

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0122182  
(43) 공개일자 2023년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/90 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/902 (2013.01)  
C12N 15/113 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7027175(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년07월08일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2022-7004950  
원출원일자(국제) 2014년07월08일  
심사청구일자 2022년03월16일
- (85) 번역문제출일자 2023년08월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/045691
- (87) 국제공개번호 WO 2015/006290  
국제공개일자 2015년01월15일
- (30) 우선권주장  
61/844,168 2013년07월09일 미국(US)
- (71) 출원인  
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지  
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠프리지, 퀸시스트리트17
- (72) 발명자  
처치, 죠지, 엠.  
미국 02446 매사추세츠주 브루클린 켄트 스트리트 218  
디카를로, 제임스  
미국 02215 매사추세츠주 보스턴 퀸즈베리 스트리트 15
- (74) 대리인  
양영준, 김영

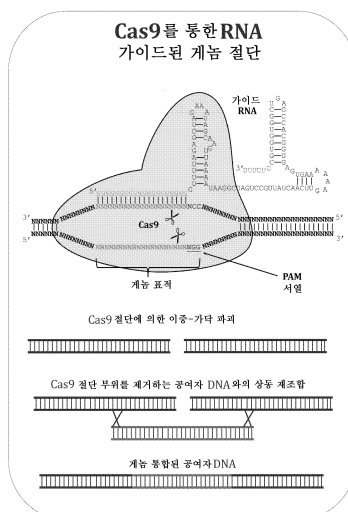
전체 청구항 수 : 총 26 항

## (54) 발명의 명칭 멀티플렉스 RNA-가이드된 게놈 조작

## (57) 요약

표적 DNA에 상보적이며 효소를 표적 DNA로 가이드하는 1개 이상의 RNA를 코딩하는 제1 외래 핵산을 세포 내로 도입하고 (여기서 1개 이상의 RNA 및 효소는 표적 DNA에 대한 공동-국제화 복합체의 구성원임), 1개 이상의 공여자 핵산 서열을 코딩하는 제2 외래 핵산을 세포 내로 도입하는 단계를 순환시키는 것을 포함하고, 여기서 순환은 세포에서의 멀티플렉스 DNA 조작을 위해 바람직한 횟수로 반복되는 것인, Cas9를 사용한 세포 내의 멀티플렉스 게놈 조작 방법이 제공된다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 9/22** (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

표적 DNA에 상보적인 가이드 RNA와 공동-국제화 복합체를 형성하고 표적 DNA를 부위 특이적 방식으로 절단하는, 유형 II CRISPR 시스템의 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질인 효소를 발현하는 단리된 세포에서 표적 DNA 내에 다중 공여자 핵산 서열 삽입을 만드는 방법이며,

(a) 표적 DNA의 서로 다른 부위에 상보적인 복수의 가이드 RNA를 코딩하는 제1 외래 핵산을 세포 내로 도입하고, 여기서 복수의 가이드 RNA의 각각이 tracrRNA-crRNA 융합체이며(여기서 복수의 가이드 RNA의 각각 및 효소는 표적 DNA에 대한 공동-국제화 복합체의 구성원임),

복수의 공여자 핵산 서열을 세포 내로 도입하는 단계

(여기서 복수의 가이드 RNA 중 적어도 하나 및 효소가 표적 DNA의 부위에 공동-국제화되고, 효소가 표적 DNA를 절단하고, 복수의 공여자 핵산 서열 중 하나가 절단 부위에서 표적 DNA에 삽입되어 세포 내에 변경된 DNA를 생성함), 및

(b) 단계 (a)를 반복하여 세포 내의 DNA 내에 다중 공여자 핵산 서열 삽입을 생성하는 것

을 포함하고,

상기 단리된 세포가 진핵 세포인 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (a)가 다수회 반복되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 효소가 Cas9인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 단리된 세포가 효모 세포, 식물 세포 또는 동물 세포인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 10개 내지 500개의 뉴클레오티드인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 20개 내지 100개의 뉴클레오티드인 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, DNA가 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 바이러스 DNA 또는 외인성 DNA인 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 공여자 핵산 서열이 재조합에 의해 삽입되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 공여자 핵산 서열이 상동 재조합에 의해 삽입되는 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 복수의 가이드 RNA 및 복수의 공여자 핵산 서열이 1개 이상의 플라스미드 상에 존재하는 것인

방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 단리된 세포가 상기 효소를 구성적으로 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 복수의 공여자 핵산 서열의 각각이 절단 부위를 플랭킹하는 상동성 아암을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 복수의 공여자 핵산의 각각이 절단 부위를 제거하는 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 14

표적 DNA에 상보적인 가이드 RNA와 공동-국제화 복합체를 형성하고 표적 DNA를 부위 특이적 방식으로 절단하는, 유형 II CRISPR 시스템의 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질을 발현하는 단리된 세포이며, 상기 단리된 세포는

(a) 세포 내의 DNA의 상이한 부위에 상보적인 복수의 가이드 RNA, 및

(b) 복수의 외인성 공여자 핵산 서열

을 포함하는 것인, 단리된 세포.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 세포 내의 DNA로 다중 외인성 공여자 핵산 서열 삽입을 포함하는 것인 단리된 세포.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 유형 II CRISPR 시스템의 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질이 Cas9인 단리된 세포.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 진핵 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 18

제14항에 있어서, 효모 세포, 식물 세포 또는 동물 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 19

제14항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 10개 내지 500개의 뉴클레오티드인 단리된 세포.

#### 청구항 20

제14항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 20개 내지 100개의 뉴클레오티드인 단리된 세포.

#### 청구항 21

제14항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 tracrRNA-crRNA 융합체인 단리된 세포.

#### 청구항 22

제14항에 있어서, DNA가 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 바이러스 DNA 또는 외인성 DNA인 단리된 세포.

#### 청구항 23

제14항에 있어서, 복수의 가이드 RNA의 각각이 플라스미드 상에 존재하는 것인 단리된 세포.

#### 청구항 24

제14항에 있어서, 복수의 가이드 RNA 및 외인성 공여자 핵산 서열 각각이 플라스미드 상에 존재하는 것인 단리

된 세포.

## 청구항 25

제14항에 있어서, 외인성 공여자 핵산 서열이 절단 부위를 플랭킹하는 상동성 서열 또는 아암을 포함하는 것인 단리된 세포.

## 청구항 26

제14항에 있어서, 외인성 공여자 핵산 서열이 절단 부위를 제거하는 서열을 포함하는 것인 단리된 세포.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원 데이터

[0002] 본원은 2013년 7월 9일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/844,168을 우선권 주장하며, 이로써 상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 정부 권리의 진술

[0004] 본 발명은 미국 에너지국으로부터의 DE-FG02-02ER63445, 국립 과학 재단으로부터의 NSF-SynBERC 및 국립 과학 재단으로부터의 SA5283-11210 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

### 배경 기술

[0005] 박테리아성 및 고세균성 CRISPR-Cas 시스템은 침입 외래 핵산 내에 존재하는 상보적 서열의 분해를 지시하는 Cas 단백질과 복합체화된 짧은 가이드 RNA에 의존한다. 문헌 [Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607 (2011); Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2579-2586 (2012); Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012); Sapranaukas, R. et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 39, 9275-9282 (2011); 및 Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* 45, 273-297 (2011)]을 참조한다. 최근, 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) 유형 II CRISPR 시스템을 시험관내에서 재구성한 결과, 정상적으로 트랜스-코딩된 tracrRNA ("트랜스-활성화 CRISPR RNA")와 융합된 crRNA ("CRISPR RNA")가, crRNA와 매칭되는 표적 DNA 서열을 서열-특이적으로 절단하도록 Cas9 단백질을 지시하는데 충분한 것으로 입증되었다. 표적 부위에 상동성인 gRNA의 발현은 Cas9 동원 및 표적 DNA의 분해를 유도한다. 문헌 [H. Deveau et al., Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 190, 1390 (Feb, 2008)]을 참조한다.

### 발명의 내용

[0006] 본 개시내용의 측면은 세포에 의해 발현되는 뉴클레아제 활성을 갖는 효소, 예컨대 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 결합 단백질을 DNA (데옥시리보핵산) 상의 표적 위치로 유도하는 1개 이상의 가이드 RNA (리보핵산)를 사용한 세포 내의 DNA의 멀티플렉스 변형 (여기서 효소가 DNA를 컷팅하고, 외인성 공여자 핵산이 예컨대 상동 재조합에 의해 DNA 내로 삽입됨)에 관한 것이다. 본 개시내용의 측면은 세포 내의 DNA의 다중 변형을 갖는 세포를 생성하기 위해 세포 상에서의 DNA 변형을 순환시키거나 반복하는 단계를 포함한다. 변형은 외인성 공여자 핵산의 삽입을 포함할 수 있다.

[0007] 다중 외인성 핵산 삽입은, 복수의 RNA 및 복수의 외인성 공여자 핵산을 코딩하는 핵산을, 예컨대 공동-형질전환에 의해, 효소를 발현하는 세포 내로 도입하는 단일 단계 (여기서 RNA가 발현되고, 복수개의 것 중 각각의 RNA가 효소를 DNA의 특정한 부위로 가이드하고, 효소가 DNA를 컷팅하고, 복수의 외인성 핵산 중 1개가 컷팅 부위에서 DNA에 삽입됨)에 의해 달성될 수 있다. 이러한 측면에 따르면, 세포 내의 DNA의 수많은 변경 또는 변형은 1

회 순환으로 생성된다.

- [0008] 다중 외인성 핵산 삽입은, 1개 이상의 RNA 또는 복수의 RNA 및 1개 이상의 외인성 핵산 또는 복수의 외인성 핵산을 코딩하는 1개 이상의 핵산을 효소를 발현하는 세포 내로 도입하는 단계를 반복하거나 순환시키는 것 (여기서 RNA가 발현되어, 효소를 DNA의 특정한 부위로 가이드하고, 효소가 DNA를 컷팅하고, 외인성 핵산이 컷팅 부위에서 DNA에 삽입됨)에 의해 세포 내에서 달성될 수 있으며, 이에 따라 세포 내의 DNA로의 외인성 DNA의 다중 변경 또는 삽입을 갖는 세포가 생성된다. 한 측면에 따르면, 효소를 발현하는 세포는 효소를 자연적으로 발현하는 세포, 또는 예컨대 세포에 의해 발현될 수 있는 효소를 코딩하는 핵산을 세포 내로 도입함으로써, 효소를 발현하도록 유전자 변경된 세포일 수 있다. 이러한 방식에서, 본 개시내용의 측면은 RNA를 효소를 발현하는 세포 내로 도입하고, 외인성 공여자 핵산을 세포 내로 도입하고, RNA를 발현시키고, RNA, 효소 및 DNA의 공동-국재화 복합체를 형성하고, DNA를 효소에 의해 효소적 컷팅하고, 공여자 핵산을 DNA 내로 삽입하는 단계들을 순환시키는 것을 포함한다. 상기 단계들의 순환 또는 반복은 다중 유전자좌에서의 세포의 멀티플렉스화 유전자 변형, 즉 다중 유전자 변형을 갖는 세포를 생성한다.
- [0009] 특정 측면에 따르면, 상기 기재된 순환 방법에 의해 상동 재조합의 비율을 증가시키는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 계놈 Cas9 유도된 DNA 컷팅은 상동 재조합의 비율을 현저하게 증가시켜 외인성 DNA를 자극한다. 특정의 추가의 측면에 따르면, 외인성 공여자 핵산은 컷팅된 부위를 플랭킹하는 상동성 서열 또는 아암을 포함한다. 특정의 추가의 측면에 따르면, 외인성 공여자 핵산은 컷팅된 서열을 제거하는 서열을 포함한다. 특정의 추가의 측면에 따르면, 외인성 공여자 핵산은 컷팅된 부위를 플랭킹하는 상동성 서열 또는 아암 및 컷팅된 부위를 제거하는 서열을 포함한다. 이러한 방식에서, Cas9는 외인성 공여자 DNA가 혼입되지 않은 세포에 대한 음성 선택으로서 사용될 수 있다. 따라서, 높은 재조합 빈도를 갖는 세포를 확인하기 위한 음성 선택 방법이 제공된다.
- [0010] 특정 측면에 따르면, 본 개시내용의 범위 내의 DNA 결합 단백질 또는 효소는 가이드 RNA와 복합체를 형성하는데, 이 가이드 RNA가 상기 복합체를 이중 가닥 DNA 서열로 가이드하고, 이러한 복합체가 DNA 서열에 결합한다. 한 측면에 따르면, 효소는 DNA에 결합하여 RNA에 의해 가이드되는 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질, 예컨대 유형 II CRISPR 시스템의 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질일 수 있다. 한 측면에 따르면, RNA 가이드된 DNA 결합 단백질은 Cas9 단백질이다.
- [0011] 본 개시내용의 이러한 측면은 RNA 및 DNA 결합 단백질의 이중 가닥 DNA로의 또는 그와의 공동-국재화로 언급될 수 있다. 이러한 방식에서, DNA 결합 단백질-가이드 RNA 복합체는 다중 유전자 변형, 예컨대 외인성 공여자 DNA의 다중 삽입을 갖는 세포가 생성되도록 이중 가닥 DNA의 다중 부위를 컷팅하는데 사용될 수 있다.
- [0012] 특정 측면에 따르면, 표적 DNA에 상보적인 RNA와 공동-국재화 복합체를 형성하여 표적 DNA를 부위 특이적 방식으로 절단하는 효소를 발현하는 세포에서 표적 DNA에 대한 다중 변경을 만드는 방법이 제공되며, 이 방법은 (a) 표적 DNA에 상보적이며 효소를 표적 DNA로 가이드하는 1개 이상의 RNA를 코딩하는 제1 외래 핵산을 세포 내로 도입하고 (여기서 1개 이상의 RNA 및 효소는 표적 DNA의 공동-국재화 복합체의 구성원임), 1개 이상의 공여자 핵산 서열을 코딩하는 제2 외래 핵산을 세포 내로 도입하는 단계 (여기서 1개 이상의 RNA 및 1개 이상의 공여자 핵산 서열이 발현되고, 1개 이상의 RNA 및 효소가 표적 DNA와 공동-국재화되고, 효소가 표적 DNA를 절단하고, 공여자 핵산이 표적 DNA에 삽입되어 세포 내의 변경된 DNA를 생성함), 및 단계 (a)를 다수회 반복하여 세포 내의 DNA에 대한 다중 변경을 생성하는 것을 포함한다.
- [0013] 한 측면에 따르면, 세포는 진핵 세포이다. 한 측면에 따르면, 세포는 효모 세포, 식물 세포 또는 동물 세포이다. 한 측면에 따르면, 세포는 포유동물 세포이다.
- [0014] 한 측면에 따르면, RNA는 약 10 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. 한 측면에 따르면, RNA는 약 20 내지 약 100개의 뉴클레오타이드이다.
- [0015] 한 측면에 따르면, 1개 이상의 RNA는 가이드 RNA이다. 한 측면에 따르면, 1개 이상의 RNA는 tracrRNA-crRNA 융합체이다.
- [0016] 한 측면에 따르면, DNA는 계놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 바이러스 DNA 또는 외인성 DNA이다.
- [0017] 본 발명의 특정 실시양태의 추가의 특징 및 이점은 하기 실시양태의 설명 및 그의 도면, 및 청구범위로부터 보다 충분히 명백해질 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0018] 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부된 도면과 함께 하기 예시적 실시양태의 상세한 설명으로부터 보다 충분히 이해될 것이다.
- 도 1은 Cas9를 통한 RNA 가이드된 게놈 절단의 개략도이다.
- 도 2는 Cas9를 사용한 효모에서의 멀티플렉스화 게놈 조작을 도시하는 개략도이다.
- 도 3은 효모에서의 열내성에 결정적인 4개의 유전자좌를 표적화하는 올리고뉴클레오타이드를 사용한 대립유전자 대체를 도시하는 개략도이다.
- 도 4는 1회 순환 후에 및 2회 순환 후에 세포당 변형의 수를 도시하는 그래프이다.
- 도 5a는 돌연변이를 갖는 균주의 표이다. 도 5b는 다양한 균주에서의 열 쇼크에 대한 열내성을 보여준다.
- 도 6a는 형질전환 빈도에 대한 그래픽 데이터를 도시한다. 도 6b는 개별 재조합 빈도에 대한 그래픽 데이터를 도시한다. 도 6c는 *can1* 및 *KanMX* 유전자좌에서의 공동-재조합 빈도에 대한 그래픽 데이터를 도시한다.
- 도 7은 2개의 유전자좌에 대한 멀티플렉스 선형 카세트 혼입에 대한 그래픽 데이터를 도시한다.
- 도 8a는 30℃에서의 배가 시간의 변화 배수에 대한 그래픽 데이터를 도시한다. 도 8b는 37℃에서의 배가 시간의 변화 배수에 대한 그래픽 데이터를 도시한다. 도 8c는 후기 정지기 배양물로부터 접종된 세포에 대한, 42℃에서의 배가 시간의 변화 배수에 대한 그래픽 데이터를 도시한다. 도 8d는 후기 대수기 배양물로부터 접종된 세포에 대한, 42℃에서의 배가 시간의 변화 배수에 대한 그래픽 데이터를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 개시내용의 실시양태는 DNA로의 공동-국재화, 및 예컨대 상동 재조합에 의해, 외인성 DNA가 삽입된 DNA의 소화 또는 컷팅을 위한 외인성 DNA, 뉴클레아제 효소, 예컨대 DNA 결합 단백질 및 가이드 RNA의 반복 사용에 기초한다. 다양한 목적을 위해 DNA에 결합하는 이러한 DNA 결합 단백질은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 DNA 결합 단백질은 자연 발생의 것일 수 있다. 본 개시내용의 범위 내에 포함되는 DNA 결합 단백질은 본원에서 가이드 RNA로 지칭되는 RNA에 의해 가이드될 수 있는 것들을 포함한다. 이러한 측면에 따르면, 가이드 RNA와 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질은 DNA에서 공동-국재화 복합체를 형성한다. 뉴클레아제 활성을 갖는 이러한 DNA 결합 단백질은 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들어 유형 II CRISPR 시스템으로 존재하는, Cas9 단백질과 같은, 뉴클레아제 활성을 갖는 자연 발생 DNA 결합 단백질을 포함한다. 이러한 Cas9 단백질 및 유형 II CRISPR 시스템은 관련 기술분야에 널리 문헌화되어 있다. 모든 보충 정보를 포함하여 문헌 [Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477]을 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0020] 뉴클레아제 활성을 갖는 예시적인 DNA 결합 단백질은 이중 가닥 DNA를 니킹하거나 컷팅하는 기능을 한다. 이러한 뉴클레아제 활성은 뉴클레아제 활성을 나타내는 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 갖는 DNA 결합 단백질로부터 생성될 수 있다. 이러한 예시적인 DNA 결합 단백질은, 각각 이중 가닥 DNA의 특정한 가닥을 컷팅 또는 니킹하는 역할을 하는 2개의 별개의 뉴클레아제 도메인을 가질 수 있다. 뉴클레아제 활성을 갖는 예시적인 폴리펩티드 서열은 통상의 기술자에게 공지되어 있고, McrA-HNH 뉴클레아제 관련 도메인 및 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 따라서, 예시적인 DNA 결합 단백질은 자연에서 McrA-HNH 뉴클레아제 관련 도메인 및 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 중 하나 이상을 함유하는 것이다.
- [0021] 예시적인 DNA 결합 단백질은 유형 II CRISPR 시스템의 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질이다. 예시적인 DNA 결합 단백질은 Cas9 단백질이다.
- [0022] 에스. 피오게네스에서, Cas9는 단백질에서 2개의 촉매 도메인 (DNA의 상보적 가닥을 절단하는 HNH 도메인 및 비-상보적 가닥을 절단하는 RuvC-유사 도메인)에 의해 매개되는 과정을 통해 프로토스페이서-인접 모티프 (PAM)의 3bp 상류에서 평활-말단 이중-가닥 파괴를 생성한다. 문헌 [Jinke et al., Science 337, 816-821 (2012)]을 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. Cas9 단백질은 문헌 [Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477]에 대한 보충 정보에서 확인되는 하기 것들을 비롯하여 다수의 유형 II CRISPR 시스템으로 존재하는 것으로 공지되어 있다: 메타노코쿠스 마리팔루디스(Methanococcus maripaludis) C7; 코리네박테리움 디프테라이에(Corynebacterium diphtheriae); 코리네박테리움 에피시엔스(Corynebacterium efficiens) YS-314; 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum) ATCC 13032 키타사토(Kitasato); 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 빌레펠트(Bielefeld); 코리네박테리움 글루타미쿰 R;



코리네박테리움 크로펜스테티이(*Corynebacterium kroppenstedtii*) DSM 44385; 미코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) ATCC 19977; 노카르디아 파르시니카(*Nocardia farcinica*) IFM10152; 로도코쿠스 에리트로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*) PR4; 로도코쿠스 조스티이(*Rhodococcus jostii*) RHA1; 로도코쿠스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*) B4 uid36573; 아시도테르무스 셀룰로리틱우스(*Acidothermus cellulolyticus*) 11B; 아르트로박터 클로로페놀리쿠스(*Arthrobacter chlorophenolicus*) A6; 크리벨라 플라비다(*Kribbella flavida*) DSM 17836 uid43465; 써모모노스포라 쿠르바타(*Thermomonospora curvata*) DSM 43183; 비피도박테리움 덴티움(*Bifidobacterium dentium*) Bd1; 비피도박테리움 롱구름(*Bifidobacterium longum*) DJ010A; 슬라키아 헬리오트리니레두센스(*Slackia heliotrinireducens*) DSM 20476; 페르세포넬라 마리나(*Persephonella marina*) EX H1; 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*) NCTC 9434; 카프노시토파가 오크라세아(*Capnocytophaga ochracea*) DSM 7271; 플라보박테리움 사이크로필룸(*Flavobacterium psychrophilum*) JIP02 86; 악케르만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) ATCC BAA 835; 로세이플렉수스 카스텐홀치이(*Roseiflexus castenholzii*) DSM 13941; 로세이플렉수스(*Roseiflexus*) RS1; 시네코시스티스(*Synechocystis*) PCC6803; 엘루시미크로비움 미누툼(*Elusimicrobium minutum*) Pei191; 비배양된 흰개미 군 1 박테리아 계통형 Rs D17; 피브로박터 숙시노게네스(*Fibrobacter succinogenes*) S85; 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 10987; 리스테리아 이노쿠아(*Listeria innocua*); 락토바실루스 카세이(*Lactobacillus casei*); 락토바실루스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*) GG; 락토바실루스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) UCC118; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) A909; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 NEM316; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 2603; 스트렙토코쿠스 디스갈락티아에 에퀴시밀리스(*Streptococcus dysgalactiae equisimilis*) GGS 124; 스트렙토코쿠스 에퀴 주에피데미쿠스(*Streptococcus equi zooepidemicus*) MGCS10565; 스트렙토코쿠스 갈로리틱우스(*Streptococcus gallolyticus*) UCN34 uid46061; 스트렙토코쿠스 고르도니이 칼리스(*Streptococcus gordonii* Challis) subst CH1; 스트렙토코쿠스 뮈탄스(*Streptococcus mutans*) NN2025 uid46353; 스트렙토코쿠스 뮈탄스; 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) M1 GAS; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS5005; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS2096; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS9429; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS10270; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS6180; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS315; 스트렙토코쿠스 피오게네스 SSI-1; 스트렙토코쿠스 피오게네스 MGAS10750; 스트렙토코쿠스 피오게네스 NZ131; 스트렙토코쿠스 써모필레스(*Streptococcus thermophiles*) CNRZ1066; 스트렙토코쿠스 써모필레스 LMD-9; 스트렙토코쿠스 써모필레스 LMG 18311; 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*) A3 로크 마리(Loch Maree); 클로스트리디움 보툴리눔 B 에클룬드(Eklund) 17B; 클로스트리디움 보툴리눔 Ba4 657; 클로스트리디움 보툴리눔 F 랑겔란드(Langeland); 클로스트리디움 셀룰로리틱움(*Clostridium cellulolyticum*) H10; 피네골디아 마그나(*Fingoldia magna*) ATCC 29328; 유박테리움 렉탈레(*Eubacterium rectale*) ATCC 33656; 미코플라스마 갈리셉티쿰(*Mycoplasma gallisepticum*); 미코플라스마 모빌레(*Mycoplasma mobile*) 163K; 미코플라스마 페네트란스(*Mycoplasma penetrans*); 미코플라스마 시노비아에(*Mycoplasma synoviae*) 53; 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*) DSM 12112; 브라디리조비움(*Bradyrhizobium*) BTai1; 니트로박터 함부르겐시스(*Nitrobacter hamburgensis*) X14; 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodospseudomonas palustris*) BisB18; 로도슈도모나스 팔루스트리스 BisB5; 파르비바쿨룸 라바멘티보란스(*Parvibaculum lavamentivorans*) DS-1; 디노로세오박터 쉬바에(*Dinoroseobacter shibae*) DFL 12; 글루코나세토박터 디아조트로피쿠스(*Gluconacetobacter diazotrophicus*) Pal 5 FAPERJ; 글루코나세토박터 디아조트로피쿠스(*Gluconacetobacter diazotrophicus*) Pal 5 JGI; 아조스피릴룸(*Azospirillum*) B510 uid46085; 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*) ATCC 11170; 디아포로박터(*Diaphorobacter*) TPSY uid29975; 베르미네프로박터 에이세니아에(*Verminephrobacter eiseniae*) EF01-2; 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*) 053442; 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*) 알파14; 네이세리아 메닝기티데스 Z2491; 데술포브리오 살렉시겐스(*Desulfovibrio salexigens*) DSM 2638; 캄필로박터 제주니 도일레이(*Campylobacter jejuni doylei*) 269 97; 캄필로박터 제주니 81116; 캄필로박터 제주니; 캄필로박터 라리(*Campylobacter lari*) RM2100; 헬리코박터 헤파티쿠스(*Helicobacter hepaticus*); 윌리넬라 숙시노게네스(*Wolinella succinogenes*); 톨루모나스 아우엔시스(*Tolomonas auensis*) DSM 9187; 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c; 슈와넬라 페알레아나(*Shewanella pealeana*) ATCC 700345; 레지오넬라 뉴모필라 파리스(*Legionella pneumophila* Paris); 악티노바실루스 숙시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*) 130Z; 파스테우렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*); 프란시셀라 툴라렌시스 노비시다(*Francisella tularensis novicida*) U112; 프란시셀라 툴라렌시스 홀라르크티카(*Francisella tularensis holarctica*); 프란시셀라 툴라렌시스 FSC 198; 프란시셀라 툴라렌시스 툴라렌시스; 프란시셀라 툴라렌시스 WY96-3418; 및 트레포넬라 덴티콜라(*Treponema denticola*) ATCC 35405. 따라서, 본 개시내용의 측면은 유형 II CRISPR 시스템으로 존재하는 Cas9 단백질에 관한 것이다.



[0023] Cas9 단백질은 통상의 기술자에 의해 문헌에서 Csn1로서 지칭될 수 있다. 본원에 기재된 실험의 대상인 에스. 피오게네스 Cas9 단백질 서열이 하기 제시된다. 문헌 [Deltcheva et al., Nature 471, 602-607 (2011)]을 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

```
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE
ATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLRIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD
VDKLFQVLQVTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGFLGN
LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
AILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE
VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRER
MKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL
TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR
K
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKEKKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLKP
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE
QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD-
```

[0024]

[0025] 한 측면에 따르면, RNA 가이드된 DNA 결합 단백질은 DNA에 결합하고, RNA에 의해 가이드되고, DNA를 컷팅하는 단백질의 능력을 보유하는 Cas9의 상동체 및 오르토로그를 포함한다. 한 측면에 따르면, Cas9 단백질은 에스. 피오게네스로부터의 자연 발생 Cas9에 대해 제시된 바와 같은 서열 및 이에 대해 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 단백질 서열을 포함하고, DNA 결합 단백질, 예컨대 RNA 가이드된 DNA 결합 단백질이다.

[0026]

한 측면에 따르면, 원하는 경우에 부위 특이적 방식으로의 RNA-가이드된 게놈 컷팅, 및 외인성 공여자 핵산의 삽입에 의한 게놈의 변형을 가능하게 하는 조작된 Cas9-gRNA 시스템이 제공된다. 가이드 RNA는 DNA 상의 표적 부위 또는 표적 유전자좌에 상보적이다. 가이드 RNA는 crRNA-tracrRNA 키메라일 수 있다. Cas9는 표적 게놈 DNA에 또는 그 부근에 결합한다. 1개 이상의 가이드 RNA가 표적 게놈 DNA에 또는 그 부근에 결합한다. Cas9는 표적 게놈 DNA를 컷팅하고, 외인성 공여자 DNA가 컷팅된 부위에서 DNA 내로 삽입된다.

[0027]

따라서, 방법은 RNA 및 외인성 공여자 핵산을 코딩하는 핵산의 삽입, RNA의 발현, DNA를 컷팅하는 방식으로의 RNA, Cas9 및 DNA의 공동-국재화, 및 외인성 공여자 핵산의 삽입의 순환에 의한 Cas9를 발현하는 세포 내의 DNA 내로의 외인성 공여자 핵산의 멀티플렉스 삽입을 위한, 가이드 RNA와 Cas9 단백질 및 외인성 공여자 핵산의 용도에 관한 것이다. 방법 단계는 임의의 원하는 수의 DNA 변형을 발생시키는 임의의 원하는 횟수로 순환될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 세포의 멀티플렉스 유전적 및 후성적 조작을 제공하기 위한, 본원에 기재된 Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 사용한 표적 유전자의 편집에 관한 것이다.

[0028]

본 개시내용의 추가 측면은 일반적으로 세포, 예컨대 인간 세포의 DNA, 예컨대 게놈 DNA 내로의 외인성 공여자 핵산의 멀티플렉스 삽입을 위한, DNA 결합 단백질 또는 시스템의 용도에 관한 것이다. 통상의 기술자는 본 개

시내용을 기초로 예시적인 DNA 결합 시스템을 용이하게 확인할 것이다.

[0029] 본 개시내용에 따른 세포는 외래 핵산이 본원에 기재된 바와 같이 도입되고 발현될 수 있는 임의의 세포를 포함한다. 본원에 기재된 본 개시내용의 기본 개념은 세포 유형에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시내용에 따른 세포는 진핵 세포, 원핵 세포, 동물 세포, 식물 세포, 진균 세포, 고세균 세포, 유박테리아 세포 등을 포함한다. 세포는 진핵 세포, 예컨대 효모 세포, 식물 세포 및 동물 세포를 포함한다. 특정한 세포는 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포를 포함한다. 또한, 세포는 DNA를 변형시키기에 유익하거나 또는 바람직할 임의의 세포를 포함한다.

[0030] 표적 핵산은, 본원에 기재된 바와 같은 공동-국제화 복합체가 니킹 또는 컷팅에 유용할 수 있는 임의의 핵산 서열을 포함한다. 표적 핵산은 유전자를 포함한다. 본 개시내용의 목적을 위해, DNA, 예컨대 이중 가닥 DNA는 표적 핵산을 포함할 수 있고, 공동-국제화 복합체는 표적 핵산에서 또는 그에 인접하여 또는 그 부근에서 공동-국제화 복합체가 표적 핵산에 대해 바람직한 효과를 가질 수 있는 방식으로 DNA에 결합할 수 있거나, 또는 그와 달리 공동-국제화될 수 있다. 이러한 표적 핵산은 내인성 (또는 자연 발생) 핵산 및 외인성 (또는 외래) 핵산을 포함할 수 있다. 본 개시내용을 기초로 하여 통상의 기술자는 표적 핵산을 포함하는 DNA에 공동-국제화되는 가이드 RNA 및 Cas9 단백질을 용이하게 확인 또는 설계할 수 있을 것이다. 통상의 기술자는 또한, 마찬가지로 표적 핵산을 포함하는 DNA에 공동-국제화되는 전사 조절 단백질 또는 도메인을 확인할 수 있을 것이다. DNA는 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 바이러스 DNA 또는 외인성 DNA를 포함한다. 한 측면에 따르면, 예시적인 균주 및 배지, 플라스미드 구축, 플라스미드의 형질전환, 일시적인 gRNA 카세트 및 공여자 핵산의 전기천공, 공여자 DNA가 포함된 gRNA 플라스미드의 Cas9-발현 세포로의 형질전환, Cas9의 갈락토스 유도, 효모 게놈에서의 CRISPR-Cas 표적의 확인 등을 비롯한 본 개시내용의 실시예에 유용한 물질 및 방법은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Di Carlo, et al., Nucleic Acids Research, 2013, vol. 41, No. 7 4336-4343]에 기재된 것을 포함한다. 본 발명을 수행하는데 통상의 기술자에게 유용한 정보, 물질 및 방법을 포함하는 추가의 참조내용이 문헌 [Mali,P., Yang,L., Esvelt,K.M., Aach,J., Guell,M., DiCarlo,J.E., Norville,J.E. and Church,G.M. (2013) RNA-Guided human genome engineering via Cas9. Science, 10.1126/science.1232033; Storici,F., Durham,C.L., Gordenin,D.A. and Resnick,M.A. (2003) Chromosomal site-specific double-strand breaks are efficiently targeted for repair by oligonucleotides in yeast. PNAS, 100, 14994-14999 및 Jinek,M., Chylinski,K., Fonfara,l., Hauer,M., Doudna,J.A. and Charpentier,E. (2012) A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337, 816-821] (이들은 각각 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 제공되어 있다.

[0031] 외래 핵산 (즉, 세포의 천연 핵산 조성물의 부분이 아닌 것들)이, 이러한 도입에 대해 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 이러한 방법은 형질감염, 형질도입, 바이러스 형질도입, 미세주사, 리포펙션, 뉴클레오펙션, 나노입자 포격, 형질전환, 접합 등을 포함한다. 통상의 기술자는 용이하게 확인가능한 문헌 공급원을 이용하여 이러한 방법을 용이하게 이해하고 적합화할 것이다.

[0032] 하기 실시예는 본 개시내용을 대표하는 것으로서 제시된다. 이들 실시양태 및 다른 등가의 실시양태가 본 개시내용, 도면 및 첨부된 청구범위의 관점에서 명백할 것이기 때문에, 이들 실시예는 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0033] 실시예 I

[0034] 효모에서의 CRISPR-Cas9를 사용한 멀티플렉스화 유전자 편집을 위한 일반적 과정

[0035] 스트렙토코쿠스 피오게네스의 CRISPR 면역계로부터의 Cas9를 사용하여, 상동 재조합을 자극하고 사카로미세스 세레비시아에서 형질전환된 DNA를 재조합하지 않는 세포를 선택한다. Cas9를 사용하는 RNA-가이드된 DNA 절단의 일반적 방법이 도 1에 제시된다. Cas9, 가이드 RNA 및 표적 DNA 사이의 공동-국제화 복합체를 형성시킨다. 이중 가닥 브레이크를 Cas9에 의해 표적 DNA에 발생시킨다. 이어서, 공여자 DNA를 상동 재조합에 의해 DNA에 삽입한다. 공여자 DNA는 컷팅된 부위의 어느 한쪽 측면 상의 플랭킹 서열 및 Cas9 절단 부위를 제거하는 서열을 포함한다. 결과는 공여자 DNA의 DNA (게놈 DNA일 수 있음)로의 통합이다.

[0036] Cas9를 사용하는 효모에서의 멀티플렉스화 DNA 조작을 이용하는 높은 빈도의 공여자 DNA 재조합을 위한 일반적 방법이 도 2를 참조하여 다음과 같이 제공된다. 자연에 존재하는 Cas9 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제를 갖지 않는 세포를 이 세포가 Cas9 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제를 발현하도록 DNA로 형질전환시킬 수 있다. Cas9 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 발현하는 세포를 성장시킨다. 1개 이상의 가이드 RNA의 세포로의 도입 및 발현을

위해, 1개 이상의 가이드 RNA를 코딩하는 1개 이상의 핵산 및 통상의 기술자에게 공지된 선택 마커를 포함하는 플라스미드를 생성한다. 도 2에 나타난 바와 같이, 세포의 게놈 DNA에 삽입될 여러 유전자, 즉 유전자 A, 유전자 B, 유전자 C, 유전자 D 및 유전자 E에 대해 사용될 가이드 RNA를 코딩하는 핵산을 각각 포함하는 플라스미드의 풀이 제시된다. 유전자 A, 유전자 B, 유전자 C, 유전자 D 및 유전자 E에 대한 이중 가닥 공여자 DNA를 포함하는 공여자 DNA의 풀이 또한 제공된다.

[0037] 세포를 세척하고, 리튬 아세테이트로 조건화한다. 세포를 추가로 세척하고, 외인성 공여자 핵산, 예컨대 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드의 풀, 예를 들어 DNA 카세트, 및 가이드 RNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 플라스미드와 혼합한다. 도 2에 나타난 바와 같이, 세포를 외인성 공여자 핵산 및 플라스미드로 PEG 3350 및 리튬 아세테이트를 사용하여 형질전환시킨다.

[0038] 도 2에 나타난 바와 같이, 선택 마커를 사용하여 1개 이상의 가이드 RNA에 대하여 세포를 선택한다. 선택된 세포는 1개 이상의 가이드 RNA를 발현한다. 세포에서 가이드 RNA, Cas9 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제 및 DNA 사이의 1개 이상의 공동-국제화 복합체가 형성된다. 엔도뉴클레아제가 DNA를 컷팅하고, 공여자 핵산을 재조합, 예컨대 상동 재조합에 의해 세포에 삽입한다. 이어서, 세포에 플라스미드가 보존되도록 한 후에, 상기 단계의 하나 또는 추가의 순환에 임의로 적용한다. 복수회의 순환을 수행할 수 있다. 복수회의 순환에 적용된 세포는 높은 재조합 빈도를 나타낸다. 대안적으로, 세포를 플라스미드 유지에 대해 선택해제하거나 또는 다르게는 세포를 플라스미드를 보유한 세포를 선택하기 위한 배지에 넣는다. 이어서, 세포 성장 단계로 시작하여 이 과정을 반복한다. 따라서, 방법은 이전 순환에 의해 이미 변형된 세포의 순환 또는 변형되지 않은 이전 순환으로부터의 세포 선택 및 상기 기재된 바와 같은 DNA의 변형에 영향을 미치는 변형되지 않은 세포의 추가의 순환을 포함한다.

[0039] 실시예 II

[0040] 상세한 순환 프로토콜

[0041] 세포를 5 ml SC 효모 배지 또는 SC + FOA (100  $\mu$ g/ml) 중에서 0.8 내지 1.0의 광학 밀도로 성장시킨다 (우라실 영양요구체, 구성적 Cas9 발현이 존재함). 세포를 2250 x g에서 3분 동안 회전시키고, 10 ml 물로 1회 세척한다. 세포를 건조시키고, 1 ml의 100 mM 리튬 아세테이트에 재현탁시킨다. 세포를 펠릿화하고, 500  $\mu$ l의 100 mM 리튬 아세테이트에 재현탁시킨다. 하기 순서로, 50  $\mu$ l의 세포; 1 nmol의 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 풀, 각각 5  $\mu$ g의 가이드 RNA (p426 벡터, 우라실 마커 포함)를 포함하는 DNA 혼합물 (원하는 최종 부피를 달성하기 위해 물로 70  $\mu$ l까지 채움); 240  $\mu$ l 50% PEG 3350; 및 36  $\mu$ l 1 M 리튬 아세테이트를 첨가하여 형질전환 혼합물을 생성시킨다. 혼합물을 30°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 이어서, 혼합물을 볼텍싱하고, 혼합물을 42°C에서 20분 동안 인큐베이션하여 세포에 열 쇼크를 가한다. 이어서, 세포를 펠릿화하고, 상청액을 제거한다. 세포에 5 ml SC-우라실을 접종하여 우라실 유전자 함유 gRNA 플라스미드를 선택한다. 세포를 2일 동안 회수한다. 2일 후에, 100  $\mu$ l의 세포 배양물을 5 ml 새로운 SC에 접종하고, 12시간 동안 성장시켜 플라스미드 유지에 대해 선택해제한다. 이어서, 100  $\mu$ l의 SC 배양 세포를 5 ml의 SC + FOA (100  $\mu$ g/mL) 배지에 접종하여 플라스미드를 보유하는 세포를 선택한다. 이로써 과정의 1회 순환이 완성된다. 이 과정을 임의의 횟수의 원하는 순환 동안 반복한다. 전체 과정은 1회 순환, 2회 순환, 3회 순환, 4회 순환, 5회 순환, 6회 순환, 7회 순환, 8회 순환, 9회 순환, 10회 순환, 15회 순환, 20회 순환, 25회 순환 등을 포함할 수 있다.

[0042] 실시예 III

[0043] 선택 돌연변이체에서의 열 쇼크에 대한 열내성

[0044] 본원에 기재된 방법을 이용하여, 선택 돌연변이체에서의 열 쇼크에 대한 열내성을 보여주었다. 녹아웃 또는 점 돌연변이시에 효모에서 열내성을 증가시키는 것을 밝혀진 유전자를 본원에 기재된 가이드 RNA-Cas9 시스템에 의해 표적화하였다. 돌연변이에 대해 4개의 유전자를 선택하였다: UBC1, SCH9, TFS1, 및 RAS2. SCH9는 삼투스트레스, 영양소 및 환경적 스트레스 유전자를 조절하는 단백질 키나제이다. TFS1은 카르복시펩티다제 Y 및 Ira2p를 억제하고, Ras GAP 활성을 억제하고, DNA 복제 스트레스에 반응한다. RAS2는 질소 고갈을 조절하는 GTP 결합 단백질이고, 스트레스 반응 경로에 관여한다. 각각의 SCH9, TFS1 및 RAS2에 대하여, 코딩 영역에 세린 → 알라닌 돌연변이를 함유하는 대립유전자인 공여자 DNA를 생성하였다. UBC1-E2는 유비퀴틴-접합 효소이다. 열내성을 발생시키는 인산화 부위를 제거하는 점 돌연변이를 포함하는 공여자 DNA를 생성시켰다.

[0045] 본원에 기재된 방법을 이용하여, 변화를 주는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드와 함께 Cas9 절단물을 유전자의 유전자좌로 유도하도록 설계된 가이드 RNA를 사용하여 유전자를 표적화하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 대립유

전자 대체는 효모에서의 열내성을 담당하는 4개의 유전자좌를 표적화하는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 달성되었다. 개략도에 따르면, 각각 유전자 중 1개에 대한 가이드 RNA를 코딩하는 핵산이 혼입된 4개의 플라스미드가 생성되었다: UBC1 gRNS 플라스미드, TFS1 gRNA 플라스미드, SCH9 gRNA 플라스미드 및 RAS2 gRNA 플라스미드. 각각의 플라스미드는 상응하는 이중 가닥 공여자 올리고뉴클레오타이드: *ubc1* (S97A) 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드, *tfs1* (태그) 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드, *sch9* (태그) 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 *ras* (태그) 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하였다. 플라스미드 및 상응하는 이중 가닥 공여자 올리고뉴클레오타이드를 풀로서 효모에 공동-형질전환시켰다. 2회 순환을 수행하였고, 세포당 변형의 수를 세포 집단 내의 세포의 백분율의 함수로 도 4에 제시한다. 유의한 수의 세포가 2회 순환 후에 1 및 2개의 변형을 포함하였다. 1개의 삼중 돌연변이체를 단리할 수 있었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0046] 도 5a는 1개의 공여자 올리고뉴클레오타이드로 형질전환된 균주, 2개의 공여자 올리고뉴클레오타이드로 형질전환된 균주 및 3개의 공여자 올리고뉴클레오타이드로 형질전환된 균주를 보여주는, 본원에 기재된 방법으로부터 생성된 균주의 표이다. 도 5b는 인큐베이션하지 않은 경우와 비교하여 42℃에서 3시간 동안 인큐베이션한 경우의 효과를 보여주며, 야생형 세포 수가 약간 감소하였다. 도 5b는 또한 인큐베이션하지 않은 경우와 비교하여 55℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 경우의 효과를 보여준다. 55℃에서의 열 쇼크에 대한 내성이 가장 큰 돌연변이체는 *sch9*, *sch9 tfs1* 및 *tfs1 ubc1(s97a)*이었다.

[0047] 도 6은 일반적으로 2개의 유전자좌에서의 멀티플렉스 올리고뉴클레오타이드 혼입의 최적화에 대한 그래픽 정보를 제공한다. 도 6a는 형질전환된 각각의 플라스미드의 양 (μg)에 대비하여 형질전환 빈도를 도시한다. 도 6b는 형질전환된 각각의 플라스미드의 양 (μg)에 대비하여 개별 재조합 빈도를 도시한다. 도 6c는 형질전환된 각각의 플라스미드의 양 (μg)에 대비하여 *can1* 및 *KanMX* 유전자좌에서의 공동-재조합 빈도를 도시한다.

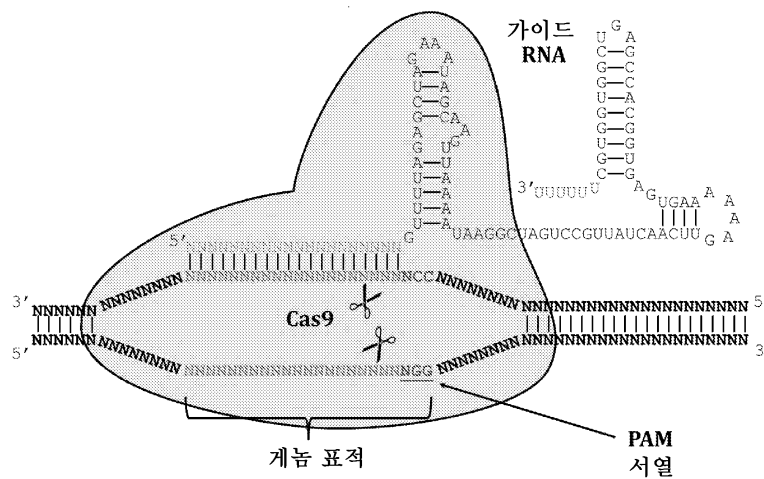
[0048] 도 7은 일반적으로 2개의 유전자좌에서의 멀티플렉스 선형 카세트 혼입에 대한 그래픽 정보를 제공한다. 그래프 차트에서, 가장 왼쪽의 첫번째 막대는 p426 gRNA ADE2 + HygR 카세트에 대한 형질전환 빈도; 그 다음 막대는 p426 gRNA CAN1 + G418R 카세트에 대한 형질전환 빈도, 그 다음 3개의 막대는 p426 gRNA + ADE2 p426 gRNA CAN1 + HygR 카세트 + G418R 카세트에 대한 형질전환 빈도이다.

[0049] 도 8은 일반적으로 선택 돌연변이체에 대한 승온에서의 지수 성장에서의 배가 시간을 보여주는 성장률 분석이다. 도 8a는 야생형 및 확인된 돌연변이체에 대한 30℃에서의 배가 시간의 변화 배수의 그래프이다. 도 8b는 야생형 및 확인된 돌연변이체에 대한 37℃에서의 배가 시간의 변화 배수의 그래프이다. 도 8c는 후기 정지기 배양물로부터 접종시의 야생형 및 확인된 돌연변이체에 대한 42℃에서의 배가 시간의 변화 배수의 그래프이다. 8d는 후기 대수기 배양물로부터 접종시의 야생형 및 확인된 돌연변이체에 대한 42℃에서의 배가 시간의 변화 배수의 그래프이다. 그래픽 데이터는 *sch9 tfs1* 및 *tfs1 ubc1(S97A)*에 대한 37℃에서의 보다 낮은 배가 시간을 보여준다. 그래픽 데이터는 *ras2 tfs1*, *sch9 ubc1(S97A)*, *tfs1 ubc1(S97A)* 및 *ras2 tfs1 ubc1(S97A)*에 대한 42℃에서의 보다 낮은 배가 시간을 보여준다.

도면

도면1

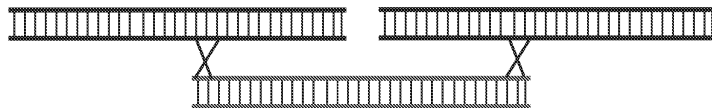
## Cas9를 통한 RNA 가이드된 게놈 절단



### Cas9 절단에 의한 이중-가닥 파괴



Cas9 절단 부위를 제거하는 공여자 DNA와의 상동 재조합

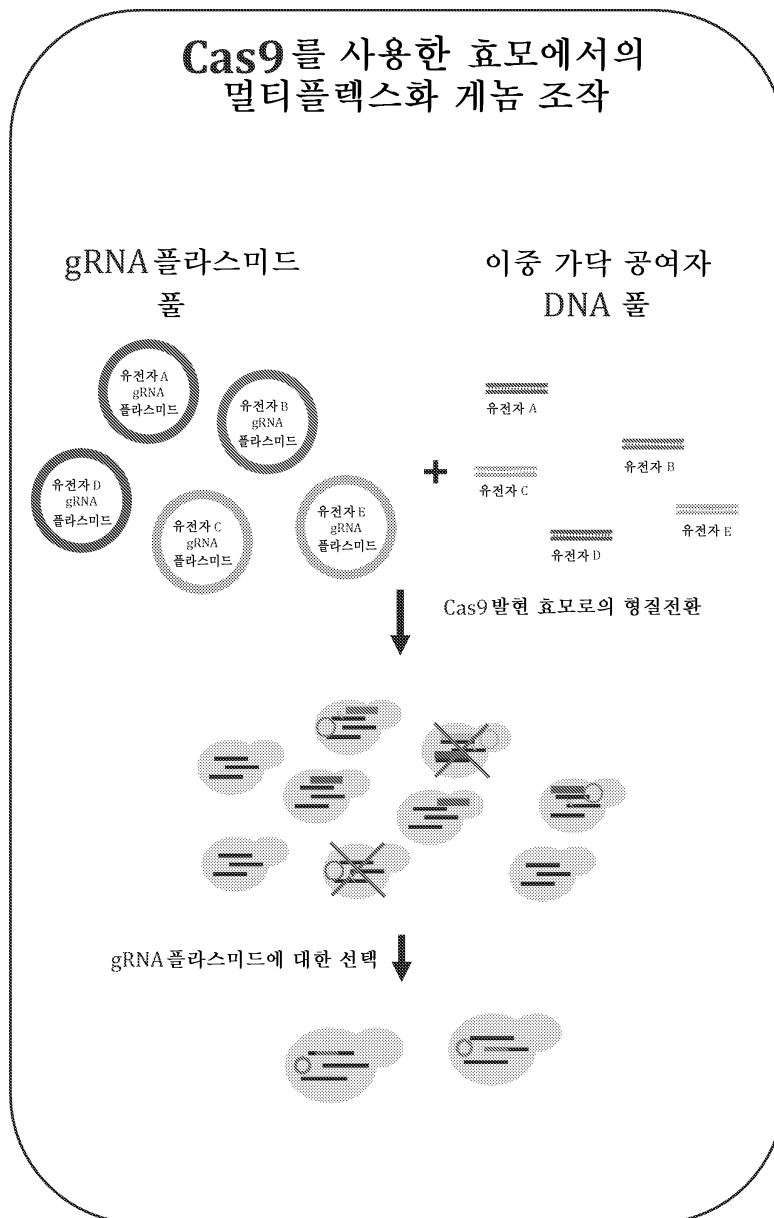


계놈 통합된 공여자 DNA

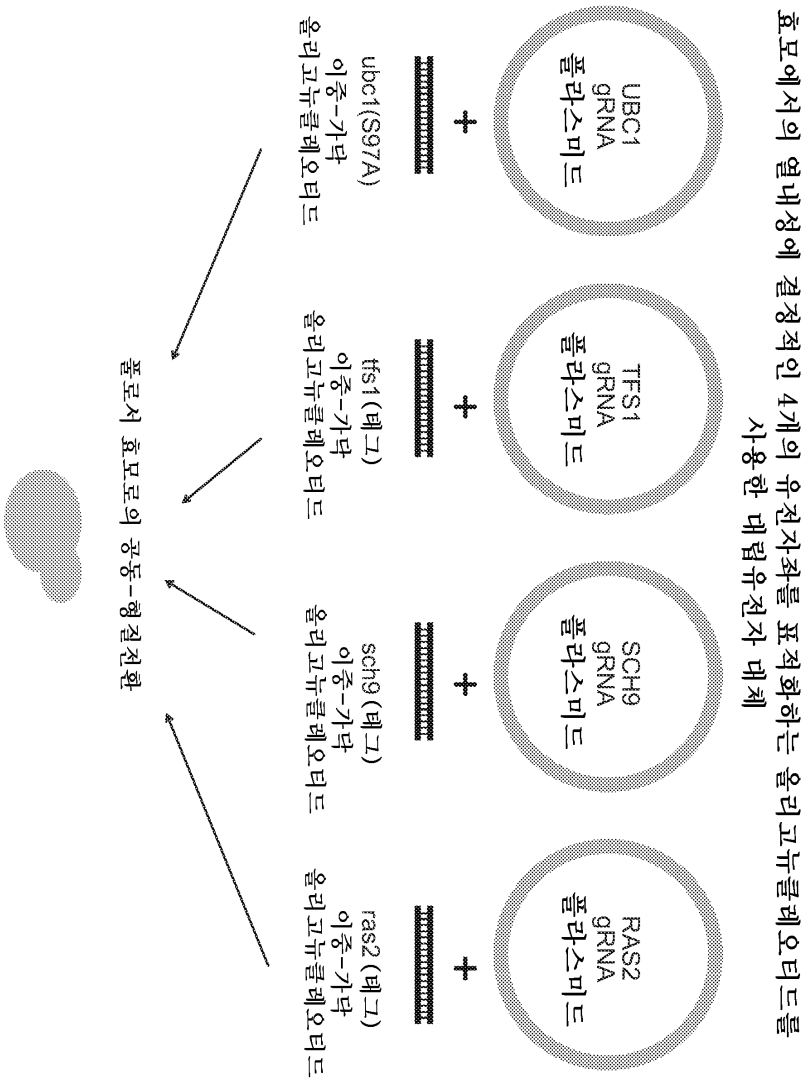




도면2

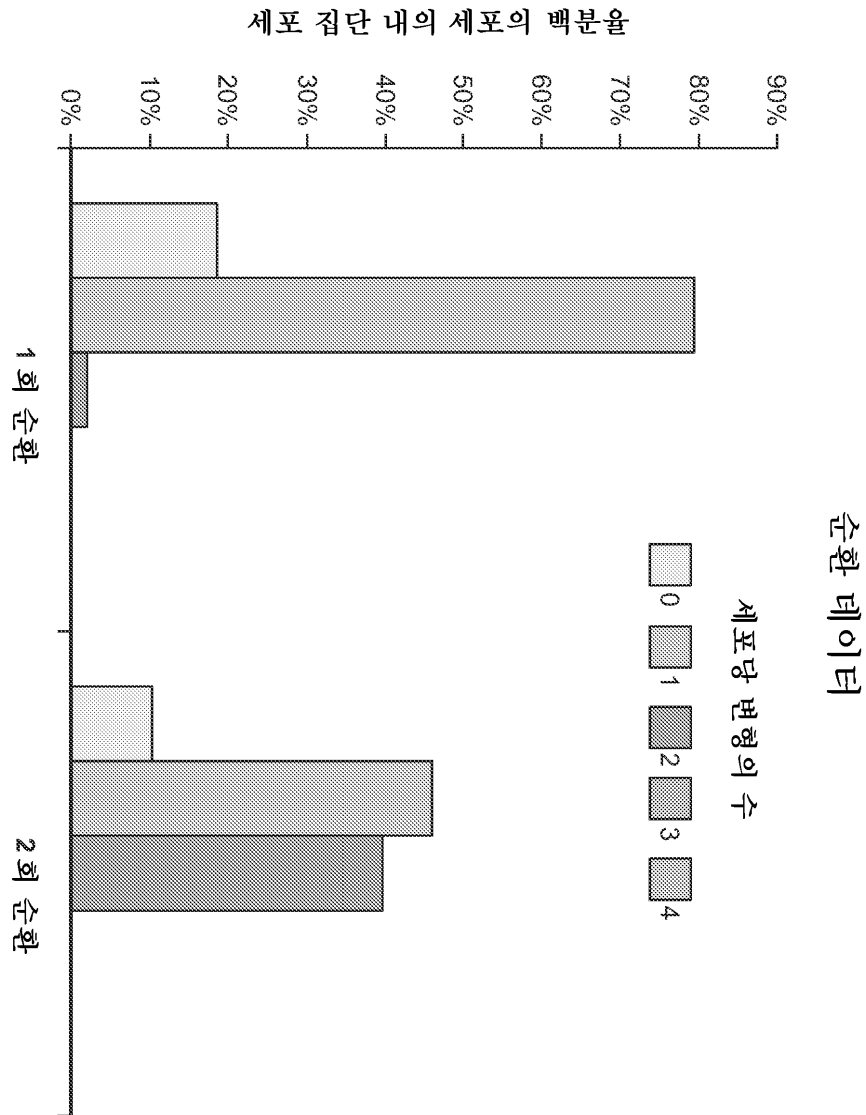


도면3





도면4



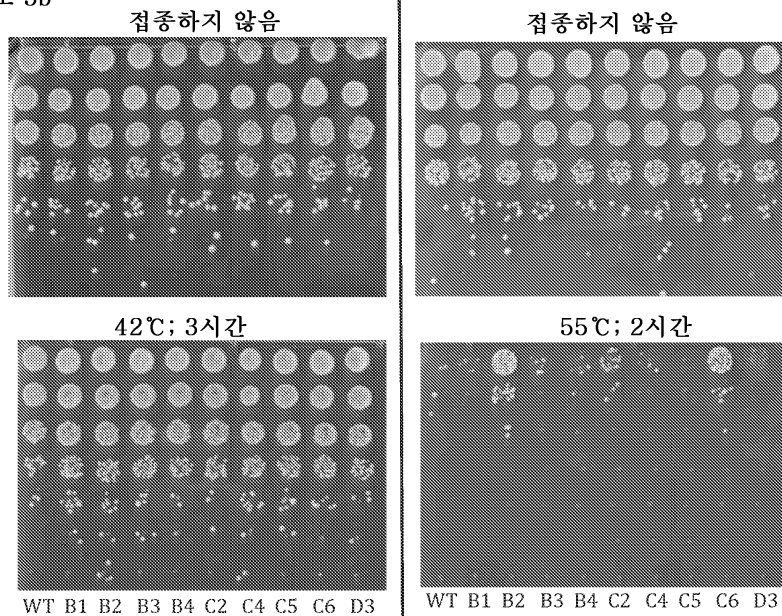
도면5

# 선택 돌연변이체에서의 열 쇼크에 대한 열내성

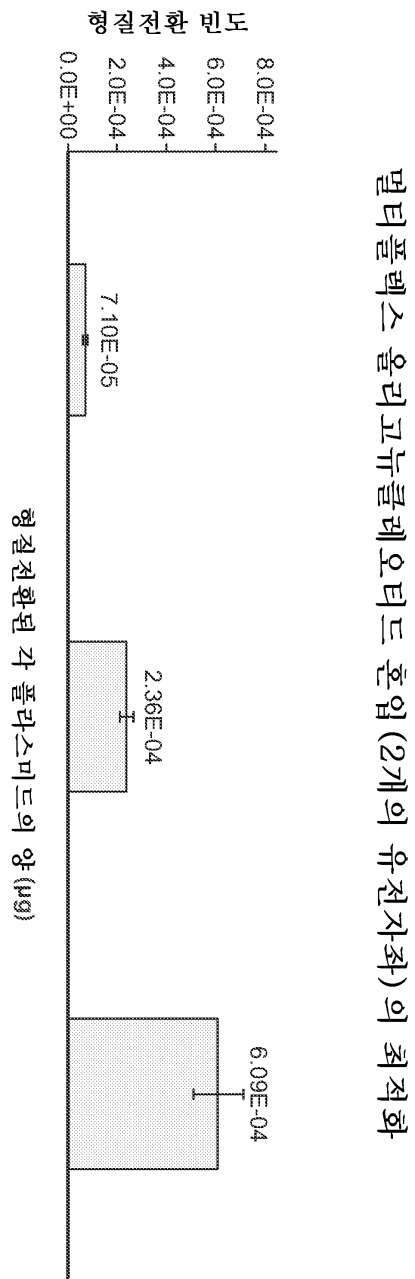
도 5a

균주	코드
야생형	WT
ras2	B1
sch9	B2
ubc1(S97A)	B3
tfs1	B4
sch9 tfs1	C2
ras2 tfs1	C4
sch9 ubc1(S97A)	C5
tfs1 ubc1(S97A)	C6
ras2 tfs1 ubc1(S97A)	D3

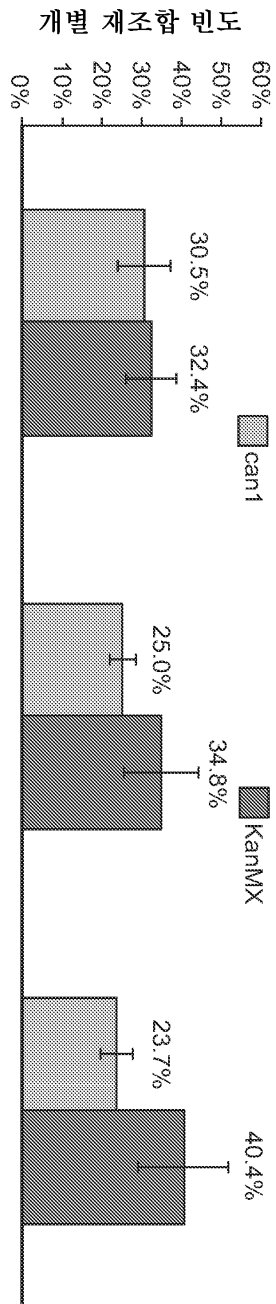
도 5b



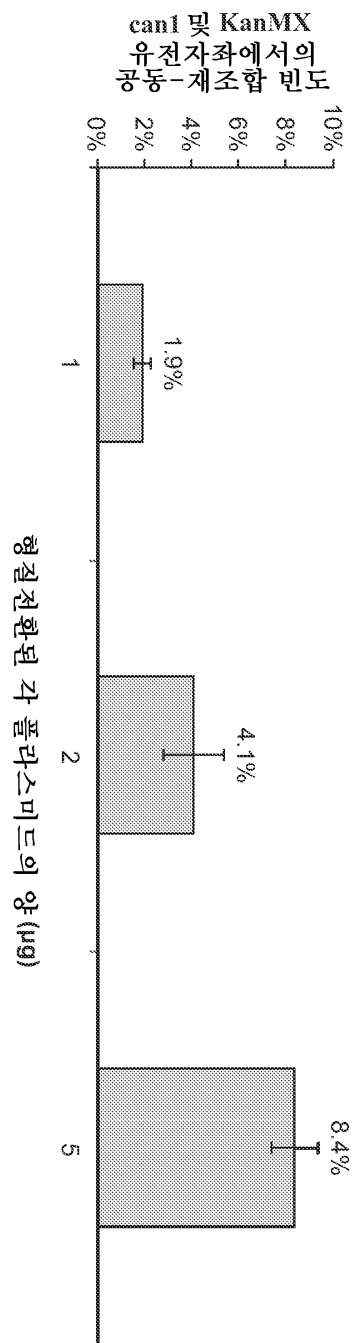
도면6a



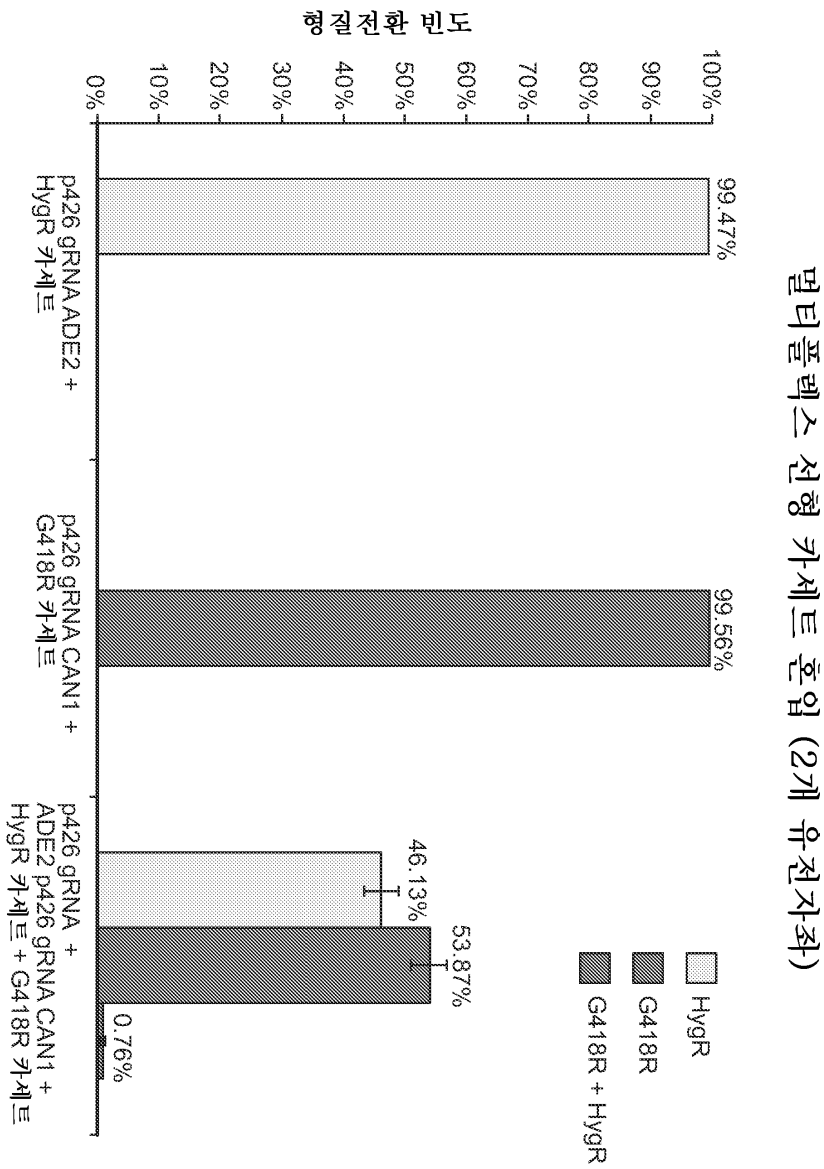
도면6b



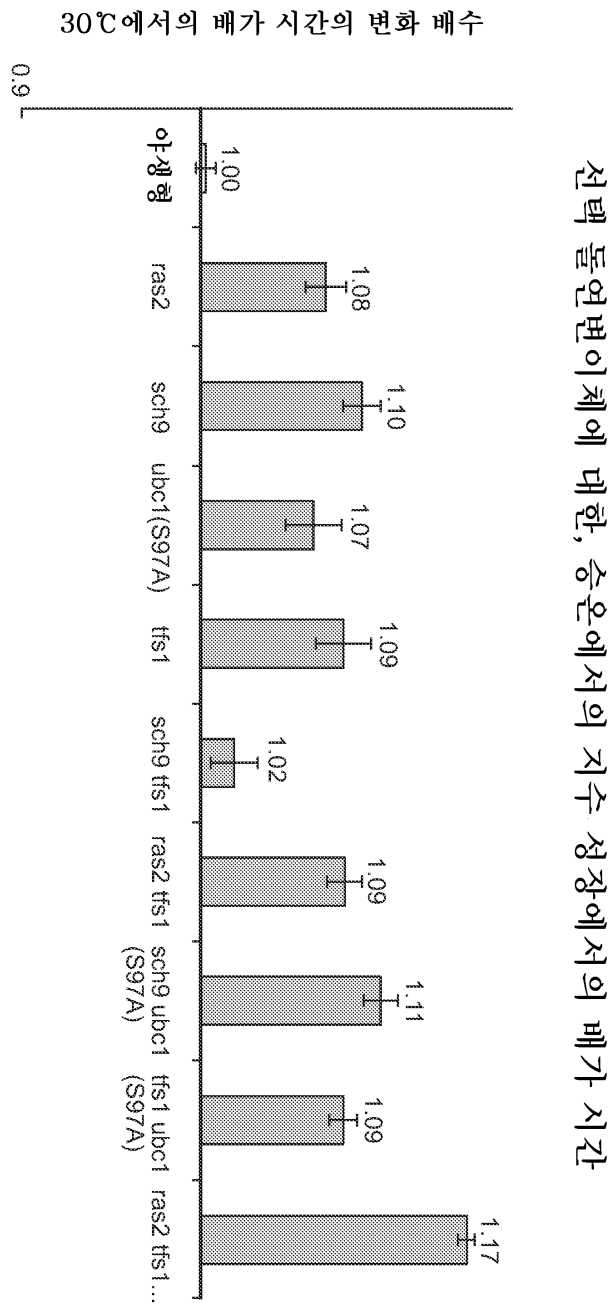
도면6c



도면7

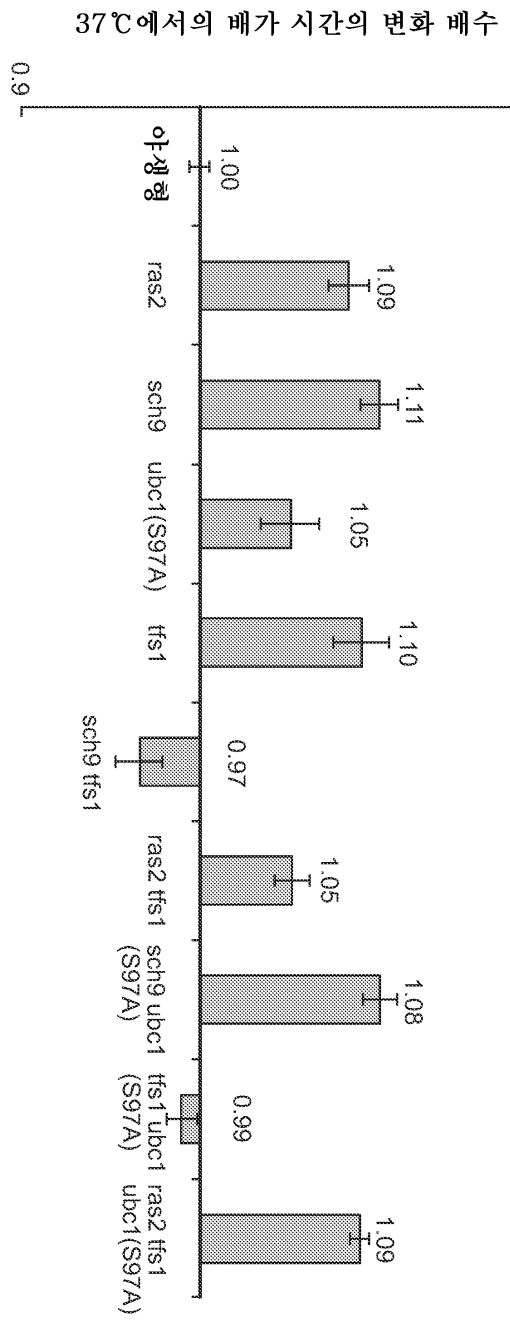


도면8a



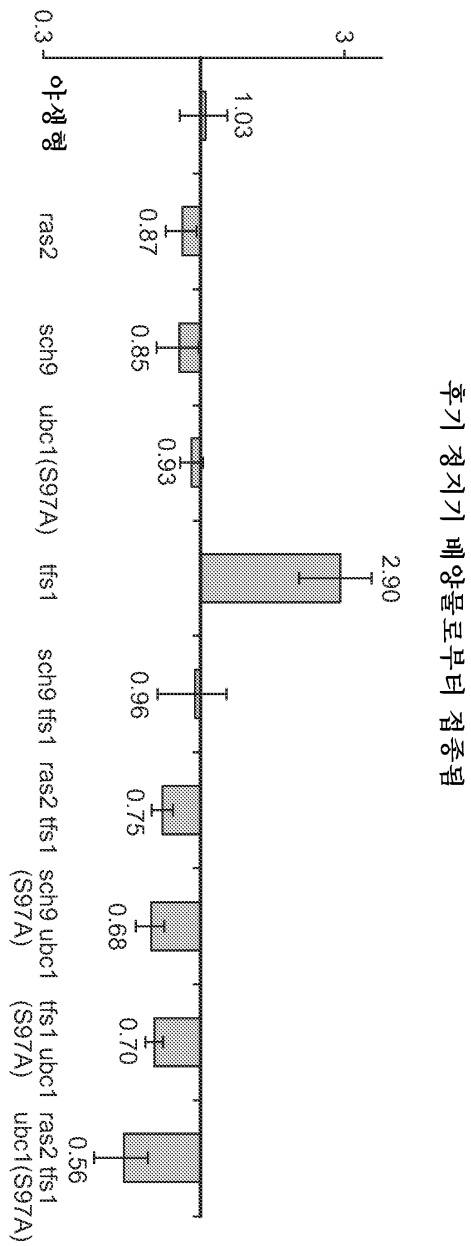


도면8b



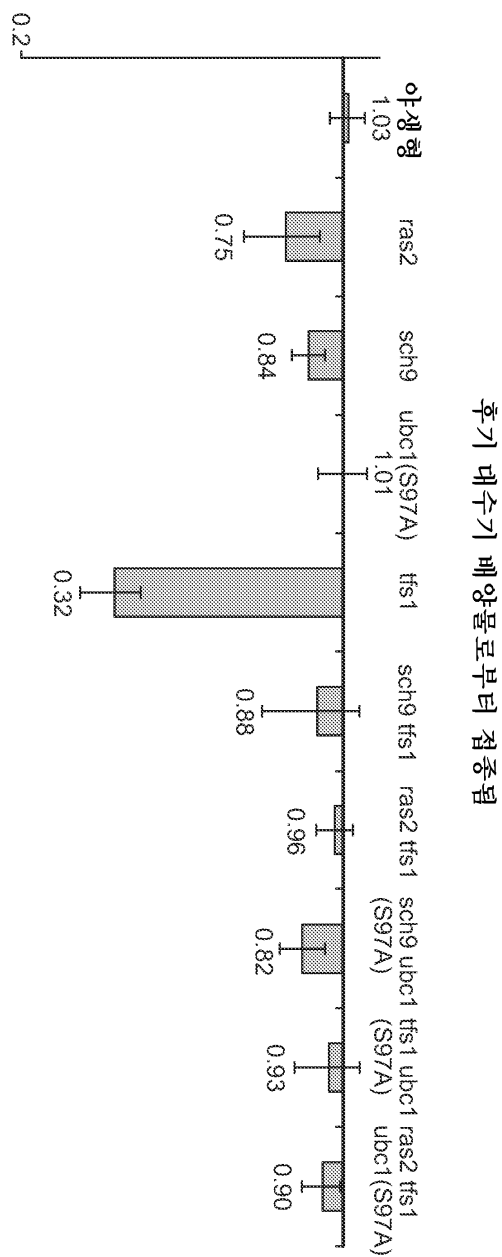
도면8c

42℃에서의 배가 시간의 변화 배수



도면8d

42℃에서의 배가 시간의 변화 배수



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> President and Fellows of Harvard College

<120> Multiplex RNA-Guided Genome Engineering

<130> 010498.00518

<140> PCT/US14/045691

<141> 2014-07-08

<150> US 61/844,168

<151> 2013-07-09

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1368

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 1

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180 185 190  
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala  
 195 200 205  
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn  
  
 210 215 220  
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe  
 245 250 255  
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp  
 260 265 270  
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp  
  
 275 280 285  
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp  
 290 295 300  
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys  
 325 330 335  
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe  
  
 340 345 350  
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser  
 355 360 365  
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp  
 370 375 380  
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg  
 385 390 395 400  
 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu  
  
 405 410 415  
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe  
 420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile  
 435 440 445  
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp  
 450 455 460  
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr  
 485 490 495  
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser  
 500 505 510  
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys  
 515 520 525  
 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln  
 530 535 540  
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr  
 545 550 555 560  
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp  
 565 570 575  
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly  
 580 585 590  
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
 595 600 605  
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
 610 615 620  
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala  
 625 630 635 640  
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr  
 645 650 655  
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp  
 660 665 670  
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe

675                      680                      685  
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe  
 690                      695                      700  
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu  
 705                      710                      715                      720  
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly  
  
 725                      730                      735  
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly  
 740                      745                      750  
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln  
 755                      760                      765  
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile  
 770                      775                      780  
 Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro  
  
 785                      790                      795                      800  
 Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 805                      810                      815  
 Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg  
 820                      825                      830  
 Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys  
 835                      840                      845  
 Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg  
  
 850                      855                      860  
 Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys  
 865                      870                      875                      880  
 Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys  
 885                      890                      895  
 Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp  
 900                      905                      910  
 Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr  
  
 915                      920                      925



Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp  
 930 935 940  
 Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser  
 945 950 955 960  
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
 965 970 975  
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val  
 980 985 990  
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
 995 1000 1005  
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala  
 1010 1015 1020  
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe  
 1025 1030 1035  
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala  
 1040 1045 1050  
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu  
 1055 1060 1065  
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val  
 1070 1075 1080  
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
 1085 1090 1095  
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys  
 1100 1105 1110  
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro  
 1115 1120 1125  
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val  
 1130 1135 1140  
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys  
 1145 1150 1155  
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser

1160                      1165                      1170  
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys  
1175                      1180                      1185  
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu  
1190                      1195                      1200  
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
1205                      1210                      1215  
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val

1220                      1225                      1230  
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
1235                      1240                      1245  
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys  
1250                      1255                      1260  
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
1265                      1270                      1275  
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala

1280                      1285                      1290  
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
1295                      1300                      1305  
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
1310                      1315                      1320  
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
1325                      1330                      1335  
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1340                      1345                      1350  
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
1355                      1360                      1365

<210> 2

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> Guide RNA

<400> 2

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaaag 60

ugaguggcac cgagucggug gugcuuuuuu 90