA 세그먼트로 치환된다. 현재 AAV 벡터는 4300 개까지의 염기의 삽입된 DNA를 수용할 수 있다. rAAV를 생산할 수 있는 많은 방식이 있으며, 본 발명은 rAAV 및 rAAV를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 원하는 바이러스 작제물을 함유하거나 또는 필수적으로 구성된 플라스미드(들)은 AAV-감염 세포 내로 트랜스펙션된다. 게다가, 제2 또는 추가 헬퍼 플라스미드가 이들 세포 내로 공동트랜스펙션되어 재조합 바이러스 작제물의 복제 및 패키징을 위해 의무적인 AAV rep 및/또는 cap 유전자를 제공한다. 이러한 조건 하에서, AAV의 rep 및/또는 cap 단백질은 전달중 작용하여 rAAV 작제물의 복제 및 패키징을 자극한다. 트랜스펙션 2일 내지 3일 후, rAAV가 수확된다. 통상적으로, rAAV 아데노바이러스와 함께 세포로부터 수확된다. 그런 다음, 오염시키고 있는 아데노바이러스는 열처리로 불활성화된다. 본 발명에서, rAAV는 유리하게는 세포 자체로부터가 아니라 세포 상청액으로부터 수확된다. 따라서, 초기 양태에서 본 발명은 rAAV를 제조하기 위해 제공되며, 상기에 더하여, rAAV는 하기를 포함하거나 하기로 필수적으로 구성된 방법에 의해 제조될 수 있다: 발현을 위한 DNA를 포함하는 외인성 DNA 및 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 백시니아 바이러스와 같은 포크바이러스)를 함유하는 rAAV로 민감성 세포를 감염시키고, 여기에서 rAAV는 작용성 cap 및/또는 rep(및 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 백시니아 바이러스와 같은 포크바이러스)는 rAAV가 결여된 cap 및/또는 rev 기능을 제공함)가 결여되며; 또는 발현을 위한 DNA를 포함하는 외인성 DNA를 함유하는 rAAV로 민감성 세포를 감염시키고, 여기에서 재조합체는 작용성 cap 및/또는 rep가 결여되며, 상기 세포를 rAAV에서 결여된 cap 및/또는 rep 기능을 공급하는 플라스미드로 트랜스펙션시키고; 또는 발현을 위한 DNA를 포함하는 외인성 DNA를 함유하는 rAAV로 민감성 세포를 감염시키고, 여기에서 재조합체는 작용성 cap 및/또는 rep가 결여되며, 여기에서 상기 세포는 재조합체에서 결여된 cap 및/또는 rep 기능을 공급하고; 또는 작용성 cap 및/또는 rep가 결여된 AAV 및 재조합체 내로 외인성 DNA를 삽입하기 위한 플라스미드로 민감성 세포를 트랜스펙션시켜 외인성 DNA가 재조합체에 의해서 그리고 rep 및/또는 cap 기능을 공급하기 위해 발현됨으로써 트랜스펙션이 작용성 cap 및/또는 rep이 결여된, 발현을 위해 DNA를 포함하는 외인성 DNA를 함유하는 rAAV를 야기한다. rAAV는 본원에 기재된 바와 같이 AAV로부터 올 수 있으며, 유리하게는 rAAV1, rAAV2, AAV5 또는 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있는 하이브리드 또는 캡시드를 갖는 rAAV일 수 있다. rAAV에 의해 표적화될 세포에 관하여 rAAV의 AAV를 선택할 수 있으며; 예를 들어, 뇌 또는 뉴런 세포에 대한 AAV 혈청형 1, 2, 5 또는 하이브리드 또는 캡시드 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이의 임의의 조합을 선택할 수 있으며; 심장 조직에 대해 AAV4를 선택할 수 있다. 293 세포 뿐만 아니라, 본 발명의 실시예에 사용된 다른 세포 및 이러한 세포에 관한 실험관내 특정 AAV 혈청형의 상대적인 감염성은 하기와 같다(Grimm, D. et al, J. Virol. 82: 5887-5911 (2008)을 참조하라):

세포주	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1a	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
단핵구	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
미성숙 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
성숙 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

[0325]

[0326]

본 발명은 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템을 인코딩하는 외인성 핵산 분자를 함유하거나 이로 필수적으로 구성된 rAAV를 제공하며, 예를 들어, 프로모터, 핵산 분자 인코딩 CRISPR-관련(Cas) 단백질 (추정의 뉴클레아제 또는 헬리카제 단백질), 예를 들어, Cas9 및 종결자를 포함하거나 이들로 필수적으로 구성된 제1 카세트, 및, 둘 이상, 유리하게는 패키징 크기 한도까지의 벡터, 예를 들어, 전체(제1 카세트 포함) 5개의 벡터를 포함하거나 이들로 구성된 다수의 카세트, 프로모터, 가이드 RNA(gRNA)를 인코딩하는 핵산 분자 및 종결자를 포함하거나 이들로 필수적으로 구성된 카세트(예를 들어, 각 카세트는 프로모터-gRNA1-종결자, 프로모터-gRNA2-종결자 ... 프로모터-gRNA(N)-종결자(N은 벡터의 패키징 크기 한도의 상한인 삽입될 수 있는 수임)로서 개략적으로 나타냄), 또는 둘 이상의 개별 rAAV로서, 각각은 하나의 카세트 이상의 CRISPR 시스템을 함유하며, 예를 들어, 프로모터, Cas, 예를 들어, Cas9를 인코딩하는 핵산 분자 및 종결자를 포함하거나 이들로 필수적으로 구성된 제1 카세트를 함유하는 제1 rAAV, 및 프로모터, 핵산 분자 인코딩 가이드 RNA (gRNA) 및 종결자를 포함하거나 이들로 필수적으로 구성된 다수, 4개의 카세트(예를 들어, 각 카세트는 프로모터-gRNA1-종결자, 프로모터-gRNA2-종결자 ... 프로모터-gRNA(N)-종결자(N은 벡터의 패키징 크기 한도의 상한인 삽입될 수 있는 수임)]를 함유하는 제2 rAAV이다. rAAV가 DNA 바이러스이므로, AAV 또는 rAAV에 관한 본원의 논의에서의 핵산 분자는 유리하게는 DNA이다. 프로모터는 몇몇 구현예에서 유리하게는 인간 시냅신 I 프로모터 (hSyn)이다. 세포로 핵산을 전달하기 위한 추가 방법은 본 분야의 숙련자에게 공지된 것이다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 US20030087817호를 참조하라. 몇몇 구현예에서, 숙주 세포는 일시적으로 또는 비-일시적으로 본원에서 기재된 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션된다. 몇몇 구현예에서, 세포는 대상체에서 자연적으로 발생하는 것처럼 트랜스펙션된다. 몇몇 구현예에서, 트랜스펙션된 세포는 대상체로부터 얻어진다. 몇몇 구현예에서, 세포는 세포주와 같은 대상체로부터 얻어진 세포로부터 유래된다. 조직 배양을 위한 매우 다양한 세포주는 당 분야에 공지되어 있다. 세포주의 예는 C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEK_n, HEK_a, MiaPaCell, Panc1, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388d1, SEM-K2, WEHI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6a, BS-C-1 원숭이 신장 상피, BALB/ 3T3 마우스 배아 섬유아세포, 3T3 Swiss, 3T3-L1, 132-d5 인간 태아 섬유아세포; 10.1 마우스 섬유아세포, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, BCP-1 cells, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1, CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr -/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepa1c1c7, HL-60, HMEC, HT-29, 주르카트(Jurkat), JY 세포, K562 세포, Ku812, KCL22, KG1, KY01, LNCap, Ma-Mel 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10a, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK II, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1a, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, OPCN / OPCT 세포주, Peer, PNT-1a / PNT 2, RenCa, RIN-5f, RMA/RMAS, Saos-2 세포, Sf-9, SkBr3, T2, T-47d, T84, THP1 세포주, U373, U87, U937, VCaP, Vero 세포, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR, 및 이의 각종 트랜스제닉을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 세포주는 당 분야의 숙련자에게 공지된 다수의 원천으로부터 입수 가능하다

(예를 들어, the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassus, Va.)를 참조하라). 몇몇 구현예에서, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션된 세포는 하나 이상의 벡터-유래 서열을 포함하는 신규 세포주를 확립하는데 사용된다. 몇몇 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 CRISPR 시스템의 성분으로 일시적으로 트랜스펙션되고(예컨대 하나 이상의 벡터의 일시적 트랜스펙션, 또는 RNA로의 트랜스펙션에 의해), CRISPR 복합체의 활성을 통해 변형된 세포는 변형을 함유하지만 임의의 다른 외인성 서열이 결합된 세포를 포함하는 신규한 세포주를 확립하기 위해 사용된다. 몇몇 구현예에서, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 일시적으로 또는 비-일시적으로 트랜스펙션된 세포, 또는 이러한 세포로부터 유래된 세포주는 하나 이상의 시험 화합물을 평가하는 데 사용된다.

- [0327] NHEJ 또는 HR 효율을 향상시키는 것은 또한 전달에 도움을 준다. NHEJ 효율은 Trex2와 같은 최종 가공 효소를 동시발현시킴으로써 향상되는 것이 바람직하다(문헌[Dumitrache et al. Genetics. 2011 August; 188(4): 787-797]). HR 효율은 Ku70 및 Ku86과 같은 NHEJ 기구를 일시적으로 저해함으로써 증가되는 것이 바람직하다. HR 효율은 또한 RecBCD, RecA와 같은 원핵 또는 진핵 상동성 재조합 효소를 동시발현시킴으로써 증가될 수 있다.
- [0328] *일반적인 패키징 및 프로모터*
- [0329] 생체내에서 게놈 변형을 매개하기 위해 Cas9 코딩 핵산 분자, 예를 들어, DNA를 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터 내로 패키징하는 방법은 다음을 포함한다:
- [0330] NHEJ-매개 유전자 낙아웃을 달성하기 위한 것:
- [0331] 단일 바이러스 벡터:
- [0332] 2개 이상의 발현 카세트를 함유하는 벡터:
- [0333] 프로모터-Cas9 코딩 핵산 분자 -종결자
- [0334] 프로모터-gRNA1-종결자
- [0335] 프로모터-gRNA2-종결자
- [0336] 프로모터-gRNA(N)-종결자(벡터의 크기 제한까지)
- [0337] 이중 바이러스 벡터:
- [0338] Cas9의 발현을 유도하기 위한 하나의 발현 카세트를 함유하는 벡터 1
- [0339] 프로모터-Cas9 코딩 핵산 분자-종결자
- [0340] 하나 이상의 가이드RNA의 발현을 유도하기 위한 하나 이상의 발현 카세트를 함유하는 벡터 2
- [0341] 프로모터-gRNA1-종결자
- [0342] 프로모터-gRNA(N)-종결자(벡터의 크기 제한까지)
- [0343] 상동성-유도 수복을 매개하는 것.
- [0344] 상기 기재한 단일 및 이중 바이러스 벡터 접근법에 더하여, 추가적인 벡터를 사용하여 상동성-유도 수복 주형을 전달한다.
- [0345] Cas9 코딩 핵산 분자 발현을 유도하기 위해 사용되는 프로모터는 다음을 포함할 수 있다:
- [0346] AAV ITR은 프로모터로서 작용할 수 있다: 이는 추가적인 프로모터 요소(벡터 내 공간을 차지할 수 있음)에 대한 필요를 없애는데 유리하다. 추가의 비어 있는 공간은 추가적인 요소(gRNA 등)의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 또한, ITR 활성은 상대적으로 더 약하고, 따라서 Cas9의 과발현에 기인하는 잠재적인 독성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0347] 편재하는 발현을 위해, 프로모터를 사용할 수 있다: CMV, CAG, CBh, PGK, SV40, 페리틴 중쇄 또는 경쇄 등.
- [0348] 뇌 또는 다른 CNS 발현에서, 프로모터: 모든 뉴런에 대해 시냅신I, 흥분성 뉴런에 대해 CaMKIIalpha, GABAergic 뉴런에 대해 GAD67 또는 GAD65 또는 VGAT 등을 사용할 수 있다.
- [0349] 간 발현에서, Albumin 프로모터를 사용할 수 있다.

- [0350] 폐 발현에서, SP-B를 사용할 수 있다.
 - [0351] 내피 세포에서, ICAM을 사용할 수 있다.
 - [0352] 조혈 세포에서 IFN베타 또는 CD45를 사용할 수 있다.
 - [0353] 조골세포에서 OG-2를 사용할 수 있다.
 - [0354] 가이드 RNA를 유도하기 위해 사용되는 프로모터는 다음을 포함할 수 있다:
 - [0355] U6 또는 H1과 같은 Pol III 프로모터.
 - [0356] gRNA를 발현시키기 위한 Pol II 프로모터 및 인트론 카세트의 사용.
 - [0357] 아데노 연관 바이러스(AAV)
 - [0358] Cas9 및 하나 이상의 가이드 RNA는 아데노 연관 바이러스(AAV), 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 다른 플라스미드 또는 바이러스 벡터 유형을 사용하여, 특히, 예를 들어, 미국 특허 제8,454,972호(아데노바이러스에 대한 제형, 용량), 제8,404,658호(AAV에 대한 제형, 용량) 및 제5,846,946호(DNA 플라스미드에 대한 제형, 용량)로부터의 제형 및 용량, 및 렌티바이러스, AAV 및 아데노바이러스를 수반하는 임상 시험 및 임상 시험에 관한 간행물로부터의 제형 및 용량을 사용하여 전달될 수 있다. 예를 들어, AAV에 대해, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 제8,454,972호에서와 같고, AAV를 수반하는 임상 시험에서와 같을 수 있다. 아데노바이러스에 대해, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 제8,404,658호에서와 같을 수 있고 아데노바이러스를 수반하는 임상 시험에서와 같을 수 있다. 플라스미드 전달에 대해, 투여 경로, 제형 및 용량은 미국 특허 제5,846,946호에서와 같고, 플라스미드를 수반하는 임상 연구에서와 같을 수 있다. 용량은 평균 70 kg 개체(예를 들어, 성인 남성)를 기준으로 하거나 또는 이로 추정될 수 있고, 상이한 체중 및 중의 환자, 대상체, 포유류에 대해 조절될 수 있다. 투여 빈도는 환자 또는 대상체의 연령, 성별, 일반적 건강상태, 다른 질환 및 다루어질 특정 질환 또는 증상을 포함하는 보통의 인자에 따라서 의학적 또는 수의학적 실행자(예를 들어, 의사, 수의사)의 영역 내에 있다. 바이러스 벡터는 관심 조직 내에 주사될 수 있다. 세포 유형 특이적 게놈 변형을 위해, Cas9의 발현은 세포 유형 특이적 프로모터에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 간 특이적 발현은 알부민 프로모터를 사용할 수 있고, 뉴런 특이적 발현(예를 들어, CNS 장애를 표적화하기 위함)은 시냅신 I 프로모터를 사용할 수 있다.
 - [0359] 생체내 전달에 관하여, AAV는 몇가지 이유로 다른 바이러스 벡터에 비해 유리하다:
 - [0360] 낮은 독성(이것은 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 세포 입자의 초원심분리를 필요로 하지 않는 정제 방법 때문일 수 있다).
 - [0361] 숙주 게놈 내로 통합하지 않기 때문에 삽입 돌연변이유발을 야기할 확률이 낮음.
 - [0362] AAV는 4.5 또는 4.75 Kb의 패키징 제한을 갖는다. 이는 Cas9뿐만 아니라 프로모터 및 전사 종결자가 모두 동일한 바이러스 벡터에 패키징되어야 함을 의미한다. 4.5 또는 4.75 Kb보다 큰 작제물은 상당히 감소된 바이러스 생산을 야기할 것이다. SpCas9는 상당히 크며, 유전자 그 자체가 4.1 Kb가 넘는데, 이는 그것이 AAV 내로 패키징되는 것을 어렵게 만든다. 따라서 본 발명의 구현에는 더 짧은 Cas9의 상동체를 이용하는 것을 포함한다. 예를 들어:
- | 종 | Cas9 크기 |
|--|---------|
| 코리네박터 디프테리아(<i>Corynebacter diphtheriae</i>) | 3252 |
| 유박테리움 벤트리오숨(<i>Eubacterium ventriosum</i>) | 3321 |
| 스트렙토코커스 파스테우리아누스(<i>Streptococcus pasteurianus</i>) | 3390 |
| 락토바실러스 파르시미니스(<i>Lactobacillus farciminis</i>) | 3378 |
| 스피로헷타 글로부스(<i>Sphaerochaeta globus</i>) | 3537 |
| 아조스피릴럼(<i>Azospirillum</i>) B510 | 3504 |
| 글루코나세토박터 디아조트로피쿠스(<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>) | 3150 |
| 나이세리아 시네레아(<i>Neisseria cinerea</i>) | 3246 |
| 로세부리아 인테스티날리스(<i>Roseburia intestinalis</i>) | 3420 |
| 파르비바큘럼 라바멘티보란스(<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>) | 3111 |
| 스타필로코커스 아우레우스 | 3159 |
| 니트라티프락토르 살수기니스(<i>Nitratifractor salsuginis</i>) DSM 16511 | 3396 |
| 캠필로박터 라리(<i>Campylobacter lari</i>) CF89-12 | 3009 |
| 스트렙토코커스 쉐모필러스 LMD-9 | 3396 |
- [0363]
 - [0364] 따라서 이들 종은 일반적으로 Cas9 종이 바람직하다.
 - [0365] AAV에 관해서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 또는 그들의 임의의 조합일 수 있다. 표적화될 세포에 관한 AAV의 AAV를

선택할 수 있으며; 예를 들어, 뇌 또는 뉴런 세포를 표적화하기 위하여 AAV 혈청형 1, 2, 5 또는 하이브리드 캡시드 AAV1, AAV2, AAV5 또는 그들의 임의의 조합을 선택할 수 있으며; 심장 조직을 표적화하기 위하여 AAV4를 선택할 수 있다. AAV8은 간으로의 전달에 유용하다. 본원의 프로모터 및 벡터는 개별적으로 바람직하다. 이들 세포에 관한 특정 AAV 혈청형의 표 작성(문헌[Grimm, D. et al, J. Virol. 82: 5887-5911 (2008)] 참조)은 하기와 같다:

세포주	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1a	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
단핵구	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
미성숙 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
성숙 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

[0366]

[0367]

렌티바이러스

[0368]

렌티바이러스는 유사분열과 유사분열 후 세포 둘 다에서 그들의 유전자를 감염 및 발현시키는 능력을 갖는 복합 레트로바이러스이다. 가장 흔히 알려진 렌티바이러스는 광범위한 세포 유형을 표적화하기 위해 다른 바이러스의 외피 당단백질을 사용하는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)이다.

[0369]

렌티바이러스는 다음과 같이 제조될 수 있다. (렌티바이러스 전달 플라스미드 백본을 함유하는) pCasES10의 클로닝 후에, 낮은 계대(p=5)에서 HEK293FT를 10% 우태아혈청이 있고 항생제가 없는 DMEM 중의 트랜스펙션 전달에 50% 컨플루언스(confluence)까지 T-75 플라스크에 씨딩하였다. 20시간 후에, 배지를 OptiMEM(무혈청) 배지로 바꾸고, 4시간 후에 트랜스펙션을 행하였다. 세포를 10 μg의 렌티바이러스 전달 플라스미드(pCasES10) 및 다음의 패키징 플라스미드: 5 μg의 pMD2.G(VSV-g 유형), 및 7.5 μg의 psPAX2(gag/pol/rev/tat)로 트랜스펙션시켰다. 양이온성 지질 전달제(50 μl 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 및 100 μl 플러스(Plus) 시약)를 이용하여 4 ml OptiMEM 중에서 트랜스펙션을 행하였다. 6시간 후, 배지를 10% 우태아혈청이 있는 무항생제 DMEM으로 바꾸었다. 이들 방법은 세포 배양 동안 혈청을 사용하지만, 무혈청 방법이 바람직하다.

[0370]

렌티바이러스는 다음과 같이 정제될 수 있다. 바이러스 상청액을 48시간 후에 수집하였다. 상청액을 먼저 데브리(debris)를 없애고, 0.45 μm 저 단백질 결합(PVDF) 필터를 통해 여과시켰다. 이어서, 그들을 24,000 rpm에서 2시간 동안 초원심분리기에서 회전시켰다. 바이러스 펠렛을 4에서 밤새 50 μl의 DMEM 중에서 재현탁화시켰다. 이어서 그들을 분주하고 즉시 -80에서 즉시 동결시켰다.

[0371]

다른 구현예에서, 말 감염성 빈혈 바이러스(equine infectious anemia virus: EIAV)에 기반한 최소 비영장류 렌티바이러스 벡터는 또한, 특히 눈 유전자 치료요법을 위해 고려된다(예를 들어, 문헌[Balagaan, J Gene Med 2006; 8: 275 - 285] 참조). 다른 구현예에서, RetinoStat®, 망(web) 형태의 노인성 황반변성의 치료를 위한 망막하 주사를 통해 전달되는 혈관신생억제 단백질 엔도스타틴 및 엔지오스타틴을 발현시키는 말 감염성 빈혈 바이러스-기반의 렌티바이러스 유전자 치료요법 벡터가 또한 고려되며(예를 들어, 문헌[Binley et al., HUMAN GENE THERAPY 23:980-991 (September 2012)]), 이러한 벡터는 본 발명의 CRISPR-Cas 시스템을 위해 변형될 수 있다.

[0372]

다른 구현예에서, HIV tat/rev에 의해 공유되는 공통 엑손을 표적화하는 siRNA, 핵소체-국소화 TAR 데코이(decoy), 및 항-CCR5-특이적 해머헤드(hammerhead) 리보자임을 이용하는 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 문헌[DiGiusto et al. (2010) Sci Transl Med 2:36ra43] 참조)가 본 발명의 CRISPR-Cas 시스템에 대해 사용되고/되거나 적합하게 될 수 있다. 최소 2.5 x 10⁶개 CD34+ 세포/킬로그램(환자의 체중)을 수집하고, 2 x 10⁶개 세포/ml의 밀도에서 2 μmol/L-글루타민, 줄기 세포 인자(100 ng/ml), Flt-3 리간드(Flt-3L)(100 ng/ml), 및 트롬보포이에틴(10 ng/ml)(셀제닉스(CellGenix))을 함유하는 X-VIVO 15 배지(론자(Lonza))에서 16 내지 20시간 동안 사전자극할 수 있다. 사전자극된 세포는 피브로블라스트(25 mg/cm²)으로 코팅된 75-cm² 조직 배양 플

라스크에서 16 내지 24 시간 동안 감염다중도 5로 렌티바이러스에 의해 형질도입될 수 있다(레트로벡틴(RetroNectin), 타카라 바이오 인코포레이티드(Takara Bio Inc.)).

[0373] 렌티바이러스 벡터는 파킨슨병의 치료에서와 같이 개시되었다, 예를 들어, 미국 특허 공개 제20120295960호 및 미국 특허 제7303910호 및 제7351585호를 참조한다. 렌티바이러스 벡터는 또한 안질환의 치료용으로 개시되었다, 예를 들어, 미국 특허 공개 제20060281180호, 제20090007284호, 제US20110117189호; 제US20090017543호; 제US20070054961호, 제US20100317109호를 참조한다. 렌티바이러스 벡터는 또한 뇌에 대한 전달용으로 개시되었다, 예를 들어, 미국 특허 공개 제US20110293571호; 제US20110293571호, 제US20040013648호, 제US20070025970호, 제US20090111106호 및 미국 특허 제US7259015호를 참조한다.

[0374] RNA 전달

[0375] RNA 전달: CRISPR 효소, 예를 들어 Cas9, 및/또는 임의의 본 발명의 RNA, 예를 들어 가이드 RNA는 또한 RNA의 형태로 전달될 수 있다. Cas9 mRNA는 시험관내 전사를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, Cas9 mRNA는 다음의 요소를 함유하는 PCR 카세트를 사용하여 합성될 수 있다: 베타 글로빈-폴리A 테일(120개 이상의 아데닌의 스트링(string))로부터의 T7_프로모터-코작 서열(GCCACC)-Cas9-3' UTR. 카세트는 T7 중합효소에 의한 전사를 위해 사용될 수 있다. 가이드 RNA는 또한 T7_프로모터-GG-가이드 RNA 서열을 함유하는 카세트로부터의 시험관내 전사를 사용하여 전사될 수 있다.

[0376] 발현을 향상시키고 가능한 독성을 감소시키기 위해, CRISPR 효소-코딩 서열 및/또는 가이드 RNA는 예를 들어, 슈도-U 또는 5-메틸-C를 사용하여 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0377] mRNA 전달 방법은 현재 간 전달용으로 특히 촉망된다.

[0378] RNA 전달에 대한 많은 임상적 연구는 RNAi 또는 안티센스에 집중되어 있으나, 이들 시스템은 본 발명을 이행하기 위하여 RNA의 전달에 적합하게 될 수 있다. 따라서, RNAi 등에 대한 하기의 참고문헌을 확인해야 한다.

[0379] 입자 전달 시스템 및/또는 제형:

[0380] 여러 유형의 입자 전달 시스템 및/또는 제형은 다양한 스펙트럼의 생체의학 응용에서 유용하다고 알려져 있다. 일반적으로, 입자는 이의 운반 및 특성에 대해서 전체 유닛으로서 거동하는 작은 물체로서 규정된다. 입자는 직경에 따라서 또한 분류된다. 조립 입자는 2,500 내지 10,000 나노미터 사이의 범위를 망라한다. 미세 입자는 100 내지 2,500 나노미터 사이의 크기이다. 초미세 입자, 또는 나노입자는 일반적으로 1 내지 100 나노미터 크기 사이이다. 100-nm 한계의 근거는 벌크 물질로부터 입자를 구별하는 신규한 특성이 통상적으로 100 nm 미만의 역치 길이 규모에서 생성한다는 사실이다.

[0381] 본원에서 사용된 바와 같이, 입자 전달 시스템/제형은 본 발명에 따른 입자를 포함하는 임의의 생물학적 전달 시스템/제형으로서 규정된다. 본 발명에 따른 입자는 100 마이크로미터(μm) 미만의 가장 큰 크기(예를 들어 직경)를 갖는 임의의 엔티티(entity)이다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 10 μm 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 2000 나노미터(nm) 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 1000 나노미터(nm) 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 또는 100 nm 미만의 가장 큰 치수를 갖는다. 통상적으로, 본 발명의 입자는 500 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어 직경)를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 250 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어 직경)를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 200 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어 직경)를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 150 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어 직경)를 갖는다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 100 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어 직경)를 갖는다. 더 작은 입자, 예를 들어, 50 nm 이하의 가장 큰 치수를 갖는 더 작은 입자가 본 발명의 몇몇 구현예에서 사용된다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 입자는 25 nm 및 200 nm 사이 범위의 가장 큰 치수를 갖는다.

[0382] 입자 특성화(예를 들어, 형태, 치수 등을 특성화를 포함함)는 상이한 기술을 이용하여 수행된다. 일반적인 기술은 전자 현미경검사법(TEM, SEM), 원자력 현미경검사법(AFM), 동적 광 산란(DLS), X-선 광전자 분광법(XPS), 분말 X-선 회절(XRD), 푸리에 변환 적외선 분광광도법(FTIR), 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 비행시간형 질량 분석기(MALDI-TOF), 자외선-가시 분광법, 이중 분극 간섭계 및 핵 자기 공명(NMR)이다. 특성화(치수 측정)는 본 발명의 임의의 시험관내, 생체외 및/또는 생체내 적용을 위한 전달을 위한 최적의 크기의 입자를 제공하기 위해 고유 입자(즉, 로딩 이전)에 대해또는 카고(cargo)의 로딩 후(본원에서 카고 예를 들어, 하나 이상의 성분의 CRISPR-Cas 시스템, 예를 들어, CRISPR 효소 또는 mRNA 또는 가이드 RNA, 또는 이들의 임의의 조합을 나타내며, 추가 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있음)에 이루어질 수 있다. 특정한 바람직한 구현예에서, 입자 치수(예

를 들어, 직경) 특성화는 동적 레이저 산란(DLS)을 이용한 측정을 기초로 한다. 입자, 이들을 제조하고 이용하는 방법 및 이들의 측정과 관련하여 미국 특허 제8,709,843호; 미국 특허 제6,007,845호; 미국 특허 제5,855,913호; 미국 특허 제5,985,309호; 미국 특허 제5,543,158호; 및 2014년 5월 11일에 온라인 공개된 공고 (James E. Dahlman and Carmen Barnes et al. Nature Nanotechnology (2014), doi:10.1038/nnano.2014.84)가 언급된다.

[0383] 본 발명의 범위 내의 입자 전달 시스템은 고체, 반고체, 에멀전 또는 콜로이드 입자를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 지질-기반 시스템, 리포솜, 미셀, 미세소포, 엑소솜, 또는 유전자총을 포함하나 이에 제한되지 않는 본원에 기재된 전달 시스템 중 임의의 전달 시스템이 본 발명의 범위 내의 입자 전달 시스템으로서 제공될 수 있다.

[0384] 나노입자

[0385] CRISPR 효소 mRNA 및 가이드 RNA는 나노입자 또는 지질 외피를 사용하여 동시에 전달될 수 있다.

[0386] 예를 들어, Su X, Fricke J, Kavanagh DG, Irvine DJ(문헌["In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles" Mol Pharm. 2011 Jun 6;8(3):774-87. doi: 10.1021/mp100390w. Epub 2011 Apr 1])는 인지질 이중층 껍질에 의해 둘러싸인 폴리(β -아미노 에스테르)(PBAE) 코어를 지니는 생분해성 코어 껍질 구조의 나노입자를 기재한다. 이들은 생체내 mRNA 전달을 위해 개발되었다. pH-반응성 PBAE 성분은 엔도솜 파괴를 촉진하도록 선택되는 한편, 지질 표면층은 다가양이온 코어의 독성을 최소화하도록 선택되었다. 따라서 그러한 것은 본 발명의 RNA를 전달하는데 바람직하다.

[0387] 일 구현예에서, 모두 뇌로의 펩티드의 구강 전달, 펩티드의 정맥내 전달 및 펩티드의 비강 전달에 적용될 수 있는 생접착성 중합체의 자가 어셈블링에 기반한 나노입자가 고려된다. 다른 구현예, 예컨대 소수성 약물의 구강 흡수 및 눈 전달이 또한 고려된다. 분자 외피 기술은 보호되고, 질환의 부위에 전달되는 조작된 중합체 외피를 수반한다(예를 들어, 문헌[Mazza, M. et al. ACSNano, 2013. 7(2): 1016-1026]; 문헌[Siew, A., et al. Mol Pharm, 2012. 9(1):14-28]; 문헌[Lalatsa, A., et al. J Contr Rel, 2012. 161(2):523-36]; 문헌[Lalatsa, A., et al., Mol Pharm, 2012. 9(6):1665-80]; 문헌[Lalatsa, A., et al. Mol Pharm, 2012. 9(6):1764-74]; 문헌[Garrett, N.L., et al. J Biophotonics, 2012. 5(5-6):458-68]; 문헌[Garrett, N.L., et al. J Raman Spect, 2012. 43(5):681-688]; 문헌[Ahmad, S., et al. J Royal Soc Interface 2010. 7:S423-33]; 문헌[Uchegbu, I.F. Expert Opin Drug Deliv, 2006. 3(5):629-40]; 문헌[Qu, X., et al. Biomacromolecules, 2006. 7(12):3452-9] 및 문헌[Uchegbu, I.F., et al. Int J Pharm, 2001. 224:185-199] 참조). 표적 조직에 따라, 약 5 mg/kg의 단일 또는 다중 용량이 고려된다.

[0388] 일 구현예에서, MIT의 덴 앤더슨 연구소(Dan Anderson's lab)에 의해 개발된 종양 성장을 중단시키기 위해 암 세포에 RNA를 전달할 수 있는 나노입자가 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 대해 사용되고/사용되거나 적합하게 될 수 있다. 특히, 앤더슨 연구소는 새로운 생체재료 및 나노제형의 합성, 정제, 특성화 및 제형화를 위한 완전히 자동화된 조합 시스템을 개발하였다. 예를 들어, 문헌[Alabi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 6;110(32):12881-6]; 문헌[Zhang et al., Adv Mater. 2013 Sep 6;25(33):4641-5]; 문헌[Jiang et al., Nano Lett. 2013 Mar 13;13(3):1059-64]; 문헌[Karagiannis et al., ACS Nano. 2012 Oct 23;6(10):8484-7]; 문헌[Whitehead et al., ACS Nano. 2012 Aug 28;6(8):6922-9] 및 문헌[Lee et al., Nat Nanotechnol. 2012 Jun 3;7(6):389-93]을 참조한다.

[0389] 미국 특허 출원 제20110293703호는 또한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템을 전달하기 위해 적용될 수 있는 폴리뉴클레오티드의 투여에서 특히 유용한 리피도이드(lipidoid) 화합물에 관한 것이다. 일 양태에서, 아미노알코올 리피도이드 화합물은 작용제와 병용되어 세포 또는 대상체에게 전달되어 마이크로입자, 나노입자, 리포솜, 또는 미셀을 형성한다. 입자, 리포솜 또는 미셀에 의해 전달될 작용제는 기체, 액체 또는 고체의 형태일 수 있고, 작용제는 폴리뉴클레오티드, 단백질, 펩티드 또는 소분자일 수 있다. 아미노알코올 리피도이드 화합물은 다른 아미노알코올 리피도이드 화합물, 중합체(합성 또는 천연), 계면활성제, 콜레스테롤, 탄수화물, 단백질, 지질 등과 조합되어 입자를 형성할 수 있다. 이어서 이들 입자는 임의로 약제학적 부형제와 조합되어 약제학적 조성물을 형성할 수 있다.

[0390] 미국 특허 공개 제20110293703호는 또한 아미노알코올 리피도이드 화합물의 제조 방법을 제공한다. 1 이상의 당량의 아민을 본 발명의 아미노알코올 리피도이드 화합물을 형성하기에 적합한 조건하에서 에폭시드-말단 화합물의 1 당량 이상과 반응되게 한다. 특정 구현예에서, 아민의 모든 아미노기는 에폭시드-말단 화합물과 완전히 반

응되어 3차 아민을 형성한다. 다른 구현예에서, 아민의 모든 아미노기는 3차 아민을 형성하기 위하여 에폭시드-말단 화합물과 완전히 반응되지 않으며, 이에 의해 아미노알코올 리피도이드 화합물에서 1차 또는 2차 아민이 초래된다. 이들 1차 또는 2차 아민은 그대로 남아 있거나, 다른 친핵체, 예를 들어, 상이한 에폭시드-말단 화합물과 반응할 수 있다. 해당 분야의 숙련자에 의해 인식될 바와 같이, 아민을 과량 미만의 에폭시드-말단 화합물과 반응시키는 것은 다수의 테일을 지니는 복수의 상이한 아미노알코올 리피도이드 화합물을 초래할 것이다. 특정 아민은 2개의 에폭시드 유래 화합물 테일로 완전히 작용화될 수 있는 반면, 다른 분자는 에폭시드 유래 화합물 테일에 의해 완전히 작용화되지 않을 것이다. 예를 들어, 디아민 또는 폴리아민은 분자의 다양한 아미노 모이어티를 제거하는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 에폭시드 유래 화합물 테일을 함유하여 1차, 2차 및 3차 아민을 야기할 수 있다. 특정 구현예에서, 모든 아미노기는 완전히 작용화되지 않는다. 특정 구현예에서, 2가지 동일 유형의 에폭시드 말단 화합물이 사용된다. 다른 구현예에서, 2개 이상의 상이한 에폭시드 말단 화합물이 사용된다. 아미노알코올 리피도이드 화합물의 합성은 용매와 함께 또는 용매 없이 수행되고, 합성은 30 내지 100, 바람직하게는 대략 50 내지 90 범위의 고온에서 수행될 수 있다. 제조된 아미노알코올 리피도이드 화합물은 임의로 정제될 수 있다. 예를 들어, 아미노알코올 리피도이드 화합물의 혼합물을 정제하여, 특정 수의 에폭시드 유래 화합물 테일을 지니는 아미노알코올 리피도이드 화합물을 수득할 수 있다. 또는 혼합물을 정제하여 특정 입체 이성질체 또는 구조 이성질체를 수득할 수 있다. 아미노알코올 리피도이드 화합물은 또한 알킬 할로겐화물(예를 들어, 요오드화메틸) 또는 다른 알킬화제를 사용하여 알킬화될 수 있고/있거나 그들은 아실화될 수 있다.

[0391] 미국 특허 공개 제20110293703호는 또한 본 발명의 방법에 의해 제조된 아미노알코올 리피도이드 화합물의 라이브리리를 제공한다. 이들 아미노알코올 리피도이드 화합물은 액체 핸들러(handler), 로봇, 마이크로타이터 플레이트, 컴퓨터 등을 수반하는 고처리량 기술을 사용하여 제조 및/또는 스크리닝될 수 있다. 특정 구현예에서, 아미노알코올 리피도이드 화합물을 폴리뉴클레오티드 또는 다른 작용제(예를 들어, 단백질, 펩티드, 소분자)를 세포에 트랜스펙션시키는 그들의 능력에 대해 스크리닝한다.

[0392] 미국 특허 공개 제20130302401호는 조합 중합을 사용하여 제조된 폴리(베타-아미노 알코올)(PBAA)의 부류에 관한 것이다. 본 발명의 PBAA는 코팅(예컨대 의료장치 또는 이식물에 대한 필름 또는 다중층 필름의 코팅), 첨가제, 재료, 부형제, 비생물오손제(non-biofouling agent), 미세패터닝제 및 세포 캡슐화제로서 생명공학 및 생체 의학 적용분야에서 사용될 수 있다. 표면 코팅으로서 사용될 때, 이들 PBAA는 그들의 화학적 구조에 따라서 시험관내와 생체내 둘 다에서 상이한 염증 수준을 유발하였다. 이러한 부류의 물질의 큰 화학적 다양성은 본 발명자들이 시험관내 대식세포 활성화를 저해하는 중합체 코팅을 확신하게 하였다. 더욱이, 이들 코팅은 카르복실화된 폴리스티렌 마이크로입자의 피하 이식 후에 염증 세포의 동원을 감소시키고, 섬유증을 감소시킨다. 이들 중합체를 사용하여 세포 캡슐화를 위한 고분자전해질 복합체 캡슐을 형성할 수 있다. 본 발명은 또한 미생물방지 코팅, DNA 또는 siRNA 전달, 및 줄기 세포 조직 조작과 같은 다수의 다른 생물학적 적용분야를 가질 수 있다. 미국 특허 공개 제20130302401호의 교시는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있다.

[0393] 다른 구현예에서, 지질 나노입자(LNP)가 고려된다. 특히, 지질 나노입자에서 캡슐화되고, 인간으로 전달되는 항트랜스티레틴(antitransthyretin) 짧은 간섭 RNA(예를 들어, 문헌[Coelho et al., N Engl J Med 2013;369:819-29] 참조) 및 그러한 시스템은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적합하게 되고, 적용될 수 있다. 정맥내로 투여된 체중 kg 당 약 0.01 내지 약 1 mg의 용량이 고려된다. 주입 관련 반응의 위험을 감소시키기 위한 의약이 고려되며, 예컨대 텍사메타손, 아세탐피노펜, 디펜하이드라민 또는 세티리진 및 라니티딘이 고려된다. 5회 용량에 대한 4주마다 킬로그램 당 약 0.3 mg의 다회 용량이 또한 고려된다.

[0394] LNP는 siRNA를 간에 전달함에 있어 고도로 효과적인 것으로 나타났으며(예를 들어, 문헌[Taberner et al., Cancer Discovery, April 2013, Vol. 3, No. 4, pages 363-470] 참조), 이에 따라 CRISPR Cas를 인코딩하는 RNA를 간으로 전달하기 위해 고려된다. 2주마다 6 mg/kg의 LNP의 약 4회 용량의 투여량이 고려될 수 있다. Taberner 등은 0.7 mg/kg으로 투여한 LNP의 처음 2 사이클 후에 종양 억제를 관찰하였고, 6 사이클의 마지막까지 환자는 림프절 전이의 완전한 억제 및 간 종양의 실질적 수축으로 부분적 반응을 달성하였음을 입증하였다. 관해가 남아 있는 이러한 환자에서 40회 용량 후에 완전한 반응을 수득하였고, 26개월에 걸쳐 용량을 제공한 후에 치료를 완료하였다. VEGF 경로 저해제를 이용한 사전 치료요법 후에 진행된 신장, 폐 및 림프절을 포함하는 RCC 및 간외영역 질병을 지니는 2명의 환자는 대략 8 내지 12개월 동안 모든 부위에서 안정한 질병을 가졌고, PNET 및 간 전이를 지니는 환자는 안정한 질병과 함께 18개월(36회 용량) 동안 연장 연구를 계속되었다.

[0395] 그러나, LNP의 전하를 고려하여야 한다. 양이온성 지질은 세포내 전달을 용이하게 하는 비이중층 구조를 유발하기 위해 음으로 하전된 지질과 조합되기 때문이다. 하전된 LNP는 정맥내 주사 후 순환으로부터 빠르게 제거되기 때문에, 7 미만의 pKa 값을 지니는 이온화 가능한 양이온성 지질을 개발하였다(예를 들어, 문헌[Rosin et al,

Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011] 참조). 음으로 하전된 중합체, 예컨대 RNA는 이온화 가능한 지질이 양전하를 나타내는 경우 낮은 pH 값(예를 들어, pH 4)에서 LNP에 로딩될 수 있다. 그러나, 생리적 pH 값에서, LNP는 더 긴 순환 시간과 양립가능한 낮은 표면 전하를 나타낸다. 이온화 가능한 양이온성 지질의 4개 종, 즉, 1,2-디리네오일-3-디메틸암모늄-프로판(DLinDAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레일옥시-케토-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLinKDMA), 및 1,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLinKC2-DMA)에 중점을 두었다. 이들 지질을 함유하는 LNP siRNA 시스템은 생체내 간세포에서 현저하게 상이한 유전자 침묵화 특성을 나타내는 것으로 나타났고, 효능은 인자 VII 유전자 침묵화 모델을 사용하는 시리즈 DLinKC2-DMA>DLinKDMA>DLinDMA>>DLinDAP에 따라 다르다(예를 들어, 문헌 [Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011] 참조). 특히 DLinKC2-DMA를 함유하는 제형에 대하여, 1 µg/ml의 투여량의 LNP 또는 LNP 중의 또는 그와 회합된 CRISPR Cas RNA가 고려될 수 있다.

[0396] LNP의 제조 및 CRISPR Cas 캡슐화가 사용될 수 있고/있거나 문헌[Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011]으로부터 적합하게 될 수 있다. 양이온성 지질 1,2-디리네오일-3-디메틸암모늄-프로판(DLinDAP), 1,2-디리놀레일옥시-3-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레일옥시케토-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLinK-DMA), 1,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLinKC2-DMA), (3-o-[2-(메톡시폴리에틸렌글리콜 2000) 숙시노일]-1,2-디미리스토일-sn-글리콜(PEG-S-DMG) 및 R-3-[(ω-메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)2000) 카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민(PEG-C-DOMG)은 테크미라 파마슈티컬즈(Tekmira Pharmaceuticals)(캐나다 밴쿠버에 소재)에 의해 제공될 수 있거나 합성될 수 있다. 콜레스테롤은 시그마(Sigma)(미국 미주리주 세인트루이스 소재)로부터 구입할 수 있다. 특정 CRISPR Cas RNA는 DLinDAP, DLinDMA, DLinK-DMA 및 DLinKC2-DMA(40:10:40:10 몰비의 양이온성 지질:DSPC:CHOL: PEGS-DMG 또는 PEG-C-DOMG)를 함유하는 LNP 내에 캡슐화될 수 있다. 필요하다면, 0.2% SP-DiOC18(캐나다 벌링턴 소재의 인비트로젠(Invitrogen))을 혼입시켜 세포 흡수, 세포내 전달 및 생체분포를 평가할 수 있다. 캡슐화는 10 mmol/l의 최종 지질 농도로 양이온성 지질:DSPC:콜레스테롤:PEG-c-DOMG(40:10:40:10 몰비)로 이루어진 지질 혼합물을 에탄올 중에 용해함으로써 수행될 수 있다. 이러한 지질의 에탄올 용액을 50 mmol/l 시트르산염, pH 4.0에 적가하여 다중 라멜라 소낭을 형성하여 30% 에탄올 vol/vol의 최종 농도를 생성할 수 있다. 압출기(캐나다 밴쿠버 소재의 노던 리피즈(Northern Lipids))를 사용하여 2개의 적층 80 nm 뉴클레오포어(Nuclepore) 폴리카르보네이트 필터를 통해 다중 라멜라 소낭을 압출한 후 거대 라멜라 소낭이 형성될 수 있다. 30% 에탄올 vol/vol을 함유하는 50 mmol/l 시트르산염, pH 4.0 중에 2 mg/ml로 용해시킨 RNA를 압출된 사전형성된 거대 단일 라멜라 소낭에 적가하고, 0.06/1 wt/wt의 최종 RNA/지질 중량비로 일정하게 혼합하면서 30분 동안 31에서 인큐베이션함으로써 캡슐화를 달성할 수 있다. Spectra/Por 2 재생 셀룰로스 투석막을 사용하여 16시간 동안 인산염 완충 식염수(PBS), pH 7.4에 대해 투석함으로써 에탄올의 제거 및 제형 완충제의 중화를 수행하였다. NICOMP 370 입도 분석기, 소낭/강도 모드, 및 가우시안(Gaussian) 피팅(미국 캘리포니아주 산타 바바라 소재의 니컴프 파티클 사이징(Nicom Particle Sizing))을 사용하여 동적 광 산란에 의해 나노입자 크기 분포를 결정할 수 있다. 3개 모두의 LNP 시스템에 대한 입자 크기는 직경이 약 70 nm일 수 있다. VivaPureD MiniH 컬럼(사르토리우스 스테덤 바이오테크(Sartorius Stedim Biotech))을 사용하여 투석 전 및 후에 수집한 시료로부터 유리 RNA를 제거함으로써 RNA 캡슐화 효율을 결정할 수 있다. 캡슐화된 RNA는 용리된 나노입자로부터 추출되고, 260 nm에서 정량화될 수 있다. RNA 대 지질 비는 와코 케미컬즈 유에스에이(Wako Chemicals USA)(미국 버지니아주 리치몬드 소재)로부터의 콜레스테롤 E 효소 검정을 사용하여 소낭 내 콜레스테롤 함량의 측정에 의해 결정될 수 있다. LNP 및 PEG 지질의 본원의 논의와 함께, PEG화 리포솜 또는 LNP는 마찬가지로 CRISPR-Cas 시스템 또는 그의 성분의 전달에 적합하다.

[0397] 거대 LNP의 제조는 문헌[Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011]으로부터 사용될 수 있고/있거나 이에 적합하게 될 수 있다. 지질 예비혼합 용액(20.4 mg/ml 총 지질 농도)은 50:10:38.5 몰비로 DLinKC2-DMA, DSPC 및 콜레스테롤을 함유하는 에탄올 중에서 제조될 수 있다. 아세트산나트륨은 0.75:1의 몰비(아세트산나트륨:DLinKC2-DMA)로 지질 예비혼합물에 첨가될 수 있다. 지질은 격렬한 교반과 함께 1.85 부피의 시트르산염 완충제(10 mmol/l, pH 3.0)와 혼합물을 혼합함으로써 이후에 수화되어, 35% 에탄올을 함유하는 수성 완충제 중의 자발적 리포솜 형성을 초래할 수 있다. 리포솜 용액을 37에서 인큐베이션시켜 시간-의존적 입자 크기의 증가를 가능하게 할 수 있다. 분취물을 인큐베이션 동안 다양한 시간에 제거하여, 동적 광 산란에 의해 리포솜 크기의 변화를 조사할 수 있다(제타사이저 나노(Zetasizer Nano) ZS, 영국 우스터셔 소재의 몰번 인스트루먼트즈(Malvern Instruments)). 일단 요망되는 입자 크기가 달성되면, 수성 PEG 지질 용액(원액 = 35%(vol/vol) 에탄올 중의 10 mg/ml PEG-DMG)을 리포솜 혼합물에 첨가하여 3.5%의 총 지질의 최종 PEG 몰

농도를 제공할 수 있다. PEG-지질의 첨가 시, 리포좀을 추가 성장을 효과적으로 쉼시켜 그들의 크기를 해야 한다. 이어서, RNA를 대략 1:10(wt:wt)의 RNA 대 총 지질 비로 빈 리포좀에 첨가한 후에 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시켜 로딩된 LNP를 형성할 수 있다. 혼합물을 후속적으로 PBS 중에 밤새 투석시키고, 0.45- μ m 주사기 필터로 여과할 수 있다.

[0398] 구체 핵산(Spherical Nucleic Acid: SNA™) 작제물 및 다른 나노입자(특히 금 나노입자)는 또한 의도된 표적에 CRISPR/Cas 시스템을 전달하기 위한 수단으로서 고려된다. 유의한 데이터는 핵산 작용화된 금 나노입자에 기반한 아우라센스 테라퓨틱스(AuraSense Therapeutics)의 구체 핵산(SNA™) 작제물이 유용한 것을 보여준다.

[0399] 본원의 교시와 함께 사용될 수 있는 문헌은 문헌[Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 2011 133:9254-9257], 문헌[Hao et al., Small. 2011 7:3158-3162], 문헌[Zhang et al., ACS Nano. 2011 5:6962-6970], 문헌[Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 2012 134:1376-1391], 문헌[Young et al., Nano Lett. 2012 12:3867-71], 문헌[Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012 109:11975-80], 문헌[Mirkin, Nanomedicine 2012 7:635-638], 문헌[Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 2012 134:16488-1691], 문헌[Weintraub, Nature 2013 495:S14-S16], 문헌[Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013 110(19):7625-7630], 문헌[Jensen et al., Sci. Transl. Med. 5, 209ra152 (2013)] 및 문헌[Mirkin, et al., Small, 10:186-192]을 포함한다.

[0400] RNA를 지니는 자가 어셈블링 나노입자는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 원위 단부에 부착된 Arg-Gly-Asp(RGD) 펩티드 리간드로 PEG화된 폴리에틸렌아민(PEI)을 이용하여 작제될 수 있다. 이러한 시스템은 예를 들어, 인테그린을 발현하는 종양 신생혈관을 표적화하고, 혈관 내피 성장 인자 수용체-2(VEGF R2) 발현을 억제하는 siRNA를 전달하여, 그에 의해, 종양 혈관형성을 달성하기 위한 수단으로 사용된다(예를 들어, 문헌[Schiffelers et al., Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 19] 참조). 나노플렉스(nanoplex)를 동일한 부피의 양이온성 중합체 및 핵산의 수용액을 혼합함으로써 제조하여 2 내지 6의 범위에 걸쳐 인산염(핵산)에 대한 순 물 과량의 이온화 가능한 질소(중합체)를 제공할 수 있다. 양이온성 중합체와 핵산 간의 정전기적 상호작용은 약 100 nm의 평균 입자 크기 분포를 갖는 폴리플렉스(polyplex)의 형성을 야기하며, 따라서 본원에서 나노플렉스로서 지칭된다. Schiffelers 등의 자가 어셈블링 나노입자에서의 전달을 위해 약 100 내지 200 mg의 CRISPR Cas의 투여량이 예상된다.

[0401] Bartlett 등(문헌[PNAS, September 25, 2007, vol. 104, no. 39])의 나노플렉스는 또한 본 발명에 적용될 수 있다. Bartlett 등의 나노플렉스는 동일 부피의 양이온성 중합체 및 핵산의 수용액을 혼합함으로써 제조되어 2 내지 6의 범위에 걸쳐 인산염(핵산)에 대한 순 물 과량의 이온화 가능한 질소(중합체)를 제공한다. 양이온성 중합체와 핵산 간의 정전기적 상호작용은 약 100 nm의 평균 입자 크기 분포를 지니는 폴리플렉스의 형성을 초래하였고, 따라서 본원에서 나노플렉스로서 지칭된다. Bartlett 등의 DOTA-siRNA를 다음과 같이 합성하였다: 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노(N-하이드록시숙신이미드 에스테르)(DOTA-NHS 에스테르)는 매크로사이클릭스(Macrocyclics)(미국 텍사스주 달라스 소재)로부터 주문하였다. 탄산염 완충제(pH 9) 중의 100배 물 과량의 DOTA-NHS-에스테르에 의한 아민 변형 RNA 센스 가닥을 마이크로원심분리 튜브에 첨가하였다. 내용물을 실온에서 4시간 동안 교반시킴으로써 반응시켰다. DOTA-RNA센스 킨주게이트를 에탄올 침전시키고, 수 중에 재현탁화하고, 미변형 안티센스 가닥에 어닐링시켜 DOTA-siRNA를 수득하였다. 모든 액체를 Chelex-100(미국 캘리포니아주 허큘러스 소재의 바이오-라드(Bio-Rad))으로 전처리하여 미량의 금속 오염물질을 제거하였다. Tf-표적화 및 비표적화 siRNA 나노입자를 사이클로텍스트린 함유 다가양이온을 사용함으로써 형성할 수 있다. 전형적으로, 나노입자를 전하비 3(+/-) 및 siRNA 농도 0.5 g/리터에서 수 중에서 형성하였다. 표적화된 나노입자의 표면상의 아다만탄-PEG 분자의 1%를 Tf로 변형시켰다(아다만탄-PEG-Tf). 나노입자를 주사용 5%(wt/vol) 글루코스 담체 용액 중에서 현탁화시켰다.

[0402] Davis 등(문헌[Nature, Vol 464, 15 April 2010])은 표적화된 나노입자 전달 시스템(임상 시험 등록 번호 NCT00689065)을 사용하는 RNA 임상 시험을 수행한다. 표준 치료 치료요법에 난치성인 고형암을 지니는 환자에게 30분 정맥내 주입에 의해 21일 사이클 중 제1일, 제3일, 제8일 및 제10일에 표적화된 나노입자의 용량을 투여한다. 나노입자는 하기를 함유하는 합성 전달 시스템으로 이루어진다: (1) 선형, 사이클로텍스트린 기반 중합체(CDP), (2) 암 세포의 표면상의 TF 수용체(TFR)에 맞물리는 나노입자 외부에 나타나는 인간 트랜스페린 단백질(TF) 표적화 리간드, (3) 친수성 중합체(생물학적 유체 중에서 나노입자 안정성을 촉진하기 위해 사용되는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)), 및 (4) RRM2의 발현을 감소시키도록 설계된 siRNA(임상에서 사용한 서열은 앞서 정의한 siR2B+5였음). TFR는 악성 세포에서 상향조절되는 것으로 알려져 있고, RRM2는 확립된 항암 표적이다. 이들 나노입자(CALAA-01로서 정의된 임상 형태)는 비인간 영장류에서의 다회 투여 연구에서 잘 용인되는 것으로 나타났다. 만성 골수성 백혈병을 지니는 단일 환자에게 리포좀 전달에 의해 siRNA가 투여되었지만, Davis 등의 임상

시험은 표적화된 전달 시스템을 이용하여 siRNA를 전신으로 전달하기 위한 그리고 고휘암을 지니는 환자를 치료하기 위한 초기 인간 시험이다. 표적화된 전달 시스템이 인간 종양으로의 작용성 siRNA의 효과적인 전달을 제공할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, Davis 등은 3개의 상이한 투여 코호트로부터의 3명 환자로부터의 생검을 조사하였고; 환자 A, B 및 C는 모두 전이성 흑색종을 가졌고, 각각 18, 24 및 30 mg m⁻² siRNA의 CALAA-01 용량을 받았다. 유사한 용량은 또한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템을 위해 고려될 수 있다. 본 발명의 전달은 선형, 사이클로텍스트린 기반 중합체(CDP), 암세포의 표면상의 TF 수용체(TFR)에 맞물리는 나노입자 외부에 나타나는 인간 트랜스페린 단백질(TF) 표적화 리간드 및/또는 친수성 중합체(예를 들어, 생물학적 유체 중에서 나노입자 안정성을 촉진하기 위해 사용되는 폴리에틸렌 글리콜(PEG))를 함유하는 나노입자에 의해 달성될 수 있다.

[0403] 본 발명과 관련하여, 하나 이상의 입자 또는 나노입자 또는 지질 외피를 이용하여 CRISPR 복합체의 하나 이상의 성분, 예를 들어, CRISPR 효소 또는 mRNA 또는 가이드 RNA 또는 sgRNA 또는 현재 HDR 주형이 전달될 수 있는 것이 바람직하다. 다른 전달 시스템 또는 벡터가 본 발명의 나노입자 양태와 함께 이용될 수 있다.

[0404] 일반적으로, "나노입자"는 1000 nm 미만의 직경을 갖는 임의의 입자를 나타낸다. 특정한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 500 nm 이하의 가장 큰 치수(예를 들어, 직경)를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 25 nm 내지 200 nm 범위의 가장 큰 치수를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 100 nm 이하의 가장 큰 치수를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자는 35 nm 내지 60 nm 범위의 가장 큰 치수를 갖는다.

[0405] 본 발명에 포함된 나노입자는 상이한 형태, 예를 들어, 고체 나노입자(예를 들어, 금속, 예를 들어, 은, 금, 철, 티타늄), 비-금속, 지질-기반 고체, 중합체), 나노입자의 현탁액, 또는 이들의 조합물로 제공될 수 있다. 금속, 유전체, 및 반도체 나노입자뿐만 아니라 하이브리드 구조(예를 들어, 코어-셸 나노입자)가 제조될 수 있다. 반도체 물질로 제조된 나노입자는 또한 이들이 전자 에너지 수준의 양자화가 발생하기에 충분히 작은(통상적으로, 10 nm 이하) 경우 양자점으로 표지될 수 있다. 이러한 나노규모 입자는 약물 담체 또는 영상화 작용제로서 생물의학 응용에서 사용되며, 본 발명에서 유사한 목적을 위해 적합하게 될 수 있다.

[0406] 반고체 및 연성 나노입자가 제조되었고, 이들은 본 발명의 범위 내이다. 반고체 성질의 프로토타입 나노입자는 리포솜이다. 다양한 유형의 리포솜 나노입자가 항암 약물 및 백신을 위한 전달 시스템으로서 현재 임상적으로 사용된다. 절반이 친수성이고, 나머지 절반이 소수성인 나노입자는 야누스(Janus) 입자로 명명되며, 에멀전을 안정화시키는데 특히 효과적이다. 이들은 물/오일 계면에서 자가-어셈블되며, 고체 계면활성제로 작용할 수 있다.

[0407] 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제8,709,843호는 조직, 세포, 및 세포내 구획으로의 치료제 함유 입자의 표적화된 전달을 위한 약물 전달 시스템을 제공한다. 상기 발명은 계면활성제, 친수성 중합체 또는 지질에 컨쥬게이트된 중합체를 포함하는 표적화된 입자를 제공한다. 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제6,007,845호는 다작용성 화합물과 하나 이상의 소수성 중합체 및 하나 이상의 친수성 중합체를 공유적으로 연결시킴으로써 형성된 멀티블록 공중합체의 코어를 갖고, 생물학적으로 활성인 물질을 함유하는 입자를 제공한다. 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,855,913호는 폐기관계로의 약물 전달을 위해 표면에 계면활성제가 혼입된, 0.4 g/cm³ 미만의 탭 밀도(tap density)와 함께 5 μm 내지 30 μm의 평균 직경을 갖는 공기역학적으로 가벼운 입자를 갖는 미립자 조성물을 제공한다. 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,985,309호는 폐기관계로의 전달을 위한 계면활성제 및/또는 양으로 또는 음으로 하전된 치료제 또는 진단제 및 반대 전하로 하전된 분자의 친수성 또는 소수성 복합체가 혼입된 입자를 제공한다. 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,543,158호는 표면에 폴리(알킬렌 글리콜) 모이어티 및 생물학적 활성 물질을 함유하는 생분해성 고체 코어를 갖는 생분해성 주사가능한 나노입자를 제공한다. 참조로서 본원에 포함되는 W02012135025호(US20120251560호로 또한 공개됨)에는 컨쥬게이트된 폴리에틸렌이민(PEI) 중합체 및 컨쥬게이트된 아자-마크로사이클(집합적으로, "컨쥬게이션된 리포머" 또는 "리포머"로 언급됨)이 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 예를 들어, 컨쥬게이트된 리포머와 같은, 여기서 인용된 본 문헌의 그러한 방법 및 물질이 단백질 발현의 변형을 포함하여 유전자 발현을 변형시키기 위한 시험관내, 생체의 및 생체내 계층 변동을 달성하기 위해 CRISPR-Cas 시스템의 상황에서 이용될 수 있음이 계획될 수 있다.

[0408] 일 구현예에서, 나노입자는 에폭시드-변형된 지질-중합체, 유리하게는 7C1일 수 있다(예를 들어, 문헌[James E. Dahlman and Carmen Barnes et al. Nature Nanotechnology (2014) published online 11 May 2014, doi:10.1038/nano.2014.84] 참조). C71을 14:1의 몰비로 C15 에폭시드-말단 지질과 PEI600을 반응시킴으로써 합성하였고, 적어도 40일 동안 PBS 용액에서 안정적인 나노입자(35 내지 60 nm의 직경)를 생성시키기 위해

C14PEG2000과 함께 제형화하였다. 폐, 심혈관 또는 신장 세포로 본 발명의 CRISPR-Cas 시스템을 전달하기 위해 에폭시드-변형된 지질-중합체가 이용될 수 있으나, 해당 분야의 숙련자는 다른 표적 기관으로 전달하기 위해 시스템을 적합하게 할 수 있다. 약 0.05 내지 약 0.6 mg/kg 범위의 투여량이 계획된다. 약 2 mg/kg의 전체 투여량의 수일 또는 수주에 걸친 투여량이 또한 계획된다.

[0409] 엑소좀

[0410] 엑소좀은 뇌 및 다른 표적 기관에 RNA를 전달할 수 있는, 단백질 및 RNA를 전달하는 내인성 나노-소낭이다. 면역원성을 감소시키기 위해, Alvarez-Erviti 등(문헌[2011, Nat Biotechnol 29: 341])은 엑소좀 생성을 위해 자가 유래 수상돌기 세포를 사용하였다. 뉴런 특이적 RVG 펩티드에 융합된 엑소좀 막 단백질인 Lamp2b를 발현하도록 수상돌기 세포를 조작함으로써 뇌로의 표적화를 달성하였다. 정제된 엑소좀에 전기천공법에 의해 외인성 RNA를 로딩하였다. 정맥내로 주사한 RVG-표적화 엑소좀을 뇌 내의 뉴런, 미세아교세포, 회소돌기신경교에 GAPDH siRNA를 특이적으로 전달하여, 특이적 유전자 낙다운을 초래하였다. RVG 엑소좀에 대한 사전 노출은 낙다운을 약화시키지 않았고, 다른 조직에서의 비특이적 흡수는 관찰되지 않았다. 엑소좀 매개 siRNA 전달의 치료 잠재력은 알츠하이머 질환에서의 치료 표적인 BACE1의 강력한 mRNA(60%) 및 단백질(62%) 낙다운에 의해 입증되었다.

[0411] 면역학적으로 비활성인 엑소좀의 풀을 얻기 위해, Alvarez-Erviti 등은 상동성 주조직적합성 복합체(MHC) 단상형을 지니는 근친교배 C57BL/6 마우스로부터 골수를 수집하였다. 미성숙 수상돌기 세포가 MHC-II 및 CD86과 같은 T-세포 활성화제가 없는 다량의 엑소좀을 생성하기 때문에, Alvarez-Erviti 등은 7일 동안 과립구/대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 지니는 수상돌기 세포에 대해 선택하였다. 잘 확립된 초원심분리 프로토콜을 사용하여 다음날 배양 상청액으로부터 엑소좀을 정제하였다. 생성된 엑소좀은 물리적으로 균질하였고, 크기 분포는 나노입자 트래킹 분석(NTA) 및 전자 현미경에 의해 결정하여 직경 80 nm에서 최고였다. Alvarez-Erviti 등은 106개 세포당 6 내지 12 μ g의 엑소좀(단백질 농도를 기준으로 측정)을 얻었다.

[0412] 다음에, Alvarez-Erviti 등은 나노규모 적용에 적합한 전기천공법 프로토콜을 사용하여 외인성 카고로의 변형된 엑소좀의 로딩 가능성을 조사하였다. 나노미터 규모에서 막 입자에 대한 전기천공법은 제대로 특성화되지 않기 때문에, 비특이적 Cy5-표지 RNA를 전기천공법 프로토콜의 경험적 최적화를 위해 사용하였다. 캡슐화된 RNA의 양을 엑소좀의 초원심분리 및 용해 후에 분석하였다. 400 V 및 125 μ F에서의 전기천공법은 RNA의 가장 큰 보유를 초래하였고, 모든 후속 실험에 대해 사용하였다.

[0413] Alvarez-Erviti 등은 150 μ g의 RVG 엑소좀 중에 캡슐화된 150 μ g의 각각의 BACE1 siRNA를 정상 C57BL/6 마우스에게 투여하고, 낙다운 효율을 4개의 대조군(미처리 마우스, RVG 엑소좀만을 주사한 마우스, 생체내 양이온성 리포좀 시약에 복합체화된 BACE1 siRNA를 주사한 마우스 및 RVG-9R, siRNA에 정전기적으로 결합된 9개의 D-아르기닌에 컨주게이트된 RVG 펩티드에 복합체화된 BACE1 siRNA를 주사한 마우스)에 대하여 비교하였다. 투여 3일 후 피질 조직 시료를 분석하였고, siRNA-RVG-9R-처리 마우스와 siRNARVG 엑소좀 처리 마우스 둘 다에서 BACE1 mRNA 수준의 상당한 감소(66% [+ 또는 -] 15%, $P < 0.001$ 및 61% [+ 또는 -] 13% 각각, $P < 0.01$)로부터 초래되는 상당한 단백질 낙다운(45%, $P < 0.05$, 대 62%, $P < 0.01$)을 관찰하였다. 게다가, 본 발명자들은 RVG-엑소좀 처리 동물에서 알츠하이머 병증에서의 아밀로이드 플라크의 주요 구성인 총 [베타]-아밀로이드 1 내지 42 수준에서 상당한 감소(55%, $P < 0.05$)를 입증하였다. 관찰한 감소는 BACE1 저해제의 정맥내 주사 후 정상 마우스에서 입증된 β -아밀로이드 1 내지 40 감소보다 더 컸다. Alvarez-Erviti 등은 BACE1 절단 산물에 대해 cDNA 말단의 5'-신속한 증폭(RACE)을 수행하였는데, 이는 siRNA에 의한 RNAi-매개 낙다운의 증거를 제공하였다.

[0414] 최종적으로, Alvarez-Erviti 등은 IL-6, IP-10, TNF α 및 IFN- α 혈청 농도를 평가함으로써 RNA-RVG 엑소좀이 생체내 면역 반응을 유발하였는지 여부를 조사하였다. 엑소좀 처리 후에, 모든 사이토카인에서의 중요하지 않은 변화가 IL-6 분비를 잠재적으로 자극한 siRNA-RVG-9R과 대조적으로 siRNA-트랜스펙션 시약 처리와 유사하게 등록되었는데, 이는 엑소좀 처리의 면역학적 비활성 프로파일을 확인시켜준다. 엑소좀이 단지 20%의 siRNA를 캡슐화하는 것을 고려해 볼 때, RVG-엑소좀에 의한 전달은 비슷한 mRNA 낙다운으로서 RVG-9R 전달보다 더 효율적인 것으로 나타나며, 대응하는 면역 자극 수준 없이, 더 큰 단백질 낙다운이 5배 더 적은 siRNA에 의해 달성되었다. 이 실험은 신경변성 질병과 관련된 유전자의 장기간 침묵화에 잠재적으로 적합한 RVG-엑소좀 기법의 치료 잠재력을 입증하였다. Alvarez-Erviti 등의 엑소좀 전달 시스템은 치료 표적, 특히 신경변성 질병에 본 발명의 CRISPR-Cas 시스템을 전달하기 위해 적용될 수 있다. 약 100 내지 1000 mg의 RVG 엑소좀에서 캡슐화된 약 100 내지 1000 mg의 CRISPR Cas의 투여량은 본 발명을 위해 고려될 수 있다.

[0415] El-Andaloussi 등(문헌[Nature Protocols 7,2112-2126(2012)])은 배양 세포로부터 유래된 엑소좀이 시험관내 및 생체내 RNA의 전달을 위해 이용될 수 있는 방법을 개시한다. 이 프로토콜은 펩티드 리간드와 융합된 엑소좀

단백질을 포함하는 발현 벡터의 트랜스펙션을 통한 표적화된 엑소좀의 생성을 처음으로 기재한다. 다음에, E1-Andaloussi 등은 트랜스펙션 세포 상층액으로부터 엑소좀을 정제하고 특성화하는 방법을 설명한다. 다음에, E1-Andaloussi 등은 RNA를 엑소좀에 로딩하기 위한 결정적인 단계를 상술한다. 최종적으로, E1-Andaloussi 등은 마우스 뇌에서 시험관내 및 생체내 RNA를 효율적으로 전달하기 위해 엑소좀을 사용하는 방법을 약술한다. 엑소좀-매개 RNA 전달이 작용성 분석 및 영상에 의해 평가되는 예상된 결과의 예가 또한 제공된다. 전체 프로토콜은 약 3주가 걸린다. 본 발명에 따른 전달 또는 투여는 자가 유래 수상돌기 세포로부터 생성된 엑소좀을 사용하여 수행될 수 있다. 본원의 교시로부터, 이것은 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다.

[0416] 다른 구현예에서, Wahlgren 등(문헌[Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 17 e130])의 혈장 엑소좀이 고려된다. 엑소좀은 수상돌기 세포(DC), B 세포, T 세포, 비만 세포, 상피 세포 및 종양 세포를 포함하는 다수의 세포 유형에 의해 생성된 나노 크기 소낭(30 내지 90 nm 크기)이다. 이들 소낭은 후기 엔도솜의 안쪽으로 향하는 출아에 의해 형성되며, 이어서 혈장막과 융합시 세포외 환경으로 방출된다. 엑소좀은 천연적으로 세포 간에 RNA를 운반하기 때문에, 이 특성은 유전자 치료요법에 유용할 수 있으며, 이러한 개시내용으로부터, 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다.

[0417] 혈장으로부터의 엑소좀은 20분 동안 900 g에서 버피 코트의 원심분리로 혈장을 단리시킨 다음에 세포 상층액을 수집하고 10분 동안 300 g에서 그리고 30분 동안 16 500 g에서 원심분리하여 세포를 제거한 후 0.22 mm 필터를 통해 여과시킴으로써 제조될 수 있다. 엑소좀을 120 000 g에서 70분 동안 초원심분리에 의해 펠렛화시킨다. siRNA의 엑소좀 내로의 화학적 트랜스펙션을 RNAi 인간/마우스 스타터 키트(Human/Mouse Starter Kit)(독일 힐덴 소재의 퀴아젠(QuiaGen))에서 제조업자의 지침서에 따라 수행한다. siRNA를 2 mmol/ml의 최종 농도로 100 ml PBS에 첨가한다. HiPerFect 트랜스펙션 시약을 첨가한 후에, 혼합물을 실온에서 10분 동안 인큐베이션시킨다. 과량의 미셀을 제거하기 위해, 알데하이드/설페이트 라텍스 비드를 사용하여 엑소좀을 재단리시킨다. 엑소좀 내로의 CRISPR Cas의 화학적 트랜스펙션은 siRNA와 유사하게 수행될 수 있다. 엑소좀은 건강한 공여자의 말초혈액으로부터 단리된 림프구 및 단핵구와 동시배양될 수 있다. 따라서, CRISPR Cas를 함유하는 엑소좀은 인간의 단핵구 및 림프구에 도입될 수도 있고 인간에게 자가 조직으로 재도입될 수도 있는 것이 고려될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 전달 또는 투여는 혈장 엑소좀을 사용하여 수행될 수 있다.

[0418] 리포솜

[0419] 본 발명에 따른 전달 또는 투여는 리포솜에 의해 수행될 수 있다. 리포솜은 내부 수성 구획을 둘러싸는 단일 또는 이중 라멜라 지질 이중층 및 상대적으로 불투과성인 외층 친지성 인지질 이중층으로 구성된 구체 소낭 구조이다. 리포솜은 그들이 생체적합성, 비독성이기 때문에 약물 전달 담체로서 상당한 관심을 얻었고, 친수성과 친지성 약물 분자를 둘 다 전달할 수 있으며, 혈장 효소에 의한 분해로부터 그들의 카고를 보호하고, 생물학적 막 및 혈액 뇌 장벽(BBB)을 가로질러 그들의 로드를 전달할 수 있다(예를 들어, 검토를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조). 리포솜은 몇몇 상이한 유형의 지질로부터 만들어질 수 있지만; 약물 담체로서 리포솜을 생성하는데 인지질이 가장 통상적으로 사용된다. 지질 필름이 수용액과 혼합될 때 리포솜 형성은 자발적이지만, 또한 균질화기, 초음파처리기 또는 압출 장치를 사용하는 것에 의한 진탕 형태로 힘을 적용함으로써 더 신속히 처리될 수 있다(예를 들어, 검토를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).

[0420] 그들의 구조 및 특성을 변형시키기 위해 몇몇 다른 첨가제가 리포솜에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 콜레스테롤 또는 스펅고미엘린을 리포솜 혼합물에 첨가하여 리포솜 구조를 안정화시키는 데 도움을 주고 리포솜 내부 카고의 누출을 방지할 수 있다. 추가로, 리포솜을 수산화된 난(egg) 포스파티딜콜린 또는 난 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 디세틸 포스페이트로부터 제조하고, 그들의 평균 소낭 크기를 약 50 및 100 nm로 조절하였다. (예를 들어, 검토를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조). 리포솜 제형은 주로 천연 인지질 및 지질, 예컨대 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스파티딜 콜린(DSPC), 스펅고미엘린, 난 포스파티딜콜린 및 모노시알로강글리오사이드로 구성될 수 있다. 이 제형은 인지질만으로 구성되기 때문에, 리포솜 제형은 다수의 난제와 마주치는데, 그 중 하나는 혈장 내 불안정성이다. 특이적으로 지질막의 조작에서 이들 난제를 극복하기 위한 몇몇 시도가 이루어졌다. 이들 시도 중 하나는 콜레스테롤의 조작에 집중되어 있다. 통상의 제형으로의 콜레스테롤의 첨가는 캡슐화된 생활성 화합물의 혈장 내로의 신속한 방출을 감소시키거나 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)은 안정성을 증가시킨다(예를 들어, 검토를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug

Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).

- [0421] 특히 유리한 구현예에서, 트로이 목마 리포솜(또한 분자 트로이 목마로 알려져 있음)이 바람직하며, 프로토콜은 <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/4/pdb.prot5407.long>에서 찾을 수 있다. 이들 입자는 혈관내 주사 후 전체 뇌로의 트랜스유전자의 전달을 가능하게 한다. 제한에 의해 구속되지 않고, 표면에 컨주게이트된 특이적 항체를 지니는 중성 지질 입자는 내포작용을 통해 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 것으로 여겨진다. 본 발명자들은 혈관내 주사를 통해 뇌에 뉴클레아제의 CRISPR 과를 전달하기 위해 트로이 목마 리포솜을 이용하는 것을 가정하는데, 이는 배아 조작에 대한 필요 없이 전체 뇌 트랜스제닉 동물을 가능하게 할 것이다. 약 1 내지 5 g의 DNA 또는 RNA가 리포솜 내 생체내 투여를 위해 고려될 수 있다.
- [0422] 다른 구현예에서, CRISPR Cas 시스템 또는 이들의 성분은 안정한 핵산 지질 입자(SNALP)와 같은 리포솜에서 투여될 수 있다(예를 들어, 문헌[Morrissey et al., Nature Biotechnology, Vol. 23, No. 8, August 2005] 참조). SNALP에서 표적화된 특이적 CRISPR Cas의 약 1, 3 또는 5 mg/kg/일의 매일의 정맥내 주사가 고려된다. 매일의 치료는 약 3일에 걸쳐 이루어질 수 있고, 이어서 약 5주 동안 주마다 이루어질 수 있다. 다른 구현예에서, 약 1 또는 2.5 mg/kg의 용량에서 정맥내 주사에 의해 투여되는 특정 CRISPR Cas 캡슐화된 SNALP가 또한 고려된다(예를 들어, 문헌[Zimmerman et al., Nature Letters, Vol. 441, 4 May 2006] 참조). SNALP 제형은 지질 3-N-[(w-메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 2000) 카바모일]-1,2-디미리스틸옥시-프로필아민(PEG-C-DMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC) 및 콜레스테롤을 2:40:10:48 몰 백분율 비로 함유할 수 있다(예를 들어, 문헌[Zimmerman et al., Nature Letters, Vol. 441, 4 May 2006] 참조).
- [0423] 다른 구현예에서, 안정한 핵산 지질 입자(SNALP)는 고도로 혈관화된 HepG2-유래 간 종양에 대해 효과적인 전달 분자인 것으로 입증되었지만, 불량하게 혈관화된 HCT-116 유래 간 종양에 대해서는 그렇지 않다(예를 들어, 문헌[Li, Gene Therapy (2012) 19, 775-780] 참조). SNALP 리포솜은 25:1의 지질/siRNA 비 및 48/40/10/2 몰비의 콜레스테롤/D-Lin-DMA/DSPC/PEG-C-DMA를 사용하여 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 및 siRNA로 D-Lin-DMA 및 PEG-C-DMA를 제형화함으로써 제조될 수 있다. 얻어진 SNALP 리포솜은 크기가 약 80 내지 100 nm이다. 또 다른 구현예에서, SNALP는 합성 콜레스테롤(미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 디팔미토일포스파티딜콜린(미국 앨라배마주 앨러베스터 소재의 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids)), 3-N-[(w-메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)2000)카바모일]-1,2-디미레스틸옥시프로필아민, 및 양이온성 1,2-디리놀레일옥시-3-N,N디메틸아미노프로판(예를 들어, 문헌[Geisbert et al., Lancet 2010; 375: 1896-905] 참조)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 용량당 약 2 mg/kg의 총 CRISPR Cas의 투여량이 고려될 수 있다. 또 다른 구현예에서, SNALP는 합성 콜레스테롤(시그마-알드리치), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC; 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드), PEG-cDMA, 및 1,2-디리놀레일옥시-3-(N;N-디메틸)아미노프로판(DLinDMA)(예를 들어, 문헌[Judge, J. Clin. Invest. 119:661-673 (2009)] 참조)을 포함할 수 있다. 생체내 연구를 위해 사용되는 제형은 약 9:1의 최종 지질/RNA 질량비를 포함할 수 있다.
- [0424] RNAi 나노의학의 안전성 프로파일은 알닐람 파마슈티컬즈(Alnylam Pharmaceuticals)의 Barros 및 Gollob에 의해 검토되었다(예를 들어, 문헌[Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 1730-1737] 참조). 안정한 핵산 지질 입자(SNALP)는 4가지 상이한 지질 - 낮은 pH에서 양이온성인 이온화 가능한 지질(DLinDMA), 중성 헬퍼 지질, 콜레스테롤 및 확산성 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지질로 구성된다. 입자는 직경이 대략 80 nm이고, 생리학적 pH에서 중성 전하이다. 제형화 동안, 이온화 가능한 지질은 입자 형성 동안 음이온성 RNA와 지질을 축합하는 작용을 한다. 점점 더 산성인 엔도솜 조건하에 양으로 하전될 때, 이온화 가능한 지질은 또한 RNA의 세포질 내로의 방출을 가능하게 하는 엔도솜 막과 SNALP의 융합을 매개한다. PEG-지질은 입자를 안정화시키고, 제형화 동안 응집을 감소시키며, 후속적으로 외부의 중성 친수성을 제공하며, 이는 약동학적 특성을 개선시킨다.
- [0425] 지금까지, RNA가 있는 SNALP 제형을 사용하여 2가지 임상 프로그램을 개시하였다. 테크미라 파마슈티컬즈는 최근에 상승된 LDL 콜레스테롤을 지니는 성인 지원자에서 SNALP-ApoB의 I상 단일 용량 연구를 완료하였다. ApoB는 간 및 공장에서 대부분 발현되며, VLDL 및 LDL의 어셈블리 및 분비에 필수적이다. 17명의 대상체에 단일 용량의 SNALP-ApoB를 제공하였다(7가지 용량 수준에 걸친 용량 상승). 간 독성의 증거는 없었다(전임상 연구에 기반한 잠재적 용량 제한 독성으로서 예상). 가장 높은 용량에서 (둘 중) 한 명의 대상체는 면역계 자극과 일치되는 감기-유사 증상을 경험하였고, 시험을 끝내는 결정을 하였다.
- [0426] 알닐람 파마슈티컬즈는 상기 기재한 SNALP 기법을 사용하고, TTR 아밀로이드증(ATTR)을 치료하기 위해 돌연변이

체와 야생형 TTR 둘 다의 간세포 생성을 표적화하는 유사하게 진보된 ALN-TTR01을 갖는다. 3가지 ATTR 증후군이 기재되었다: 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP) 및 가족성 아밀로이드성 심근증(FAC) - 둘 다 TTR에서의 상염색체 우성 돌연변이에 의해 야기됨; 및 야생형 TTR에 의해 야기되는 노인 전신성 아밀로이드증(SSA). ALN-TTR01의 위약 조절, 단일 용량 상승 I상 시험을 ATTR을 지니는 환자에서 최근에 완료하였다. ALN-TTR01을 0.01 내지 1.0 mg/kg(siRNA 기준)의 용량 범위 내에서 31명의 환자(연구 약물에 의한 23명 및 위약에 의한 8명)에 대한 15분 IV 주입으로서 투여하였다. 간 기능 시험에서 유의미한 증가 없이 치료는 잘 용인되었다. 주입 관련 반응은 0.4 mg/kg 이상에서 23명의 환자 중 3명에서 언급되었고; 모두 주입 속도의 늦춤에 반응하였으며, 모두 연구를 계속하였다. 1 mg/kg의 가장 높은 용량에서 2명의 환자에서 혈청 사이토카인 IL-6, IP-10 및 IL-1ra의 최소 및 일시적 상승이 언급되었다(전임상 및 NHP 연구로부터 예상되는 바와 같음). 혈청 TTR의 저하, ALN-TTR01의 예상된 약동학적 효과가 1 mg/kg에서 관찰되었다.

[0427] 또 다른 구현예에서, SNALP는 양이온성 지질, DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 예를 들어, 각각 40:10:40:10의 몰비로, 예를 들어, 에탄올 중에 용해시킴으로써 제조될 수 있다(문헌[Semple et al., Nature Nanotechnology, Volume 28 Number 2 February 2010, pp. 172-177] 참조). 지질 혼합물을 혼합하면서, 각각 30%(vol/vol) 및 6.1 mg/ml의 최종 에탄올 및 지질 농도로 수성 완충제(50 mM 시트르산염, pH 4)에 첨가하고, 2분 동안 22에서 평형화되게 한 후 압출시켰다. 수화된 지질을 동적 광 산란 분석에 의해 결정된 바와 같은 70 내지 90 nm의 소낭 직경이 수득될 때까지 리팩스 압출기(Lipex Extruder)(노던 리피즈(Northern Lipids))를 사용하여 22에서 2층 80 nm 기공 크기 필터(뉴클레오포어(Nuclepore))를 통해 압출하였다. 이는 일반적으로 1 내지 3회의 통과를 필요로 하였다. siRNA(30% 에탄올을 함유하는 50 mM 시트르산염, pH 4 수용액 중에 용해)를 혼합하면서 약 5 ml/분의 속도로 사전 평형화된(35) 소낭에 첨가하였다. 0.06(wt/wt)의 최종 표적 siRNA/지질 비에 도달한 후, 혼합물을 35에서 추가 30분 동안 인큐베이션시켜 소낭 재조직화 및 siRNA의 캡슐화를 가능하게 하였다. 이어서, 에탄올을 제거하고, 투석 또는 접선 유동 정용여과에 의해 외부 완충제를 PBS로 대체하였다(155 mM NaCl, 3 mM Na2HPO4, 1 mM KH2PO4, pH 7.5). siRNA를 조절된 계단식 회석 방법 과정을 사용하여 SNALP에서 캡슐화하였다. KC2-SNALP의 지질 성분은 57.1:7.1:34.3:1.4의 몰비로 사용한 DLin-KC2-DMA(양이온성 지질), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC; 아반티 폴라 리피즈), 합성 콜레스테롤(시그마) 및 PEG-C-DMA였다. 로딩된 입자의 형성시에, SNALP를 PBS에 대해 투석하였고, 사용 전 0.2 μm 필터를 통해 멸균 여과시켰다. 평균 입자 크기는 75 내지 85 nm였고, siRNA의 90 내지 95%는 지질 입자 내에서 캡슐화되었다. 생체내 시험을 위해 사용한 제형 내 최종 siRNA/지질 비는 약 0.15(wt/wt)였다. 인자 VII siRNA를 함유하는 LNP-siRNA 시스템을 사용 직전에 멸균 PBS 중에서 적절한 농도로 회석시켰고, 제형을 총 10 ml/kg의 부피로 옆 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 투여하였다. 이러한 방법 및 이들 전달 시스템은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 대해 추론될 수 있다.

[0428] 기타 지질

[0429] 기타 양이온성 지질, 예컨대 아미노 지질 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA)은 예를 들어, siRNA와 유사한 CRISPR Cas 시스템 또는 그의 성분 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)를 캡슐화하기 위해 이용될 수 있으며(예를 들어, 문헌[Jayaraman, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 8529 - 8533] 참조), 이런 이유로, 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 다음의 지질 조성물이 있는 사전 형성된 소낭이 고려될 수 있다: 대략 0.05(w/w)의 FVII siRNA/총 지질 비 및 각각 40/10/40/10의 몰비의 아미노 지질, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤 및 (R)-2,3-비스(옥타데실옥시) 프로필-1-(메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)2000)프로필카바메이트(PEG-지질). 70 내지 90 nm의 범위의 좁은 입자 크기 분포 및 낮은 다분산지수 0.11±0.04(n=56)를 보장하기 위해, 입자를 CRISPR Cas RNA를 첨가하기 전에 80 nm 막을 통해 3회까지 압출시킬 수 있다. 매우 강력한 아미노 지질 16을 함유하는 입자가 사용될 수 있으며, 여기서, 4가지 지질 성분, 16, DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-지질의 몰비(50/10/38.5/1.5)는 생체내 활성을 증진시키도록 추가로 최적화될 수 있다.

[0430] Michael S D Kormann 등(문헌["Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice: Nature Biotechnology, Volume:29, Pages: 154-157 (2011)])은 RNA를 전달하기 위한 지질 외피의 사용을 기재한다. 지질 외피의 사용은 또한 본 발명에서 바람직하다.

[0431] 다른 구현예에서, 지질은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템과 함께 제형화되어 지질 나노입자(LNP)를 형성할 수 있다. 지질은 DLin-KC2-DMA4, C12-200 및 공지질 디스테로일포스파티딜 콜린, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 자발적 소낭 형성 절차를 사용하여 siRNA 대신 CRISPR Cas를 이용하여 제형화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Novobrantseva, Molecular Therapy-Nucleic Acids (2012) 1, e4; doi:10.1038/mtna.2011.3] 참조). 성분 몰비는 약 50/10/38.5/1.5(DLin-KC2-DMA 또는 C12-200/디스테로일포스파티딜 콜린/콜레스테롤/PEG-DMG)일 수 있다. 최종 지질:siRNA 중량비는 DLin-KC2-DMA 및 C12-200 지질 나노입

자(LNP)의 경우에 각각 약 12:1 및 9:1일 수 있다. 제형은 90% 초과 포획 효율을 지니는 약 80 nm의 평균 입자 직경을 가질 수 있다. 3 mg/kg 용량이 고려될 수 있다.

[0432] 테크미라는 LNP 및 LNP 제형의 다양한 양태와 관련된 미국 및 해외에서의 대략 95개의 특허 패밀리의 포트폴리오를 가지며(예를 들어, 미국 특허 제7,982,027호; 제7,799,565호; 제8,058,069호; 제8,283,333호; 제7,901,708호; 제7,745,651호; 제7,803,397호; 제8,101,741호; 제8,188,263호; 제7,915,399호; 제8,236,943호 및 제7,838,658호 및 유럽 특허 제1766035호; 제1519714호; 제1781593호 및 제1664316호 참조), 이들 모두는 본 발명에 대해 사용되고/사용되거나 적합하게 될 수 있다.

[0433] CRISPR Cas 시스템 또는 그의 성분 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)는 단백질, 단백질 전구체, 또는 단백질 또는 단백질 전구체의 부분적으로 또는 완전히 가공된 형태를 인코딩할 수 있는 변형된 핵산 분자를 포함하는 조성물의 제형의 양태에 관한 미국 출원 공개 제20130252281호 및 제20130245107호 및 제20130244279호(모데르나 테라퓨틱스(Moderna Therapeutics) 출원)에서 추가로 기재된 것과 같은 PLGA 미소구체에서 캡슐화되어 전달될 수 있다. 제형은 폴비 50:10:38.5:1.5-3.0(양이온성 지질:융합생성 지질:콜레스테롤:PEG 지질)을 가질 수 있다. PEG 지질은 PEG-c-DMG, PEG-DMG로부터 선택될 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 융합생성 지질은 DSPC 일 수 있다. 또한, Schrum 등의 미국 출원 공개 제20120251618호(Delivery and Formulation of Engineered Nucleic Acids)를 참조한다.

[0434] 나노머 기술은 저분자량 소수성 약물, 펩티드 및 핵산 기반 치료제(플라스미드, siRNA, miRNA)를 포함하는 광범위한 치료제에 대한 생체이용성 난제를 다룬다. 기술이 명확한 이점을 입증한 특정 투여 경로는 경구 경로, 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 전달, 고형 종양으로의 전달뿐만 아니라 눈으로의 전달을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Mazza et al., 2013, ACS Nano. 2013 Feb 26;7(2):1016-26]; 문헌[Uchegbu and Siew, 2013, J Pharm Sci. 102(2):305-10] 및 문헌[Lalatsa et al., 2012, J Control Release. 2012 Jul 20;161(2):523-36]을 참조한다.

[0435] 미국 특허 공개 제20050019923호는 생활성 분자, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 펩티드 및 폴리펩티드 및/또는 약제학적 작용제를 포유류 신체에 전달하기 위한 양이온성 덴드리머를 기재한다. 덴드리머는, 예를 들어 간, 비장, 폐, 신장 또는 심장(또는 심지어 뇌)으로의 생활성 분자의 전달을 표적화하는데 적합하다. 덴드리머는 단순한 분지형 단량체 단위로부터 단계적 방식으로 제조된 합성 3-차원 거대분자이며, 그의 특성 및 작용성은 용이하게 조절되고 달라질 수 있다. 덴드리머는 다작용성 코어에 대한(합성에 대한 확산적 접근), 또는 다작용성 코어를 향한(합성에 대한 수렴적 접근) 빌딩 블록의 반복된 부가로부터 합성되고, 빌딩 블록의 3차원 셀의 각각의 첨가는 덴드리머의 더 고차 세대의 형성을 야기한다. 폴리프로필렌이민 덴드리머는 디아미노부탄 코어로부터 출발하며, 이것에 일차 아민으로의 아크릴로니트릴의 이중 마이클 첨가(Michael addition)에 의해 아미노기 수의 2배가 부가된 후, 니트릴이 수소화된다. 이는 아미노기의 배가를 초래한다. 폴리프로필렌이민 덴드리머는 100% 양성자화 가능한 질소 및 최대 64개의 말단 아미노기를 함유한다(5세대, DAB 64). 양성자화 가능한 기는 보통 중성 pH에서 양성자를 수용할 수 있는 아민기이다. 유전자 전달체로서 덴드리머의 용도는 컨쥬게이팅 단위로서 각각 아민/아미드 또는 N-P(O)S의 혼합물과 함께 폴리아미도아민 및 인 함유 화합물의 용도에 크게 집중되어 있는데 유전자 전달을 위한 더 낮은 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머의 용도에 대해 보고한 연구는 없었다. 폴리프로필렌이민 덴드리머는 또한 주위 아미노기에 의해 화학적으로 변형될 때 약물 전달을 위해 그리고 게스트 분자의 캡슐화를 위해 pH 감수성 조절 방출 시스템으로서 연구되었다. 세포독성 및 DNA와 폴리프로필렌이민 덴드리머의 상호작용뿐만 아니라 DAB 64의 트랜스펙션 효능이 또한 연구되었다.

[0436] 미국 특허 공개 제20050019923호는 이전의 보고와 상반되게 양이온성 덴드리머, 예컨대 폴리프로필렌이민 덴드리머가 유전물질과 같은 생활성 분자의 표적화된 전달에서 사용하기 위한 적합한 특성, 예컨대 특이적 표적화 및 낮은 독성을 나타낸다는 관찰에 기반한다. 추가로, 양이온성 덴드리머의 유도체는 또한 생활성 분자의 표적화된 전달을 위한 적합한 특성을 나타낸다. 또한, 미국 출원 공개 제20080267903호의 생활성 중합체를 참조하며, 이는 "양이온성 폴리아민 중합체 및 덴드리머 중합체를 포함하는 다양한 중합체가 항증식 활성을 갖는 것으로 나타나며, 따라서 신생물 및 종양과 같은 바람직하지 않은 세포 증식을 특징으로 하는 장애, 염증 장애(자가면역 장애를 포함), 건선 및 아테롬성 동맥경화증의 치료에 유용할 수 있음을 개시한다. 중합체는 단독으로 활성제로서 또는 다른 치료제, 예를 들어, 약물 분자 또는 유전자 전달을 위한 핵산을 위한 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 이러한 경우에, 중합체 자체의 고유 항종양 활성은 전달될 작용제의 활성을 보완할 수 있다". 이들 특허 간행물의 개시내용은 CRISPR Cas 시스템(들) 또는 그의 성분(들) 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)의 전달을 위한 본 발명의 교시와 함께 사용될 수 있다.

[0437] 초하전(Supercharged) 단백질

- [0438] 초하전 단백질은 대단히 높은 양 또는 음의 이론적 순전하를 지니는 조작된 또는 천연적으로 발생하는 단백질의 부류이며, CRISPR Cas 시스템(들) 또는 그의 성분(들) 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)의 전달에 사용될 수 있다. 초음성으로 하전된 단백질과 초양성으로 하전된 단백질은 둘 다 열적으로 또는 화학적으로 유도된 응집을 견디는 현저한 능력을 나타낸다. 초양성으로 하전된 단백질은 또한 포유류 세포를 침투할 수 있다. 카고와 이들 단백질, 예를 들어, 플라스미드 DNA, RNA 또는 다른 단백질의 회합은 시험관내와 생체내 둘 다에서 포유류 세포 내로 이들 거대분자의 작용성 전달을 가능하게 할 수 있다. David Liu 연구소는 2007년에 초하전 단백질의 생성 및 특성화를 보고하였다(문헌[Lawrence et al., 2007, Journal of the American Chemical Society 129, 10110-10112]).
- [0439] 포유류 세포 내로의 RNA 및 플라스미드 DNA의 비바이러스 전달은 연구와 치료 응용 둘 다에 대해 가치있다(문헌[Akinc et al., 2010, Nat. Biotech. 26, 561-569]). 정제된 +36 GFP 단백질(또는 다른 초양성으로 하전된 단백질)은 적절한 무혈청 배지에서 RNA와 혼합되고, 세포에 첨가 전 복합체화되게 한다. 이 단계에서 혈청의 포함은 초하전 단백질-RNA 복합체의 형성을 저해하고, 치료 효능을 감소시킨다. 다음의 프로토콜은 다양한 세포주에 대해 효과적이 되는 것으로 관찰되었다(문헌[McNaughton et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 6111-6116]). 그러나, 단백질 및 RNA의 용량을 변화시키는 파일럿 실험은 특정 세포주에 대하여 절차를 최적화하도록 수행되어야 한다.
- [0440] (1) 치료 하루 전, 48-웰 플레이트에서 웰당 1 x 10⁵개 세포를 플레이팅.
- [0441] (2) 치료일에, 최종 농도 200 nM로 무혈청 배지에서 정제된 +36 GFP 단백질을 희석시킴. RNA를 50 nM의 최종 농도로 첨가함. 와류시켜 혼합하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션시킴.
- [0442] (3) 인큐베이션 동안, 세포로부터 배지를 흡입하고, PBS로 1회 세척함.
- [0443] (4) +36 GFP 및 RNA의 인큐베이션 후에, 단백질-RNA 복합체를 세포에 첨가함.
- [0444] (5) 37에서 4시간 동안 복합체와 세포를 인큐베이션시킴.
- [0445] (6) 인큐베이션 후에, 배지를 흡입하고, 20 U/ml 헤파린 PBS로 3회 세척. 활성에 대한 검정에 따라 추가 48시간 또는 그 이상 동안 혈청-함유 배지와 세포를 인큐베이션시킴.
- [0446] (7) 세포를 면역블롯, qPCR, 표현형 분석 또는 다른 적절한 방법에 의해 분석함.
- [0447] David Liu 연구소는 다양한 세포에서 +36 GFP가 효과적인 플라스미드 전달 시약인 것으로 추가로 발견하였다. 플라스미드 DNA는 siRNA보다 더 큰 카고이기 때문에, 비례하여 더 많은 +36 GFP 단백질이 효과적으로 플라스미드와 복합체화하는데 필요로 한다. 효과적인 플라스미드 전달을 위해, 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스 혈구 응집소 단백질로부터 유래된 공지된 엔도솜 파괴 펩티드인 C-말단의 HA2 펩티드 태그를 보유하는 +36 GFP의 변이체를 개발하였다. 다음의 프로토콜은 다양한 세포에서 효과적이었지만, 상기와 같이 플라스미드 DNA 및 초하전 단백질 용량이 특정 세포주 및 전달 응용분야를 위해 최적화되는 것이 권고된다.
- [0448] (1) 치료 하루 전, 48-웰 플레이트에서 1 x 10⁵개/웰을 플레이팅.
- [0449] (2) 치료일에, 최종 농도 2 mM로 무혈청 배지에서 정제된 +36 GFP 단백질을 희석시킴. 1 mg의 플라스미드 DNA를 첨가. 와류시켜 혼합하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션시킴.
- [0450] (3) 인큐베이션 동안, 세포로부터 배지를 흡입하고, PBS로 1회 세척함.
- [0451] (4) +36 GFP 및 플라스미드 DNA의 인큐베이션 후에, 단백질-DNA 복합체를 세포에 온건하게 첨가함.
- [0452] (5) 37에서 4시간 동안 복합체와 세포를 인큐베이션시킴.
- [0453] (6) 인큐베이션 후에, 배지를 흡입하고, PBS로 세척. 혈청-함유 배지에서 세포를 인큐베이션시키고 추가 24 내지 48시간 동안 인큐베이션시킴.
- [0454] (7) 적절하다면 (예를 들어, 플라스미드-유도 유전자 발현에 의해) 플라스미드 전달을 분석함.
- [0455] 또한, 예를 들어, 문헌[McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 6111-6116 (2009)]; 문헌[Cronican et al., ACS Chemical Biology 5, 747-752 (2010)]; 문헌[Cronican et al., Chemistry & Biology 18, 833-838 (2011)]; 문헌[Thompson et al., Methods in Enzymology 503, 293-319 (2012)]; 문헌[Thompson, D.B., et al., Chemistry & Biology 19 (7), 831-843 (2012)]을 참조한다. 초하전된 단백질의 방법은 본 발명

의 CRISPR Cas 시스템의 전달을 위해 사용되고/거나 그를 위해 적합하게 될 수 있다. Lui 박사 및 본원의 교사와 함께 본원의 문헌의 이들 시스템은 CRISPR Cas 시스템(들) 또는 그의 성분(들) 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)의 전달에 사용될 수 있다.

[0456] 세포 투과성 펩티드 (CPPs)

[0457] 또 다른 구현예에서, 세포 투과성 펩티드(CPP)가 CRISPR Cas 시스템의 전달을 위해 고려된다. CPP는 다양한 분자 카고(나노크기 입자로부터 작은 화학 분자 및 DNA의 큰 단편까지)의 세포 흡수를 용이하게 하는 짧은 펩티드이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "카고"는 치료제, 진단 프로브, 펩티드, 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 플라스미드, 단백질, 나노입자, 리포좀, 발색단, 소분자 및 방사성 물질로 이루어진 군을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 양태에서, 카고는 또한 CRISPR Cas 시스템의 임의의 성분 또는 전체 작용성 CRISPR Cas 시스템을 포함할 수 있다. 본 발명의 양태는 하기를 포함하는, 원하는 카고를 대상체로 전달하는 방법을 제공한다: (a) 본 발명의 세포 투과성 펩티드 및 원하는 카고를 포함하는 복합체를 제조하고, (b) 대상체에게 복합체를 경구, 관절내, 복강내, 척추강내, 동맥내, 비강내, 뇌실내, 피하내, 근육내, 정맥내, 피부, 직장내, 또는 국소투여한다. 카고는 공유 결합을 통한 화학적 결합 또는 비-공유 상호작용을 통해 펩티드와 결합된다.

[0458] CPP의 기능은 카고를 세포로 전달하는 것이며, 살아있는 포유류 세포의 엔도솜으로 전달된 카고의 엔도시토시스를 통해 일반적으로 발생하는 공정이다. 세포-침투성 펩티드는 상이한 크기, 아미노산 서열, 및 전하이지만 모든 CPP가, 혈장 막을 전위시키고 세포질 또는 세포소기관으로 다양한 분자 카고의 전달을 용이하게 하는 능력인 하나의 별개 특성을 갖는다. CPP 전위는 3개의 주요 엔트리 메커니즘으로 분류될 수 있다: 막에서의 직접 투과, 엔도시토시스-매개 엔트리, 및 일시적 구조의 형성을 통한 전위. CPP는 암을 포함하는 상이한 질병의 치료에서 약물 전달제, 바이러스 저해제뿐만 아니라 세포 표지화를 위한 대조 작용제로서 의학에서의 많은 적용이 발견되었다. 후자의 예는 GFP에 대한 담체, MRI 대조 작용제, 또는 양자점으로서 작용하는 것을 포함한다. CPP는 연구 및 의학에서의 용도에서 실험관내 및 생체내 전달 벡터로서 훌륭한 잠재성을 보유한다. CPP는 통상적으로 리신 또는 아르기닌과 같은 상대적으로 풍부한 양전하 아미노산을 함유하거나 극성/전하 아미노산 및 비극성 소수성 아미노산의 교대 패턴을 함유하는 서열을 갖는 아미노산 조성물을 갖는다. 이들 2가지 유형의 구조는 각각 다가 이온성 또는 양친매성으로서 언급된다. CPP의 세번째 부류는 낮은 네트 전하를 갖는 극성 잔기만을 함유하는 소수성 펩티드이거나, 세포 유입에 결정적인 소수성 아미노산 그룹을 갖는다. 발견된 초기 CPP 중 하나는 배양에서 많은 세포 유형에 의해 배지 주위로부터 효율적으로 취득되어 발견되는 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1)로부터의 트랜스-활성화 전사 활성화제(Tat)였다. 그 이후부터, 많은 공지된 CPP는 상당히 확장되었으며 더 효과적인 단백질 형질도입 특성을 갖는 소분자 합성 유사체가 생산되었다. CPP는 페너트라틴, Tat (48-60), 트랜스포르탄, 및 (R-Ahx-R4) (Ahx=아미노헥사노일)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0459] 미국 특허 제8,372,951호는 높은 세포-투과 효율 및 낮은 독성을 나타내는 호산구 양이온성 단백질(ECP)으로부터 유래된 CPP를 제공한다. 척추동물 대상체로 CPP를 이의 카고와 함께 전달하는 양태가 또한 제공된다. CPP 및 이의 전달의 추가 양태는 미국 특허 제8,575,305호; 제8,614,194호 및 제8,044,019호에 기재되어 있다. CPP는 CRISPR-Cas 시스템 또는 이의 성분을 전달하기 위해 사용될 수 있다. CPP가 CRISPR-Cas 시스템 또는 이의 성분을 전달하기 위해 사용될 수 있는 것은 또한 본원에 참조로서 통합된, Suresh Ramakrishna, Abu-Bonsrah Kwaku Dad, Jagadish Beloor 등의 문헌 "Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA"에서 제공되며(Genome Res. 2014 Apr 2. [Epub ahead of print]), 여기에서 CPP-접합 제조합 Cas9 단백질 및 CPP-복합 가이드 RNA로의 치료가 인간 세포주에서의 내인성 유전자 파괴를 이끌어냄이 입증되었다. 이 문헌에서 Cas9 단백질은 티오에스테르 결합을 통해 CPP에 접합되며, 가이드 RNA는 CPP와 복합되어, 축합된 양전하 나노입자를 형성한다. 변형된 Cas9 및 가이드 RNA와 함께 피부 섬유아세포, HEK293T 세포, HeLa 세포, 및 배아 암종 세포와 같은 배아 줄기 세포를 포함하는 인간 세포의 동시 및 순차적 치료가 플라스미드 트랜스펙션에 비해 감소된 표적의 돌연변이로 효율적인 유전자 파괴를 이끌어냄을 보였다.

[0460] 이식 가능한 장치

[0461] 다른 구현예에서, CRISPR Cas 시스템 또는 그의 성분(들) 또는 그를 코딩하는 핵산 분자(들)의 전달을 위해 이식 가능한 장치가 또한 고려된다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110195123호는 국소적으로 그리고 연장된 기간 동안 약물을 용리하는 이식 가능한 의료 장치를 개시하며, 이러한 장치의 몇가지 유형, 실행의 처리 방식 및 이식 방법을 포함하여 제공된다. 장치는 중합체 기질, 예를 들어 장치 몸체로서 사용되는 매트릭스, 및 약물, 및 일부 경우에 추가적인 스캐폴딩 재료, 예컨대 금속 또는 추가적인 중합체, 및 가시성 및 영상화를 향상시키는 재료를 포함한다. 이식 가능한 전달 장치는 국소적인, 그리고 연장된 기간에 걸친 방출을 제공하는데 유리할

수 있으며, 여기서, 약물은 예를 들어, 종양, 염증, 변성과 같은 병에 걸린 영역의 세포의 매트릭스(ECM)로 직접 방출되고, 증상 목표를 위해, 또는 손상된 평활근 세포에 또는 예방을 위해 방출된다. 한 종류의 약물은 상기 개시된 바와 같은 RNA이며, 이러한 시스템은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 사용될 수 있고/있거나 적합하게 될 수 있다. 일부 구현예에서 이식 방식은 근접 치료요법 및 바늘 생검을 포함하는 다른 치료를 위해 오늘날 개발되고 사용되는 기존의 이식 절차이다. 이러한 경우에, 본 발명에서 기재된 새로운 이식물의 치수는 본래의 이식물과 유사하다. 전형적으로 소수의 장치는 동일한 치료 절차 동안 이식된다.

[0462] 미국 특허 공개 제20110195123호는 복강과 같은 강에 적용 가능한 시스템을 포함하는 약물 전달 이식 가능한 또는 삽입 가능한 시스템 및/또는 임의의 다른 유형의 투여를 제공하며, 여기서, 예를 들어 임의로 매트릭스일 수 있는 생체안정성 및/또는 분해가능한 및/또는 생체흡수성 중합체성 기질을 포함하는 약물 전달 시스템은 고정 또는 부착되지 않는다. 용어 "삽입"은 또한 이식을 포함하는 것으로 언급되어야 한다. 약물 전달 시스템은 바람직하게는 미국 특허 공개 제20110195123호에 기재되어 있는 바와 같은 "로더(Loder)"로서 실행된다.

[0463] 중합체 또는 복수의 중합체는 생체적합성이며, 조절된 속도로 작용제를 방출시킬 수 있는 작용제 및/또는 복수의 작용제를 혼입하며, 중합체성 기질, 예컨대 일부 구현예에서 매트릭스의 총 부피는, 임의로 및 바람직하게는 작용제의 치료 수준이 도달되게 하는 최대 부피 이하이다. 비제한적 예로서, 이러한 부피는 작용제 로드를 위한 부피에 의해 필요한 바와 같은 바람직하게는 0.1 m³ 내지 1000 mm³ 범위 내에 있다. 로더는, 예를 들어 크기가 작용성에 의해 결정되는 장치, 예를 들어 제한 없이, 무릎 관절, 자궁내 또는 자궁경부 링 등과 함께 혼입될 때, 임의로 더 클 수 있다.

[0464] (조성물을 전달하기 위한) 약물 전달 시스템은 바람직하게는 일부 구현예에서 분해성 중합체를 사용하도록 설계되거나(주요 방출 메카니즘은 벌크 침식(bulk erosion)임); 또는 일부 구현예에서, 비분해성 또는 서서히 분해되는 중합체가 사용되며(주요 방출 메카니즘은 벌크 침식보다는 확산임), 따라서 외부는 막으로서 기능하고, 내부는 약물 저장소로서 기능하는데, 이는 연장된 기간(예를 들어 약 1주 내지 약 수개월) 동안 주변에 의해 실제로 영향받지 않는다. 상이한 방출 메카니즘을 지니는 상이한 중합체의 조합이 또한 임의로 사용될 수 있다. 표면에서 농도 기울기는 바람직하게는 총 약물 방출 기간의 상당한 기간 동안 효과적으로 일정하게 유지되고, 따라서 확산 속도는 효과적으로 일정하다("제로 방식" 확산으로 지칭됨). 용어 "일정한"은 더 낮은 치료적 유효성의 역치 초과로 바람직하게 유지되지만, 여전히 임의로 초기 버스트를 특징으로 하고/하거나 변동하는, 예를 들어 특정 정도로 증가 및 감소할 수 있는 확산 속도를 의미한다. 확산 속도는 바람직하게는 연장된 기간 동안 이렇게 유지되며, 치료적으로 효과적인 기간, 예를 들어 효과적인 침묵화 기간을 최적화하기 위해 특정 수준으로 일정한 것으로 고려될 수 있다.

[0465] 약물 전달 시스템은 임의로 및 바람직하게는 성질이 화학물질이든 대상체의 체내의 효소 및 다른 인자로부터의 공격에 기인하든, 분해로부터 뉴클레오티드 기반 치료제를 보호하도록 설계된다.

[0466] 미국 특허 공개 제20110195123호의 약물 전달 시스템은 장치의 이식 시 및/또는 이식 후에, 활성화 및/또는 가속화/감속화의 비침습적 및/또는 최소 침습적 방법에 의해 작동되는 감지 및/또는 활성화 기기와 임의로 연동되며, 예를 들어 임의로 제한되는 것은 아니지만, 열적인 가열 및 냉각, 레이저 빔 및 집속 초음파를 포함하는 초음파 및/또는 RF(무선주파수) 방법 또는 장치를 포함한다.

[0467] 미국 특허 공개 제20110195123호의 일부 구현예에 따르면, 국소 전달을 위한 부위는 임의로 종양을 포함하는 세포의 고도 비정상 증식, 및 억제된 세포자멸사, 자가면역질환 상태를 포함하는 활성화 및 또는 만성 염증 및 감염, 근육 및 신경 조직을 포함하는 변성 조직, 만성 통증, 변성 부위, 및 뼈 골절 위치 및 조직 재생의 향상을 위한 다른 상처 위치, 및 손상된 심근, 평활근 및 횡문근을 특징으로 하는 표적 부위를 포함할 수 있다.

[0468] 조성물의 이식을 위한 부위, 또는 표적 부위는 바람직하게는 표적화된 국소 전달에 충분히 작은 반경, 면적 및/또는 부피를 특징으로 한다. 예를 들어, 표적 부위는 임의로 약 0.1 mm 내지 약 5 cm 범위의 직경을 가진다.

[0469] 표적 부위의 위치는 바람직하게는 최대 치료 효능에 대해 선택된다. 예를 들어, 약물 전달 시스템의 조성물(임의로 상기 기재한 바와 같은 이식을 위한 장치와 함께)은 임의로 및 바람직하게는 종양 환경 또는 이들의 관련된 혈액 공급 내에서 또는 이에 근접하여 이식된다.

[0470] 예를 들어 조성물은 (임의로 장치와 함께) 임의로 체장, 전립선, 유방, 간 내에 또는 그에 근접하여, 니콜을 통해, 혈관계 내 등에 이식된다.

[0471] 표적 위치는 (임의로 체내의 임의의 부위가 로더를 이식하는데 적합할 수 있기 때문에 단지 비제한적 예로서): 1. 기저핵, 백질 및 회백질에서 파킨슨병 또는 알츠하이머병에서와 같은 변성 부위의 뇌; 2. 근위축성 측삭경화

증(ALS)의 경우에서와 같은 척추; 3. HPV 감염을 예방하기 위한 자궁경부; 4. 활성 및 만성 염증 관절; 5. 건선의 경우에서와 같은 진피; 6. 진통 효과를 위한 교감 및 감각 신경 부위; 7. 골내이식; 8. 급성 및 만성 감염 부위; 9. 질내; 10. 내이--청각기관, 내이의 미로, 전정계; 11. 기관내; 12. 심장내; 관상동맥, 심외막; 13. 방광; 14. 담도계; 15. 신장, 간, 비장을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 실질세포; 16. 림프절; 17. 침샘; 18. 치과용 수지; 19. 관절내(관절 내로); 20. 안내; 21. 뇌조직; 22. 뇌실; 23. 복강을 포함하는 강(예를 들어, 제한되는 것은 아니지만, 난소암); 24. 식도내 및 25. 직장내로 이루어진 군으로부터 임의로 선택된다.

[0472] 임의로 시스템의 삽입(예를 들어, 조성물을 함유하는 장치)는 표적 부위의 및 이러한 부위 부근의, 국소 pH 및/또는 온도 및/또는 ECM 내 약물의 확산 및/또는 약물 역학에 영향을 미치는 다른 생물학적 인자에 영향을 미치도록 하는 표적 부위 및 해당 부위 부근에서 ECM에 대한 물질의 주사와 연관된다.

[0473] 임의로, 일부 구현예에 따르면, 상기 작용제의 방출은 삽입 전 및/또는 삽입 시 및/또는 삽입 후, 레이저빔, 조사, 열적 가열 및 냉각, 집속 초음파를 포함하는 초음파 및/또는 RF(무선주파수) 방법 또는 장치 및 화학적 활성화제를 포함하는 활성화 및/또는 가속화/감속화의 비침습적 및/또는 최소 침습적 및/또는 그 밖의 방법에 의해 작동되는 감지 및/또는 활성화 기기와 연관될 수 있었다.

[0474] 미국 특허 공개 제20110195123호의 다른 구현예에 따르면, 약물은 바람직하게는, 예를 들어 이하에 기재되는 바와 같이 유방, 췌장, 뇌, 신장, 방광, 폐 및 전립선에서 국소화된 암 경우를 위한 RNA를 포함한다. RNAi로 예시되지만, 약물이 로더 기질, 예컨대 매트릭스와 함께 캡슐화될 수 있는 한, 다수 약물이 로더에서 캡슐화되어 적용 가능 적용 가능 발명과 함께 사용될 수 있으며, 이러한 시스템이 본 발명의 CRISPR Cas 시스템을 전달하는데 사용되고/거나 그에 적합하게 될 수 있다.

[0475] 구체적 응용의 다른 예로서, 신경 및 근육 변성 질병은 비정상 유전자 발현에 기인하여 발생한다. RNA의 국소 전달은 이러한 비정상 유전자 발현을 방해하는 치료적 특성을 가질 수 있다. 작은 약물 및 거대분자를 포함하는 세포자멸사방지, 염증방지 및 변성방지 약물의 국소 전달은 또한 임의로 치료적일 수 있다. 이러한 경우에, 로더는 일정한 속도로 및/또는 별도로 이식되는 전용 장치를 통해 연장된 방출을 위해 적용된다. 이것 모두는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 사용될 수 있고/있거나 적합하게 될 수 있다.

[0476] 구체적 응용의 또 다른 예로서, 정신과적 및 인지 장애가 유전자 변형자를 이용하여 치료된다. 유전자 낙다운은 치료적 선택사항이다. 중추 신경계 부위에 작용제를 국소적으로 전달하는 로더는 정신병, 양극성 질병, 신경성 장애 및 행동 병폐를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 정신과적 및 인지 장애에 대한 치료적 선택사항이다. 로더는 또한 특정 뇌 부위에 이식시 작은 약물 및 거대분자를 포함하는 약물을 국소적으로 전달할 수 있었다. 이것 모두는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 사용될 수 있고/있거나 적합하게 될 수 있다.

[0477] 구체적 응용의 다른 예로서, 국소 부위에서 선천성 및/또는 적응성 면역 매개체의 침묵화는 기관 이식 거부를 예방할 수 있다. 이식된 기관 및/또는 이식된 부위에 이식된 로더를 사용한 RNA 및 면역조절 시약의 국소 전달은 이식 기관에 대해 활성화된 CD8과 같은 면역 세포를 퇴치함으로써 국소 면역 억제를 제공한다. 이것 모두는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 사용될 수 있고/있거나 적합하게 될 수 있다.

[0478] 구체적 응용의 다른 예로서, VEGF 및 안지오팀닌 등을 포함하는 혈관 성장 인자는 신혈관형성에 필수적이다. 인자, 펩티드, 펩티드모방체의 국소 전달 또는 그들의 억제제의 억제제는 중요한 치료적 양식이며; 억제제의 침묵화 및 로더를 사용한 혈관형성을 자극하는 인자, 펩티드, 거대분자 및 작은 약물의 국소 전달은 말초, 전신 및 심혈관 질병에 대하여 치료적이다.

[0479] 이식과 같은 삽입 방법은 임의로 다른 유형의 조직 이식을 위해 및/또는 삽입을 위해 및/또는 조직 시료추출을 위해 임의로 변형 없이 또는 대안적으로 임의로 이러한 방법에서 주요하지 않은 변형만을 사용하여 이전에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 임의로 근접치료 방법, 생검, 초음파와 함께 및/또는 초음파 없이 내시경, 예컨대 ERCP, 뇌 조직 내로의 정위적 방법, 관절, 복부 기관, 방광벽 및 체강 내로의 복강경의 이식을 포함하는 복강경 검사를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0480] 본원에서 논의된 이식가능한 장치 기술이 본원의 기재에 따라 사용될 수 있으며 이에 따라 본원의 내용 및 당분야의 지식에 의해, CRISPR-Cas 시스템 또는 이의 성분 또는 이의 핵산 분자 또는 성분의 인코딩 또는 제공이 이식가능한 장치를 통해 전달될 수 있다.

[0481] 유체 전달 장치 방법

[0482] 다른 구현예에서, 바늘의 어레이를 갖는 유체 전달 장치(예를 들어, Fred Hutchinson Cancer Research Center

에게 양도된 미국 특허 공개 제20110230839호를 참조하라)는 고체 조직으로 CRISPR Cas의 전달을 위해 고려될 수 있다. 고체 조직으로의 유체의 전달을 위한 미국 특허 공개 제20110230839호의 장치는 어레이 내에 배치된 다수의 바늘; 다수의 바늘의 각각과 소통하는 각 유체의 다수의 저장소; 및 다수의 저장소의 각각과 작동적으로 커플링되고 저장소 내의 유체 압력 조절을 위해 설정된 다수의 액츄에이터를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서 다수의 액츄에이터 각각은 다수의 프린저 중 하나인 다수의 저장소 각각에서 받아지는 다수의 프린저 각각의 제1 말단을 포함할 수 있으며, 특정 추가 구현예에서 다수의 프린저 중의 프린저는 제2 말단 각각과 함께 작동적으로 커플링되어 동시에 누를 수 있다. 특정한 또 다른 구현예는 선별적으로 가변적인 비율로 다수의 프린저 모두를 밀도록 설계된 프린저 드라이버를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서 다수의 액츄에이터 각각은 제1 말단 및 제2 말단을 갖는 다수의 유체 전달 라인 중 하나를 포함할 수 있으며, 다수의 유체 전달 라인 각각의 제1 말단은 다수의 저장소 각각에 커플링된다. 다른 구현예에서 장치는 유체 압력 소스를 포함할 수 있으며, 각각의 다수의 액츄에이터는 아체 압력 소스 및 다수의 저장소 각각 사이에 커플링된 유체를 포함한다. 추가 구현예에서 유체 압력 소스는 적어도 하나의 컴프레서, 진공 어큐뮬레이터, 연동 펌프, 마스터 실린더, 미세유체 펌프 및 밸브를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 각각의 다수의 바늘은 이의 길이에 따라 분포된 다수의 포트를 포함할 수 있다.

[0483] 환자-특이적 스크리닝 방법

[0484] 뉴클레오티드, 예를 들어, 트리뉴클레오티드 반복부를 표적으로 하는 CRISPR-Cas 시스템을 사용하여 그러한 반복부의 존재에 대하여 환자 또는 환자 시료를 스크리닝할 수 있다. 반복부는 CRISPR-Cas 시스템의 RNA의 표적일 수 있으며, CRISPR-Cas 시스템에 의한 그로의 결합이 존재한다면, 결합을 검출하여, 그러한 반복부가 존재하는 것을 나타낼 수 있다. 따라서, CRISPR-Cas 시스템을 사용하여 환자 또는 환자 시료를 반복부의 존재에 대하여 스크리닝할 수 있다. 그 다음, 환자에게 질환을 다루기 위한 적합한 화합물(들)을 투여할 수 있거나; 또는 그에 결합하고 삽입, 결실 또는 돌연변이를 야기하고, 질환을 완화시키는 CRISPR-Cas 시스템을 투여할 수 있다.

[0485] 뼈

[0486] Oakes 및 Lieberman은 뼈로 유전자를 전달하는 것을 논의한다(Clin Orthop Relat Res. 2000 Oct;(379 Suppl):S101-12). 특히 해부학적 부위에서 세포로 유전자를 이송하여, 뼈 전도성(osteoinductive) 특성의 성장 인자가 지속된 기간 동안 생리학적 용량으로 사용되어 좀더 효과적인 치유 반응을 가능하게 한다. 특히 해부학적 부위, 뼈의 질, 및 연조직 외피는 영역성 유전자 치료를 위한 표적 세포의 선별에 영향을 미친다. 뼈 전도성 담체로서 치료 부위로 전달되는 유전자 치료 벡터는 유망한 결과를 산출하였다. 여러 조사관은 동물 모델에서의 생체외 및 생체내 영역성 유전자 치료를 사용하는 흥미로운 결과들을 보였다. 이러한 시스템은 뼈로의 전달을 위한 CRISPR Cas 시스템이 사용될 수 있고 그리고/또는 여기에 적용될 수 있다.

[0487] 표적 결실, 치료적 적용

[0488] 유전자의 표적 결실이 바람직하다. 그러므로, 디미리스토일포스파티딜콜린 생합성, 지방산 생합성, 및 다른 대사 장애에 관련된 유전자, 아밀로이드 및 그외 질병에 관련된 미스-폴딩 단백질을 인코딩하는 유전자, 세포 변형을 이끌어내는 종양유전자, 잠복 바이러스 유전자, 및 다른 질병들 사이에서, 우성-음성 장애를 이끌어내는 유전자가 바람직하다. 본원에서 예시된 바와 같이, 출원인은 바이러스 또는 나노입자 전달 시스템을 사용하여 대사 장애, 아밀로이드증 및 단백질-응집 관련 질병, 유전 돌연변이로부터 발생한 세포 변형 및 전위, 유전자 돌연변이의 우성 음성 효과, 잠복 바이러스 감염 및 다른 관련 증상을 앓고 있는 치료를 필요로 하는 대상체 또는 환자의 눈(안구), 귀(청각), 상피, 조혈, 또는 다른 조직으로 CRISPR-Cas 시스템의 유전자 전달을 선호한다. CRISPR-Cas 시스템의 치료적 적용은 색소성 망막염, 색맹, 황반변성, 녹내장, 등을 포함하는 안구 유전 질병을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 안구 질병의 리스트는 본원에 제공된다(안구 유전자 치료로 명명된 섹션을 참고하라).

[0489] 예로서, HIV-1의 만성 감염이 치료되거나 예방될 수 있다. 이를 성취하기 위해, 최대 커버리지 및 효율에 대한 HIV-1 균주 변이체를 고려하여, 방대한 다수의 HIV-1 계통을 표적화하는 CRISPR-Cas 가이드 RNA를 발생시킬 수 있다. 숙주 면역 시스템의 종래 아데노바이러스 또는 렌티바이러스-매개 감염에 의해 CRISPR-Cas 시스템의 전달을 성취할 수 있다. 접근법에 따라, 숙주 면역 세포는 a) 분리되고, CRISPR-Cas로 형질도입되고, 선별되고 숙주로 재도입되거나 b) CRISPR-Cas 시스템의 전신성 전달에 의해 생체내 형질도입될 수 있다. 제1 접근법은 저항 면역 집단의 발생을 허용하며 제2 접근법은 숙주 내의 잠복 바이러스 저장소를 표적화하는 것이 더 가능할 것이다. 이는 실시예 섹션에 좀 더 자세히 논의된다.

- [0490] 다른 예에서, Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20130171732호는 게놈으로 항-HIV 트랜스 유전자의 삽입에 관한 것으로, CRISPR Cas 시스템으로 적용될 수 있는 방법이다. 다른 구현예에서, CXCR4 유전자는 표적화될 수 있으며 Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20100291048호의 TALE 시스템이 본 발명의 CRISPR Cas 시스템으로 변형될 수 있다. Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20130137104호 및 제20130122591호 및 Collectis로 양도된 미국 특허 공개 제20100146651호의 방법은, 유전자 변형의 빈도를 증가시키기 위해 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 유전자좌를 변형시키는 것에 관련되므로 트랜스유전자 발현에 일반적으로 더 적용 가능할 것이다.
- [0491] 또한 본 발명이 유전자 낙아웃 세포 라이브러리를 만드는 것이 또한 예상된다. 각세포는 낙아웃된 단일 유전자를 가질 수 있다.
- [0492] 각 세포가 낙아웃된 단일 유전자를 갖는 ES 세포의 라이브러리를 만들 수 있으며, ES 세포의 전체 라이브러리는 낙아웃된 모든 단일 유전자를 가질 것이다. 이 라이브러리는 세포 공정뿐만 아니라 질병에서의 유전자 기능을 스크리닝하는데 유용하다. 이 세포 라이브러리를 만들기 위해, ES 세포 내로 유도성 프로모터(예를 들어 독시사이클린 유도성 프로모터)에 의해 구동되는 Cas9을 통합할 수 있다. 게다가, ES 세포에서의 특이 유전자를 표적화하는 단일 가이드 RNA를 통합할 수 있다. ES 세포 라이브러리를 만들기 위해, ES 세포를 인간 게놈에서 각 유전자를 표적화하는 가이드 RNA를 인코딩하는 유전자의 라이브러리와 단순히 혼합할 수 있다. 인간 ES 세포의 AAVS1 유전자좌로 단일 BxB1 attB 부위를 우선 도입할 수 있다. 그런 다음, BxB1 인테그라제를 사용하여 AAVS1 유전자좌 내의 BxB1 attB 부위로 개별 가이드 RNA 유전자의 통합을 촉진할 수 있다. 통합을 촉진하기 위해, 각 가이드 RNA 유전자는 단일 attP 부위를 운반하는 플라스미드 내에 함유될 수 있다. 이 방식 BxB1는 가이드 RNA 함유 플라스미드 상의 attP 부위와 게놈 상의 attB 부위를 재조합할 것이다. 세포 라이브러리를 발생시키기 위해, 통합된 가이드 RNA를 갖고 Cas9 발현을 유도하는 세포의 라이브러리를 가질 수 있다. 유도 후, Cas9는 가이드 RNA에 의해 특이적인 부위에서의 이중 가닥 파손을 매개한다.
- [0493] 단백질 치료제의 만성 투여는 특이 단백질에 대한 허용될 수 없는 면역 반응을 끌어낼 수 있다. 단백질 약물의 면역원성은 소수의 면역우성 헬퍼 T 림프구(HTL) 에피토프에 의한 것일 수 있다. 이들 단백질 내에 포함되는 이들 HTL 에피토프에 대한 MHC 결합 친화성을 감소시키면 낮은 면역원성을 갖는 약물을 발생시킬 수 있다(Tangri S, et al. "Rationally engineered therapeutics protein with reduced immunogenicity" J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3187-96). 본 발명에서, 특허 CRISPR 효소의 면역원성이 에리트로포이에틴에 관한 Tangri 등의 문헌에서 첫번째로 착수한 접근법에 따라 감소되고 뒤이어 발달될 수 있다. 따라서, 직접 진화 또는 합리적 설계가 숙주 종(인간 또는 다른 종)에서의 CRISPR 효소 (예를 들어 Cas9)의 면역원성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0494] 출원인은 예시 구현예에서 관심 3개의 가이드RNA를 사용하여 표적화 생체내 절단을 보였으며 세포의 작은 부분 집합에서만 발생하는 유효한 생체내 DNA 절단을 시각화할 수 있다. (예를 들어, 실시예 1을 참조하라) 특히, 이는 포유류와 같은 고등 생물을 특이 표적화하는 것 또한 달성될 수 있음을 설명한다. 또한 다수의 가이드 서열 (즉 별개 표적)이 동시에(공동-전달의 의미로) 사용될 수 있다는 점에서 다중 양태를 강조한다. 다시 말해서, 출원인은 동시에 그러나 독립적으로 표적화된 여러 상이한 서열을 갖는 다수의 접근법을 사용했다.
- [0495] 혈액
- [0496] 본 발명은 또한 혈액으로 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다.
- [0497] Wahlgren 등의 문헌에서의 혈장 엑소좀이 혈액으로 CRISPR Cas 시스템을 전달하는 데 사용될 수 있다(Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 17 e130). 다른 전달 수단 또는 RNA는 예컨대 나노입자를 통한 것이 바람직하다(Cho, S., Goldberg, M., Son, S., Xu, Q., Yang, F., Mei, Y., Bogatyrev, S., Langer, R. 및 Anderson, D., Lipid-like nanoparticles for small interfering RNA).
- [0498] 본 발명의 CRISPR Cas 시스템은 또한 탈라세미아 및 겸상 적혈구 빈혈과 같은 이상 혈액소증을 치료하기 위해 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 의해 표적화될 수 있는 잠재적인 표적에 대한 국제 출원 공개 번호 WO 2013/126794를 참조하라. 전체에서 착수할 경우 인용하고 있는 문서와 함께 본원에 참조로서 통합된 Drakopoulou의 문헌은 β -글로빈 또는 γ -글로빈에 대한 유전자를 전달하는 렌티바이러스를 사용하여 HSC를 변형시키는 것을 논의한다("Review Article, The Ongoing Challenge of Hematopoietic Stem Cell-based Gene Therapy for β -Thalassemia," Stem Cells International, Volume 2011, Article ID 987980, 10 pages, doi:10.4061/2011/987980). 당 분야의 지식 및 본원에서의 기재에 따라 렌티바이러스를 사용하는 것과 대조적으

로, 숙련자는 (예를 들어, β -글로빈 또는 γ -글로빈, 유리하게는 비-겸상 β -글로빈 또는 γ -글로빈에 대한 코딩 서열을 전달하는 적합한 HDR 주형을 가지고) 돌연변이를 표적화하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 β -탈라세미아에 관해 HSC를 교정할 수 있으며; 특히, sgRNA는 β -탈라세미아를 발생시키는 돌연변이를 표적화할 수 있으며, HDR은 β -글로빈 또는 γ -글로빈의 적절한 발현에 대한 코딩을 제공한다. 이에 관하여 여기에 언급되거나 여기에 관련된 모든 문서와 함께 참조로서 본원에 모두 통합된 하기 문헌에 언급되어 있으며: Cavazzana, "Outcomes of Gene Therapy for β -Thalassemia Major via Transplantation of Autologous Hematopoietic Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral β A-T87Q-Globin Vector." tif2014.org/abstractFiles/Jean%20Antoine%20Ribeil_Abstract.pdf; Cavazzana-Calvo, "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia", *Nature* 467, 318-322 (16 September 2010) doi:10.1038/nature09328; Nienhuis, "Development of Gene Therapy for Thalassemia, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, doi: 10.1101/cshperspect.a011833 (2012), LentiGlobin BB305, a lentiviral vector containing an engineered β -globin gene (β A-T87Q); and Xie et al., "Seamless gene correction of β -thalassaemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyback" *Genome Research* gr.173427.114 (2014) 24: 1526-1533 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); 이는 인간 β -지중해빈혈에 관련된 Cavazzana의 문헌의 대상체 및 Xie의 문헌의 대상체다. 본 발명에서, HDR 주형은 조작된 β -글로빈 유전자 (예를 들어, β A-T87Q), 또는 Xie의 문헌에서와 같은 β -글로빈을 발현하기 위해 HSC를 제공할 수 있다. 겸상 적혈구 빈혈증은 적혈구가 낫-모양이 되는 상염색체 열성 유전 질병이다. 이는 β -글로빈 유전자에서 염색체 11의 단완에 위치하는 단일 염기 치환에 의해 생성한다. 결과로서, 발린은 겸상 헤모글로빈 (HbS)의 생산을 발생시키는 글루탐산 대신 발린이 생산된다. 이는 왜곡된 형태의 적혈구의 형성을 야기한다. 비정상적인 모양에 의해, 작은 혈관이 차단되어, 뼈, 비장 및 피부 조직에 심각한 손상을 발생시킨다. 이는 통증의 에피소드, 빈번한 감염 및 손-발 증후군 또는 심지어는 다수 기관 부전을 이끌어낼 수 있다. 왜곡된 적혈구는 또한 용혈에 더 민감하여, 심각한 빈혈증을 이끌어낸다. β -지중해빈혈의 경우에서와 같이, 겸상 적혈구 빈혈증은 CRISPR/Cas9 시스템으로 HSC를 변형시켜 교정될 수 있다. 시스템은 이의 DNA를 절단한 후 이를 자체 수복하도록 하여 세포의 게놈의 특이 편집을 가능하게 한다. Cas9 단백질은 돌연변이 점으로 RNA 가이드에 의해 삽입되고 유도된 후 이 지점에서 DNA를 절단한다. 동시에, 건강한 버전의 서열이 삽입된다. 이 서열은 세포 자신의 수복 시스템에 의해 사용되어 유도된 절단을 고친다. 이 방식에서, CRISPR/Cas9는 이전에 수득된 줄기 세포에서 돌연변이의 교정을 가능하게 한다. 당 분야의 지식 및 이 내용에서의 기재를 이용하여, 숙련자는 (예를 들어, β -글로빈, 유리하게는 비-겸상 β -글로빈에 대한 코딩 서열을 전달하는 적합한 HDR 주형을 가지고) 돌연변이를 표적화하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 겸상 적혈구 빈혈증에 관한 HSC를 교정할 수 있으며; 특별히, sgRNA는 겸상 세포 빈혈증을 발생시키는 돌연변이를 표적화할 수 있고, HDR은 β -글로빈의 적절한 발현에 대한 코딩을 제공할 수 있다.

[0499] Collectis로 양도된 미국 특허 공개 제20110225664호, 제20110091441호, 제20100229252호, 제20090271881호 및 제20090222937호는 CREI 변이체에 관한 것으로, 여기에서 2개의 I-CreI 단량체 중 적어도 하나는 적어도 2개의 치환을 가지고 있으며, LAGLIDADG 코어 도메인의 2개의 작용성 서브도메인 각각에서의 하나는 I-CreI의 위치 26 내지 40 및 44 내지 77에 각각 위치하며, 상기 변이체는 공동 사이토카인 수용체 감마 사슬 유전자 또는 감마 C 유전자로도 명명된 인간 인터류킨-2 수용체 감마 사슬(IL2RG) 유전자로부터 DNA 표적 서열을 절단할 수 있다. 표적 서열 미국 특허 공개 제20110225664호, 제20110091441호, 제20100229252호, 제20090271881호 및 제20090222937호에서 확인된 표적 서열이 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에서 사용될 수 있다.

[0500] 중증 복합형 면역 부전증(SCID)은 림프구 B에서의 작용성 결함과 항상 관련되는 림프구 T 성숙에서의 결함으로부터 야기한다(Cavazzana-Calvo et al., *Annu. Rev. Med.*, 2005, 56, 585-602; Fischer et al., *Immunol. Rev.*, 2005, 203, 98-109). 전체 발생은 75 000명의 출생 중 1명으로 평가된다. 치료되지 않은 SCID를 갖는 환자는 다수의 기회적 미생물 감염이 걸릴 수 있으며, 일반적으로 1년 이후 생존하지 않는다. SCID는 가족 기증자로부터 동종 이계 조혈 줄기 세포 이수에 의해 치료될 수 있다. 기증자와의 조직적합성은 광범위하게 변할 수 있다. SCID 형태 중 하나인 아데노신 디아미나아제(ADA) 결핍의 경우, 환자는 재조합 아데노신 디아미나아제 효소의 주입에 의해 치료될 수 있다.

[0501] ADA 유전자가 SCID 환자에서 돌연변이 된 것으로 보여진 이후로(Giblett et al., *Lancet*, 1972, 2, 1067-1069), SCID와 관련된 여러 다른 유전자가 확인되었다(Cavazzana-Calvo et al., *Annu. Rev. Med.*, 2005, 56, 585-602; Fischer et al., *Immunol. Rev.*, 2005, 203, 98-109). SCID에 대한 4개의 주요 원인이 있다: (i) SCID의 가장 빈번한 형태인, SCID-X1(X-연관 SCID 또는 X-SCID)은 IL2RG 유전자에서의 돌연변이에 의해 발생하며, 이는 성숙 T 림프구 및 NK 세포의 부재를 야기한다. IL2RG는 적어도 5개 인터류킨 수용체 복합체의 공통 성

분인 감마 C 단백질을 인코딩한다(Noguchi, et al., Cell, 1993, 73, 147-157). 이들 수용체는 JAK3 키나아제를 통해 여러 표적을 활성화시키며(Macchi et al., Nature, 1995, 377, 65-68), 불활성화는 감마 C 불활성화로써 동일한 증후군을 야기한다; (ii) ADA 유전자에서의 돌연변이는 퓨린 대사에서의 결함을 야기하며, 결국 B, T 및 NK 세포의 유사 부재를 야기한다; (iii) V(D)J 재조합은 면역글로불린 및 T 림프구 수용체(TCR)의 성숙에서의 필수 단계이다. 이 공정에 관련된 3개 유전자인 재조합 활성화 유전자 1 및 2(RAG1 및 RAG2) 및 아르테미스(Artemis)에서의 돌연변이는 성숙 T 및 B 림프구의 부재를 야기한다; 및 (iv) 소수의 경우를 나타내고는 있지만 T 세포 특이 신호화에 관련된 CD45와 같은 다른 유전자에서의 돌연변이가 또한 보고되었다(Cavazzana-Calvo et al., Annu. Rev. Med., 2005, 56, 585-602; Fischer et al., Immunol. Rev., 2005, 203, 98-109).

[0502] 이들의 유전 염기가 확인되었을 때 이후로, 다른 SCID 형태가 2가지 주요 이유로 유전자 치료 접근법을 위한 전형적인 예가 되었다(Fischer et al., Immunol. Rev., 2005, 203, 98-109). 생체의 처리가 구상되었다. 조혈 줄기 세포(HSC)는 골수로부터 회수되어, 소수의 세포 분열을 위해 이들의 다분화능 특성을 유지할 수 있다. 그러므로, 이들은 실험관내 처리된 후, 이들이 골수로 재이주하는 환자에게 재주입될 수 있다. 림프구의 성숙이 SCID 환자에서 손상되기 때문에, 교정된 세포가 선별적인 이점을 갖는다. 그러므로, 소수의 교정된 세포는 작용성 면역 시스템을 회복시킬 수 있다. 이 가설은 (i) SCID 환자의 돌연변이의 회귀와 관련된 면역 기능의 부분적 회복(Hirschhorn et al., Nat. Genet., 1996, 13, 290-295; Stephan et al., N. Engl. J. Med., 1996, 335, 1563-1567; Bousso et al., Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 2000, 97, 274-278; Wada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98, 8697-8702; Nishikomori et al., Blood, 2004, 103, 4565-4572), (ii) 조혈 세포내 실험관내 SCID-X1 결핍의 교정(Candotti et al., Blood, 1996, 87, 3097-3102; Cavazzana-Calvo et al., Blood, 1996, Blood, 88, 3901-3909; Taylor et al., Blood, 1996, 87, 3103-3107; Hacein-Bey et al., Blood, 1998, 92, 4090-4097), (iii) 동물 모델에서 생체내 SCID-X1 (Soudais et al., Blood, 2000, 95, 3071-3077; Tsai et al., Blood, 2002, 100, 72-79), JAK-3 (Bunting et al., Nat. Med., 1998, 4, 58-64; Bunting et al., Hum. Gene Ther., 2000, 11, 2353-2364) 및 RAG2 (Yates et al., Blood, 2002, 100, 3942-3949) 결핍의 교정 및 (iv) 유전자 치료 임상 시험의 결과(Cavazzana-Calvo et al., Science, 2000, 288, 669-672; Aiuti et al., Nat. Med., 2002; 8, 423-425; Gaspar et al., Lancet, 2004, 364, 2181-2187)에 의한 다른 시스템에서 입증되었다. 이 내용으로부터, SCID와 관련된 하나 이상의 돌연변이를 표적화하는 CRISPR-Cas9 시스템, 예를 들어 각각 SCID를 일으키고 감마 C 단백질의 교정 발현을 제공하는 *IL2RG*의 돌연변이를 표적화하는 sgRNA(들) 및 HDR 주형(들)을 갖는 CRISPR-Cas9 시스템을 사용할 수 있다.

[0503] 더 칠드런스 메디칼 센터 코퍼레이션(the Children's Medical Center Corporation) 및 더 프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지(the President and Fellows of Harvard College)로 양도된 미국 특허 공개 제 20110182867호는 RNAi 및 항체와 같은 BCL11a 발현 또는 활성의 저해제를 통해 조혈 간세포에서의 태아 헤모글로빈 발현(HbF)을 조절하기 위한 방법 및 용도에 관한 것이다. BCL11a와 같은 미국 특허 공개 제20110182867호에 기재된 표적은 태아 헤모글로빈 발현을 조절하기 위한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 의해 표적화될 수 있다. 또한 추가 BCL11a 표적에 대해 Bauer 등의 문헌(Science 11 October 2013: Vol. 342 no. 6155 pp. 253-257) 및 Xu 등의 문헌(Science 18 November 2011: Vol. 334 no. 6058 pp. 993-996)을 참조하라.

[0504] 귀

[0505] 본 발명은 또한 하나 또는 두 귀로 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다.

[0506] 연구자는 유전자 치료가 현재 난청 치료-즉, 달팽이관 이식을 원조하기 위해 사용될 수 있는지를 조사하였다. 난청은 종종 청각 뉴런으로 신호를 전달할 수 없는 손실되거나 손상된 모세포에 의해 발생된다. 이러한 경우에서, 달팽이관 이식은 신경 세포로 소리에 대한 반응 및 전기 신호 전달을 위해 사용될 수 있다. 그러나 더 적은 성장 인자가 손상된 모세포에 의해 방출되므로 달팽이관으로부터 이들 뉴런이 종종 악화되고 철회된다.

[0507] 미국 특허 출원 제20120328580호는 예를 들어, 주사기, 예를 들어, 단일-용량 주사기를 사용하여 약학적 조성물을 귀(예를 들어, 귀 투여), 예컨대 달팽이관의 관내강(luminae)으로(예를 들어, 중앙계, Sc 정전계(vestibulae), 및 고실계) 주입을 기재한다. 예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 화합물은 고막내 주입(예를 들어, 중이 내로), 및/또는 외이, 중이 및/또는 내이 내로 주입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 인간 귀로 스테로이드 및 항체의 투여를 위해 당 분야에서 관례적으로 사용된다. 주입은 예를 들어, 귀의 내창 또는 달팽이관 캡슐을 통해 실시될 수 있다. 다른 내이 투여 방법이 당 분야에서 공지되었다(예를 들어 Salt and Plontke, Drug Discovery Today, 10:1299-1306, 2005).

[0508] 다른 모드의 투여에서, 약학적 조성물은 카테터 또는 펌프를 통해 원 위치 투여될 수 있다. 카테터 또는

펌프는, 예를 들어, 달팽이관 관내강 또는 귀의 내창 및/또는 결장의 루멘으로 약학적 조성물을 향하게 한다. 본원에서 기재된 하나 이상의 화합물을 귀, 예를 들어 인간 귀로 투여하기 위해 적합한 예시적인 약물 전달 장치 및 방법이 McKenna 등의 문헌(미국 공개 번호 제2006/0030837호) 및 Jacobsen 등의 문헌(미국 특허 제 7,206,639호)에 기재되어 있다. 몇몇 구현예에서, 카테터 또는 펌프는 수술 과정 동안, 예를 들어, 환자의 귀(예를 들어, 외이, 중이, 및/또는 내이)에 위치될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 카테터 또는 펌프는 수술 과정 필요 없이, 예를 들어, 환자의 귀(예를 들어, 외이, 중이, 및/또는 내이)에 위치될 수 있다.

[0509] 대안적으로 또는 더하여, 본원에 기재된 하나 이상의 화합물이 달팽이관 이식 또는 외이에 착용하는 보청기와 같은 기계 장치와의 조합으로 투여될 수 있다. 본 발명과 함께 사용하기에 적합한 예시적인 달팽이관 이식은 Edge 등의 문헌에 의해 설명된다(미국 공개 번호 제2007/0093878호).

[0510] 몇몇 구현예에서, 상기 기재된 투여 모드는 임의의 순서로 조합될 수 있으며 동시에 또는 배치될 수 있다.

[0511] 대안적으로 또는 더하여, 본 발명은 예를 들어, CDER Data Standards Manual, 버전 넘버 004(fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm에서 이용 가능함)에 기재된 바와 같은, 임의의 미 식품의약국(Food and Drug Administration) 승인 방법에 따라 투여될 수 있다.

[0512] 일반적으로, 미국 특허 출원 제20120328580호에 기재된 세포 치료 방법이 실험관내 내이의 성숙 세포 유형(예를 들어, 모세포)에 대해 또는 이를 향해 세포의 완전한 부분적 분화를 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 그런 다음 이러한 방법으로부터 야기된 세포는 이러한 치료가 필요한 환자에게 이식되거나 주입될 수 있다. 적합한 세포 유형을 확인하고 선별하기 위한 방법을 포함하는 이들 방법을 실시하기 위해 요구되는 세포 배양 방법, 선택된 세포의 완전한 또는 부분적 분화를 촉진하는 방법, 완전히 또는 부분적으로 분화된 세포 유형을 확인하기 위한 방법, 및 완전히 또는 부분적으로 분화된 세포를 이식하는 방법이 하기에 기재된다.

[0513] 본 발명에서 사용하기에 적합한 세포는, 본원에 기재된 하나 이상의 화합물과 예를 들어 실험관내 접촉했을 때, 내이의 성숙 세포, 예를 들어, 모세포(예를 들어, 내부 및/또는 외부 모세포) 내로 완전하게 또는 부분적으로 분화될 수 있는 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 모세포로 분화될 수 있는 예시적인 세포는 줄기 세포(예를 들어, 내이 줄기 세포, 성인 줄기 세포, 골수 유래 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 피부 줄기 세포, iPS 세포, 및 지방 유래 줄기 세포), 간세포(예를 들어, 내이 간세포), 지지 세포(예를 들어, 다이테르스 세포, 주상 세포, 내부 지골 세포, 텃개(tectal) 세포 및 헨젠 세포), 및/또는 생식 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 내이 감각 세포의 대체를 위한 줄기 세포의 사용이 Li 등의 문헌(미국 공개 번호 2005/0287127) 및 Li 등의 문헌(미국 특허 연속 번호 11/953,797)에 기재되어 있다. 내이 감각 세포의 대체를 위한 골수 유래 줄기 세포의 사용이 Edge 등의 PCT/US2007/084654호에 기재되어 있다. iPS 세포는 예를 들어, 문헌[Takahashi et al., Cell, Volume 131, Issue 5, Pages 861-872 (2007); Takahashi 및 Yamanaka, Cell 126, 663-76 (2006); Okita et al., Nature 448, 260-262 (2007); Yu, J. et al., Science 318(5858):1917-1920 (2007); Nakagawa et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 및 Zaehres 및 Scholer, Cell 131(5):834-835 (2007)]에 기재되어 있다.

[0514] 이러한 적합한 세포는 하나 이상의 조직 특이 유전자의 존재를 분석(예를 들어, 정성적 또는 정량적)하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 유전자 발현은 하나 이상의 조직-특이적 유전자의 단백질 산물을 탐지하여 탐지될 수 있다. 단백질 탐지 기술은 적절한 항원에 대한 항체를 사용하는 염색 단백질(예를 들어, 세포 추출물 또는 전체 세포를 사용함)을 수반한다. 이러한 경우에서, 적절한 항원은 조직-특이적 유전자 발현의 단백질 산물이다. 원칙적으로 제1 항체(즉, 항원에 결합하는 항체)가 표지될 수 있지만, 제1 항체(예를 들어, 항-IgG)로 향하는 제2 항체를 사용하는 것이 좀더 일반적(및 시각화를 개선함)이다. 이러한 제2 항체는 형광 색소 또는 비색 반응을 위한 적절한 효소 또는 (전자 현미경을 위한) 금 비드 또는 비오틴-아비딘 시스템과 컨쥬게이트되어, 1차 항체의 위치가 인식될 수 있으므로 항원이 인식될 수 있다.

[0515] 본 발명의 CRISPR Cas 분자는 미국 공개 출원, 제20110142917호로부터 변형된 조성물을 가지고, 외이로 약학적 조성물을 직접 적용하여 귀로 전달될 수 있다. 몇몇 구현예에서 약학적 조성물은 이도(ear canal)에 적용된다. 귀로의 전달은 또한 청각 또는 귀 전달으로서 언급될 수 있다.

[0516] 몇몇 구현예에서 본 발명의 RNA 분자는 리포솜 또는 리포펙틴 제형 등으로 전달되며 당 분야의 숙련자에게 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 제 5,593,972호, 제5,589,466호, 및 제5,580,859호에 기재되어 있다.

[0517] 특별히 포유류 세포로 siRNA의 증강되고 개선된 전달을 목표로 하는 전달 시스템이 개발되었으며(예를 들어, 문

현[Shen et al FEBS Let. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision. 2003, 9: 210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003, 327: 761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108 및 Simeoni et al., NAR 2003, 31, 11: 2717-2724]을 참조하라), 본 발명에 적용될 수 있다. siRNA는 최근에 영장류에서의 유전자 발현의 저해에 성공적으로 사용되었으며(예를 들어, 문헌[Tolentino et al., Retina 24(4):660]을 참조하라), 이는 또한 본 발명에 적용될 수 있다.

[0518] Qi 등은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있는 신규한 단백질 전달 기술에 의해 온전한 내창을 통해 내이로 효율적인 siRNA 트랜스펙션을 위한 방법을 기재했다(예를 들어, 문헌[Qi et al., Gene Therapy (2013), 1-9]을 참조하라). 특히, 온전한 내창 투과를 통해 내부 및 외부 모세포, 팽대부릉(crista ampullaris), 난형낭 반 및 구형낭반을 포함하는 내이의 세포 내로 Cy3-표지 siRNA를 트랜스펙션시킬 수 있는, TAT 이중 가닥 RNA-결합 도메인(TAT-DRBDs)이 다양한 내이 질병의 치료 및 청각 기능의 보존을 위한 생체내 이중 가닥 siRNA 전달에 성공적이었다. 10 mM RNA의 약 40 μ l가 귀에 투여하기 위한 용량으로서 고려될 수 있다.

[0519] Rejali 등의 문헌(Hear Res. 2007 Jun;228(1-2):180-7)에 따라, 달팽이관 이식이 나선 신경절 뉴런의 우수한 보존에 의해 개선될 수 있으며, 이는 이식에 의한 전기 자극의 표적이고 뇌 유래 신경영양성 인자(BDNF)가 실험적으로 청각을 잃은 귀에서 나선 신경절 생존을 증가시킴이 이전에 보여졌다. Rejali 등은 BDNF 유전자 삽입을 갖는 바이러스 벡터에 의해 형질도입된 섬유아세포의 코팅을 포함하는 달팽이관 이식 전극의 변형된 설계를 시험했다. 이 유형의 생체의 유전자 이송을 완수하기 위해, Rejali 등은 BDNF 유전자 카세트 삽입을 갖는 아데노 바이러스로 기니아피그 섬유아세포를 형질도입시키고, 이 세포들이 BDNF를 분비하는 것을 밝힌 후 BDNF-분비 세포를 아가로스 겔을 통해 달팽이관 이식 전극에 부착시키고 고실계에 전극을 이식했다. Rejali 등은 BDNF 발현 전극이 대조 전극과 비교했을 때 이식 48일 후에 달팽이관의 기저 회전에서 상당히 많은 나선 신경절 뉴런을 보존할 수 있었음을 밝혔으며 나선 신경절 뉴런 생존을 증강시키기 위해 생체의 유전자 이송과 달팽이관 이식 치료법을 조합하는 가능성을 밝혔다. 이러한 시스템은 귀로의 전달을 위한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있다.

[0520] Mukherjea 등은 손상으로부터 OHC의 보호 및 청각 뇌 줄기 반응(ABRs)에서의 감소된 역치 시프트에 의해 입증되는 바와 같이, 짧은 간섭(si) RNA를 사용한 NOX3의 낙다운이 시스플라틴 이독성을 폐지하는 것을 기록했다(Antioxidants & Redox Signaling, Volume 13, Number 5, 2010). 상이한 용량의 siNOX3 (0.3, 0.6, 및 0.9 μ g)이 래트에 투여되고 NOX3 발현이 실시간 RT-PCR로 평가됐다. 사용된 NOX3 siRNA의 가장 낮은 투여량(0.3 μ g)은 스크램블드 siRNA의 고막투과 투여 또는 비처리된 달팽이관과 비교했을 때 NOX3 mRNA의 임의의 저해를 보이지 않았다. 그러나, 고용량의 NOX3 siRNA (0.6 및 0.9 μ g)의 투여는 대조 스크램블드 siRNA에 비해 NOX3 발현을 감소시켰다. 이러한 시스템은 인간으로의 투여를 위해 약 2 mg 내지 약 4 mg 용량의 CRISPR Cas를 고막투과 투여하기 위한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있다.

[0521] Jung 등은 iRNA의 적용 후 소낭에서의 Hes5 수준이 감소하고 이러한 소낭에서의 다수의 모세포가 대조 치료 후 보다 상당히 더 큰 것을 입증했다(Molecular Therapy, vol. 21 no. 4, 834-841 apr. 2013). 데이터는 siRNA 기술이 내이에서의 수복 및 재생을 유도하는데 유용할 수 있고 Notch 신호화 경로가 특이 유전자 발현 저해에 대한 잠재적으로 유용한 표적임을 제시한다. Jung 등은 8 μ g의 Hes5 siRNA를 2 μ l 부피로 주입했으며, 이는 귀의 전정 상피(vestibular 상피)에 대한 동결건조된 siRNA에 멸균된 일반 식염수를 첨가하여 제조되었다. 이러한 시스템은 인간으로의 투여를 위한 약 1 내지 약 30 mg 용량으로 CRISPR Cas을 귀의 전정 상피에 투여하기 위해 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있다.

[0522] Pinyon J. L. 등은 달팽이관 이식으로 통합된 뉴트로핀 유전자 치료가 나선 신경절 신경돌기 재생을 자극하여 이의 성능이 개선되는 것을 보이는 기니아피그에서의 그들의 연구를 보고했다(Sci. Transl Med. 2014 Apr 23;6(233):233ra54. doi: 10.1126/scitranslmed.3008177. Close-field electroporation gene delivery using the cochlear implant electrode array enhances the bionic ear). 저자는 신규한 "차단-필드(close-field)" 전기천공법을 위해 달팽이관 이식 전극 어레이를 사용하여 뇌-유래 신경영양성 인자 (BDNF) 및 녹색 형광 단백질(GFP) 리포터의 발현을 구동하는 네이키드 상보적 DNA 유전자 작제물로 달팽이관 외림프관을 따라 늘어선 간엽 세포를 형질도입시켰다. 특정한 달팽이관 이식 전극 배치에 의한 자기장에 초점을 맞추는 것이 인접한 간엽 세포로 놀랍게도 유효한 유전자 전달을 이끌어냈다. 결과적으로 생성된 BDNF 발현은 나선 신경절 신경돌기의 재생을 자극하여, 쌍방 지각신경 난청 모델에서 이독성 치료 2주 후 쇠퇴하였다. 이 모델에서, 대조 GFP-단독 벡터의 전달은 비이식된 달팽이관으로부터 구별되지 않는 쇠퇴한 뉴런을 가지고 뉴런 구조를 회복하는데 실패했다. BDNF 치료법으로, 재생된 나선 신경절 신경돌기가 국소화 이소성 분지화로 달팽이관 이식 전극에 가깝게 확장했다. 이러한 신경 리모델링은 전기적으로 일으키는 청성 뇌간 반응을 통해 결정되는 달팽이관 신경의

낮은 자극 역치 및 확장된 역학 범위를 가지고 달팽이관 이식 어레이를 통한 양극성 자극을 가능하게 하였다. 이러한 발달은 신경 간섭을 매우 개선할 수 있으며 분자 의약 적용을 확장시킬 수 있다.

[0523] Atkinson P. J. 등은 모세포 발달에 필수적인 것으로 알려진 전사인자인 ATOH1의 도입 및 신경영양성 인자의 도입을 통한 성숙 달팽이관에서의 감각 모세포의 재생 및 청각 뉴런과의 이들의 재접속을 촉진하는 것을 목표로 하는 연구의 결과를 보고했다(PLoS One 2014 Jul 18;9(7):e102077. doi: 10.1371/journal.pone.0102077. eCollection 2014. Hair cell regeneration after ATOH1 gene therapy in the cochlea of profoundly deaf adult guinea pigs.). ATOH1를 단독으로, 또는 뉴로트로핀-3 및 뇌 유래 신경영양성 인자와 함께 포함하는 아데노바이러스 벡터를 이독성 청각장애 4일 후 기니아피그 달팽이관의 기저 중앙계로 주입하였다. ATOH1 유전자 치료 단독으로 처리된 기니아피그는, 치료 후 3주간 시험했을 때 반대쪽의 비-처리 달팽이관에 비해 모세포 마커를 발현하는 상당히 많은 수의 세포를 가졌다. 그러나, 이러한 증가는 청각 역치에서의 상응하는 개선을 야기하는 것이 아니고, ATOH1 단독 치료 후, 또는 뉴로트로핀과 조합했을 때 CtBP2 반점에 의해 측정되는 바와 같이, 시냅스 리본에서의 증가도 없었다. 그러나, 모세포 ATOH1 및 신경영양성 인자의 공동-처리 후 모세포 형성 및 시냅스 생성은, 시료가 조합했을 때 바이러스 역가가 반으로 줄어드는 것에 의해 바이러스 형질도입이 감소되므로 결정적이지 않은 것으로 남아있다. 저자는 총괄하여, 이들 데이터가 ATOH1 단독으로 성숙 달팽이관에서 미성숙 감각 모세포 표현형으로 비-감각 세포를 구동시키지만, 이는 아미노글루코시드-유도 난청 후 작용성 개선을 야기하지 않음을 제시한다고 결론을 내렸다.

[0524] 난청 및 청각 장애 유전자 치료 설명

[0525] 방향 및 균형 장애의 주요한 한 원인은 인간 달팽이관내의 모세포의 손실이다. 손실은 소음, 이독성 손상 등에 기인한 것일 수 있다. 유감스럽게도, 새로운 모세포가 인간을 포함하는 성체 포유류에서 자발적으로 생산될 수 있음을 뒷받침하는 증거가 없으며, 포유류에서 모세포 발생을 확실하게 자극하는 방법은 없다.

[0526] 출생 후 달팽이관

[0527] 그럼에도 불구하고, 최근 보고는 인간 ATOH1과 같은 특정 유전자의 과발현이 새로운 모세포의 생산을 유도할 수 있음을 보였다. ATOH1는 모세포 발생에 핵심 조절자로서 제시되는 염기성 헬릭스-루프-헬릭스(bHLH) 전사인자이다. 그러므로, CRISPR-Cas9 시스템을 사용한 후성적 조작을 통한 생체내 ATOH1 발현의 조절이 인간 난청 또는 다른 유형의 청각 장애에 대한 잠재적인 치료적 접근으로서 사용될 수 있다. 이 유형의 청각 질병을 위한 효과적인 유전자 치료의 개발을 위한 주요 도전은 하기와 같다: (a) 용이하게 설계 가능한 게놈 조작의 부족: 이는 CRISPR-Cas9 기술에 의해 다뤄진다. 특히, Cas9 단백질의 비-절단 돌연변이체 버전인 dCas9을 생성하기 위한 능력은 표적 DNA 서열에 결합할 수 있지만 임의의 DNA 손상 또는 변형을 도입하지 않는 것이다. (b) 생체내 전달의 낮은 효율: 이는 작은 Cas9인 스타필로코커스 아우레우스로부터의 SaCas9에 의해 개선되어, dCas9 단백질, 융합 이펙터, 및 상응하는 키메라 가이드 RNA(들) 모두를 발현하는 단일 AAV 벡터내로 쉽게 패키징될 수 있다. (c) 단일 유전자를 조작하기 위해 다수의 가이드를 적용하기 위한 필수성에 기인하는 후성적 조절의 낮은 효율 및 이에 따른 다수의 바이러스 벡터의 공동-전달의 필요조건.

[0528] 출원인은 dCas9 및 융합 이펙터, 키메라 가이드 RNA 설계의 최적화에 의해 다중-가이드 이슈를 해결하였다. 특히, 다중 MS2 결합 부위는 텐덤 삽입을 통해 키메라 RNA 골격으로 조작될 수 있다. 이 방식에서, 후성적 조작은 dCas9, 변형된 키메라 가이드 RNA, 및 융합 이펙터로 구성된 삼-성분 복합체에 의해 실행된다. 융합 이펙터는 MS2 단백질 및 VP64, p65, KRAB, SID, 또는 SID4X 도메인과 같은 후성적 변형체를 포함한다. 중요하게는, 다른 RNA-단백질 상호작용 역시 동일한 방식으로 탐구될 수 있다. 게다가, 다중-벡터 이슈 또한 실험을 실시하기 위해 요구되는 바이러스 벡터의 수를 전체 2개 또는 3개 벡터로부터 단지 전체 1개 또는 2개 벡터까지 감소시키는, 작은 SaCas9의 도입에 의해 개선된다.

[0529] 출원인의 SaCas9를 사용하는 게놈 조작 시스템은 AAV 또는 Ad 바이러스 내로 효과적으로 패키징될 수 있고, 특히 생체내 포유류 세포 내의 내인성 후성적 상태를 변형시키기 위해 사용될 수 있어, 질병-관련 유전자 또는 게놈 유전자좌의 발현 수준을 조정하여 치료 효과를 만들어 낼 수 있다. 단일-벡터 설계에서 시스템의 성분은 도 24에 나타냈으며, 이는 dCas9-기반 후성적 조절 시스템 (시스템의 3 성분인, dSaCas9, 융합 이펙터, 및 sgRNA를 보임)의 설계를 보인다. 이 시스템은 아데노-관련 바이러스(AAV), 아데노 바이러스(Ad) 또는 다른 전달 비히클에 근거한 전달 방법과 조합되어 생체내 세포의 후성적 상태를 변형할 수 있다.

[0530] 난청 또는 청각 장애를 치료하기 위해 ATOH1 발현을 자극하는 dSaCas9를 사용하는 비-제한적인 예가 본원의 실시예 6, 및 도 24 및 25에 제공했다.

- [0531] 눈
- [0532] 본 발명은 또한 하나 또는 두 눈으로 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다.
- [0533] 본 발명의 다른 양태에서, CRISPR-Cas 시스템은 Genetic Diseases of the Eye, Second Edition, edited by Elias I. Traboulsi, Oxford University Press, 2012에 추가 기재된 여러 유전적 돌연변이로부터 발생한 안구 결함을 교정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0534] 눈으로의 투여에서, 렌티바이러스 벡터, 상세하게는 말 전염성 빈혈증 바이러스(EIAV)가 특히 바람직하다.
- [0535] 다른 구현예에서, 말 전염성 빈혈증 바이러스(EIAV)에 근거한 최소한의 비-영장류 렌티바이러스 벡터가 또한 특히 안구 유전자 치료에서 고려되었다(예를 들어, 문헌[Balagaan, J Gene Med 2006; 8: 275 - 285, Published online 21 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jgm.845]을 참조하라). 벡터는 표적 유전자의 발현을 구동하는 시토메갈로 바이러스 (CMV) 프로모터를 갖는 것이 고려된다. 전방내, 망막하, 안내 및 유리체내 주입이 모두 고려된다(예를 들어, 문헌[Balagaan, J Gene Med 2006; 8: 275 - 285, Published online 21 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jgm.845]을 참조하라). 안내 주입은 수술 현미경의 도움으로 실행될 수 있다. 망막하 및 유리체내 주입에서, 눈은 온화한 손가락 압력에 의해 탈출될 수 있으며 기반부는 현미경용 유리 슬라이드 커버슬립으로 덮인 각막 상에 커플링 베지 용액을 떨어뜨리는 것으로 구성된 콘택트 렌즈 시스템을 사용하여 시각화되었다. 망막하 주입에서, 5- μ l 해밀턴 주사기에 고정된 10-mm 34-게이지 바늘의 끝부분이, 망막하 공간에서 바늘의 구멍이 보일 때까지, 우세한 적도 공막(equatorial sclera)을 통해 접선으로 후두극을 향해 직접 시각화 하에서 진전될 수 있다. 그런 다음, 2 μ l의 벡터 상청액을 주입하여 우세한 수포성 망막 분리를 생성할 수 있으며, 따라서 이는 망막하 벡터 투여를 확인하는 것이다. 이러한 접근법은 RPE에 의해 흡수될 때까지, 일반적으로 48시간의 과정 내에 벡터 상청액이 망막하 공간에서 보유되도록 하는 자가-밀봉 공막절개를 창출한다. 이 과정은 하위 망막 분리를 생성하기 위해 하위 반구에서 반복될 수 있다. 이 기술은 벡터 현탁액으로 대략 70%의 감각신경 망막 및 RPE의 노출을 야기한다. 유리체내 주입에서, 바늘 끝은 공막을 통해 각공막 경계 1 mm 뒤로 진전될 수 있으며 2 μ l의 벡터 현탁액은 유리체강으로 주입된다. 전방내 주입에서, 바늘 끝은 각공막 경계 천자를 통해, 중앙 각막을 향해 진전될 수 있으며, 2 μ l의 벡터 현탁액이 주입될 수 있다. 전방내 주입에서, 바늘 끝은 각공막 경계 천자를 통해, 중앙 각막을 향해 진전될 수 있으며, 2 μ l의 벡터 현탁액이 주입될 수 있다. 이들 벡터는 1.0-1.4 x 10¹⁰ 또는 1.0-1.4 x 10⁹ 형질도입 유닛(TU)/ml의 역가로 주입될 수 있다.
- [0536] 다른 구현예에서, 망 형태의 노인성 황반변성의 치료를 위한 망막하 주입을 통해 전달되는 혈관형성 억제 단백질 엔도스타틴 및 안지오스타틴을 발현하는 단백질 말 전염성 빈혈증 바이러스-기반 렌티바이러스 유전자 치료 벡터인 RetinoStat®이 또한 고려된다(예를 들어, 문헌[Binley et al., HUMAN GENE THERAPY 23:980-991 (September 2012)]을 참조하라). 이러한 벡터는 본 발명의 CRISPR-Cas 시스템을 위해 변형될 수 있다. 각각의 눈은 총 100 μ l의 부피로 눈 당 1.1 x 10⁵ 형질도입 유닛(TU/eye)의 용량의 RetinoStat®으로 치료될 수 있다.
- [0537] 다른 구현예에서, E1-제거, 부분적 E3-제거, E4-제거 아데노바이러스 벡터가 눈으로의 전달을 위해 고려될 수 있다. 후기 혈관신생 노인성 황반변성 (AMD)을 갖는 28명의 환자에게 인간 안료 상피-유래 인자(AdPEDF.11)를 발현하는 E1-제거, 부분적 E3-제거, E4-제거 아데노바이러스 벡터의 단일 초자체내 주입이 주어졌다(예를 들어, 문헌[Campochiaro et al., Human Gene Therapy 17:167-176 (February 2006)]을 참조하라). 10⁶ 내지 10^{9.5} 입자 유닛(PU) 범위의 용량이 조사되었으며 AdPEDF.11에 관련된 심각한 부작용 및 투여량-제한 독성이 없었다(예를 들어, 문헌[Campochiaro et al., Human Gene Therapy 17:167-176 (February 2006)]을 참조하라). 아데노바이러스 벡터-매개 안구 유전자 이송이 안구 장애의 치료를 위해 실행가능한 접근법을 나타낼 수 있으며 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있다.
- [0538] 다른 구현예에서, RXi Pharmaceuticals의 sd-rxRNA® 시스템이 눈으로의 CRISPR Cas의 전달을 위해 사용되고 그리고/또는 조정될 수 있다. 이 시스템에서, 3 μ g의 sd-rxRNA의 단일 유리체내 투여는 14일 동안 PPIB mRNA 수준의 서열-특이적 감소를 야기한다. sd-rxRNA® 시스템이 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있으며, 인간에게 투여된 약 3 내지 20 mg 용량의 CRISPR을 고려하는 것이다.
- [0539] Millington-Ward 등은 RNAi 표적 부위 상의 변성 위치에서 뉴클레오티드 변경에 기인한 억제에 저항하는 RNA 간섭 (RNAi)-기반 로돕신 억제제 및 코돈-변형 로돕신 대체 유전자를 전달하기 위해 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터를 기재한다(Molecular Therapy, vol. 19 no. 4, 642-649 apr. 2011). 6.0 x 10⁸ vp 또는 1.8 x 10¹⁰ vp의

AAV의 주입이 Millington-Ward 등에 의해 눈으로 망막하 주입된다. Millington-Ward 등의 AAV 벡터는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있으며, 인간에게 약 2×10^{11} 내지 약 6×10^{13} vp 용량으로 투여되는 것을 고려한 것이다.

[0540] Dalkara 등은 또한 눈의 유리액으로 비-상해 주입 후에 망막 도처에 결합 유전자의 야생형 버전을 전달하는 AAV 벡터를 만들기 위해 생체내 유도 진화에 관한 것이다(Sci Transl Med 5, 189ra76 (2013)). Dalkara는 AAV1, 2, 4, 5, 6, 8, 및 9로부터 cap 유전자의 DNA 서플링에 의해 작제된 칠량체 펩티드 디스플레이 라이브러리 및 AAV 라이브러리를 기재한다. CAG 또는 Rho 프로모터 하에서 GFP를 발현하는 rcAAV 라이브러리 및 rAAV 벡터는 패키징되었으며 디옥시리보뉴클레아제-저항 게놈 역가는 정량 PCR을 통해 획득된다. 라이브러리가 풀링되었으며, 두 라운드의 진화가 실행되었으며, 각각 초기 라이브러리 다양화 및 그 이후의 3개의 생체내 선별 단계로 구성된다. 각각의 이러한 단계에서, P30 rho-GFP 마우스에게 약 1×10^{12} vg/ml의 게놈 역가를 갖는 2 ml의 이 오덕사놀-정제된, 인산염-완충 식염수(PBS)-투석 라이브러리로 유리체내로 주입되었다. Dalkara 등의 AAV 벡터는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있으며, 약 1×10^{15} 내지 약 1×10^{16} vg/ml의 용량으로 인간에게 투여하는 것을 고려하는 것이다.

[0541] 다른 구현예에서, 로돕신 유전자는 색소성 망막염 (RP)의 치료를 위해 표적화될 수 있으며, Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20120204282호의 시스템은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 따라 변형될 수 있다.

[0542] 다른 구현예에서, 인간 로돕신 유전자로부터 표적 서열을 절단하는 방법에 대한, Collectis로 양도된 미국 특허 공개 제20130183282호의 방법은 또한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템으로 변형될 수 있다.

[0543] Academia Sinica로 양도된 미국 특허 공개 제20130202678호는 눈에서 망막하 또는 유리체내 공간으로 Puf-A 유전자 (눈 조직의 망막 신경절 및 색소 세포에서 발현되고 독특한 항-세포사멸 활성을 나타냄)의 전달에 관하여 망막증 및 시력-위협 안과학적 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 특히, 요망하는 표적은 zgc:193933, prdm1a, spata2, tex10, rbb4, ddx3, zp2.2, Blimp-1 및 HtrA2이며, 이들 모두는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 의해 표적화될 수 있다.

[0544] Wu는 DNA 절단을 유도했을 때, 마우스에서 백내장을 일으키는 단일 염기쌍 돌연변이로 Cas9을 이끌어내는 가이드 RNA를 설계했다(Cell Stem Cell, 13:659-62, 2013). 그런 다음, 다른 야생형 대립 형질 또는 올리고를 사용하여 돌연변이체 마우스에서 파손된 대립 형질의 서열을 고치고 백내장-발생 유전 결함을 고치는 접합체 수복 메커니즘이 주어졌다.

[0545] 미국 특허 공개 제20120159653호는 황반변성(MD)과 연관된 세포, 동물 및 단백질을 유전적으로 변형시키기 위해 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하는 것을 기재한다. 황반변성(MD)은 노인의 시각 장애의 일차 원인이나, 또한 유아기와 같이 어린 발병 연령을 갖는 스타르가르트 질병, 소르스비 기저부(Sorsby fundus), 및 치명적인 소아 신경병성 질병과 같은 소아 질병의 특정 증상이기도 하다. 황반변성은 망막으로의 손상때문에 시계 중심의 시야 손실(망막황반)을 야기한다. 현재 존재하는 동물 모델은 인간에서 관찰된 바와 같은 질병의 주요 특징을 나타내지 않는다. MD와 연관된 단백질을 인코딩하는 돌연변이 유전자를 포함하는 가능한 동물 모델은 또한 매우 다양한 표현형을 생산하며, 이는 인간 질병 및 치료법 개발로 번역되어 문제가 생기게 한다.

[0546] 미국 특허 공개 제20120159653호의 일 양태는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있는 MD와 연관된 단백질을 인코딩하는 임의의 염색체 서열의 편집에 관한 것이다. MD와 연관된 단백질은 통상적으로 MD 장애에 대한 MD와 연관된 단백질의 실험적 연관성에 근거하여 선택된다. 예를 들어, MD와 연관된 단백질의 생산 비율 또는 순환 농도가 MD 장애가 결여된 집단에 비해 MD 장애를 갖는 집단에서 상승하거나 저해될 수 있다. 단백질 수준에서의 분화는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹 기술을 사용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, MD와 연관된 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현 (SAGE)의 연속 분석, 및 정량 실시간 폴리머라제 캐스케이드(Q-PCR)을 포함하는 게놈 기술을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현프로파일을 획득함으로써 확인될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0547] 비-제한적인 예로서, MD와 연관된 단백질은 하기 단백질을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: (ABCA4) ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 4 ACHM1 색맹 (간상체 적색맹) 1 ApoE 아포지단백질 E (ApoE) C1QTNF5 (CTRP5) C1q 및 중앙 피사 인자 관련 단백질 5 (C1QTNF5) C2 보체 성분 2 (C2) C3 보체 성분 (C3) CCL2 케모카

인 (C-C 모티프) 리간드 2 (CCL2) CCR2 케모카인 (C-C 모티프) 수용체 2 (CCR2) CD36 분화 클러스터 36 CFB 보체 인자 B CFH 보체 인자 CFH H CFHR1 보체 인자 H-관련1 CFHR3 보체 인자 H-관련3 CNGB3 환형 뉴클레오타이드 게이트 채널 베타 3 CP 세룰로플라스민 (CP) CRP C 반응성 단백질 (CRP) CST3 시스타틴 C 또는 시스타틴 3 (CST3) CTSD 카텡신 D (CTSD) CX3CR1 케모카인 (C-X3-C 모티프) 수용체 1 ELOVL4 (Elongation of very long chain fatty acids 4) ERCC6 (excision repair cross-complementing) 설치류 수복 결핍, FBLN5 피블린-5 FBLN5 피블린 5 FBLN6 피블린 6 FSCN2 파신(fascin) (FSCN2) HMCN1 헤미센트린(Hemacentrin) 1 HMCN1 헤미센틴 (hemicentin) 1 HTRA1 HtrA 세린 펩티다아제 1 (HTRA1) HTRA1 HtrA 세린 펩티다아제 1 IL-6 인터류킨 6 IL-8 인터류킨 8 LOC387715 가설 단백질 PLEKHA1 플렉스트린 상동성 도메인-함유 패밀리아 멤버 1 (PLEKHA1) PROM1 프로미닌 1(PROM1 또는 CD133) PRPH2 페리페린-2 RPGR 색소성 망막염 GTPase 조절자 세르핀G1 세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 G, 멤버 1 (C1-저해제) TCOF1 트리클 TIMP3 메탈로프로테이나아제 저해제 3 (TIMP3) TLR3 톨-유사 수용체 3.

[0548] 염색체 서열이 편집된 MD와 연관된 단백질의 동일성은 변화될 수 있고 변화될 것이다. 바람직한 구현예에서, 염색체 서열이 편집된 MD와 연관된 단백질은 ATP-결합 카세트, ABCR 유전자에 의해 인코딩되는 서브-패밀리아 (ABC1) 멤버 4 단백질 (ABCA4), APOE 유전자에 의해 인코딩되는 아포지단백질 E 단백질 (APOE), CCL2 유전자에 의해 인코딩되는 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2 단백질 (CCL2), CCR2 케모카인 (C-C 모티프) 수용체 2 단백질 (CCR2), CP 유전자에 의해 인코딩되는 세룰로플라스민 단백질 (CP), CTSD 유전자에 의해 인코딩되는 카텡신 D 단백질 (CTSD), 또는 TIMP3 유전자에 의해 인코딩되는 메탈로프로테이나아제 저해제 3 단백질 (TIMP3)일 수 있다. 예시적인 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물은 래트이며, MD와 연관된 단백질을 인코딩하는 편집된 염색체 서열은 하기 것일 수 있다: (ABCA4) ATP-결합 카세트, NM_000350 서브-패밀리아 (ABC1), 멤버 4 APOE 아포지단백질 E NM_138828 (APOE) CCL2 케모카인 (C-C NM_031530 모티프) 리간드 2 (CCL2) CCR2 케모카인 (C-C NM_021866 모티프) 수용체 2 (CCR2) CP 세룰로플라스민 (CP) NM_012532 CTSD 카텡신 D (CTSD) NM_134334 TIMP3 메탈로프로테이나아제 NM_012886 저해제 3 (TIMP3). 동물 또는 세포는 MD와 연관된 단백질을 인코딩하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 그 이상의 방해된 염색체 서열을 포함할 수 있다.

[0549] 편집되거나 통합된 염색체 서열은 MD와 연관된 변형된 단백질을 인코딩하기 위해 변형될 수 있다. MD-관련 염색체 서열에서의 여러 돌연변이는 MD와 연관되었다. MD와 연관된 염색체 서열에서의 돌연변이의 비-제한적인 예는, ABCR 단백질에서, E471K (즉 위치 471의 글루타메이트가 리신으로 변화함), R1129L (즉 위치 1129의 아르기닌이 류신으로 변화함), T1428M (즉 위치 1428의 트레오닌이 메티오닌으로 변화함), R1517S (즉 위치 1517의 아르기닌이 세린으로 변화함), I1562T (즉 위치 1562의 이소류신이 트레오닌으로 변화함), 및 G1578R (즉 위치 1578의 글리신이 아르기닌으로 변화함); CCR2 단백질에서, V64I (즉 발린 위치 192 이소류신으로 변화함); CP 단백질에서, G969B (즉 위치 969의 글리신이 아스파라긴 또는 아스파테이트로 변화함); TIMP3 단백질에서, S156C (즉 위치 156의 세린이 시스테인으로 변화함), G166C (즉 위치 166의 글리신이 시스테인으로 변화함), G167C (즉 위치 167의 글리신이 시스테인으로 변화함), Y168C (즉 위치 168의 티로신이 시스테인으로 변화함), S170C (즉 위치 170의 세린이 시스테인으로 변화함), Y172C (즉 위치 172의 티로신이 시스테인으로 변화함) 및 S181C (즉 위치 181의 세린이 시스테인으로 변화함)을 포함하는, MD를 발생할 수 있는 것들을 포함한다. MD-연관 유전자 및 질환에서의 유전자 변이체의 다른 연관성이 당 분야에 공지되어 있다.

[0550] 안구 질병 유전자 치료

[0551] 유전적 근거에 대해 널리 맵핑되므로 인간 환자에서 이들 질환을 치료하기 위해 효과적인 유전자 치료를 개발하기 위한 게놈 조작 기술을 사용하기 위한 좋은 방안을 제공하는 많은 유형의 유전적 망막 질병이 있다. 가능성에 근거하여, 안구 질병의 리스트를 이들의 유전학 및 유전 모드에 대한 주석을 갖는 하기 표에 나타냈다.

[0552] 질병 리스트 및 주석

안구 질병	인간 게놈에서 인과관계의 게놈 유전자좌	유전 모드
스티르가르트 질병 및 망막 변성	ABCA4 & ELOVL4	상염색체 열성 및 상염색체 우성
색맹	CNGA3(엑손 8) & CNGB3(엑손 10)	상염색체 열성
	CNGA3, CNGB3, CNNM4, GNAT2, KCNV2, NBAS, OPN1LW, PDE6C, PDE6H & RPGR	상염색체 열성 & X-연관
바렛-비들 증후군	ARL6, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BBS10, BBS12, CEP290, INPP5e, LZTFL1, MKS1, MKKS, SDCCAG8, TRIM32 & TTC8	상염색체 열성
베스트병	BEST1	상염색체 우성
청색 추상체 색맹	OPN1LW	X-연관
맥락막 결여	CHM	X-연관
추상체-간상체 이영양증	CRX, GUCA1a(Leu151Phe) & GUCY2D (엑손 13)	상염색체 우성
	ADAM9, AIPL1, C21ORF2, C8ORF37, CACNA1f, CACNA2D4, CDHR1, CERKL, CNGB3, CNNM4, CRX, GUCA1a, GUCY2D, KCNV2, PDE6C, PDE6H, PITPNM3, PROM1, PRPH2, RAP28, RAX2, RDH5, RIMS1, RPGR, RPGRIP1 & UNC119	상염색체 우성, 상염색체 열성 & X-연관
선천적 야맹증	CACNA1f, GRM6, PDE6b & TRPM1	상염색체 우성, 상염색체 열성 & X-연관
	CABP4, CACNA1f, GNAT1, GPR179, GRK1, GRM6, LRIT3, NYX, PDE6b, RDH5, RHO, SAG, SLC24a1, TRPM1	
각막 이영양증-기질	TGFBI (엑손 4 & 11-14)	상염색체 우성
증강된 S-추상체 증후군	NR2E3 (엑손 2-8)	상염색체 열성
청소년기 개방각 녹내장 또는 원발성 개방각 녹내장	MYOC	상염색체 우성
청소년기 X-연관 망막분리	RS1	X-연관
레베르 선천성 흑암시(LCA)	AIPL1, CEP290, CRB1, CRX, GUCY2D, IQCB1, LCA5, LRAT, NMNAT1, RD3, RDH12, RPE65, RPGRIP1, SPATA7, TULP1	상염색체 열성
말라티아 레벤티니스(Malattia Leventinese)	EFEMP1 (Arg345Trp 돌연변이)	상염색체 우성

[0553]

노리 병 또는 X-연관 가족성 삼출 유리체망막증 (XL- FEVR)	NDP	X-연관
패턴 이영양증	RDS	상염색체 우성
색소성 망막염	C1QTNF5, IMPDH1, NR2E3, PRPF3, PRPF31, PRPF8, RDH12, RDS, RHO, RP1, RP9, SNRNP200, TOPORS	상염색체 우성
	ABCA4, CC2D2a, CERKL, CLRN1, CNGA1, CRB1, DHDDS, EYS, FAM161a, FLVCR1, IDH3b, IMPG2, LRAT, MAK, NR2E3, NRL, PDE6a, PDE6b, PDE6G, PROM1, RBP3, RDH12, RGR, RLBP1, RPE65, SAG, TTPA, TULP1, USH2a, ZNF513	상염색체 열성
	RP2, RPGR	X-연관
소르스비 이영양증	TIMP3 (엑손 1 & 5)	상염색체 우성
어서 증후군	ABHD12, CDH23, CIB2, CLRN1, DFNB31, GPR98, HARS, MYO7a, PCDH15, USH1c, USH1g & USH2a	상염색체 열성
무홍채증	PAX6	상염색체 우성
우성 시신경 위축	OPA1	상염색체 우성

[0554]

[0555]

안구 질병을 위한 효과적인 유전자 치료의 개발을 위한 주요 도전은 하기와 같다: (a) 용이하게 설계 가능한 게놈 조작의 부족; (b) 생체내 전달의 낮은 효율; 및 (c) 다수의 바이러스 벡터의 공동-전달에 기인한 HDR의 낮은 효율. 출원인은 CRISPR-Cas9 기술이 효과적으로 다뤄지고 이들 도전에 대한 해결책을 제공함을 나타냈다. 출원인은 생체내 전달의 낮은 효율 및 HDR의 낮은 효율 및 공동-전달의 도전이 작은 Cas9인 스타필로코커스 아우레우스로부터의 SaCas9에 의해 해결되어, Cas9 단백질 및 이의 상응하는 키메라 가이드 RNA(들) 모두를 발현하는 단일 AAV 벡터내로 쉽게 패키징될 수 있음을 보였다. 또한, 출원인은 작은 SaCas9의 도입이 상동성-유도 수복(HDR)을 실시하기 위해 요구되는 바이러스 벡터의 수를 3개 벡터에서 2개 벡터로 감소시킴을 나타냈다.

[0556]

SaCas9-기반 CRISPR-Cas 게놈 조작 시스템을 사용하여 생체내 포유류 세포 내의 내인성 게놈 서열의 변형:

[0557]

출원인은 SaCas9를 사용하는 게놈 조작 시스템이 효과적으로 AAV 내로 패키징될 수 있으며, 특히 생체내 포유류 세포에서 내인성 게놈 서열을 변형시키는데 사용될 수 있음을 보였다.

[0558]

출원인의 SaCas9 시스템의 기본 특성을 도 15에 나타냈다. 이 시스템은 아데노-관련 바이러스(AAV)에 근거한 전달 방법과 조합하여 생체내 유사분열 후 세포를 편집할 수 있으며 특히 전달 비히클과 조합했을 때 인간 망막에서의 다수의 세포 유형에 효과적이다. 망막 질병 치료법의 경우에서, 2가지 전달 경로가 사용된다: AAV가 눈의 유리액에 주입되는 유리체내 AAV 주입은 망막 신경절 세포 및 물러 신경교 세포를 표적화하거나, 안구 세포 내의 트랜스유전자의 장기간 발현을 유지하기 위해 사용될 수 있다. 반면에, 망막의 아래에 소량의 유체가 주입되는 망막하 AAV 주입은 광수용체 및 망막 안료 상피(RPE) 세포를 효과적으로 표적화한다.

[0559]

AAV 혈청형 2 및 8(AAV2 및 AAV8)는 신경절 및 물러 세포에 대한 유리체내 경로를 사용하여 전달하는 데 사용될 수 있는 가장 효과적인 혈청형이다. AAV 혈청형 1, 2, 5, 7, 8, DJ는 망막하 주입 과정을 통해 광수용체 및 RPE 세포 내로 트랜스유전자를 전달하는 데 사용될 수 있다. 이 시스템을 사용한 유전자 치료를 위한 상세한 모델은 도 16에 나타냈다.

[0560]

도 16에 도시하고 실시예 2 내지 5에서 예시된 본원에 기재된 생체내 치료적 게놈 조작 접근법은 질병-발생 돌연변이 및 안구 시스템에서 다른 유형의 게놈 비정상을 교정하기 위해 사용될 수 있음이 쉽게 이해될 것이다. 프로토콜은 하기 단계로 요약될 수 있다: (i) 실험관내 표적 및 HDR 주형 확인; (ii) 바이러스 생산; (iii) 바이러스 정제; 및 (iv) 안구 주입.

[0561]

색소성 망막염을 위한 생체내 치료적 게놈 조작

[0562]

색소성 망막염(RP)은 시력 손상 및 일부 경우에는 실명도 이를 수 있는 장애 유전적 안구 장애이다. 이는 인간 눈에서 광수용체 세포 또는 망막 안료 상피(RPE) 세포의 기능 또는 조절에 관련된 유전자에서의 미스센스 돌연변이에 의해 종종 발생하는 퇴행성 눈 질병의 유형이다. RP는 유전 망막 변성의 가장 일반적인 형태이다.

[0563]

RP에서의 분자성 유전에서의 핵심 유전자는 로돕신 유전자(RHO)이다. RHO 유전자는 광수용체 외부 세그먼트의 주요 단백질을 인코딩한다. 연구는 이 유전자에서의 돌연변이가 RP의 대략 25%의 상염색체 우성 형태에 원인이

있음을 보였다.

[0564] RP를 발생시키는 RHO 돌연변이의 일례는 코돈 23에서 CCC에서 CAC로의 뉴클레오티드 치환이며, 이는 RHO 유전자의 위치 23에서 페닐알라닌의 히스티딘으로 아미노산 치환 또는 RHO(P23H)을 인코딩하는 것이다. P23H 돌연변이는 상염색체 우성 색소성 망막염의 가장 일반적인 원인 중 하나이다(도 18a). 이질접합 환자에서의 표현형은 대부분 망막증 및 진행형 망막 변성이다. 이 질병에 대해 동형접합인 환자는 더 심각한 표현형을 나타낸다. 돌연변이체 P23H 단백질의 글리코실화가 심각하게 감소됨이 관찰되었다. 일반적으로, 환자는, 말초 시계의 변성의 결과로서 결핍된 빛에서 어둠으로, 어둠에서 명 순응으로 또는 야맹증을 경험할 수 있다. 중앙 시야 손실 또한 동일한 경우에서 관찰되었다. RP는 난청, 운동실조 등을 갖는 비-중후군 성 또는 중후군성일 수 있다.

[0565] 다른 RP 질병 돌연변이/게놈 이상의 리스트

질병	돌연변이 유전자	유전 모드
색소성 망막염	C1QTNF5, IMPDH1, NR2E3, PRPF3, PRPF31, PRPF8, RDH12, RDS, RHO, RPI, RP9, SNRNP200, TOPORS	상염색체 우성
	ABCA4, CC2D2a, CERKL, CLRN1, CNGA1, CRB1, DHDSD, EYS, FAM161a, FLVCR1, IDH3b, IMPG2, LRAT, MAK, NR2E3, NRL, PDE6a, PDE6b, PDE6G, PROM1, RBP3, RDH12, RGR, RLBP1, RPE65, SAG, TTPA, TULP1, USH2a, ZNF513	상염색체 열성
	RP2, RPGR	X-연관

[0566]

[0567] 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재되고 도 5에 나타난 출원인의 예시적인 생체내 치료적 게놈 조작 접근법이 안구 시스템에서 질병-발생 돌연변이 또는 다른 유형의 게놈 이상을 교정하기 위해 사용될 수 있음이 쉽게 이해될 것이다. RHO 유전자를 표적화하는 색소성 망막염 유전자 치료에 대한 출원인의 게놈 조작 접근법은 본원의 실시예 2 및 3에서 논의된다.

[0568] 색맹에 대한 생체내 치료적 게놈 조작

[0569] 색맹(ACHM)은 높은 빛 수준(즉, 외부 일광)에서는 일반 시력을 유지하지만 색을 감지하지 못하는 환자에 의해 설명되는 의학적 질환이다. 이는 후천적 질환으로 적용될 수 있지만, 통상적으로 상염색체 열성인 선천적인 색각 질환으로 적용될 수 있다. 이 질환은 또한 색약으로 정의되는 불완전한 형태로서 나타날 수 있다. 평가된 발생은 일반 집단에서 33,000명 당 대략 1명이다.

[0570] ACHM, 즉 색맹, 약시, 주맹증, 안구진탕증, 및 홍채 작동 이상과 연관된 5개의 주요 증상이 있다.

[0571] ACHM의 분자유전학에서의 핵심 유전자는 추상 세포 환형 뉴클레오티드-개폐 이온 채널 유전자 CNGA3, CNGB3, 및 형질도입 유전자 GNAT2이다. 이들 유전자에서의 돌연변이는 망막 광형질도입 경로의 기능부전을 이끌어낼 것이다. 구체적으로, 이 유형의 선천적인 ACHM는 과분극에 의해 빛 투입에 적절하게 반응하는 추상 세포의 불능으로부터 야기된 것으로 생각된다. CNGA3 돌연변이에 의해 발생한 색맹은 ACHM2로서 분류되고, CNGB3 돌연변이에 의해 발생한 색맹은 ACHM3로서 분류되며, GNAT2에 의해 발생한 색맹은 ACHM4로서 분류된다. 이들은 주요 유형의 ACHM이며, 몇몇 소수의 경우 유전자 PDE6C 및 다른 ACHM5로 명명된 다른 유전자의 돌연변이에 의해 발생된다.

[0572] CNGA3 및 CNGB3 돌연변이를 표적화하는 ACHM 유전자 치료를 위한 출원인의 게놈 조작 접근법은 본원 실시예 4에 기술된다.

[0573] CNGA3(ACHM2)에서, 4개의 주요 돌연변이인 cys로의 arg277(R277c), trp로의 arg283(R283W), trp로의 arg436(R435W), 및 leu로의 phe547(F547L)이 있다. 이들 질환-발생 돌연변이는 탐지된 돌연변이 모두 중 41.8%를 차지했다(Wissinger et al. 2001, Am. J. Hum. Genet. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536077>에서의 보고). 여기에서 출원인은 예로서 제1 및 제2 돌연변이(R277C 및 R283W)를 선택한다. 이들의 근접성때문에, 이들 2개의 돌연변이는 동일 전략, 작제물, 바이러스 벡터 세트 및 과정으로 교정될 수 있다.

[0574] CNGB3(ACHM3)에서, 1148delC 돌연변이는 질환-발생 돌연변이의 일반적인 형태이며 75% of 환자의 75%를 차지함이 보고되었다(Wiszniowski et al. 2007, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265047>). 그리고 HR 주형 벡터를 수반한 Cas9-매개 게놈 조작 접근법을 통한 이 돌연변이의 교정은 질병 표현형을 구제할 것이다.

[0575] 다른 색맹 질병 돌연변이/게놈 이상의 리스트

질병	돌연변이 유전자	유전 모드
색맹	CNGA3, CNGB3, CNM4, GNAT2, KCNV2, NBAS, OPN1LW, PDE6C, PDE6H & RPGR	상염색체 열성

[0576]

[0577] 노인성 황반변성을 위한 생체내 치료적 게놈 조작

[0578] 노인성 황반변성(AMD 또는 ARMD)은 일반적으로 노인에게 영향을 주는 의학적 질환으로, 망막에 손상 때문에 시계의 중앙에서 시야의 손실을 야기한다. 이는 "건조" 및 "습윤" 형태로 생성한다. 이는 50세의 성인에서 실명 및 시각 장애의 주요 원인이다.

[0579] 습윤 및 건조 형태의 두 유형의 ARMD가 있다. 습윤 또는 삼출성 형태의 ARMD는 망막 뒤의 맥락막으로부터의 혈관형성에 의해 특성화된다. 새로운 혈관은 파손되기 쉬우며 망막황반 아래에 혈액 및 단백질 누출을 야기할 수 있다. 이들 혈관으로부터의 출혈, 누출, 및 상흔은 결국에는 광수용체로서의 비가역적 손상을 발생시키므로 치료되지 않고 남아 있을 경우 급격한 시야 손실을 발생시킨다. 망막은 성장 혈관 때문에 분리될 수 있다.

[0580] 건조 또는 비삼출성 형태에서, 결정강이라고 불리는 세포 잔해가 망막 및 맥락막 사이에 축적되며, 이는 환자의 시야에 영향을 미쳐서 결국 마찬가지로 망막 분리를 발생시킬 수 있다.

[0581] 노인성 황반변성을 치료하기 위한 분자 표적

[0582] 유전자 치료로 가능성 있게 치료될 수 있는 ARMD의 가장 적절한 형태는 '습윤' 형태의 ARMD이다. 이러한 경우에서, 망막에서의 비정상 혈관의 확산은 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 또는 인간 게놈에서의 게놈 유전자와 VEGFA에 의해 자극된다. 따라서, VEGF 발현을 억제하거나 이의 활성을 저해할 수 있는 방법은 혈관의 성장을 중단시키거나, 일부 경우에는 역전시킬 수 있다. 이는 인간 환자에서 효과적으로 이 유형의 ARMD를 치료하기 위한 유망한 분자 접근법이다.

[0583] 노인성 황반변성을 치료하기 위한 유전자 치료에서 예시적인 비-제한적인 게놈 조작 접근법은 본원의 실시예 5 및 도 23a 및 23b에 예시된다.

[0584] 심장

[0585] 본 발명은 또한 심장으로 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다. 심장에서, 선호되는 유전자 이송을 보이는 심근 열대성 아데나-연관 바이러스(AAVM), 특히 AAVM41이 바람직하다(예를 들어, 문헌[Lin-Yanga et al., PNAS, March 10, 2009, vol. 106, no. 10]을 참조하라). 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다. 약 1-10 x 10¹⁴ 용량의 벡터 게놈이 전신성 투여를 위해 고려된다. 또한, 예를 들어, 문헌[Eulalio et al. (2012) Nature 492: 376 및 Somasuntharam et al. (2013) Biomaterials 34: 7790]을 참고하라.

[0586] 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110023139호는 세포, 동물 및 심혈관 질병에 연관된 단백질을 유전적으로 변형시키기 위한 아연 핑거 뉴클레아제의 사용을 기재한다. 심혈관 질환은 일반적으로 고혈압, 심장마비, 심부전, 및 뇌졸중 및 TIA를 포함한다. 심혈관 질병에 관련된 임의의 염색체 서열 또는 심혈관 질병에 관련된 임의의 염색체 서열에 의해 인코딩된 단백질은 본 기재에서 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 심혈관-관련 단백질은 통상적으로 심혈관 질병의 발병에 대한 심혈관-관련 단백질의 실험 연관성에 근거하여 선별된다. 예를 들어, 심혈관-관련 단백질의 생산 비율 또는 순환 농도는 심혈관 장애가 결여된 집단에 비해 심혈관 장애를 갖는 집단에서 상승되거나 감소될 수 있다. 단백질 수준에서의 차이는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹스 기술을 사용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 심혈관-관련 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), 및 정량 실시간 폴리머라제 캐스케이드(Q-PCR)을 포함하는 게놈 기술을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현 프로파일을 수득함으로써 식별될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0587] 예로서, 염색체 서열은 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: IL1B(인터류킨 1, 베타), XDH(크산틴 탈수소효소), TP53(종양 단백질 p53), PTGIS(프로스타글란딘 12(프로스타사이클린) 합성효소), MB(미오글로빈), IL4(인터류킨 4), ANGPT1(안지오프로틴 1), ABCG8(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 G (WHITE), 멤버 8), CTSK(카텝신 K), PTGIR(프로스타글란딘 12(프로스타사이클린)수용체 (IP)), KCNJ11(칼륨 내부-정류 채널, 서브패밀리 J, 멤

버 11), INS(인슐린), CRP(C-반응성 단백질, 펜트라신-관련), PDGFRB(혈소판-유래 성장 인자 수용체, 베타 폴리펩티드), CCNA2(사이클린 A2), PDGFB(혈소판-유래 성장 인자 베타 폴리펩티드(원숭이 육종 바이러스(v-sis) 암 유전자 상동체)), KCNJ5(칼륨 내부-정류 채널, 서브패밀리 J, 멤버 5), KCNN3(칼륨 중간/작은 전도도 칼슘-활성화 채널, 서브패밀리 N, 멤버 3), CAPN10(칼페인 10), PTGES(프로스타글란딘 E 합성효소), ADRA2B(아드레날린성, 알파-2B-, 수용체), ABCG5(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 G (WHITE), 멤버 5), PRDX2(페록시레독신 2), CAPN5(칼페인 5), PARP14(폴리 (ADP-리보스) 중합효소 패밀리, 멤버 14), MEX3C(mex-3 상동체 C(예쁜꼬마선충)), ACE(안지오텐신 I 전환 효소(펩티딜-디펩티다아제 A) 1), TNF(중양 괴사 인자(TNF 슈퍼패밀리, 멤버 2)), IL6(인터류킨 6(인터페론, 베타 2)), STN(스타틴), SERPINE1(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 E(넥신, 플라스미노겐 활성화제 저해제 유형 1), 멤버 1), ALB(알부민), ADIPOQ(아디포넥틴, C1Q 및 콜라겐 도메인 함유), APOB(아포지질단백질 B (Ag(x) 항원 포함)), APOE(아포지질단백질 E), LEP(렙틴), MTHFR(5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소(NADPH)), APOA1(아포지질단백질 A-I), EDN1(엔도텔린 1), NPPB(나트륨 이노 펩티드 전구체 B), NOS3(산화 질소 합성효소 3(내피 세포)), PPARG(피옥시좀 증식체-활성화 수용체 감마), PLAT(플라스미노겐 활성화제, 조직), PTGS2(프로스타글란딘-엔도페록시드 합성효소 2(프로스타글란딘 G/H 합성효소 및 시클로옥시다아제)), CETP(콜레스테롤 에스테르 수송 단백질, 혈장), AGTR1(안지오텐신 II 수용체, 유형 1), HMGCR(3-히드록시-3-메틸글루타릴-조효소 A 환원효소), IGF1(인슐린-유사 성장 인자 1(소마토메딘 C)), SELE(셀렉틴 E), REN(레닌), PPARA(피옥시좀 증식체-활성화 수용체 알파), PON1(파라옥소나아제 1), KNG1(키니노젠 1), CCL2(케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2), LPL(지질단백질 리파아제), VWF(폰 빌레브란트 인자), F2(응고 인자 II (트롬빈)), ICAM1(세포내 부착 분자 1), TGFβ1(변형 성장 인자, 베타 1), NPPA(나트륨 이노 펩티드 전구체 A), IL10(인터류킨 10), EPO(에리트로포이에틴), SOD1(초과산화 디스뮤타아제 1, 가용성), VCAM1(혈관 세포 부착 분자 1), IFNG(인터페론, 감마), LPA(지질단백질, Lp(a)), MPO(미엘로퍼옥시다아제), ESR1(에스트로겐 수용체 1), MAPK1(미토겐-활성화 단백질 키나아제 1), HP(합토클로빈), F3(응고 인자 III (트롬보프라스틴, 조직 인자)), CST3(시스타틴 C), COG2(올리고머 골지 복합체 2의 성분), MMP9(매트릭스 메탈로펩티다아제 9(젤라티나아제 B, 92 kDa 젤라티나아제, 92 kDa IV형 콜라게나아제)), SERPINC1(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 C (안티트롬빈), 멤버 1), F8(응고 인자 VIII, 응혈원 성분), HMOX1(헴 옥시다아제 (디사이클링) 1), APOC3(아포지질단백질 C-III), IL8(인터류킨 8), PROK1(프로키네티신 1), CBS(시스타티오닌-베타-합성효소), NOS2(산화 질소 합성효소 2, 유도성), TLR4(톨-유사 수용체 4), SELP(셀렉틴 P(과립 막 단백질 140 kDa, 항원 CD62)), ABCA1(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 1), AGT(안지오텐신노젠(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 A, 멤버 8)), LDLR (저밀도 지질단백질 수용체), GPT(글루타민-피루베이트 트랜스퍼라제(알라닌 아미노트랜스퍼라제)), VEGFA 혈관 내피 성장 인자 A), NR3C2(핵 수용체 서브패밀리 3, 그룹 C, 멤버 2), IL18 (인터류킨 18(인터페론-감마-유도 인자)), NOS1(산화 질소 합성효소 1(신경세포)), NR3C1(핵 수용체 서브패밀리 3, 그룹 C, 멤버 1(당질코르티코이드 수용체)), FGB(피브리노겐 베타 사슬), HGF(간세포 성장 인자(헤파로이에틴 A; 산란 인자)), IL1A(인터류킨 1, 알파), RETN(레시스틴), AKT1(v-akt 무린 흥선종 바이러스 암유전자 상동체 1), LIPC(리파아제, 간), HSPD1(열 쇼크 60 kDa 단백질 1(샤페로닌)), MAPK14(미토겐-활성화 단백질 키나아제 14), SPP1(분비된 인단백질 1), ITGB3(인테그린, 베타 3(혈소판 당단백질111a, 항체 CD61)), CAT(카탈라아제), UTS2(우로텐신 2), THBD(트롬보모듈린), F10(응고 인자 X), CP(세룰로플라스민(페록시다아제)), TNFRSF11B(중양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 멤버 11b), EDNRA(엔도텔린 수용체 유형 A), EGFR(상피 성장 인자 수용체(적아세포 백혈병 바이러스성(v-erb-b) 암유전자 상동체, 조류)), MMP2(매트릭스 메탈로펩티다아제 2(젤라티나아제 A, 72 kDa 젤라티나아제, 72 kDa IV형 콜라게나아제)), PLG(플라스미노겐), NPY(신경펩티드 Y), RHOD(ras 상동체 유전자 패밀리, 멤버 D), MAPK8(미토겐-활성화 단백질 키나아제 8), MYC(v-myc 골수세포종 바이러스 암유전자 상동체(조류)), FN1(피브로넥틴 1), CMA1(키마아제 1, 비만 세포), PLAU(플라스미노겐 활성화제, 우로키나아제), GNB3(구아닌 뉴클레오티드 결합 단백질(G 단백질), 베타 폴리펩티드 3), ADRB2(아드레날린성, 베타-2-, 수용체, 표면), APOA5(아포지질단백질 A-V), SOD2(초과산화 디스뮤타아제 2, 미토콘드리아성), F5(응고 인자 V(프로악셀레린, 불안정 인자)), VDR(비타민 D(1,25-디히드록시비타민 D3) 수용체), ALOX5(아라키돈산 5-리폭시게나아제), HLA-DRB1(주조직적합성 복합체, 클래스 II, DR 베타 1), PARP1(폴리(ADP-리보스) 중합효소 1), CD40LG(CD40 리간드), PON2(파라옥소나아제 2), AGER(진보된 글리코실화 말단 산물-특이 수용체), IRS1(인슐린 수용체 기질 1), PTGS1(프로스타글란딘-엔도페록시드 합성효소 1(프로스타글란딘 G/H 합성효소 및 사이클로옥시다아제)), ECE1(엔도텔린 전환 효소 1), F7(응고 인자 VII(혈청 프로트롬빈 전환 약셀레이터)), URN(인터류킨 1 수용체 길항물질), EPHX2(에폭시드 가수분해효소 2, 세포질), IGFBP1(인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 1), MAPK10(미토겐-활성화 단백질 키나아제 10), FAS(Fas(TNF 수용체 슈퍼패밀리, 멤버 6)), ABCB1(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 B(MDR/TAP), 멤버 1), JUN(jun 암유전자), IGFBP3(인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 3), CD14(CD14 분자), PDE5A(포스포디에스테라아제 5A, cGMP-특이), AGTR2(안지오텐신 II 수용체,

유형 2), CD40(CD40 분자, TNF 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5), LCAT(레스틴-콜레스테롤 아실트랜스페라제), CCR5 (케모카인(C-C 모티프) 수용체 5), MMP1(매트릭스 메탈로펩티다아제 1 (간질 콜라게나아제)), TIMP1(TIMP 메탈로펩티다아제 저해제 1), ADM(아드레노메둘린), DYT10(근육긴장이상 10), STAT3(신호 트랜스듀서 및 전사의 활성화제 3급성기 반응 인자)), MMP3(매트릭스 메탈로펩티다아제 3 (스트로멜리신 1, 프로켈라티나아제)), ELN (엘라스틴), USF1(업스트림 전사 인자 1), CFH(보체 인자 H), HSPA4(열 쇼크 70 kDa 단백질 4), MMP12(매트릭스 메탈로펩티다아제 12(마크로파지 엘라스타아제)), MME(막 메탈로-엔도펩티다아제), F2R(응고 인자 II(트롬빈) 수용체), SELL(셀렉틴 L), CTSB(카텝신 B), ANXA5(아넥신 A5), ADRB1(아드레날린성, 베타-1-, 수용체), CYBA(사이토크롬 b-245, 알파 폴리펩티드), FGA(피브리노겐 알파 사슬), GGT1(감마-글루타미드 트랜스페라제 1), LIPG(리파아제), HIF1A(저산소증 유도 인자 1, 알파 서브유닛(염기 헬릭스-루프-헬릭스 전사 인자)), CXCR4(케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 4), PROC(단백질 C(응고인자 Va 및 VIIa의 불활성화제 내피)), SCARB1 (스캐빈저수용체 클래스 B, 멤버 1), CD79A(CD79a 분자, 면역글로불린-연관 알파), PLTP(인지질 수송 단백질), ADD1(아듀신 1 (알파)), FGG(피브리노겐 감마 사슬), SAA1(혈청 아밀로이드 A1), KCNH2(칼륨 전위-의존성 채널, 서브패밀리 H(귀-관련), 멤버 2), DPP4(디펩티달-펩티다아제 4), G6PD(글루코스-6-포스페이트 탈수소효소), NPR1(나트륨이노 펩티드 수용체 A/구아닐화 사이클라아제 A(심방나트륨이노성 펩티드 수용체 A)), VTN(비트로넥틴), KIAA0101 (KIAA0101), FOS(FBJ 류린 골육종 바이러스 암유전자 상동체), TLR2(톨-유사 수용체 2), PPIG (펩티달프롤일 아이소머라아제 G(시클로펩린 G)), IL1R1(인터류킨 1 수용체, 유형 I), AR(안드로겐 수용체), CYP1A1(사이토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 1), SERPINA1(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 A(알파-1 안티프로테이나아제, 안티트립신), 멤버 1), MTR (5-메틸테트라하이드로폴레이트-호모시스테인 메틸트랜스페라아제), RBP4(레티놀 결합 단백질 4, 혈장), APOA4(아포지질단백질 A-IV), CDKN2A(사이클린 키나아제 저해제 2A(흑색종, p16, CDK4를 억제함)), FGF2(섬유아세포-의존 성장 인자 2(염기)), EDNRB(엔도텔린 수용체 유형 B), ITGA2(인테그린, 알파 2 (D49B, VLA-2 수용체의 알파 2 서브유닛)), CABIN1(칼시뉴린 결합 단백질 1), SHBG(성 호르몬-결합 글로불린), HMGB1(고-이동성 그룹 box 1), HSP90B2P(열 쇼크 단백질 90 kDa 베타 (Grp94), 멤버 2(위 유전자)), CYP3A4(사이토크롬 P450, 패밀리 3, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 4), GJA1(간극 결합 단백질, 알파 1, 43 kDa), CAV1 (카베올린 1, 소포 단백질, 22 kDa), ESR2(에스트로겐 수용체 2(ER 베타)), LTA(림프독소 알파(TNF 서브패밀리, 멤버 1)), GDF15(성장 분화 인자 15), BDNF(뇌-유래 신경영양 인자), CYP2D6(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 D, 폴리펩티드 6), NGF(신경 성장 인자(베타 폴리펩티드)), SP1(Sp1 전사 인자), TGIF1(TGFB-유도 인자 호메오박스 1), SRC(v-src 육종(Schmidt-Ruppin A-2) 바이러스 암유전자 상동체(조류)), EGF(상피 성장 인자(베타-유로가스트론)), PIK3CG(포스포이노시티드-3-키나아제, 촉매성, 감마 폴리펩티드), HLA-A(구조적합성 복합체, 클래스 I, A), KCNQ1(칼륨 전위-의존성 채널, KQT-유사 서브패밀리, 멤버 1), CNR1(칸나비노이드 수용체 1(뇌)), FBN1(피브릴린 1), CHKA(콜린 키나아제 알파), BEST1(베스트로핀 1), APP(아밀로이드 베타 (A4) 전구체 단백질), CTNNA1(카테닌 (카테린-연관 단백질), 베타 1, 88 kDa), IL2(인터류킨 2), CD36(CD36 분자(트롬보스폰딘 수용체)), PRKAB1(단백질 키나아제, AMP-활성화, 베타 1 비-촉매성 서브유닛), TPO(티로이드 퍼옥시다아제), ALDH7A1(알데히드 탈수소효소 7 패밀리, 멤버 A1), CX3CR1(케모카인(C-X3-C 모티프) 수용체 1), TH(티로신 수산화효소), F9(응고 인자 IX), GH1(성장 호르몬 1), TF(트랜스페린), HFE(혈색소증), IL17A(인터류킨 17A), PTEN(포스포타아제 및 텐신 상동체), GSTM1(글루타티온 S-트랜스페라제 mu 1), DMD(디스트로핀), GATA4(GATA 결합 단백질 4), F13A1(응고 인자 XIII, A1 폴리펩티드), TTR(트랜스티레틴), FABP4(지방산 결합 단백질 4, 지방세포), PON3(파라옥소나아제 3), APOC1(아포지질단백질 C-I), INSR(인슐린 수용체), TNFRSF1B(중양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 멤버 1B), HTR2A(5-히드록시트립타민 (세로토닌) 수용체 2A), CSF3(콜로니 자극 인자 3(과립구)), CYP2C9(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 C, 폴리펩티드 9), TXN(티오레독신), CYP11B2(사이토크롬 P450, 패밀리 11, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 2), PTH(파라티로이드 호르몬), CSF2(콜로니 자극 인자 2(과립구-마크로파아지)), KDR(키나아제 삽입 도메인 수용체(제III형 수용체 티로신 키나아제)), PLA2G2A(포스포리파아제 A2, 그룹 IIA(혈소판, 활액)), B2M(베타-2-마이크로글로불린), THBS1(트롬보스폰딘 1), GCG(글루카곤), RHOA(ras 상동체 유전자 패밀리, 멤버 A), ALDH2(알데히드 탈수소효소 2 패밀리(미토콘드리아)), TCF7L2(전사 인자 7-유사 2(T-세포 특이, HMG-box)), BDKRB2(브라디키닌 수용체 B2), NFE2L2(핵 인자(적혈구-유래 2)-유사 2), NOTCH1(Notch 상동체 1, 전좌-연관(초파리)), UGT1A1(UDP 글루쿠로노실트랜스페라제 1 패밀리, 폴리펩티드 A1), IFNA1(인터페론, 알파 1), PPARD(퍼옥시좀 증식체-활성화 수용체 델타), SIRT1(시르투인(휴지 교배형 정보 조절 2 상동체) 1 (S. 세레비시애)), GNRH1(성선 자극호르몬-배출 호르몬 1(황체형성-배출 호르몬)), PAPPA(임신-연관 혈장 단백질 A, 팜팔리신 1), ARRB3(아레스틴3, 레티날(X-아레스틴)), NPPC(나트륨이노 펩티드 전구체 C), AHSP(알파 헤모글로빈 안정화 단백질), PTK2(PTK2 단백질 티로신 키나아제 2), IL13(인터류킨 13), MTOR(라파마이신의 기계적 표적(세린/트레오닌 키나아제)), ITGB2(인테그린, 베타 2(보체 성분 3 수용체 3 및 4 서브유닛)), GSTT1(글루타티온 S-트랜스페라제 세

타 1), IL6ST(인터류킨 6 신호 트랜스듀서(gp130, 온코스타틴 M 수용체)), CPB2(카르복시펩티다아제 B2(혈장)), CYP1A2(사이토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 2), HNF4A(간세포 핵 인자 4, 알파), SLC6A4(용질 담체 패밀리 6(신경전달물질 운반체, 세로토닌), 멤버 4), PLA2G6(포스포리파아제 A2, 그룹 VI(시토졸성, 칼슘-의존성)), TNFSF11(종양 괴사 인자(리간드) 슈퍼패밀리, 멤버 11), SLC8A1(용질 담체 패밀리 8(나트륨/칼슘 교환체), 멤버 1), F2RL1(응고 인자 II(트롬빈) 수용체-유사 1), AKR1A1(알도-케토 환원효소 패밀리 1, 멤버 A1(알데하이드 환원효소)), ALDH9A1(알데히드 탈수소효소 9 패밀리, 멤버 A1), BGLAP(뼈 감마-카르복시글루타메이트(gla) 단백질), MTTP(마이크로솜 트리글리세리드 수송 단백질), MTRR(5-메틸테트라하이드로폴레이트-호모시스테인 메틸트랜스페라아제 환원효소), SULT1A3(술포트랜스페라아제 패밀리, 사이토졸, 1A, 페놀-선호, 멤버 3), RAGE(신장 종양 항원), C4B(보체 성분 4B (Chido 혈액형군), P2RY12(퓨린작동성 수용체 P2Y, G-단백질 커플링됨, 12), RNLS(레날라아제, FAD-의존 아민 옥시다아제), CREB1(cAMP 반응성 요소 결합 단백질 1), POMC(프로오피오멜라노코르틴), RAC1(ras-관련 C3 보툴리누스 toxin 기질 1(rho 패밀리, 작은 GTP 결합 단백질 Rac1)), LMNA(라민 NC), CD59(CD59 분자, 보체 조절 단백질), SCN5A(나트륨 채널, 전압-의존성, 유형 V, 알파 서브유닛), CYP1B1(사이토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1), MIF(마크로파아지 이동 저해 인자(글리코실화-저해 인자)), MMP13(매트릭스 메탈로펩티다아제 13(콜라게나아제 3)), TIMP2(TIMP 메탈로펩티다아제 저해제 2), CYP19A1(사이토크롬 P450, 패밀리 19, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 1), CYP21A2(사이토크롬 P450, 패밀리 21, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 2), PTPN22(단백질 티로신 포스파타아제, 비-수용체 유형 22(림프성)), MYH14(미오신, 중쇄 14, 비-근육), MBL2(만노스-결합 렉틴(단백질 C) 2, 가용성(음소닌 결합)), SELPLG(셀렉틴 P 리간드), AOC3(아민 옥시다아제, 구리 함유 3(혈관 점착 단백질 1)), CTSL1(카텝신 L1), PCNA(증식 세포 핵 항원), IGF2(인슐린-유사 성장 인자 2(소마토메딘 A)), ITGB1(인테그린, 베타 1(피브로블라스트 수용체, 베타 폴리펩티드, 항원 CD29는 MDF2, MSK12를 포함함)), CAST(칼파스타틴), CXCL12(케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 12(간질 세포-유래 인자 1)), IGHE(면역글로불린 중쇄 불변 엡실론), KCNE1(칼륨 전위-의존성 채널, Isk-관련 패밀리, 멤버 1), TFRC(트랜스페린 수용체(p90, CD71)), COL1A1(콜라겐, 유형 I, 알파 1), COL1A2(콜라겐, 유형 I, 알파 2), IL2RB(인터류킨 2 수용체, 베타), PLA2G10(포스포리파아제 A2, 그룹 X), ANGPT2(안지오펜에틴 2), PROCR(단백질 C 수용체, 내피(EPCR)), NOX4(NADPH 옥시다아제 4), HAMP(헵시딘 항균 펩티드), PTPN11(단백질 티로신 포스파타아제, 비-수용체 유형 11), SLC2A1(용질 담체 패밀리 2(축진된 글루코스 운송체), 멤버 1), IL2RA(인터류킨 2 수용체, 알파), CCL5(케모카인(C-C 모티프) 리간드 5), IRF1(인터페론 조절 인자 1), CFLAR(CASP8 및 FADD-유사 아포토시스 조절제), CALCA(칼시토닌-관련 폴리펩티드 알파), EIF4E(진핵 세포 번역 개시 인자 4E), GSTP1(글루타티온 S-트랜스페라아제 파이 1), JAK2(야누스 키나아제 2), CYP3A5(사이토크롬 P450, 패밀리 3, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 5), HSPG2(헤파란 설페이트 프로테오글리칸 2), CCL3(케모카인(C-C 모티프) 리간드 3), MYD88(골수 분화 원발성 반응 유전자(88)), VIP(혈관활성 장 펩티드), SOAT1(스테롤 O-아실트랜스페라아제 1), ADRBK1(아드레날린성, 베타, 수용체 키나아제 1), NR4A2(핵 수용체 서브패밀리 4, 그룹 A, 멤버 2), MMP8(매트릭스 메탈로펩티다아제 8(호중구 콜라게나아제)), NPR2(나트륨이노 펩티드 수용체 B/구아닐화 사이클라아제 B(심방나트륨이노성 펩티드 수용체 B)), GCH1(GTP 사이클로히드롤라아제 1), EPRS(글루타미드-프롤릴-tRNA 합성효소), PPARGC1A(퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 감마, 공동활성화제 1 알파), F12(응고 인자 XII(하계만 인자)), PECAM1(혈소판/내피 세포 부착 분자), CCL4(케모카인(C-C 모티프) 리간드 4), SERPINA3(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 A(알파-1 안티프로테이나아제, 안티트립신), 멤버 3), CASR(칼슘-감지 수용체), GJA5(간극 결합 단백질, 알파 5, 40 kDa), FABP2(지방산 결합 단백질 2, 장), TTF2(전사 종결 인자, RNA 중합효소 II), PROS1(단백질 S(알파)), CTF1(카디오트로핀 1), SGCB(사코글리칸, 베타(43 kDa 디스트로핀-연관 당단백질)), YME1L1(YME1-유사 1(S. 세레비시에)), CAMP(카텔리시딘 항균 펩티드), ZC3H12A(아연 핑거 CCCH-유형 함유 12A), AKR1B1(알도-케토 환원효소 패밀리 1, 멤버 B1(알도스 환원효소)), DES(데스민), MMP7(매트릭스 메탈로펩티다아제 7(마트릴리신, 자궁)), AHR(아릴 하이드로카본 수용체), CSF1(콜로니 자극 인자 1(마크로파아지)), HDAC9(히스톤 탈아세틸화효소 9), CTGF(연결 조직 성장 인자), KCNMA1(칼륨 큰 전도도 칼슘-활성화 채널, 서브패밀리 M, 알파 멤버 1), UGT1A(UDP 글루쿠로노실트랜스페라아제 1 패밀리, 폴리펩티드 A 복합체 유전자좌), PRKCA(단백질 키나아제 C, 알파), COMT(카테콜-.베타-.메틸트랜스페라아제), S100B(S100 칼슘 결합 단백질 B), EGR1(이른 성장 반응 1), PRL(프로락틴), IL15(인터류킨 15), DRD4(도파민 수용체 D4), CAMK2G(칼슘/칼모둘린-의존 단백질 키나아제 II 감마), SLC22A2(용질 담체 패밀리 22(유기 양이온 운반체), 멤버 2), CCL11(케모카인(C-C 모티프) 리간드 11), PGF(B321 태반 성장 인자), THPO(트롬보포이에틴), GP6(당단백질 VI(혈소판)), TACR1(타키키닌 수용체 1), NTS(뉴로텐신), HNF1A(HNF1 호메오박스 A), SST(소마토스타틴), KCND1(칼륨 전위-의존성 채널, Sha1-관련 서브패밀리, 멤버 1), LOC646627(포스포리파아제 저해제), TBXAS1(트롬복산 A 합성효소 1(혈소판)), CYP2J2(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 J, 폴리펩티드 2), TBXA2R(트롬복산 A2 수용체), ADH1C(알코올 탈수소효소 1C(클래스 I), 감마 폴리펩티드), ALOX12(아라키돈산 12-리폭시게나아제), AHSG(알파-

2-HS-당단백질), BHMT(베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라아제), GJA4(간극 결합 단백질, 알파 4, 37 kDa), SLC25A4(용질 담체 패밀리 25(미토콘드리아 담체; 아데닌 뉴클레오티드 전달체), 멤버 4), ACLY(ATP 시트레이트 리아제), ALOX5AP(아라키돈산 5-리폭시게나아제-활성화 단백질), NUMA1(핵 유사분열 기관 단백질 1), CYP27B1(사이토크롬 P450, 패밀리 27, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1), CYSLTR2(시스테인일 류코트리엔 수용체 2), SOD3(초과산화 디스무타아제 3, 세포외), LTC4S(류코트리엔 C4 합성효소), UCN(우로코르틴), GHRL(그렐린/오베스타틴 프리프로펩티드), APOC2(아포지질단백질 C-II), CLEC4A(C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4, 멤버 A), KBTBD10(kelch 반복 및 BTB(POZ) 도메인 함유 10), TNC(테나신 C), TYMS(티미딜산 합성효소), SHC1(SHC(Src 상동체 2 도메인 함유) 변형 단백질 1), LRP1(저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1), SOCS3(사이토카인 신호화 3의 억제제), ADH1B(알코올 탈수소효소 1B(클래스 I), 베타 폴리펩티드), KLK3(칼리크레인-관련 펩티다아제 3), HSD11B1(히드록시스테로이드(11-베타) 탈수소효소 1), VKORC1(비타민 K 에폭시드 환원효소 복합체, 서브유닛 1), SERPINB2(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 B(오브알부민), 멤버 2), TNS1(텐신 1), RNF19A(고리 핑거 단백질 19A), EPOR(에리트로포이에틴 수용체), ITGAM(인테그린, 알파 M(보체 성분 3 수용체 3 서브유닛)), PITX2(쌍-유사 호메오도메인 2), MAPK7(미토젠-활성화 단백질 키나아제 7), FCGR3A(IgG의 Fc 단편, 저 친화성 111a, 수용체 (CD16a)), LEPR(렙틴 수용체), ENG(엔도글린), GPX1(글루타티온 퍼옥시다아제 1), GOT2(글루타민-옥살로아세트산 트랜스아미나아제 2, 미토콘드리아성(아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 2)), HRH1(히스타민 수용체 H1), NR112(핵 수용체 서브패밀리 1, 그룹 I, 멤버 2), CRH(코르티코트로핀 배출 호르몬), HTR1A(5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1A), VDAC1(전압-의존 음이온성 채널 1), HPSE(헤파라나아제), SFTPD(계면활성 단백질 D), TAP2(운송체 2, ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 B (MDR/TAP)), RNF123(고리 핑거 단백질 123), PTK2B(PTK2B 단백질 티로신 키나아제 2 베타), NTRK2(신경영양 티로신 키나아제, 수용체, 유형 2), IL6R(인터류킨 6 수용체), ACHE(아세틸콜린에스테라아제(Yt 혈액형)), GLP1R(글루카곤-유사 펩티드 1 수용체), GHR(성장 호르몬 수용체), GSR(글루타티온 환원효소), NQO1(NAD(P)H 탈수소효소, 퀴논 1), NR5A1(핵 수용체 서브패밀리 5, 그룹 A, 멤버 1), GJB2(간극 결합 단백질, 베타 2, 26 kDa), SLC9A1(용질 담체 패밀리 9(나트륨/산소 교환체), 멤버 1), MAOA(모노아민 옥시다아제 A), PCSK9(프로단백질 전환효소 서브틸리신/렉신 유형 9), FCGR2A(IgG의 Fc 단편, 저 친화성 IIa, 수용체(CD32)), SERPINF1(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 F(알파-2 항플라스민, 색소 상피 유래 인자), 멤버 1), EDN3(엔도텔린 3), DHFR(디하이드로폴레이트 환원효소), GAS6(성장 저지-특이 6), SMPD1(스핑고미엘린 포스포디에스테라아제 1, 산 리소좀), UCP2(커플링되지 않은 단백질 2(미토콘드리아, 양성자 담체)), TFAP2A(전사 인자 AP-2 알파(활성화 증강제 결합 단백질 2 알파)), C4BPA(보체 성분 4 결합 단백질, 알파), SERPINF2(세르핀 펩티다아제 저해제, 클레이드 F(알파-2 항플라스민, 색소 상피 유래 인자), 멤버 2), TYMP(티미딘 포스포릴라아제ALPP(알칼리성 포스포타아제, 태반(리건 동질효소)), CXCR2(케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 2), SLC39A3(용질 담체 패밀리 39(아연 운송체), 멤버 3), ABCG2(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 G(WHITE), 멤버 2), ADA(아데노신 디아미나아제), JAK3(야누스 키나아제 3), HSPA1A(열 쇼크 70 kDa 단백질 1A), FASN(지방산 합성효소), FGF1(섬유아세포 성장 인자 1(산성)), F11(응고 인자 XI), ATP7A(ATPase, Cu++ 수송, 알파 폴리펩티드), CR1(보체 성분(3b/4b) 수용체 1(Knops 혈액형)), GFAP(신경교 섬유질 산성 단백질), ROCK1(Rho-연관, 휘감긴-코일 함유 단백질 키나아제 1), MECP2(메틸 CpG 결합 단백질 2(레트 증후군)), MYLK(미오신 경쇄 키나아제), BCHE(부티릴콜린에스테라아제), LIPE(리파아제, 호르몬-민감성), PRDX5(페록시레독신 5), ADORA1(아데노신 A1 수용체), WRN(베르너 증후군, RecQ 헬리카아제-유사), CXCR3(케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 3), CD81(CD81 분자), SMAD7(SMAD 패밀리 멤버 7), LAMC2(라미닌, 감마 2), MAP3K5(미토젠-활성화 단백질 키나아제 키나아제 키나아제 5), CHGA(크로모그라닌 A(부갑상선 분비 단백질 1)), IAPP(섬 아밀로이드 폴리펩티드), RHO(로돕신), ENPP1(엑토뉴클레오티드 피로포스포타아제/포스포디에스테라아제 1), PTHLH(파라티로이드 호르몬-유사 호르몬), NRG1(뉴레글린 1), VEGFC(혈관 내피 성장 인자 C), ENPEP(글루타미드 아미노펩티다아제(아미노펩티다아제 A)), CEBPB(CCAAT/인핸서 결합 단백질(C/EBP), 베타), NAGLU(N-아세틸글루코사미니다아제, 알파-), F2RL3(응고 인자 II(트롬빈) 수용체-유사 3), CX3CL1(케모카인(C-X3-C 모티프) 리간드 1), BDKRB1(브라디키닌 수용체 B1), ADAMTS13(트롬보스폰딘 유형 1 모티프를 갖는 ADAM 메탈로펩티다아제, 13), ELANE(엘라스타아제, 호중구 발현됨), ENPP2(엑토뉴클레오티드 피로포스포타아제/포스포디에스테라아제 2), CISH(사이토카인 유도 SH2-함유 단백질), GAST(가스트린), MYOC(미오실린, 섬유주대 유도 당질코르티코이드 반응), ATP1A2(ATPase, Na+/K+ 수송, 알파 2 폴리펩티드), NF1(뉴로피브로민 1), GJB1(간극 결합 단백질, 베타 1, 32 kDa), MEF2A(미오사이트 인핸서 인자 2A), VCL(빈쿨린), BMPR2(뼈 형태형성 단백질 수용체, 유형 II(세린/트레오닌 키나아제)), TUBB(튜불린, 베타), CDC42(세포 분할 주기 42(GTP 결합 단백질, 25 kDa)), KRT18(케라틴 18), HSF1(열 쇼크 전사 인자 1), MYB(v-myb 골수아세포 바이러스 암유전자 상동체(조류)), PRKAA2(단백질 키나아제, AMP-활성화, 알파 2 촉매 서브유닛), ROCK2(Rho-연관, 휘감긴-코일 함유 단백질 키나아제 2), TFPI(조직 인자 경로 저해제(지질단백질-연관 응고 저해제)), PRKG1(단백질 키나아제, cGMP-의존, 유형 I), BMP2(뼈 형태

형성 단백질 2), CTNND1(카테닌(카테린-연관 단백질), 델타 1), CTH(시스타티오나아제(시스타티오닌 감마-리아제)), CTSS(카텝신 S), VAV2(vav 2 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자), NPY2R(신경펩티드 Y 수용체 Y2), IGFBP2(인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 2, 36 kDa), CD28(CD28 분자), GSTA1(글루타티온 S-트랜스페라제 알파 1), PPIA(펩티딜프롤릴 아이소머라아제 A(시클로필린A)), APOH(아포지질단백질 H(베타-2-당단백질 I)), S100A8(S100 칼슘 결합 단백질 A8), IL11(인터류킨 11), ALOX15(아라키돈산 15-리폭시게나아제), FBLN1(피블린 1), NR1H3(핵 수용체 서브패밀리 1, 그룹 H, 멤버 3), SCD(스테아로일-CoA 불포화효소(델타-9-불포화효소)), GIP(위 저해 폴리펩티드), CHGB(크로모그라닌 B(세크레토그라닌 1)), PRKCB(단백질 키나아제 C, 베타), SRD5A1(스테로이드-5-알파-환원효소, 알파 폴리펩티드 1(3-옥소-5 알파-스테로이드 델타 4-탈수소효소 알파 1)), HSD11B2(히드록시스테로이드(11-베타) 탈수소효소 2), CALCRL(칼시토닌 수용체-유사), GALNT2(UDP-N-아세틸-알파-D- γ 갈락토사민: 폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스페라제 2(GalNAc-T2)), ANGPTL4(안지오펜에틴-유사 4), KCNN4(칼륨 중간/작은 전도도 칼슘-활성화 채널, 서브패밀리 N, 멤버 4), PIK3C2A(포스포이노시티드-3-키나아제, 클래스 2, 알파 폴리펩티드), HBEGF(헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자), CYP7A1(사이토크롬 P450, 패밀리 7, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 1), HLA-DRB5(구조적합성 복합체, 클래스 II, DR 베타 5), BNIP3(BCL2/아데노바이러스 E1B 19 kDa 상호작용 단백질 3), GCKR(글루코키나아제(핵소키나아제 4) 조절제), S100A12(S100 칼슘 결합 단백질 A12), PADI4(펩티딜 아르기닌 디아미나아제, 유형 IV), HSPA14(열 쇼크 70 kDa 단백질 14), CXCR1(케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 1), H19(H19, 각인된 모계 발현 전사(비-단백질 코딩)), KRTAP19-3(케라틴 연관 단백질 19-3), IDDM2(인슐린-의존 당뇨병 2), RAC2(ras-관련 C3 보툴리눔 독소 기질 2(rho 패밀리, 작은 GTP 결합 단백질 Rac2)), RYR1(리아노딘 수용체 1(골격)), CLOCK(클락 상동체(마우스)), NGFR(신경 성장 인자 수용체(TNFR 슈퍼패밀리, 멤버 16)), DBH(도파민 베타-수산화효소(도파민 베타-모노옥시게나아제)), CHRNA4(콜린성 수용체, 니코틴성, 알파 4), CACNA1C(칼슘 채널, 전압-의존, L 유형, 알파 1C 서브유닛), PRKAG2(단백질 키나아제, AMP-활성화, 감마 2 비-촉매 서브유닛), CHAT(콜린 아세틸트랜스페라제), PTGDS(프로스타글란딘 D2 합성효소 21 kDa(뇌)), NR1H2(핵 수용체 서브패밀리 1, 그룹 H, 멤버 2), TEK(TEK 티로신 키나아제, 내피), VEGFB(혈관 내피 성장 인자 B), MEF2C(미오사이트 인핸서 인자 2C), MAPKAPK2(미토젠-활성화 단백질 키나아제-활성화 단백질 키나아제 2), TNFRSF11A(종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 멤버 11a, NFkB 활성화제), HSPA9(열 쇼크 70 kDa 단백질 9(모르탈린)), CYSLTR1(시스테인일 류코트리엔 수용체 1), MAT1A(메티오닌 아데노실트랜스페라아제 I, 알파), OPR1(아편 수용체-유사 1), IMPA1(이노시톨(myo)-1(또는 4)-모노포스파타아제 1), CLCN2(클로라이드 채널 2), DLD(디하이드로리포아미드 탈수소효소), PSMA6(프로테아좀(프로솜, 마크로파인) 서브유닛, 알파 유형, 6), PSMB8(프로테아좀(프로솜, 마크로파인) 서브유닛, 베타 유형, 8(큰 다작용성 펩티다아제 7)), CHI3L1(키티나아제 3-유사 1(연골 당단백질-39)), ALDH1B1(알데히드 탈수소효소 1 패밀리, 멤버 B1), PARP2(폴리(ADP-리보스) 중합효소 2), STAR(스테로이드성 급성 조절 단백질), LBP(지질다당류 결합 단백질), ABCC6(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 C(CFTR/MRP), 멤버 6), RGS2(G-단백질 신호화 2의 조절제, 24 kDa), EFN2(에피린-B2), GJB6(간극 결합 단백질, 베타 6, 30 kDa), APOA2(아포지질단백질 A-II), AMPD1(아데노신 모노포스페이트 디아미나아제 1), DYSF(디스페린, 사지 연결 근육 퇴행위축 2B(상염색체 열성)), FDF1T1(파네실-디포스페이트 파네실트랜스페라제 1), EDN2(엔도텔린 2), CCR6(케모카인(C-C 모티프) 수용체 6), GJB3(간극 결합 단백질, 베타 3, 31 kDa), IL1RL1(인터류킨 1 수용체-유사 1), ENTPD1(엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드로라아제 1), BBS4(바데트-비들 증후군 4), CELSR2(카테린, EGF LAG 세븐-패스 G-유형 수용체 2(플라밍고 상동체, 초파리)), F11R(F11 수용체), RAPGEF3(Rap 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF) 3), HYAL1(히알루론글루코사미니다아제 1), ZNF259(아연 핑거 단백질 259), ATOX1(ATX1 황산화 단백질 1 상동체(효모)), ATF6(활성화 전사 인자 6), KHK(케토핵소키나아제(프록토키나아제)), SAT1(스페르미딘/스페르민 N1-아세틸트랜스페라아제 1), GGH(감마-글루타밀 가수분해효소(콘쥬가아제, 폴립롤리감마글루타미드 가수분해효소)), TIMP4(TIMP 메탈로펩티다아제 저해제 4), SLC4A4(용질 담체 패밀리 4, 중탄산수소나트륨 공동운송체, 멤버 4), PDE2A(포스포디에스테라아제 2A, cGMP-자극됨), PDE3B(포스포디에스테라아제 3B, cGMP-저해됨), FADS1(지방산 불포화효소 1), FADS2(지방산 불포화효소 2), TMSB4X(티모신 베타 4, X-연결됨), TXNIP(티오레독신 상호작용 단백질), LIMS1(LIM 및 노쇠 세포 항원-유사 도메인 1), RHOB(ras 상동체 유전자 패밀리, 멤버 B), LY96(립프구 항원 96), FOXO1(포크헤드 박스 O1), PNPLA2(파타틴-유사 포스포리파아제 도메인 함유 2), TRH(티로트로핀-방출 호르몬), GJC1(간극 결합 단백질, 감마 1, 45 kDa), SLC17A5(용질 담체 패밀리 17(음이온/당 전달체), 멤버 5), FTO(지방량 및 비만 연관), GJD2(간극 결합 단백질, 델타 2, 36 kDa), PSRC1(프롤린/세린-풍부 휘감긴-코일 1), CASP12(카파아제 12 (유전자/위유전자)), GPBAR1(G 단백질-커플링 담즙산 수용체 1), PXX(PX 도메인 함유 세린/트레오닌 키나아제), IL33(인터류킨 33), TRIB1(트리블스 상동체 1(초파리)), PBX4(전구-B-세포 백혈병 호메오박스 4), NUPR1(핵 단백질, 전사 조절제, 1), 15-Sep(15 kDa 셀레노단백질), CILP2(연골 중간층 단백질 2), TERC(텔로머라아제 RNA 성분), GGT2(감마-글루타미드트랜스페라제 2), MT-CO1(미토콘드리아 인코딩된 사이토

크롬 c 옥시다아제 I), 및 UOX(요산염 옥시다아제, 위유전자).

- [0588] 추가 구현예에서, 염색체 서열은 Pon1(과라옥소나아제 1), LDLR(LDL 수용체), ApoE(아포지질단백질 E), Apo B-100(아포지질단백질 B-100), ApoA(아포지질단백질(a)), ApoA1(아포지질단백질 A1), CBS(시스타틴은 B-합성효소), 글리코단백질 IIb/IIb, MTHRF(5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소(NADPH)), 및 이들의 조합으로부터 추가로 선별될 수 있다. 일 반복에서, 심혈관 질병에 관련된 염색체 서열 및 염색체 서열에 의해 인코딩되는 단백질은 Cacnalc, Sod1, Pten, Ppar(알파), Apo E, 렙틴, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 폐
- [0589] 본 발명 또한 하나 또는 둘 모두의 폐로 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다.
- [0590] AAV-2-기저 벡터가 CF 기도로 CFTR 전달을 위해 원래 제안되었지만, AAV-1, AAV-5, AAV-6, 및 AAV-9와 같은 다른 혈청형이 다양한 폐 상피 모델에서 개선된 유전자 이송 효율을 나타낸다(예를 들어, 문헌[Li et al., Molecular Therapy, vol. 17 no. 12, 2067-2077 Dec 2009]을 참조하라). 생체내 AAV-1 형질도입된 뮤린 기관 기도가 AAV-5와 동일한 효율을 갖지만, 내피 AAV-1 실험관내 형질도입 인간 기도 상피 세포에서 AAV-2 및 AAV-5 보다 100배까지 더 효율적일 수 있음이 입증되었다. 다른 연구는 실험관내 인간 기도 상피(HAE)로의 유전자 전달에서 AAV-5가 AAV-2보다 50배 더 효율적이고 생체내 마우스 폐 기도 상피에서는 상당히 더 효율적임을 보였다. AAV-6은 또한 실험관내 인간 기도 상피 세포 및 생체내 뮤린 기도에서 AAV-2보다 더 효율적임을 보였다. 더 최근의 분리체인 AAV-9는 9개월에 걸쳐 탐지된 유전자 발현을 갖는 생체내 뮤린 코 및 치조 상피에서 AAV-5보다 더 우수한 유전자 이송 효율을 나타냄을 보였으며, 이는 AAV가 CFTR 유전자 전달 벡터를 위해 요망되는 특성인 생체내 장기간 유전자 발현이 가능하게 할 수 있음을 제안한다. 더욱이, AAV-9는 CFTR 발현의 손실 및 최소 면역 결과를 갖는 뮤린 폐로 재투여될 수 있음을 입증하였다. CF 및 비-CF HAE 배양은 몇 시간 동안 100 μl의 AAV 벡터가 정점 표면 상에 접종될 수 있다(예를 들어, 문헌[Li et al., Molecular Therapy, vol. 17 no. 12, 2067-2077 Dec 2009]을 참조하라). MOI는 바이러스 농도 및 실험 목적에 의존하여 1×10^3 내지 4×10^5 벡터 계승/세포로 변한다. 상기 인용된 벡터는 본 발명의 전달 및/또는 투여를 위해 고려된다.
- [0591] Zamora 등은 RNA 간섭 치료제의 인간 감염 질병의 치료 및 또한 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)-감염 폐 이식 수령인에서 항바이러스 약물의 무작위 시험으로의 적용의 예를 보고했다(Am J Respir Crit Care Med Vol 183. pp 531-538, 2011). Zamora 등은 RSV 호흡관 감염을 갖는 LTX 수령자에서 임의, 이중-맹검, 플라시보조절 시험을 실시했다. 환자는 RSV에 대해 표준 관리를 받았다. 에어로졸화 ALN-RSV01 (0.6 mg/kg) 또는 위약이 3일 동안 매일 투여됐다. 이 연구는 RSV를 표적화하는 RNAi 치료제가 RSV 감염을 갖는 LTX 수령자에 안전하게 투여될 수 있음을 입증한다. ALN-RSV01의 3회 일일 용량은 호흡관 증상 또는 폐 기능의 장애의 임의의 악화를 야기하지 않았으며 사이토카인 또는 CRP의 유도과 같은 임의의 전신성 염증전 효과를 나타내지 않았다. 약동학은 흡인 후 낮은 일시적인 전신성 노출만을 보였으며, 이는 정맥내 또는 흡입으로 투여된 ALN-RSV01이 엑소뉴클레아제 매개 소화 및 신장 배출을 통해 순환으로부터 신속하게 청소됨을 보이는 임상전 동물 데이터와 일치하는 것이다. Zamora 등의 방법은 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있으며 에어로졸화 CRISPR Cas는 예를 들어, 0.6 mg/kg의 용량으로, 본 발명에 대해 고려될 수 있다.
- [0592] CFTRdelta508 키메라 가이드 RNA는 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 사용하여 낭포성 섬유증 또는 낭포성 섬유증(CF) 관련 증상을 앓고 있는 치료를 필요로 하는 대상체 또는 환자의 기도에서의 CRISPR-Cas 시스템의 유전자 이송 또는 유전자 전달을 위해 사용되었다. 이 수복 전략은 낭포성 섬유증 델타 F508 돌연변이에 대한 사용을 예시한다. 이 유형의 전략은 모든 생물에 적용할 수 있을 것이다. 특히 CF에 관해서, 적합한 환자는 하기를 포함할 수 있다: 인간, 비-영장류 인간, 개, 고양이과, 소, 말 및 그외 가축. 출원인은 deltaF508 또는 다른 CFTR-유도 돌연변이를 표적화하기 위해 Cas9 효소를 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 사용하였다.
- [0593] 이 예시에서 치료 받은 대상체는 자연스럽게 호흡하는 동안 기관지내로 전달되도록 폐에 대하여 약학적 유효량의 에어로졸화 AAV 벡터 시스템을 받는다. 이와 같이 에어로졸화 전달이 일반적으로 AAV 전달에 바람직하다. 아데노바이러스 또는 AAV 입자는 전달을 위해 사용될 수 있다. 각각 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 적합한 유전자 작제물은 전달 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 이 실례에서, 하기 작제물이 예로서 제공된다: Cas9에 대해 Cbh 또는 EF1a 프로모터, 키메라 가이드 RNA에 대해 U6 또는 H1 프로모터; 바람직한 배열은 임의로 하나 이상의 핵 국소화 신호 또는 서열(들)(NLS(들)), 예를 들어, 두(2) 개의 NLS와 함께 키메라 가이드를 표적화하는 CFTRdelta508, deltaF508 돌연변이를 위한 수복 주형 및 Cas9 효소에 대해 최적화된 코돈(바람직한 Cas9는 뉴클레아제 또는 니카아제 활성을 갖는 것임)을 사용한다. NLS가 없는 작제물 또한 구상된다.
- [0594] Cas9 표적 부위를 확인하기 위해, 출원인은 인간 CFTR 게놈 유전자좌를 분석하여 Cas9 표적 부위를 확인했다.

바람직하게는, 일반적으로 그리고 이 CF 경우에서, PAM은 NGG 또는 NNAGAAW 모티프를 포함할 수 있다.

- [0595] 따라서, CF의 경우에서, 본 발명의 방법은 조성물의 발현을 위해 조성물을 작동 가능하게 인코딩하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생하거나 조작된 조성물을 전달하는 단계를 포함하는, 관심 게놈 유전자좌 내의 표적 서열의 조작을 포함하며, 여기에서 조성물은 하기를 포함한다:
- [0596] 하기를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 벡터 시스템을 포함하는 비-천연 발생 또는 조작된 조성물
- [0597] I. CRISPR-Cas 시스템 키메라 RNA(chiRNA) 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소로서, 폴리뉴클레오티드 서열은 하기를 포함함
- [0598] (a) 적합한 포유류 세포 내의 CF 표적 서열에 혼성화할 수 있는 가이드 서열,
- [0599] (b) tracr 메이트 서열, 및
- [0600] (c) tracr 서열, 및
- [0601] II. 적어도 하나 이상의 핵 국소화 서열을 포함하는 효소-코딩 서열 인코딩 CRISPR 효소에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소,
- [0602] 여기에서 (a), (b) 및 (c)는 5'에서 3' 방향으로 배열된 것이고,
- [0603] 성분 I 및 II은 시스템의 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치하고,
- [0604] 전사됐을 때, tracr 메이트 서열은 tracr 서열에 혼성화되고 가이드 서열은 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하며,
- [0605] 여기에서 CRISPR 복합체는 (1) 표적 서열에 혼성화된 가이드 서열, 및 (2) tracr 서열에 혼성화된 tracr 메이트 서열과 복합된 CRISPR 효소를 포함한다. CF에 관하여, 바람직한 표적 DNA 서열은 CFTRdelta508 돌연변이를 포함한다. 바람직한 PAM은 상기 기재된다. 바람직한 CRISPR 효소는 임의의 Cas이다. CF에 대한 대안은 임의의 유전 장애를 포함하며 이들의 예는 널리 공지되었다. 본 발명의 다른 바람직한 방법 또는 용도는 라포라병에 연관된 것으로 확인된 EMP2A 및 EMP2B 유전자에서의 결함을 교정하는 것이다.
- [0606] 몇몇 구현예에서, "가이드 서열"은 "가이드 RNA"과 구별될 수 있다. 가이드 서열은 표적 부위에 특이적인 가이드 RNA 내의 대략 20bp 서열을 나타낼 수 있다. 몇몇 구현예에서, Cas9는 SpCas9이다(또는 이로부터 유래된 것이다). 이러한 구현예에서, 바람직한 돌연변이는 SpCas9의 위치 10, 762, 840, 854, 863 및/또는 986 또는 다른 Cas9에서 상응하는 위치(예를 들어 표준 서열 비교 도구에 의해 확인될 수 있음) 중 임의의 위치 또는 모든 위치에 있다. 특히, 임의의 또는 모든 하기 돌연변이가 SpCas9에서 바람직하다: D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A; 뿐만 아니라 임의의 대체 아미노산에 대한 보존 치환 또한 구상된다. 다른 Cas9의 상응하는 위치에서의 동일한 것(또는 이들 돌연변이의 보존 치환)이 또한 바람직하다. SpCas9에서 D10 및 H840이 특히 바람직하다. 그러나, 다른 Cas9에서, SpCas9에 상응하는 잔기인 D10 및 H840 또한 바람직하다. 이들은 니카아제 활성을 제공하기 때문에 유리하다. 이러한 돌연변이는 CF의 치료뿐만 아니라, 본 발명의 모든 양태에 적용될 수 있다. Schwank 등은 인간 줄기 세포에서 낭포성 섬유증과 연관된 결함을 교정하기 위해 CRISPR/Cas9를 사용했다(Cell Stem Cell, 13:653-58, 2013). 이 팀의 표적은 이온 채널을 위한 유전자인, 낭포성 섬유증 막투과 전도체 수용체(CFTR). CFTR에서의 결실은 낭포성 섬유증 환자에서 단백질의 미스폴딩을 발생시킨다. 낭포성 섬유증을 갖는 2명의 아동으로부터의 세포 시료로부터 발생된 배양된 장 줄기 세포를 사용하여, Schwank 등은 삽입될 수복 서열을 함유하는 공여 플라스미드와 함께 CRISPR을 사용하여 교정할 수 있었다. 그런 다음, 연구자들은 세포를 장 "오르가노이드," 또는 소형 소화관으로 성장시켰으며, 이들이 정상적으로 작용함을 보였다. 이러한 경우에서, 클론성 오르가노이드의 대략 절반이 적절한 유전 교정을 겪었다.
- [0607] 근육
- [0608] 본 발명은 또한 근육(들)에 CRISPR-Cas 시스템을 전달하는 것을 고려한다.
- [0609] Bortolanza 등은 안면견갑상완근 이영양증 (FSHD)의 발병 후 FRG1 마우스에서의 RNA 간섭 발현 카세트의 전신 전달이 독성의 징조 없이 용량-의존성 장기간 FRG1 낙다운을 이끌어냄을 보였다(Molecular Therapy vol. 19 no. 11, 2055-2064 Nov. 2011). Bortolanza 등은 5×10^{12} vg의 rAAV6-sh1FRG1의 단일 정맥내 주입이 FRG1 마우스의 근육 조직병리학 및 근육 기능을 구제함을 발견했다. 상세하게는, 200 μ l 생리학적 용액 중 2×10^{12} 또는 $5 \times$

10^{12} vg의 벡터가 25-게이지 Terumo 주사기를 사용하여 꼬리 정맥으로 주입되었다. Bortolanza 등의 방법은 CRISPR Cas를 발현하는 AAV에 적용될 수 있으며 약 2×10^{15} 또는 2×10^{16} vg 용량의 벡터로 인간에게 투여될 수 있다.

[0610] Dumonceaux 등은 미오스타틴 수용체 AcvRIIb mRNA(sh-AcvRIIb)에 대한 RNA 간섭의 기술을 사용하여 미오스타틴 경로를 저해한다(Molecular Therapy vol. 18 no. 5, 881-887 May 2010). 유사-디스트로핀의 복구는 벡터화 U7 엑손-스키핑 기술(U7-DYS)에 의해 매개되었다. sh-AcvRIIb 작제물 단독, U7-DYS 작제물 단독, 또는 두 작제물의 조합을 나르는 아테노-관련 벡터는 mdx 마우스의 전경골근(TA) 근육으로 주입되었다. 주입은 10^{11} AAV 바이러스 게놈으로 실행되었다. Dumonceaux 등의 방법은 CRISPR Cas를 발현하는 AAV에 적용될 수 있으며 인간에게 예를 들어, 약 10^{14} 내지 약 10^{15} vg 용량의 벡터로 주입될 수 있다.

[0611] Kinouchi 등은 아텔로콜라겐(ATCOL)을 갖는 화학적으로 비변형된 siRNA의 나노입자 형성을 통해 정상 또는 질병에 걸린 마우스의 골격근으로의 생체내 siRNA 전달의 효능을 보고한다(Gene Therapy (2008) 15, 1126-1130). 마우스 골격근 또는 정맥내로 골격근 성장의 음성 조절자인 미오스타틴을 표적화하는 siRNA의 ATCOL-매개 국소 적용은 적용 몇 주 후 내에 근육량의 증가를 초래했다. 이들 결과는 siRNA의 ATCOL-매개 적용이 근육위축증을 포함하는 질병에 대한 미래의 치료적 용도를 위한 강력한 도구임을 시사한다. Mst-siRNA(최종 농도, 10 mM)는 제조업자의 지시에 따라 ATCOL(국소 투여를 위한 최종 농도, 0.5%)(AteloGene, Kohken, Tokyo, Japan)와 혼합되었다. 넴뷰탈(25 mg/kg, i.p.)에 의한 마우스(20-주령 수컷 C57bL/6)의 마취 후, Mst-siRNA/ATCOL 복합체는 교근 및 대퇴이두근 근육으로 주입되었다. Kinouchi 등의 방법은 CRISPR Cas에 적용될 수 있으며 인간에게, 예를 들어, 40 μ M 용액의 약 500 내지 1000 ml의 용량으로 근육에 주입된다.

[0612] Hagstrom 등은 포유류의 다리 근육을 통해 근육 세포(근섬유)로 핵산의 유효하고 반복가능한 전달이 가능한 혈관내, 비바이러스 방법을 기재한다(Molecular Therapy Vol. 10, No. 2, August 2004). 과정은 지혈대 또는 혈압 측정용 커프스에 의해 일시적으로 분리된 다리의 말단 정맥으로 네이키드 플라즈미드 DNA 또는 siRNA의 주입을 포함한다. 근섬유로의 핵산 전달은 근육 조직으로 핵산 용액이 유출되기에 충분한 부피로 이의 신속한 주입을 가능하게 한다. 골격근에서의 높은 수준의 트랜스유전자 발현은 최소 독성을 갖는 작은 동물 및 큰 동물 모두에서 달성된다. 다리 근육으로의 siRNA 전달 증거 또한 획득되었다. 붉은털 원숭이로의 플라즈미드 DNA 정맥내 주입에서, 삼방활전은 각각 단일 주사기로 로딩된 2개의 주사기 펌프(모델 PHD 2000; Harvard Instruments)에 연결되었다. 파파베린 주입 5분 후, pDNA (40 내지 100 ml 식염수 중 15.5 내지 25.7 mg)는 1.7 또는 2.0 ml/s의 비율로 주입되었다. 이는 본 발명의 CRISPR Cas를 발현하는 플라즈미드 DNA를 위해 인간에 대해 800 내지 2000 ml 식염수 약 300 내지 500 mg의 주입으로 규모가 커질 수 있다. 래트에서의 아테노바이러스 벡터 주입에서, 2×10^9 전염성 입자는 3 ml의 생리 식염수(NSS)로 주입되었다. 이는 본 발명의 CRISPR Cas를 발현하는 플라즈미드 DNA를 위해 인간에 대해 10의 NSS로 주입되는 약 1×10^{13} 전염성 입자의 주입으로 규모가 커질 수 있다. siRNA에서, 래트는 12.5 μ g의 siRNA로 대복재 정맥에 주입되었으며 영장류는 대복재 정맥에 750 μ g의 siRNA가 주입되었다. 이는 본 발명의 CRISPR Cas를 위해 예를 들어, 인간의 대복재 정맥으로 약 15 내지 약 50 mg의 주입으로 규모가 커질 수 있다.

[0613] 피부

[0614] 본 발명은 또한 피부로의 CRISPR-Cas 시스템의 전달을 고려한다. Hickerson 등의 문헌은 인간 및 무린 피부로 자가-전달(sd)-siRNA를 전달하기 위한 전동 마이크로니들 어레이 스킨 전달 장치에 관한 것이다(Molecular Therapy-Nucleic Acids (2013) 2, e129). siRNA-기반 피부 치료제가 임상으로 바뀌기 위한 주된 도전은 효과적인 전달 시스템의 개발이다. 다양한 피부 전달 기술에서의 상당한 노력이 쏟아졌으나 제한된 성공만을 거두었다. 피부가 siRNA로 치료되는 임상 연구에서, 피하 주사 주입과 연관된 강렬한 통증이 추가 환자의 등록을 불가능하게 하였으며, 이는 개선되며 좀더 "환자-친화적인"(즉, 적은 통증 또는 무통증) 전달 접근법에 대한 요구를 강조하는 것이다. 마이크로니들은 초기 장벽인 각질층을 거쳐 siRNA를 포함하는 대전하 카고를 전달하는 효과적인 방식을 대표하며, 일반적으로 통상적인 피하 주사보다 통증이 덜한 것으로 간주된다. Hickerson 등에 의해 사용된 동력화 마이크로니들 어레이(MMNA) 장치를 포함하는, 동력화 "스탬프 유형" 마이크로니들 장치는 무모 마우스 연구에서 안전함을 보였으며 (i) 미용 산업에서의 광범위한 사용 및 (ii) 모든 지원자들이 독감 예방주사보다 훨씬 적은 통증으로 장치를 사용함을 발견한 제한된 시험에 의해 입증된 바와 같이 적은 통증 또는 무통증을 초래하며, 이는 이 장치를 사용하는 siRNA 전달이 피하 주사 주입을 사용한 이전 임상 시험에 경험했던 것보다 훨씬 더 적은 통증을 야기할 수 있음을 제안하는 것이다. MMNA 장치(Bomtech Electronic Co(Seoul,

South Korea)에 의해 Triple-M 또는 Tri-M로서 판매됨)는 마우스 및 인간 피부로의 siRNA 전달을 위해 적응되었다. sd-siRNA 용액(300 µl까지의 0.1 mg/ml RNA)은 0.1 mm 깊이로 세팅된 일회용 Tri-M 니들 카트리지(Bomtech)의 챔버 내로 도입되었다. 인간 피부를 치료하기 위해, 익명인 데이터의 피부(수술 과정 후 즉시 수득됨)는 치료 전에 수동으로 늘리고 코르크 플랫폼에 핀으로 고정시켰다. 모든 피내 주입은 28-게이지 0.5-인치 바늘을 갖는 인슐린 주사기를 사용해 실행되었다. Hickerson 등의 MMNA 장치 및 방법은 본 발명의 CRISPR Cas, 예를 들어, 피부에 300 µl까지의 용량으로 0.1 mg/ml CRISPR Cas를 전달하기 위해 사용되고 그리고/또는 적용될 수 있다.

[0615] Leachman 등의 문헌은 피부에 제1 짧은 간섭 RNA(siRNA)-기반 치료제를 사용하여 장애성 발바닥 각피증을 포함하는 상염색체 우성 증후군인 흔하지 않은 피부 장애 선천성 경조증(PC)의 치료를 위한 Ib상 임상 시험에 관한 것이다(Molecular Therapy, vol. 18 no. 2, 442-446 Feb. 2010). TD101로 명명된 이 siRNA는 야생형 K6a mRNA 없이 케라틴 6a(K6a) N171K 돌연변이체 mRNA를 특이적으로 그리고 강력하게 표적화한다. 용량-단계적 확대 스케줄은 하기에 나타냈다:

주	용량 번호	일	부피 (ml)	TD101의 농도 (µg/ml)	총 용량 TD101 (mg)
1	1-2	1-7	0.1	1.0	0.10
2	3-4	8-14	0.25	1.0	0.25
3	5-6	15-21	0.50	1.0	0.50
4	7-8	22-28	1.0	1.0	1.0
5	9-10	29-35	1.5	1.0	1.5
6	11-12	36-42	2.0	1.0	2.0
7	13-14	43-49	2.0	1.5	3.0
8	15-16	50-56	2.0	2.0	4.0
9	17-18	57-63	2.0	2.5	5.0
10	19-20	64-70	2.0	3.0	6.0
11	21-22	71-77	2.0	3.5	7.0
12	23-24	78-84	2.0	4.0	8.0
13	25-26	85-91	2.0	4.5	9.0
14	27-28	92-98	2.0	5.0	10.0
15	29-30	99-105	2.0	6.0	12.0
16	31-32	106-112	2.0	7.0	14.0
17	33	113-119	2.0	8.5	17.0

[0616] 초기에, TD101 또는 비히클 단독(갈슘 또는 마그네슘이 없는 돌베코 인산염 완충 식염수)의 1.0 mg/ml 용액 중 0.1 ml이 대칭적 균은살에 주입되었다. 6개의 증가 용량-부피가 증가에 대한 부작용 없이 완료되었다: 주입 당 TD101 용액의 1.0 mg/ml 용액의 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 및 2.0 ml. 가장 높게 계획된 부피(2.0 ml)는 잘 견뎠으며, 그 후 TD101의 농도는 1 mg/ml로부터 8.5 mg/ml의 최종 농도까지 매주 증가하였다. 유사한 용량이 케라틴 6a(K6a) N171K 돌연변이체 mRNA를 특이적이고 강력하게 표적화하는 CRISPR Cas의 투여를 위해 고려된다.

[0618] Zheng 등은 구형의 핵산 나노입자 접합체(SNA-NCs)인 고도로 지향적인 공유적으로 고정화된 siRNA의 밀집된 셀로 싸인 금 코어는 적용 후 몇 시간 내에 실험관내 각질세포, 마우스 피부 및 인간 표피를 거의 100% 자유롭게 투과함을 보였다(PNAS, July 24, 2012, vol. 109, no. 30, 11975-11980). Zheng 등은 60시간 동안 25 nM의 표피 성장 인자 수용체(EGFR) SNA-NC의 단일 적용이 인간 피부에서의 효과적인 유전자 낙다운을 입증함을 설명했다. 유사한 용량이 피부로의 투여를 위해 SNA-NC에 고정된 CRISPR Cas에 대해 고려될 수 있다.

[0619] 핵산, 아미노산 및 단백질, 조직 서열, 벡터 등

[0620] 핵산, 아미노산 및 단백질: 본 발명은 표적 DNA 서열과 결합할 수 있는 핵산을 사용한다. 이것은 핵산이 단백질보다 생산하기 훨씬 더 용이하고 저렴하며, 상동성이 추구되는 스트레치의 길이에 따라 특이성이 변화될 수 있기 때문에 유익하다. 예를 들어, 다중 핑거의 복합체 3-D 배치는 필요하지 않다. 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환 가능하게 사용된다. 그것들은 임의의 길이의 뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중 어느 하나, 또는 그의 유사체의 중합체 형태를 말한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있으며, 기지의 또는 미지의 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관 분석으로부터 정의된 유전자좌들(유전자좌), 엑손, 인트론, 전령 RNA(mRNA), 운반 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라즈미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 또한, 상기 용어는 합성 백분이 있는 핵산-유사 구조를 포함하며, 예를 들어, 문헌[Eckstein, 1991]; 문헌[Baserga et al., 1992]; 문헌[Milligan, 1993]; WO 97/03211호; WO 96/39154

호; 문헌[Mata, 1997]; 문헌[Strauss-Soukup, 1997]; 및 문헌[Samstag, 1996]을 참조한다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형이 존재한다면, 중합체의 어셈블리 전에 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비뉴클레오티드 성분에 의해 단속될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예를 들어, 표지화 성분과의 컨주게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "야생형"은 해당 분야의 숙련자에 의해 이해되는 해당 분야의 용어이며, 그것이 돌연변이체 또는 변이체로부터 구별되는 정도로 천연에서 발생하는 것과 같은 전형적인 형태의 유기체, 균주, 유전자 또는 특징을 의미한다. "야생형"은 기준선일 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "변이체"는 천연에서 발생하는 것에서 벗어난 패턴을 갖는 특질의 표현을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 용어 "비-천연 발생" 또는 "조작된"은 상호교환 가능하게 사용되며, 인간의 손의 개입을 나타낸다. 상기 용어는 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 대하여 언급되는 경우, 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 그들이 천연에서 천연적으로 회합되어 있고, 천연에서 관찰되는 적어도 하나의 다른 성분이 적어도 실질적으로 없음을 의미한다. "상보성"은 통상의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍형성 또는 기타 비-통상적 유형에 의해 다른 핵산 서열과 수소 결합(들)을 형성하는 핵산의 능력을 지칭한다. 상보성 백분율은 제2 핵산 서열과 수소 결합(예를 들어, 왓슨-크릭 염기 쌍형성)을 형성할 수 있는 핵산 분자 내의 잔기의 백분율을 나타낸다 (예를 들어, 10개 중 5, 6, 7, 8, 9, 10개는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 상보성임). "완전한 상보성"은 핵산 서열의 모든 연속 잔기가 동일한 수의 제2 핵산 서열 내의 연속 잔기와 수소 결합할 것임을 의미한다. 본원에 사용되는 바와 같이, "실질적인 상보성"은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 뉴클레오티드의 영역에 걸쳐 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 상보성 정도를 지칭하거나, 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 2개의 핵산을 지칭한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 혼성화를 위한 "엄격한 조건"은 표적 서열에 대하여 상보성을 갖는 핵산 서열이 대개 표적 서열과 혼성화하며, 비-표적 서열에는 실질적으로 혼성화하지 않는 조건을 지칭한다. 엄격한 조건은 일반적으로 서열-의존적이며, 다수의 요인에 따라 달라진다. 일반적으로, 서열이 길수록, 서열이 그의 표적 서열에 특이적으로 혼성화하는 온도가 더 높아진다. 엄격한 조건의 비제한적인 예는 문헌[Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y.]에 상세히 기재되어 있다. 폴리뉴클레오티드 서열이 언급될 때, 상보성 또는 부분 상보성 서열도 생각된다. 이들은 바람직하게 높은 엄격성 조건하에 기준 서열에 혼성화할 수 있다. 일반적으로, 혼성화 비율을 최대화하기 위해서, 상대적으로 낮은 엄격성 혼성화 조건이 선택된다: 열 용점(T_m)보다 약 20 내지 25 낮은 온도. T_m은 특정 표적 서열의 50%가 규정된 이온 세기와 pH에서 용액 중에서 완전히 상보성인 프로브와 혼성화하는 온도이다. 일반적으로, 혼성화된 서열의 적어도 약 85% 뉴클레오티드 상보성을 요구하기 위해서, 높은 엄격성 세척 조건은 T_m보다 약 5 내지 15 낮도록 선택된다. 혼성화된 서열의 적어도 약 70% 뉴클레오티드 상보성을 요구하기 위해서, 중등의 엄격성 세척 조건은 T_m보다 약 15 내지 30 낮도록 선택된다. 아주 관대한(매우 낮은 엄격성) 세척 조건은 T_m보다 50 정도 낮을 수 있으며, 이것은 혼성화된 서열들 간에 높은 수준의 미스매칭을 허용한다. 해당 분야의 숙련자는 표적 서열과 프로브 서열 간 상동성의 특정 수준으로부터 검출 가능한 혼성화 신호의 결과에 영향을 미치기 위해서 혼성화 및 세척 단계에서 다른 물리화학적 변수들도 변경될 수 있다는 것을 인정할 것이다. 바람직한 높은 엄격성 조건은 42에서 50% 포름아미드, 5xSSC, 및 1% SDS 인큐베이션, 또는 65°C에서 5xSSC 및 1% SDS 인큐베이션과 65°C에서 0.2xSSC 및 0.1% SDS 세척을 포함한다. "혼성화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 반응하여, 복합체를 형성하고, 이 복합체는 뉴클레오티드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨 크릭 염기 쌍형성, 후그스타인(Hoogsteen) 결합 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 발생할 수 있다. 복합체는 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일의 자가 혼성화 가닥 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 PCR의 개시 또는 효소에 의한 폴리뉴클레오티드의 절단과 같은 보다 광범위한 과정에서 하나의 단계를 이룰 수 있다. 주어진 서열과 혼성화할 수 있는 서열은 주어진 서열의 "상보물"로 지칭된다. 본원에서 사용된 용어 "게놈 유전자좌" 또는 "유전자좌"(복수의 유전자좌)는 염색체에서 유전자 또는 DNA 서열의 특정 위치이다. "유전자"는 유기체에서 활동하는 기능적 역할을 가진 RNA 사슬 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA의 스트레치로서, 이에 따라, 살아있는 유기체에서 유전의 분자 단위를 말한다. 본 발명의 목적을 위해서, 유전자는 이러한 조절 서열이 코딩 서열 및/또는 전사된 서열에 인접하든 아니든 유전자 산물의 생성을 조절하는 영역을 포함하는 것으로 간주될 수 있다. 따라서, 반드시 제한되는 것은 아니지만, 유전자는 프로모터 서열, 종결자, 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위와 같은 번역 조절 서열, 인핸서, 사일런서, 인슐레이터, 경계 요소, 복제 원점, 매트릭스 부착 부위 및 유전자좌 조절 영역을 포함한다. 본원에서 사용된 "게놈 유전자좌의 발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보가 기능적 유전자 산물의 합성에서 사용되는 과정이다.

유전자 발현의 산물은 주로 단백질이지만, rRNA 유전자 또는 tRNA 유전자와 같은 비-단백질 코딩 유전자에서는 이 산물은 기능적 RNA이다. 유전자 발현 과정은 생존을 위한 기능적 산물들을 생성하기 위해서 모든 알려진 생명체, 즉 진핵생물(다세포 유기체 포함), 원핵생물(박테리아 및 고세균) 및 바이러스에 의해서 사용된다. 본원에서 사용된 유전자 또는 핵산의 "발현"은 세포 유전자 발현뿐만 아니라 클로닝 시스템 및 임의의 다른 맥락에서 핵산(들)의 전사 및 번역을 포괄한다. 본원에서 사용된 "발현"은 또한 폴리뉴클레오티드가 DNA 주형으로부터 (예컨대 mRNA 또는 다른 RNA 전사물로) 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA가 이어서 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 말한다. 전사물 및 암호화된 폴리펩티드는 집합적으로 "유전자 산물"이라고 언급될 수 있다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래된다면, 발현은 진핵 세포에서 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다. 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환 가능하게 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 그것은 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 그것은 비-아미노산에 의해 단속될 수 있다. 또한, 상기 용어는 변형된 아미노산 중합체; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화(lipidation), 아세틸화, 인산화 또는 임의의 기타 조작, 예를 들어, 표지화 성분과의 컨쥬게이션을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산"은 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체 및 아미노산 유사체 및 펩티도모방체를 포함하는 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산을 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "도메인" 또는 "단백질 도메인"은 단백질 사슬의 나머지 부분과 독립적으로 존재하며 기능할 수 있는 단백질 서열의 일부를 말한다. 본 발명의 양태들에서 설명된 대로, 서열 동일성은 서열 상동성과 관련된다. 상동성 비교는 눈으로, 또는 더 일반적으로는 쉽게 이용 가능한 서열 비교 프로그램의 도움으로 수행될 수 있다. 이들 상업적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램은 둘 이상의 서열 사이의 상동성 백분율(%)을 계산할 수 있고, 또한 둘 이상의 아미노산 또는 핵산 서열에 의해서 공유된 서열 동일성을 계산할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 dTALF의 캡핑 영역은 본원에 제공된 캡핑 영역 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하거나 동일성을 공유하는 서열을 가진다. 서열 상동성은 본 분야에 알려진 다수의 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 BLAST 또는 FASTA 등의 임의의 것에 의해서 생성될 수 있다. 이러한 정렬을 수행하기 위한 적합한 컴퓨터 프로그램은 GCG 위스콘신 베스트핏(Wisconsin Bestfit) 패키지이다(University of Wisconsin, U.S.A; 문헌[Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387]). 서열 비교를 수행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예들은, 제한은 아니지만, BLAST 패키지(상기 문헌[Ausubel et al., 1999] - 18장 참조), FASTA(문헌[Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410]) 및 GENWORKS 비교 도구 일습을 포함한다. BLAST와 FASTA는 모두 오프라인과 온라인 검색을 위해 이용할 수 있다(상기 문헌[Ausubel et al., 1999], 페이지 7-58 내지 7-60 참조). 그러나, GCG 베스트핏 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다. 서열 상동성 백분율(%)은 연속 서열에 걸쳐서 계산될 수 있는데, 즉 하나의 서열이 다른 서열과 정렬되고, 하나의 서열에서 각 아미노산 또는 뉴클레오티드가 다른 서열에서 상응하는 아미노산 또는 뉴클레오티드와 한번에 하나의 잔기씩 직접 비교된다. 이것은 "비갭"(ungapped) 정렬이라고 불린다. 통상적으로, 이러한 비갭 정렬은 상대적으로 짧은 수의 잔기에 걸쳐서만 수행된다. 이것은 매우 간단하고 일관된 방법이지만, 예를 들어 다른 동일한 쌍의 서열에서, 하나의 삽입 또는 결실이 이후의 아미노산 잔기를 정렬되지 않도록 할 수 있다는 것을 고려하지 않으므로, 전반적 정렬이 수행될 때는 잠재적으로 상동성%에 상당한 감소가 있게 된다. 결론적으로, 대부분의 서열 비교 방법은 전체 상동성 또는 동일성 점수에 과도한 페널티 부과 없이 가능한 삽입과 결실을 고려하는 최적 정렬을 생성하도록 설계된다. 이것은 국소 상동성 또는 동일성을 최대화하도록 시도하도록 서열 정렬에 "갭"을 삽입함으로써 달성된다. 그러나, 이런 더 복잡한 방법은 정렬에서 발생한 각 갭에 "갭 페널티"를 배정하며, 이로써 동일한 수의 동일한 아미노산에 대해, 가능한 적은 갭을 가진 서열 정렬 - 비교된 두 서열 간의 더 높은 관련성 반영 - 이 많은 갭을 가진 것보다 더 높은 점수를 달성할 수 있다. "친화성 갭 점수"가 통상적으로 사용되는데, 이것은 갭의 존재에는 상대적으로 높은 점수를 매기고, 갭의 각 연속 잔기에는 더 적은 페널티를 매긴다. 이것은 가장 흔히 사용되는 갭 점수배정 시스템이다. 높은 갭 페널티는 당연히 갭이 적을수록 최적화된 정렬을 생성할 수 있다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 페널티의 변형을 허용한다. 그러나, 서열 비교에 이러한 소프트웨어를 사용할 때 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, GCG 위스콘신 베스트핏 패키지를 사용할 때, 아미노산 서열에 대한 디폴트 갭 페널티는 갭에 대해 -12 및 각 연장에 대해 -4이다. 따라서, 최대 상동성%의 계산은 먼저 갭 페널티를 고려한 최적 정렬의 생성을 요구한다. 이러한 정렬을 수행하기 위한 적합한 컴퓨터 프로그램은 GCG 위스콘신 베스트핏 패키지이다(문헌[Devereux et al., 1984 Nuc. Acids Research 12 p387]). 서열 비교를 수행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예들은, 제한은 아니지만, BLAST 패키지(문헌[Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. Chapter 18] 참조), FASTA(문헌[Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410]) 및 GENWORKS 비교 도구 일습을 포함한다. BLAST와 FASTA는 모두 오프라인과 온라인 검색으로 이용할 수 있다(문헌[Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, pages 7-58 to 7-60] 참조). 그러나, 일부 응용을 위해, GCG 베스트핏 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다. BLAST 2 서열이라고 불리는 새로운 도

구도 단백질 및 뉴클레오티드 서열을 비교하는데 이용할 수 있다(문헌[FEMS Microbiol Lett. 1999 174(2): 247-50]; 문헌[FEMS Microbiol Lett. 1999 177(1): 187-8] 및 National Institutes for Health 웹사이트에서 National Center for Biotechnology 웹사이트 참조). 최종 상동성%는 동일성에 관하여 측정될 수 있지만, 통상적으로 정렬 과정 자체는 모 아니면 도의 쌍 비교에 기초하지 않는다. 대신, 축척된 유사성 점수 행렬이 일반적으로 사용되는데, 이것은 화학적 유사성 또는 진화적 거리에 기초하여 각 쌍-방식 비교에 점수를 배정한다. 흔히 사용되는 이러한 행렬의 예는 BLOSUM62 행렬로서, 이것은 BLAST 프로그램 일습의 디폴트 행렬이다. GCG 위스콘신 프로그램은 일반적으로 공개된 디폴트 값이나 제공되는 경우에는 사용자 지정 기호 비교표(추가 상세한 설명을 위해 사용자 매뉴얼 참조)를 사용한다. 일부 응용을 위하여, GCG 패키지에 대한 공개된 디폴트 값을 사용하거나, 또는 다른 소프트웨어의 경우에는 BLOSUM62와 같은 디폴트 행렬을 사용하는 것이 바람직하다. 대안적으로, 상동성 백분율은 CLUSTAL과 유사한 알고리즘에 기초한, DNASIS™(히타치 소프트웨어(Hitachi Software))의 다중 정렬 특징을 사용하여 계산될 수 있다(문헌[Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244]). 일단 소프트웨어가 최적 정렬을 생성하면, 상동성%, 바람직하게는 서열 동일성%를 계산하는 것이 가능하다. 이 소프트웨어는 통상적으로 서열 비교의 일부로서 이것을 행하고, 수치 결과를 생성한다. 서열은 또한 침묵성 변화를 야기하여 기능적으로 동등한 물질을 가져오는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 가질 수 있다. 아미노산 특성(예컨대 잔기의 극성, 전하, 용해성, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성)의 유사성을 기초로 의도적인 아미노산 치환이 만들어질 수 있으며, 따라서 작용기에 있어서 아미노산을 함께 그룹화하는 데 유용하다. 아미노산은 그것의 측쇄만의 특성에 기초하여 그룹화될 수 있다. 그러나, 돌연변이 데이터를 포함하는 것도 역시 더 유용하다. 이렇게 유도된 아미노산 세트는 구조적 이유로 보존될 수 있다. 이들 세트는 벤다이어그램의 형태로 설명될 수 있다(문헌[Livingstone C.D. and Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl. Biosci. 9: 745-756])(문헌[Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J. Theor. Biol. 119; 205-218]). 보존적 치환은, 예를 들어 일반적으로 용인된 벤다이어그램 아미노산 그룹화를 설명한 아래 표에 따라서 이루어질 수 있다.

세트		하위-세트	
소수성	FWYHKMILVAGC	방향족	FWYH
		지방족	ILV
극성	WYHKREDCSTNQ	하전	HKRED
		양으로 하전	HKR
		음으로 하전	ED
소형	VCAGSPTND	최소형	AGS

[0621]

[0622]

본 발명의 구현예는, 아미노산의 경우 유사한 것으로의 치환, 예컨대 염기성을 염기성으로, 산성을 산성으로, 극성을 극성으로 등등의 치환을 일으킬 수 있는 상동성 치환(치환 및 대체는 모두 본원에서 기존 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 대안적인 잔기 또는 뉴클레오티드로의 교환을 의미하도록 사용됨)을 포함할 수 있는 서열(폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 모두)을 포함한다. 비-상동성 치환, 즉 한 부류의 잔기로부터 다른 부류의 잔기로의 치환, 또는 대안적으로 오르니틴(이후 Z로 언급), 디아미노부티르산 오르니틴(이후 B로 언급), 노르류신 오르니틴(이후 O로 언급), 페리일알라닌, 티에닐알라닌, 나프틸알라닌 및 페닐글리신과 같은 비천연 아미노산의 포함을 수반하는 치환이 일어날 수 있다. 변이체 아미노산 서열은 글리신 또는 β-알라닌 잔기와 같은 아미노산 스페이스에 더하여 메틸, 에틸 또는 프로필기와 같은 알킬기를 포함하는 서열의 임의의 두 아미노산 잔기 사이에 삽입될 수 있는 적합한 스페이스 기를 포함할 수 있다. 펩타이드 형태로 하나 이상의 아미노산 잔기의 존재를 포함하는 추가의 형태의 변형도 해당 분야의 숙련자에게 잘 이해될 수 있다. 의심을 피하기 위해서, "펩타이드 형태"는 α-탄소 치환기가 α-탄소가 아니라 잔기의 질소 원자에 존재하는 변이체 아미노산 잔기를 말하기 위해서 사용된다. 펩타이드 형태로 펩티드를 제조하는 과정은 해당 분야에, 예를 들어 문헌[Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371] 및 문헌[Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134]에 공지되어 있다.

[0623]

본 발명의 목적을 위하여, 증폭은 타당한 충실도로 표적 서열을 복제할 수 있는 중합효소 및 프라이머를 사용하는 임의의 방법을 의미한다. 증폭은 천연 또는 제조합 DNA 중합효소, 예를 들어, TaqGold™, T7 DNA 중합효소,

에스캐리키아 폴라이 DNA 중합효소의 클레나우(Klenow) 단편 및 역전사효소에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 증폭 방법은 PCR이다.

[0624] 특정 양태에서, 본 발명은 벡터를 포함한다. 본원에서 사용된 "벡터"는 하나의 환경에서 다른 환경으로 엔터티의 전달을 허용하거나 용이하게 하는 도구이다. 그것은 레플리콘, 예컨대 플라스미드, 파지, 또는 코스미드이며, 여기에 다른 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있고, 이로써 삽입된 세그먼트의 복제가 야기된다. 일반적으로, 벡터는 적절한 제어 요소와 회합되는 경우 복제 가능하다. 일반적으로, 용어 "벡터"는 그것이 결합되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터는, 제한은 아니지만, 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 부분적으로 이중 가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 자유 말단을 포함하는 핵산 분자, 자유 말단이 없는 핵산 분자(예를 들어, 원형); DNA, RNA 또는 둘 다 포함하는 핵산 분자; 및 해당 분야에 공지된 폴리뉴클레오티드의 다른 변종을 포함한다. 벡터의 하나의 종류는 "플라스미드"인데, 이것은 원형 이중 가닥 DNA 루프를 말하며, 여기에 예컨대 표준 분자 클로닝 기술에 의해서 추가의 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있다. 벡터의 다른 종류는 바이러스 벡터이며, 바이러스-유래된 DNA 또는 RNA 서열이 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스(AAV))로의 패키징을 위한 벡터에 존재한다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포로의 트랜스펙션을 위한, 바이러스가 지니는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포에서 자율적 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 원점을 가진 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포에 도입 시 숙주 세포의 게놈에 통합되며, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 그것이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"라고 언급된다. 재조합 DNA 기술에서 활용되는 통상적인 발현 벡터는 주로 플라스미드의 형태이다.

[0625] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함할 수 있는데, 이것은 재조합 발현 벡터가 하나 이상의 조절 요소를 포함하는 것을 의미하며, 하나 이상의 조절 요소는 발현에 사용될 숙주 세포에 기초하여 선택될 수 있고, 발현될 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 재조합 발현 벡터에서 "작동 가능하게 연결된"은 관심 뉴클레오티드 서열이 그 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 방식으로 조절 요소(들)에 연결된 것을 의미하고자 한다(예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포에 도입되었을 때는 숙주 세포에서). 재조합 및 클로닝 방법과 관련하여, US 2004-0171156 A1호로 2004년 9월 2일자 공개된 미국 특허 출원 10/815,730호를 참조하며, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0626] 본 발명의 양태는 키메라 RNA 및 Cas9에 대한 비시스트로닉 벡터에 관한 것이다. 키메라 RNA 및 Cas9에 대한 비시스트로닉 발현 벡터가 바람직하다. 일반적으로 그리고 특히 이 구현예에서, Cas9는 바람직하게 CBh 프로모터에 의해서 유도된다. 키메라 RNA는 바람직하게 Pol III 프로모터, 예를 들어, U6 프로모터에 의해 유도된다. 이상적으로 2개가 조합된다. 키메라 가이드 RNA는 통상적으로 20 bp 가이드 서열(N)로 구성되며, 이것은 tracr 서열과 연결될 수 있다(아래 가닥의 첫 번째 "U"에서 전사체의 끝까지 이어진다). tracr 서열은 나타낸 대로 다양한 위치에서 트렁케이션될 수 있다. 가이드 서열과 tracr 서열은 tracr-메이트 서열에 의해서 분리되는데, tracr-메이트 서열은 GUUUUAGAGCUA일 수 있다. 이것 다음에는 나타낸 대로 루프 서열 GAAA가 올 수 있다. 이들은 모두 바람직한 예들이다. 본 발명자들은 서베이어 검정에 의해 인간 EMX1 및 PVALB 유전자좌에서 Cas9-매개의 삽입결실을 입증하였다. ChiRNA는 "+n" 표기로 나타내며, crRNA는 가이드 서열과 tracr 서열이 개별 전사물로서 발현되는 하이브리드 RNA를 말한다. 본 출원 전체에서, 키메라 RNA는 또한 단일의 가이드, 또는 합성 가이드 RNA(sgRNA)로 칭해질 수 있다. 이 루프는 바람직하게 GAAA이지만, 이 서열에만 제한되는 것은 아니며, 실제로 단지 4 bp 길이에만 제한되는 것도 아니다. 실제로, 헤어핀 구조에서 사용하기 위한 바람직한 루프 형성 서열은 4 뉴클레오티드 길이이고, 가장 바람직하게 서열 GAAA를 가진다. 그러나, 더 길거나 짧은 루프 서열도 사용될 수 있으며, 대안적인 서열도 사용될 수 있다. 서열은 바람직하게 뉴클레오티드 트리플렛(예를 들어, AAA), 및 추가의 뉴클레오티드(예를 들어, C 또는 G)를 포함한다. 루프 형성 서열의 예들은 CAAA 및 AAAG를 포함한다. 본원에 개시된 방법 중 임의의 것을 실시하는데 있어서, 적합한 벡터가, 제한은 아니지만 마이크로인젝션, 전기천공, 소노포레이션, 바이오리스틱스, 칼슘 포스페이트-매개 트랜스펙션, 양이온 트랜스펙션, 리포솜 트랜스펙션, 덴드리머 트랜스펙션, 열 충격 트랜스펙션, 뉴클레오펙션 트랜스펙션, 마그네토펙션, 리포펙션, 임페일펙션, 광학 트랜스펙션, 핵산의 전용 제제-증진 흡수, 및 리포솜, 면역리포솜, 비로솜 또는 인공 비리온을 통한 전달을 포함하는 해당 분야에 공지된 하나 이상의 방법을 통해서 세포 또는 배아에 도입될 수 있다. 일부 방법에서, 벡터는 마이크로인젝션에 의해서 배아에 도입된다. 벡터 또는 벡터들은 배아의 핵 또는 세포질에 마이크로인젝션될 수 있다. 일부 방법에서, 벡터 또는 벡터들은 뉴클레오펙션에 의해서 세포에 도입될 수 있다.

[0627] 용어 "조절 요소"는 프로모터, 인핸서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 및 다른 발현 조절 요소(예를 들어, 전사

종결 신호, 예컨대 폴리아데닐화 신호 및 폴리-U 서열)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 요소는, 예를 들어 문헌[Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 설명된다. 조절 요소는 많은 종류의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 유도하는 것들과 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하는 것들(예를 들어, 조직-특이적 조절 서열)을 포함한다. 조직-특이적 프로모터는 근육, 뉴런, 뼈, 피부, 혈액, 특정 장기(예를 들어, 간, 췌장)와 같은 요망되는 관심 조직, 또는 특정 세포 유형(예를 들어, 림프구)에서 주로 발현을 유도할 수 있다. 또한, 조절 요소는 시간-의존적 방식으로, 예컨대 세포-주기 의존적 또는 발생 단계 의존적 방식으로 발현을 유도할 수 있으며, 이것은 조직 특이적이거나 세포-유형 특이적일 수 있거나, 그렇지 않을 수도 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 pol III 프로모터(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 pol III 프로모터), 하나 이상의 pol II 프로모터(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 pol II 프로모터), 하나 이상의 pol I 프로모터(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 pol I 프로모터), 또는 이들의 조합을 포함한다. pol III 프로모터의 예들은, 제한은 아니지만, U6 및 H1 프로모터를 포함한다. pol II 프로모터의 예들은, 제한은 아니지만, 레트로바이러스 라우스(Rous) 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(임의로 RSV 인핸서와 함께), 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(임의로 CMV 인핸서와 함께)[예를 들어, 문헌[Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)] 참조], SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터, 및 EF1α 프로모터를 포함한다. 또한, 용어 "조절 요소"에는 인핸서 요소, 예컨대 WPRE; CMV 인핸서; HTLV-I의 LTR에서 R-U5' 세그먼트(문헌[Mol. Cell. Biol., Vol. 8(1), p. 466-472, 1988]); SV40 인핸서; 및 토끼 β-글로빈의 엑손 2와 3 사이의 인트론 서열(문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78(3), p. 1527-31, 1981])도 포함된다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택, 요망되는 발현 수준 등과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다는 것이 해당 분야의 숙련자에 의해서 인정될 것이다. 벡터는 숙주 세포에 도입될 수 있고, 이로써 본원에 설명된 대로 핵산에 의해서 인코딩되는 전사물, 융합 단백질 또는 펩티드를 포함하는 단백질 또는 펩티드가 생성될 수 있다(예를 들어, 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드로믹 반복부(CRISPR) 전사물, 단백질, 효소, 이들의 돌연변이 형태, 이들의 융합 단백질 등). 조절 서열과 관련하여, 미국 특허 출원 10/491,026호를 참조하며, 이것의 내용은 그 전체가 여기 참고로 포함된다. 프로모터와 관련하여, PCT 공보 WO 2011/028929호 및 미국 출원 12/511,940호를 참조하며, 이들의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0628] 벡터는 원핵 또는 진핵 세포에서 CRISPR 전사물(예를 들어, 핵산 전사물, 단백질 또는 효소)의 발현을 위해 설계될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 전사물은 박테리아 세포, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이, 곤충 세포(배칼로 바이러스 발현 벡터 사용), 효모 세포 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 적절한 숙주 세포는 문헌 [Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 추가로 논의되어 있다. 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 예를 들어, T7 프로모터 조절 서열 및 T7 중합효소를 사용하여 시험관내에서 전사되고 번역될 수 있다.

[0629] 벡터는 원핵생물, 또는 원핵 세포에 도입되고, 그에서 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, 원핵생물은 진핵 세포로 도입될 벡터 또는 진핵 세포로 도입되는 벡터의 생성에서 중간체 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터 패키징 시스템의 일부로서 플라스미드 증폭)로서 벡터의 카피를 증폭시키기 위해서 사용된다. 일부 구현예에서, 원핵생물은 벡터의 카피를 증폭시키고, 하나 이상의 핵산을 발현하기 위해, 예를 들어, 숙주 세포 또는 숙주 유기체로의 전달을 위한 하나 이상의 단백질의 공급원을 제공하기 위해 사용된다. 원핵생물에서의 단백질의 발현은 자주 융합 또는 비-융합 단백질 중 어느 하나의 발현을 유도하는 구성성 또는 유도성 프로모터를 함유하는 벡터를 사용하여 에스케리키아 콜라이에서 수행된다. 융합 벡터는 거기에 인코딩된 단백질에, 예를 들어, 재조합 단백질의 아미노 말단에 수많은 아미노산을 부가한다. 이러한 융합 벡터는 다음과 같은 하나 이상의 목적을 제공할 수 있다: (i) 재조합 단백질의 발현의 증가; (ii) 재조합 단백질의 용해도의 증가; 및 (iii) 친화성 정제에서 리간드로 작용함으로써 재조합 단백질의 정제의 보조. 종종, 융합 발현 벡터에서, 단백질분해 절단 부위는 융합 모이어티와 재조합 단백질의 연결부에 도입되어, 융합 단백질의 정제 이후에 융합 모이어티로부터 재조합 단백질의 분리를 가능하게 한다. 이러한 효소 및 그들의 동족 인식 서열은 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나아제를 포함한다. 예시적인 융합 발현 벡터는 pGEX(파마시아 바이오테크 인코포레이티드(Pharmacia Biotech Inc); 문헌[Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40]), pMAL(미국 매사추세츠주 비벌리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)) 및 pRIT5(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 파마시아(Pharmacia))를 포함하며, 이는 각각 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 E 결합 단백질 또는 단백질 A를 표적 재조합 단백질에 융합시킨다. 적절한 유도성 비-융합 에스케리키아 콜라이 발현 벡터의 예는 pTrc(문헌[Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315]) 및 pET 11d(문헌[Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89])를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 사

카로마이세스 세레비지에에서의 발현을 위한 벡터의 예에는 pYepSec1(문헌[Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234]), pMFa(문헌[Kuijan and Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943]), pJRY88(문헌[Schultz et al., 1987. Gene 54: 113-123]), pYES2(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 인비트로겐 코포레이션) 및 picZ(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 인비트로겐 코포레이션)가 포함된다. 일부 구현예에서, 벡터는 배콜로바이러스 발현 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 단백질 발현을 유도한다. 배양된 곤충 세포(예를 들어, SF9 세포)에서 단백질의 발현에 이용 가능한 배콜로바이러스 벡터는 pAc 시리즈(문헌[Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165]) 및 pVL 시리즈(문헌[Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39])를 포함한다.

[0630] 일부 구현예에서, 벡터는 포유류 발현 벡터를 사용하여 포유류 세포에서 하나 이상의 서열의 발현을 유도할 수 있다. 포유류 발현 벡터의 예는 pCDM8(문헌[Seed, 1987. Nature 329: 840]) 및 pMT2PC(문헌[Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195])를 포함한다. 포유류 세포에서 사용되는 경우, 발현 벡터의 조절 기능은 통상적으로 하나 이상의 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스, 유인원 바이러스 40 및 본원에 개시되고 당업계에 공지되어 있는 기타의 것으로부터 유래된다. 원핵 및 진핵 세포 둘 모두를 위한 다른 적절한 발현 시스템에 대하여, 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]의 16 및 17장을 참조한다.

[0631] 일부 구현예에서, 재조합 포유류 발현 벡터는 특정 세포 유형에서 우선적으로 핵산의 발현을 유도할 수 있다(예를 들어, 핵산을 발현하기 위하여 조직-특이적 조절 요소가 사용됨). 조직-특이적 조절 요소가 해당 분야에 공지되어 있다. 적절한 조직-특이조직-특이적적 프로모터의 비제한적인 예에는 알부민 프로모터(간-특이적; 문헌 [Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277]), 림프-특이적 프로모터(문헌[Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275]), 특히, T 세포 수용체(문헌[Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733]) 및 면역글로불린의 프로모터(문헌[Baneiji, et al., 1983. Cell 33: 729-740]; 문헌[Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748]), 뉴런-특이적 프로모터(예를 들어, 신경섬유 프로모터; 문헌[Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477]), 췌장-특이적 프로모터(문헌[Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916]) 및 유선-특이적 프로모터(예를 들어, 유장(milk whey) 프로모터; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 제264,166호)가 포함된다. 발생-조절 프로모터, 예를 들어, 췌장 hox 프로모터(문헌[Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379]) 및 α-태아단백질 프로모터(문헌[Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546])도 또한 포함된다. 이들 원핵 및 진핵 벡터와 관련하여, 미국 특허 제6,750,059호를 참조하며, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 본 발명의 다른 구현예들은 바이러스 벡터의 사용에 관한 것일 수 있으며, 이것과 관련해서는 미국 특허 출원 13/092,085호를 참조하고, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 조직-특이적 조절 요소는 해당 분야에 공지이며, 이것과 관련하여 미국 특허 7,776,321호를 참조하고, 이것의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 일부 구현예에서, 조절 요소는 CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소에 작동 가능하게 연결되어 CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 유도한다. 일반적으로, SPIDR(스페이스 산재 직접 반복부)로도 공지되어 있는 CRISPR(클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬릭 반복부)은 통상 특정 박테리아 종에 특이적인 DNA 유전자좌의 과를 구성한다. CRISPR 유전자좌는 에스케리키아 콜라이에서 인식되는 별개의 부류의 산재된 짧은 서열 반복부(SSR) 및 관련 유전자를 포함한다(문헌[Ishino et al., J. Bacteriol., 169:5429-5433 [1987]]; 및 문헌[Nakata et al., J. Bacteriol., 171:3553-3556 [1989]]). 유사한 산재된 SSR이 할로페락스 메디테라네이(Haloferax mediterranei), 스트렙토코커스 피오게네스, 아나바에나(Anabaena) 및 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)에서 확인되었다(문헌[Groenen et al., Mol. Microbiol., 10:1057-1065 [1993]]; 문헌[Hoe et al., Emerg. Infect. Dis., 5:254-263 [1999]]; 문헌[Masepohl et al., Biochim. Biophys. Acta 1307:26-30 [1996]]; 및 문헌[Mojica et al., Mol. Microbiol., 17:85-93 [1995]] 참조). CRISPR 유전자좌는 통상적으로 SRSR(규칙적으로 산재된 짧은 반복부(short regularly spaced repeat))로 명명된 반복부의 구조가 다른 SSR과 상이하다(문헌 [Janssen et al., OMICS J. Integ. Biol., 6:23-33 [2002]]; 및 문헌[Mojica et al., Mol. Microbiol., 36:244-246 [2000]]). 일반적으로, 반복부는 실질적으로 고정된 길이를 갖는 독특한 개체 서열에 의해 규칙적으로 이격된 클러스터에 존재하는 짧은 요소이다(상기 문헌[Mojica et al., [2000]]). 반복 서열이 균주들 간에 고도로 보존되어 있지만, 산재된 반복부의 수와 스페이스 영역의 서열은 통상적으로 균주마다 상이하다(문헌 [van Embden et al., J. Bacteriol., 182:2393-2401 [2000]]). CRISPR 유전자좌는 아에로피룸(Aeropyrum), 피로바쿨룸(Pyrobaculum), 술폴로부스(Sulfolobus), 아카이오글로부스(Archaeoglobus), 할로카르쿨라(Halocarcula), 메타노박테리움(Methanobacterium), 메타노코커스(Methanococcus), 메타노사르시나(Methanosarcina), 메타노피루스(Methanopyrus), 피로코커스(Pyrococcus), 피크로필러스(Picrophilus), 썬모플

라스마(Thermoplasma), 코리네박테리움(Corynebacterium), 마이코박테리움(Mycobacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 아퀴팩스(Aquifex), 포르피로모나스(Porphyrmonas), 클로로비움(Chlorobium), 써머스(Thermus), 바실러스(Bacillus), 리스테리아(Listeria), 스타필로코커스(Staphylococcus), 클로스트리디움(Clostridium), 써모아나에로박터(Thermoanaerobacter), 마이코플라스마(Mycoplasma), 푸소박테리움(Fusobacterium), 아자쿠스(Azarcus), 크로모박테리움(Chromobacterium), 네이세리아(Neisseria), 니트로소모나스(Nitrosomonas), 데설펜브리오(Desulfovibrio), 게오박터(Geobacter), 믹소코커스(Myxococcus), 캄필로박터(Campylobacter), 볼리넬라(Wolinella), 아시네토박터(Acinetobacter), 에르위니아(Erwinia), 에스케리키아, 레지오넬라(Legionella), 메틸로코커스(Methylococcus), 파스퇴렐라(Pasteurella), 포토박테리움(Photobacterium), 살모넬라(Salmonella), 잔토모나스(Xanthomonas), 예르시니아(Yersinia), 트레포네마(Treponema) 및 써모토가(Thermotoga)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 40개 초과 원핵생물에서 확인되었다(예를 들어, 문헌[Jansen et al., Mol. Microbiol., 43:1565-1575 [2002]]; 및 문헌[Mojica et al., [2005]] 참조).

[0632] 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 하나 이상의 이중 단백질 도메인(예를 들어, CRISPR 효소에 더하여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 도메인)을 포함하는 융합 단백질의 부분이다. CRISPR 효소 융합 단백질은 임의의 추가의 단백질 서열 및 임의로 임의의 2개 도메인 사이의 링커 서열을 포함할 수 있다. CRISPR 효소에 융합될 수 있는 단백질 도메인의 예는 비제한적으로 에피토프 태그, 리포터 유전자 서열 및 하기의 활성 중 하나 이상을 갖는 단백질 도메인을 포함한다: 메틸라제 활성, 디메틸라제 활성, 전사 활성화 활성, 전사 억제 활성, 전사 방출 인자(transcription release factor) 활성, 히스톤 변형 활성, RNA 절단 활성 및 핵산 결합 활성. 에피토프 태그의 비제한적인 예는 히스티딘(His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그 및 티오레독신(Trx) 태그를 포함한다. 리포터 유전자의 예는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 호스라디시(horseradish) 과산화효소(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 녹색 형광 단백질(GFP), HcRed, DsRed, 청록색 형광 단백질(CFP), 황색 형광 단백질(YFP) 및 청색 형광 단백질(BFP)을 포함하는 자가형광 단백질을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. CRISPR 효소는 DNA 분자에 결합하거나, 말토스 결합 단백질(MBP), S-태그, Lex A DNA 결합 도메인(DBD) 융합체, GAL4 DNA 결합 도메인 융합체 및 단순 포진 바이러스(HSV) BP16 단백질 융합체를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 세포 분자에 결합하는 단백질 또는 단백질의 단편을 인코딩하는 유전자 서열에 융합될 수 있다. CRISPR 효소를 포함하는 융합 단백질의 부분을 형성할 수 있는 추가의 도메인은 본원에 참조로 포함되는 US20110059502호에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 태그가 부착된 CRISPR 효소를 사용하여 표적 서열의 위치를 확인한다.

[0633] 일부 구현예에서, CRISPR 효소는 유도성 시스템의 성분을 형성할 수 있다. 이 시스템의 유도성 성질은 에너지 형태를 사용하여 유전자 편집이나 유전자 발현의 시공간적 제어를 허용할 것이다. 에너지 형태는, 제한은 아니지만, 전자기선, 소리 에너지, 화학 에너지 및 열 에너지를 포함할 수 있다. 유도성 시스템의 예들은 테트라사이클린 유도성 프로모터(Tet-On 또는 Tet-Off), 소 분자 2-하이브리드 전사 활성화 시스템(FKBP, ABA 등) 또는 광 유도성 시스템(피토크롬, LOV 도메인 또는 크립토크롬)을 포함한다. 일 구현예에서, CRISPR 효소는 서열-특이적 방식으로 전사 활성화에 변화를 유도할 수 있는 광 유도성 전사 이펙터(LITE)의 일부일 수 있다. 광의 성분은 CRISPR 효소, 광-반응성 시토크롬 이중이량체(예를 들어, 아라비도시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana) 유래), 및 전사 활성화/억제 도메인을 포함할 수 있다. 유도성 DNA 결합 단백질의 추가의 예들과 이들의 사용을 위한 방법은 US 제61/736465호 및 US 제61/721,283호에 제공되며, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0634] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 당업계의 기술 내에 있는 면역학, 생화학, 화학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 유전체학 및 재조합 DNA의 통상의 기술을 사용한다. 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989)]; 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987))]; 시리즈 문헌[METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995))], 문헌[Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL] 및 문헌[ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987))]을 참조한다.

[0635] 재조합 주형 (예를 들어, HDR 주형)

[0636] 몇몇 구현예에서, 재조합 주형 또한 제공된다. 재조합 주형은 본원에 기재된 바와 같은 다른 벡터의 성분일 수 있거나, 별개의 벡터에 포함되거나 별개의 폴리뉴클레오티드로서 제공될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 재조합 주형은 CRISPR 복합체의 부분으로서 CRISPR 효소에 의해 절단되거나 절개된 표적 서열 내 또는 근처와 같은 상동

성 재조합 내의 주형으로서 제공하기 위해 설계된다. 주형 폴리뉴클레오티드는 약 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, 또는 그 이상이거나 이보다 큰 뉴클레오티드 길이와 같은 임의의 적합한 길이일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 부분에 상보적이다. 최적으로 정렬되었을 때, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 서열의 하나 이상의 뉴클레오티드와 중복 될 것이다 (예를 들어 약 1, 5, 10, 15, 20, 또는 그 이상이거나 이보다 많은 뉴클레오티드). 몇몇 구현예에서, 표적 서열을 포함하는 주형 서열 및 폴리뉴클레오티드가 최적으로 정렬되었을 때, 주형 폴리뉴클레오티드의 가장 가까운 뉴클레오티드는 표적 서열로부터 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 또는 그 이상의 뉴클레오티드 내에 있다.

[0637] 표적 변형

[0638] 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법을 제공하며, 이것은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 인간 또는 비인간 동물 또는 식물로부터 세포 또는 세포 집단을 시료추출하는 단계, 및 세포 또는 세포들을 변형하는 단계를 포함한다. 배양은 생체외에서 임의의 단계에서 일어날 수 있다. 세포 또는 세포들은 심지어 비인간 동물 또는 식물에 재도입될 수 있다. 재도입된 세포의 경우, 세포가 줄기 세포인 것이 특히 바람직하다.

[0639] 일부 구현예에서, 방법은 CRISPR 복합체가 표적 폴리뉴클레오티드에 결합되게 하여, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 절단을 행함으로써 표적 폴리뉴클레오티드를 변형시키는 단계를 포함하고, 여기서 CRISPR 복합체는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열과 혼성화되는 가이드 서열과 복합체화된 CRISPR 효소를 포함하며, 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결되고, 이어서 tracr 메이트 서열은 tracr 서열과 혼성화된다.

[0640] 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 변형하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 결합이 폴리뉴클레오티드의 증가된 또는 감소된 발현을 가져오도록 CRISPR 복합체가 폴리뉴클레오티드에 결합되게 하는 단계를 포함하며, 여기서 CRISPR 복합체는 상기 폴리뉴클레오티드 내의 표적 서열과 혼성화되는 가이드 서열과 복합체화된 CRISPR 효소를 포함하고, 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결되고, 이어서 tracr 메이트 서열은 tracr 서열과 혼성화된다. 유사한 고려사항 및 조건이 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법에 대해 상기 설명된 것과 같이 적용된다. 실제로 이들 시료추출, 배양 및 재도입 선택사항은 본 발명의 전 양태에 적용된다.

[0641] 실제로, 본 발명의 임의의 양태에서, CRISPR 복합체는 표적 서열과 혼성화되는 가이드 서열과 복합체화된 CRISPR 효소를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 가이드 서열은 tracr 메이트 서열에 연결되고, 이어서 tracr 메이트 서열은 tracr 서열과 혼성화될 수 있다. 유사한 고려사항 및 조건이 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법에 대해 상기와 같이 적용된다.

[0642] 일 양태에서, 본 발명은 상기 방법 및 조성물에서 개시된 요소들 중 임의의 하나 이상을 함유하는 키트를 제공한다. 요소들은 개별적으로 또는 조합하여 제공될 수 있으며, 임의의 적합한 용기, 예컨대 바이알, 보틀 또는 튜브에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 하나 이상의 언어로 된, 예를 들어 하나 초과의 언어로 된 설명서를 포함한다.

[0643] 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 요소 중 하나 이상을 사용하는 과정에 사용하기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 시약은 임의의 적절한 용기에 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트는 하나 이상의 반응 또는 저장 완충제를 제공할 수 있다. 시약은 특정 검정에 사용가능한 형태 또는 사용 전에 하나 이상의 다른 성분의 첨가를 필요로 하는 형태(예를 들어, 농축물 또는 동결건조 형태)로 제공될 수 있다. 완충제는 탄산나트륨 완충제, 중탄산나트륨 완충제, 붕산염 완충제, 트리스(Tris) 완충제, MOPS 완충제, HEPES 완충제 및 그들의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 완충제일 수 있다. 일부 구현예에서, 완충제는 알칼리성이다. 일부 구현예에서, 완충제는 약 7 내지 약 10의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 키트는 가이드 서열과 조절 요소를 작동 가능하게 연결하도록, 박테리에 삽입하기 위한 가이드 서열에 상응하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 상동성 재조합 주형 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 설명된 박테리 중 하나 이상 및/또는 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함한다. 키트는 유리하게 본 발명의 시스템의 모든 요소가 제공되게 할 수 있다.

[0644] 질병-연관 유전자 및 폴리뉴클레오티드

[0645] 본 발명의 실행에서 표적화될 수 있는 질병-연관 유전자 및 폴리뉴클레오티드의 예는 표 A 및 B에 열거했다. 질병 특이 정보는 월드 와이드 웹 상에서 입수 가능한 정보[McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine,

Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) 및 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)]로부터 입수할 수 있다. 신호화 생화학 경로-연관 유전자 및 폴리뉴클레오티드의 예는 표 C에 열거했다. 이들 유전자 및 경로의 돌연변이는 기능에 영향을 미치는 부적절한 양의 단백질 또는 부적절한 단백질의 생산을 야기할 수 있다. 유전자, 질병 및 단백질의 추가 예는 2012년 12월 12일 제출된 US 가출원 제61/736,527호로부터 참조로서 본원에 통합된다. 이러한 유전자, 단백질 및 경로는 CRISPR 복합체의 표적 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0646] [표 A]

질병/장애	유전자(들)
종양 형성	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1A; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR alpha; PPAR 감마; WT1 (Wilms Tumor); FGF 수용체 패밀리 멤버 (5 개 멤버: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2A; APC; RB (retinoblastoma); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (Androgen Receptor); TSG101; IGF; IGF 수용체; Igf1 (4 개 변이체); Igf2 (3 개 변이체); Igf 1 수용체; Igf2 수용체; Bax; Bcl2; 카스파제 패밀리 (9 개 멤버: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
노인성 망막황반 변성	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (ceruloplasmin)); Timp3; 카텡신 D; Vldlr; Ccr2
조현병	뉴레굴린 1 (Nrg1); Erb4 (뉴레굴린에 대한 수용체); 컴플렉스 1 (Cplx1); Tph1 트립토판 수산화 효소; Tph2 트립토판 수산화 효소 2; 뉴펙신 1; GSK3; GSK3A; GSK3B
장애	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6a3; DAOA; DTNBPI; Dao (Dao1)

[0647]

질병/장애	유전자(들)
트리뉴클레오티드 반복 장애	HTT (Huntington's Dx); SBMA/SMAX1/AR (케네디 병); FXN/X25 (프레드리히 운동실조); ATX3 (마카도- 조셉 병); ATXN1 및 ATXN2 (척수소뇌성 실조증); DMPK (근긴장성 이영양증); 아트로핀-1 및 Atn1 (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP - 세계적 불안정성); VLDLR (알츠하이머); Atxn7; Atxn10
취약 X 증후군	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
세크레타아제 관련 장애	APH-1 (알파 및 베타); 프레세닐린(Psen1); 니카스트린 (Ncstn); PEN-2
기타	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
프리온- 관련 장애	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
약물 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, 아쿠아포린 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); II-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/CARD15 for IBD; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
파킨슨병	x-시누클레인; DJ-1; LRRK2; 파킨; PINK1

[0648]

[0649] [표 B]

혈액 및 응고 질병 및 장애	빈혈증 (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5c3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 베어 림프구 증후군 (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), 출혈성 질병(TBXA2R, P2RX1, P2X1); 인자 H 및 인자 H-유사 1 (HF1, CFH, HUS); 인자 V 및 인자 VIII (MCFD2); 인자 VII 결핍(F7); 인자 X 결핍(F10); 인자 XI 결핍(F11); 인자 XII 결핍(F12, HAF); 인자 XIII 결핍(F13a1, F13a); 인자 XIIIb 결핍(F13b); 판코니 빈혈증 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 혈구탐식성 림프조직구증(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 장애(ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 겸상 적혈구 빈혈증(HBB); 탈라세미아 (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1).
-----------------	---

[0650]

세포 조절장애 및 증양 질병 및 장애	C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), 출혈성 질병(TBXA2R, P2RX1, P2X1); 인자 H 및 인자 H-유사 1 (HF1, CFH, HUS); 인자 V 및 인자 VIII (MCFD2); 인자 VII 결핍(F7); 인자 X 결핍(F10); 인자 XI 결핍(F11); 인자 XII 결핍(F12, HAF); 인자 XIII 결핍(F13a1, F13a); 인자 XIIIb 결핍(F13b); 판코니 빈혈증 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 혈구탐식성 림프조직구증(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 장애(ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 겸상 적혈구 빈혈증(HBB); 탈라세미아 (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1).
세포 조절장애 및 증양 질병 및 장애	B-세포 비-호지킨 림프종(BCL7A, BCL7); 백혈병 (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4b, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, 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 장애	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3dS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 자가면역 림프증식성 증후군 (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1a); 복합 면역결핍, (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), HIV 감수성 또는 감염(IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCKR5 (CCR5)); 면역결핍(CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14b,

[0651]

	<p>TAC1); 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); 심각한 복합 면역결핍(SCIDs)(JAK3, JAKL, DCLRE1c, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3d, T3d, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4).</p>
<p>대사성, 간, 신장 및 단백질 질병 및 장애</p>	<p>아밀로이드 신경병증(TTR, PALB); 아밀로이드증 (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); Cirrhosis (KRT18, KRT8, CIRH1a, NAIC, TEX292, KIAA1988); 낭포성 섬유증 (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); 당뇨병(SLC2a2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); 간 선종, 142330 (TCF1, HNF1a, MODY3), 간부전, 이른 발병, 및 신경 장애(SCOD1, SCO1), 간 리파아제 결핍 (LIPC), 간암, 암 및 암종(CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; 수질 낭성 신장 질병(UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); 페닐케톤뇨증(PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); 다발성 낭포성 및 간 질병 (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63).</p>
<p>근육/골격 질병 및 장애</p>	<p>베커 근위축증(DMD, BMD, MYF6), 뒤시엔느 근위축증(DMD, BMD); 에머리-드라이푸스 근위축증(LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, CMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); 안면견갑상완근 이영양증 (FSHMD1A, FSHD1A); 근육성 이영양증 (FKRP, MDC1c, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1d, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2a, LGMD2H, FKRP, MDC1c, LGMD2I, TTN, CMD1g, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1c, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); 골화성증(LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); 근위축증 (VAPB, VAPC, ALS8,</p>

[0652]

	SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1).
신경학 및 신경 질병 및 장애	ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); 알츠하이머병(APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLAU, 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); 취약 X 증후군 (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); 헌팅턴병 및 질병 유사 장애(HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); 과킨슨병 (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); 레프 증후군 (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-Synuclein, DJ-1); 조현병 (뉴레굴린 1 (Nrg1), Erb4 (뉴레굴린에 대한 수용체), 컴플렉신 1 (Cplx1), Tph1 트립토판 수산화효소, Tph2, 트립토판 수산화효소 2, Neurexin 1, GSK3, GSK3A, GSK3B, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6a3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); 세크레타제 관련 장애 (APH-1 (알파 및 베타), 프레세닐린 (Psen1), 니카스트린, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2); 트리뉴클레오티드 반복 장애(HTT (헌팅턴병), SBMA/SMAX1/AR (케네디병), FXN/X25 (프레드리히 운동실조), ATX3 (마카도-조셉병), ATXN1 및 ATXN2 (척수소뇌성 실조증), DMPK (강직성 근위축증), 아트로핀-1 및 Atn1 (DRPLA Dx), CBP (Creb-BP – 세계적 불안정성), VLDLR (알츠하이머), Atnx7, Atnx10).
안구 질병 및 장애	노인성 황반변성 (Aber, Ccl2, Cc2, cp (세룰로플라스민), Timp3, 카텔신 D, Vldlr, Cer2); 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, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM,

[0653]

	KRIT1); 각막 혼탁 및 이영양증 (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, MIS1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 선천적 편평 각막 (KERA, CNA2); 녹내장 (MYOC, TIGR, GLC1a, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1e, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); 레베르 선천성 흑암시(CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 망막황반 이영양증 (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).
--	--

[0654]

[0655]

표 C

세포 기능	유전자	
PI3K/AKT 신호화	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2;	
	PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1;	
	AKT2; IKKBK; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2;	
	PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2;	
	ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3;	
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7;	
	YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKKBK; RELB; DYRK1A;	
	CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;	
	CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1;	
	PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2;	
	TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;	
	HSP90AA1; RPS6KB1	
	ERK/MAPK 신호화	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2;
		EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6;
		MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1;
PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A;		
PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN;		
EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC;		
CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ;		
PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;		
MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1;		
PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1;		
CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK		
당질코르티코이드 수용체 신호화		RAC1; TAF4b; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1;
	MAPK1; SMAD3; AKT2; IKKBK; NCOR2; UBE2I;	
	PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2;	
	MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1;	

[0656]

세포 기능	유전자
	MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1
축삭 유도 신호화	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; IGF1; RAC1; RAPIA; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5a; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA
에프린 수용체 신호화	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAPIA; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIMI1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK
액틴 세포골격 신호화	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIMI1; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; VAV3; SGK
현탕턴병 신호화	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2; MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SPI1; CAPN2; PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST; GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1; GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2;

[0657]

세포 기능	유전자
	HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A;
	HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX;
	ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
아폽토시스 신호화	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1;
	BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB;
	CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8;
	BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA;
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF;
	RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2;
	CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2;
	BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK;
	CASP3; BIRC3; PARP1
B 세포 수용체 신호화	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1;
	MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9;
	EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;
	MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1;
	NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN;
	GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
백혈구 혈관유출 신호화	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA;
	RAC1; RAPIA; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11;
	MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12;
	PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB;
	MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK;
	MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2;
	CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK;
	CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9
인테그린 신호화	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAPIA;
	TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2;
	CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;
	SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP;
	RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1;
	TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2;
	CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
급성기 반응 신호화	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14;
	PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS;
	MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1;
	TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1;
	IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1;

[0658]

세포 기능	유전자
	CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6
PTEN 신호화	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1
p53 신호화	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3
아릴 하이드로카본 수용체 신호화	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
생체이물 대사 신호화	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1a; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
SAPK/JNK 신호화	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK

[0659]

세포 기능	유전자
PPAr/RXR 신호화	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN;
	RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2;
	ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8;
	IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1a;
	NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7;
	CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1;
	TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1;
ADIPOQ	
NF-KB 신호화	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6;
	TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2;
	KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF;
	INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1;
	PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10;
	GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1
뉴레클린 신호화	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1;
	MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI;
	CDKN1B; STAT5B; PRKDI; MAPK3; ITGA1; KRAS;
	PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2;
	ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3;
	EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL;
	AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1
Wnt & 베타 카테닌 신호화	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1e; GJA1; SMO;
	AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A;
	WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK;
	LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1;
	PPP2R5C; WNT5a; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1;
	GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B;
	AKT3; SOX2
인슐린 수용체 신호화	PTEN; INS; EIF4E; PTPN11; PRKCZ; MAPK1; TSC1;
	PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3;
	MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1;
	SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN;
	MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;
	GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;
	RPS6KB1
IL-6 신호화	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11;
	IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3;
	MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1;
	MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG;
	RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3;
MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6	
간 답즙울혈	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA;
	RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8;

[0660]

세포 기능	유전자
	PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1;
	TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBK; RELB; MAP3K7; IL8;
	CHUK; NRIH2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4;
	JUN; IL1R1; PRKCA; IL6
IGF-1 신호화	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2;
	PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A;
	YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3;
	FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1
NRF2-매개 산화 스트레스 반응	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1;
	NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL;
	NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP;
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1;
	GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1
간섭유증/간	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF;
성장 세포 활성화	SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9;
	IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8;
	PDGFRA; NFKB1; TGFB1; SMAD4; VEGFA; BAX;
	IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9
PPAR 신호화	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKKB;
	NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3;
	NR1P1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2;
	PPARGC1a; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBK;
	RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA;
	MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1
Fc 엘리트론 RI 신호화	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD;
	MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN;
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3;
	VAV3; PRKCA
G-단백질 커플링 수용체 신호화	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKKB;
	PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB;
	PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1;
	IKBK; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK;
	PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3;
	PRKCA
이노시톨 포스페이트 대사	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6;
	MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3;
	MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2;
	PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1;

[0661]

세포 기능	유전자
	MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
PDGF 신호화	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2
VEGF 신호화	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA
천연 킬러 세포 신호화	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA
세포 주기: G1/S	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC;
체크포인트 조절	ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RBL1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6
T 세포 수용체 신호화	RAC1; ELK1; MAPK1; IKKBK; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBK; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3
사멸 수용체 신호화	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKKBK; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBK; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3
FGF 신호화	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF
GM-CSF 신호화	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1
근위축성 측색	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2;

[0662]

세포 기능	유전자
경화증 신호화	PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1;
	PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5a; CASP1;
	APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
JAK/Stat 신호화	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B;
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A;
	PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1;
	AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3;
STAT1	
니코티네이트 및 니코틴아미드	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1;
	PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1;
대사	PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2;
	MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
	MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
케모카인 신호화	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ;
	CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13;
	RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1;
	MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
IL-2 신호화	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS;
	STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS;
	SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2;
	JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3
시냅스 장기	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS;
역압	PRKCE; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3;
	KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA;
	YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
에스트로겐 수용체 신호화	TAF4b; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2;
	SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1;
	HDAC3; PPARGC1a; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP;
단백질 유비퀴틴 작용 경로	MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4;
	CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7;
IL-10 신호화	USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8;
	USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
	TRAF6; CCR1; ELK1; IKKBK; SPI1; FOS; NFKB2;
	MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF;
VDR/RXR 활성화	IKKBK; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1;
	JUN; IL1R1; IL6
	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1;
	NCOR2; SPI1; PRKCE; CDKN1B; PRKD1; PRKCD;
	RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1;

[0663]

세포 기능	유전자
	LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
TGF-베타 신호화	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFB1; SMAD4; JUN; SMAD5
톨-유사 수용체 신호화	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKKBK; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKKBK; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN
p38 MAPK 신호화	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFB1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1
뉴트로핀/TRK 신호화	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4
FXR/RXR 활성화	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTP; MAPK9; PPARGC1a; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1
시냅스 장기	PRKCE; RAPIA; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1;
증강	PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA
칼슘 신호화	RAPIA; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6
EGF 신호화	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1
심혈관 시스템에서의	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT;
저산소증 신호화	HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1
RXR 기능의	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1;
LPS/IL-1 매개 저해	MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1
LXR/RXR 활성화	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9

[0664]

세포 기능	유전자
아밀로이드 과정	PRKCE; CSNK1e; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2;
	CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1;
	PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP
IL-4 신호화	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1;
	PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	FRAP1; AKT3; RPS6KB1
세포 주기: G2/M DNA	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC;
손상 체크포인트	CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A;
조절	PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A
심혈관 시스템에서의	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3;
산화질소 신호화	CAVI; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1;
	VEGFA; AKT3; HSP90AA1
퓨린 대사	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4;
	PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C;
	NT5E; POLD1; NME1
cAMP-매개 신호화	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3;
	SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4
미토콘드리아 기능부전	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9;
	PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3
노치 신호화	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2;
	PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4
소포체	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4;
스트레스 경로	EIF2AK3; CASP3
피리미딘 대사	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B;
	NT5E; POLD1; NME1
파킨슨 신호화	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7;
	PARK2; CASP3
심장 & 베타 아드레날린작용성 신호화	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
해당/포도당신생	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1
인터페론 신호화	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3
소닉 헤지호그 신호화	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1b
글리세롤인지질	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
대사	
인지질 분해	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2

[0665]

세포 기능	유전자
트립토판 대사	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1
리신 분해	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C
뉴클레오티드 절제 수복	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1
경로	
녹말 및 수크로스	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1
대사	
아미노당 대사	NQO1; HK2; GCK; HK1
아라키돈산	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
대사	
24 시간 주기 리듬 신호화	CSNK1e; CREB1; ATF4; NR1d1
응고 시스템	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3
도파민 수용체	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
신호화	
글루타민 대사	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1
글리세로지질 대사	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2
리놀산 대사	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
메티오닌 대사	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3a
피루빈산 대사	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA
아르기닌 및 프롤린	ALDH1A1; NOS3; NOS2A
대사	
에이코사노이드 신호화	PRDX6; GRN; YWHAZ
프룩토오스 및 만노스	HK2; GCK; HK1
대사	
갈락토오스 대사	HK2; GCK; HK1
스틸벤, 쿠마린 및	PRDX6; PRDX1; TYR
리그닌 생합성	
항원 표출	CALR; B2M
경로	
스테로이드의 생합성	NQO1; DHCR7
부타노에이트 대사	ALDH1A1; NLGN1
시트레이트 주기	IDH2; IDH1
지방산 대사	ALDH1A1; CYP1B1

[0666]

세포 기능	유전자
글리세로인지질 대사	PRDX6; CHKA
히스티딘 대사	PRMT5; ALDH1A1
이노시톨 대사	ERO1L; APEX1
사이토크롬 p450 에 의한	GSTP1; CYP1B1
생체이물의 대사	
메탄 대사	PRDX6; PRDX1
페닐알라닌 대사	PRDX6; PRDX1
프로파노에이트 대사	ALDH1A1; LDHA
셀라노아미노산 대사	PRMT5; AHCY
스핑고지질 대사	SPHK1; SPHK2
아미노포스포네이트 대사	PRMT5
안드로겐 및 에스트로겐 대사	PRMT5
아스코르베이트 및 알다레이트 대사	ALDH1A1
담즙산 생합성	ALDH1A1
시스테인 대사	LDHA
지방산 생합성	FASN
글루타메이트 수용체 신호화	GNB2L1
NRF2-매개 산화 스트레스 반응	PRDX1
펜토오스 포스페이트 경로	GPI
펜토오스 및 글루쿠로네이트 상호전환	UCHL1
레티놀 대사	ALDH1A1

[0667]

세포 기능	유전자
리보플라빈 대사	TYR
티로신 대사	PRMT5, TYR
유비퀴린 생합성	PRMT5
발린, 류신 및 이소류신 분해	ALDH1A1
글리신, 세린 및 트레오닌 대사	CHKA
리신 분해	ALDH1A1
통증/맛	TRPM5; TRPA1
통증	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2;
	Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
미토콘드리아 기능	AIF; CytC; SMAC (디아블로); Aifm-1; Aifm-2
발달 신경학	BMP-4; 초르딘(Chrd); 노긴(Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); 베타-카테닌; Dkk-1; 프리즐드 관련 단백질; Otx-2; Gbx2; FGF-8; 릴린; Dab1; unc-86 (Pou4f1 또는 Brn3a); Numb; Reln

[0668]

[0669]

본 발명의 구현예는 또한 유전자를 낙아웃시키고, 유전자를 증폭하고 DNA 반복 불안정성 및 신경성 장애와 연관된 특정 돌연변이를 수복하는 것에 관련된 방법 및 조성물에 관한 것이다(Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, Genetic Instabilities and Neurological Diseases, Second Edition, Academic Press, Oct 13, 2011-

Medical). 중열 반복 서열의 특이 양태는 20개 초과인 인간 질병에 원인임이 발견되었다(New insights into repeat instability: role of RNADNA hybrids. McIvor EI, Polak U, Napierala M. RNA Biol. 2010 Sep-Oct;7(5):551-8). CRISPR-Cas 시스템은 게놈 불안정성의 이들 결함을 교정하기 위해 활용될 수 있다.

[0670] 본 발명의 추가 양태는 라포라병과 연관된 것으로 확인된 EMP2A 및 EMP2B 유전자에서 결함을 교정하기 위해 CRISPR-Cas 시스템을 사용하는 것에 관한 것이다. 라포라병은 청소년기에 간질성 발작으로서 시작할 수 있는 진행성 마이오클로누스 간질을 특징으로 하는 상염색체 열성 질환이다. 질병의 몇몇 경우에서 아직 확인되지 않은 유전자의 돌연변이에 의해 초래될 수 있다. 질병은 발작, 근경련, 걷기 어려움, 치매, 및 결국 사망을 초래한다. 질병의 진행에 대해 효과적으로 주어지는 치료법은 현재 없다. 간질과 연관된 다른 유전 이상은 또한 CRISPR-Cas 시스템에 의해 표적화될 수 있으며 근본적인 유전학은 문헌(Genetics of Epilepsy and Genetic Epilepsies, edited by Giuliano Avanzini, Jeffrey L. Noebels, Mariani Foundation Paediatric Neurology:20; 2009)에 추가로 기술된다.

[0671] T 세포 수용체(TCR) 유전자를 불활성화시키는 데 관련된, Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20110158957호의 방법은 또한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템으로 변형될 수 있다. 다른 예에서, Sangamo BioSciences, Inc.로 양도된 미국 특허 공개 제20100311124호 및 Collectis로 양도된 미국 특허 공개 제 20110225664호의 방법은 둘 다 글루타민 합성효소 유전자 발현 유전자를 불활성화시키는 데 관련된 것으로서, 또한 본 발명의 CRISPR Cas 시스템으로 변형될 수 있다.

[0672] 본 발명의 여러 추가 양태는 국립보건원(National Institutes of Health)의 웹사이트에서 토픽 서브섹션 유전 장애(Genetic Disorders)(웹사이트 health.nih.gov/topic/GeneticDisorders) 하에 추가 기재된 광범위한 유전 질환과 연관된 결함을 교정하는 것에 대한 것이다. 유전 뇌 질환은 부신백질이영양증, 뇌량의 무발생증, 에카르디 증후군, 알퍼스병, 알츠하이머병, 바스 증후군, 바텐병, CADASIL, 소녀 변성, 파브리병, 게르스트만 슈트라우슬러 슈트라우슬러 사인키병, 헌팅턴병 및 다른 상중 반복 장애, 라이병, 레쉬-니한 증후군, 멘케스병, 미토콘드리아 근병증 및 NINDS 거대후두각을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 질환은 국립보건원의 웹사이트에서 서브 섹션 유전 뇌 장애(Genetic Brain Disorders)하에 추가 기재된다.

[0673] 전체에서 착수할 경우 인용하고 있는 문서와 함께 본원에 참조로서 통합된 Cartier의 문헌에서 동종이계 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)이 홀러병(Hurler's disease)을 갖는 환자의 뇌로 정상 리소좀 효소를 전달하기 위해 사용되는 것을 인식하며 ALD를 치료하기 위한 HSC 유전자 치료의 논의가 있다("MINI-SYMPOSIUM: X-Linked Adrenoleukodystrophy, Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in X-Linked Adrenoleukodystrophy," Brain Pathology 20 (2010) 857-862). 2명의 환자에서, 말초 CD34+세포는 과립구-결장 자극 인자(G-CSF) 고정화 후 수집되고 형질도입된 with an 척수증식성 육종 바이러스 증강제인, 음성 대조 영역 제거된, d1587rev 프라이머 결합 부위가 치환된 (MND)-ALD 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 환자로부터의 CD34+ 세포는 낮은 농도의 사이토카인의 존재 하에서 16시간 동안 MND-ALD 벡터로 형질도입되었다. 형질도입된 CD34+ 세포는 특히 3개 복제-컴피턴트 렌티바이러스 (RCL) 어레이를 포함하는 다양한 안전성 시험을 5% 세포 상에서 실행하기 위해 형질도입 후 냉동되었다. CD34+ 세포의 형질도입 효율은 0.65 내지 0.70 사이의 렌티바이러스 통합된 카피의 평균수를 갖는 35% 내지 50%의 범위였다. 형질도입된 CD34+ 세포를 해동한 후, 환자는 부슬판 및 시클로포스-파미드로를 이용한 완전한 강한 골수억제 후 $4 \cdot 10^6$ 형질도입된 CD34+ 세포/kg 초과로 재주입되었다. 환자의 HSC는 유전자-교정된 HSC의 접목을 촉진하기 위해 제거되었다. 혈액학적 회복은 2명의 환자에서 13일 및 15일 사이에 일어났다. 거의 완전한 면역학적 회복이 첫번째 환자에서 12개월째에 일어났으며, 두번째 환자에 대해서는 9개월째에 일어났다. 렌티바이러스를 사용하는 것과 대조적으로, 방분야의 지식 및 이 내용에서의 기재를 가지고, 당업자는 돌연변이를 표적화하고 교정하는 CRISPR-Cas9 시스템을 (예를 들어, 적합한 HDR 주형을 가지고) ALD에 관해 HSC를 교정할 수 있으며; 구체적으로, sgRNA는 퍼옥시좀 막 전달체 단백질인 ALD에 대해 코딩하는 X 염색체 상에 위치한 유전자인 *ABCD1*의 돌연변이를 표적화할 수 있으며, HDR은 단백질의 적합한 발현에 대한 코딩을 제공할 수 있다. 이 내용으로부터 돌연변이 및 Cas9 단백질을 표적화하는 sgRNA는 조혈 줄기 세포와 접촉될 수 있으며 HDR 주형이 퍼옥시좀 막 전달체 단백질의 발현을 위한 돌연변이의 교정을 위해 도입됐다.

[0674] 몇몇 구현예에서, 질환은 중앙형성일 수 있다. 질환이 중앙형성인 몇몇 구현예에서, 표적화될 유전자는 표 A에 열거된 것들 중 임의의 것이다(이러한 경우에서 PTEN 등). 몇몇 구현예에서, 질환은 노인성 황반변성일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 정신분열 장애일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 트리뉴클레오티드 반복 장애일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 취약 X 증후군일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 세크레타제 관련

장애일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 프리온-관련 장애일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 ALS일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 약물 중독일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 증상은 자폐증일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 알츠하이머병일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 염증일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 질환은 파킨슨병일 수 있다.

[0675] 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110023145호는 자폐 스펙트럼 장애 (ASD)와 연관된 세포, 동물 및 단백질을 유전적으로 변형시키기 위해 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하는 것을 기재한다. 자폐 스펙트럼 장애(ASD)는 사회적 상호작용 및 의사소통에서의 질적인 장애 및 한정되고 반복적이며 정형화된 패턴의 거동, 흥미, 및 활동을 특징으로 하는 장애의 그룹이다. 자폐증, 아스퍼거 증후군(AS) 및 명확히 진단되지 않는 확산적 발달장애(PDD-NOS)의 3가지 장애는 지능 기능 및 의학적 질환에 연관된, 심한 정도가 달라지는 동일한 장애의 연속체이다. ASD는 대부분 유전적으로 약 90%의 유전력을 갖는 유전적으로 결정된 장애이다.

[0676] 미국 특허 공개 제20110023145호는 본 발명의 CRISPR Cas 시스템에 적용될 수 있는 ASD와 연관된 단백질을 인코딩하는 임의의 염색체 서열의 편집을 포함한다. ASD와 연관된 단백질은 통상적으로 ASD의 발생 정도 또는 조짐에 대한 ASD와 연관된 단백질의 실험적 연관성에 근거하여 선별된다. 예를 들어, ASD와 연관된 단백질의 생산 비율 순환 농도가 ASD가 부족한 집단에 비해 ASD를 갖는 집단에서 증가되거나 감소될 수 있다. 단백질 수준의 차이는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹 기술을 사용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, ASD와 연관된 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현 (SAGE)의 연속 분석, 및 정량화 실시간 폴리머라제 캐스캐이드(Q-PCR)을 포함하는 게놈 기술을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현 프로파일을 획득함으로써 확인될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0677] ASD와 연관된 단백질과 연관될 수 있는 질병 상태 또는 장애의 비-제한적인 예는 자폐증, 아스퍼거 증후군(AS), 명확히 진단되지 않는 확산적 발달장애(PDD-NOS), 레트 증후군, 결절성 경화증, 페닐케톤뇨증, 스미스-렘리-오피츠 증후군 및 취약 X 증후군을 포함한다. 비-제한적인 예에 의해서, ASD와 연관된 단백질은 하기 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다: ATP10C 아미노인지질- MET MET 수용체 운반 ATPase 티로신 키나아제(ATP10C) BZRAP1 MGLUR5(GRM5) 대사성 글루타메이트 수용체 5(MGLUR5) CDH10 카데린-10 MGLUR6(GRM6) 대사성 글루타메이트 수용체 6(MGLUR6) CDH9 카데린-9 NLGN1 뉴로리긴-1 CNTN4 콘탁틴-4 NLGN2 뉴로리긴-2 CNTNAP2 콘탁틴-연관 SEMA5A 뉴로리긴-3 단백질-유사 2(CNTNAP2) DHCR7 7-디하이드로디미리스토일포스파티딜콜린 NLGN4X 뉴로리긴-4 X-환원효소(DHCR7) 연결된 DOC2A 이중 C2-유사 도메인- NLGN4Y 뉴로리긴-4 Y-함유 단백질 알파 연결 DPP6 디펙티달 NLGN5 뉴로리긴-5 아미노캡시다아제-유사 단백질 6 EN2 인그레일드(engrailed) 2(EN2) NRCAM 뉴런 세포 부착 분자(NRCAM) MDGA2 취약 X 정신 지체 NRXN1 뉴렉신-1 1(MDGA2) FMR2(AFF2) AF4/FMR2 패밀리 멤버 2 OR4M2 후각 수용체(AFF2) 4M2 FOXP2 포크헤드 박스 단백질 P2 OR4N4 후각 수용체(FOXP2) 4N4 FXR1 취약 X 정신적 OXTR 옥시토신 수용체 지연, 상염색체(OXTR) 상동체 1(FXR1) FXR2 취약 X 정신적 PAH 페닐알라닌 지연, 상염색체 수소화효소(PAH) 상동체 2(FXR2) GABRA1 감마-아미노부티르산 PTEN 포스파타아제 및 수용체 서브유닛 알파-1 텐신 상동체(GABRA1)(PTEN) GABRA5 GABAA(.감마.-아미노부티릭 PTPRZ1 수용체-유형 산) 수용체 알파5 티로신-단백질 서브유닛(GABRA5) 포스파타아제 제타(PTPRZ1) GABRB1 감마-아미노부티르산 RELN 릴린 수용체 서브유닛 베타-1 (GABRB1) GABRB3 GABAA(.감마.-아미노부티릭 RPL10 60S 리보솜 산) 수용체 .베타.3 서브유닛 단백질 L10(GABRB3) GABRG1 감마-아미노부티르산 SEMA5A 세미포린-5A 수용체 서브유닛 감마-1(SEMA5A)(GABRG1) HIRIP3 HIRA-상호작용 단백질 3 SEZ6L2 발자 관련 6 상동체(마우스)- 유사 2 HOXA1 호메오박스 단백질 Hox-A1 SHANK3 SH3 및 다수(HOXA1) 안키린 반복 도메인 3(SHANK3) IL6 인터류킨-6 SHBZRAP1 SH3 및 다수 안키린 반복 도메인 3(SHBZRAP1) LAMB1 라미닌 서브유닛 베타-1 SLC6a4 세로토닌(LAMB1) 트랜스포터(SERT) MAPK3 미토겐-활성화 단백질 TAS2R1 미각 수용체 키나아제 3 유형 2 멤버 1 TAS2R1 MAZ Myc-연관 아연 핑거 TSC1 결절성 경화증 단백질 단백질 1 MDGA2 MAM 도메인 함유 TSC2 결절성 경화증 글리코실포스파티딜이노시톨 단백질 2 앵커 2(MDGA2) MECP2 메틸 CpG 결합 UBE3A 유비퀴틴 단백질 단백질 2(MECP2) 리가아제 E3a(UBE3a) MECP2 메틸 CpG 결합 WNT2 윙리스-유형 단백질 2(MECP2) MMTV 통합 부위 패밀리, 멤버 2(WNT2).

[0678] 염색체가 편집된 ASD와 연관된 단백질의 동일성은 변할 수 있고 변할 것이다. 바람직한 구현예에서, 염색체 서열이 편집된 ASD와 연관된 단백질은 BZRAP1 유전자에 의해 인코딩되는 벤조디아자핀 수용체 (말초) 연관 단백질 1(BZRAP1), AFF2 유전자(또한 MFR2로 명명됨)에 의해 인코딩되는 AF4/FMR2 패밀리 멤버 2 단백질(AFF2), FXR1 유전자에 의해 인코딩되는 취약 X 정신 지체 상염색체 상동체 1 단백질(FXR1), FXR2 유전자에 의해 인코딩되는 취약 X 정신 지체 상염색체 상동체 2 단백질(FXR2), MDGA2 유전자에 의해 인코딩되는 MAM 도메인 함유 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커2 단백질(MDGA2), MECP2 유전자에 의해 인코딩되는 메틸 CpG 결합 단백질 2(MECP2),

MGLUR5-1 유전자(또한 GRM5로 명명됨)에 의해 인코딩되는 대사성 글루타메이트 수용체 5(MGLUR5), NRXN1 유전자에 의해 인코딩되는 뉴렉신 1 단백질, 또는 SEMA5A 유전자에 의해 인코딩되는 세미포린-5A 단백질(SEMA5A)일 수 있다. 예시적인 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물은 래트가고, 편집된 염색체 서열 인코딩 ASD와 연관된 단백질은 하기에 열거된다: BZRAP1 벤조디아자핀 수용체 XM_002727789, (말초) 연관 XM_213427, 단백질 1(BZRAP1) XM_002724533, XM_001081125 AFF2(FMR2) AF4/FMR2 패밀리 멤버 2 XM_219832, (AFF2) XM_001054673 FXR1 취약 X 정신적 NM_001012179 지연, 상염색체 상동체 1(FXR1) FXR2 취약 X 정신적 NM_001100647 지연, 상염색체 상동체 2(FXR2) MDGA2 MAM 도메인 함유 NM_199269 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 2(MDGA2) MECP2 Methyl CpG 결합 NM_022673 단백질 2(MECP2) MGLUR5 대사성 글루타메이트 NM_017012(GRM5) 수용체 5(MGLUR5) NRXN1 뉴렉신-1 NM_021767 SEMA5A 세미포린-5A(SEMA5A) NM_001107659.

[0679]

예시적인 동물 또는 세포는 ASD와 연관된 단백질을 인코딩하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 그 이상의 활성화 염색체 서열, 및 ASD와 연관된 단백질을 인코딩하는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 그 이상의 염색체 통합된 서열이다. 편집되거나 통합된 염색체 서열은 변경된 ASD와 연관된 단백질을 인코딩하기 위해 변형될 수 있다. ASD와 연관된 단백질의 돌연변이의 비-제한적인 예는 위치 18의 류신이 글루타민으로 대체된 뉴렉신 1의 L18Q 돌연변이, 위치 451의 아르기닌이 시스테인으로 대체된 뉴로리긴 3의 R451C 돌연변이, 위치 87의 아르기닌이 트립토판으로 대체된 뉴로리긴 4의 R87W 돌연변이, 위치 425의 이소류신이 발린으로 대체된 I425V 돌연변이를 포함한다. ASD-관련 염색체 서열에서 다른 돌연변이 및 염색체 재배열은 ASD와 연관되며 당 분야에서 공지되었다. 예를 들어, 이의 전체가 본원에 참조로 통합되는 문헌[Freitag et al. (2010) Eur. Child. Adolesc. Psychiatry 19:169-178, 및 Bucan et al. (2009) PLoS Genetics 5: e1000536]을 참조하라. 파킨슨병과 연관된 단백질의 예는 α-시누클레인, DJ-1, LRRK2, PINK1, 파킨, UCHL1, 신필린-1, 및 NURR1를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 추가-관련 단백질의 예는 예를 들어 ABAT를 포함할 수 있다. 염증-관련 단백질의 예는 예를 들어 Ccr2 유전자에 의해 인코딩되는 단핵구 화학주성인자 단백질-1(MCP1), Ccr5 유전자에 의해 인코딩되는 C-C 케모카인 수용체 유형 5(CCR5), Fcgr2b 유전자에 의해 인코딩되는 IgG 수용체 IIB(FCGR2b, 또한 CD32로도 명명됨), 또는 Fcgr1g 유전자에 의해 인코딩되는 Fc 엡실론 R1g(FCER1g) 단백질을 포함할 수 있다. 심혈관 질병 관련 단백질의 예는 예를 들어 IL1b(인터루킨 1, 베타), XDH(크잔틴 데하이드로게나제), TP53(종양 단백질 p53), PTGIS (프로스타글란딘 I2(프로스타시클린) 신타제), MB(미오글로빈), IL4(인터루킨 4), ANGPT1(안지오프이테틴 1), ABCG8(ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 G (WHITE), 멤버 8), 또는 CTSK(카텝신 K)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110023153호는 알츠하이머병에 연관된 세포, 동물 및 단백질을 유전적으로 변형시키기 위한 아연 핑거 뉴클레아제의 용도를 기재한다. 변형된 세포 및 동물이 AD의 연구에서 공통적으로 사용되는 측정-예컨대 학습 및 기억, 불안, 우울증, 중독 및 감각 운동 기능뿐만 아니라 거동, 작용성, 방리학적, 대사성 및 생화학 기능을 사용하여 AD의 발달 및/또는 진행에서의 표적화 돌연변이의 효과를 연구하기 위해 공지된 방법을 사용하여 추가 시험되었다.

[0680]

본 발명은 AD와 연관된 단백질을 인코딩하는 임의의 염색체 서열의 편집을 포함한다. AD-관련 단백질은 통상적으로 AD 장애에 대한 AD-관련 단백질의 실험 연관성에 근거하여 선별된다. 예를 들어, AD-관련 단백질의 생산 비율 또는 순환 농도가 AD 장애가 부족한 집단에 비해 AD 장애를 갖는 집단에서 상승하거나 감소될 수 있다. 단백질 수준에서의 차이는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹 기술을 사용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, AD-관련 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), 및 정량화 실시간 폴리머라제 캐스캐이드(Q-PCR)를 포함하는 게놈 기술을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현 프로파일을 획득함으로써 확인될 수 있다. 알츠하이머병 연관 단백질의 예는 예를 들어 VLDLR 유전자에 의해 인코딩되는 초저밀도 지단백질 수용체 단백질(VLDLR), UBA1 유전자에 의해 인코딩되는 유비퀴틴-유사 변형체 활성화 효소 1(UBA1), 또는 UBA3 유전자에 의해 인코딩되는 NEDD8-활성화 효소 E1 촉매 서브유닛 단백질(UBE1C)을 포함할 수 있다. 비-제한적인 예에 의해, AD에 연관된 단백질은 하기에 열거된 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 염색체 서열 인코딩된 단백질 ALAS2 델타-아미레볼린산 합성효소 2(ALAS2) ABCA1 ATP-결합 카세트 전달체(ABCA1) ACE 안지오텐신 I-전환 효소(ACE) APOE 아포지단백질 E 전구체(APOE) APP 아밀로이드 전구체 단백질(APP) AQP1 아쿠아포린 1 단백질(AQP1) BIN1 Myc 복스-의존-상호작용 단백질 1 또는 가교 인테그레이터 1 단백질(BIN1) BDNF 뇌-유래 신경영양성 인자(BDNF) BTNL8 부티로필린-유사 단백질 8(BTNL8) C10RF49 염색체 1 오픈 리딩 프레임 49 CDH4 카데린-4 CHRNB2 뉴런 아세틸콜린 수용체 서브유닛 베타-2 CKLFSF2 CKLF-유사 MARVEL 막통과 도메인-함유 단백질 2(CKLFSF2) CLEC4E C-유형 lectin 도메인 패밀리 4, 멤버 e(CLEC4E) CLU 클루스테인 단백질(또한 아포프지단백질 J로서 알려짐) CR1 적혈구 보체 수용체 1(CR1, 또한 CD35, C3b/C4b 수용체 및 면역 부착 수용체로서 알려짐) CRIL 적혈구 보체 수용체 1(CRIL) CSF3R 과립구 집락-자극 인자 3 수용체(CSF3R) CST3 시스테인 C 또는 시스타

틴 3 CYP2C 사이토크롬 P450 2C DAPK1 사멸-연관 단백질 키나아제 1(DAPK1) ESR1 에스트로젠 수용체 1 IgA 수용체의 FCAR Fc 단편(FCAR, 또한 CD89로서 알려짐) IgG의 FCGR3B Fc 단편, 저친화성 IIb, 수용체(FCGR3B 또는 CD16b) FFA2 유리 지방산 수용체 2(FFA2) FGA 피브리노겐(인자 I) GAB2 GRB2-연관-결합 단백질 2(GAB2) GAB2 GRB2-연관-결합 단백질 2(GAB2) GALP 갈라닌-유사 펩티드 GAPDHS 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수효소, 정자형성(GAPDHS) GMPB GMBP HP 합토크로빈(HP) HTR7 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 7(아데닐레이트 사이클라제-커플링) IDE 인슐린 분해 효소 IF127 IF127 IFI6 인터페론, 알파-유도성 단백질 6(IF16) IFIT2 테트라트리카펩티드 반복 2를 갖는 인터페론-유도 단백질(IFIT2) IL1RN 인터류킨-1 수용체 길항제(IL-1RA) IL8RA 인터류킨 8 수용체, 알파(IL8RA 또는 CD181) IL8RB 인터류킨 8 수용체, 베타(IL8RB) JAG1 재기드(Jagged) 1(JAG1) KCNJ15 칼륨 내부-정류 채널, 서브패밀리 J, 멤버 15(KCNJ15) LRP6 저-밀도 지단백질 수용체-관련 단백질 6(LRP6) MAPT 미소관-연관 단백질 tau(MAPT) MARK4 MAP/미소관 친화성-조절 키나아제 4(MARK4) MPHOSPH1 M-상 인단백질 1 MTHFR 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소 MX2 인터페론-유도 GTP-결합 단백질 Mx2 NBN 또한 NBN으로 알려진 니브린, NCSTN 니카스트린 NIACR2 니아신 수용체 2(NIACR2, 또한 GPR109B로 알려짐) NMNAT3 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐릴전달효소 3 NTM 뉴로트리민(또는 HNT) ORM1 오로스뮤코이드1(ORM1) 또는 알파-1-산 글리코단백질 1 P2RY13 P2Y 퓨리노셉터 13(P2RY13) PBEF1 니코틴아미드 포스포리보실전달효소(NAmPRTase 또는 Nampt) 또한 전-B-세포 집락-증강 인자 1(PBEF1) 또는 비스파민으로 알려짐 PCK1 포스포에놀피루브산 카르복실키나아제 PICALM 포스파티딜이노시톨 결합 클라트린 조립 단백질(PICALM) PLAU Uro키나아제-유형 플라스미노겐 활성화제(PLAU) PLXNC1 플렉신 C1(PLXNC1) PRNP 프리온 단백질 PSEN1 프레세닐린 1 단백질(PSEN1) PSEN2 프레세닐린 2 단백질(PSEN2) PTPRA 단백질 티로신 포스파타아제 수용체 유형 A 단백질(PTPRA) PH 도메인 및 SH3 결합 모티프 2(RALGPS2)를 갖는 RALGPS2 Ral GEF G-단백질 신호화 유사 2의 RGS2 조절자(RGS2) SELENBP1 셀레늄 결합 단백질 1(SELENBP1) SLC25A37 미토펜-1 SORL1 소르틸린-관련 수용체 L(DLR 클래스) 반복-함유 단백질(SORL1) TF 트랜스페린 TFAM 미토콘드리아 전사 인자 A TNF 종양 괴사 인자 TNFRSF10C 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10C(TNFRSF10C) TNFSF10 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, (TRAIL) 멤버 10a(TNFSF10) UBA1 유비퀴틴-유사 변형제 활성화 효소 1(UBA1) UBA3 NEDD8-활성화 효소 E1 촉매 서브유닛 단백질(UBE1C) UBB 유비퀴틴 B 단백질(UBB) UBQLN1 유비퀴틴-1 UCHL1 유비퀴틴 카르복실-말단 에스테라제 L1 단백질(UCHL1) UCHL3 유비퀴틴 카르복실-말단 가수분해효소 동위효소 L3 단백질(UCHL3) VLDLR 초저밀도 지단백질 수용체 단백질(VLDLR). 예시적인 구현예에서, 염색체 서열이 편집된 AD 연관된 단백질은 VLDLR 유전자에 의해 인코딩되는 초저밀도 지단백질 수용체 단백질(VLDLR), UBA1 유전자에 의해 인코딩되는 유비퀴틴-유사 변형제 활성화 효소 1(UBA1), UBA3 유전자에 의해 인코딩되는 NEDD8-활성화효소 E1 촉매 서브유닛 단백질(UBE1C), AQP1 유전자에 의해 인코딩되는 아쿠아포린 1 단백질(AQP1), UCHL1 유전자에 의해 인코딩되는 유비퀴틴 카르복실-말단 에스테라제 L1 단백질(UCHL1), UCHL3 유전자에 의해 인코딩되는 유비퀴틴 카르복실-말단 가수분해효소 동위효소 L3 단백질(UCHL3), UBB 유전자에 의해 인코딩되는 유비퀴틴 B 단백질(UBB), MAPT 유전자에 의해 인코딩되는 미소관-연관 단백질 tau(MAPT), PTPRA 유전자에 의해 인코딩되는 단백질 티로신 포스파타아제 수용체 유형 A 단백질(PTPRA), PICALM 유전자에 의해 인코딩되는 포스파티딜이노시톨 결합 클라트린 조립체 단백질(PICALM), CLU 유전자에 의해 인코딩되는 클루스테린 단백질(또한 아포프지단백질 J로도 알려짐), PSEN1 유전자에 의해 인코딩되는 프레세닐린 1 단백질, PSEN2 유전자에 의해 인코딩되는 프레세닐린 2 단백질, SORL1 유전자에 의해 인코딩되는 소르틸린-관련 수용체 L(DLR 클래스) A 반복-함유 단백질(SORL1) 단백질, APP 유전자에 의해 인코딩되는 아밀로이드 전구체 단백질(APP), APOE 유전자에 의해 인코딩되는 아포지단백질 E 전구체(APOE), 또는 BDNF 유전자에 의해 인코딩되는 뇌-유래 신경영양성 인자(BDNF)일 수 있다. 예시적인 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물은 래트이고, AD와 연관된 단백질을 인코딩하는 편집된 염색체 서열은 하기와 같다: APP 아밀로이드 전구체 단백질(APP) NM_019288 AQP1 아쿠아포린 1 단백질(AQP1) NM_012778 BDNF 뇌-유래 신경영양성 인자 NM_012513 CLU 클루스테린 단백질(또한 NM_053021 아포프지단백질 J로 알려짐) MAPT 미소관-연관 단백질 NM_017212 tau(MAPT) PICALM 포스파티딜이노시톨 결합 NM_053554 클라트린 조립 단백질(PICALM) PSEN1 프레세닐린 1 단백질(PSEN1) NM_019163 PSEN2 프레세닐린 2 단백질(PSEN2) NM_031087 PTPRA 단백질 티로신 포스파타아제 NM_012763 수용체 유형 A 단백질(PTPRA) SORL1 소르틸린-관련 수용체 L(DLR NM_053519, 클래스) A 반복-함유 XM_001065506, 단백질(SORL1) XM_217115 UBA1 유비퀴틴-유사 변형제 활성화 NM_001014080 효소 1(UBA1) UBA3 NEDD8-활성화 효소 E1 NM_057205 촉매 서브유닛 단백질(UBE1C) UBB 유비퀴틴 B 단백질(UBB) NM_138895 UCHL1 유비퀴틴 카르복실-말단 NM_017237 에스테라제 L1 단백질(UCHL1) UCHL3 유비퀴틴 카르복실-말단 NM_001110165 가수분해효소 동위효소 L3 단백질(UCHL3) VLDLR 초저밀도 지단백질 NM_013155 수용체 단백질(VLDLR). 동물 또는 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 AD와 연관된 단백질을 인코딩하는 방해된 염색체 서열 및 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상의 AD와 연관된 단백질을 인코딩하는 염색체 통합된 서열 인코딩을 포함할 수 있다. 편집되거나 통합된 염색체 서열은 AD와 연

관된 변경된 단백질을 인코딩하기 위해 변형될 수 있다. AD-관련 염색체 서열에서 다수의 돌연변이는 AD와 연관되었다. 예를 들어, APP 내의 V717I(즉 위치 717에서 발린이 이소류신으로 변화함) 미스센스 돌연변이는 가족성 AD를 초래한다. H163R(즉 위치 163에서 히스티딘이 아르기닌으로 변화함), A246E(즉 위치 246에서 알라닌이 글루탐산으로 변화함), L286V(즉 위치 286에서 류신이 발린으로 변화함) 및 C410Y(즉 위치 410에서 시스테인이 티로신으로 변화함)와 같은 프레세닐린-1 단백질에서의 다수의 돌연변이는 가족성 알츠하이머 유형 3을 초래한다. N141 I(즉 위치 141에서 아스파라긴이 이소류신으로 변화함), M239V(즉 위치 239의 메티오닌이 발린으로 변화함), 및 D439A(즉 위치 439에서 아스파테이트가 알라닌으로 변화함)와 같은 프레세닐린-2 단백질에서의 돌연변이는 가족성 알츠하이머 유형 4를 초래한다. AD-연관 유전자 및 질병에서의 유전 변이체의 다른 연관성은 당 분야에 공지되어 있다, 예를 들어, 이의 전체가 본원에 참조로서 통합된 Waring 등의 문헌[(2008) Arch. Neurol. 65:329-334]을 참조하라.

- [0681] 자폐 스펙트럼 장애와 관련된 단백질의 예는 예를 들어 BZRAP1 유전자에 의해 인코딩되는 벤조디아자핀 수용체 (말초) 관련 단백질 1(BZRAP1), AFF2 유전자(또한 MFR2로 명명됨)에 의해 인코딩되는 AF4/FMR2 패밀리 멤버 2 단백질(AFF2), FXR1 유전자에 의해 인코딩되는 취약 X 정신 지체 상염색체 상동체 1 단백질(FXR1), 또는 FXR2 유전자에 의해 인코딩되는 취약 X 정신 지체 상염색체 상동체 2 단백질(FXR2)을 포함할 수 있다.
- [0682] 황반변성과 관련된 단백질의 예는 예를 들어 ABCR 유전자에 의해 인코딩되는 ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1) 멤버 4 단백질(ABCA4), APOE 유전자에 의해 인코딩되는 아포지단백질 E 단백질(APOE), 또는 CCL2 유전자에 의해 인코딩되는 케모카인(C-C 모티프) 리간드 2 단백질(CCL2)를 포함할 수 있다.
- [0683] 조현병에 연관된 단백질의 예는 NRG1, ErbB4, CPLX1, TPH1, TPH2, NRXN1, GSK3A, BDNF, DISC1, GSK3B, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0684] 종양 억제에 관련된 단백질의 예는 예를 들어 ATM(변이 혈관확장성 운동실조증), ATR(혈관확장성 운동실조증 및 Rad3 관련), EGFR(상피 성장 인자 수용체), ERBB2(v-erb-b2 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 2), ERBB3(v-erb-b2 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 3), ERBB4(v-erb-b2 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 4), 노치 1, 노치 2, 노치 3, 또는 노치 4를 포함할 수 있다.
- [0685] 세크레타제 장애와 연관된 단백질의 예는 PSENEN(프레세닐린 인헨서 2 상동체(예쁜꼬마선충)), CTSB(카텝신 B), PSEN1(프레세닐린 1), APP(아밀로이드 베타(A4) 전구체 단백질), APH1B(앞인두 결함 1 상동체 B(예쁜꼬마선충)), PSEN2(프레세닐린 2(알츠하이머병 4)), 또는 BACE1(베타-부위 APP-절단 효소 1)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110023146호는 세크레타제-연관 장애와 연관된 세포, 동물 및 단백질을 유전적으로 변형시키기 위해 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하는 것을 개시한다. 세크레타제는 전구-단백질의 이의 생물학적 활성 형태로의 공정에 필수적이다. 세크레타제 경로의 다양한 성분에서의 결함은 많은 장애, 상세하게는 알츠하이머병(AD)과 같은 특징적 아밀로이드 생산 또는 아밀로이드 플라크를 갖는 장애의 원인이 된다.
- [0686] 세크레타제 장애 및 이들 장애와 연관된 단백질은 많은 장애에 대한 감수성, 장애의 존재, 장애의 심각성 또는 이들의 조합에 영향을 주는 다양한 세트의 단백질이다. 본원의 기재는 세크레타제 장애와 연관된 단백질을 인코딩하는 임의의 염색체 서열의 편집을 포함한다. 세크레타제 장애와 연관된 단백질은 통상적으로 세크레타제 장애의 발달과 세크레타제-관련 단백질의 실험 연관성에 근거하여 선별된다. 예를 들어, 세크레타제 장애와 연관된 단백질의 생산 비율 또는 순환 농도는 세크레타제 장애가 없는 집단에 비해 세크레타제 장애를 갖는 집단에서 상승되거나 감소될 수 있다. 단백질 수준에서의 차이는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹 기술을 이용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 세크레타제 장애와 연관된 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석 (SAGE), 및 정량 실시간 폴리머라제 캐스케이드(Q-PCR)를 포함하는 게놈 기술을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현 프로파일을 획득함으로써 확인될 수 있다. 비-제한적인 예에 의해, 세크레타제 장애와 연관된 단백질은 PSENEN (프레세닐린 인헨서 2 상동체 (예쁜꼬마선충)), CTSB (카텝신 B), PSEN1 (프레세닐린 1), APP (아밀로이드 베타 (A4) 전구체 단백질), APH1B (앞인두 결함 1 상동체 B (예쁜꼬마선충)), PSEN2 (프레세닐린 2 (알츠하이머병 4)), BACE1 (베타-부위 APP-절단 효소 1), ITM2B (내재막 단백질 2B), CTSD (카텝신 D), NOTCH1 (Notch 상동체 1, 전좌-연관 (초파리)), TNF (종양 괴사 인자 (TNF) 슈퍼패밀리, 멤버 2)), INS(인슐린), DYT10 (근육긴장이상 10), ADAM17 (ADAM 메탈로펩티다아제 도메인 17), APOE (아포지단백질 E), ACE (안지오텐신 I 전환 효소 (펩티딜-디펩티다아제 A) 1), STN (스타틴), TP53 (종양 단백질 p53), IL6 (인터류킨 6 (인터페론, 베타 2)), NGFR (신경 성장 인자 수용체 (TNFR 슈퍼패밀리, 멤버 16)), IL1B (인터류킨 1, 베타), ACHE (아세틸콜린에스테라아제 (Yt 혈액형)), CTNBN1 (카테닌 (카데린-연관 단백질), 베타 1, 88kDa),

IGF1 (인슐린-유사 성장 인자 1 (소마토메딘 C)), IFNG (인터페론, 감마), NRG1 (뉴레귤린 1), CASP3 (카파아제 3, 아포토시스-관련 시스템인 펩티다아제), MAPK1 (미토겐-활성화 단백질 키나아제 1), CDH1 (카데린 1, 유형 1, E-카데린 (상피)), APBB1 (아밀로이드 베타 (A4) 전구체 단백질-결합, 패밀리 B, 멤버 1 (Fe65)), HMGCR (3-히드록시-3-메틸글루타릴-조효소 A 환원효소), CREB1 (cAMP 반응성 요소 결합 단백질 1), PTGS2 (프로스타글란딘-엔도페록시드 합성효소 2 (상피 G/H 합성효소 및 사이클로옥시게나아제)), HES1 (스플릿 1의 모상 및 인헨서 인헨서, (초파리)), CAT (카탈라아제), TGFBI (변형 성장 인자, 베타 1), ENO2 (에놀라아제 2 (감마, 뉴런)), ERBB4 (v-erb-a 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 4 (조류)), TRAPPC10 (이동 단백질 입자 복합체 10), MAOB (모노아민 옥시다아제 B), NGF (신경 성장 인자 (베타 폴리펩티드)), MMP12 (매트릭스 메탈로펩티다아제 12 (마크로파아지 엘라스타아제)), JAG1 (재그드 1 (알라질 증후군)), CD40LG (CD40 리간드), PPARG (피옥시즘 증식체-활성화 수용체 감마), FGF2 (섬유아세포 성장 인자 2 (염기)), IL3 (인터류킨 3 (군락-자극 인자, 다수)), LRP1 (저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1), NOTCH4 (Notch 상동체 4 (초파리)), MAPK8 (미토겐-활성화 단백질 키나아제 8), PREP (프롤릴 엔도펩티다아제), NOTCH3 (Notch 상동체 3 (초파리)), PRNP (프리온 단백질), CTSG (카텡신 G), EGF (상피 성장 인자 (베타-유로가스톤)), REN (레닌), CD44 (CD44 분자 (인디안 혈액형)), SELP (셀렉틴 P (과립 막 단백질 140 kDa, 항원 CD62)), GHR (성장 호르몬 수용체), ADCYAP1 (adenylate 사이클라아제 activating 폴리펩티드 1 (뇌하수체)), INSR (인슐린 수용체), GFAP (신경교섬유질 산성 단백질), MMP3 (매트릭스 메탈로펩티다아제 3 (스트로멜리신 1, 프로켈라티나아제)), MAPK10 (미토겐-활성화 단백질 키나아제 10), SP1 (Sp1 전사 인자), MYC (v-myc 골수세포증 바이러스 암유전자 상동체 (조류)), CTSE (카텡신 E), PPARA (피옥시즘 증식체-활성화 수용체 알파), JUN (jun 암유전자), TIMP1 (TIMP 메탈로펩티다아제 저해제 1), IL5 (인터류킨 5 (집락-자극인자, 에오시노필)), IL1A (인터류킨 1, 알파), MMP9 (매트릭스 메탈로펩티다아제 9 (젤라티나아제 B, 92 kDa 젤라티나아제, 92 kDa 유형 IV 콜라게나아제)), HTR4 (5-히드록시트립타민 (세로토닌) 수용체 4), HSPG2 (헤파란 설페이트 프로테오글리칸 2), KRAS (v-Ki-ras2 키르스텐 래트 육종 바이러스 암유전자 상동체), CYCS (사이토크롬 c, 채강), SMG1 (SMG1 상동체, 포스파티딜이노시톨 3-키나아제-관련 키나아제 (예쁜꼬마선충)), IL1R1 (인터류킨 1 수용체, 유형 I), PROK1 (프로키네틴신 1), MAPK3 (미토겐-활성화 단백질 키나아제 3), NTRK1 (신경영양 티로신 키나아제, 수용체, 유형 1), IL13 (인터류킨 13), MME (막 메탈로-엔도펩티다아제), TKT (트랜스케롤라아제), CXCR2 (케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 2), IGF1R (인슐린-유사 성장 인자 1 수용체), RARA (레티노산 수용체, 알파), CREBBP (CREB 결합 단백질), PTGS1 (프로스타글란딘-엔도페록시드 합성효소 1 (상피 G/H 합성효소 및 사이클로옥시게나아제)), GALT (갈락토스-1-포스페이트 우리딜트랜스페라제), CHRM1 (콜린성 수용체, 무스카린성 1), ATXN1 (아탁신 1), PAWR (PRKC, 아포토시스, WT1, 조절제), NOTCH2 (Notch 상동체 2 (초파리)), M6PR (만노스-6-포스페이트 수용체 (양이온 의존성)), CYP46A1 (사이토크롬 P450, 패밀리 46, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 1), CSNK1 D (카제인 키나아제 1, 델타), MAPK14 (미토겐-활성화 단백질 키나아제 14), PRG2 (프로테오글리칸 2, 골수(천연 킬러 세포 활성화제, 에오시노필 과립 주요 염기 단백질)), PRKCA (단백질 키나아제 C, 알파), L1 CAM (L1 세포 부착 분자), CD40 (CD40 분자, TNF 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5), NR1I2 (핵 수용체 서브패밀리 1, 그룹 I, 멤버 2), JAG2 (재그드 2), CTNND1 (카데린 (카데린-연관 단백질), 델타 1), CDH2 (카데린 2, 유형 1, N-카데린 (뉴런)), CMA1 (키마아제 1, 비만 세포), SORT1 (소르틸린 1), DLK1 (델타-유사 1 상동체 (초파리)), THEM4 (티오에스테라아제 슈퍼패밀리 멤버 4), JUP (접합 플라코글로빈), CD46 (CD46 분자, 보체 조절 단백질), CCL11 (케모카인 (C-C 모티프) 리간드 11), CAV3 (카베올린 3), RNASE3 (리보뉴클레아제, RNase A 패밀리, 3 (호산구 양이온성 단백질)), HSPA8 (열 쇼크 70kDa 단백질 8), CASP9 (카파아제 9, 아포토시스-관련 시스템인 펩티다아제), CYP3A4 (사이토크롬 P450, 패밀리 3, 서브패밀리 A, 폴리펩티드 4), CCR3 (케모카인 (C-C 모티프) 수용체 3), TFAP2A (전사 인자 AP-2 알파 (활성화 증강제 결합 단백질 2 알파)), SCP2 (스테롤 담체 단백질 2), CDK4 (사이클린-의존 키나아제 4), HIF1A (저산소증 유도 인자 1, 알파 서브유닛 (염기성 헬릭스-루프-헬릭스 전사 인자)), TCF7L2 (전사 인자 7-유사 2 (T-세포 특이, HMG-박스)), IL1R2 (인터류킨 1 수용체, 유형 II), B3GALT1 (베타 1,3-갈락토실트랜스페라제-유사), MDM2 (Mdm2 p53 결합 단백질 상동체 (마우스)), RELA (v-reticuloendotheliosis 바이러스 암유전자 상동체 A (조류)), CASP7 (카파아제 7, 아포토시스-관련 시스템인 펩티다아제), IDE (인슐린-분해 효소), FABP4 (지방산 결합 단백질 4, 지방세포), CASK (칼슘/칼모둘린-의존 세린 단백질 키나아제 (MAGUK 패밀리)), ADCYAP1R1 (아데닐레이트 사이클라아제 활성화 폴리펩티드 1 (뇌하수체) 수용체 유형 I), ATF4 (활성화 전사 인자 4 (tax-반응성 증강제 요소 B67)), PDGFA (혈소관-유래 성장 인자 알파 폴리펩티드), C21 또는 f33(염색체 21 오픈 리딩 프레임 33), SCG5 (세크레토그라닌 V (7B2 단백질)), RNF123 (고리 핑거 단백질 123), NFKB1 (B-세포 내 카파 라이트 폴리펩티드 유전자 인헨서 핵인자 1), ERBB2 (v-erb-b2 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 2, 신경아세포종/교아종 유래 암유전자 상동체(조류)), CAV1 (카베올린 1, 소포 단백질, 22 kDa), MMP7 (매트릭스 메탈로펩티다아제 7 (마트릴리신, 자궁)), TGFA (변

형 성장 인자, 알파), RXRA (레티노이드 X 수용체, 알파), STX1A (신타신 1A (뇌)), PSMC4 (프로테아좀 (프로솜, 마크로파인) 26S 서브유닛, ATPase, 4), P2RY2 (퓨린작동성 수용체 P2Y, G-단백질 커플링됨, 2), TNFRSF21 (종양 괴사 인자종양 괴사 인자멤버 21), DLG1 (디스크, 큰 상동체 1 (초파리)), NUMBL (numb 상동체 (초파리)- 유사), SPN (시알로포린), PLSCR1 (인지질 스크램블라아제 1), UBQLN2 (유비퀴린 2), UBQLN1 (유비퀴린 1), PCSK7 (프로단백질 전환효소 서브틸리신/렉신 유형 7), SPON1 (딘스폰 1, 세포외 매트릭스 단백질), SILV (실버 상동체 (마우스)), QPCT (글루타미닐-펩티드 사이클로트랜스페라제), HESS (스플릿 5의 모상 및 인헨서 (초파리)), GCC1 (GRIP 및 휘감긴-코일 도메인 함유 1), 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 유전적으로 변형된 동물 또는 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 세크레타제 장애와 연관된 단백질을 인코딩 하는 방해된 염색체 서열 및 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 세크레타제 장애와 연관된 방해된 단백질을 인코딩하는 염색체성 통합된 서열을 포함할 수 있다.

[0687] 근위축성 측색 경화증과 연관된 단백질의 예는 SOD1(초산화 디스무타아제 1), ALS2(근위축성 측색 경화증 2), FUS(육종 내 융합), TARDBP(TAR DNA 결합 단백질), VAGFA(혈관 내피 성장 인자 A), VAGFB(혈관 내피 성장 인자 B), 및 VAGFC(혈관 내피 성장 인자 C), 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제20110023144호는 근위축성 측색 경화증(ALS) 질병과 연관된 세포, 동물 및 단백질을 유전적으로 변형시키기 위해 아연 핑거 뉴클레아제를 사용하는 것을 기재한다. ALS는 수의 운동과 관련된 대뇌 피질, 뇌 줄기, 및 척수에서의 특정 신경 세포의 점진적인 꾸준한 변성을 특징으로 한다.

[0688] 운동 뉴런 장애 및 이들 장애와 연관된 단백질은 운동 뉴런 장애의 발달에 대한 감수성, 운동 뉴런 장애의 존재, 운동 뉴런 장애의 심각성 또는 이들의 임의의 조합에 영향을 주는 다양한 세트의 단백질이다. 본원의 기재는 특이 운동 뉴런 장애인 ALS 질병에 연관된 단백질을 인코딩하는 임의의 염색체 서열의 편집을 포함한다. ALS에 연관된 단백질은 통상적으로 ALS에 대한 ALS-관련 단백질의 실험 연관성에 근거하여 선별된다. 예를 들어, ALS에 연관된 단백질의 생산 비율 또는 순환 농도는 ALS가 없는 집단에 비해 ALS를 갖는 집단에서 상승되거나 감소될 수 있다. 단백질 수준에서의 차이는 웨스턴 블롯, 면역 조직화학적 염색, 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 및 질량 분석을 포함하는 프로테오믹 기술을 사용하여 평가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, ALS에 연관된 단백질은 DNA 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), 및 정량 실시간 폴리머라제 캐스캐이드(Q-PCR)을 포함하는 게놈 분석을 사용하여 단백질을 인코딩하는 유전자의 유전자 발현 프로파일을 획득함으로써 확인될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비-제한적인 예에 의해, ALS에 연관된 단백질은 하기 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다: SOD1 과산화 디스무타아제 1, ALS3 근위축성 측색 수용성 경화증 3 SETX 세나탁신 ALS5 근위축성 측색 경화증 5 FUS 육종에 융합됨 ALS7 근위축성 측색 경화증 7 ALS2 근위축성 측색 DPP6 디펩티달-펩티다아제 6 경화증 2 NEFH 신경미세섬유, 헤비 PTGS1 프로스타글란딘-폴리펩티드 엔도페록시드 합성효소 1 SLC1A2 용질 담체 패밀리를 1 TNFRSF10B 종양 괴사 인자(신경교 고친화성 수용체 슈퍼패밀리, 글루타메이트 전달체), 멤버 10b 멤버 2 PRPH 페리페린 HSP90AA1 열 충격 단백질 90 kDa 알파(사이토솔), 클래스 A 멤버 1 GRIA2 글루타메이트 수용체, IFNG 인터페론, 감마 이온성, AMPA 2 S100B S100 칼슘 결합 FGF2 섬유아세포 성장 인자 2 단백질 B AOX1 알데하이드 산화효소 1 CS 시트레이트 합성효소 TARDBP TAR DNA 결합 단백질 TXN 티오레독신 RAPH1 Ras 연관 MAP3K5 미토겐-활성화 단백질(RaIGDS/AF-6) 및 키나아제 5 플렉스트린 상동성 도메인 1 NBEAL1 뉴로비친(neurobeachin)-유사 1 GPX1 글루타티온 과산화효소 1 ICA1L 소도 세포 자가 항원 RAC1 ras-관련 C3 보툴리누스 1.69 kDa-유사 독소 기질 1 MAPT 미소관-연관 ITPR2 이노시톨 1,4,5- 단백질 tau 트리포스페이트 수용체, 유형 2 ALS2CR4 근위축성 측색 GLS 글루타미나아제 경화증 2 (청소년) 염색체 영역, 후보 4 ALS2CR8 근위축성 측색 CNTFR 섬모 신경영양성 인자 경화증 2 (청소년) 수용체 염색체 영역, 후보 8 ALS2CR11 근위축성 측색 FOLH1 폴레이트 가수분해효소 1 경화증 2 (청소년) 염색체 영역, 서열 P4HB 프롤일4-수소화효소를 갖는 후보 11 FAM117b 패밀리를, 유사성 117, 멤버 B 베타 폴리펩티드 CNTF 섬모 신경영양성 인자 SQSTM1 세퀘스토솜(sequestosome) 1 STRADB STE20-관련 키나아제 NAIP NLR 패밀리를, 아포토시스 어댑터 베타 저해 단백질 YWHAQ 티로신 3- SLC33a1 용질 담체 패밀리를 33 모노옥시게나아제/트립토프(아세틸-CoA 전달체), 5-모노옥시게나아제 멤버 1 활성화 단백질, 세타 폴리펩티드 TRAK2 이동 단백질, 도 4 도 4 상동체, SAC1 키네신 결합 2 지질 포스포타아제 도메인 함유 NIF3L1 NIF3 NGG1 상호작용 INA 인터넥신 뉴런 인자 3-유사 1 매개 필라멘트 단백질, 알파 PARD3b par-3 분할COX8a 사이토크롬 c 산화효소 결합 3 상동체 B 서브유닛 VIIIA CDK15 사이클린-의존성 키나아제 HECW1 HECT, C2 및 WW 15 도메인 함유 E3 유비퀴틴 단백질 리가아제 1 NOS1 산화질소 합성효소 1 MET met 프로토-암유전자 SOD2 과산화 디스무타아제 2, HSPB1 열 충격 27 kDa 미토콘드리아 단백질 1 NEFL 신경미세섬유, 광 CTSB 카텝신 B 폴리펩티드 ANG 안지오게닌, HSPA8 열 충격 70 kDa 리보뉴클레아제, RNase A 단백질 8 패밀리를, 5 VAPB VAMP(비히클- ESR1 에스트로젠 수용체 1 연관 막 단백질)-연관 단백질 B 및 C SNCA 시누클레인, 알파 HGF 간세포 성장 인자 CAT 카탈라제 ACTB 액틴, 베타 NEFM 신경미세섬유, 매질 TH 티

로신 수소화효소 폴리펩티드 BCL2 B-세포 CLL/림프종 2 FAS Fas (TNF 수용체 슈퍼패밀리, 멤버 6) CASP3 카스파아제 3, 아포토시스-CLU 클루스테린 관련 시스테인 펩티다아제 SMN1 운동 뉴런의 생존 G6PD 글루코스-6-포스페이트 1, 텔로머 탈수소효소 BAX BCL2-연관 X HSF1 열 충격 전사 단백질 인자 1 RNF19A 고리 핑거 단백질 19A JUN jun 암유전자 ALS2CR12 근위축성 측삭 HSPA5 열 충격 70 kDa 경화중 2 (청소년) 단백질 5 염색체 영역, 후보 12 MAPK14 미토젠-활성화 단백질 IL10 인터유킨 10 키나아제 14 APEX1 APEX 뉴클레아제 TXNRD1 티오레독신 환원효소 1(다작용성 DNA 수복 효소) 1 NOS2 산화질소 합성효소 2, TIMP1 TIMP 메탈로펩티다아제 유도성 저해제 1 CASP9 카스파아제 9, 방출된 시스테인 아포토시스 펩티다아제의 아포토시스-XIAP X-연관 저해제 GLG1 골지 글리코단백질 1 EPO 에리트로포이에틴 VEGFA 혈관 내피 ELN 엘라스틴 성장 인자 A GDNF 신경교 세포 유래 NFE2L2 핵 인자(적혈구-신경영양성 인자 유래 2)-유사 2 SLC6a3 용질 담체 패밀리 6 HSPA4 열 충격 70 kDa (신경전달물질 단백질 4 전달체, 도파민), 멤버 3 APOE 아포지단백질 E PSMB8 프로테아좀(프로솜, 마크로파인) 서브유닛, 베타 유형, 8 DCTN1 디넥틴 1 TIMP3 TIMP 메탈로펩티다아제 저해제 3 KIFAP3 키네신-연관 SLC1a1 용질 담체 패밀리 1 단백질 3(뉴런/상피 고친화성 글루타메이트 전달체, 시스템 Xag), 멤버 1 SMN2 운동 뉴런의 생존 CCNC 사이클린 C 2, 동원체 MPP4 막 단백질, STUB1 STIP1 상동성 및 U-팔미토일화 4 박스 함유 단백질 1 ALS2 아밀로이드 베타 (A4) PRDX6 페록시레독신 6 전구체 단백질 SYP 시넵토파이신 CABIN1 칼시뉴린 결합 단백질 1 CASP1 카스파아제 1, 아포토시스-GART 포스포리보실글리신아미드 관련 시스테인 de 포르밀트랜스퍼라제, 펩티다아제 포스포리보실글리신아미드 합성효소, 포스포리보실아미노이미다졸 합성효소 CDK5 사이클린-의존성 키나아제 5 ATXN3 아타신 3 RTN4 레티쿨론 4 C1QB 보체 성분 1, q 서브컴포넌트, B 사슬 VEGFC 신경 성장 인자 HTT 헌팅틴 수용체 PARK7 파킨슨병 7 XDH 크산틴 탈수소효소 GFAP 신경교 섬유질 산성 MAP2 미소관-연관 단백질 단백질 2 CYCS 사이토크롬 c, IgG의 체성 FCGR3B Fc 단편, 저친화성 IIIb, UBL5 유비퀴틴-유사 5 과산화 디스뮤타아제에 대한 CCS 구리 사프론 MMP9 매트릭스 메탈로펩티다아제 SLC18a3 용질 담체 패밀리 18 9 (소포 아세틸콜린), 멤버 3 TRPM7 단기 수용체 HSPB2 열 충격 27 kDa 잠재적 양이온 채널, 단백질 2 서브패밀리 M, 멤버 7 AKT1 v-akt 뮤린 흉선종 DERL1 Der1-유사 도메인 패밀리, 바이러스 암유전자 상동체 1 멤버 1 CCL2 케모카인(C-C 모티프) NGRN 뉴그린, 신경돌기 리간드 2 성장 연관 GSR 글루타티온 환원효소 TPPP3 튜블린 중합화-촉진 단백질 패밀리 멤버 3 APAF1 세포사멸 펩티다아제 BTBD10 BTB (POZ) 도메인 활성화 인자 1 함유 10 GLUD1 글루타메이트 CXCR4 케모카인(C-X-C 모티프) 탈수소효소 1 수용체 4 SLC1A3 용질 담체 패밀리 1 FLT1 fms-관련 티로신(신경교 고친화성 글루타메이트 전달체), 멤버 3 키나아제 1 PON1 파라옥소나아제 1 AR 안드로젠 수용체 LIF 백혈병 저해 인자 ERBB3 v-erb-b2 적아세포 백혈병 바이러스 암유전자 상동체 3 LGALS1 렉틴, 갈락토시드-CD44 CD44 분자 결합, 가용성, 1 TP53 종양 단백질 p53 TLR3 톨-유사 수용체 3 GRIA1 글루타메이트 수용체, GAPDH 글리세르알데히드-3- 이온성, AMPA 1 포스페이트 탈수소효소 GRIK1 글루타메이트 수용체, DES 데스민 이온성, 카이네이트 1 CHAT 콜린 아세틸트랜스퍼라제 FLT4 fms-관련 티로신 키나아제 4 CHMP2B 염색질 변형 BAG1 BCL2-연관 단백질 2B 안타노젠 MT3 메탈로티오네인 3 CHRNA4 콜린성 수용체, 니코틴성, 알파 4 GSS 글루타티온 합성효소 BAK1 BCL2-길항제/킬러 1 KDR 키나아제 삽입 도메인 GSTP1 글루타티온 S-트랜스퍼라제 수용체(제II형 I 파이 1 수용체 티로신 키나아제) OGG1 8-옥소구아닌 DNA IL6 인터유킨 6(인터페론, 글리코실라제 베타 2). 동물 또는 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 ALS와 연관된 단백질을 인코딩하는 방해된 염색체 서열 및 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 방해된 단백질을 인코딩하는 염색체 통합 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 ALS에 연관된 단백질은 SOD1(초과산화 디스뮤타아제 1), ALS2(근위축성 측삭 경화중 2), FUS(육종 내 융합), TARDBP(TAR DNA 결합 단백질), VAGFA(혈관 내피 성장 인자 A), VAGFB(혈관 내피 성장 인자 B), 및 VAGFC(혈관 내피 성장 인자 C), 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0689] 프리온에 연관된 단백질의 예는 SOD1 (초과산화 디스뮤타아제 1), ALS2 (근위축성 측삭 경화중 2), FUS (육종 내 융합), TARDBP (TAR DNA 결합 단백질), VAGFA (혈관 내피 성장 인자 A), VAGFB (혈관 내피 성장 인자 B), 및 VAGFC (혈관 내피 성장 인자 C), 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0690] 프리온 장애에서 신경병성 질환에 관련된 단백질의 예는 예를 들어 A2M (알파-2-마크로글로불린), AATF (아포토시스 길항 전사 인자), ACPP (산 포스파타아제 전립샘), ACTA2 (액틴 알파 2 평활근 대동맥), ADAM22 (ADAM 메탈로펩티다아제 도메인), ADORA3 (아데노신 A3 수용체), 또는 ADRA1D (알파-1D 아드레날린성 수용체)를 포함할 수 있다.

[0691] 번역결핍에 연관된 단백질의 예는 예를 들어 A2M [알파-2-마크로글로불린]; AANAT [아릴알킬아민 N-아세틸트랜스퍼라제]; ABCA1 [ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 1]; ABCA2 [ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 2]; 또는 ABCA3 [ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 3]을 포함할 수 있다.

[0692] 트리뉴클레오티드 반복 장애와 연관된 단백질의 예는 예를 들어 AR (안드로젠 수용체), FMR1 (취약 X 지적 장애

1), HTT (헌팅틴), 또는 DMPK (근긴장성 이영양증-단백질 키나아제), FXN (프라탁신), ATXN2 (아탁신 2)를 포함한다. 신경전달 장애에 연관된 단백질의 예는 예를 들어 SST (소마토스타틴), NOS1 (산화 질소 합성효소 1 (뉴런)), ADRA2A (아드레날린성, 알파-2A-, 수용체), ADRA2C (아드레날린성, 알파-2C-, 수용체), TACR1 (타키키닌 수용체 1), 또는 HTR2c (5-히드록시트립타민 (세로토닌) 수용체 2C)를 포함한다. 신경발달-연관 서열의 예는 예를 들어 A2BP1 [아탁신 2-결합 단백질 1], AADAT[아미노아디페이트 아미노트랜스페라제], AANAT[아릴알킬아민 N-아세틸트랜스페라제], ABAT[4-아미노부티레이트 아미노트랜스페라제], ABCA1[ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 1], 또는 ABCA13[ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 A (ABC1), 멤버 13]을 포함한다. 본 발명의 시스템으로 치료할 수 있는 바람직한 질환의 추가 예는 하기로부터 선택된 것을 포함할 수 있다: 에카르디-고티에레스(Aicardi-Goutieres) 증후군; 알렉산더 질병; 알란-헌든-두들리(Allan-Herndon-Dudley) 증후군; POLG-관련 장애; 알파-만노스축적증(제II형 및 제III형); 알스트롬(Alstrom) 증후군; 엔젤만; 증후군; 모세혈관확장성 실조증; 신경 세로이드 리포푸신증; 베타-탈라세미아; 양쪽 시신경 위축 및 (유아) 시신경 위축 유형 1; 망막아세포종(양쪽); 카나반병; 뇌-눈-얼굴-골격(Cerebrooculofacioskeletal) 증후군 1[COFS1]; 뇌건황색증; 코넬리아 드 랑즈 증후군; MAPT-관련 장애; 유전성 프리온 질병; 드라벡 증후군; 초기-발생 가족성 알츠하이머병; 프리트라이히 운동실조 [FRDA]; 프린스 증후군; 푸코사이드축적증; 후쿠야마형 선천성 근이영양증; 갈락토시알리도시스; 고세병; 유기 산노증; 혈구탐식성 림프조직구증식증; 허치슨 길포드 조로증 증후군; 뮤코리피드증 II; 유아 유리 시알산 축적 질병(Infantile Free Sialic Acid Storage Disease); PLA2G6-연관 신경변성; 제벨 랑귀닐 증후군; 집합형 수포성 표리박리증; 헌팅턴병; 크라베병(유아); 미토콘드리아 DNA-연관 라이 증후군 및 NARP; 레쉬-니한 증후군; LIS1-연관 뇌회결손; 로베 증후군; 단풍시럽노병; MECP2 중복 증후군; ATP7A-관련 구리 이송 장애; LAMA2-관련 근이영양증; 아릴실과아제 A 결핍증; 점액성 다당류증 제I형, 제II형 또는 제III형; 과산화소체 생물발생 장애, 젤웨거 증후군 스펙트럼; 뇌 철분 축적 장애를 갖는 신경변성; 산성 스펅고미엘라제 결핍증; 니만-픽병 C형; 글리신 뇌병증; ARX-관련 장애; 요로 회로 장애; COL1A1/2-관련 골형성 부전증; 미토콘드리아 DNA 결실 증후군; PLP1-관련 장애; 페리 증후군; 펠란-매거미드 증후군; 당원 축적병 제II형(폼페병)(유아); MAPT-관련 장애; MECP2-관련 장애; 점상연골 이형성증 제1형; 로버츠 증후군; 샌드호프병; 윈들러병 - 제1형; 아테노신 디아미나아제 결핍증; 스미스-렘리-오피츠 증후군; 척수성 근위축증; 유아-발병 유전선 실조증; 핵소사미니다아제 A 결핍증; 치사성 이형성증 제1형; 제VI형 콜라겐-관련 장애; 어서 증후군 제1형; 선천성 근이영양증; 윌프 허쉬호른 증후군; 리소좀 산 리파아제 결핍; 및 색소피부건조증을 포함한다.

[0693] 본 발명의 시스템이 임의의 관심 폴리뉴클레오티드 서열을 표적화하는데 사용될 수 있음이 구상중임이 명백할 것이다. 본 발명의 시스템을 사용하여 유용하게 치료될 수 있는 질환 또는 질병의 몇몇 예는 본원의 표에 포함되며 이들 질환에 현재 연관된 유전자의 예 또한 여기에 제공된다. 그러나, 예시화된 유전자는 완전하지 않다.

[0694] **실시예**

[0695] 하기의 실시예는 본 발명의 다양한 구현예를 예시할 목적으로 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하고자 하지 않는다. 본원에 기술된 방법과 함께 본 발명의 실시예는 본원에서 바람직한 구현예를 대표하는 것이며, 예시적이고, 본 발명의 범주에 대한 제한으로 의도되지 않는다. 거기에서의 변화 및 다른 용도는 청구범위의 범주에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 목적에 포함되며, 해당 분야의 숙련자에게 수행될 것이다.

[0696] *실시예 1: CRISPR-Cas9을 이용한 포유동물 뇌에서의 유전자 기능의 생체내 측정*

[0697] Swiech, L. 등의 문헌[제목: "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. " Nat Biotechnol. 2014 Oct 19. doi: 10.1038/nbt.3055. [Epub ahead of print]]은 참조로서 본원에 포함된다. 이 연구는 다음의 주요 사항을 나타낸다:

- [0698] · 성공적인 생체내 AAV-매개 Cas9 생체내 전달뿐만 아니라 유사분열 후(post-mitotic) 뉴런 내에서 효율적인 게놈 변형의 첫 번째 입증;
- [0699] · Cas9 및 sgrNA-발현 세포로부터 뉴런 핵의 용이한 단리를 가능하게 하는 핵 태깅 기술의 개발;
- [0700] · 뉴런 전사체의 RNA서열 분석을 향한 응용프로그램의 입증;
- [0701] · Cas9-매개 게놈 변동과 전기생리학적 연구의 통합; 및
- [0702] · 그리고 멀티플렉스 표적화 및 Cas9-매개 게놈 편집을 이용하여 설치류 행동에서 유전자 기능을 연구할 수 있는 능력의 입증.
- [0703] 질병-연관 돌연변이를 일으키는 형질전환 동물 모델은 질병의 유전학적 및 병리생리학적 메커니즘을 설명하는

데 도움이 되는, 신경학적 장애의 연구에 대해 대단히 유용하다. 그러나, 단일 또는 다중 유전적 변형을 일으키는 동물 모델의 생성은 특히 노동 집약적이고 많은 세대 이상의 시간이 소요되는 번식을 필요로 한다. 따라서, 정상 및 질병-연관 뇌 과정에서 유전자 기능의 신속한 절개를 용이하게 하기 위해 출원인은 생체내 뉴런의 계층을 정확하고 효율적으로 다루는 능력을 필요로 한다. 스트랩토코커스 피오케네스(SpCas9)으로부터 CRISPR-연관 엔도뉴클라아제 Cas9는 진핵 세포 복제에서 단일 또는 다중 유전자의 정확하고 효율적인 계층 절단을 증대하는 것으로 나타났으며, 삽입/결실(삽입결실(indel)) 돌연변이를 인프레임(in frame) 이동하도록 야기한다. 본원에서, 출원인은 생체내 뇌 장애에서 뉴런의 과정 및 그들의 역할에서 유전자의 개인뿐만 아니라 그룹의 기능을 연구하기 위해 생화학, 시퀀싱, 전기생리학적, 및 행동적 관측과 Cas9-매개 계층 변동을 통합한다.

[0704] 논의

[0705] 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터는 일반적으로 마우스 뇌에 재조합 유전자를 전달하기 위해 주로 사용된다. AAV 시스템의 주요 제한은 ITRs 없이 대략 4.5 kb 로 캡핑되는, 작은 패키징 크기이며, 이는 단일 벡터 내로 패키징 될 수 있는 유전 물질의 양을 제한한다. SpCas9의 크기가 이미 단일 AAV 벡터 내의 다른 유전자 요소에 대해 0.3 kb 미만을 남기는, 4.2 kb이기 때문에, 출원인은 2개의 분리된 바이러스 벡터에 SpCas9(AAV-SpCas9) 및 sgRNA 발현 카세트(AAV-Sp가이드)를 패키징하는 이중-벡터 시스템을 설계하였다(도 1). AAV-SpCas9 벡터를 설계하는 동안, 출원인은 짧은 뉴런-특이적 프로모터뿐만 아니라 SpCas9 발현을 최적화하는 폴리 아데닐화 신호를 비교하였다. 출원인의 최종 설계에 대해 출원인은 배양된 원발성 마우스 피질 뉴런에서 SpCas9 발현의 효율적인 수준을 달성할 수 있는 그들의 능력에 기반하여 마우스 Mecp2 프로모터(235 bp, pMecp2) 및 최소 폴리아데닐화 신호(48 bp, spA)를 선택하였다(도 5c). SpCas9-발현 뉴런의 면역형광 식별을 용이하게 하기 위해, 출원인은 HA-에피토프 태그로 SpCas9를 태그하였다. AAV-As가이드 벡터에 대하여, 출원인은 U6-sgRNA 발현 카세트뿐만 아니라 인간 시냅신 I 프로모터에 의해 구동된 KASH 핵 막-통과 도메인9로 융합된 녹색 형광 단백질(GFP)을 패키징하였다(도 1a). GFP-KASH 융합 단백질은 외부 핵막에 대해 GFP를 지지하며 (도 5c, 도 5d) AAV-Sp가이드에 의해 형질도입된 온전한 뉴런의 핵의 형광-기반 식별 및 정제를 가능하게 한다.

[0706] 출원인의 이중-벡터 전달 시스템의 전달 효과를 테스트하기 위해, 출원인은 먼저 시험관내 배양된 원발성 마우스 피질 뉴런을 형질도입하고 80% 초과와 공동-형질도입 효율을 갖는(도 5e), AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드(도 5c)에 의한 로버스트(robust) 발현을 관찰하였다. 중요한 것은, 형질도입 되지 않은 뉴런과 비교하여, SpCas9의 발현은 형질도입된 뉴런의 형태 및 생존율에 악영향을 나타내지 않았다(도 5c, 도 5f).

[0707] 구축된 효율적인 전달 시스템을 가지면서, 출원인은 그 후 마우스 원발성 뉴런에서 SpCas9-매개 계층 편집을 테스트하기 위해 노력하였다. SpCas9가 다양한 분열하는 세포 유형에서 효율적인 계층 변형을 달성하기 위해 사용된 반면, SpCas9가 유사분열 후 뉴런에서 계층 편집을 효율적으로 성취하기 위해 사용된 것인지는 불분명하다. 출원인의 초기 테스트에 대해 출원인은 Mecp2 유전자를 표적으로 하였으며, 이는 자폐 스펙트럼 장애(autism spectrum disorder)의 한 유형인, 레트 증후군에서 중요한 역할을 하는 것이다. Mecp2 단백질은 보편적으로 뇌를 통틀어 뉴런에서 발현되지만 교세포에서는 거의 발현되지 않으며 이것의 결핍은 뉴런에서 심각한 형태학적 및 전기생리학적 표현형과 연관되어 있음이 나타나 있고, 둘 다 레트 증후군을 가진 환자에서 관찰된 신경학적 증상에 기여하는 것으로 되어있다. Mecp2를 표적으로, 출원인은 먼저 마우스 Mecp2 유전자(도 6a)의 엑손 3을 표적으로 하는 여러 sgRNA를 설계하고 Neuro-2a 세포를 이용하여 그들의 효과를 평가하였다. 가장 효율적인 sgRNA는 서베이어 뉴클라아제 분석을 이용하여 확인되었다(도 6b). 출원인은 실험관내 및 생체내 Mecp2 표적화 실험 이후에 가장 효율적인 sgRNA(Mecp2 표적 5)를 선택하였다.

[0708] 뉴런에서 출원인의 이중-벡터 시스템의 효율성을 편집하는 것을 평가하기 위해, 출원인은 원발성 마우스 피질 뉴런을 시험관내 7일 동안 형질도입하고 (7 DIV, 도 7a) 형질도입 7일 후에 서베이어 뉴클라아제 분석을 이용하여 삽입결실 속도를 측정하였다(도 7b). 유의하게, AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드 표적화 Mecp2로 공동-형질도입된 뉴런 배양은 대조군 뉴런과 비교하여 Mecp2 단백질 수준에서 80%까지의 감소를 나타냈다(도 7c, 도 7d). 상대적으로 낮은 삽입결실 빈도(약 14%) 및 로버스트 단백질 고갈(약 80%) 사이에서 관찰된 불일치에 대한 가능한 설명 하나는 표적 부위에서 SpCas9에 의한 단순한 결합이 전사를 방해할 수 있다는 것일 수 있으며, 이는 대장균에서 나타난다. 출원인은 불활성화된 RuvC 및 HNH 촉매 도메인 둘 다를 갖는 SpCas9의 돌연변이를 이용하여 이런 가능성을 조사하였다(D10A 및 H840A, dSpCas9). dSpCas9 및 Mecp2-표적화 sgRNA의 공동-발현은 Mecp2 단백질 수준을 감소시키지 않았으며(도 7a, 도 7d), 활성화 SpCas9의 존재 하에 Mecp2 수준의 관찰된 감소는 Mecp2 유전자좌에서의 변형의 발생에 의한 것이라는 것을 제안한다. 검출된 삽입결실의 낮은 수준 및 단백질 고갈의 높은 수준 사이의 불일치에 대한 또 하나의 가능한 설명은 서베이어 뉴클라아제 분석에 의한 진정한 삽입결실 속도의 과소평가 때문일 수 있다 - 서베이어의 검출 정확도는 삽입결실 서열 조성물에 민감한 것으로 중

래에 나타났다.

- [0709] MeCP2 기능 상실은 뉴런에서의 수상돌기 트리 이상 및 척추 형태발생 결함과 관련된 것으로 종래에 나타났다. MeCP2 결핍의 이러한 표현형은 MeCP-KO iPS 세포로부터 분화된 뉴런에서 또한 복제되었다. 따라서, 출원인은 뉴런에서의 SpCas9-매개 MeCP2-결핍이 레트 증후군의 형태학적 표현형을 유사하게 되풀이 할 수 있을지를 조사하였다. 실제로, 뉴런 공동-발현 SpCas9 및 Mecp2-표적화 sgRNA는 대조군 뉴런과 비교하였을 때 변형된 수상돌기 트리 형태 및 척추 밀도를 나타냈다(도 8). 이러한 결과는 유사분열 후 뉴런에서 표적화된 녀아웃을 가능하게 함으로써 세포 분석에서 유전자 기능의 연구에 SpCas9가 용이하게 사용될 수 있음을 설명한다.
- [0710] 이종 세포 유형의 뒤엎힌 네트워크로 구성된, 신경계의 복잡성에 기반하여, 생체내 뉴런의 게놈을 효율적으로 편집할 수 있는 것은 고유의 상황에 포함된 관련 세포 유형에서 유전자 기능의 직접 테스트를 가능하게 한다. 결과적으로, 출원인은 성인 마우스의 해마 치상회로 높은 역가의 AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드의 혼합물 (1:1 비율)을 정위적으로 주입하였다. 출원인은 바이러스 주입 4 주 이후 Mecp2 유전자좌의 유전자 변형을 야기하는(도 1d) 해마 과립 세포(hippocampal granule cells)에서 두 백터의 높은 공동-형질도입 효율(80% 초과)을 관찰하였다(도 1b, 도 1c). 서베이어 뉴클라아제 분석을 이용하여 출원인은 주입된 뇌 영역으로부터 수득된 브레인 펀치(brain punches)에서 약 13% 삽입결실 빈도를 검출하였다(도 1e). 배양된 원발성 뉴런에서의 출원인의 결과와 유사하게, Mecp2 좌의 SpCas9-매개 절단은 60% 초과로 MeCP2 단백질 수준을 효율적으로 감소하였다(도 1f). 추가적으로 치상회에서 MeCP2-양성 핵의 수는 AAV-SpCas9 단독과 비교하여 AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드를 주입하였을 때 75% 초과로 감소하였다(도 1g 내지 도 1h). 이러한 결과는 SpCas9가 온전한 세포학적 상황 내에서 특정 유전자를 직접적으로 교란시키는 데에 사용될 수 있다는 것을 시사한다.
- [0711] 표적화된 유전자 변동은 특정 유전자 요소의 생물학적 기능으로의 통찰력을 제공하기 위한 정량 관독과 결합될 수 있다. AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드 형질도입된 세포의 분석을 용이하게 하기 위해, 출원인은 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 이용하여 GFP-KASH 표지화된 핵을 정제하는 방법을 개발하였다(도 2a). 분류된 핵은 하류 생화학 또는 서열 분석을 위해 핵의 DNA 및 RNA를 정제하는 데에 직접적으로 사용될 수 있다. 생거 시퀀싱을 이용하여, 출원인은 sgRNA 표적 위치에서 삽입결실 돌연변이를 함유한 14 단일 GFP-양성 핵 밖의 13을 발견하였다.
- [0712] 게놈 DNA 시퀀싱뿐만 아니라, 정제된 GFP-양성 핵이 MeCP2 결핍의 전사 결과를 연구하기 위해 RNA서열 분석에 또한 사용될 수 있다(도 2b 내지 도 9). 치상회로부터 뉴런의 전사에서 Mecp2 녀아웃의 효과를 테스트하기 위하여, 출원인은 AAV-SpCas9 뿐만 아니라 박테리아 lacZ 유전자를 표적으로하고 마우스 유전자는 표적으로 하지 않도록 설계된 대조군 sgRNA이거나, Mecp2-표적화 sgRNA를 받는 동물로부터 FACS 정제된 GFP⁺ 핵을 이용하여 RNA 서열 라이브러리를 제조하였다. 모든 sgRNA는 그들의 분석-표적 점수(CRISPR 설계 도구: <http://tools.genome-engineering.org>)를 최소화하기 위해 최적화되었다. 출원인은 대조군과 Mecp2 sgRNA 발현 핵 사이에서 차등적으로 발현된 유전자(도 2b)를 발견할 수 있었다(p<0.01). 출원인은 Mecp2 sgRNA 발현 핵에서 아래로 조절된 유전자 중 몇 가지 흥미로운 후보를 식별하였다: Hpc4, Olfml1, 및 Ncdn이며, 이는 학습 행동에 중요한 역할을 하는 것으로 종래에 보고되었다; 그리고 Cplx2는, 시냅스 소포체 방출에 수반되고 뉴런의 활동 빈도와 관련된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 SpCas9-매개 유전자 변동 집단 수준 및 RNA서열 분석의 조합이 뉴런에서 전사 조절을 특성화하는 방법을 제공한다는 것을 설명하며 특정 뉴런 기능 또는 질병 과정에 중요할 수 있는 유전자를 제시한다.
- [0713] 뇌에서의 SpCas9-매개 생체내 유전자 편집은 특정 세포 유형 또는 회로 구성요소에서의 유전자 변동의 효과를 연구하기 위해 전기생리학적 기록과 또한 결합될 수 있다. 신경생리학에서 MeCP2 결핍의 기능적 효과를 연구하기 위해 출원인은 수컷 마우스의 원발성 시각 피질(V1)의 표피층으로 AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드 표적화 Mecp를 정위적으로 공동-전달했다. 표피층 피질 흥분성 뉴런이 이광자 이미징 및 이광자 가이드된 표적 기록에 더욱 접근 가능하기 때문에 V1이 선택되었다. SpCas9 전달 2주 후, 마우스는 V1 마우스의 2/3 층에서 KASH-GFP⁺ 뉴런 및 GFP⁻ 이웃 뉴런의 전기생리학적 반응(도 3의 a 내지 도 3의 c)과 비교하기 위해 이광자 가이드된 세포결(juxtacellular) 기록되었다(도 3). 출원인은 20° 단위로 18 드리프팅 격자에 대한 뉴런 반응을 측정하고 세포의 나타낸 활동 빈도(firing rate, FR) 및 방향 선택도 지수(orientation selectivity index, OSI)를 반응 평균 백터에 의해 계산하였다. FR 및 OSI 둘 다는 모두 이웃한 GFP⁻ 흥분성 뉴런과 비교하여, 흥분성 GFP⁺, MeCP2 녀아웃 뉴런에 대해 상당히 감소되었다(도 3의 d 내지 도 3의 e). 비교하여, SpCas9와 함께 대조군 sgRNA 발현은 이웃한 비감염 뉴런과 비교할 때 FR 및 OSI에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 3의 d 내지 도 3의 e). 이러한 결과는 성인 V1 피질 뉴런에서 MeCP2의 SpCas9 매개 결핍이 2주 이내에 세포 내 흥분성 뉴런의 시각적 응답

특성을 변화시키고 또한 유전자 기능 및 뉴런 회로의 절개를 연구하기 위해, 세포내 포유동물 뇌에서 표적화된 유전자 녹아웃을 용이하게 하는 SpCas9의 다양성을 설명한다.

- [0714] SpCas9 시스템의 한 가지 중요한 장점은 멀티플렉스 게놈 편집을 용이하게 하는 능력이다. 살아있는 동물의 뇌에서 여러 유전자의 안정한 녹아웃을 도입하는 것은 생리학적 및 신경병리학적 조건에서 다중유전자 메커니즘의 원인이 되는 질문과 같은, 잠재적으로 광범위한 응용프로그램을 가질 수 있다. 뇌에서 멀티플렉스 게놈 편집의 가능성을 테스트 하기 위해 출원인은 핵 표지화를 위해 GFP-KASH와 함께, 3개의 sgRNA가 직렬로 이루어진 멀티플렉스 sgRNA 발현 벡터를 설계하였다(도 4a). 출원인은 DNA 메틸트랜스퍼라아제 유전자 패밀리 (DNMTs)를 표적화하는 sgRNA를 선택하였으며, 이는 Dnmt1, Dnmt3a 및 Dnmt3b로 이루어진다. Dnmt1 및 3a는 성인 뇌에서 높게 발현되며 DNMT 활동이 DNA 메틸화를 변형시키며 Dnmt3a 및 Dnmt1 둘 다 시냅스 가소성 및 학습과 기억 형성을 위해 요구된다는 것이 종래에 나타났다. 출원인은 높은 변형 효율성을 갖는 Dnmt3a 및 Dnmt1에 대한 개별 sgRNA를 설계하였다. Dnmt3b에 의한 잠재적인 보상 효과를 방지하기 위해 출원인은 이것이 뉴런 발달 동안 주로 발현되더라도 이러한 유전자를 또한 추가적으로 표적으로 하도록 결정하였다²⁷. 출원인은 최종적으로 3개의 표적화된 유전자 모두에 대해 높은 동시 RNA 절단을 위한 개별 sgRNA를 선택하였다(도 4b 및 도 10).
- [0715] 생체내 멀티플렉스 게놈 편집의 효율성을 테스트하기 위해, 출원인은 높은 역가의 AAV-SpCas9 및 AAV-Sp가이드의 혼합물을 수컷 성인 마우스의 등 및 복부 치상회로 정위적으로 전달하였다. 4주 후, 해마는 해부되었으며 표적화된 세포 핵은 FACS를 통해 분류되었다. 출원인은 서베이어 뉴클라아제 분석(도 4c) 및 시퀀싱(도 11)을 이용하여 분류된 핵 집단에서 약 19%(Dnmt3a), 18%(Dnmt1) 및 4%(Dnmt3b) 삽입결실 빈도를 검출하였다. 표적화 다중 좌위는 개별 세포에서 다중-녹아웃의 효율적인 속도에 대한 질문을 야기한다. 표적화된 시퀀싱과 결합된 단일 핵 분류를 이용하여, 출원인은 개별 뉴런의 핵에서 다중 DNMT 좌위의 동시 표적화를 정량화하였다(도 4d). 적어도 하나의 Dnmt 유전자좌에서 변형을 일으키는 뉴런의 핵에서, 70% 초과 핵은 Dnmt3a 및 Dnmt1 둘 다에서 삽입결실을 함유하였다(약 40%는 3 좌위 모두에서 삽입결실을 함유하였고, 그리고 약 30%는 Dnmt3a 및 Dnmt1 좌위 둘 다에서 함유함). 이러한 결과는 치상회에서 Dnmt3a 및 Dnmt1 단백질 결핍 수준과 일치한다(도 4a). 성인 뇌에서 Dnmt3b의 낮은 발현 때문에, 출원인은 Dnmt3b 단백질을 검출할 수 없었다.
- [0716] 20-nt sgRNA 서열 이내의 각 염기가 전체 특이성에 기여하더라도, sgRNA와 부분적으로 일치하는 유전자 좌위는 표적외 이중가닥 브레이크와 삽입결실 형성을 야기할 수 있다는 SpCas9에 대한 최근 연구가 나타났다. 표적외 변형의 속도를 평가하기 위해, 출원인은 매우 유사한 유전자 표적 위치²의 리스트를 계산적으로 식별하고 표적화된 딥 시퀀싱을 이용하여 변형 속도를 정량화하였다. 예측된 표적외 좌위 상단의 삽입결실 분석이 SpCas9 변형이 특이적임을 설명하는 삽입결실 형성의 0 내지 1.6% 속도를 나타냈다(추가 표 1). 생체내 SpCas9-매개 게놈 편집의 특이성을 증가시키기 위해, 미래의 연구가 이중 닉킹 및 절단된 sgRNAs와 같은 표적외 최소화 전략을 이용할 수 있다.
- [0717] Dnmt3a 및 Dnmt1의 낙다운은 해마-의존 기억 형성²⁷에 영향을 주는 것으로 종래에 나타났다. 결과적으로, 출원인은 기억 수집 및 통합에서 SpCas9-매개 삼중 녹아웃(Dnmt3a, Dnmt1 및 Dnmt3b)의 효과를 조사하기 위해 공포 상황 조건화 행동 테스트(contextual fear-conditioning behaviour tests)를 수행하였다. 출원인이 기억 수집 상에서 대조군과 삼중 녹아웃 마우스 사이의 어떠한 차이점도 발견하지 못한 반면, 녹아웃 마우스는 훈련된 상황 조건 하에서 테스트 될 때 손상된 기억 통합을 나타냈다(도 4f). 이러한 효과는 마우스가 변화된 상황에서 테스트되었을 때 사라진다. 출원인의 결과는 치상회 뉴런에서 DNMT 패밀리 멤버의 CRIPSR-Cas9-매개 녹아웃이 행동 작업에서 유전자의 기능을 조사하기에 충분하다는 것을 입증하였다.
- [0718] 출원인의 결과는 SpCas9 및 sgRNA의 AAV-매개 세포내 전달이 온전한 뉴런 회로 내에서 정확한 게놈 변동을 달성하기 위해 빠르고 강력한 기술을 제공한다는 것을 나타낸다. SpCas9가 절단하는 세포를 조작하기 위해 광범위하게 사용된 반면, 출원인은 SpCas9가 NHEJ-매개 삽입결실 생성을 통해 높은 효율성을 갖는 사후 유사분열성 뉴런의 게놈을 조작 하는 데에 또한 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. SpCas9-매개 게놈 변동은 표적화된 유전자 요소의 기능을 연구하기 위해 생화학, 시퀀싱, 전기생리학적, 및 행동 분석과 결합될 수 있다. 출원인은 단일 또는 다중 유전자의 SpCas9-매개 표적화가 기본적으로, 더욱 시간이 걸리는 유전 마우스 모델을 이용하여 관찰된 형태적, 전기생리학적, 및 행동 표현형을 요약할 수 있다는 것을 나타낸다. 현재의 연구는 스트렙토코쿠스 피오게네스 Cas9을 이용하며, 이는 2개의 AAV 벡터의 사용을 필요로 할 뿐만 아니라 세포 유형-특이적 표적화를 성취하기 위해 사용될 수 있는 프로모터 요소의 크기를 제한한다. SpCas9보다 실질적으로 짧은 일부를 갖는, Cas9 상동유전자(orthologues)의 다양성을 감안하여, 본원에 기재된 바와 같이, Cas9 및 sgRNA 둘 다를 발현하는 단

일 AAV 벡터를 조작할 수 있어야 한다.

- [0719] 방법
- [0720] DNA 작제물
- [0721] SpCas9 표적 선택 및 단일 가이드 RNA (sgRNA)의 생성을 위하여, 20-nt 표적 서열이 5'-NGG PAM 서열을 선행하도록 선택되었다. 표적외화 효과를 최소화하기 위해, CRIPSR 설계 도구가 사용되었다 (<http://tools.genome-engineering.org>). sgRNA는 포워드 프라이머를 주형으로서 U6 프로모터를 이용하여 PCR 증폭되었다: 5'-cgcacgcgtaattcgaacgctgacgtcatc-3' 및 20-nt DNA 표적 위치를 갖는 sgRNA를 함유하는 리버스 프라이머(굵게 표시):
 5'-cacacgcgtAAAAAGcaccgactcggtgccactttttcaagttgataacggactagccttattttaacttgctaTTTctagctctaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGTGTTTCGTCCTTCCAC-3'. (서열번호:) 대조군 sgRNA 서열은 대장균으로부터 lacZ 유전자를 표적으로 하도록 설계되었다:
- [0722] 표적 서열: TGCGAATACGCCACGCGATGGG (서열번호:)
- [0723] EGFP-KASH 구조는 와만 교수(콜롬비아 대학, NYC)로부터 온 관대한 선물이었으며 인간 시냅신 프로모터(hSyn) 하에 AAV 백본에 코딩 카세트를 복제하기 위한 PCR 주형으로서 사용되었다. 다음으로, U6-Mecp2sgRNA 코딩 서열이 M1uI 위치를 이용하여 도입되었다. 멀티플렉스 유전자 표적화 전략을 위해, 개별 sgRNA가 상기 기재된 바와 같이 PCR 증폭되었다. 3개의 sgRNA 모두 골든 게이트 클로닝 전략을 이용하여 PCR 증폭된 hSyn-GFP-KASH-bGHpA 카세트(도 1a 참조)와 결합되었다. PCR 증폭 후에, 3개의 sgRNA와 hSyn-GFP-KASH-bGH pA를 함유하는 골든 게이트 라이게이션 산물은 AAV 골격내로 클로닝되었다. 수득된 모든 작제물은 검증되어 시퀀싱되었다. 뉴런에서 SpCas9 발현을 유도할 수 있는 최적의 프로모터 서열을 찾기 위해 출원인은 테스트하였다: hSyn1, Mecp2(pMecp2)이 절단된 마우스, 및 절단된 래트 Map1b(pMap1b) 프로모터 서열²(도 5a 참조). 다음의 프라이머는 프로모터 영역을 증폭하기 위해 사용되었다:
- [0724] hSyn_F: 5'-GTGTCTAGACTGCAGAGGGCCCTG-3'; (SEQ ID NO:)
- [0725] hSyn_R: 5'-GTGTCTGCCTGAGAGCGCAGTCGAGAA-3'; (SEQ ID NO:)
- [0726] Mecp2_F 5'-gagaagcttAGCTGAATGGGGTCCGCCTC-3'; (SEQ ID NO:)
- [0727] Mecp2_R 5'-ctcaccggtGCGCGCAACCGATGCCGGGACC-3'; (SEQ ID NO:)
- [0728] Map1b-283/-58_F 5'-gagaagcttGGCGAAATGATTGCTGCAGATG-3'; (SEQ ID NO:)
- [0729] Map1b-283/-58_R 5'-ctcaccggtGCGCGCGTCGCCTCCCCCTCCGC-3'. (SEQ ID NO:)
- [0730] 래트 map1b 프로모터의 다른 절단은 하기 올리고와 조합되었다:
- [0731] 5'-agcttCGCGCCGGGAGGAGGGGGACGCAGTGGGCGGAGCGGAGACAGC
 ACCTTCGAGATAATCCTTCTCTGCGCAGAGCAGAGAGCGGCGGAGAGGAACACTTCTCCAGGCTTTAGCAGAGCCGgA-3'
- [0732] 5'-ccggtCCGGCTCTGCTAAAGCCTGGGAGAAGTGTCTCTCCCGCGCTC
 CTCTGCTCTGCGCAGGAGAAAGGATTATCTCCGAAGTGTCTCTCCGCTCCGCCACTGCGTCCCCCTCCTCCCGCGCGgA-3'. (SEQ ID NO:)
- [0733] 짧은 합성 폴리아데닐화 신호(spA)³가 하기 올리고를 이용하여 조합되었다:
- [0734] 5'-aattcAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTG TGTgc-3' (SEQ ID NO:) 및
- [0735] 5'-ggccgcACACAAAAACCAACACACAGATCTAATGAAATAAAGAT CTTTTATTg-3'. (SEQ ID NO:)
- [0736] SpCas9 및 이의 D10A 돌연변이 버전 (dSpCas9)은 종래^{4,5}에 기재되어있다. EF1 α 프로모터의 제어 하에 적색 형광 단백질(mCherry)을 인코딩하는 플라스미드는 Lipofectamine[®] 2000(Life Technologies)로 뉴런 형질주입을 위해 사용되었다.
- [0737] 세포주 배양 및 형질주입
- [0738] Neuro-2a(N2a) 세포는 5% 소태아혈청(BSA)을 함유하는 DMEM에서 성장되었다. 10% 소태아혈청(FBS)을 함유하는

HEK293FT 세포 DMEM이 사용되었다. 세포는 5% CO₂ 분위기로 37에서 유지되었다. 세포는 제조사의 프로토콜에 따라, Lipofectamine[®] 2000 또는 폴리에틸렌이민(PEI) "MAX" 시약(Polysciences)을 이용하여 형질주입되었다.

[0739] 농축된 AAV 벡터의 제조

[0740] 높은 역가의 AAV1/2 입자가 동등한 비율의 AAV1 및 AAV2 혈청형 플라스미드와 pDF6 헬퍼 플라스미드를 이용하여 제조되었으며 해파린 친화성 컬럼⁶으로 정제되었다. 바이러스 입자의 역가는 qPCR로 수행되었다. 높은 역가의 AAV1 입자는 UNC 벡터 코어 서비스(채플 힐의 북캐롤라이나 대학)에 의해 제조되었다. DMEM 중 낮은 역가의 AAV1 입자는 종래⁷에 기재된 바와 같이 제조되었다. 요약하면, HEK293FT 세포는 트랜스 유전자 플라스미드, pAAV1 혈청형 플라스미드 및 pDF6 헬퍼 플라스미드로 PEI "MAX"를 이용하여 형질주입 되었다. 배양액은 48시간 이후에 수집되어 0.45 μm PVDF 필터(Millipore)를 통해 필터링되었다.

[0741] 원발성 피질 뉴런 배양

[0742] 조직 배양에 대한 뉴런을 수득하기 위해 사용된 동물은 동물 관리 MIT 위원회(MIT CAC)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 희생되었다. 1차 배양은 배아 16일 마우스 뇌⁸로부터 제조되었다. 둘 중 하나의 성을 갖는 배아가 사용되었다. 세포는 폴리-D-라이신(PDL) 코팅된 24-웰 플레이트(BD Biosciences) 또는 라미닌/PDL 코팅된 커버슬립(VWR) 상에 배양되었다. 배양은 B27, 글루타맥스(Life Technologies) 및 페니실린/스트렙토마이신 혼합물이 보충된, 뉴로배슬(Neurobasal) 배지에서 37°C 및 5% CO₂에서 성장되었다. AAV 형질도입을 위해, 500 μl 뉴로배슬 배양액 중 피질 뉴런이 HEK293FT 세포⁷로부터 조절된 300 μl(1:1 비율에서 이중 주입) AAV1-함유 배지와 7 DIV에서 배양되었다. 1주 후 형질도입 뉴런은 하류 처리를 위해 수확되거나 면역형광 염색 또는 형태 분석을 위해 4% 파라포름알데히드에서 고정되었다.

[0743] 뉴런 형태의 시각화를 위해, DIV7에서 세포가 종래⁹에 기재된 바와 같이 1 주 동안 Lipofectamine[®] 2000(Life Technologies)를 이용하여 EF1α-mCherry 발현 벡터로 형질주입되었다. 총 수상돌기 길이의 측정을 위해, 개별 뉴런의 모든 수상돌기가 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 추적되었다. 원발성 수상돌기의 수의 정량화, 수상돌기 팁 및 술 분석(Sholl analysis)¹⁰이 40배 대물렌즈(Zeiss AxioCam Ax10 현미경, AxioCam MRm 카메라)에서 형광 현미경으로 수득된 이미지 상에서 수행되었다. 수상돌기의 수에 대해, 10 μm 미만의 모든 비신경돌기 오버행의 말단이 계산되었다. 술 분석에 대해, 직경이 5 μm 단계인 동심원은 자동으로 체세포 주변으로 당겨졌으며, 각 원의 교차 수상돌기의 수는 술 플러그-인(plugin)을 구비한 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 계산되었다.

[0744] 마우스 뇌로의 AAV1/2의 정위적 주입

[0745] MIT CAC 승인된 모든 동물 절차는 본원에 기재되었다. 성인(12 내지 16주령) 수컷 C57BL/6N 마우스는 100 mg/kg 케타민 및 10 mg/kg 자일라진의 복강(i.p.) 주입에 의해 마취되었다. 선제 진통제(pre-emptive analgesia)가 주입되었다(Buprenex, 1 mg/kg, i.p.). 개두술은 승인된 절차에 따라 수행되었으며 1 ul의 1:1 AAV 혼합물(1x10¹³ Vg/ml의 sMecp2-SpCas9; 6x10¹² Vg/ml의 DNMT 3xsgRNA; 3-5x10¹² Vg/ml의 hSyn-GFP-KASH)이 다음으로 주입되었다: 등쪽의 치상회(전측/후측: -1.7; 중외측: 0.6; 등쪽/배쪽: -2.15) 및/또는 복부 치상회(전측/후측: -3.52; 중외측: 2.65; 등쪽/배쪽: -3). 생체내 생체전기학적 기록 실험(도 3)을 위하여 바이러스 주입 좌표는 사후 봉합부로부터 3 mm 옆쪽(정수리로부터) 및 1 mm 앞쪽이었다. 두개골은 식염수로 종종 냉각되고 드레멜 드릴을 이용하여 박막화되었으며, 남은 경막은 미네랄 오일에 현탁된 바이러스로 채워진 유리 마이크로파이펫을 이용하여 천공되었다. 몇몇의 주입(3 내지 4)가 200 내지 250 μm의 깊이로, 이웃한 위치에서 만들어졌다. 150 내지 200 nl 부피의 바이러스 혼합물이 각 위치에서 75 nl/min 속도로 주입되었다. 각 주입 이후, 파이펫은 누수를 방지하기 위해 후퇴하기 이전에 3 내지 5분 동안 위치한 곳에서 유지되었다. 절개부는 봉합되었으며 적절한 수술-후 진통제(멜록시카ם, 1 내지 2 mg/kg)가 수술 후 3 일 동안 투여되었다.

[0746] 표적화된 루즈 패치 기록(targeted loose patch recordings)이 가이드된 생체내 이광자

[0747] 바이러스 주입 2주 이후, 마우스는 전기생리학 실험에 사용되었다. 마우스는 2% 이소플루란을 이용하여 마취되고 0.8% 이소플루란을 이용하여 유지되었다. 피부는 절개되고, 수기(sugi)로 세척되었으며 금속 헤드판이 폴카치과 아크릴을 이용하여 두개골에 붙여졌고, 2 mm x 2 mm 개두술이 원발성 시각피질(V1)에 걸쳐 수행되었다. 노출된 부분은 인공 뇌척수액(aCSF; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.01 mM EDTA, 10 mM HEPES, 10 mM 글루코오스; pH 7.4)에서 1.5% 아가로스의 박막으로 커버되었다. 동물의 체온은 37.5로 가열담요

로 실험 동안 유지되었다. 붕규산염(borosilicate) 파이렛(WPI)은 Sutter P-2000 레이저 폴러(Sutter Instruments)를 이용하여 뽑아졌다. 튜브 직경은 저항이 3 내지 5 MΩ 사이인 동안 약 1 μm이었다. 기록은 커스텀 소프트웨어(Network Prism, Sur lab)를 이용하여 만들어졌으며, MultiClamp 700B 증폭기(Axon)로 제어하여, Matlab(MathWorks)로 작성되었다. 유리 파이렛 전극은 20 내지 35°의 각도로 뇌에 삽입되었으며 Ag/AgCl 그라운드 전극 파이렛(Warner Instruments)이 동일한 용액에서 뇌 및 물체와 같이 위치되었다. 형광 시각화를 위해, 파이렛이 Alexa Fluor 594(Molecular Probes)로 충전되었다. 파이렛은 먼저 10배 렌즈를 이용하여 주입 부위에 표적화되고, 그 후 770 nm에서 동시 이광자 이미징을 통해 25배 렌즈를 이용하여 개별 GFP+ 세포에 표적화되었다. 세포 근접성은 5 mV 전압 커맨드 펄스로 빠르게 시간이 변화하는 동안 전압 클램프에서 관찰된 저항에서의 편향을 통해 검출되었다. 일단 저항이 5 내지 10 MΩ로 증가하면, 증폭기는 전류 플럼프로 전환되고, 스파이크는 KHz의 베셀 필터 및 300 Hz의 AC 필터 하에, 0으로 주입된 전류로 기록되었다. 뇌에 주입된 바이러스는 관류되었고 그 후 면역조직화학법이 수행되었다.

[0748] 표적화된 루즈 패치 기록이 가이드된 생체내 이광자로부터의 시각 자극 및 데이터 분석

[0749] 방향 선택성 및 계층-편집된 뉴런의 조정을 평가하기 위해, 출원인은 Matlab PsychToolbox-3에 기재된 커스텀 소프트웨어를 이용하여 지향하는 격자를 나타냈다. 격자는 세포의 응답을 위해 최적화 되었으며 144초의 총 프레젠테이션 기간 동안, 4초 동안 "오프" 이후 4초 동안 "온"이 선행된 각 격자 프레젠테이션으로, 20°의 단계에서 0 내지 350°로 방향이 단계별로 제시되었다.

[0750] 데이터는 Matlab로 직접 취득되었으며 .mat files로서 저장되었다. 스파이크 검출은 추가 확인을 위해 스파이크 형상 매칭 후에 수동으로 정의된 역치를 이용한 오프 루틴을 통해 수행되었다. 모든 스파이크는 태그되었으며 그래픽 사용자 인터페이스에서 스크린에 표시되었으며 그때문에 이는 실험자에 의해 위양성(false positive) 및 위음성(false negative)에 대해 수동적으로 검토되었다. 모든 자극에 대한 반응에서 스파이크 시간은 시각 자극과 관련된 그들의 타이밍에 기반하여 "온" 또는 "오프"로 그룹화되었으며, 각 자극에 대한 "온" 스파이크는 동일한 시간 동안 관찰된 '오프' 스파이크의 수에 의하여 감소되었다. 방향 실험에 대해, "온" 및 "오프" 기간이 동일한 시간이기 때문에 # 자극 당 스파이크 = (# 스파이크 "온") - (# 스파이크 "오프") 이다. 관심 있는 모든 세포에 대해, 방법은 각각 지향하는 자극에 대한 반응을 수집하기 위해 사용되었다 (20°의 단계에서, 0 내지 360°). 이러한 응답은 각 시험에 대해 응답 대 반응의 "튜닝 곡선"으로 전환되었다. 방향 선택적 지수(OSI)는 다음 식에 따라 선회되는 방향에 대해 벡터 평균을 내어 계산되었다:

$$OSI = \frac{\sqrt{(\sum_i R(\theta_i) \sin(2\theta_i))^2 + (\sum_i R(\theta_i) \cos(2\theta_i))^2}}{\sum_i R(\theta_i)}$$

[0751]

[0752] 조직 준비 및 세포 핵의 정제

[0753] 총 해마 또는 치상회가 얼음처럼 차가운 DPBS (Life Sciences)에서 빠르게 절개되고 드라이 아이스 상에서 순식간에 얼려졌다. 세포 핵 정제를 위해, 조직이 2 ml Dounce 균질기(Sigma)를 이용하여 2 ml의 얼음처럼 차가운 균질 완충액 (HB) (320 mM 수크로오스, 5 mM CaCl, 3 mM Mg (Ac)₂, 10 mM Tris pH7.8, 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP40, 0.1 mM PMSF, 1 mM 베타-머캅토에탄올)에서 부드럽게 균질화되었다; 막자 A로 25배, 그 후 막자 B로 25배. 그 후, 3 ml의 HB가 총 5 ml까지 첨가되고 5분 동안 얼음에서 유지되었다. 구배 원심분리를 위하여, 5 mM CaCl, 3 mM Mg (Ac)₂, 10 mM Tris pH 7.8, 0.1 mM PMSF, 1 mM 베타-머캅토에탄올을 함유하는 5 ml의 OptiPrep™ 밀도 구배 배지(Sigma)가 첨가되고 혼합되었다. 용해물은 30 ml 원뿔 원심분리 튜브(Beckman Coulter, SW28 rotor) 중 10 ml의 29% 이소-삼투압 OptiPrep™ 용액의 상부에 부드럽게 로딩되었다. 시료는 10,100 xg(7,500 rpm)에서 30분 동안 4에서 원심분리 되었다. 상청액은 제거되었으며 핵 펠렛은 65 mM 베타-글리세로포스페이트 (pH 7.0), 2 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 340 mM 수크로오스 및 5% 글리세롤로 약하게 재현탁되었다. 정제된 핵의 수와 품질은 명시야 현미경을 이용하여 제어되었다.

[0754] 세포 핵 분류

[0755] 정제된 GFP-양성(GFP⁺) 및 음성(GFP⁻) 무순상 핵은 Vybrant® DyeCycle™ 루비 스테인(1:500, Life Technologies)으로 공동 표지화 되었으며 BD FACSAria III(Koch Institute Flow Cytometry Core, MIT)를 이용하여 분류되었다. GFP⁺ 및 GFP⁻ 핵은 1% BSA로 코팅되고 400 μl의 재현탁 완충액(65 mM 베타-글리세로포스페이트

트 pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 340 mM 수크로오스 및 5% 글리세롤)를 함유하는 1.5 mL 에펜도프 튜브에 수집되었다. 분류 이후, 모든 시료는 얼음에 보관되었고 10,000 xg에서 20분 동안 4에서 원심 분리 되었다. 핵 펠렛은 -80에 저장되거나 하류 처리에 직접 사용되었다.

[0756] 유전자 DNA 추출 및 서베이어™ 분석

[0757] sgRNA의 기능 테스트를 위해, 50 내지 70% 융합성 N2a 세포가 단일 PCR 증폭된 sgRNA 및 SpCas9 벡터로 공동-형질주입되었다. SpCas9로 형질주입된 세포만이 음성 대조군으로서 제공되었다. 세포는 형질주입 48시간 이후에 수확되었으며, DNA는 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy 혈액 & 조직 키트(Qiagen)를 이용하여 추출되었다. 원발성 뉴런으로 형질도입된 원발성 AAV1로부터 유전자 DNA의 단리를 위해, DNeasy 혈액&조직 키트가 제조사의 지시에 따라, AAV 형질도입 7일 이후에 사용되었다. 분류된 핵 또는 해부된 조직은 55에서 30분 동안 용해 완충액(10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM SDS, 프로테아제 K(PK, 1mg/ml) 및 RNase A)에서 용해되었다. 그 다음에, 클로로포름-페놀 추출액이 표준 절차에 따라, 에탄올로 DNA 침전에 이어 수행되었다. DNA는 TE 완충액(10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA)에서 재현탁되고 하류 분석을 위해 사용되었다. 개별 sgRNA의 기능 테스트가 추가 표 2에 나열된 PCR 프라이머를 이용하여 서베이어™ 뉴클라아제 분석(Transgenomics)에 의해 수행되었다. 밴드 강도 정량화화가 본원에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0758] RNA 라이브러리 제조 및 시퀀싱

[0759] 가이드 표적화 Mecp2(동물 4마리)와 SpCas9 또는 gRNA 표적화 lacZ(동물 4마리)와 SpCas9의 박테리아 바이러스 전달 2주 후, 치상회는 얼음처럼 차가운 DPBS(Life Sciences)에서 빠르게 해부되었으며 RNA-후 용액(Ambion)으로 즉시 옮겨졌다. 4에서 24시간 후 조직은 -80로 이동되었다. 표적화된 뉴런 핵 100 집단은 1% 2-머캅토에탄올(Qiagen)이 보충된 10 µl TCL 완충액으로 FACS 분류되었다. 원심분리 이후에, 시료는 -80로 즉시 냉동되었다. RNA는 제조사의 지침에 따라 AMPure RNACleanXP SPRI 비드(Beckman Coulter Genomics)에 의해 정제되었으며, 최종 용출을 생략하고, 80% 에탄올로 3회 세척되었다. 수득된 RNA가 들어있는 비드는 공기 건조되었으며 cDNA 합성을 위해 즉시 처리되었다. 핵이 없는 시료는 음성 대조군으로서 사용되었다. 3 개의 집단 시료는 오직 역전사 효소를 0.1 ul의 Maxima H Minus 효소(200 U/ul, Thermo Scientific)로 대체한 SMART-seq2 프로토콜에 따른 cDNA 라이브러리 제조에서, 총 24 집단 시료인, 각 동물에 사용되었으며, 25 ul의 부피로 PCR 반응이 축소되었다. 태그멘테이션(tagmentation) 반응 및 최종 PCR 증폭은 다음의 변형과 함께, Nextera XT DNA 시료 제조 키트(Illumina)를 이용하여 수행되었다. 전체 반응 부피가 4배로 축소되었으며, 라이브러리는 PCR 증폭 이후 각 시료당 2.5 ul씩 취함으로써 모아졌다. 모아진 라이브러리는 세척되었으며 0.7 부피의 AMPure XP SPRI 비드 클린업(Beckman Coulter Genomics)의 2 라운드를 이용하여 크기-선택되었다. 정량화가 Qubit 파인성 DNA 키트(Invitrogen)로 수행되는 동시에, 시료는 라이브러리의 품질을 확인하기 위해 고감도 DNA 칩(Agilent)으로 로딩되었다. 모아진 라이브러리는 4 nM 및 12 pmol 의 최종 농도로 희석되었고 75 bp 페어링된 말단 리드(paired end reads)로 Illumina Miseq를 이용하여 시퀀싱되었다.

[0760] RNA 라이브러리 데이터 분석

[0761] Bowtie2 지수는 마우스 mm9 UCSC 게놈 및 알려진 유전자 전사체¹³에 기반하여 생성되었으며, 페어링된 말단 리드는 커맨드 라인 옵션 -q --phred33-quals -n 2 -e 99999999 -l 25 -I 1 -X 1000 -a -m 200 -p 4 --chunkmbs 512로 Bowtie2를 이용하여 이러한 지수로 즉시 정렬되었다. 그 후에, RSEM v1.27가 발현 수준을 측정하기 위해 Bowtie2에 의해 생성된 정렬에 기본 매개변수로 실행되었다. RSEM의 유전자 수준 발현 계산(tau)는 각 유전자에 대해 100만 추정치당 전사물(TPM)을 수득하기 위해 1,000,000만큼 곱해지고, TPM 추정치는 log2(TPM+1)를 수득함으로써 로그-공간으로 변형되었다. 유전자는 그들의 형질도입된 발현 수준이 2와 동일 또는 그 이상(log2(TPM+1) 스케일에서)인지 검출된 것으로 간주되었다. 라이브러리는 검출된 유전자 8000 미만인 경우 필터링되었다. 이 기준에 기반하여, 4 라이브러리는 여과되었으며 하류 분석으로부터 제외되었다. 대조군 동물 및 Mecp2 sgRNA 발현 동물 사이에서 다르게 발현된 유전자를 찾기 위해, Student's t-검정(Matlab V2013b) 및 교차 검증이 20 임의의 순열 실행에서 사용되었고, 여기서 각 동물로부터의 한 라이브러리의 각 실행은 임의로 제외될 것이 선택되었다(각 t-검정에서 사용된 총 12 라이브러리를 야기함). t-검정은 각 시료에 대해 0.9 사분위수(quantile)(보통 약 5 log2(TPM+1)) 초과와 발현 수준을 의미하는 모든 유전자에서 실행되었다. 이어서, 치환 실행의 삼분의 일 초과에서 중요한 유전자가 선택되었다(p<0.01). 이러한 유전자 교차 시료의 log2(TPM+1) 발현 수준은 계층적 클러스터링(Matlab V2013b)을 이용하여 클러스터링 되었다.

[0762] 번역형광 염색

[0763] 세포 배양: 원발성 뉴런의 면역형광 염색을 위하여, 세포가 바이러스 전달 7일 후 4% 파라포름알데히드(PFA)로 실온에서 20분 동안 고정되었다. PBS로 3회 세척 후, 세포는 PBS 중 5% 정상 염소 혈청(NGS)(Life Technologies), 5% 당나귀 혈청(DS)(Sigma) 및 0.1% Triton-X100(Sigma)로 실온에서 30분 동안 블록되었다. 세포는 2.5% NGS, 2.5% DS 및 0.1% Triton-X100에서 실온에서 1시간 동안 또는 4에서 밤새 1차 항체로 배양되었다. PBST로 3회 세척 후, 세포는 2차 항체로 1시간 동안 실온에서 배양되었다. 최종적으로, 커버슬립이 VECTASHIELD HardSet 봉입제와 DAPI(백터 Laboratories)를 이용하여 장착되었으며 Zeiss AxioCam Ax10 현미경 및 AxioCam MRm 카메라를 이용하여 이미지화되었다. 이미지는 Zen 2012 소프트웨어(Zeiss)를 이용하여 처리되었다. 정량화는 ImageJ 소프트웨어 1.48시간 및 뉴런 검출기 플러그인을 이용하여 수행되었다. 마우스는 바이러스 전달 4주 후 치사량의 케타민/자일라진으로 희생되었으며 PFA 이후 PBS로 경심관류로 관류되었다. 고정된 조직은 비브라툼(Leica, VT1000S)을 이용하여 섹션화되었다. 그 다음으로, 30 μ m의 섹션이 소듐 시트레이트 완충액(10 mM 트리-소듐 시트레이트 무수물, 0.05% Tween20, pH 6.0)에서 2분 동안 비등되었으며 실온에서 20분 동안 냉각되었다. 섹션은 TBST(137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.6, 0.2% Tween-20) 중 4% 정상 염소 혈청(NGS)으로 1시간 동안 블록되었다. 파라핀 섹션은 마이크로톰(Leica RM2125 RTS)을 이용하여 8 μ m로 절단되었고, 종래에 기재된 바와 같이 염색되었다. 섹션은 TBST와 4% NGS에 희석된 1차 항체로 4에서 밤새 배양되었다. TBST에서 3회 세척 후, 시료는 2차 항체로 배양되었다. TBST로 3회 세척 후, 섹션은 HardSet 봉입제와 DAPI를 이용하여 장착되었으며 공초점 현미경(Zeiss LSM 710, Ax10 ImagerZ2, Zen 2012 소프트웨어)으로 시각화되었다. 다음의 1차 항체가 사용되었다: 토끼 항-Dnmt3a(Santa Cruz, 1:100); 토끼 항-MeCP2(Millipore, 1:200); 마우스 항-NeuN(Millipore, 1:50-1:400); 닭 항-GFAP(Abcam, 1:400); 마우스 항-Map2(Sigma, 1:500); 닭 항-GFP(Aves labs, 1:200-1:400); 마우스 항-HA(세포 신호, 1:100). 2차 항체: AlexaFluor®488, 568 또는 633(Life Technologies, 1:500-1:1,000).

[0764] *LIVE/DEAD® 분석의 정량화*

[0765] 대조군 및 형질도입된 원발성 뉴런은 제조사의 지침에 따른 LIVE/DEAD® 분석(Life technologies)을 이용하여 염색되었다. GFP-KASH 발현으로부터 GFP-신호의 간섭을 방지하기 위해, 세포는 DEAD(에티디움 호모다미머) 및 DAPI(모든 세포)만으로 염색되었다. 염색된 세포는 형광 현미경 및 DEAD를 이용하여 이미지화되었으며, GFP 및 DAPI 양성 세포는 ImageJ 1.48시간 소프트웨어 및 뉴런 검출기 플러그인에 의해 계산되었다.

[0766] *웨스턴블롯 분석*

[0767] 형질도입된 원발성 피질 뉴런(24 웰, 바이러스 전달 후 7일) 및 형질도입된 조직 시료(바이러스 전달 후 4주)은 0.1% SDS 및 프로테아제 저해제(Roche, Sigma)를 함유하는 50 μ L의 얼음처럼 차가운 RIPA 완충액(세포 신호)에 용해되었다. 세포 용해물은 Bioruptor 소니케이터(Diagenode)에서 5분 동안 초음파 처리되었으며 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트(Pierce Biotechnology, Inc.)를 이용하여 측정되었다. 단백질은 SDS-PAGE 시료 완충액에서 용해되었으며, 4 내지 15% Tris-HCl 젤(Bio-Rad)에서 환원 조건 하에 분리되었고 1차 항체를 이용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다: 토끼 항-Dnmt3a(Santa Cruz, 1:500), 마우스 항-Dnmt1(Novus Biologicals, 1:800), 토끼 항-Mecp2(Millipore, 1:400), 토끼 항-Tubulin(세포 신호, 1:10,000)에 이어서 2차 항-마우스 및 항-토끼 HRP 항체(Sigma-Aldrich, 1:10,000). GAPDH는 항-GAPDH 항체(세포 신호, 1:10,000)와 결합된 토끼 HRP로 직접 시각화되었다. 튜블린 또는 GAPDH는 로딩 대조군으로서 주어졌다. 블롯은 ImageLab 4.1 소프트웨어(BioRad)이 구비된 ChemiDoc™ MP 시스템으로 이미지화 되었으며, ImageJ 소프트웨어 1.48h를 이용하여 정량화 되었다.

[0768] *자연 공포 상황 조건화(delay contextual fear conditioning, DCFC)*

[0769] 12주령 C57BL/6N 수컷 마우스의 비강 및 복부 치상회 양쪽에 SpCas9/DNMT 3xsgRNA 전달 8주 후, 동물은 실험자 및 행동실에 7일 동안 길들여졌다. SpCas9/GFP-KASH는 대조군으로서 지정된 한배새끼(littermate)에 주입되었다. DCFC의 1일차, 마우스 케이지는 테스트 전 후 청각적 단서들로부터 마우스를 방지하기 위해 독립된 대기실에 배치되었다. 개별 마우스는 FC 챔버(Med Associates Inc.)로 배치되었으며 12분 습관화 기간이 수행되었다. 습관화 후 마우스는 홈케이지에 다시 배치되었다. 다음날(훈련일) 개별 마우스는 챔버에 배치되었으며 4분 동안 길들여지도록 했다. 다른 20초(프리-톤) 간격 이후, 85 dB의 수준의 툰(청각 신호), 2.8 kHz이 20초 동안 나타났으며 그 후 발 충격(0.5 mA, 2초)이 나타나기 이전에 18초 지연 간격이 이어졌다. 발 충격 이후, 20초 프리-톤 간격으로 시작하는 다음 동일한 시험 전에 40초 간격(프리-톤/충격)이 제시되었다. 훈련 시험은 마우스가 그들의 홈케이지로 다시 배치되기 전까지 6번 반복되었다. 3일(훈련일)차, 마우스는 3분 동안 컨디셔닝 다음 챔버에 배치되었다. 그 다음, 마우스는 20초 간격으로 시작하는 4배 100초 테스트 시험을 겪은 뒤 20초

톤 및 60초 프리-톤 간격이 이어졌다. 최종적으로, 마우스는 변경된 상황 조건화 챔버(편평 바닥 대 그리드, 4량체 대 7량체 챔버, 바닐린 향)에 배치되었으며 테스트 시험은 반복되었다. 프리징 거동(Freezing behavior)은 기록되었으며 분석은 블라인드-오프-라인으로 수동으로 수행되었고 Noldus EthoVision XT 소프트웨어(Noldus Information Technology)로 확인되었다.

[0770] *답 시퀀싱 분석 및 삽입결실 검출*

[0771] CRISPR 설계 도구 (<http://crispr.mit.edu/>)이 뇌에서 CRISPR-SpCas9에 의해 표적화된, DNMT 패밀리 유전자에 대한 잠재적 오프-표적을 찾기 위해 사용되었다. 치상회로부터 표적화된 세포 핵은 바이러스 전달 12주 후 FACS로 분류되었으며 유전자 DNA는 상기 기재된 바와 같이 정제되었다. 관심있는 유전자에 대해, 유전자 부위 측면 CRISPR 표적 위치 Illumina P5 어댑터뿐만 아니라 특유한 시료-특이적 바코드를 표적 증폭산물(온- 및 오프-표적 프라이머에 대해 추가 표 3을 참조)에 부착하기 위해 융합 PCR 방법에 의해 증폭되었다. 바코드화되고 정제된 DNA 시료는 Qubit 2.0 형광광도계(Life Technologies)에 의해 정량화되었으며 등몰비로 모아졌다. 시퀀싱 라이브러리는 그 후 Illumina MiSeq 퍼스널 시퀀서(Life Technologies)로, 읽기 길이 300 bp로 시퀀싱되었다. MiSeq 리드는 종래¹⁵에서 기재된 바와 같이 분석되었다. 요약하면, 리드는 Phred quality(Q score)에 의해 필터링되었으며 스미스-워터맨 알고리즘(Smith-Waterman algorithm)을 이용하여 표적 위치의 유전자 영역 50 뉴클레오티드 업스트림 및 하류로 정렬되었다. 삽입결실은 표적 위치의 5 뉴클레오티드 업스트림에서 5 뉴클레오티드 하류까지 정렬된 지역에서 계산되었다. 각 시료에 대한 음성 대조군은 추정상의 절단 사건으로서 삽입결실의 삽입 또는 결실을 추정하는 데에 사용되었다. 출원인은, 음성 대조군의 데이터로부터 표적당 영역당 리드 에러 속도(per-target-region-per-read error rate)를 이용하여, 참-삽입결실 (true-indel)로 표적-영역을 함유하는 리드의 부분에 대해 최대-가능도 추정량 (maximum likelihood estimator, MLE)을 측정하였다. 각 표적에 대한 MLE 점수 및 절삭 속도는 추가 표 1에 나타나있다.

[0772] *통계적 분석*

[0773] 모든 실험은 최소한 2개의 독립적인 생물학적 복제동물로 수행되었다. 통계는 Student's 양측검정(Student's two tailed t-test)을 이용하여 Prism6(GraphPad)으로 수행되었다.

[0774] 추가 표 1. DNMTs 표적화에 대한 표적외 분석

	유전자	GI	잠재적 오프-표적 서열	MLE (%)	SEM	서열번호:
Dnmt1	Abca1	NM_013454	GGAGCTGGAGCTGTTCCAGTGG	0.0000	0.00	
	Mctp1	NM_030174	CGGGCAGCAGATGTTCCGCGIAGG	0.0806	0.08	
	Exd2	NM_133798	AGGGCTIGAGATGTTCCGGGCTGG	0.0612	0.06	
	Pik3r6	NM_001004435	CCGGCTGGGGCTGTCCICGCTAG	0.0000	0.00	
	Sobp	NM_175407	CGGGGTGCAGCTGCTCACGCCAG	0.0000	0.00	
	Vac14	NM_146216	CTGGCCGGAGCTGCTCGCGIAGG	0.0083	0.00	
Dnmt3a	Efemp2	NM_021474	TGAGCATGGGCCCGCTGGCGGTGG	0.0050	0.01	
	Bmpr1b	NM_001277217	ATGGCATAGGCCGCTGACAGAGG	0.0117	0.01	
	Syce1	NM_001143765	TTGGCATGGIAGCTGGCGGGGG	0.0067	0.00	
	Atp8b3	NM_028094	TGGCAGGGGTCICTGAGGGCAG	0.0067	0.01	
	Rdh11	NM_021557	TTGGCATGGGTCICTIACCAAGG	0.0017	0.00	
Dnmt3b	Hecw2	NM_001001883	ACAATGGTICCAAGGGTATGTAG	0.0000	0.00	
	Plekha3	NM_153804	GGAGGIGGGCAGCGGGTATGTAG	0.0954	0.01	
	Cdc25b	NM_001111075	AGAAGGTCGCCGGGGCATGGAG	0.2421	0.12	
	Top1mt	NM_028404	GGAGGGAACCAGCCGGTATGGGG	0.0167	0.01	
	Sean2	NM_144907	AGAGAGTGGCAGTGGTAAGCAG	0.0000	0.00	
	Ncan	NM_007789	AGAGGTGGCCAGCGGGCAGGAAG	0.0017	0.00	
	Nacad	NM_001081652	TGAGGGGGCCAGCTGGGATGCAG	1.6254	0.76	

[0775]

[0776] 추가 표 2. 서베이어 분석에서 사용된 PCR 프라이머

유전자	포워드 프라이머 서열 (5'-3')	서열번호:	리버스 프라이머 서열 (5'-3')	서열번호:
Mecp2	GGTCTCATGTGTGGCACTCA		TGTCCAACCTTCAGGCAAGG	
Dnmt3a	ATCCCTCCTCAGAGGGTCAGC		TACCTCATGCACAGCTAGCACC	
Dnmt1	TTCGGGCATAGCATGGTCTTCC		GTTCTATTTAGAGGGCTGATCCC	
Dnmt3b	GTTCTGAGCCGCACAGTTTGG		GGATAAGAAGGGACAATACAGG	

[0777]

[0778] 추가 표 3. 온- 및 표적의 유전자 좌위 증폭에 사용된 프라이머

유전자	포워드 프라이머 서열 (5'-3')	서열번호:	리버스 프라이머 서열 (5'-3')	서열번호:
Dnmt1	GCCGGGGTCTC GTTCAGAGCT		CTACCGCCTGCGGA CATGGT	
Dnmt3a	CCTGTCTCTCTGT CCTAGGGCTCC		CCGTTTGCTGATGTAGTA GGGGTCC	
Dnmt3b	CCCACAGGAAA CAATGAAGGGAGAC		CATCCTTCGTGTCT GAGGACTGGTC	
Abca1	CCCTGACACCAGC TGTTCAGCAC		CTCTGGGTGAC CACACACGATGC	
Mctp1	GAGCAGGCAGA GCCGAGCAAG		GGAGAGCGTCC GCCAGGAG	
Exd2	GGGTCTTGTGTG AGTAGGGTGTG		GAAGCTCTCTTAA CTACTGTTC	
Pik3r6	CCTGGAATACTAT TTCCACGCCG		CAGGCCCTAGCAGCG AGCAG	
Sobp	GCAGCACACTCCA CCCTCACAT		GGAAGGGGCTTTCC TCCGAGC	
Vac14	CGGCGTCACG TGACCTGAGTAAC		GCTCCGACCCTGCT CTCCCA	
Efemp2	GTGTCTGCCTC GCTCTGCTGC		CCTGTTGATGAGGCTC GTAGCCC	
Bmpr1b	CTATCTGAAATCC		CGATTGCTGGCTTGC	

[0779]

	ACCACCTTAGACGC		CTTGAG	
Syce1	GCCTGAGGGGG CCAGAGGT		GGTTCGCGTCCGCC CGCGTGAT	
Atp8b3	GGGACTCC CCGGGTGGTG		GAGAGGTGGTC CTGTCCCTATG	
Rdh11	GACCTGTGTTT CAAGTCTCTCTG		CCCAGCAGGTCACA GCTGACATC	
Hecw2	GGCCATCCAGTAC ATTCAATACG		AGCACAGTATGTATTC TATAAAATAATACGAC	
Plekhg3	GCAGAAGCCGT GACTCAGCA		GTGGGAGGGGACAG AGACCATG	
Cdc25b	CTTGTGCTTG TGATTCTGTCTACTGC		CCTTACCTGTTCTCT TCCTTATCCAGC	
Top1mt	CGAGAAGTC GATGCAGACACTCAA		ATACCCAGTCCAC ATCCCTGCC	
Sean2	GCTGAAGACTGGC GAGCACAGCT		CCTCTGCATCTCCCTCAGGAAGTATT	
Ncan	GACCTGAATGTTG TGGCTGAGAGTCC		GCCTCCTGTC CCCAGGTCCC	
Nacad	CCCTCACGTTCC TGCCAGCAA		CACTAGGCTT GGGCTGCCCTCT	

[0780]

[0781]

실시예 2: 생체내 망막 질병 모델 (색소성 망막염에 대한 마우스 모델)

[0782]

출원인은 AAV에 패키징될 때, 그리고 포유동물 세포에서 내인성 게놈 서열을 변형하는데 성공적으로 사용될 때 Cas9를 이용한 게놈 조각 접근의 생체내 효용성을 입증한다. 출원인은 뉴런에서 게놈 조각의 잠재력을 설명하기 위해 이 시스템을 사용하며, 이는 인간 생체에서 유사분열 후 세포의 하나의 중요한 그룹을 설명한다. 출원인의 연구는 인간 환자에서 발견되는 유사한 유전자 결함과 일치하는 돌연변이를 떠맡는 마우스 모델에서 인간 질병 색소성 망막염과 연관된 돌연변이의 수정을 통해 체조직의 생체내 게놈 조각의 치료 가능성을 강조한다. 출원인의 연구에 사용된 마우스 종은 C57BL/6 중 B6.129S6(Cg)-Rhotm1.1Kpal/J이다. 이 마우스 종은 이러한 마우스가 마우스 로돕신(Rho) 유전자 내의 코돈 23에서, CCC에서 CAC로의 뉴클레오티드 치환을 가지고 있기 때문에 선택되었다. 이러한 코돈은 위치 23, P23H에서 페닐알라닌에 대한 히스티딘의 아미노산 치환을 인코딩한다. P23H 돌연변이는 상염색체 우성 색소성 망막염의 가장 일반적인 원인 중 하나이다. Rho 유전자의 유전자 위치는 마우스 염색체 6이다: 115,931,927-115,938,829. 출원인은 마우스가 생육 가능하고 번식력이 있는 표적화된 돌연변이에 대해 동형접합적이라는 것을 발견하였다. 돌연변이 및 야생형 유전자 산물(mRNA) 둘 다는 cDNA 시퀀싱 크로마토그램에 의해 검출되었다. 이형 마우스에서의 표현형은 P23H 돌연변이에 의해 야기된 상염색체 우성 색소성 망막염을 가진 환자에서 발견된 망막병증 및 점진적인 망막변성과 유사하였다. 나이가 35일이 될 때까지, 이형은 대조군과 비교하였을 때 더 짧은 막대 외부 세그먼트(rod outer segment)를 갖는다. 산후 63일, 이형은 더 적은 막대 핵(야생형 마우스에서 관찰된 수의 반)을 가지며, 막대 외부 세그먼트의 길이는 감소되었다. 동형접합 마우스는 얇아진 외부 핵막을 갖는 심각한 표현형, 산후 23일까지 광 수용체의 심각한 퇴화 및 산후 63일까지 거

의 모든 광수용체 세포의 감소를 나타낸다. 돌연변이 P23H 단백질의 글리코실화는 매우 감소한다.

[0783] *마우스 변형 B6.129S6(Cg)-Rhotm1.1Kpal/J에서 망막 뉴런으로 Cas9 시스템의 AAV 전달:*

[0784] 출원인은 망막 뉴런의 정상적인 기능에 대해 중요한 Rho 유전자를 표적으로 하도록, 그리고 cas9 게놈 조작 도구 및 조합 주형의 아데노-연관 바이러스 (AAV)를 이용하여 질병-관련 돌연변이 P23H를 해결하기 위해 표적에 상동성 재조합을 유도하도록 선택되었다. 출원인은 주황색으로 표시된 P23H 돌연변이 위치와 적색으로 표시된 단일 뉴클레오티드 돌연변이 C-A인, 3개의 표적을 설계하였다(도 18a 참조). 이러한 접근은 마우스 모델에서의 유전자 돌연변이의 보정이 질병-연관 표현형을 구조할 수 있다는 것을 입증하며 또한 성인 동물의 뉴런에서 유전자 변형을 수행하는 가능성을 입증한다. 또한, 연구는 모델 시스템으로서 이러한 변형에서 망막 뉴런을 이용하여, 게놈 조작 목적에 대해 신경세포 유형에서 유도될 수 있는 상동성 재조합의 수준을 평가할 수 있는 정보를 제공한다. 실험 설정은 하기 표에 나타난 바와 같다:

그룹 목적	주입 경로	그룹의 수	그룹당 마우스	합계
음성 대조군-식염수 주입	IV	1 그룹, 3 회	5	15
대조군-비-표적화 벡터	IV	1 그룹, 3 회	5	15
표적화 벡터	IV	3 회 X 3 조건	5	45

[0785]

[0786] 종합하여, 25마리의 마우스는 각 변형이 이 연구에 사용될 총 100마리가 되도록 번식 쌍(breeder pairs)을 설정 하는데 사용되었다.

[0787] *AAV의 망막 주입:*

[0788] 망막 주입이 전달 경로로서 사용되었다. 마우스는 체온으로 덥혀지고 1E12 바이러스 입자를 함유하는 0.5 내지 1 마이크로리터의 생리 식염수(0.9% 염화 나트륨)로 망막 주입되었다. 이러한 마우스는 6주령 초과이다. 동물은 발열 패드 및/또는 램프를 이용하여 따뜻하게 유지되고 모니터링되었다. 동물은 질병과 관련된 절차의 임상적 징후를 위해 매일 모니터링되었다. 마우스당 최대 2번의 주입이 투여되었다.

[0789] *조직 수집:*

[0790] 물질의 주입 1 내지 4주 후, 마우스는 마우스로부터 조직 샘플링하기에 앞서 CO₂ 흡입 방법에 의해 희생되었다. 조직은 성공적인 유전자 형질주입, 게놈 변형, 또는 독성의 증거를 위해 분석되었다.

[0791] *실시예 3: 색소성 망막염에 대한 생체내 치료적 게놈 조작 접근*

[0792] *가이드 선택 및 실험관내 검증*

[0793] 먼저, 인간 게놈에서 RHO 유전자를 표적으로 하는 SaCas9에 대한 가이드가 하기에 나타난 바와 같이 설계되었다. 이는 질병을 유발하는 돌연변이 P23H의 유전자좌에 기반하여 선택되었다. 설계는 가장 높은 효율 및 치료적 유전자 수정의 특이성을 용이하게 하는 질병 돌연변이 자리에 가장 가까운 온-표적 절단 도입의 가능성을 최대화하기 위해 계산적 알고리즘을 통해 생성되었다. 가이드는 표적 가이드 서열과 일치하는 유전자 영역의 접근성을 최대화하기 위해 그들의 DNaseI 과민성(HS) 분석 결과에 대해 스크리닝 되었으며, 그에 따라 생체내 전달 이후 가이드의 예상되는 효율성이 증가되었다. 하나 이상의 가이드가 선택되었으며 그 후 배양된 인간 세포(HEK 293FT)에서 표적 유전자 좌에서 삽입결실 형성을 유도하기 위해 그들의 효율성을 측정하기 위한 서베이어 분석을 이용하여 스크리닝되었다. 시험관내 가장 높은 효율성을 갖는 가이드가 바이러스 산물 및 생체내 하루 실험을 위해 선택되었다. 도 18a 및 도 18b는 RHO 좌에 대한 가이드 설계, 및 서베이어 분석을 이용하여 시험관내 가이드 스크리닝 결과를 나타낸다.

[0794] *상동성 재조합 주형 설계 및 검증*

[0795] 둘째로, 상동-인도 복구(homology-directed repair)를 이용하여 관련된 질병-연관 돌연변이 P23H를 해결하기 위한 표적에서 상동성 재조합을 도입하기 위해, HR 벡터가 영향을 받지 않은 개별 인간의 야생형(정상) 유전자 서열에 기반하여 합성되었다. 이러한 벡터는 AAV 패키징 신호, 및 최대 총 5 kb 상동성 부위를 갖는 유전자 서열의 정상 버전을 떠맡는다: 좌측 및 우측인, 2개의 상동성 부위는, 하기 나타난 바와 같이, 중간에서 표적 돌연변이 위치 P23H에 끼워진 서열의 각 측면이다. 이러한 벡터는 종래 섹션에서 측정된 바와 같은 가장 좋은 가이드와

함께 SaCas9 시스템을 인코딩하는 벡터와 일치하는 1:1, 1:3, 1:5 비율로 시험관 내에서 공동-형질주입됨으로써 평가되었고 그에 따라 표적 P23H 좌에서 상동성 재조합(HR) 효율은 제한효소단편길이다형성(RFLP) 분석을 이용하여 측정되며 HDR 절차에 대한 최적 조건을 확인한다.

[0796] 도 19는 RHO HR AAV 벡터를 나타낸다. 상동성 재조합 주형으로서 주어진 것에 원인이 있는 부분에 대한 특정 서열이 하기에 나타났다.

[0797] >Rho HR AAV 벡터 주형 영역

```

ACCAGAAAGTCTCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAACC
CAGGCCACCAGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTC
TCCTCCCTTTTCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCTCCTAGTGTCA
CCTTGGCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTAT
GAACACCCCAATCTCCAGATGCTGATTAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACTTTAT
AAGGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGG
CCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAGCCACAAGGGCCACAGCCATGAATG
GCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCT
TCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCTACATGT
TTCTGCTGATCGTGTGGGCTTCCCATCAACTTCTCAGCTCTACGTACCGTCCAGCACA
AGAAGCTGCGCACGCCCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGG
TCCTAGGTGGCTTACCAGCACCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCCA
CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTATGAGCCGGGTGTGGGTGGGT
GTGCAGGAGCCCCGGGAGCATGGAGGGGTCTGGGAGAGTCCCGGGCTTGGCGGTGTGGCTGAG
AGGCCCTTCTCCCTTCTCCTGTCTCAATGTTATCCAAAGCCCTCATATATTCAGTCAACAA
ACACCATTGATGGTATAGCCGGGCTGCTGTTTGTGCAGGGCTGGCACTGAACACTGCCTTGA
TCTTATTTGGAGCAATATGCGCTTGTCTAATTTACAGCAAGAAAAGTGGAGCTGAGGCTCAA
GAAGTCAAGCGCCCTGCTGGGGCGTACACAGGGACGGGTGCAGAGTTGAGTTGAAGCCCGC
ATCTATCTCGGGCCATGTTGCGACCAAGCCCTCTGTTTCCCTTGGAGCAGCTGTGCTGAGT
CAGACCCAGGCTGGGCACTGAGGGAGAGCTGGGCAAGCCAGACCCCTCCTCTCTGGGGGCCA
AGCTCAGGGTGGGAAGTGGATTTCCATCTCCAGTATTGGGTCTCCCTGTGCTGGGCAAT
GGGCTCGGTCCCCTCTGGCATCCTCTGCCTCCCCTCTCAGCCCTGTCTCAGGTGCCCTCC
AGCCTCCCTGCCCGCTTCAAAGTCTCCTGGTGTGAGAACCAGCAAGCAGCCGCTCTGAAGCAG
TTCCTTTTGTCTTAGAATAATGTCTTGCATTTAACAGGAAAACAGATGGGGTGTGCAGGGA
TAACAGATCCCACTTAACAGAGAGGAAAAGTGGGAGGGGAGAGGGGAAGAGACTCATTTAGG
GATGTGGCCAGGCAGCAACAAGAGCCTAGGTCTCCTGGCTGTGATCCAGGAATATCTCTGCTG
AGATGCAGGAGGAGACGCTAGAAGCAGCCATTGCAAAGCTGGGTGACGGGGAGAGCTTACCGC
CAGCCACAAGCGTCTCTGCCAGCCTTGCCTGTCTCCCCATGTCCAGGCTGCTGCCTCGG
TCCCATCTCAGGGAATCTCTGGCCATTGTTGGGTGTTGTTGCATTCAATAATCACAGATCA
CTCAGTTCTGGCCAGAAGGTGGGTGTGCCACTTACGGGTGGTGTCTCTGCAGGGTCACTCC
CAGTTTACAAATATTGTCCTTTCACTGTTAGGAATGTCCAGTTTGGTTGATTAAGTATATG
GCCACTCTCCCTATGGAATTCATGGGGTGGTGGAGCAGGACAGATGTCTGAATCCATCATT
CCTTCTCTCTCTGCGCAAAACATTGCACATTGCTTATGGCTCCTAGGAGAGGCCCCCAC
ATGTCCGGGTATTTCATTTCCCGAGAAGGGAGAGGGAGGAAGGACTGCCAATCTGGGTTTC
CACCACCTCTGCATTCCTTCCAACAAGGAAGTCTGCCCCACATTAGGATGCATTCCTCTGCT
AAACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
AAAAGTCCCTACCGGGTCCCAGTTCAATCCTGACCCCTGATCTGATTCGTGTCCCTTATGG
GCCAGAGCGCTAAGCAAATAACTTCCCCCATTCCTGGAATTTCTTTGCCAGCTCTCTCA
GCGTGTGGTCCCTCTGCCCCCTCCCCCTCCTCCAGCAGCAAGCTCTCTCTTCCCCAAGGCC
TCCTCAAATCCCTCTCCCACTCCTGGTTGCCTTCCCTAGCTACCCTC
    
```

[0798]

[0799] Cas9 게놈 조작 도구 및 재조합 주형의 AAV 전달

[0800] 마지막으로, 생체내 Cas9 게놈 조작 도구 및 재조합 주형의 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달을 적용하기 위해, 두 바이러스가 혈청형 AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8(모두 효율적임)으로 제조되었으며, 구배 초원심분리 또는 크로마토그래피 방법에 의해 정제되었다. 바이러스 입자는 그 후 광 수용체 및 RPE 세포로의 전달을 위한 망막 하 경로를 통해 이전 섹션에서 결정된 바와 같이 최적의 조건을 사용하여 주입되었다.

[0801] 상세한 주입 프로토콜

[0802] AAV의 망막 주입: 망막하 주입은 체온으로 덤혀진 상이한 양의 AAV 바이러스 입자를 함유하는 생리 식염수(0.9%

염화 나트륨)의 최대 1 밀리리터의 주입에 의해 수행되었다. 2개의 상이한 AAV 벡터인, 하나는 SaCas9에 대한 것 그리고 하나는 HR 주형에 대한 것은 최적의 조건을 결정하기 위해 상이한 비율(예를 들어, SaCas9 대 HR 주형 = 1:1, 1:3, 또는 1:5)로 혼합되었다. 주입에 대해 사용되는 투여량은 1.5 x 10E10 전체 벡터 게놈만큼 낮거나 또는 1.5 x 10E11 전체 벡터 게놈까지가 될 수 있다. 더 높은 투여량은 더 나은 유전자 치료 효과를 제공하지만 바이러스 벡터 주입에 대한 면역 반응으로 인한 질환의 더 높은 기회를 유도할 수 있다. 환자는 질환과 연관된 절차의 임상적 징후를 위해 매일 모니터링된다. 이러한 절차는 다음 출판물에 제공된 가이드라인을 본질적으로 따른다: Maguire A. M. *et al. N Engl. J. Med.* 2008 May 22;358 (21):2240-8. doi: 10.1056/NEJMoa0802315. Epub 2008 Apr 27. 레버씨 선천성 흑암시(Leber's congenital amaurosis)에 대한 유전자 전달의 안정성 및 효율성. Simonelli F. *et al. Mol. Ther.* 2010 Mar;18 (3):643-50. doi: 10.1038/mt.2009.277. Epub 2009 Dec 1. 레버씨 선천성 흑암시에 대한 유전자 치료는 안전하며 벡터 투여 후 1.5년 내내 효과적이다. Maguire A. M. *et al. Lancet.* 2009 Nov 7;374 (9701):1597-605. doi: 10.1016/S0140-6736 (09)61836-5. Epub 2009 Oct 23. 레버씨 선천성 흑암시에 대한 RPE65 유전자 치료의 연령-의존 효과: 1차 복용량-증가 연구.

[0803] 주입 후 절차

[0804] 주입 후, 환자는 모든 면역학적 반응 또는 역효과에 대해 모니터링된다. 적어도 4주 이후, 제한효소단편길이다형성(RFLP) 분석이 안구 세포 유형에서 유도될 수 있는 상동성 재조합의 수준을 평가하기 위해 사용된다. 색맹 표현형의 복구 또는 완화가 또한 평가된다.

[0805] 실시예 4: 색맹에 대한 생체내 치료적 게놈 조작

[0806] 가이드 선택 및 시험관내 검증

[0807] 먼저, 하기 나타낸 바와 같이 인간 유전자에서 유전자 CNGA3 및 CNGB3 를 표적으로 하는 SaCas9에 대한 가이드가 설계되었다. 이는 질병-유발 돌연변이, 즉 CNGA3에 대해 R277C 및 R283W 및 CNGB3에 대해 148delC의 좌에 기반하여 선택되었다. 설계는 치료적 유전자 보정의 가장 높은 효율성 및 특이성을 용이하게 하는 질병 돌연변이 위치에 가장 가까운 온-표적 절단의 도입의 가능성을 최대화하기 위해 계산적 알고리즘을 통해 생성되었다. 가이드는 표적 가이드 서열과 일치하는 유전자 영역의 접근성을 최대화하기 위해 그들의 DNaseI 과민성(HS) 분석 결과에 대해 또한 스크리닝 되었으며, 그에 따라 생체내 전달 이후 가이드의 예상된 효율성이 증가되었다. 가장 효율적인 가이드가 서베이어 분석을 통해 시험관내에서 테스트되기 위해 하나 이상의 가이드가 선택되었다. 시험관 내에서 가장 높은 효율성을 갖는 가이드는 바이러스 산물 및 생체내 하루 실험을 위해 그 후 선택되었다. 도 20a 및 도 20b는 CNGA3 및 CNGB3에 대한 가이드 선택을 나타낸다.

[0808] 상동성 재조합 주형 설계 및 검증

[0809] 두번째로, 상동-인도 복구를 이용하여 관련된 질병-관련 돌연변이를 해결하기 위한 표적에서 상동성 재조합을 도입하기 위해, HR 벡터는 영향을 받지 않은 개별 인간으로부터 각각, CNGA3 및 CNGB3 유전자의 야생형(정상) 유전자 서열에 기반하여 합성되는 것이 요구된다.

[0810] 도 21 및 도 22는 각각, CNGA3 HR AAV 벡터 및 CNGB3 HR AAV 벡터의 맵을 나타낸다. 이러한 벡터는 AAV 패키징 신호, 및 최대 총 5 kb 상동성 부위를 갖는 유전자 서열의 정상 버전을 떠맡는다: 좌측 및 우측인, 2개의 상동성 부위는, 하기 나타낸 바와 같이, 중간에서 표적 돌연변이 위치 사이에 있는 서열의 각 측면이다. 이러한 벡터는 이전 섹션에서 측정된 바와 같이 가장 좋은 가이드와 함께 SaCas9 시스템을 인코딩하는 벡터와 일치하는 1:1, 1:3, 1:5 비율에서 공동-형질주입됨으로써 시험관내 입증되며, 그 후 표적 좌에서 상동성 재조합(HR) 효율성은 제한효소단편길이다형성 분석(RFLP) 분석을 이용하여 측정되었고 그에 따라 HDR 절차에 대한 최적의 조건을 입증한다.

[0811] 상동성 재조합 주형을 담당하는 부분에 대한 특정 서열이 하기에 나열되어 있다.

[0812] >CNGA3 HR AAV 벡터 주형 영역

CTGCTGCCTGCTCTGTCCCCTTTAAGTATTGACATCCTCAAACCCTCTTTGGAAAAAGCACA
GGCCACAGATCTTACTGTGACTTGTGTTTCTTCTCCTAGGTGTACCTTCAACCTTGATAAAA
ATAAACCTCTAAATCAATTGAGATCTGCCTCCGTCACTTTTTTTTTTCAAAGACTCAGAGTC
TCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGTAGTGGTGCATCTTGGCTCATTGCACCCTCCACCTCC
TGGGTTCAAGTGGTCTCGTGCCTCAGCTTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGGGTGCACCACC
ACATCTGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTCACCATGTTGCCAGGCTGGTC
TCAAACCCTTGACCTCAGTGTATCCACCCGCTCGGCCTCTCAAAGTACTGGGATTATAGGCA
TGAGCCACGGCACCCGGCCTCTGTCACTTTTTGATTTACAACATGTATCTCTAATTTTAAAG
GATCCTTTTTTAAATATGTATATAAATTTCCATTTATCTTTTAAATTTAATAATCATTCTTT
GTTATCATGTAATACCCAATTTATATTTAAATTTACTCAATCAACCTATGTTTTAAAAAATT
CAATAGAATAGATTAGAACCTCATAGAATAGAAAATATCAGAGTGCATTTCTGTAGTAATGG
TAAGTGTGTTTTGAAATCATTCTATTATATATGTATCACTGCATACTGTGTAGCCGTGAG
GTAAATATGTTTTCTTTGACTATGGTCAAAAAAAGTCAGCCTCTGTGATGCCAATGACCTC
CATCTTCTCTTTAGGTTTTCTCGAGCAAGGCTTAATGGTCAGTGATACCAACAGGCTGTGGC
AGCATTACAAGACGACCACGAGTCAAGCTGGATGTGTGTCCCTGGTCCCACCGACCTGG
CTTACTTAAAGGTGGGCACAACTACCCAGAAGTGAAGTTCAACCGCCTACTGAAGTTTTCCC
GGCTCTTTGAATCTTTGACCGCACAGAGACAAGGACCAACTACCCAATATGTTCAAGATTG
GAACTTGGTCTTGTACATTCTCATCATCCACTGGAATGCCTGCATCTACTTTGCCATTT
CCAAGTTCATTGGTTTTGGGACAGACTCCTGGGTCTACCCAAACATCTCAATCCCAGAGCATG
GGCGCCTCTCCAGGAGTACATTTACAGTCTCTACTGGTCCACCTTGACCCTTACCACCATG
GTGAGACCCACCCCGGTGAAAGATGAGGAGTATCTCTTTGTGGTCTGTAGACTTCTTGGTGG
GTGTTCTGATTTTTGCCACCATTTGTGGCAATGTGGGCTCCATGATCTCGAATATGAATGCCT
CACGGGCAGAGTTCAGGCCAAGATTGATTCATCAAGCAGTACATGCAGTTCGCAAGGTCA
CCAAGGACTTGGAGACGGGGTTATCCGGTGGTTTGGACTACCTGTGGGCCAACAAAGAAGCGG
TGGATGAGAAGGAGGTGCTCAAGAGCCTCCAGACAAGCTGAAGGCTGAGATCGCCATCAACG
TGCACCTGGACACGCTGAAGAAGTTCGCATCTTCCAGGACTGTGAGGCAGGGCTGCTGGTGG
AGCTGGTGTGAAGCTGCGACCCACTGTGTTTCAGCCCTGGGGATTATATCTGCAAGAAGGGAG
ATATTGGGAAGGAGATGTACATCATCAACGAGGGCAAGCTGGCCGTGGTGGCTGATGATGGGG
TCACCCAGTTCGTGGTCTCAGCGATGGCAGCTACTTCGGGGAGATCAGCATCTGAAACATCA
AGGGGAGCAAGTCCGGGAACCGCAGGACGGCCAACATCCGCAGCATTGGCTACTCAGACCTGT
TCTGCCTCTCAAAGGACGATCTCATGGAGGCCCTCACCGAGTACCCGAAGCCAAGAAGGCCC
TGGAGGAGAAAGGACGGCAGATCTGATGAAAGACAACCTGATCGATGAGGAGCTGGCCAGGG
CGGGCGGGACCCCAAGGACCTTGAGGAGAAAGTGGAGCAGCTGGGGTCTCCCTGGACACCC
TGCAGACCAGGTTTGCACGCCTCCTGGCTGAGTACAACGCCACCCAGATGAAGATGAAGCAGC
GTCTCAGCCAACCTGGAAGGCCAGGTGAAGGTGGTGGGACAAGCCCTGGCTGATGGGGAAG
TTCCCGGGGATGCTACAAAAACAGAGGACAAACAACAGTAAAAATGCAGCATCTGTCTCCTGC
TTCACAGGGTGCAGTGTGAGGGTGACCSTATGTGGCCGAGCTGTGTGGCATGGAACTGGTC
AGGGTTGAATTCAGCTCTACTCACCCCTTGAAGCTGTGTGACTGCCTGAGAGAACCTGTTT
CTTACCTAAAAAATGGGACTTTTTGTCTCAGTCCCAGTGAAGTCCAGGTTTGATTGTGAAG
TCCGCATGAAACACTGCACCAGGCAGGGCTTTGCAAAGTGCAA

[0813]

[0814] >CNGB3 HR AAV 벡터 주형 영역

```

ACTTTGAGGCAATTTTACTGTAGCTGGTATTTTAGTCAATTTTGTAGATAAATTAGTTGTTTAT
ATCAAAGTAAATAAATTCACATTCTAAAGGGAATTATTTATTTAGTAAATTTTCTGGAAATTGA
GTGTCTGTGTGTGTGTGTTTCCCAATCAGTGGTCCCTCTGACTTTAAATTCCTTAAAATCGGT
TCTGGTTGTTATAATCCCTTATACATATCCAACCTACTCTAGGTAGTATGTAATTTTGTAAAGT
TATTTTCCCTCTCTTTGCTCTATCCTATAAATTGCTCTCCATCCCAAGGCTGCAGTGCAGTTGCC
CTTCAAAGTAATGCTGGGACCTGCTTTTTTCCAGTTTGGACATTGCCTTATTATATGTTCAA
TGTCATTTCACTGGAGCAGAAAGTTAGTGAAGTCAACTTTATGCCAGGTCTTTGTATTTTACC
AAAAGGAAATTTCACTATTAAATAACCCAGTTGCCATTTCTGAGTCTGATTCTACTGTTCTA
AATTTTCAAGTGATCTTTTTTATTTCTGGGACACTGCATACCTAATTGTCAAGTTTAAAT
TATGATCCTCGTTACTCTTAAGTGTAAATTGAGTTAGTGGTTATAGCTGACTCATAAACC
ATAAAACCCTTCACTGGTAAACTAATTAGCCACTGCACCTGCCCTTTAAATAAATTAACATTGT
TCATTACTAACAAATCGGCATCGGAGTTATTAAGTTACCTTACTGCTCAGTTGTCTAGAGGC
TTTCAAACTTTTTGTATCATGATCCAGAGTAAAAATGCATTTTACAGGCCAACTCAGGATAC
ACACACACACACACACTCCCTACTATCTATCAGACTCTGATATTTTCTATTCTATTATTC
TCTATCTTCTTTCAATTTAAAATGTATTGACTTACTAAAGAGGTTTTTTCAGCTTAAAATTTT
TATTTAGACCAATTCATGGGGTACTCATGCAATTTTGTACATGTATAAATGCATAGTGATC
AAGTCAGGGTGTGTTAGGGTGTGTTTACTCGAGTACAATACATGTTTTGAAACTATAGTCACC
CTACTCTGTGCAAACGTTGAATATATTCTTACTGTATGTTGTATCCTTTAATCCACTTTTC
TTTATGCGCTCCTCTCCCACCCTCACCCTTCCAGTCTCTGTTATCTTTCCACTCTCTGTC
TCTATGTGATCAAAATTTTAGCTCCACATATATGTGAGAACGTTGATATTTATCGTTTTG
GGTCTGGCTTATTTCACTAAGATAATGACCTTCAGTCCCATCCATTTTGGTGCAAATGACATG
ATTTTATCCTTTTTTATGGCCAAATAGCATTACCAGCCATTGAATGGGTTATGACAGCTTCA
AAAACACTGGCTCTCATAAATTCATACAATGAAACAGAATGTTAAAAATAATCAATAAAGGTT
TCTTTCAAATCAGAATTAAGTCTTCCCTTCCCCTCATAACCCATCTAGTAGTGCCAATT
CCTTCATAGTTTGAAGCCCAGTAATAAACACAGGCATTAATGTGCAGAATAAACAGCAAGTAT
CCAGTTGTTGCAATAAATCTGTGAGAGAGAATAGATGCAAAGTAAGATTGATGTTGTTTCTGA
AATACAGCCTATTTAACATTTCTTTTCCCTTAAAGTACCAGCGAACCCCTTGTCTTTGGATT
TGTGAAGTGTAACTCTCATTAGTACAGTACAAAGTATGGTGCCATTGCATGTTTTCTGATG
GCAATGTCTGACTGGGATTGACAGAGTGTAAAGAAAAAAGAAAAAGAAAACTTCCCTCT
CTTTTACAGATGTTGTGAGTCAACTCCGTGAAAGACATGCCTCAAAGGTCACTTCTTCAGTT
TAAGTCCCATAAAATACACTATGCTAATTTAACTGGATATCTCTGAAAAGCTCATGAGACTTT
ATGCTACGATGAATGGCAACTAGAGGTTTCGGTGCAAGTAAAATTTAGAACAACAAACGAATG
AAATTCAGATTAGGAATGAATATCATGAGAAAGGTTAAAGTTAACTTGCAAAAAGATATGT
TTTTCTGTACTTGTGTTGACAGAGGCAGATAATAAGTCCATTTTCTTAGTCCAGTATTCTAA
AATCTGATATGATTTTCACTCTTATTTCACTTAAAATATCCACATCTGTTCTAGAACATAG
TCCTATATTTTATATAGCCAAAGCTGAAATATATCCTTTTTTTGAAGAGGGGGTTCATATCC
CTGCCAAATFCCGTCTAAAATGTTGTACCATTGCTTTTTTCCCTTCCCCAAGTATACTGAGT
TATACTTTACCTGTAGATATATGCTTTGTCCATTATAGACTCTAGGTGATGATTAATTCAAA
AAATGAAGTGTACTATATAGAAAAGCAAAAGAAATCCAAAAGCATGTTAGTCTTAAATATATA
TATTTAAATAAAAATATATGAAATAGATTTTATTACTGAAAAT
    
```

[0815]

[0816] Cas9 게놈 조작 도구 및 재조합 주형의 AAV 전달

[0817] 마지막으로, 생체내 Cas9 게놈 조작 도구 및 재조합 주형의 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달을 적용하기 위해, 두 바이러스가 혈청형 AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8(모두 효율적임)으로 제조되었으며, 구배 초원심분리 또는 크로마토그래피 방법에 의해 정제되었다. 바이러스 입자는 그 후 광 수용체 및 RPE 세포로의 전달을 위한 망막 하 경로를 통해 이전 섹션에서 결정된 바와 같이 최적의 조건을 사용하여 주입되었다.

[0818] 상세한 주입 프로토콜

[0819] AAV의 망막 주입: 망막하 주입은 체온으로 덤혀진 상이한 양의 AAV 바이러스 입자를 함유하는 생리 식염수 (0.9% 염화 나트륨)의 최대 1 밀리리터의 주입에 의해 수행되었다. 2개의 상이한 AAV 벡터, 하나는 SaCas9에 대한 것 그리고 하나는 HR 주형에 대한 것은 최적의 조건을 결정하기 위해 상이한 비율(예를 들어, SaCas9 대 HR 주형 = 1:1, 1:3, 또는 1:5)로 혼합되었다. 주입에 대해 사용되는 투여량은 1.5 x 10E10 전체 벡터 게놈만큼 낮거나 또는 1.5 x 10E11 전체 벡터 게놈까지가 될 수 있다. 더 높은 투여량은 더 나은 유전자 치료 효과를 제공하지만 바이러스 벡터 주입에 대한 면역 반응으로 인한 질환의 더 높은 기회를 유도할 수 있다. 환자는 질환과

연관된 절차의 임상적 징후를 위해 매일 모니터링 된다.

- [0820] *주입 후 절차*
- [0821] 주입 후, 환자는 모든 면역학적 반응 또는 역효과에 대해 모니터링 된다. 적어도 4주 이후, 제한효소단편길이다형성(RFLP) 분석이 안구 세포 유형에서 유도될 수 있는 상동성 제조합의 수준을 평가하기 위해 사용된다. 색맹 표현형의 복구 또는 완화가 또한 평가된다.
- [0822] *실시예 5: 노인성 황반변성에 대한 생체내 치료적 게놈 조작 접근.*
- [0823] *가이드 선택 및 시험관내 검증*
- [0824] 첫번째로, 인간 게놈에서 유전자 좌 VEGFA를 표적으로 하는 SaCas9에 대한 가이드가 하기에 나타낸 바와 같이 설계된다. 이는 유전자의 첫 번째 엑손 내에서 선택되었지만, 유전자의 다른 부분도 가장 효율적인 가이드 설계를 결정하도록 스크리닝 될 수 있는 표적 부분의 넓은 범위를 위해 또한 표적화될 수 있다. 모든 설계는 전사 시작 부위와 가장 가깝고 망막에서 발현된 상이한 전사 부분의 공통 영역 내에서 위치되는 온-표적 절단 도입의 가능성을 최대화하기 위해 계산적 알고리즘을 통해 생성되었다. 이것은 치료적 유전자 수정의 가장 높은 효율성 및 특이성을 용이하게 할 것이다. 가이드는 표적 가이드 서열과 일치하는 유전자 영역의 접근성을 최대화하기 위해 그들의 DNaseI 과민성(HS) 분석 결과에 대해 또한 스크리닝 되었으며, 그에 따라 생체내 전달 이후 가이드의 예상된 효율성이 증가되었다. 가장 효율적인 가이드가 시험관내에서 테스트되기 위해 하나 이상의 가이드가 선택되었다. 도 23a 및 도 23b는 VEGFA에 대한 가이드 선택을 나타낸다.
- [0825] 설계된 가이드를 검증하는 것은 인간 세포에서 VEGFA 유전자의 발현과 최적의 가이드 및 조건을 찾는 것을 효과적인 억제할 수 있다. 설계된 가이드를 떠맡는 폐쇄된 AAV 벡터는 인간 세포 (예를 들어, HEK293)로 시험관내 전달된다. 세포는 전달 72 내지 96시간 후 수확되었다. RNA 및 단백질은 세포로부터 추출되었다. VEGF의 단백질 수준이 ELISA 또는 다른 단백질 측정 방법을 통해 측정되는 반면, VEGF의 mRNA 수준은 qRT-PCR 법 또는 다른 RNA 측정 방법을 통해 측정되었다. 가장 중요한 기준은 이것이 시스템의 임상학적 효과에 대해 직접적으로 관련이 있기 때문에 VEGF 단백질 수준이다. VEGF의 더 낮은 발현 수준에 대해 시험관 내에서 가장 높은 효율성을 갖는 가이드는 생체내 바이러스 산물 및 하류 실험을 위해 그 후 선택된다.
- [0826] 마지막으로 생체내 VEGF 발현을 방해할 수 있는 Cas9 게놈 조작 도구의 아데노-연관 바이러스 (AAV) 전달을 적용하기 위해, 바이러스가 혈청형 AAV2 및 AAV8 (둘 다 효율적이며, AAV1, AAV5, AAV7, AAV9, 또는 AAV-DJ와 같은 다른 AAV 혈청형은 사용될 수 있으나 덜 효율적임)으로 제조되었다. 바이러스 입자는 구배 초원심분리 또는 크로마토그래피 방법에 의해 모두 정제되었다.
- [0827] AAV 바이러스 입자는 유리체 내 경로를 통해 종래 섹션에서 결정된 바와 같이 최적의 조건을 사용하여 그 후 주입되며, 여기서 AAV는 안구의 유리액에 주입된다. 이러한 절차는 덜 침습적이며 치료적 교정 효과를 유도하는 VEGF 발현의 효율적인 방해물 획득하기 위해 구성물의 지속적인 발현을 유지할 수 있다.
- [0828] *상세한 주입 프로토콜*
- [0829] AAV의 망막 주입: 망막하 주입은 체온으로 덥혀진 상이한 양의 AAV 바이러스 입자를 함유하는 생리 식염수(0.9% 염화 나트륨)의 최대 1 밀리리터의 주입에 의해 수행되었다. 주입에 대해 사용되는 투여량은 1.5 x 10E8 전체 벡터 게놈만큼 낮거나 또는 1.5 x 10E11 전체 벡터 게놈까지가 될 수 있다. 상이한 투여량의 사용은 최적의 투여량을 가능하게 한다.
- [0830] 더 높은 투여량은 더 나은 유전자 치료 효과를 제공하지만 바이러스 벡터 주입에 대한 면역 반응으로 인한 질환의 더 높은 기회를 유도할 수 있다. 환자는 질환과 연관된 절차의 임상적 징후를 위해 매일 모니터링 된다.
- [0831] 인간 주입 파라미터에 대한 참조는 임상 시험의 정보에 대한 US 정부 웹사이트 Clinical Trials (dot) Gov에서 이용 가능하며, clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01024998의 웹사이트 주소를 갖는다.
- [0832] *주입 후 절차*
- [0833] 주입 후, 환자는 모든 면역학적 반응 또는 역효과에 대해 모니터링된다. 적어도 4주 이후, ELISA 또는 다른 단백질 측정 방법이 망막내 VEGF의 수준을 평가하기 위해 적용될 수 있다. ARMD 표현형의 복구 또는 완화가 또한 평가된다.
- [0834] 환자에 있어서 따라야 될 중요한 안전 절차는 단일 단안의 망막내 주입의 최대 허용 가능한 투여량, 치료 응급

유해사례의 수, 및 주입 후 망막의 두께를 포함한다.

[0835] 실시예 6: 난청 또는 청각 장애를 치료하기 위한 ATOH1 발현을 자극하는 dSaCas9.

[0836] 가이드 선택 시험관내 검증

[0837] 첫번째로, 인간 게놈에서 유전자 ATOH1를 표적으로 하는 SaCas9에 대한 가이드가 하기에 나타난 바와 같이 설계된다. 이는 표적 유전자 발현에서 후성 변조의 효율성을 최대화하는 최적의 파라미터에 기반하여 선택되었다. 구체적으로, 설계는 치료적 유전자 치료의 가장 높은 효율성 및 특이성을 용이하게 하는 온-표적 결합 도입의 가능성을 최대화하기 위해 계산적 알고리즘을 통해 생성되었다. 가이드는 표적 가이드 서열과 일치하는 유전자 영역의 접근성을 최대화하기 위해, 그들의 DNaseI 과민성 (HS) 분석 결과에 대해 또한 스트리닝 되었으며, 그에 따라 생체내 전달 이후 가이드의 예상된 효율성이 증가되었다. 또한, 잠재적으로 결합을 방해할 수 있는 전사 인자 부위가 가이드의 선택 동안 고려되었다. 하나 이상의 가이드가 선택되었으며 그 후 ATOH1 유전자 발현의 도입에 대해 그들의 효율성을 측정하기 위해 배양된 인간 세포(HEK 293FT)에서 시험관내 스크리닝되었다. 시험관내 가장 높은 효율성을 갖는 가이드가 하류 실험 및 생체내 치료적 증대를 위해 그 후 선택되었다. ATOH1에 대한 가이드의 특정 설계가 도 25a 내지 도 25c에 나타난다.

[0838] 가이드 스크리닝 및 검증

[0839] 설계된 가이드가 인간 세포에서 ATOH1 유전자의 발현을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하고 최적의 가이드 및 조건을 찾기 위해, 시험관내 스크리닝 및 검증이 인간 세포주로 수행된다. dSaCas9, 융합 이펙터, 및 최적의 가이드 RNA를 포함하는, 시스템은 인간 세포(예를 들어, HEK293) (도 24)로 시험관내 전달된다. 세포는 전달 72 내지 96시간 후 수확되었다. RNA 및 단백질은 세포로부터 추출된다. ATOH1의 단백질 수준이 ELSIA 또는 다른 단백질 추출 방법을 통해 추출된 반면, ATOH1의 mRNA 수준은 qRT-PCR 방법 또는 다른 RNA 추출 방법을 통해 추출되었다. 가장 중요한 기준은 이것이 시스템의 임상학적 효과에 대해 직접적으로 관련이 있기 때문에 ATOH1 단백질 수준이다. ATOH1의 발현을 자극하기 위해 시험관내 가장 높은 효율성을 갖는 가이드는 생체내 전달 및 치료적 입증을 위해 그 후 선택된다.

[0840] AAV 또는 Ad 바이러스 입자 또는 전체 시스템을 패키징하는 다른 전달 비히클은 그 후 생성되어, 실험적으로 결정된 바와 같은 최적의 조건을 사용하여 주입된다. 최적화하는 가장 중요한 파라미터는 각 개인 주입에 대해 사용된 전달 비히클의 양(즉, 투여량)이다.

[0841] 더 높은 투여량은 더 나은 유전자 치료 효과를 제공하지만 바이러스 벡터 주입에 대한 면역 반응으로 인한 질환의 더 높은 기회를 유도할 수 있다. 환자는 질환과 연관된 절차의 임상적 징후를 위해 매일 모니터링 된다.

[0842] 주입 후 절차

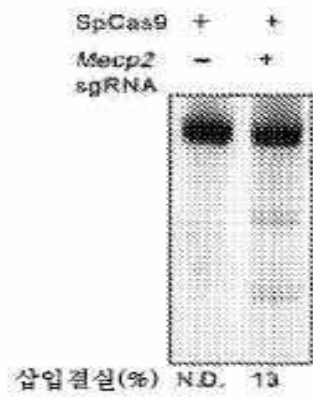
[0843] 주입 후, 환자는 모든 면역학적 반응 또는 역효과에 대해 모니터링 된다. 적어도 1주 이후, ELISA 또는 다른 단백질 측정 방법이 ATOH1 자극의 수준을 평가하기 위해 적용될 수 있다. 달팽이관에서 새로운 모발 세포 성장이 생체 검사 및 이미징법을 통해 시각화될 수 있다. 난청 및 청각 장애의 완화 및 회복은 그 후 인간 환자에서 청각 테스트를 통해 평가된다.

[0844] 환자에 있어서 따라야 될 중요한 안전 절차는 인간 달팽이관으로의 단일 주입의 최대 허용 가능한 투여량, 주입 후 치료 응급 사례의 수를 포함한다.

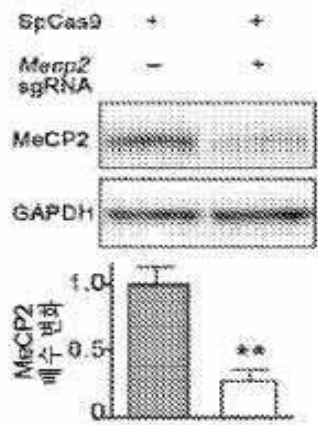
[0845] 본 발명의 바람직한 구현예가 본원에 제시되고 기재되었으나, 상기 구현예는 단지 예로 제공된 것이 해당 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않고 다수의 변동, 변화, 및 치환이 해당 분야의 숙련자에 의해 이제 발생될 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실시에서 이용될 수 있음이 이해되어야 한다.

도면

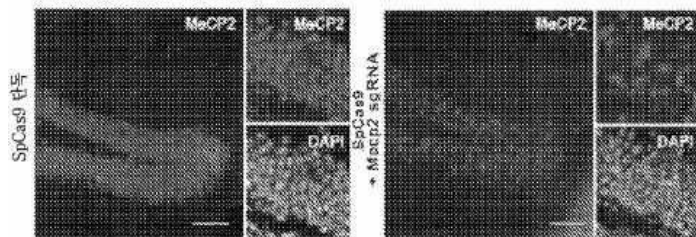
도면1e



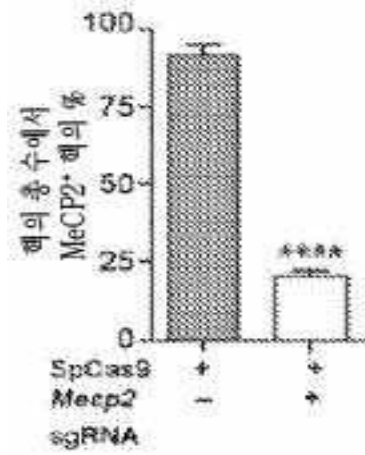
도면1f



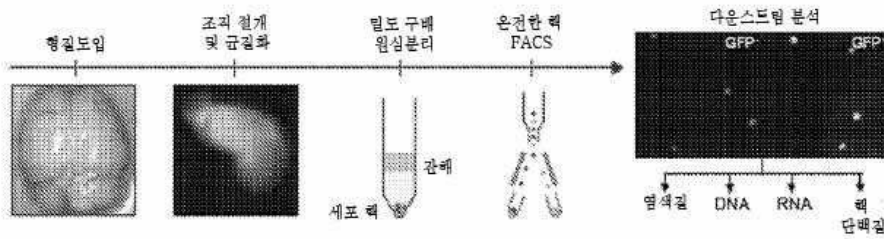
도면1g



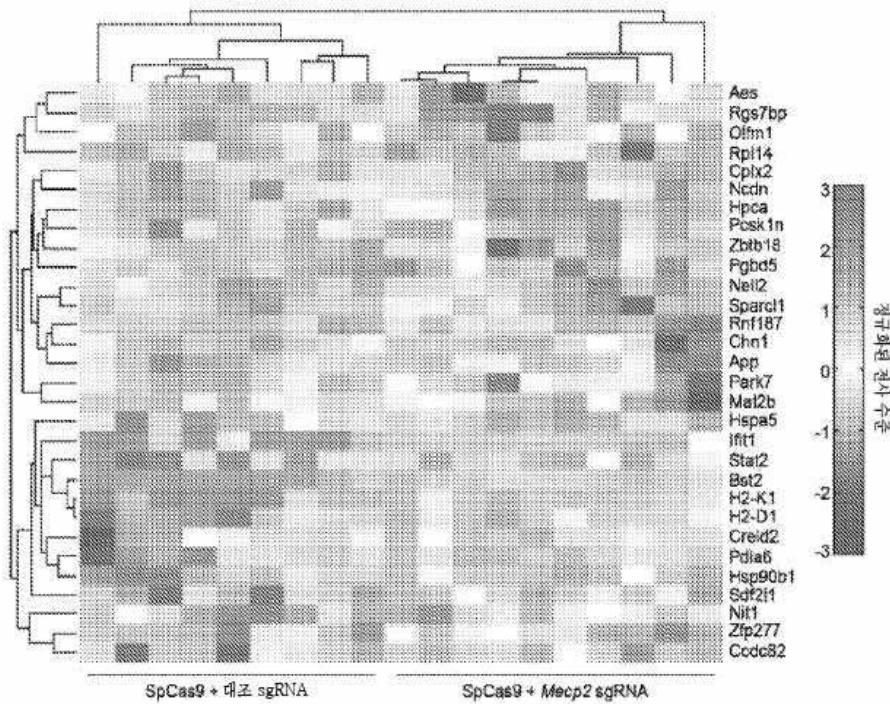
도면1h



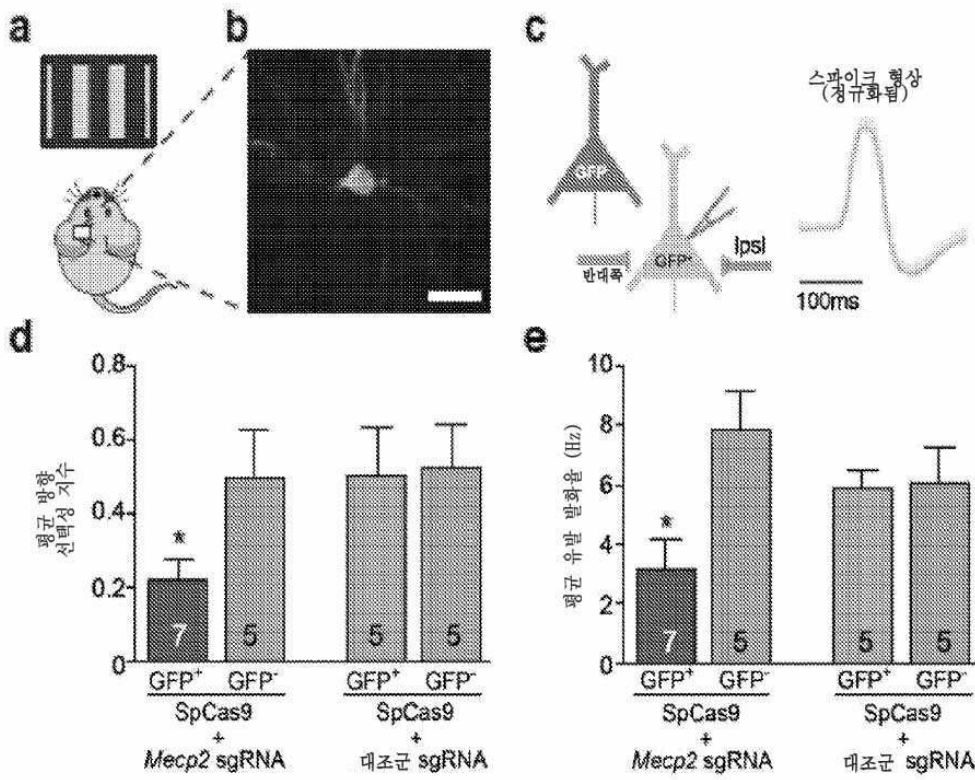
도면2a



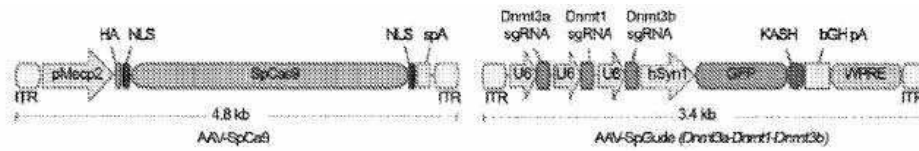
도면2b



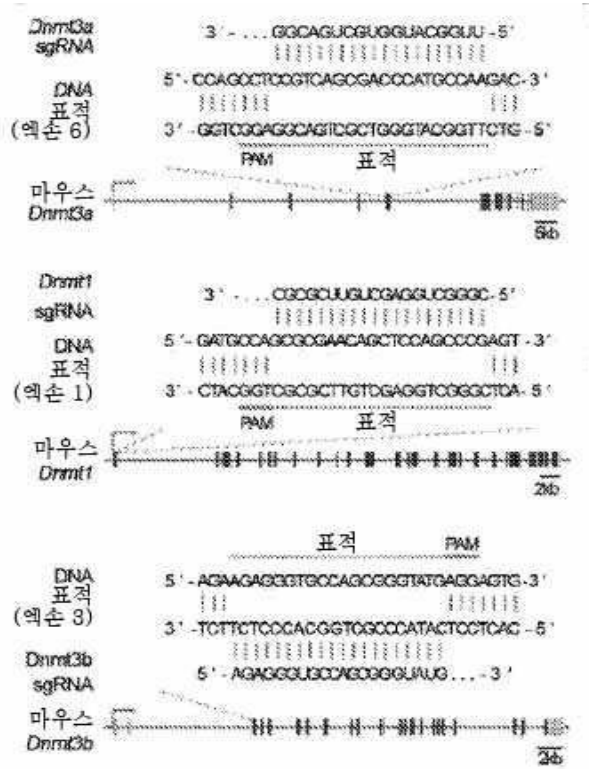
도면3



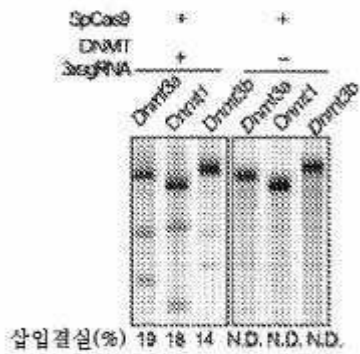
도면4a



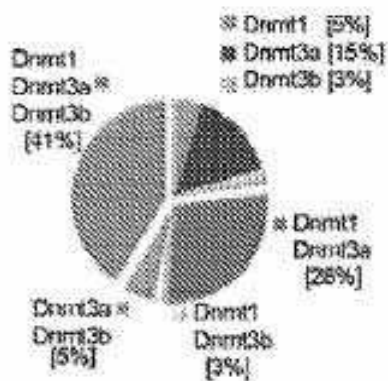
도면4b



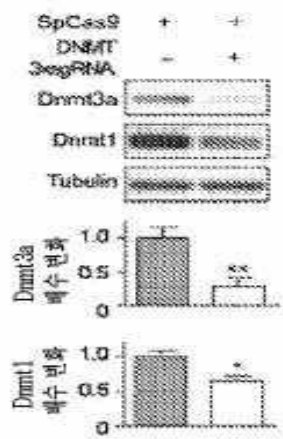
도면4c



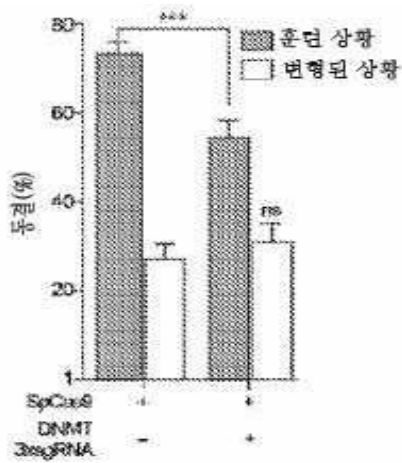
도면4d



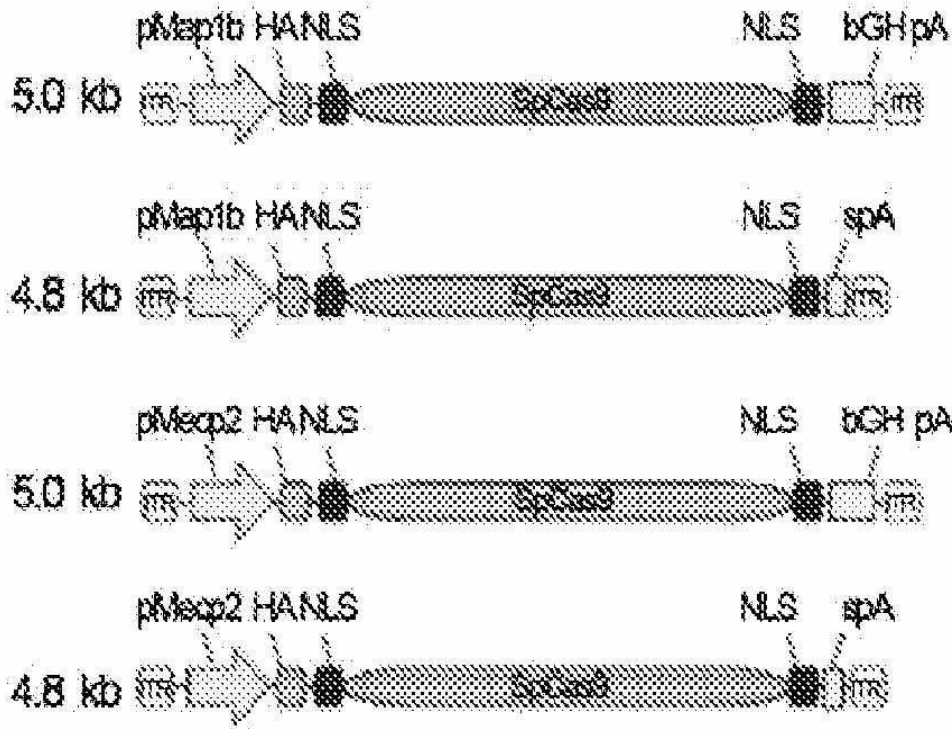
도면4e



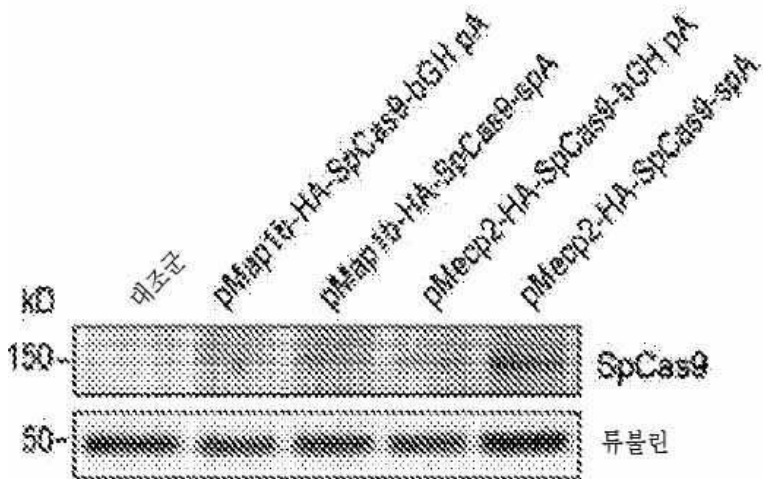
도면4f



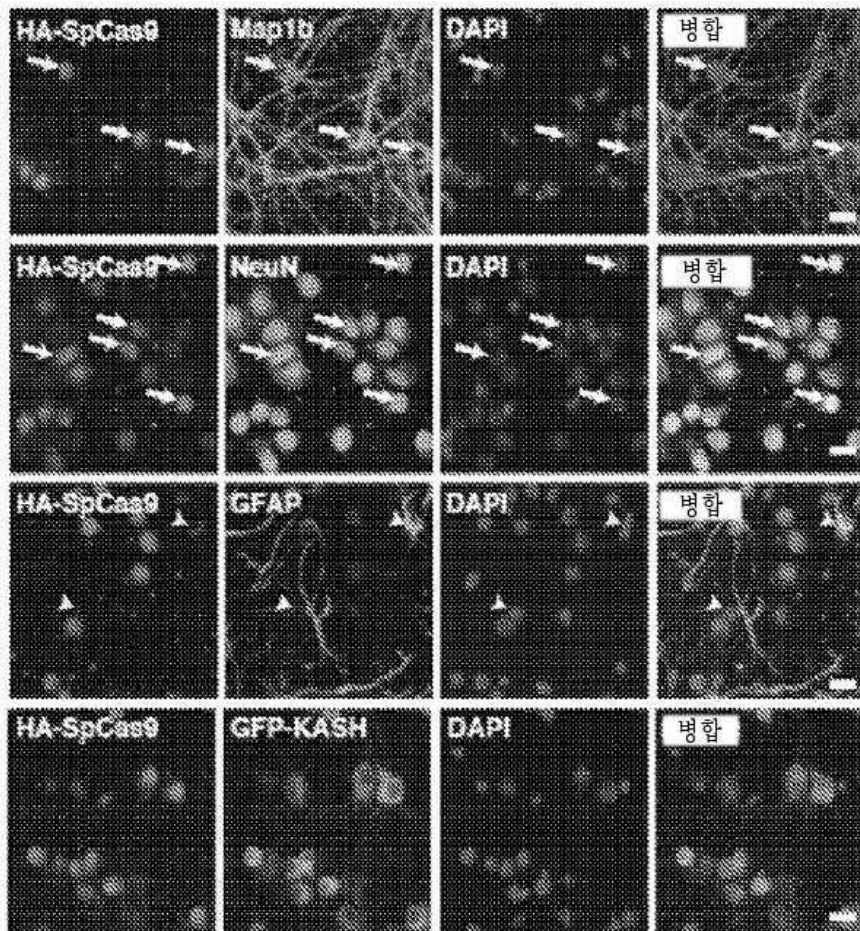
도면5a



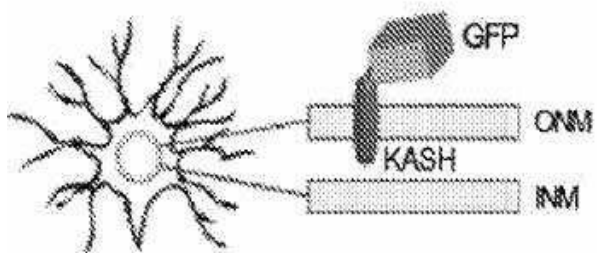
도면5b



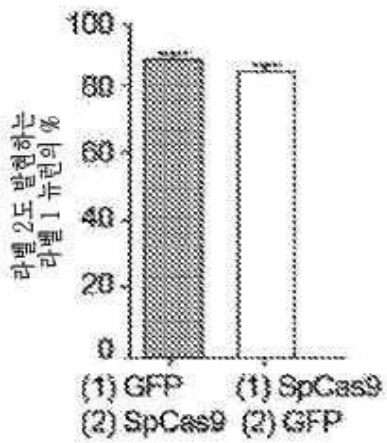
도면5c



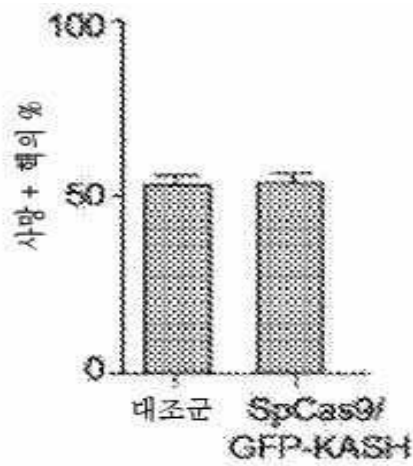
도면5d



도면5e



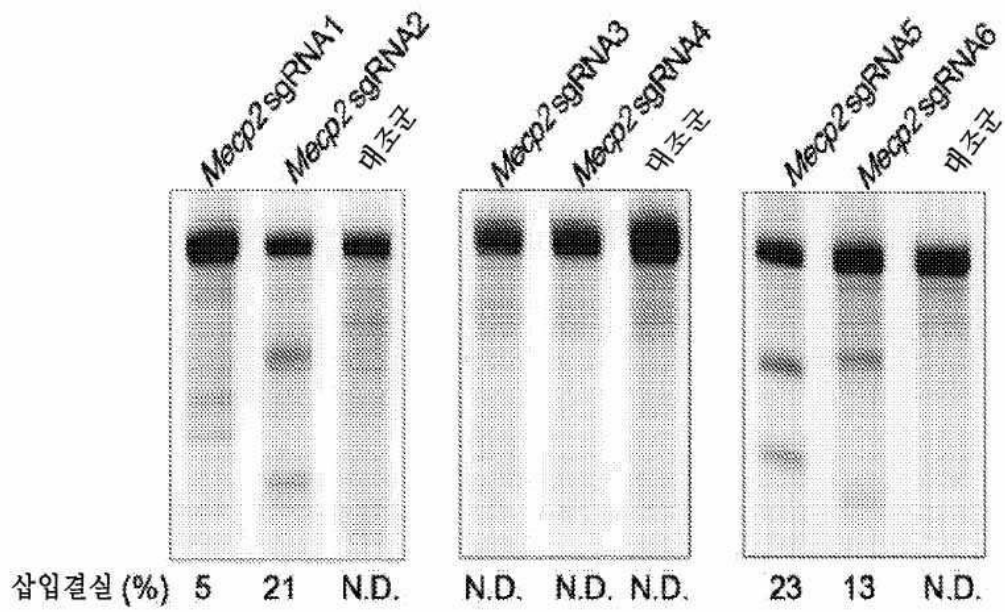
도면5f



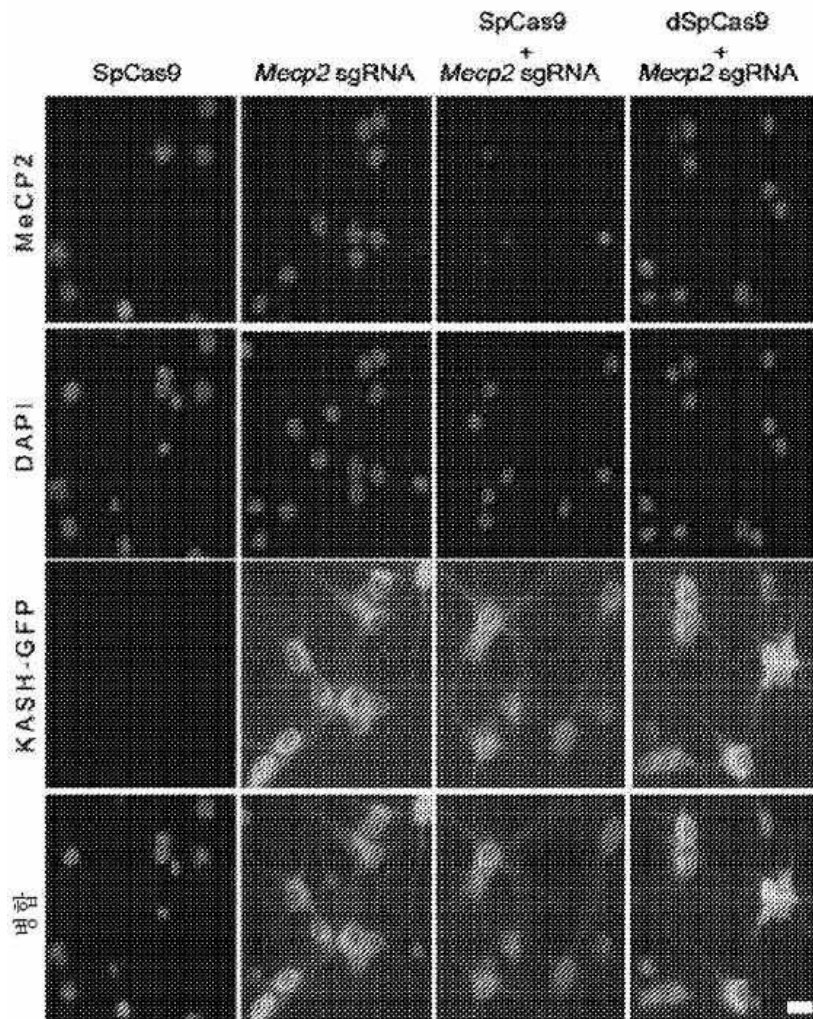
도면6a

	<i>Mecp2</i> 표적 서열	PAM
표적 1	CTGGGAGAGGGAGCCCCTCC	AGG
표적 2	AAAGGTGGGAGACACCTCCT	TGG
표적 3	TCCAACCTTCAGGCAAGGTG	GGG
표적 4	AGGAAGTCTGGCCGATCTGC	TGG
표적 5	CCATTCTGCAGAGCCAGCAG	AGG
표적 6	CTCTGAGGCCCTGGAGATCC	TGG

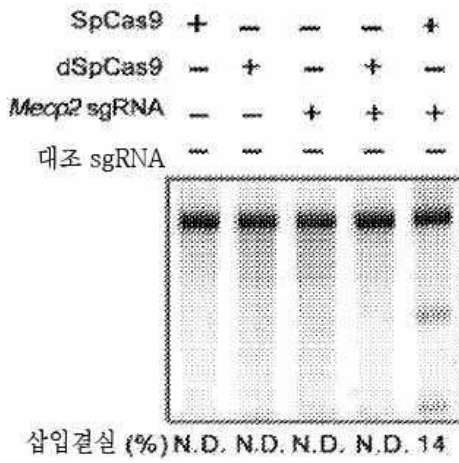
도면6b



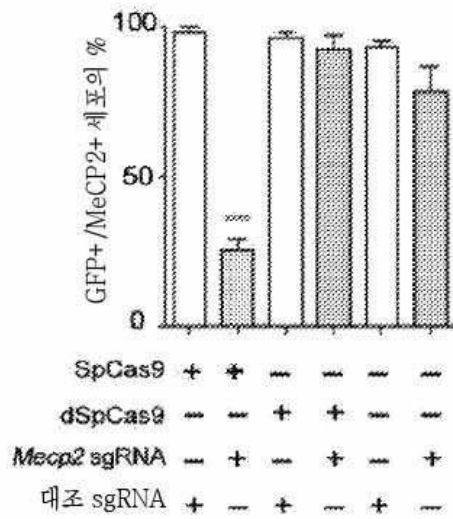
도면7a



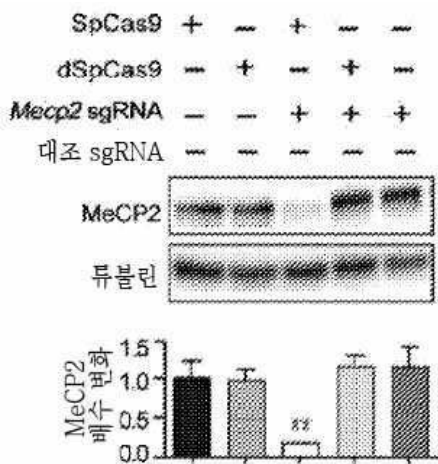
도면7b



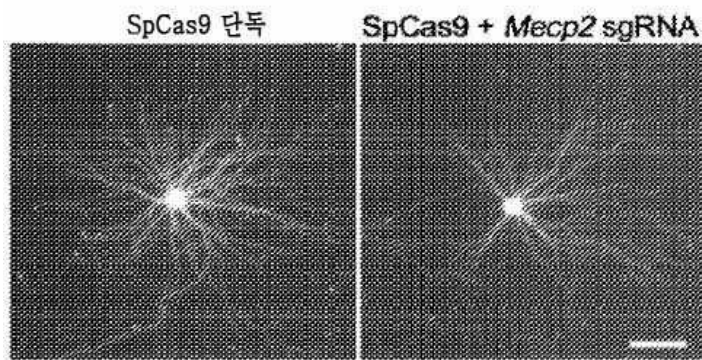
도면7c



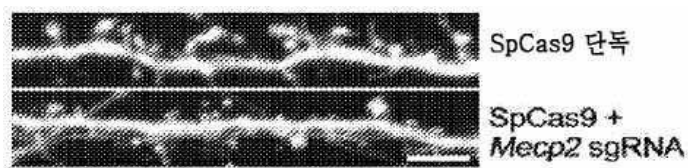
도면7d



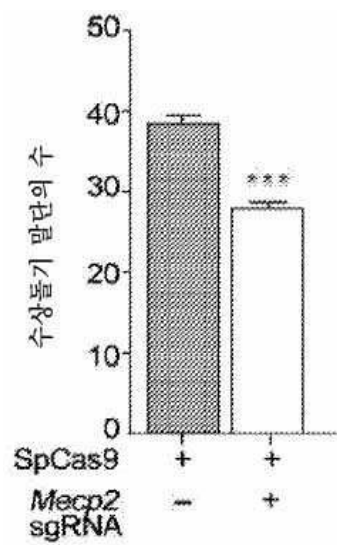
도면8a



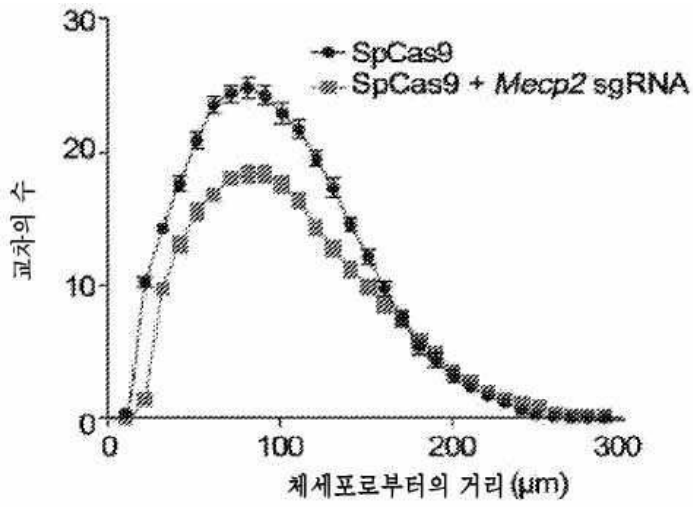
도면8b



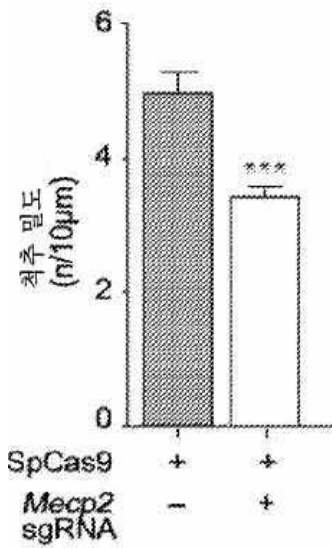
도면8c



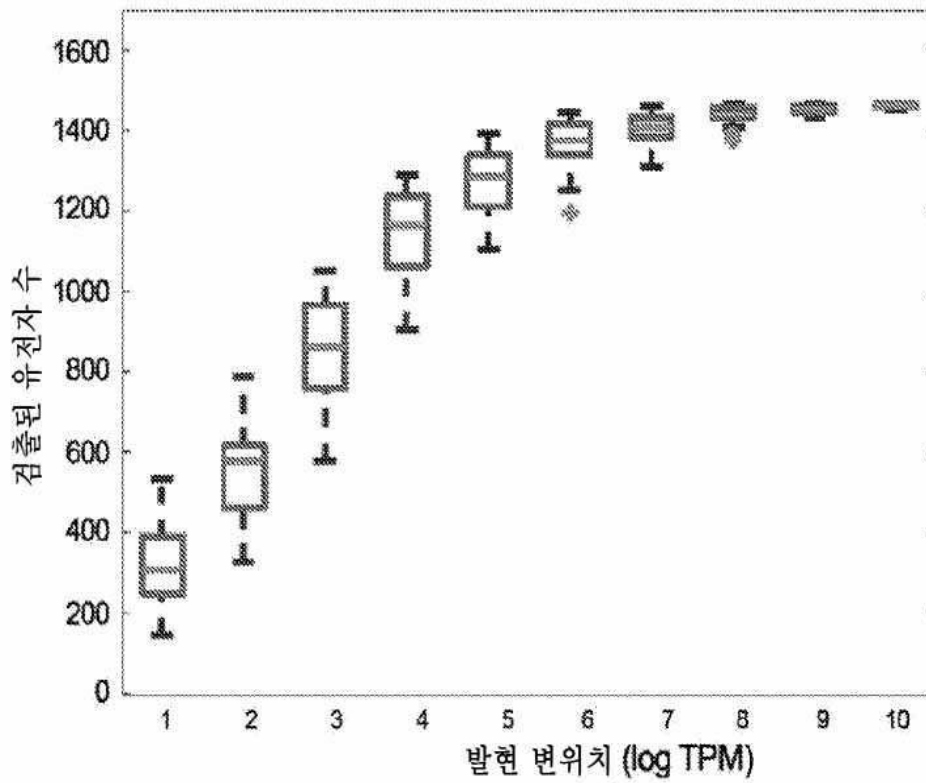
도면8d



도면8e



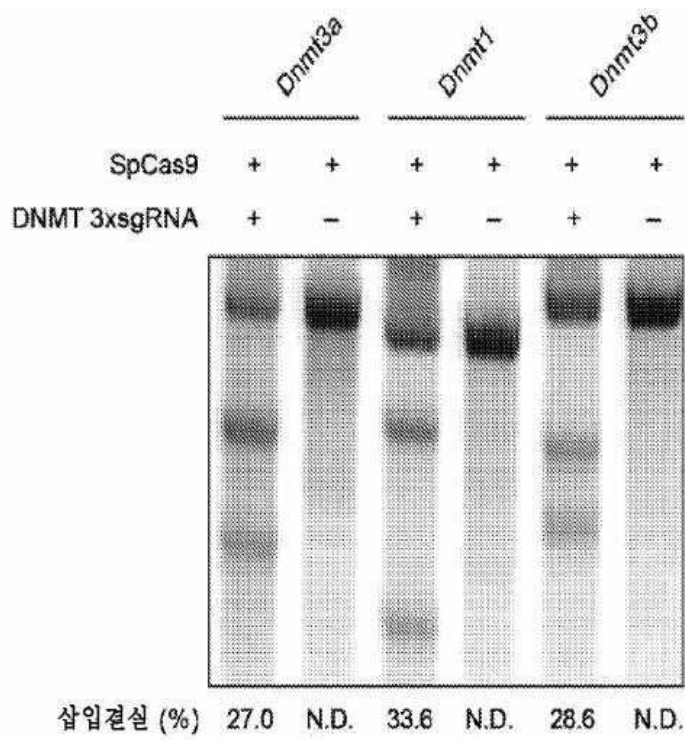
도면9



도면10a

표적	표적 서열	PAM
<i>Dnmt3a</i>	TTGGCATGGGTCGCTGACGG	AGG
<i>Dnmt1</i>	CGGGCTGGAGCTGTTCGCGC	TGG
<i>Dnmt3b</i>	AGAGGGTGCCAGCGGGTATG	AGG

도면10b



도면11a

Dnmt3a 유전자좌

PAM

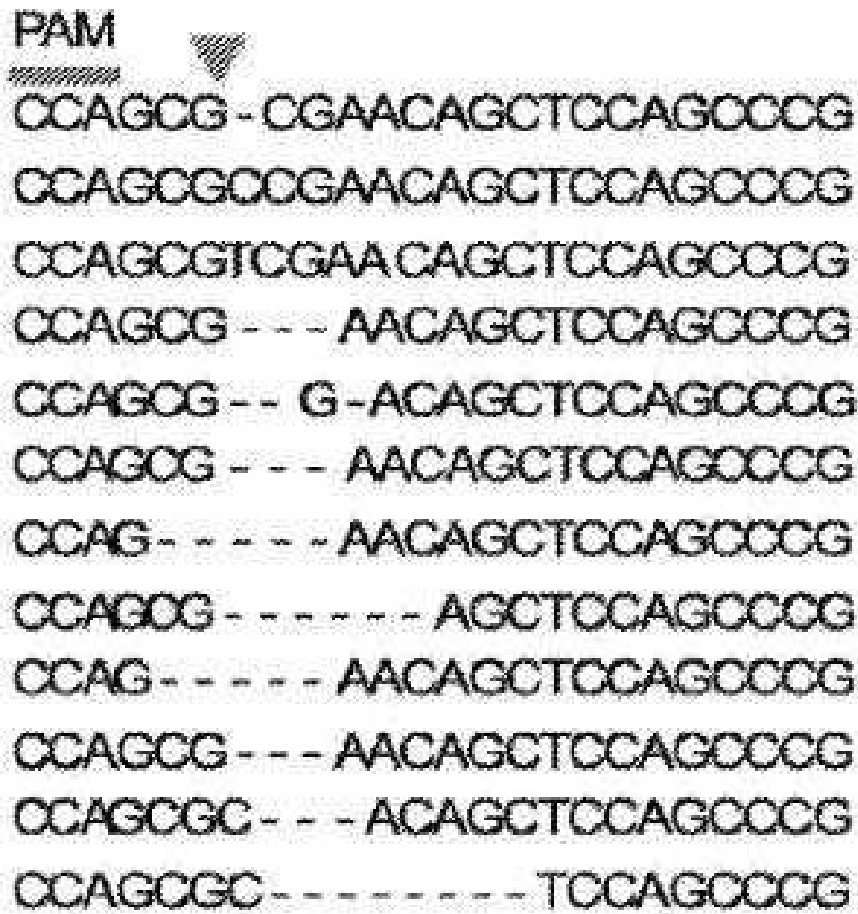


CCTCCG--TCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCG-ATCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCGTGTCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCG-TTCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCG-CTCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCC---TCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCG---CAGCGACCCATGCCAA
 CCTC-----TCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCC---TCAGCGACCCATGCCAA
 CCTCCG-----CGACCCATGCCAA
 CCTC-----AGCGACCCATGCCAA
 C-----TCAGCGACCCATGCCAA

도면11b

Dnmt1 유전자좌

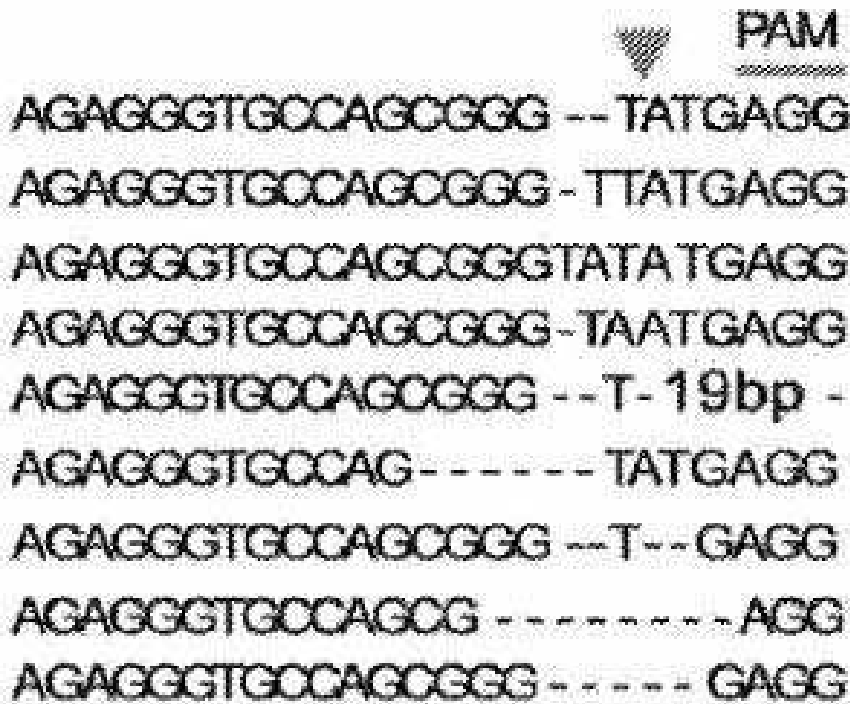
PAM



CCAGCG - CGAACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCGCCGAAACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCGTCGAA CAGCTCCAGCCCG
 CCAGCG - - - AACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCG - - G - ACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCG - - - AACAGCTCCAGCCCG
 CCAG - - - - AACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCG - - - - - AGCTCCAGCCCG
 CCAG - - - - - AACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCG - - - AACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCGC - - - ACAGCTCCAGCCCG
 CCAGCGC - - - - - - - TCCAGCCCG

도면11c

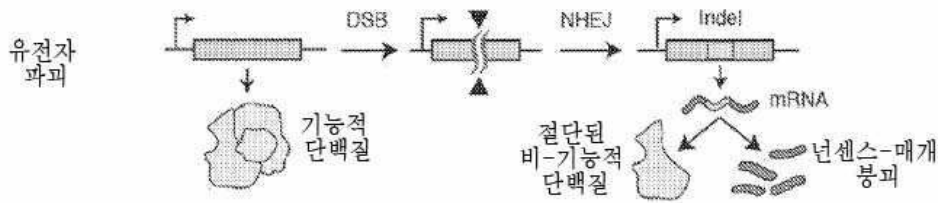
Dnmt3b 유전자좌



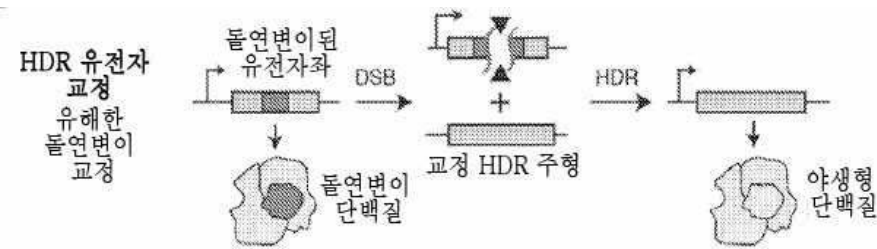
도면12

	자연 쪼개 뉴클레아제	TALE 뉴클레아제	CRISPR-Cas9
인식 부위	전형적으로 ZFP 당 9 내지 18 bp, ZFN 당 18 내지 36 bp	전형적으로 TALE 당 14 내지 20bp, TALEN 당 28 내지 40 bp	22bp(20bp 가이드 서열+2bp PAM 서열); 이중 니킹(nicking) 당 44bp까지
특이성	적은 수의 용인된 위치적 미스매치	적은 수의 용인된 위치적 미스매치	용인된 위치적 및 다중 연속 미스매치
표적 제한	비-G-부부 서열을 표적화하기가 어려움	5' 표적화 열기는 T가 되어야 함	표적화 서열은 PAM을 선행하여야 함
조작의 용이성	어려움. 상당한 단백질 조각이 요구될 수 있음	중간. 다중 분자 클로닝법은 요구함	표준 클로닝 절차 및 올리고 합성을 이용하여 용이하게 재-표적화됨
면역원성	ZFN가 인간 전사 인자 단백질 스키프로딩에 기반하기 때문에, 아마도 낮음	알려져 있지 않음. 박테리아 칸토모나스 종으로부터 유래된 단백질	알려져 있지 않음. 다양한 박테리아 종으로부터 유래된 단백질
생체의 전달의 용이성	전기 침공법 및 렌티바이러스성 형질도입과 같은 방법을 통해 상대적으로 용이함	전기 침공법 및 렌티바이러스성 형질도입과 같은 방법을 통해 상대적으로 용이함	전기 침공법 및 렌티바이러스성 형질도입과 같은 방법을 통해 상대적으로 용이함
생체내 전달의 용이성	작은 크기의 ZFN 발현 카세트로 인하여 상대적으로 용이함. 다양한 바이러스 벡터에서의 사용 가능하게 함	각 TALEN의 큰 크기 및 TALEN을 인코딩하는 DNA의 반복적인 성질로 인하여 어려움. 원하지 않은 재조합 사건은 유도함	중간: 흔히 사용되는 스트렙토코쿠스 피오케네스트로부터의 Cas9는 전달 문제를 일으키기에 충분할 수 있으나, 그 외에 더 작은 오솔로그가 존재
멀티플렉싱의 용이성	낮음	낮음	높음

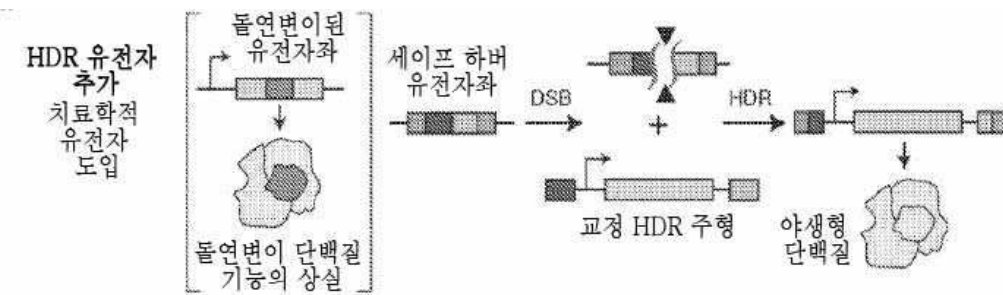
도면13a



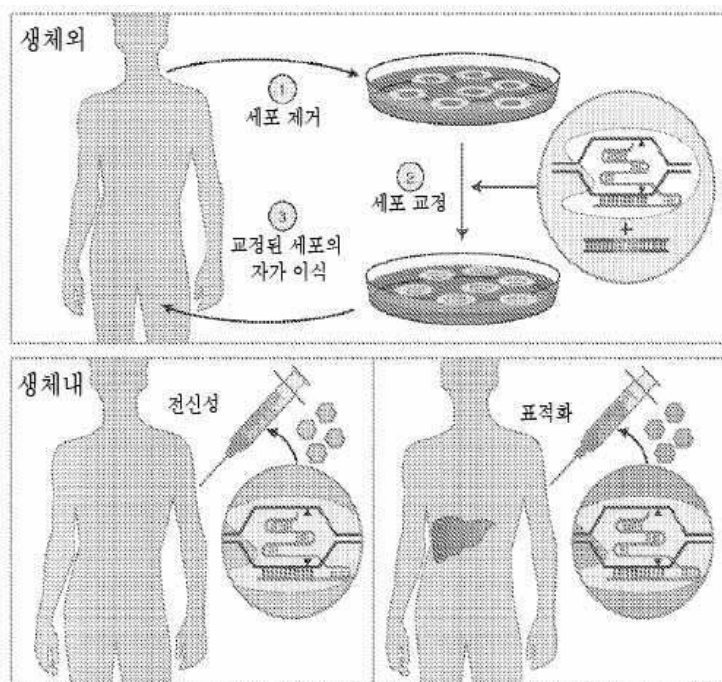
도면13b



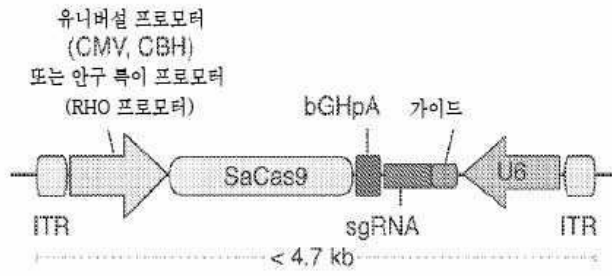
도면13c



도면14

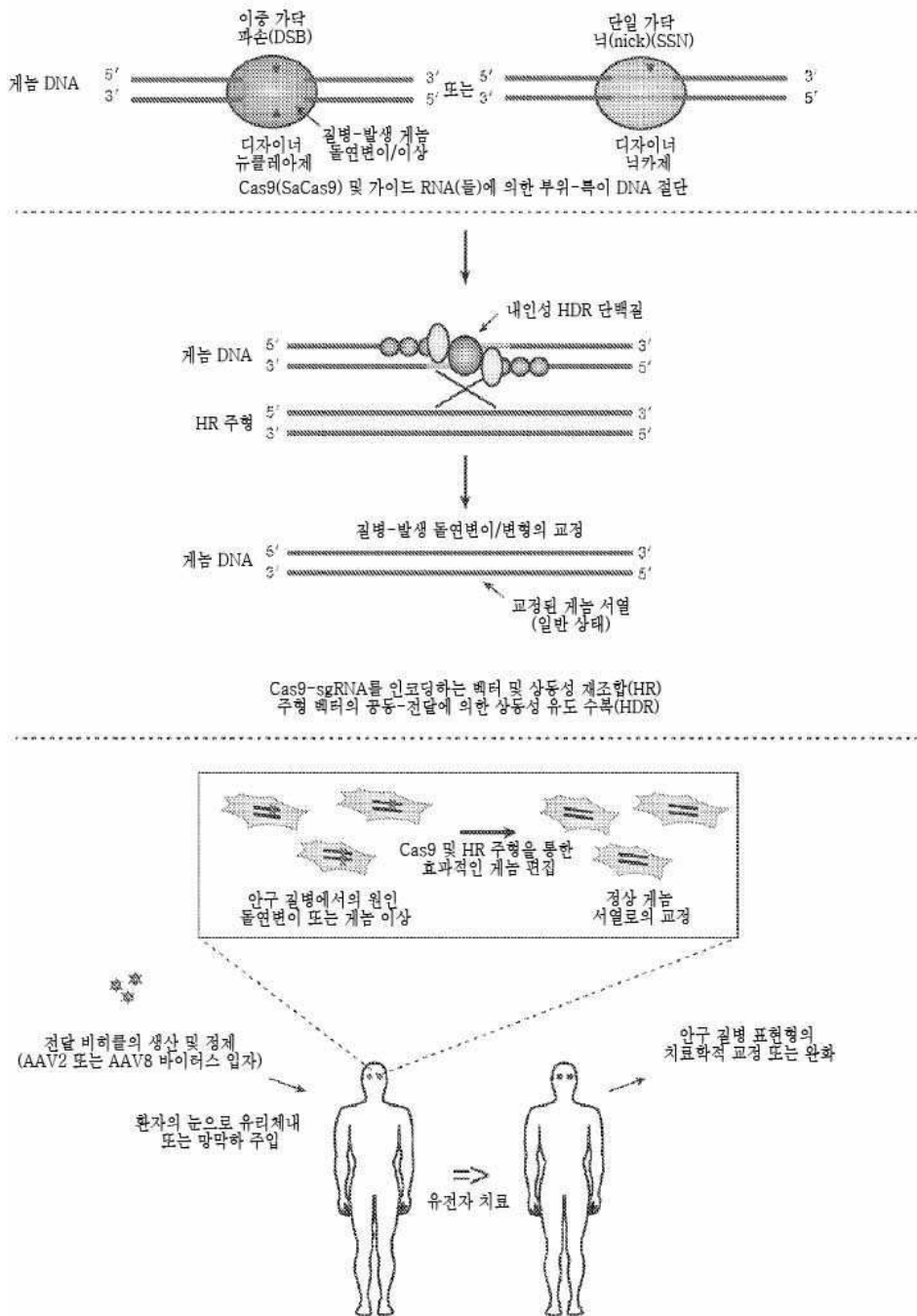


도면15

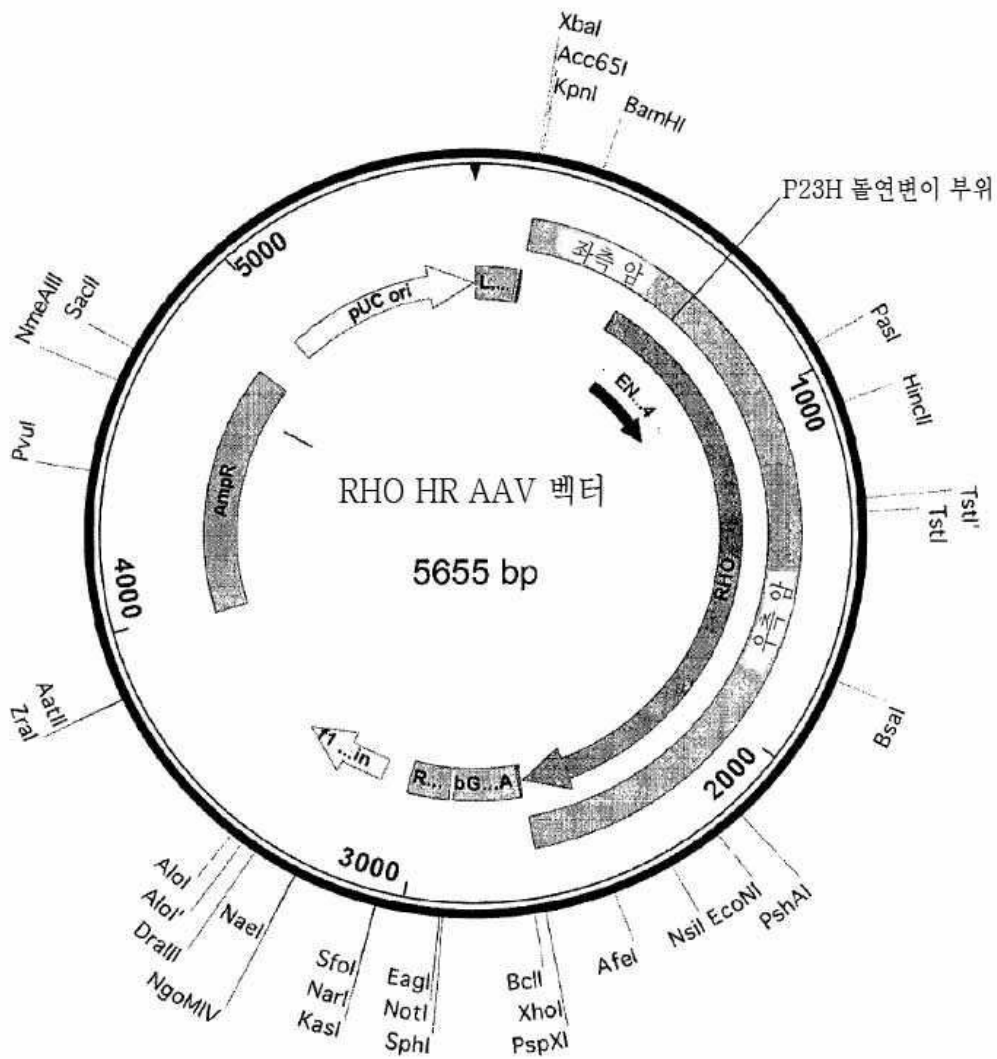


CMV: 사이토메갈로 바이러스 프로모터
CBH: CMV 베타-액틴 하이브리드 프로모터
RHO: 로돕신 프로모터

도면16

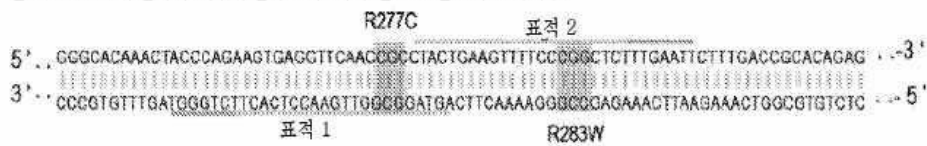


도면19



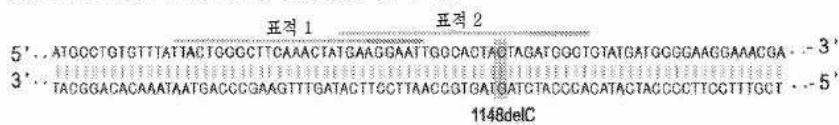
도면20a

인간 CNGA3 유전자좌(대립유전자는 두 개의 질병 돌연변이를 나타냄)

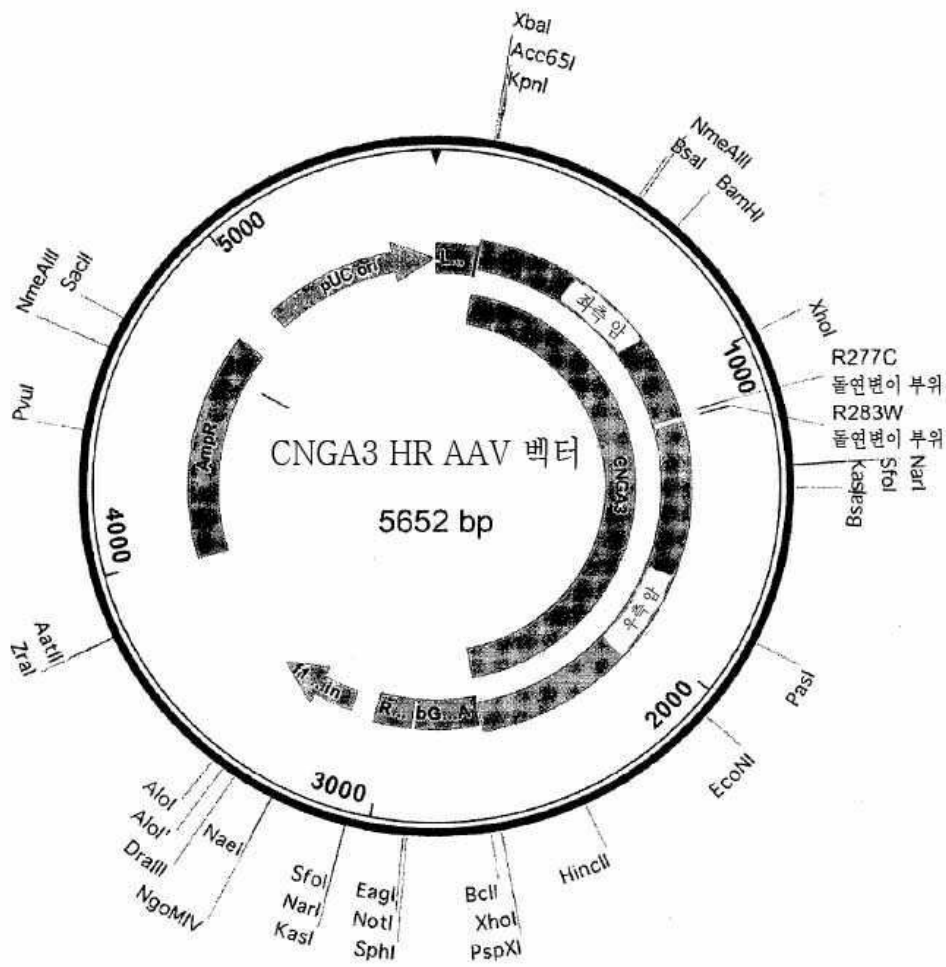


도면20b

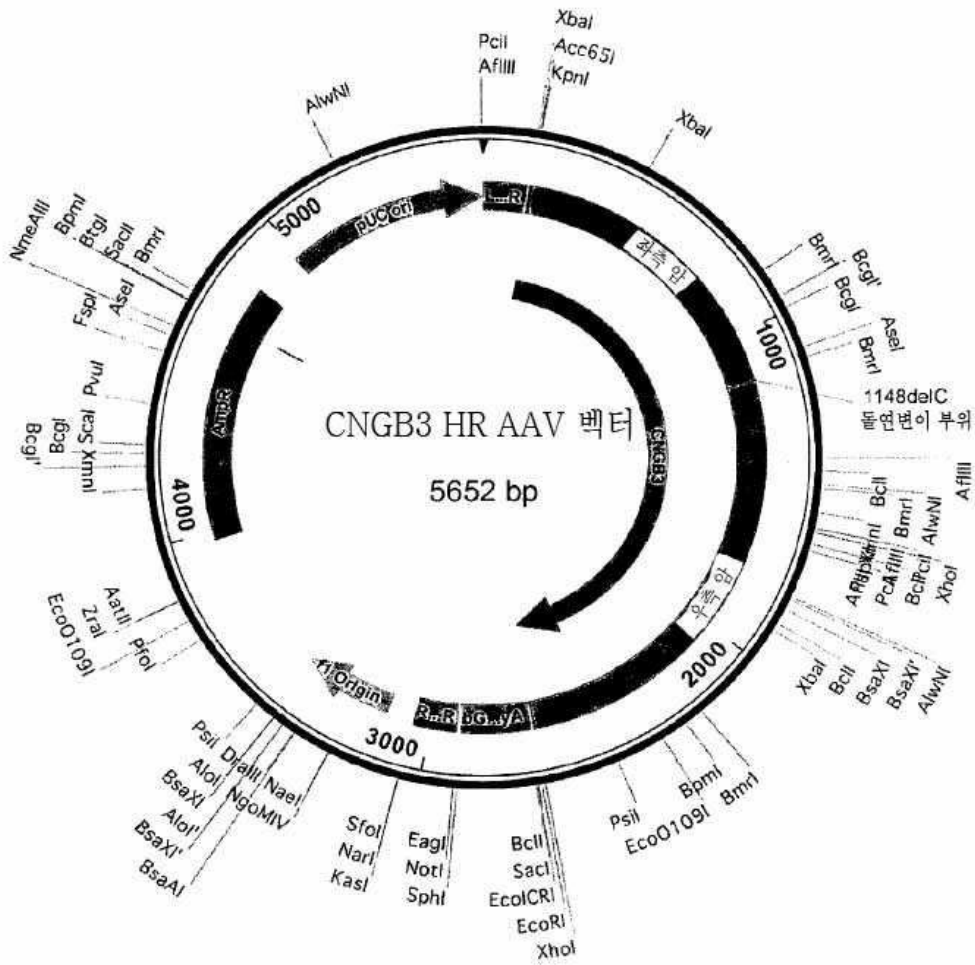
인간 CNGB3 유전자좌(대립유전자는 질병 돌연변이를 나타냄)



도면21



도면22



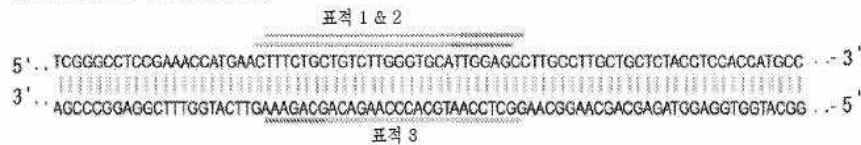
도면23a

인간 VEGFA 유전자좌 (일반 영역 1)

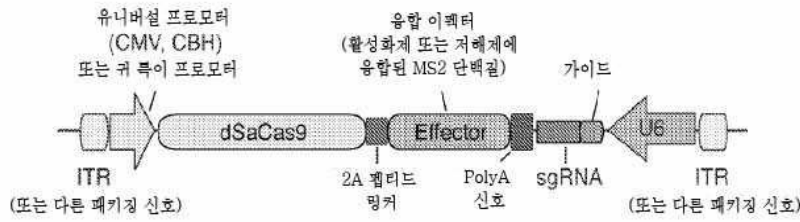


도면23b

인간 VEGFA 유전자좌 (일반 영역 2)

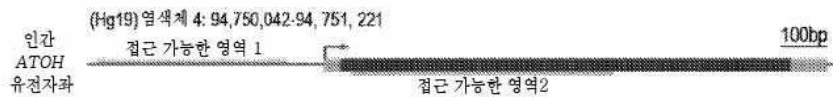


도면24



CMV: 사이토메갈로 바이러스 프로모터
 CBH: CMV 베타-액틴 하이브리드 프로모터

도면25a



도면25b

인간 ATOH1 유전자좌(고도로 접근 가능한 영역 1)

```

5' ..GCCTTC .. TTTCTGGGGTGAAAACTCTTTGATTGGCTGCTGCACGGCCTGCCCGCGCCCTCCATTGGCT ... 3'
3' ..CGGAAG ... AAAGAGCCCACATTTT GAGAACTAACCGACGAGCGTGC GCGGACGGGCGCGGGAGGTAACCGA ... 5'
    
```

표적 1

```

                    표적 2
5' .. GAGAAGACACGCCGACCGCGCGAGGAGGGGTTGGGAGAGGAGCGGGGGAGACTGAGTGGCGGT .. GCATAG ... 3'
3' .. CTCTTCTGTGCGCTGGCGCGCTCCTCCCAACCTCTCCTCGCCCGCTCTGACTCACCAGCA ... CGTATC ... 5'
    
```

도면25c

인간 ATOH1 유전자좌(고도로 접근 가능한 영역 2)

```

5' .. GGGCTG .. AGAGAGCATCCGCTACCCGCCCTGAGCTGTCCCTCCTGGACAGCACCGACCCAGCGCCTGGCTG ... 3'
3' .. CCGGAC .. TCTCTCGTAGGGCAGATGGCGGACTCCAGAGGAGGACCTGTCTGGCTGGGTGCGCGGACCGAC ... 5'
    
```

표적 1

```

                    표적 2
5' .. GCTCCC .. CGCGCCGCCAGTATTTGCTACATTCGCCGAGGTGGGTGCCTCAGAGGCCGCTGCG .. AACGCC ... 3'
3' .. CGAGGG .. GCGGGGGGTCATAAACGATGTAAGGGGCTCGACCCACGGAGTCTCGGGGACGC .. TTCCGG ... 5'
    
```

표적 3

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BROAD INSTITUTE INC.

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

<120> DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS

SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR GENOME EDITING

<130> 47627.99.2091
 <140> PCT/US2014/070127
 <141> 2014-12-12
 <150> 61/915,176
 <151> 2013-12-12
 <150> 61/915,192
 <151> 2013-12-12
 <150> 61/915,215
 <151> 2013-12-12
 <150> 61/915,107
 <151> 2013-12-12
 <150> 61/915,145
 <151> 2013-12-12
 <150> 61/915,148
 <151> 2013-12-12

 <150> 61/915,153
 <151> 2013-12-12
 <160> 195
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 1
 cctccgtgtc agcgacccat gccaa

 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

25

<400> 2

ccagcgtcga acagctccag cccg

24

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

agagggtgcc agcgggtata tgagg

25

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

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

<400> 4

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngg

23

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(12)
 <223> a, c, t or g
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 5

nnnnnnnnnn nnnngg

15

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

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

<400> 6

nnnnnnnnnn nnnnnnnnn ngg

23

<210> 7

<211> 14

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(11)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 7
 nnnnnnnnnn nngg 14
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t or g
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(22)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 8
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnagaaw 27
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base
 <222> (1)..(12)
 <223> a, c, t or g
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(14)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 9
 nnnnnnnnnn nnnnagaaw 19
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t or g
 <220><221> modified_base
 <222> (21)..(22)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 10
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnagaaw 27
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(11)
 <223> a, c, t or g
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(13)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 11
 nnnnnnnnnn nnnnagaaw 18
 <210> 12
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

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

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

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

<400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nggng

25

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(12)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

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

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

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

<400> 13

nnnnnnnnnn nnggng 17

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

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

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

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

<400> 14

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nggng 25

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(11)

<223> a, c, t or g

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

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

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

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

<400> 15

nnnnnnnnnn nnggng 16

<210> 16

<211> 137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

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

<400> 16

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttcagaa 60

gctacaaga taagcttca tgccgaaac aacacctgt cttttatgg cagggtgttt 120

tcgtattta atttttt 137

<210> 17

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

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

<400> 17

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaaat gcagaagcta caagataag 60

gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tatttaattt 120

ttt 123

<210> 18

<211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 18
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaaat gcagaagcta caaagataag 60
 gtttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttttt 110

<210> 19
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 19
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60
 cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt tt 102

<210> 20
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base

<222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 20
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaata aaggctagtc 60
 cgttatcaac ttgaaaaagt gttttttt 88
 <210> 21
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

 <400> 21
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaata aaggctagtc 60
 cgttatcatt tttttt 76
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ggtccgagc agaagaagaa 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 ggtcctagc aggagaagaa 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24

gagtctaagc agaagaagaa

20

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 25

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

 Nucleoplasmin bipartite NLS sequence"

<400> 26

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

 C-myc NLS sequence"

<400> 27

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

C-myc NLS sequence"

<400> 28

Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 29

Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro

 20 25 30

Arg Asn Gln Gly Gly Tyr

 35

<210> 30

<211> 42

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

IBB domain from importin-alpha sequence"

<400> 30

Arg Met Arg Ile Glx Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys

 20 25 30

Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val

 35 40

<210> 31

<211> 8

```

<212> PRT
<213> Unknown
<220><221> source
<223> /note="Description of Unknown:
        Myoma T protein sequence"
<400> 31
Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
1           5
<210> 32

<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown
<220><221> source
<223> /note="Description of Unknown:
        Myoma T protein sequence"
<400> 32
Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
1           5
<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu
1           5
<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 34
Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
1           5           10
<
210> 35

```

<211> 5

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 35

Asp Arg Leu Arg Arg

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 36

Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Hepatitis delta virus

<400> 37

Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg

1 5 10

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys

1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys

20

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys

1

5

10

15

Lys

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1

5

<210> 42

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 42

guuuuagagc ua

12

<210> 43

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 43
 cgcacgcgta attcgaacgc tgacgtcatc 30

<210> 44
 <211> 130
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <220><221> modified_base
 <222> (92)..(110)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 44
 cacacgcgta aaaaagcacc gactcgggtgc cactttttca agttgataac ggactagcct 60
 tattttaact tgctatttct agctctaaaa cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn cgggtgtttcg 120
 tcctttccac 130

<210> 45
 <211> 23
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 45
 tgccaatacg cccacgcgat ggg 23

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 46

gtgtctagac tgcagagggc cctg 24

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 47

gtgtcgtgcc tgagagcgca gtcgagaa 28

<210> 48

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 48

gagaagctta gctgaatggg gtccgcctc 29

<210> 49

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 49

ctcaccggtg cgcgcaaccg atgccgggac c 31

<210> 50

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 50
 gagaagcttg gcgaaatgat ttgctgcaga tg 32
 <210> 51
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 51
 ctcaccggtg cgcgctcgc ctccccctcc gc 32
 <210> 52
 <211> 134
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"
 <400> 52
 agcttcgcg cgaggagg ggggacgcag tggcgaggc ggagacagca cttcggaga 60
 taatccttc tctgccgca gagcagagga gcggcgggag aggaacactt ctcccaggct 120
 ttagcagagc cgga 134

<210> 53
 <211> 134
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"
 <400> 53
 ccggtccgc tctgctaaag cctgggagaa gtgttcctct cccgccgctc ctctgctctg 60

cggcaggaga aaggattatc tccgaagggtg ctgtctccgc tccgcccact gcgtccccc 120
tcttcccggc gcga 134
<210> 54
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"
<400> 54
aattcaataa aagatcttta ttttcattag atctgtgtgt tggttttttg tgtgc 55
<210> 55
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"
<400> 55
ggccgcacac aaaaaccaa cacacagatc taatgaaaat aaagatcttt tattg 55
<210> 56
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 56
ggagctggag ctgttcacgt tgg 23
<
210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 57
cgggcagcag atgttcgcgt agg 23
<210> 58

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 agggcttgag atgttcgggc tgg 23
 <210> 59
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 ccggctgggg ctgtcctcgc tag 23
 <210> 60
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 cggggtgcag ctgctcacgc cag 23
 <210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 ctggcgggag ctggtcgcgt gag 23
 <210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 tgagcatggg ccgctggcgg tgg 23
 <210> 63
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 63

atggcatagg ccgctgacag agg 23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

ttggcatggt gagctggcgg ggg 23

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

tgggcagggg tctctgaggg cag 23

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

ttggcatggg tctcttacca agg 23

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

acatggttcc agtgggtatg tag 23

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

ggaggtgggc agcgggtatg tag 23

<210> 69

<211> 23

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 agaaggtccc cgcgggcatg gag 23
 <210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 ggaggggaacc agccggtatg ggg 23
 <210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 agagagtggc agtgggtaag cag 23
 <210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 agaggtggcc agcgggcagg aag 23

 <210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 tgagggggcc agctgggatg cag 23
 <210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400> 74
 ggtctcatgt gtggcactca 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400> 75
 tgtccaacct tcaggcaagg 20
 <210> 76
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400> 76
 atccctctc agagggtcag c 21
 <210> 77
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400>
 > 77
 tacctcatgc acagctagca cc 22
 <210> 78
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 78
 ttccggcata gcatggtctt cc 22
 <210> 79
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 79
 gttctatttc agagggtga tccc 24
 <210> 80
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 80
 gttctgagcc gcacagtttg g 21
 <210> 81
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 81
 ggataagaag ggacaataca gg 22
 <210> 82

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 82

gccgggtct cgttcagac t

21

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 83

ctaccgctg cggacatggt

20

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 84

cctgtctctc tgcctaggg ctcc

24

<210> 85

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 85
 ccgtttgctg atgtagtagg ggtcc 25
 <210> 86
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 86
 cccacaggaa acaatgaagg gagac 25
 <210> 87
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 87
 catccttcgt gtctgaggac tggtc 25
 <210> 88
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 88
 ccctgacacc agctgttcag cac 23
 <210> 89
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 89

ctctgggtga ccacacacga tgc 23

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400>

> 90

gagcaggcag agccgagcaa g 21

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 91

ggagagcgtc cgccaggag 19

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 92

gggtcttggt gtgagtaggg tgtg 24

<210> 93

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 93
 gaagctctct taactactgt tc 22
 <210> 94
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 94
 cctggaatac tatttccacg ccg 23
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 95
 caggccctag cagcgagcag 20
 <210> 96
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 96

gcagcacact ccaccctcac at 22

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 97

ggaaggggct ttctccgag c 21

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 98

cggcgtcacg tgacctgagt aac 23

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 99

getccgacce tgetctccca 20

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 100
 gtgtctgcct cgctctgctg c 21
 <210> 101
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 101
 cctgttcac aggctcgtag ccc 23
 <210> 102
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 102
 ctatctgaaa tccaccacct tagacgc 27
 <210> 103
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 103
 cgattgctgg cttgccttga g 21
 <210> 104
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 104
 gcctgagggg gccagaggt 19
 <210> 105
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 105
 ggttcgctc cgcccgtg at 22

<210> 106
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 106
 gggactcccc ggtggtg 18
 <210> 107
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 107
 gagagtggt cctgtcct atg 23

<210> 108
 <211>
 > 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 108
 gaccctgtgt ttcaagtctc tctg 24
 <210> 109
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 109
 cccagcaggt cacagctgac atc 23
 <210> 110
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 110
 ggccatccag tacattcaat acg 23
 <210> 111
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 111
 agcacagtat gtattctata aaataatacg ac 32

<210> 112
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 112
 gcagaagccg tgactcacag ca 22

<210> 113
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 113
 gtgggagggg acagagacca tg 22

<210> 114
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 114
 cttgtgcttg tgattctgtc cttactgc 28

<210> 115
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 115
 ccttacctgt tcctcttct taccagc 28
 <210> 116
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 116
 cgagaagtcg atgcagacac ttcaa 25
 <210> 117
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 117
 ataccagtc cacatccctg cc 22
 <210> 118
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 118
 gctgaagact ggcgagcaca gct 23

<210> 119
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 119
 cctctgcatc tcctcagga agtatt 26
 <210> 120
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 120
 gacctgaatg ttgtggctga gagtcc 26

 <210> 121
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 121
 gcctcctgtc cccaggtccc 20
 <210> 122
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 122
ccctcacgtt cctgtccagc aa 22

<210> 123

<211

> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 123
cactaggctt gggctgcct ct 22

<210> 124

<211> 2503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 124
accagaaagt ctctagetgt ccagaggaca tagcacagag gcccattggtc cctatttcaa 60
accaggcca ccagactgag ctgggacctt gggacagaca agtcatgcag aagttagggg 120

accttctcct ccttttctt ggatcctgag tacctctcct cctgacctc aggettctc 180
ctagtgtcac ctiggccct cttagaagcc aattaggccc tcagtttctg cagcgggat 240
taatatgatt atgaacacc ccaatctcc agatgctgat tcagccagga gcttaggagg 300
gggaggtcac ttataagg tctgggggg tcagaacca gagtcatca gctggagccc 360
tgagtggctg agctcaggcc ttcgcagcat tcttgggtgg gagcagccac gggtcagcca 420
caaggccac agccatgaat ggcacagaag gcctaactt ctactgccc ttctccaatg 480
cgacgggtgt ggtacgcagc cccttcgagt acccacagta ctacctggt gagccatggc 540

agttctccat gctggccgcc tacatgtttc tgctgatcgt gctgggcttc cccatcaact 600
tcctcacgct ctactcacc gtccagcaca agaagctgag cacgcctctc aactacatcc 660
tgctcaacct agcgtggct gacctttca tggctcctagg tggcttacc agcacctct 720
acacctctct gcatggatac ttcgtcttcg ggcccacagg atgcaatttg gagggcttct 780

ttgccaccct gggcgggatg agccgggtgt ggggtgggtg tgcaggagcc cgggagcatg 840
 gaggggtctg ggagagtccc gggcttggcg gtggtggctg agaggccttc tccttctcc 900
 tgtcctgtca atgttatcca aagccctcat atattcagtc aacaaacacc attcatggtg 960

 atagccgggc tgctgtttgt gcagggtg cactgaacac tgccttgatc ttatttggag 1020
 caatatgcgc ttgtctaatt tcacagcaag aaaactgagc tgaggctcaa agaagtcaag 1080
 cgccctgctg gggcgtcaca cagggacggg tgcagagtig agttggaagc cgcactctat 1140
 ctcgggccat gtttgcagca ccaagcctct gtttcccttg gagcagctgt gctgagtcag 1200
 acccaggtg ggcactgagg gagagctggg caagccagac cctcctctc tgggggcca 1260
 agctcaggtt ggaagtga ttttcattc tccagtcatt gggcttccc tgtgctgggc 1320
 aatgggctcg gtccccctg gcatcctctg cctcccctc cagcccctgt cctcaggtgc 1380

 cctccagcc tcctgccc gttccaagtc tcttgggtt gagaaccgca agcagccgct 1440
 ctgaagcagt tccttttgc tttagaataa tgccttgcatt ttaacaggaa aacagatggg 1500
 gtgctgcagg gataacagat cccactaac agagaggaaa actgaggcag ggagagggga 1560
 agagactcat ttaggatgt gggcaggcag caacaagagc ctaggctctcc tggctgtgat 1620
 ccaggaatat ctctgctgag atgcaggagg agacgctaga agcagccatt gcaaagctgg 1680
 gtgacgggga gagcttaccg ccagccacaa gcgtctctct gccagccttg cctgtctcc 1740
 cccatgtcca ggctgtgcc tcggtcceat tctcagggaa tctctggcca ttgttgggtg 1800

 tttgttgcatt tcaataatca cagatcactc agttctggcc agaaggtggg tgtgccactt 1860
 acgggtgggt gttctctgca gggtcagtcc cagtttaca atattgtccc tttcactgtt 1920
 aggaatgtcc cagtttgggt gattaactat atggccactc tccctatgga acttcatggg 1980
 gtggtgagca ggacagatgt ctgaattcca tcatttcctt cttcttctc tgggcaaaac 2040
 attgcacatt gcttcatggc tcttaggaga ggccccaca tgtccgggtt atttcatttc 2100
 ccgagaaggg agagggagga aggactgcca attctgggtt tccaccact ctgactcct 2160
 tcccaacaag gaactctgcc ccacattagg atgcattctt ctgctaaaca cacacacaca 2220

 cacacacaca cacaacacac acacacacac acacacacac acacacacaa aactccctac 2280
 cgggttccca gttcaatcct gaccacctga tctgattcgt gtccttatg ggcccagagc 2340
 gctaagcaaa taacttcccc cattccctgg aatttctttg cccagctctc ctgagcgtgt 2400
 ggtccctctg cccttcccc ctctcccag caccaagctc tctcttccc caaggcctcc 2460
 tcaaatccct ctcccactcc tggttgcctt cctagctacc etc 2503

<210> 125

<211> 2500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 125

```

ctgctgcctg ctctgtcccc ttaagtatt gacatcctca aaacctctt tggaaaaagc      60
acaggccaca gatcttactg tgacttgtgt ttctttctcc taggtgtacc ttcaaccttg      120
ataaaaaata acctctaat caattgagat ctgcctccgt cacitTTTTT tttcaaaga      180
ctcagagtct cactctgttg cccaggctgg agtgtagtgg tgcgatcttg gctcattgca      240
ccctccacct cctgggttca agtggttctc gtgcctcagc ttctgagta gctgggatta      300
caggggtgca ccaccacatc tggctaattt ttgtatTTTT agtagagaca gggtttcacc      360
atggtgccca ggctggcttc aaaccttga cctcaggtga tccaccgcc tcggcctctc      420

aaagtactgg gattataggc atgagccacg gcacccggcc ctctgtcact ttttgattta      480
caacatgtat ctctaatttt aaaggatcct tttttaaata atgtatataa tttcattta      540
tcttttaaaa ttaataatc attctttgtt atcatgtaat acccaattta tatttaaatt      600
tactcaatca acctatgitt taaaaaaatt caatagaata gattagaacc tcatagaata      660
gaaaatatca gagtgcattt cctgtagtaa tggtaagtgt tgtttttgaa atcatttcta      720
ttatatatgt atcactgcat actgtgtagc cgtgaggtaa aatatgttc tttgtactat      780
ggtcaaaaaa agtcagcctc tgtgatgcc aatgacctcc atcttcttct ttaggttttc      840

tcgagcaagg cttaatggtc agtgatacca acaggctgtg gcagcattac aagacgacca      900
cgcagttcaa gctggatgtg ttgtccctgg tccccaccga cctggcttac ttaaagggtg      960
gcacaaacta ccagaagtg aggttcaacc gcctactgaa gttttccgg ctctttgaat      1020
tctttgaccg cacagagaca aggaccaact accccaatat gttcaggatt gggaacttgg      1080
tctttgacat tctcatcacc atccactgga atgcctgcat ctactttgcc atttccaagt      1140
tcattggttt tgggacagac tcttgggtct acccaaacat ctcaatcca gagcatgggc      1200
gcctctccag gaagtacatt tacagtctct actggtccac cttgacctt accaccattg      1260

gtgagacccc accccccgtg aaagatgagg agtatctctt tgtggtcgta gacttcttgg      1320
tgggtgttct gatTTTTGCC accattgtgg gcaatgtggg ctccatgatc tcgaatatga      1380
atgcctcacg ggcagagttc caggccaaga ttgattccat caagcagtac atgcagttcc      1440
gcaaggtcac caaggacttg gagacgcggg ttatccgtg gtttgactac ctgtgggcca      1500

```

acaagaagac ggtggatgag aaggaggtgc tcaagacct cccagacaag ctgaaggctg 1560
 agatcgccat caacgtgcac ctggacacgc tgaagaaggt tcgcatcttc caggactgtg 1620
 aggcagggct gctggtggag ctggtgctga agctgcgacc cactgtgttc agccctgggg 1680

attatatctg caagaaggga gatattggga aggagatgta catcatcaac gagggcaagc 1740
 tggccgtggt ggctgatgat ggggtcacc agttcgtggt cctcagcgat ggcagctact 1800
 tcggggagat cagcattctg aacatcaagg ggagcaagtc ggggaaccgc aggacggcca 1860
 acatccgcag cattggctac tcagacctgt tctgcctctc aaaggacgat ctcatggagg 1920
 ccctcaccga gtaccccgaa gccaaagaagg ccttgaggga gaaaggacgg cagatctga 1980
 tgaaagaca cctgatcgat gaggagctgg ccagggcggg cgcgacccc aaggaccttg 2040
 aggagaaagt ggagcagctg gggctctccc tggacacct gcagaccagg tttgcacgcc 2100

tcttgctga gtacaacgcc acccagatga agatgaagca gcgtctcagc caactggaaa 2160
 gccaggtgaa ggttggggg gacaagcccc tggctgatgg ggaagttccc ggggatgcta 2220
 caaaaacaga ggacaaaca cagtgaaaat gcagcatctg tctctgctt cacagggtcg 2280
 actgtcaggg tgaccgtatg tggccgcagc tgtgtggcat ggaacttggc cagggttgaa 2340
 ttccagctct actcaccctt tgaaagctgt gtgactgcct gagagaacct gtttcttcac 2400
 ctaaaaaatg ggactttttg tctcagtcce agtgaagtgc caggtttgat tgtgaagtec 2460
 gcatgaaaca ctgcaccagg cagggtttg caaagtgcaa 2500

<210> 126

<211> 2500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 126

actttgaggc aattttactg tagctggtat tttagtcaat ttttagataa attagtgtt 60
 tatatcaaag taaataattc acattctaaa gggaattatt tatttagtaa attttctgga 120
 aattgagtgt ctgtgtgtgt gtgtttccca atcagtggtc cttctgactt taaattcttt 180
 aaaatcggtt ctggttgta taatccctta tacatatcca actcactcta ggtagtatgt 240
 aattttgtaa gttattttcc ctctctttgc tctatctat aattgctctc catccaagg 300

ctgcagtgag ttgcccttca aagtaatgct gggacctgct tttttccag tttggacatt 360

gccttattat atgttcaatg tcatttcact ggagcagaaa gttagtgaag tcaactttat 420
gccaggtcct tgtattttac caaaaggaaa tttcactatt aaataacca gttgccattt 480
ctgagtcctg attctactgt tctaaatfff tcaagtgate tttttttatt tctgggacac 540
ttgcatacct aattgtcaag ttttaatttt gatcctcgtt actctctaag tgtttaattg 600
agtttagtgg tatagctgac tcataaaccc ataaaaccct tcactggtaa actaattagc 660
cactgcacct gccctttaaa taattaacat tgttcattac taacaatcgg catcggagtt 720

atataaagtt accttactgc tcagttgtct agaggctttc aaactttttt gatcatgatc 780
cagagtaaaa aatgcatttc acaggccaac tcaggataca cacacacaca cacacactcc 840
cctactatct atcagactct gatattttct attctattat tctctatctt ctttcattta 900
aaaatgtatt gacttactaa agaggttttt cagcttaaaa atttttattt agaccaattc 960
atggggact catgcaattt tgttacatgt atacaatgca tagtgatcaa gtcagggtgt 1020
ttaggtgtt tattactcga gtacaataca tgttttgaaa ctatagtcac cctactctgt 1080
tgcaaactgt gaatatattc ttactgatg tttgtatcct ttaatccact tttctttatg 1140

cgctctctc cccaccactc acccttccca gtctctgtta tctttccact ctctgtctct 1200
atgtgatcaa aatttttagc tcccacatat atgtgagaac gtgtgatatt tatcgttttg 1260
ggtctggctt atttcactaa gataatgacc ttcagtccca tccatttttg tgcaaatgac 1320
atgattttat cttttttat ggccaaatag catttaccag ccattgaaat ggttatgaca 1380
gcttcaaaaa cactggctct cataaattca tacaatgaaa cagaatgtta aaaataatca 1440
ataaaggttt ctttcaaaat cagaacttac tcgtttcctt ccccatcata cacccatcta 1500
gtagtccaa ttctttcata gtttgaagcc cagtaataaa cacaggcatt aatgtgcaga 1560

ataaacagca agtatccagt tgttcgaata actctgtcag agagaataga tgcaaagtaa 1620
gattcatgtt gtttctgaaa tacagcctat ttaacattt tcttttcctt aaagtcacca 1680
gcgaaccctt tgctttggat ttgtgaactg ttaactctca ttagtacagt acaaagtgat 1740
ggtgccattg catgttttct gatggcaatg tcttgactgg gattgacaga gtgtaaagaa 1800
aaaaaaaaaga aaaagaaaac ttctctctt ttcacagatg ttgtgagtca actccgtgaa 1860
agacatgcct caaaggcac ttcttcagt taagtccat aaaatacact atgctaattt 1920
aactggatat ctctgaaaag ctcatgagac tttatgctac gatgaatggc aactagaggt 1980

ttcggtgcaa gtaaaattta gaacaacaaa cgaatgaaat tcagattagg aatgaattat 2040
catgagaaaag gtttaaagtt aacttgcaaa agagtatgtt tttctgtact tgttttgaca 2100
gaggcagata ataagtccata ttttcttagt ccagtattct aaaatctgat atgattttca 2160
tactcttatt tcaacttaaaa tatccacatc tgttctagaa catagtccta tattttatat 2220

agccaaagct gaaattatat cctttttttg aagagggggg tcatatccct gccaaattcc 2280
 gtctaaaatg ttgtaccatt gctttttccc cttcccccaa gtatactgag ttatacttta 2340
 cctgtagata tatgctttgt ccattataga ctctaggtga tgattaaatt caaaaaatga 2400

agtgtactat atagaaaagc aaaagaaatc caaaagcatg ttagtcttaa atatatatat 2460
 ttaaataaaa ctatatgaaa tagattttat tactgaaaaat 2500

<210> 127
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 127

ccaccattct gcagagccag cagaggcagg 30

<210> 128
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 128

ccaauucugca gagccagcag 20

<210> 129
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 129

ccattctgca gagccagcag agg 23

<210> 130
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 130

ccattctgca gagccagagg cagg 24

<210> 131

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 131
 ccattctgca gagcccagag g 21
 <210> 132
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 132
 ccattctgca gagccagaga gg 22

 <210> 133
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 133
 ccattctgca gagcagagg 19
 <210> 134
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 134
 ccattctgca gagccccaga gg 22
 <210> 135
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 135
 ccattctgca gagccaggag gcagg 25
 <210> 136
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220><221> modified_base

<222> (18)..(61)

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

<400> 136

ccattctgca gagccagnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

ncagagg 67

<210> 137

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> modified_base

<222> (18)..(52)

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

<400> 137

ccattctgca gagccagnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnagg 55

<210> 138

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 138

ccattctgca gagccagaag agg 23

<210> 139

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

ccattctgca gagccagcac agagg 25

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 140

ccattctgca gagccacaga gg 22

<210> 141
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 141
 ccattctgca gagccagtca gagg 24
 <
 210> 142
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 142
 uuggcauggu gcugacgg 18
 <210> 143
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 143
 ccagcctccg tcagcgacc atgccaagac 30
 <210> 144
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 144
 cgggcuggag cuguucgcg 20
 <210> 145
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 145
 gatgccagcg cgaacagctc cagccccgagt 30
 <210> 146
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 146
 agaagagggt gcccagcgggt atgaggagtg 30
 <210> 147
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide"
 <400> 147
 agagggugcc agcggguaug 20
 <210> 148
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 148
 ctgggagagg gagcccctcc agg 23
 <210> 149
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 149
 aaagtgggga gacacctctt tgg 23
 <210> 150
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 150
 tccaaccttc aggcaagggtg ggg 23

<210> 151
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 151
 aggaagtctg gccgatctgc tgg 23

<210> 152
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 152
 ctctgaggcc ctggagatcc tgg 23

<210> 153
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 153
 ttggcatggg tcgctgacgg agg 23

<210> 154
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 154
 cgggctggag ctgttcgcgc tgg 23

<210> 155
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 155
 agagggtgcc agcgggtatg agg 23

<210> 156

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 156
 cctccgtcag cgacccatgc caa 23
 <210> 157
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 157
 cctccgatca gcgacccatg ccaa 24
 <210> 158
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 158
 cctccgtgtc agcgacccat gccaa 25
 <210> 159
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 159
cctccgttca gcgacccatg ccaa 24
<210> 160
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 160
cctccgctca gcgacccatg ccaa 24
<210> 161
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 161
cctcctcagc gacccatgcc aa 22
<210> 162
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 162
cctccgcagc gacccatgcc aa 22
<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 163
 cctctcagcg acccatgcca a 21
 <210> 164
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 164
 cctccgcgac ccatgccaa 19
 <210> 165
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 165
 cctcagcgac ccatgccaa 19
 <210> 166
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 166
 ctcagcgacc catgccaa 18
 <210> 167
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 167
 ccagcgcgaa cagctccagc ccg 23
 <210> 168
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 168
 ccagcgccga acagctccag cccg 24
 <210> 169
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 169
 ccagcgtcga acagctccag cccg 24
 <210> 170
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 170

ccagcgaaca gctccagccc g 21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 171

ccagcggaca gctccagccc g 21

<210> 172

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 172

ccagaacagc tccagcccg 19

<210> 173

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 173

ccagcgagct ccagcccg 18

<210> 174

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 174
ccagcgcacg gctccagccc g 21
<210> 175
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 175
ccagcgctcc agccccg 16
<210> 176
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 176
agagggtgcc agcgggttat gagg 24
<210> 177
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 177
agagggtgcc agcgggtata tgagg 25
<210> 178
<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 178
 agagggtgcc agcgggtaat gagg 24
 <210> 179
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(36)
 <223> a, c, t, g, unknown or other
 <400> 179
 agagggtgcc agcgggtnnn nnnnnnnnnn nnnnnn 36
 <210> 180
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 180
 agagggtgcc agtatgagg 19
 <210> 181
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 181
agagggtgcc agcgggtgag g 21
<210> 182
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 182
agagggtgcc agcgagg 17
<210> 183
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 183
agagggtgcc agcggggagg 20
<210> 184
<211> 79
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 184
ctacgtgcc ttctccaatg cgacgggtgt ggtacgcagc cccttcgagt acccacagta 60
ctacctggct gagccatgg 79
<210> 185
<211> 79
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 185

gggcacaaac tacccagaag tgaggttcaa cgcctactg aagttttccc ggctctttga 60

attctttgac cgcacagag 79

<210> 186

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 186

atgcctgtgt ttattactgg gcttcaaact atgaaggaat tggcactact agatgggtgt 60

atgatgggga aggaaacga 79

<210> 187

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 187

cggcgagccg cgggcagggg ccggagcccg cgcccggagg cggggtggag ggggtcgggg 60

ctcgcggcgt cgactgaa 79

<210> 188

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 188

tgggectcc gaaacctga actttctgct gtcttgggtg cattggagcc ttgccttct 60

gctctacctc caccatgcc 79

<210> 189

<211> 64

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 189

tttctggggt gtaaaaactc tttgattggc tgctgcacgc gcctgcccgc gcctccatt 60

ggct 64

<210> 190

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 190
 gagaagacac gcgaccggcg cgaggagggg gttgggagag gagcgggggg agactgagtg 60

 gcgcgt 66
 <210> 191
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 191
 agagagcatc ccgtctaccc gcctgagctg tcctcctgg acagcaccga cccacgcgcc 60
 tggctg 66
 <210> 192
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 192
 cgcgcgcgcc agtatttgc acattccccg gagctgggtg cctcagagc cgctgcg 57
 <210> 193
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 193
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 120
 <210> 194
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

