



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0120670  
(43) 공개일자 2018년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 35/30* (2015.01) *A61L 27/36* (2006.01)  
*A61L 27/54* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 5/079* (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 35/30* (2013.01)  
*A61L 27/3604* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7016752

(22) 출원일자(국제) 2016년11월14일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년06월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/061893

(87) 국제공개번호 WO 2017/083852

국제공개일자 2017년05월18일

(30) 우선권주장

62/255,310 2015년11월13일 미국(US)

(71) 출원인

아벨리노 랩 유에스에이, 인크.

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트  
비-2, 아담스 드라이브 1505

대디오니시오 레리

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

무어 타라

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

네스빗 앤드류

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

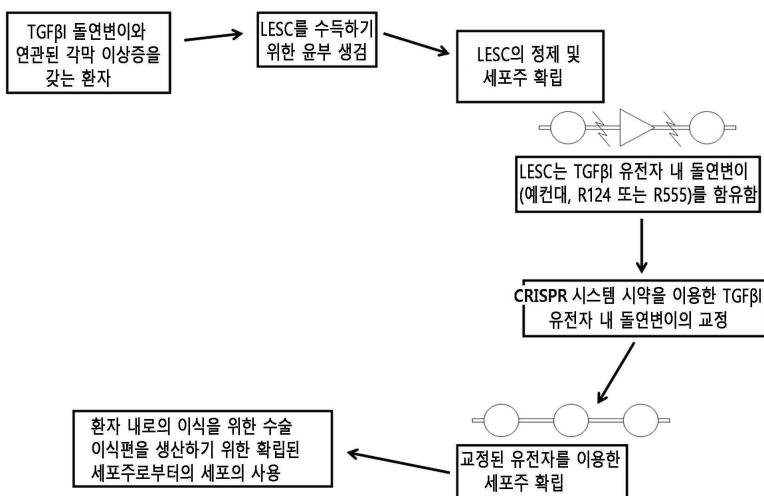
손민

전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 각막 이상증의 치료 방법

**(57) 요약**

이를 필요로 하는 대상체에서 각막 이상증의 치료를 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 일 측면에서, 방법은 대상체로부터 각막 이상증 표적 핵산 내 돌연변이를 포함하는 복수의 줄기세포를 수득하고 복수의 줄기세포의 하나 이상의 세포에서 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써 하나 이상의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계를 포함한다. 조작된 줄기세포는 단리된 후 대상체 내로 이식된다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 CRISPR 시스템을 사용하여 조작된다.

**대표도 - 도1**

(52) CPC특허분류

*A61L 27/3666* (2013.01)

*A61L 27/3695* (2013.01)

*A61L 27/54* (2013.01)

*A61P 27/02* (2018.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*C12N 15/85* (2013.01)

*C12N 5/0621* (2013.01)

*C12N 9/22* (2013.01)

(71) 출원인

**이진**

경기도 용인시 수지구 상현로 71 (상현동)

**조선영**

서울특별시 강남구 학동로 432, 101동 1303호 (삼  
성동, 삼성동롯데아파트)

**무어 타라**

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

**네스빗 앤드류**

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

---

(72) 발명자

**이진**

경기도 용인시 수지구 상현로 71 (상현동)

**조선영**

서울특별시 강남구 학동로 432, 101동 1303호 (삼  
성동, 삼성동롯데아파트)

**대디오니시오 레리**

미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비2,  
1505 아담스 드라이브

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이를 필요로 하는 대상체(subject)에서 각막 이상증을 예방, 개선 또는 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:

줄기세포에서 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써, 조작된 줄기세포를 형성하는 단계; 및

조작된 줄기세포를 대상체 내로 이식하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 하기를 포함하는 방법:

복수의 줄기세포에서 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써, 하나 이상의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계;

하나 이상의 조작된 줄기세포를 단리하는 단계; 및

하나 이상의 조작된 줄기세포를 대상체 내로 이식하는 단계.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 이식 전에 하나 이상의 조작된 줄기세포를 배양하여 복수의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 이식이 복수의 조작된 줄기 세포를 이식하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 이식 전에 조작된 줄기세포를 배양하여 복수의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 이식이 복수의 조작된 줄기 세포를 이식하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 배양이 조작 후에 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 배양이 안정한 세포주를 확립하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기세포가 자가 또는 동종 공여자로부터 수득되는 것인, 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 포함하는 줄기세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 이상증 표적 핵산이 TGF $\beta$  I 표적 핵산인 것인, 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 핵산 돌연변이가 TGF $\beta$  I 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 626의 아미노산 치환을 인코딩하는 것인, 방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 핵산 돌연변이가 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q, 및 H626P로부터 선택되는 아미노산 치환을 인코딩하는 것인, 방법.

### 청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 각각 이상증 표적 핵산이 COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1 표적 핵산인 것인, 방법.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 핵산 돌연변이가 COL4A1 내 Q1334H, COL4A2 내 G683A, COL4A2 내 P718S, COL4A2 내 R517K, COL4A3 내 D326Y, COL4A3 내 H451R, COL4A4 내 V1327M, LOX 내 R158Q, AKAP13 내 A1046T, AKAP13 내 G624V, ZNF469 내 G2358R, SLC29A3 내 S158F, MUC5AC 내 P4493S, CROCC 내 P370S 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 아미노산 치환을 인코딩하는 것인, 방법.

### 청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 핵산 돌연변이가 rs3742207, rs3803230, rs9583500, rs7990383, rs55703767, rs11677877, rs2229813, rs1800449, rs1053411, rs2116780, rs3749350, rs2286194, rs12536657, rs2614668, rs745191, rs12598474, rs10932976, rs5908678, rs35803438, rs132728, rs132729, rs132730, rs859063, rs2893276, rs6687749, rs13189855, rs6876514, rs6876515, rs13361701, rs883764, rs780667, rs780668, rs13166148, rs10941287, rs7907270, rs200922784, rs9435793, rs116300974, 또는 rs2233696에 상응하는 것인, 방법.

### 청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 각각 이상증 표적 핵산이 TGF $\beta$  I, KRT3, KRT12, GSN 또는 UBIAD1 표적 핵산인 것인, 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 핵산 돌연변이가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 인코딩하는 것인, 방법:

(i) TGF $\beta$  I 표적 핵산 내 Leu509Arg, Arg666Ser, Gly623Asp, Arg555Gln, Arg124Cys, Val505Asp, Ile522Asn, Leu569Arg, His572Arg, Arg496Trp, Pro501Thr, Arg514Pro, Phe515Leu, Leu518Pro, Leu518Arg, Leu527Arg, Thr538Pro, Thr538Arg, Val539Asp, Phe540del, Phe540Ser, Asn544Ser, Ala546Thr, Ala546Asp, Phe547Ser, Pro551Gln, Leu558Pro, His572del, Gly594Val, Val613del, Val613Gly, Met619Lys, Ala620Asp, Asn622His, Asn622Lys, Asn622Lys, Gly623Arg, Gly623Asp, Val624\_Val625del, Val624Met, Val625Asp, His626Arg, His626Pro, Val627SerfsX44, Thr629\_Asn630insAsnValPro, Val631Asp, Arg666Ser, Arg555Trp, Arg124Ser, Asp123delins, Arg124His, Arg124Leu, Leu509Pro, Leu103\_Ser104del, Val113Ile, Asp123His, Arg124Leu, 및/또는 Thr125\_Glu126del;

(ii) KRT3 표적 핵산 내 Glu498Val, Arg503Pro, 및/또는 Glu509Lys;

(iii) KRT12 표적 핵산 내 Met129Thr, Met129Val, Gln130Pro, Leu132Pro, Leu132Va, Leu132His, Asn133Lys, Arg135Gly, Arg135Ile, Arg135Thr, Arg135Ser, Ala137Pro, Leu140Arg, Val143Leu, Val143Leu, Ile391\_Leu399dup, Ile426Val, Ile426Ser, Tyr429Asp, Tyr429Cys, Arg430Pro, 및/또는 Leu433Arg;

(iv) GSN 표적 핵산 내 Asp214Tyr; 및

(v) UBIAD1 표적 핵산 내 Ala97Thr, Gly98Ser, Asn102Ser, Asp112Asn, Asp112Gly, Asp118Gly, Arg119Gly, Leu121Val, Leu121Phe, Val122Glu, Val122Gly, Ser171Pro, Tyr174Cys, Thr175Ile, Gly177Arg, Lys181Arg, Gly186Arg, Leu188His, Asn232Ser, Asn233His, Asp236Glu, 및/또는 Asp240Asn.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 줄기세포가 윤부 상피 줄기세포, 경구 점막 상피 줄기세포,

치아 줄기세포, 모낭 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 제대 라이닝 (lining) 줄기세포, 또는 배아 줄기세포인 것인, 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 복수의 줄기세포가 윤부 상피 줄기세포인 것인, 방법.

### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 이상증이 레이저 눈 수술 후에 발생한 것인, 방법.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 미리 결정된 빈도로 이식을 반복하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 돌연변이가 한 세트의 핵산 조작 시약을 단리된 복수의 줄기세포 내로 도입함으로써 조작되고, 그로 인해 핵산 조작 시약이 복수의 줄기세포의 하나 이상에서 상기 핵산 돌연변이를 교정하는 것인, 방법.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 핵산 조작 시약이 전기천공, 형질감염 또는 바이러스 전달을 사용하여 복수의 줄기세포 내로 도입되는 것인, 방법.

### 청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 한 세트의 핵산 조작 시약이 징크 핑거 뉴클레아제, 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (TALENs), 재가공된 귀소 뉴클레아제 (reengineered homing nuclease), RNA 간섭 (RNAi) 시약, 또는 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) (CRISPR)/뉴클레아제 시스템 시약을 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 조작 시약이 하기를 포함하는 클러스터형의 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR)/뉴클레아제 시스템 시약이고:

복수의 줄기세포 내에서 각막 이상증 표적 핵산과 혼성화하는 가이드 RNA 핵산; 및

뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레아제 핵산;

그로써 가이드 RNA가 표적 핵산을 표적하고 뉴클레아제가 표적 핵산을 절단하는 것인, 방법.

### 청구항 25

제24항에 있어서, 가이드 RNA가 검출가능한 표지를 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 가이드 RNA의 검출가능한 표지가 핵산 바코드 또는 형광 바코드 표지인 것인, 방법.

### 청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 조작 시약이 각막 이상증 표적 핵산의 야생형 베전 또는 이의 단편을 포함하는 복구 핵산(repair nucleic acid)을 추가로 포함하고, 그로써 가이드 RNA가 표적 핵산을 표적하고 뉴클레아제가 표적 핵산을 절단함으로써 표적 핵산 절단 부위를 생성하고, 그로 인해 복구 핵산이 표적 핵산 절단 부위의 생성 후에 각막 이상증 표적 핵산과 상동적으로 재조합할 수 있는 것인, 방법.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 복구 핵산이 검출가능한 표지를 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 29

제28항에 있어서, 복구 핵산의 검출가능한 표지가 핵산 바코드 또는 형광 바코드 표지인 것인, 방법.

### 청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, CRISPR/뉴클레아제 시스템 시약이 비-상동성 말단-연결 (non-homologous end-joining) (NHEJ) 경로에 관여하는 유전자를 억제함으로써 복수의 줄기세포에서 상동 재조합의 빈도를 증가시키는 하나 이상의 시약을 추가로 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레아제가 Cas9 뉴클레아제인 것인, 방법.

### 청구항 32

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 조작이 가공된 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR)/CRISPR 연관 단백질 9 (Cas9) 시스템을 줄기세포 내로 도입하는 단계를 포함하고, 여기서 CRISPR/Cas9 시스템이 Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자 및 단일 가이드 RNA (sgRNA)를 포함하는 적어도 하나의 벡터를 포함하고, Cas9 뉴클레아제 및 상기 sgRNA가 자연적으로 함께 발생하지 않는 것인, 방법.

### 청구항 33

제32항에 있어서, sgRNA가 (i) CRISPR 표적화 RNA (crRNA) 서열, 및 (ii) 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA) 서열을 포함하고, crRNA 서열 및 tracrRNA 서열이 자연적으로 함께 발생하지 않는 것인, 방법.

### 청구항 34

제33항에 있어서, tracrRNA가 서열번호: 2 또는 6의 뉴클레오티드 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 뉴클레아제가 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 스타필로코커스 (*Staphylococcus*), 또는 이들의 변형체로부터인 것인, 방법.

### 청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 뉴클레아제가 서열번호: 4 또는 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자가 서열번호: 3 또는 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, sgRNA 및 Cas9 뉴클레아제가 동일한 벡터 상에 포함되는 것인, 방법.

### 청구항 39

하기를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 각각 이상증의 치료를 위한 키트:

각각 이상증 표적 핵산과 혼성화하는 가이드 RNA 핵산; 및

뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레아제 핵산.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 각막 이상증 표적 핵산의 야생형 버전 또는 이의 단편을 포함하는 복구 핵산을 추가로 포함하는, 키트.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명의 개시는 일반적으로 각막 이상증의 치료를 위한 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 개시는 유전적 돌연변이와 연관된 각막 이상증의 치료를 위한 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]

각막 이상증은 눈의 외층 (각막)에서의 유전적 장애의 한 그룹이다. 예를 들어, 각막 이상증은 눈의 투명한 전면부인, 각막의 양측에서 비정상적인 물질의 침착을 특징으로 할 수 있다. 각막 이상증에는 다음과 같은 4가지 IC3D 범주의 각막 이상증을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다 (예컨대, Weiss et al., Cornea 34(2): 117-59 (2015) 참조): 상피 및 상피하 이상증, 상피-기질 TGF $\beta$ I 이상증, 기질 이상증 및 내피 이상증. 각막 이상증은 형질전환 성장 인자, 베타-유도성 (*TGF $\beta$ I*), 케라틴 3 (*KRT3*), 케라틴 12 (*KRT12*), *GSN*, 또는 *UbiA* 프레닐트랜스퍼라제 (prenyltransferase) 도메인 함유 1 (*UBIADI*)에 위치한 돌연변이에 의해 유발될 수 있다.

[0003]

예를 들어, 이러한 각막 이상증의 하위집합인, 상피-기질 각막 이상증은 형질전환 성장 인자 베타 유도성 (*TGF $\beta$ I*) 유전자 내 돌연변이와 연관된 것으로 알려져 있다. *TGF $\beta$ I* 유전자는 타입 I, II 및 IV 콜라겐에 결합하는 아르기닌-글리신-아스파르트산 (RGD) 함유 단백질을 인코딩한다. RGD 모티프는 세포 접착을 조절하는 다수의 세포외 기질 단백질에서 발견되고 여러 인테그린에 대한 리간드 인식 서열로서 제공된다. 일부 사례에서, 상피-기질 각막 이상증은 서로 구별되며 혼탁의 임상적 양상, 질환의 임상적 특징, 및 침전물의 조직병리학적 염색 특성에 기초하여 아형으로 나누어진다. 임의의 특정 작동 이론에 구애됨이 없이, *TGF $\beta$ I* 유전자 내 특정 돌연변이가 이러한 각막 이상증과 연관된 특정 표현형을 설명하고 상이한 표현형의 임상적 특징을 설명하는 각막 혼탁이 돌연변이된 인코딩되는 *TGF $\beta$ I* 단백질의 전부 또는 일부의 침착에 기인하는 것으로 이해된다. 과립 각막 이상증 타입 II로도 알려진, 아벨리노 (Avelino) 각막 이상증은 표면 중심 각막 기질에서 불규칙한-모양의, 잘-구획된 과립 침전물 및 점진적인 시각 장애를 특징으로 하는 상피-기질 각막 이상증의 한 형태이다. 아벨리노 각막 이상증을 앓고 있는 이형접합 환자는 삶의 후반기에 심해지는 나이에 따라 증가하는 시력 저하를 갖는다. 대조적으로, 동형접합 환자는 6세까지 완전히 시력이 상실될 정도로 심각하다.

[0004]

원추각막 (keratoconus) (KTCN)은 양성의 가족 병력을 보유하는 대상체(subject)의 대략 6 내지 23.5%에서 가장 흔한 각막 확장성 장애이다 (Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., *Reproductive Sys Sexual Disord* 2012; S: 6). 보고된 KTCN의 유병률은 10만 명당 8.8명 내지 54.4명의 범위이다. 이 유병률의 차이는 부분적으로 이 질병을 진단하는데 사용된 상이한 기준에 기인한다 (Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., *Reproductive Sys Sexual Disord* 2012; S: 6; 및 Nowak, D., Gajecka, M., *Middle East Afr J Ophthalmol* 2011; 18(1): 2-6). KTCN의 유전적 원인을 규명하려는 많은 연구가 이 문헌에 존재한다. 이 연구들은 실험적 매개변수에 따라서 질환의 병인에 기여하는 것으로 여겨지는 수많은 가능한 유전적 변형 또는 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)을 밝혀냈다. 원추 각막의 과정 동안에, 중심 또는 중심주위 (paracentral) 각막은 불규칙한 난시를 일으키는 점진적인 얇아짐 (thinning)과 경사침 (steepening)을 거친다. 유전적 패턴은 두드러지거나 예측 가능하지 않지만 양성의 가족 병력이 보고되었다. 원추각막의 발병률은 종종 2000명 중 1명으로 보고된다. 원추각막은 보우만 층 (Bowman's layer)의 단편화, 기질 및 위에 놓인 (overlying) 상피의 얇아짐, 테스메막 (Descemet's membrane)의 중첩 또는 파열, 및 다양한 양의 확산 각막 흉터를 포함하는, 후속 병리학적 소견을 나타낼 수 있다.

[0005]

각막 이상증의 초기 단계는 각막 부종을 줄이기 위해 고장성 (hypertonic) 약 및 연고로 초기에 치료되고 외과적 개입 전에 중상 호전을 제공할 수 있다. 각막 이상증에 의해 야기된 준최적 시력은 일반적으로 각막 이식의 형태로 외과적 개입을 요구한다. 그러나 공여자 각막 조직의 이용가능성 부족은 외과적 수술의 이용을 제한한다. 또한, 공여자 이식편에서 질환의 재발이 각막 이식 후 발생할 수 있다. 각막 이식 후 발생할 수 있는

다른 합병증에는, 예를 들어 흉터, 백내장 형성, 이식 절개로부터의 액체 누출, 감염 및 시련 문제가 포함된다. 따라서, 각막 이상증의 치료를 위한 대안적인 방법이 요구된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006]

이를 필요로 하는 대상체에서 각막 이상증의 치료를 위한 조성물, 방법 및 시스템이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증은 과립 각막 이상증 타입 II이다. 다른 실시양태에서, 각막 이상증은 원추각막이다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어 *TGFBI*, *KRT3*, *KRT12*, *GSN*, 및/또는 *UBIAD1* 유전자에서의 단일-뉴클레오티드 다형성 (SNP)과 연관이 있다.

[0007]

일 측면에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 각막 이상증을 예방, 개선 또는 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0008]

일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터의 줄기세포 내 각막 이상증 표적 핵산에서 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써 조작된 줄기세포를 형성하는 단계; 및 조작된 줄기세포를 대상체에 이식하는 단계를 포함한다. 부가적 실시양태에서, 방법은 이식 전에 조작된 줄기세포를 배양함으로써 복수의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계를 추가로 포함하고, 이식은 복수의 조작된 줄기세포를 포함한다. 추가 실시양태에서, 방법은 대상체로부터의 복수의 줄기세포에서 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써 하나 이상의 조작된 줄기 세포를 형성하는 단계; 하나 이상의 조작된 줄기세포를 단리하는 단계; 및 하나 이상의 조작된 줄기 세포를 이식하는 단계를 포함한다. 다른 추가 실시양태에서, 방법은 이식 전에 하나 이상의 조작된 줄기세포를 배양함으로써 복수의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계를 포함하고, 이식은 복수의 조작된 줄기세포를 이식하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 포함하는 줄기세포를 대상체로부터 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0009]

일부 실시양태에서, 방법은 a) 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 포함하는 복수의 줄기세포를 대상체로부터 수득하는 단계; b) 복수의 줄기세포의 하나 이상의 줄기세포에서 핵산 돌연변이를 조작하여 상기 핵산 돌연변이를 교정함으로써, 하나 이상의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계; c) 하나 이상의 조작된 줄기세포를 단리하는 단계; 및 d) 하나 이상의 조작된 줄기세포를 대상체에 이식하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 *TGF $\beta$  I* 표적 핵산이다. 다른 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 *COL4A1-4*, *LOX*, *SPARC*, *LRRN1*, *HGF*, *AKAP13*, *ZNF469*, *ATG12P2*, *GS1-256022.5*, *PLEKHA6*, *APOL4*, *SLC44A3*, *SLC6A18*, *SLC29A3*, *RANBP3L*, *KCNMA1*, *MUC5AC*, *CROCC*, *ATHL1*, 또는 *PLP1* 표적 핵산이다.

[0010]

일부 실시양태에서, 배양은 조작 후에 수행된다.

[0011]

일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 단리된 복수의 줄기세포 내로 한 세트의 핵산 조작 시약을 도입함으로써 조작되고, 그로 인해 핵산 조작 시약은 복수의 줄기세포의 하나 이상에서 핵산 돌연변이를 교정한다. 추가 실시양태에서, 핵산 조작 시약은 전기천공, 형질감염 또는 바이러스 전달을 이용해 복수의 줄기세포 내로 도입된다.

[0012]

특정 실시양태 및 상기의 어느 하나에 따라서, 핵산 돌연변이는 *TGF $\beta$  I* 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 666의 아미노산 치환을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *R124C*, *R124H*, *R124L*, *R555W*, *R555Q*, 및 *H626P*로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 인코딩한다.

[0013]

일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A1* 내 아미노산 치환 *Q1334H*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A2* 내 아미노산 치환 *G683A*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A2* 내 아미노산 치환 *P718S*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A2* 내 아미노산 치환 *R517K*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A3* 내 아미노산 치환 *D326Y*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A3* 내 아미노산 치환 *H451R*을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *COL4A4* 내 아미노산 치환 *V1327M*을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *LOX* 내 아미노산 치환 *R158Q*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *AKAP13* 내 아미노산 치환 *A1046T*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *AKAP13* 내 아미노산 치환 *G624V*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *ZNF469* 내 아미노산 치환 *G2358R*을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *SLC29A3* 내 아미노산 치환 *S158F*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *MUC5AC* 내 아미노산 치환 *P4493S*를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 *CROCC* 내 아미노산 치환 *P370S*를 인코딩한다.

[0014]

일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3742207 (예컨대, 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information)의 dbSNP 데이터베이스에서 rs3742207로 식별되는 SNP)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3803230에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9583500에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs7990383에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs55703767에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs11677877에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2229813에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1800449에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1053411에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2116780에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3749350에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12536657에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2614668에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs745191에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12598474에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10932976에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs5908678에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs35803438에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132728에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132729에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132730에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs859063에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2893276에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13189855에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876514에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876515에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13361701에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs883764에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs780667에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs780668에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13166148에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10941287에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs200922784에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9435793에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs116300974에 상응한다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2233696에 상응한다.

[0015]

일부 실시양태 및 상기의 어느 하나에 따라서, 줄기세포는 자가 또는 동종 공여자로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 각각 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 포함하는 줄기세포를 수득하는 단계를 포함한다.

[0016]

특정 실시양태 및 상기의 어느 하나에 따라서, 복수의 줄기세포는 윤부 상피 줄기세포, 경구 점막 상피 줄기세포, 치아 줄기세포, 모낭 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 제대 라이닝 (lining) 줄기세포, 또는 배아 줄기세포이다. 특정 실시양태에서, 복수의 줄기세포의 세포는 윤부 상피 줄기세포이다.

[0017]

일부 실시양태에서, 한 세트의 핵산 조작 시약은 징크 핑거 뉴클레아제, 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (TALENs), 재구조화된 귀소 뉴클레아제 (reengineered homing nuclease), RNA 간섭 (RNAi) 시약, 또는 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) (CRISPR)/ 뉴클레아제 시스템 시약을 포함한다.

[0018]

특정 실시양태에서, 핵산 조작 시약은 a) 복수의 줄기세포의 DNA 분자 내 각각 이상증 표적 핵산과 혼성화하는 가이드 RNA 핵산; 및 b) 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레아제 핵산을 포함하는, 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR)/뉴클레아제 시스템 시약이다. 이러한 실시양태에서, 가이드 RNA는 표적 핵산을 표적하고 (예컨대, 그와 혼성화하고) 뉴클레아제는 DNA 분자를 절단한다. 일부 실시양태에서, CRISPR/뉴클레아제 시스템 시약은 c) 각각 이상증 표적 핵산의 야생형 버전 또는 이의 단편을 포함하는 복구 핵산(repair nucleic acid)을 추가로 포함한다. 이러한 실시양태에서, 가이드 RNA는 표적 핵산과 혼성화하고 뉴클레아제는 DNA 분자

를 절단함으로써 표적 핵산 절단 부위를 생성하고, 그로 인해 복구 핵산은 표적 핵산 절단 부위의 생성 후에 각 막 이상증 표적 핵산과 상동적으로 재조합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA 및/또는 복구 핵산은 검출가능한 표지를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출가능한 표지는 핵산 바코드 또는 형광 바코드 표지이다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 TGF $\beta$  I 표적 핵산이다. 다른 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1 표적 핵산이다. 일부 실시양태에서, COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1 표적 핵산의 둘 이상이 조작된다. 일부 실시양태에서, TGF $\beta$  I 표적 핵산 및 COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 및 PLP1 표적 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표적 핵산이 조작된다.

[0019] 일부 실시양태에서, CRISPR/뉴클레아제 시스템 시약은 비-상동성 말단-연결 (non-homologous end-joining) (NHEJ) 경로에 관여하는 유전자를 억제함으로써 복수의 줄기세포에서 상동 재조합의 빈도를 증가시키는 하나 이상의 시약을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.

[0020] 예시적 실시양태 및 상기의 어느 하나에 따라서, 각막 이상증은 레이저 눈 수술 후에 발생한다.

[0021] 추가 실시양태 및 상기의 어느 하나에 따라서, 방법은 단리된 하나 이상의 조작된 줄기세포로부터 안정한 세포주를 확립하는 단계를 추가로 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 방법은 d) 1회 이상의 미리 결정된 빈도 (예컨대, 매주, 매월, 분기별, 연 2회, 매년 등)로 하나 이상의 조작된 줄기세포를 대상체에 이식하는 단계를 반복하는 것을 추가로 포함한다.

[0023] 두 번째 측면에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 각막 이상증의 치료를 위한 키트가 본원에 제공된다. 키트는 각막 이상증 표적 핵산과 혼성화하는 가이드 RNA 핵산; 및 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레아제 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 또한 각막 이상증 표적 핵산의 야생형 버전 또는 이의 단편을 포함하는 복구 핵산을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0024] 본 발명의 시스템 및 방법의 전술한 구현예뿐만 아니라 이의 추가적인 구현예를 보다 잘 이해하기 위하여, 참조 번호와 같이 도면 전체에 걸쳐 대응하는 부분을 지칭하는 하기 도면과 함께, 하기 구현예의 설명에 대해 참조가 이루어져야 한다.

도 1은 본원에 기술된 본 발명의 일 실시양태의 개요를 보여주는 모식도이다.

도 2는 본원에 제공된 본 발명을 이용하여 복구될 수 있는 예시적인 돌연변이를 보여주는 차트이다.

도 3은 새로운 PAM에 대한 변형체의 위치를 나타낸다.

도 4는 스트렙토코커스 피로젠스 Cas9 뉴클레아제를 사용하는 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)를 포함하는, CRISPR/Cas9 시스템의 예시적인 벡터를 설명한다.

도 5는 야생형 및 돌연변이 케라틴 12 (K12) 대립유전자 (allele)를 표적하는 sgRNA의 예시적 고안을 설명한다. K12-L132P 대립유전자 상에서 발견된 SNP-유래 PAM를 사용하는 sgRNA를 고안하였다 (적색). 이 PAM는 야생형 대립유전자가 부재한다. 야생형 및 돌연변이 K12 대립유전자 둘 다를 표적하는 제2 sgRNA (녹색)를 또한 고안하였고 양성 대조군으로 사용하였다.

도 6은 외인성 발현 컨스트럭트를 사용하는 sgK12LP의 대립유전자 특이성 및 효능의 평가를 설명한다. 야생형 및 돌연변이 K12에 대한 외인성 발현 컨스트럭트를 sgK12LP의 대립유전자-특이성 및 효능을 시험하기 위해 사용하였다. (a) 이중 루시퍼라제 어세이는 sgK12LP 플라스미드의 대립유전자-특이성을 입증한 반면, 효능은 sgK12 컨스트럭트의 효능에 필적할 만한 것으로 나타났다. N=8 (b) 웨스턴 블로팅은 처리되지만 K12 야생형 단백질을 발현하는 세포와 비교하여 sgK12LP로 처리된 세포에서 K12-L132P 단백질의 상당한 감소와 함께 이러한 특성을 더욱 입증하였다.  $\beta$ -액틴을 로우딩 대조군으로 사용하였다. (c) 야생형 및 돌연변이 대립유전자 둘 다를 발현하는 세포에서 총 K12에 대한 정량적 역전사효소-PCR은 mRNA 발현에서의 낙다운을 입증하였다. N=4 (d) 이어서 이 mRNA 낙다운의 대립유전자 비율을 파이로시퀀싱에 의해 정량하여, KRT12 대립유전자 둘 다를 동시-발현하고 sgK12LP로 처리된 세포에서 돌연변이 대립유전자의 대립유전자 낙다운을 확인하였다. N=4, \*P<0.05,

\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

도 7은 생체 내 sgK12LP-유도성 NHEJ를 나타낸다. 기질내 주입 후 24시간째에 마우스의 각막 상피에서 GFP 발현이 관찰되었고, 이는 각막 상피를 형질감염시키는 기질내 플라스미드 주입의 효능을 입증한다 (a; N=2). 주입 후 48시간째에는 GFP 발현이 전혀 관찰되지 않았다. sgK12LP 컨스트럭트가 주입된 인간 K12-L132P 이형접합 마우스로부터의 gDNA의 시퀀싱은 KRT12-L132P 대립유전자의 절단에 기인한 거대 결절 및 NHEJ의 유도를 입증하였다. 시퀀싱된 13개 클론 중에서, 5개가 NHEJ를 거치는 것으로 밝혀졌다 (b).

도 8은 TGFBI 돌연변이 R514P (A), L518R (B), 및 L509R (C)에 대해 고안된 SNP 유래 PAM 가이드 RNA를 사용한 결과를 나타내고, 루시퍼라제 발현을 이용하여 야생형 및 돌연변이 대립유전자 발현을 평가하였다. 양성 대조군 (sgW 또는 sgWT) 가이드는 WT (청색 막대) 및 MUT (적색 막대) 대립유전자 둘 다를 절단하도록 고안되었고 상기에 나타난 바와 같이 예상대로 두 대립유전자 모두를 절단하였다. L518R에 대해 사용된 가이드 (sgM 또는 sgMUT)는 돌연변이 대립유전자 (적색 막대)을 최소한으로 절단하면서 최대 대립유전자 특이성을 나타낸다. 음성 대조군 가이드 (sgN 또는 sgNSC)는 예상대로 WT 또는 MUT DNA의 어느 것도 절단하지 않았다.

도 9는 R124에 대해 고안된 돌연변이 대립유전자 특이적 가이드 RNA를 사용한 결과를 나타낸다. TGFBI 돌연변이 및 루시퍼라제 발현을 사용하여 야생형 및 돌연변이 대립유전자 발현을 평가하였다. 양성 대조군 sgWT 가이드는 WT 및 MUT 대립유전자 둘 다를 절단하도록 고안되었고 상기에 나타난 바와 같이 예상대로 두 대립유전자 모두를 절단한다 (각 그래프의 청색 및 적색 막대에서 중간 막대). 20мер (mer) 길이를 갖는 가이드는 더 많은 WT 대립유전자 DNA 편집 (editing)을 나타내었다. 18мер로 짧아진 대립유전자 특이적 RNA 가이드를 사용하여 어세이를 반복하였다. 이는 WT DNA 절단의 양을 감소시켰다 (그래프의 우측 패널 및 그래프 상의 우측 막대 (청색 막대)).

도 10은 좌안은 비-특이적 음성 대조군 sgRNA로 형질감염된 반면, 우안은 sgRNA 표적 Luc2로 형질감염되었음을 나타낸다.

도 11은 스트렙토코커스 피로젠스 (Spy) 및 스타필로코커스 아우레우스 (Sau)로부터의 예시적인 sgRNA 서열, Cas9 뉴클레아제의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 설명한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### I. 서론

각막 이상증은 눈의 외층 (각막)에서의 유전적 장애의 한 그룹이다. 예를 들어, 각막 이상증은 눈의 투명한 전면부인, 각막의 양측에서 비정상적인 물질의 침착을 특징으로 하는 유전성 장애의 한 그룹이다. 이러한 각막 이상증의 부분집합인, 상피-기질 각막 이상증은 형질전환 성장 인자 베타 유도성 ( $TGF\beta I$ ) 유전자 내 돌연변이와 연관된 것으로 알려져 있다.  $TGF\beta I$  유전자는 타입 I, II 및 IV 콜라겐에 결합하는 RGD-함유 단백질을 인코딩한다.

일부 경우에, 상피-기질 각막 이상증은 서로 구별되며 혼탁의 임상적 양상, 질환의 임상적 특징, 및 침전물의 조직병리학적 염색 특성에 기초하여 아형으로 나누어진다. 임의의 특정 작동 이론에 구애됨이 없이,  $TGF\beta I$  유전자 내 특정 돌연변이가 이러한 각막 이상증과 연관된 특이적 표현형을 설명하고, 상이한 표현형의 임상적 특징을 설명하는 각막 혼탁이 돌연변이된 인코딩되는  $TGF\beta I$  단백질의 전부 또는 일부의 침착에 기인하는 것으로 여겨진다.

조직 복구 및 재생을 위한 줄기세포-기반 요법은 각막 이상증을 비롯한 다수의 안구 장애의 유망한 치료를 제공한다. 줄기세포는 다양한 성숙한 세포 계통을 생성하기 위해 자가-재생 및 분화를 할 수 있다. 이러한 세포의 이식은 표적 조직 (예컨대, 각막 조직)의 재구성을 위한 임상적 도구로 사용될 수 있고, 그로써 생리학적 및 해부학적 기능을 회복시킨다.

핵산 조작 시약 개발의 진보는 줄기세포에서 핵산 (예컨대, DNA 및 RNA)의 단순하고 효율적인 조작을 가능케 하였다. CRISPR 시약의 개발은 DNA-인코딩된, RNA 매개된, DNA- 또는 RNA-표적 서열 특이적 표적화를 제공하였다. CRISPR 시스템은, 예를 들어 표적 세포 계놈 내로 공여자 DNA의 정확한 삽입을 위해 사용될 수 있다. 이러한 핵산 조작 시약은 연구자들이 특정 계놈 요소를 정확하게 조작할 수 있게 해주었다.

본 발명 개시는 적어도 부분적으로 줄기세포 기반 접근법을 이용하여 안구 질환의 치료를 위한 방법의 발견에 기초한다. 특정 실시양태에서, 안구 이상증에 대한 치료를 받고 있는 대상체로부터 단리된 줄기세포를 수득하

고 CRISPR 시스템 시약을 사용하여 유전적으로 변형시켜 안구 질환과 연관된 돌연변이 대립유전자를 교정한다.

[0031] 일 측면에서, 각막 이상증의 치료를 위한 방법이 본원에 제공된다 (예컨대, 도 1). 방법은, 예를 들어 대상체로부터의 줄기세포 내 각막 이상증 표적 혼란에서 혼란 돌연변이를 조작하여 상기 혼란 돌연변이를 교정함으로써 조작된 줄기세포를 형성하는 단계; 및 조작된 줄기세포를 대상체에 이식하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 표적 각막 이상증 혼란 내에 혼란 돌연변이를 포함하는 복수의 줄기세포를 수득하는 단계; b) 복수의 줄기세포의 하나 이상의 줄기세포에서 혼란 돌연변이를 조작하여 상기 혼란 돌연변이를 교정함으로써 하나 이상의 조작된 줄기세포를 형성하는 단계; c) 하나 이상의 조작된 줄기세포를 단리하는 단계; 및 d) 하나 이상의 조작된 줄기세포를 대상체에 이식하는 단계를 포함할 수 있다. 본 방법의 특징이 하기에 더욱 상세히 기술된다.

## II. 각막 이상증

[0033] 본원에 제공된 방법은 이를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 각막 이상증의 치료를 위한 것이다.

[0034] 이 방법으로 치료될 수 있는 대상체에는 포유류 대상체, 예컨대 마우스, 랙트, 개, 개코원숭이, 돼지 또는 인간이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 방법은 적어도 1세, 2세, 3세, 5세, 10세, 15세, 20세, 25세, 30세, 35세, 40세, 45세, 50세, 55세, 60세, 65세, 70세, 75세, 80세, 85세, 90세, 95세 또는 100세 연령의 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, "각막 이상증"은 눈의 외층 (각막)에서의 유전적 장애 그룹의 임의의 하나를 지칭한다. 예를 들어, 각막 이상증은 각막의 양측에서 비정상적인 물질의 침착을 특징으로 한다. 각막 이상증은 다음의 4가지 IC3D 범주의 각막 이상증을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다 (예컨대, Weiss et al., Cornea 34(2): 117-59 (2015) 참조): 상피 및 상피하 이상증, 상피-기질 TGF $\beta$  I 이상증, 기질 이상증 및 내피 이상증. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은 상피 기저막 이상증 (EBMD), 메스만 (Meesmann) 각막 이상증 (MECD), 티엘-벤케 (Thiel-Behnke) 각막 이상증 (TBCD), 격자 (Lattice) 각막 이상증 (LCD), 과립 (Granular) 각막 이상증 (GCD), 및 스나이더 (Schnyder) 각막 이상증 (SCD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 부가적 실시양태에서, 본원에서 각막 이상증은 MECD를 제외한다.

[0036] 부가적 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어 형질전환 성장 인자, 베타-유도성 (*TGFBI*), 캐라틴 3 (*KRT3*), 캐라틴 12 (*KRT12*), *GSN*, 및 *UbiA* 프레닐트랜스페라제 도메인 함유 1 (*UBIAD1*)로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자에 위치하는 것들을 포함하는, SNP와 같은, 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기된다. 추가 실시양태에서, SNP 부위는 본원에 나타난 바와 같은 돌연변이 단백질 내 돌연변이 아미노산의 인코딩을 초래한다. 추가 실시양태에서, SNP 부위를 포함하는 돌연변이 서열은 (i) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q15582의 *TGFBI* 내 Leu509Arg, Arg666Ser, Gly623Asp, Arg555Gln, Arg124Cys, Val505Asp, Ile522Asn, Leu569Arg, His572Arg, Arg496Trp, Pro501Thr, Arg514Pro, Phe515Leu, Leu518Pro, Leu518Arg, Leu527Arg, Thr538Pro, Thr538Arg, Val539Asp, Phe540del, Phe540Ser, Asn544Ser, Ala546Thr, Ala546Asp, Phe547Ser, Pro551Gln, Leu558Pro, His572del, Gly594Val, Val1613del, Val1613Gly, Met619Lys, Ala620Asp, Asn622His, Asn622Lys, Asn622Lys, Gly623Arg, Gly623Asp, Val624\_Val625del, Val624Met, Val625Asp, His626Arg, His626Pro, Val627SerfsX44, Thr629\_Asn630insAsnValPro, Val631Asp, Arg666Ser, Arg555Trp, Arg124Ser, Asp123delins, Arg124His, Arg124Leu, Leu509Pro, Leu103\_Ser104del, Val113Ile, Asp123His, Arg124Leu, 및/또는 Thr125\_Glu126del에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 *TGFBI* 단백질; (ii) 예를 들어, 단백질 등재 번호 P12035 또는 NP\_476429.2의 캐라틴 3 단백질 내 Glu498Val, Arg503Pro, 및/또는 Glu509Lys에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 *KRT3* 단백질; (iii) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q99456.1 또는 NP\_000214.1의 *KRT12* 내 Met129Thr, Met129Val, Gln130Pro, Leu132Pro, Leu132Va, Leu132His, Asn133Lys, Arg135Gly, Arg135Ile, Arg135Thr, Arg135Ser, Ala137Pro, Leu140Arg, Val143Leu, Val143Leu, Lle391\_Leu399dup, Ile 426Val, Ile 426Ser, Tyr429Asp, Tyr429Cys, Arg430Pro, 및/또는 Leu433Arg를 갖는 돌연변이 *KRT12* 단백질; (iv) 예를 들어, 단백질 등재 번호 P06396의 *GSN* 내 Asp214Tyr를 갖는 돌연변이 *GSN* 단백질; 및 (v) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q9Y5Z9의 *UBIAD1* 내 Ala97Thr, Gly98Ser, Asn102Ser, Asp112Asn, Asp112Gly, Asp118Gly, Arg119Gly, Leu121Val, Leu121Phe, Val122Glu, Val122Gly, Ser171Pro, Tyr174Cys, Thr175Ile, Gly177Arg, Lys181Arg, Gly186Arg, Leu188His, Asn232Ser, Asn233His, Asp236Glu, 및/또는 Asp240Asn에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 *UBIAD1* 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이 단백질을 인코딩한다. 예를 들어, SNP 부위를 포함하는 돌연변이 서열은 단백질 등재 번호 Q15582의 아미노산 위치 509에 상응하는 아미노산 위치에서 Leu를 Arg로 대체함으로써 변이된 돌연변이 *TGFBI* 단백질의 적어도 일부를 인코딩한다. 이 경우에, SNP 부위에서

의 돌연변이는 단백질 등재 번호 Q15582의 아미노산 위치 509에 상응하는 아미노산 위치에서 돌연변이 아미노산의 인코딩을 담당할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 인간 단백질에서 특정 돌연변이에 "상응하는" 돌연변이는 인간 단백질의 특정 돌연변이의 상응하는 위치에서 발생하는 상이한 종 내 돌연변이를 포함할 수 있다. 또한, 본원에 사용된 바와 같이, 돌연변이 단백질이, 예를 들어, Leu509Arg의 특정 돌연변이를 포함하는 것으로 기술되는 경우, 이러한 돌연변이 단백질은 관련 인간 단백질, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 단백질 등재 번호 Q15582의 TGFB1 단백질 내 특정 돌연변이에 상응하는 돌연변이 부위에서 발생하는 임의의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0037] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 돌연변이는 KRT12 단백질 내 임의의 돌연변이는 제외한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 돌연변이는, 예를 들어 단백질 등재 번호 Q99456.1의 KRT12 내 Leu132Pro에 상응하는 돌연변이는 제외한다. 추가 실시양태에서, 본원에 기술된 SNP는 KRT12 유전자에서 발생하는 임의의 SNP는 제외한다. 다른 추가 실시양태에서, 본원에 기술된 SNP는 KRT12 단백질 내 Leu132Pro 돌연변이를 초래하는 임의의 SNP를 제외한다. SNP는 KRT12 단백질 내 Leu132Pro 돌연변이를 초래하는 PAM 부위에서의 SNP (AAG>AGG)를 추가로 제외할 수 있다.

[0038] 상피-기질 각막 이상증은 라이스-뷔클러 (Reis-Bucklers) 각막 이상증, 티엘-벵케 (Thiel-Behnke) 각막 이상증, 격자 각막 이상증 타입 1, 과립 각막 이상증 타입 1, 및 과립 각막 이상증 타입 2를 포함한다. 기질 각막 이상증은 황반 각막 이상증, 스나이더 각막 이상증, 선천적 기질 각막 이상증, 후부 무정형 각막 이상증, 프랑수아 중심 혼탁 이상증 (central cloudy dystrophy of Francois), 및 프리-데스메 (pre-Descemet) 각막 이상증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상피-기질 각막 이상증의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은 라이스-뷔클러 각막 이상증이다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증은 티엘-벵케 각막 이상증이다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증은 격자 각막 이상증 타입 1이다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증은 과립 각막 이상증 타입 1이다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증은 과립 각막 이상증 타입 2이다. 상피-기질 이상증은 TGF $\beta$  I 내 돌연변이에 의해 야기된다. 본원에 사용된 바와 같이 "형질전환 성장 인자, 베타-유도성", "TGFB1", "TGF $\beta$  I", "BIGH3", "CDB1", "CDG2", "CDG1", "CSD", "CSD1", "CSD2", "CSD3", "EBMD", 및 "LCD1" 모두는 타입 I, II, 및 IV 콜라겐 (등재 번호: NM\_00358 및 MP\_000349 (인간) 및 NM\_009369 및 MP\_033395 (마우스))에 결합하는 RGD-함유 단백질을 지칭한다. 인간에서, TGF $\beta$  I는 TGFB1 유전자, 유전자좌 5q31에 의해 암호화된다. RGD 모티프는 세포 접착을 조정하는 다수의 세포외 기질 단백질에서 발견되고 여러 인테그린에 대한 리간드 인식 서열로서 제공된다. TGF $\beta$  I는 형질전환 성장 인자-베타에 의해 유도되고 세포 접착을 억제하도록 작용한다. TGFB1 유전자 내 돌연변이인, 상피-기질 이상증에서, TGF $\beta$  I 구조는 비정상이고 각막에서 불용성 돌연변이 TGF $\beta$  I 또는 이의 단백분해 단편의 축적이 일어난다.

[0039] 다른 실시양태에서, 대상체는 과립 각막 이상증 타입 II를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, "과립 각막 이상증 타입 II", "아벨리노 각막 이상증," "과립 각막 이상증 타입 2" 및 "조합된 과립-격자 각막 이상증" 모두는 염색체 5q31 상에 위치한, TGFB1 유전자 내 돌연변이에 의해 야기되는 과립 각막 이상증의 상염색체 우성 형태를 지칭한다. 일부 경우에, 과립 각막 이상증 타입 II는 표면 중심 각막 기질에서 불규칙한-모양의, 잘-구획된 과립 침전물 및 점진적인 시각 장애를 특징으로 한다. 과립 각막 이상증 타입 II를 앓고 있는 이형접합 환자는 나이가 듬에 따라 시력 상실이 증가하고 삶의 후반기에는 더 심해진다. 병변은 생애 처음 10년 이내에 나타나고 3세에 분명해질 수 있다. 과립 각막 이상증 타입 II의 발병은 일반적으로 동형접합 환자에서 더 일찍 일어나고 경증의 각막 침식을 동반할 수 있다. 시력은 대개 상태 진행의 후기까지 양호한 상태로 유지된다. 혼탁은 초기에는 표면의 작은 희끄무레한 (whitish) 점들이다. 그 후에, 고리 또는 별-모양의 기질 혼탁이 발생한다. 최종 단계 혼탁은 보다 피상적이고 반투명하며 전방 기질에서 합쳐질 수 있다.

[0040] 일부 실시양태에서, 대상체는 원추각막을 갖는다. 원추각막 (KTCN)은 양성의 가족 병력을 보유하는 대상체의 대략 6 내지 23.5%에서 가장 혼한 각막 확장성 장애이다 (Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., *Reproductive Sys Sexual Disord* 2012; S: 6). 보고된 KTCN의 유병률은 10만 명당 8.8명 내지 54.4명의 범위이다. 이 유병률의 차이는 부분적으로 이 질병을 진단하는데 사용된 상이한 기준에 기인한다 (Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., *Reproductive Sys Sexual Disord* 2012; S: 6; 및 Nowak, D., Gajecka, M., *Middle East Afr J Ophthalmol* 2011; 18(1): 2-6). KTCN의 유전적 원인을 규명하려는 많은 연구가 이 문헌에 존재한다. 이 연구들은 실험적 매개변수에 따라서 질환의 병인에 기여하는 것으로 여겨지는 수많은 가능한 유전적 변형체 또는 단일 SNP를 밝혀냈다.

[0041] 이전에는, 이형접합체 개인이 라식 (LASIK) 레이저 눈 수술 후 시력 상실의 가속화에 매우 취약했던 것으로 확인되었다. 놀랍게도, 수술 2년 후에 증가하는 공격성을 갖는 이들 환자에서 각막의 증가된 혼탁이 관찰되었고,

결국 완전한 시력의 상실을 초래하였다 (Jun, R. M. et al., *Ophthalmology*, 111:463, 2004). 이전에는, 라식 또는 엑시머 (Excimer) 레이저 수술이 각막 이상증을 앓고 있는 환자의 시야 흐려짐 (blurriness)을 제거할 것이라는 기대를 가지고 눈 수술이 수행되었다. LASIK 수술의 가상의 30만 건의 경우, 과립 각막 이상증 타입 II를 앓고 있는 이형접합 환자의 최소 추정치의 1/1000을 기준으로 하면, 300명의 사람들이 시력을 상실했을 것이다. 라식 수술을 받은 환자는 주로 생산적인 활동을 수행하는 20대 및 30대가 많다. 또한, 미국에서 2000년에 라식 수술이 승인된 후, 라식 수술을 받은 과립 각막 이상증 타입 II를 앓고 있는 아프리칸 아메리칸 환자는 시력을 상실한 것으로 나타났고, 이는 전 세계적으로 다수의 유사한 사례가 발생하였을 것으로 추측된다.

[0042] 일부 실시양태에서, 과립 각막 이상증 타입 II를 갖는 대상체는 TGF $\beta$  I 내 돌연변이에 대해 동형접합이다. 다른 실시양태에서, 과립 각막 이상증 타입 II를 갖는 대상체는 TGF $\beta$  I 내 돌연변이에 대해 이형접합이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 TGF $\beta$  I 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 626의 치환을 인코딩하는 돌연변이를 갖는다. 특정 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q, 및 H626P로부터 선택된 아미노산 치환을 인코딩한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 과립 각막 이상증 타입 I를 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 과립 각막 이상증 타입 I를 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100세이다.

[0044] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 과립 각막 이상증 타입 II를 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 과립 각막 이상증 타입 II를 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100세이다.

[0045] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 격자 각막 이상증 타입 1을 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 격자 각막 이상증 타입 1을 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100세이다.

[0046] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 라이스-뷔클러 각막 이상증을 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 라이스-뷔클러 각막 이상증을 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100세이다.

[0047] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 티엘-벵케 각막 이상증을 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 티엘-벵케 각막 이상증을 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100세이다.

[0048] 일부 실시양태에서, 대상체는 각막원추를 가지며 다음의 각막 표적 핵산 중 하나에서의 돌연변이에 대해 동형접

합이다: COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1. 다른 실시양태에서, 대상체는 각막원추를 가지며 다음의 각막 표적 핵산 중 하나에서의 돌연변이에 대해 이형접합이다: COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1.

[0049] 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A1에서 아미노산 치환 Q1334H를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A2에서 아미노산 치환 G683A를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A2에서 아미노산 치환 P718S를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A2에서 아미노산 치환 R517K를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A3에서 아미노산 치환 D326Y를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 COL4A3에서 아미노산 치환 H451R을 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 LOX에서 아미노산 치환 R158Q를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 AKAP13에서 아미노산 치환 A1046T를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 AKAP13에서 아미노산 치환 G624V를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 ZNF469에서 아미노산 치환 G2358R을 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 SLC29A3에서 아미노산 치환 S158F를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 MUC5AC에서 아미노산 치환 P4493S를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 CROCC에서 아미노산 치환 P370S를 인코딩하는 핵산 돌연변이를 갖는다.

[0050] 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3742207 (예컨대, 국립생물공학정보센터의 dbSNP 데이터베이스에서 rs3742207로 식별되는 SNP)에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3803230에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9583500에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs7990383에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs55703767에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs11677877에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2229813에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1800449에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1053411에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2116780에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3749350에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2286194에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12536657에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2614668에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs745191에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12598474에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10932976에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs5908678에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs35803438에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132728에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132729에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132730에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs859063에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2893276에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6687749에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13189855에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876514에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876515에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13361701에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs883764에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다.

rs780667에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs780668에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13166148에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10941287에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs7907270에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs200922784에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9435793에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs116300974에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2233696에 상응하는 핵산 돌연변이를 갖는다.

[0051] 특정 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 원추각막을 가지며 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100세이다. 일부 실시양태에서, 치료를 받고 있는 대상체는 원추각막을 가지며 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100세이다.

[0052] 특정 실시양태에서, 본 발명의 치료를 받고 있는 대상체는 과립 각막 이상증 타입 II를 가지며 또한 레이저 눈 수술을 받았다. 일부 실시양태에서, 치료는 레이저 눈 수술 후 6개월 이하, 1년 이하, 1.5년 이하, 2년 이하, 2.5년 이하, 3년 이하, 3.5년 이하, 4년 이하, 4.5년 이하, 5년 이하, 5.5년 이하, 6년 이하, 6.5년 이하, 7년 이하, 7.5년 이하, 8년 이하, 8.5년 이하, 9년 이하, 9.5년 이하, 10년 이하, 15년 이하, 20년 이하, 25년 이하, 30년 이하, 35년 이하, 40년 이하, 45년 이하, 50년 이하, 55년 이하, 60년 이하, 65년 이하, 70년 이하, 75년 이하, 80년 이하, 85년 이하, 90년 이하, 95년 이하 또는 100년 이하에 수행된다.

[0053] 본원에 제공되는 방법의 일부 실시양태에서, 요법은 질환 또는 상태 (예컨대, 각막 이상증)와 관련하여 양성적 치료 반응을 제공하기 위해 사용된다. "양성적 치료 반응"에 의해 질환 또는 상태의 개선, 및/또는 질환 또는 상태와 연관된 증상의 개선이 의도된다. 본 발명의 치료 방법의 치료 효과는 임의의 적합한 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 치료는 대조군 (예컨대, 치료 전의 단백질 침착의 양)과 비교하여 치료 후 대상체의 각막에 대한 단백질 침착의 감소에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 치료를 받기 전의 각막에 비해 대상체에서 각막 단백질 침착의 양을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 감소시킨다. 각막 혼탁이 또한 본 발명의 방법을 이용하여 치료 효과를 평가하는데 사용될 수 있다. 또한, 일부 실시양태에서, 치료는 시각 기능에 의해 평가된다. 대상체에서 시각 기능의 평가는 비교정 시력 (UCVA), 최대-교정 시력 (BCVA) 및 휘도 명료도 시험 (brightness acuity test, BAT) 평가를 비롯한 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 시험을 이용하여 수행될 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 모든 목적 및 특히 시력을 평가하는 기준과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함되는, 문헌 [Awaad et al., Am J Ophthalmol. 145(4): 656-661 (2008) and Sharhan et al., Br J Ophthalmol 84:837-841 (2000)]을 참조한다. 특정 실시양태에서, 대상체의 시력은 치료를 받기 전에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 개선된다.

[0054] 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 각막 이상증에 대해 시험된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기술된 각막 이상증과 연관된, 핵산 돌연변이, 예컨대 SNP에 대해 시험된다.

[0055] 예를 들어, 대상체는 표적 TGF $\beta$  I 핵산 내 핵산 돌연변이에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 대상체는 TGF $\beta$  I 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 626의 아미노산 치환을 인코딩하는 핵산 돌연변이에 대해 시험된다. 일부 실시양태에서, 핵산 돌연변이는 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q, 및 H626P로부터 선택된 아미노산 치환을 인코딩한다. 예를 들어, 대상체의 구강 세포 (buccal cell)를 구강 면봉을 사용해 수집한다. 수집된 구강 세포를 TGF $\beta$  I 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 626의 아미노산 치환을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 돌연변이의 존재에 대해 분석한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어, TGF $\beta$  I 유전자에서 R124 돌연변이를 초래하는 것과 같은, 아벨리노 각막 이상증-관련 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP) (이들로 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, C(G/A)C SNP로도 언급되는, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 418에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R124H 돌연변이를 포함함)의 검출을 통해 검출된다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어, TGF $\beta$  I 유전자에서 R555 돌연변이를 초래하는 것과 같은, 과립

각막 이상증-관련 SNP (이들로 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, (C/T)GG SNP로도 언급되는, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1663에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R555W 돌연변이를 포함함)의 검출을 통해 검출된다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어 TGF $\beta$  I 유전자에서 R124 및/또는 626 돌연변이를 초래하는 것과 같은, 격자 이상증-관련 SNP (이들로 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 (C/T)GC SNP로도 언급되는, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 417에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124C 돌연변이 또는 TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1924에서 A의 C로의 전이에 의해 야기되는 H626P 돌연변이를 포함함)의 검출을 통해 검출된다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어 TGF $\beta$  I 유전자에서 R124 돌연변이를 초래하는 것과 같은, 라이스-뷔클러 각막 이상증-관련 SNP (이들로 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 C(G/T)C SNP로도 언급되는, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 418에서 G의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124L 돌연변이를 포함함)의 검출을 통해 검출된다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증은, 예를 들어 TGF $\beta$  I 유전자에서 R555 돌연변이를 초래하는 것과 같은, 티엘-벵케 각막 이상증-관련 SNP (이들로 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 C(G/A)G SNP로도 언급되는, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1664에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R555Q 돌연변이를 포함함)의 검출을 통해 검출된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 원추각막과 연관된 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1이다.

[0056] 일부 실시양태에서, 대상체는 대상체 내로 하나 이상의 조작된 줄기세포를 이식하기 전에 하나 이상의 각막 이상증에 대해 시험된다.

### III. 줄기세포

[0058] 본 발명의 방법은 복수의 줄기세포를 수득하는 것을 포함한다. 임의의 적합한 줄기세포가 치료되는 각막 이상증의 유형에 따라서, 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 줄기세포는 자가, 동종 또는 이종 공여자로부터 수득된다. 줄기세포가 이종 공여자로부터 수득되는 경우, 이종 공여자 및 치료되는 대상체의 줄기세포는 공여자-수용자 조직접합성이다. 특정 실시양태에서, 자가 줄기세포는 각막 이상증의 치료를 필요로 하는 대상체로부터 수득된다. 수득된 줄기세포는 치료되는 특정 각막 이상증과 연관된 유전자 내 돌연변이를 보유한다 (예컨대, 상기에 논의된 바와 같이, 상피-기질 이상증을 갖는 대상체의 TGF $\beta$  I 유전자 내 돌연변이를 갖는 줄기세포). 적합한 줄기세포에는 치수 줄기세포, 모낭 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 제대 라이닝 줄기세포, 배아 줄기세포, 경구 점막 상피 줄기세포 및 윤부 상피 줄기세포가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0059] 일부 실시양태에서, 복수의 줄기세포는 윤부 상피 줄기세포를 포함한다. 윤부 상피 줄기세포 (LESC)는 각막의 윤부 영역에 위치하며 각막 표면의 유지 및 복구를 담당한다. 임의의 특정한 작동 이론에 구애됨이 없이, LESC는 줄기세포 풀 (pool)을 재증식시키기 위해 줄기세포 적소 (niche)에 잔존하는 줄기세포, 및 조기 일시적 증폭 딸세포 (daughter early transient amplifying cell) (eTAC)를 생산하는 비대칭 세포 분열을 거치는 것으로 이해된다. 이렇게 더 분화된 eTAC는 줄기세포 적소로부터 제거되고 일시적 증폭 세포 (TAC)를 더 생산하도록 분열할 수 있으며, 결국에는 분화된 세포 (DC)를 최종적으로 생성한다. LESC는, 예를 들어 대상체의 눈으로부터 생검을 취함으로써 수득된다. 예컨대, 문헌 [Pellegrini et al., *Lancet* 349: 990-993 (1997)]을 참조한다. 윤부 생검으로부터 수득된 LESC는 단리되고, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 및 원심분리 기법을 비롯한 임의의 적합한 기법을 이용하여 본 발명의 방법에 사용하기 위해 분류될 수 있다. LESC는 줄기세포 연관 마커의 양성 발현 및 분화 마커의 음성 발현을 이용하여 생검으로부터 분류될 수 있다. 양성 줄기세포 마커에는 전사인자 p63, ABCG2, C/EBP $\delta$  및 Bmi-1이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 음성 각막 특이적 마커에는 사이토케라틴 3 (CK3), 사이토케라틴 12 (CK12), 코넥신 43, 및 인볼루크린 (involucrin)이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 복수의 줄기세포는 p63, ABCG2 또는 이들의 조합의 발현에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 복수의 줄기세포 중 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포는 p63, ABCG2, C/EBP $\delta$  및 Bmi-1 또는 이들의 조합을 발현한다. 일부 실시양태에서, 복수의 줄기세포는 CK3, CK12, 코넥신 43, 인볼루크린 또는 이들의 조합의 발현에 대해 음성이다. 특정 실시양태에서, 복수의 줄기세포 중 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포는 CK12, 코넥신 43, 인볼루크린 또는 이들의 조합을 발현하지 않는다. LESC에 유용한 다른 마커가, 예를 들어, 문헌 [Takacs et al., *Cytometry A* 75: 54-66 (2009)]에 기술되어 있으며, 이는 모든 목적, 및 특히 LESC 마커와 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다. 세포 크기 및 높은 핵 대 세포질 비율과 같은 줄기

세포 특징이 또한 LESC의 동정을 보조하기 위해 사용될 수 있다.

[0060] LESC 외에, 대상체의 각막으로부터 단리된 다른 줄기세포가 또한 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 각막 줄기세포에는 기질 줄기세포, 기질 섬유아세포-유사 세포, 기질 중간엽 세포, 신경관 (neural crest) 유래 각막 줄기세포, 및 추정 내피 줄기세포가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 사용된 세포는 대상체의 각막으로부터 수득된 기질 줄기세포이다. 예를 들어, 기질 줄기세포는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 문헌 [Funderburgh et al., *FASEB J* 19: 1371-1373 (2005); Yoshida et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 1653-1658 (2005); Du et al. *Stem Cells* 1266-1275 (2005); Dravida et al., *Brain Res Dev Brain Res* 160:239-251 (2005); 및 Polisetty et al. *Mol Vis* 14: 431-442 (2008)]에 기술된 것들을 포함하는 임의의 적합한 방법을 이용하여 단리될 수 있으며, 이들은 모든 목적, 및 특히 다양한 기질 줄기세포의 단리 및 배양과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

[0062] 이러한 기질 줄기세포의 특징인 마커에는 Bmi-1, Kit, Notch-1, Six2, Pax6, ABCG2, Spag10, 및 p62/OSIL이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 복수의 줄기세포 중 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포는 Bmi-1, Kit, Notch-1, Six2, Pax6, ABCG2, Spag10, 또는 p62/OSIL 또는 이들의 조합을 발현한다. 특정 실시양태에서, 기질 줄기세포는 CD31, SSEA-4, CD73, CD105에 대해 양성이고 CD34, CD45, CD123, CD133, CD14, CD106 및 HLA-DR에 대해 음성이다. 특정 실시양태에서, 복수의 줄기세포 중 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포는 CD31, SSEA-4, CD73, CD105에 대해 양성이고 CD34, CD45, CD123, CD133, CD14, CD106 및 HLA-DR에 대해 음성이다. 또 다른 실시양태에서, 기질 줄기세포는 CD105, CD106, CD54, CD166, CD90, CD29, CD71, Pax6에 대해 양성이고 SSEA-1, Tra1-81, Tra1-61, CD31, CD45, CD11a, CD11c, CD14, CD138, Flk1, Flt1, 및 VE-캐드헤린에 대해 음성이다. 특정 실시양태에서, 복수의 줄기세포 중 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 세포는 CD105, CD106, CD54, CD166, CD90, CD29, CD71, Pax6에 대해 양성이고 SSEA-1, Tra1-81, Tra1-61, CD31, CD45, CD11a, CD11c, CD14, CD138, Flk1, Flt1, 및 VE-캐드헤린에 대해 음성이다.

[0063] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 세포는 대상체의 각막으로부터 단리된다. 이러한 줄기세포를 단리하는 방법은, 예를 들어 문헌 [Engelmann et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1656-1662 (1988)]에 기술되고, 이는 모든 목적, 및 특히 각막 내피 줄기세포의 단리 및 배양과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

[0064] 단리 후, 복수의 줄기세포 (예컨대, LESC)는 안정한 세포주를 생산하기 위해 임의의 적합한 방법을 이용하여 배양될 수 있다. 줄기세포는 본원에 기술된 핵산 돌연변이의 조작 전 및/또는 후에 배양될 수 있다. 예를 들어, 배양은 피더 세포로서 섬유아세포 (예컨대, 3T3)의 존재 또는 부재하에 유지될 수 있다. 다른 경우에, 인간 양막 상피 세포 또는 인간 배아 섬유아세포는 배양을 위한 피더 층으로 사용될 수 있다. LESC의 배양에 적합한 기법이 문헌 [Takacs et al. *Cytometry A* 75: 54-66 (2009), Shortt et al., *Surv Ophthalmol VisSci* 52: 483-502 (2007); 및 Cauchi et al. *Am J Ophthalmol* 146: 251-259 (2008)]에 상세히 기술되어 있으며, 이들은 모든 목적, 및 특히 LESC의 배양과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

#### IV. 핵산 조작 시약

[0065] 일 측면에서, 줄기세포 내 핵산 돌연변이는 각막 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이를 교정하도록 조작된다. 본원에 사용된 바와 같이, "각막 이상증 표적 핵산"은 하나 이상의 각막 이상증과 연관된 돌연변이를 포함하는 핵산을 지칭한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 *TGFBI*, *KRT3*, *KRT12*, *GSN*, 및 *UBIADI* 유전자에 위치한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 본원에 나타난 바와 같은 돌연변이 핵산의 인코딩을 초래하는 SNP 부위와 연관된다. 추가 실시양태에서, SNP 부위를 포함하는 돌연변이 서열은 (i) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q15582의 *TGFBI* 내 Leu509Arg, Arg666Ser, Gly623Asp, Arg555Gln, Arg124Cys, Val505Asp, Ile522Asn, Leu569Arg, His572Arg, Arg496Trp, Pro501Thr, Arg514Pro, Phe515Leu, Leu518Pro, Leu518Arg, Leu527Arg, Thr538Pro, Thr538Arg, Val539Asp, Phe540del, Phe540Ser, Asn544Ser, Ala546Thr, Ala546Asp, Phe547Ser, Pro551Gln, Leu558Pro, His572del, Gly594Val, Val1613del, Val1613Gly, Met619Lys, Ala620Asp, Asn622His, Asn622Lys, Asn622Lys, Gly623Arg, Gly623Asp, Val1624\_Val1625del, Val1624Met, Val1625Asp, His626Arg, His626Pro, Val1627SerfsX44, Thr629\_Asn630insAsnValPro, Val1631Asp, Arg666Ser, Arg555Trp, Arg124Ser,

Asp123delins, Arg124His, Arg124Leu, Leu509Pro, Leu103\_Ser104del, Val113Ile, Asp123His, Arg124Leu, 및/또는 Thr125\_Glu126del에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 TGFBI 단백질; (ii) 예를 들어, 단백질 등재 번호 P12035 또는 NP\_476429.2의 케라틴 3 단백질 내 Glu498Val, Arg503Pro, 및/또는 Glu509Lys에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 KRT3 단백질; (iii) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q99456.1 또는 NP\_000214.1의 KRT12 내 Met129Thr, Met129Val, Gln130Pro, Leu132Pro, Leu132Va, Leu132His, Asn133Lys, Arg135Gly, Arg135Ile, Arg135Thr, Arg135Ser, Ala137Pro, Leu140Arg, Val143Leu, Val143Leu, Lle391\_Leu399dup, Ile426Val, Ile426Ser, Tyr429Asp, Tyr429Cys, Arg430Pro, 및/또는 Leu433Arg를 갖는 돌연변이 KRT12 단백질; (iv) 예를 들어, 단백질 등재 번호 P06396의 GSN 내 Asp214Tyr를 갖는 돌연변이 GSN 단백질; 및 (v) 예를 들어, 단백질 등재 번호 Q9Y5Z9의 UBIAD1 내 Ala97Thr, Gly98Ser, Asn102Ser, Asp112Asn, Asp112Gly, Asp118Gly, Arg119Gly, Leu121Val, Leu121Phe, Val122Glu, Val122Gly, Ser171Pro, Tyr174Cys, Thr175Ile, Gly177Arg, Lys181Arg, Gly186Arg, Leu188His, Asn232Ser, Asn233His, Asp236Glu, 및/또는 Asp240Asn에 상응하는 돌연변이를 포함하는 돌연변이 UBIAD1 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이 단백질을 인코딩 한다.

[0068]

특정 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 과립 각막 이상증 타입 II (예컨대, TGF $\beta$  I)와 연관된다. 다른 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 원추각막과 연관된다. 임의의 특정한 작동 이론에 구애됨이 없이, 도 2에 도시된 돌연변이가 원추각막과 연관된 것으로 여겨진다. 특정 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 도 2에 도시된 돌연변이의 하나 이상을 포함한다.

[0069]

조작되는 줄기세포는 별개의 단리된 줄기세포 또는 단리된 줄기세포로부터 확장된 줄기세포주로부터의 줄기세포를 포함한다. 임의의 적합한 유전적 조작 방법이 줄기세포에서 핵산 돌연변이를 교정하는데 사용될 수 있다.

[0070]

특정 실시양태에서, 핵산 조작 시약이 줄기세포 내로 도입된다. 이러한 핵산 조작 시약은 그 후에 줄기세포에서 핵산 돌연변이를 교정하여 조작된 줄기세포를 형성한다. 핵산 조작 시약에는 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN) 및 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR) 시스템 시약이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 모든 목적, 및 특히 핵산 조작 시약과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함되는, 문헌 [Gaj et al., *Trends Biotechnol* 31(7): 397-405 (2013)]을 참조한다. 이러한 시약은 오류-유발 비-동종 말단 연결 (error-prone non-homologous end joining) (NHEJ) 및/또는 상동성 지시 복구 (homology directed repair) (HDR) 경로를 비롯한, 세포 DNA 복구 메커니즘을 자극하는 표적 DNA 이중-가닥 절단 (DSB)을 유도함으로써 표적 핵산의 효율적이고 정확한 변형을 가능하게 함으로써 작용한다. 핵산 돌연변이의 야생형 대립유전자 (예컨대, 야생형 TGFBI 또는 이의 단편)을 함유하는 상동성 복구 핵산이 존재하는 경우, 틈 (nicked) 표적 핵산은 상동 재조합을 거치고, 그로 인해 돌연변이 대립유전자를 야생형 대립유전자로 대체하고 조작된 줄기세포 내 핵산 돌연변이를 교정한다.

[0071]

일부 경우에, 본원에 제공되는 본 발명의 방법에 사용되는 표적 핵산 조작 시약은 CRISPR 시스템 시약을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 CRISPR 시스템 시약은, 예를 들어, 타입 II 뉴클레아제 (예컨대, Cas9 뉴클레아제 또는 Cpf1 뉴클레아제)를 인코딩하는 핵산, 가이드 RNA (gRNA)를 인코딩하는 핵산 및 관심 유전자 또는 이의 단편의 야생형 대립유전자를 포함하는 복구 핵산을 포함한다. 가이드 RNA는 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)와 함께 CRISPR RNA (crRNA)를 포함한다. CRISPR 시스템 시약을 사용하는 일부 실시양태에서, crRNA 및 tracrRNA는 가이드 RNA 대신에 별도 시약으로 포함된다.

[0072]

일부 실시양태에서, 복구 핵산은 본원에 기술된 바와 같은 각막 이상증과 연관된 돌연변이를 포함하는 줄기세포 계놈의 영역 (즉, "각막 이상증 표적 핵산")에서 HDR 경로에 의한 상동 재조합을 거칠 수 있다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGFBI, KRT3, KRT12, GSN, 및 UBIAD1 유전자 내 표적 핵산과 상동 재조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 복구 뉴클레오티드 문자는 본원에 기술된 돌연변이 아미노산을 인코딩하는 TGFBI 유전자 내 핵산 (예컨대, Leu132Pro)과 상동 재조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 벡터는 다중 복구 핵산을 포함한다. 복구 핵산은 특정 돌연변이를 함유하는 본원에 기술된 세포의 동정 및 분류를 위한 표지를 추가로 포함할 수 있다. 복구 뉴클레오티드 문자와 함께 포함될 수 있는 예시적인 표지에는 형광 표지 및 길이 또는 서열에 의해 식별 가능한 핵산 바코드가 포함된다.

[0073]

타입 II 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산은 조절 요소에 작동적으로 연결될 수 있고 단일 벡터 상에 또는 상이한 벡터 상에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA 및 타입 II 뉴클레아제는 동일한 벡터 상에 포함된다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA 및 타입 II 뉴클레아제는 상이한 벡터 상에 포함된다.

[0074]

일부 예시적인 실시양태에서, 가이드 RNA 및/또는 타입-II 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 복

수의 줄기세포의 하나 이상의 세포의 세포 계놈 내로 안정적으로 통합될 수 있다. 일부 예로서, 타입-II 뉴클레아제 및 가이드 RNA는 자연계에서 함께 발생하지 않는다. 예시적인 CRISPR 시스템 시약 및 본 발명에서의 사용 방법이, 예를 들어, 문헌 [Shalem et al., *Nature Reviews Genetics* 16: 299-311 (2013); Zhang et al., *Human Molecular Genetics* 23(R1): R40-6 (2014); Zetsche et al. dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038 (2015); 및 Zhu et al. *Cell* 157: 1262-1278 (2014)]에 보다 상세히 기술되고, 이들은 모든 목적, 및 특히 CRISPR 시스템 시약과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

[0075] CRISPR 시스템에서, gRNA/타입 II 뉴클레아제 복합체는 gRNA 서열과 표적 핵산에 대한 보체 사이의 염기-짝짓기에 의해 계놈 표적 서열로 모집된다. gRNA/타입 II 뉴클레아제 복합체의 결합은 타입 II 뉴클레아제가 DNA의 두 가닥 모두를 절단하여 이중 가닥 절단 (DSB)를 야기할 수 있도록 타입 II 뉴클레아제를 계놈 표적 서열에 국한시킨다.

[0076] DSB의 복구는 (1) 비-동종 말단 연결 (NHEJ) DNA 복구 경로 또는 (2) 상동성 지시 복구 (HDR) 경로 중 하나를 통해 야기될 수 있다. NHEJ 복구 경로는 종종 프레임쉬프트 및/또는 미성숙 정지 코돈을 초래할 수 있는 DSB 부위에서 삽입/결실 (InDels)을 유발하여, 표적 핵산의 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 효과적으로 파괴하고, 그로써 표적 핵산에 의해 인코딩되는 유전자 산물의 발현을 감소시킨다. HDR 경로는 DSB를 고치는데 사용되는, 복구 핵산의 존재를 필요로 한다. 특정 뉴클레오티드 변화 (예컨대, 야생형 대립유전자)는 복구 핵산을 이용한 HDR의 사용에 의해 표적된 돌연변이 유전자 내로 도입될 수 있다. HDR 경로는, 돌연변이가 본원에 기술된 각막 장애와 연계되는 경우 (예컨대, TGFBI 유전자), 예를 들어, 줄기세포 내 돌연변이를 교정하기 위해 사용될 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 핵산 조작 시약은 복구 핵산을 포함한다. 복구 핵산은 HDR 경로를 통해 타입 II 뉴클레아제 유도성 DSB의 복구 시 복수의 줄기세포의 하나 이상의 세포의 계놈 내로 특정 대립유전자 (예컨대, 야생형 대립유전자)을 도입한다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 단일 가닥 DNA (ssDNA)이다. 다른 실시양태에서, 복구 핵산은 플라스미드 벡터로서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 20 내지 25, 25 내지 30, 30 내지 35, 35 내지 40, 40 내지 45, 45 내지 50, 50 내지 55, 55 내지 60, 60 내지 65, 65 내지 70, 70 내지 75, 75 내지 80, 80 내지 85, 85 내지 90, 90 내지 95, 95 내지 100, 100 내지 105, 105 내지 110, 110 내지 115, 115 내지 120, 120 내지 125, 125 내지 130, 130 내지 135, 135 내지 140, 140 내지 145, 145 내지 150, 150 내지 155, 155 내지 160, 160 내지 165, 165 내지 170, 170 내지 175, 175 내지 180, 180 내지 185, 185 내지 190, 190 내지 195, 또는 195 내지 200개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 200 내지 300, 300 내지 400, 400 내지 500, 500 내지 600, 600 내지 700, 700 내지 800, 800 내지 900, 900 내지 1,000개 뉴클레오티드 길이이다. 다른 실시양태에서, 복구 핵산은 1,000 내지 2,000, 2,000 내지 3,000, 3,000 내지 4,000, 4,000 내지 5,000, 5,000 내지 6,000, 6,000 내지 7,000, 7,000 내지 8,000, 8,000 내지 9,000, 또는 9,000 내지 10,000개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 본원에 기술된 바와 같은 각막 이상증과 연관된 돌연변이 (즉, "각막 이상증 표적 핵산")를 포함하는 줄기세포 계놈의 영역에서 HDR 경로에 의한 상동 재조합을 거칠 수 있다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGFBI 유전자 내에서 표적 핵산과 상동 재조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드 내 아르기닌 124, 아르기닌 555, 또는 히스티딘 626을 인코딩하는 TGFBI 유전자 내 핵산과 상동 재조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q, 및 H626P로부터 선택되는 아미노산 치환을 인코딩하는 TGFBI 유전자 내 핵산과 상동 재조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 124를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 복구 핵산은 뉴클레오티드 TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 417에서 시토신 (예컨대, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 417에서 C의 T로의 전이를 교정하기 위함), TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 418에서의 구아닌 (예컨대, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 418에서 G의 A 또는 G의 T로의 전이를 교정하기 위함)을 삽입하기 위해 사용된다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 555를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1663에서 시토신 (예컨대, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1663에서 C에서 T로의 전이를 교정하기 위함)을 삽입하고 TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1664에 구아닌을 삽입 (예컨대, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1664에서 G의 A로의 전이를 교정하기 위함)하기 위해 사용된다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 히스티딘 626을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1924에 아데닌을 삽입 (예컨대, TGF $\beta$  I 유전자의 뉴클레오티드 1924에서 A의 C로의 전이를 교정하기 위함)하기 위해 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 124, 아르기닌 555, 및 히스티딘 626을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0078]

다른 실시양태에서, 복구 핵산은 각막 원추각막과 연관된 각막 이상증 표적 핵산 (예컨대, 도 2에 도시된 돌연변이의 하나 이상을 포함하는 표적 핵산)과 상동 재조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 COL4A1-4, LOX, SPARC, LRRN1, HGF, AKAP13, ZNF469, ATG12P2, GS1-256022.5, PLEKHA6, APOL4, SLC44A3, SLC6A18, SLC29A3, RANBP3L, KCNMA1, MUC5AC, CROCC, ATHL1, 또는 PLP1에서의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3742207 (예컨대, 국립생물공학정보센터의 dbSNP 데이터베이스에서 rs3742207로 식별된 SNP)에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3803230에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9583500에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs7990383에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs55703767에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs11677877에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2229813에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1800449에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs1053411에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2116780에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs3749350에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2286194에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12536657에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2614668에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs745191에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs12598474에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10932976에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs5908678에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs35803438에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132728에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132729에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs132730에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs859063에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2893276에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6687749에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13189855에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876514에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs6876515에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13361701에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs883764에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs780667에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs780668에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs13166148에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs10941287에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs7907270에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs200922784에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs9435793에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs116300974에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각막 이상증 표적 핵산은 기준 SNP 클러스터 식별자 rs2233696에 상응하는 돌연변이를 포함한다.

[0079]

일부 실시양태에서, 핵산 조작 시약은 다중 복구 핵산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 124를 인코딩하는 핵산 및 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 555를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 히스티딘 626을 인코딩하는 핵산을 추가로

포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용되는 CRISPR 시스템 시약은 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 124를 인코딩하는 핵산에 대한 제1 가이드 RNA를 인코딩하는 제1 핵산 및 TGF $\beta$  I 폴리펩티드의 아르기닌 555를 인코딩하는 핵산에 대한 제2 가이드 RNA를 인코딩하는 제2 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, CRISPR 시스템 시약은 히스티딘 626을 인코딩하는 핵산에 대한 제3 가이드 RNA를 인코딩하는 제3 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, CRISPR 시스템 시약은 제1 핵산, 제2 핵산, 및 제3 핵산의 임의의 조합(예컨대, 제1 핵산과 제3 핵산의 조합, 또는 제2 핵산과 제3 핵산의 조합)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 COL4A1에서 Q1334H, COL4A2에서 G683A, COL4A2에서 P718S, COL4A2에서 R517K, COL4A3에서 D326Y, COL4A3에서 H451R, COL4A4에서 V1327M, LOX에서 R158Q, AKAP13에서 A1046T, AKAP13에서 G624V, ZNF469에서 G2358R, SLC29A3에서 S158F, MUC5AC에서 P4493S, CROCC에서 P370S 또는 이들의 조합을 포함하는 하나 이상의 아미노산 치환을 인코딩하는 각각 이상증 표적 핵산을 복구할 수 있다.

[0080] 복구 핵산은 특정 돌연변이를 함유하는 줄기세포의 식별 및 분류를 위한 표지를 추가로 포함할 수 있다. 복구 핵산과 함께 포함될 수 있는 예시적인 표지에는 형광 표지 및 길이 또는 서열로 식별 가능한 핵산 바코드가 포함된다.

[0081] 추가 실시양태에서, 핵산 조작 시약은 또한 DSB의 HNEJ 복구에 비해 HDR 경로를 촉진하는 하나 이상의 시약을 포함한다. 이러한 시약은 HDR 경로에 의한 복구 핵산의 상동 재조합을 유리하게 허용한다. DSB의 HNEJ 복구에 비해 HDR 경로를 촉진하는 시약에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, HNEJ 복구에 관여하는 유전자를 억제하는 제제, 예를 들어, DNA 리가제 IV가 포함된다. 예컨대, 문헌 [Maruyana et al. *Nat Biotechnol.* 33(5): 538-42 (2015)]을 참고하고, 이는 모든 목적, 및 특히 DSB의 HNEJ 복구에 관여하는 유전자를 억제하는 제제와 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

[0082] 본원에 제공되는 본 발명의 방법에 사용되는 타입 II 뉴클레아제는 일시적 또는 세포-유형 의존적 방식으로의 발현에 최적화된 유도성 타입 II 뉴클레아제일 수 있다. 타입 II 뉴클레아제에 연결될 수 있는 유도성 프로모터에는 테트라사이클린-유도성 프로모터, 메탈로치오네인 프로모터; 테트라사이클린-유도성 프로모터, 메치오네인-유도성 프로모터 (예컨대, MET25, MET3 프로모터); 및 갈락토스-유도성 프로모터 (GAL1, GAL7 및 GAL10 프로모터)가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 적합한 프로모터에는 ADH1 및 ADH2 알코올 디히드로게나제 프로모터 (글루코스 중에 억제됨, 글루코스가 고갈되고 에탄올이 생성되는 경우 유도됨), CUP1 메탈로치오네인 프로모터 ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 의 존재 하에서 유도됨), PHO5 프로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터, 및 AOX1 프로모터가 포함된다.

[0083] 개선된 특이성을 나타내는 돌연변이 타입 II 뉴클레아제가 또한 사용될 수 있다 (예컨대, 문헌 [AnnRan et al., *Cell* 154(6) 1380-89 (2013)] 참조, 이는 모든 목적, 및 특히 표적 핵산에 대해 개선된 특성을 갖는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제와 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함됨). 핵산 조작 시약은 또한 비활성화 타입 II 뉴클레아제 (예컨대, dCas9)를 포함할 수 있다. 핵산 요소 단독에 대한 비활성화 Cas9 결합은 RNA 폴리머라제 기구를 입체적으로 방해함으로써 전사를 억제할 수 있다. 또한, 비활성화 Cas는 표적 핵산에 대한 비가역적 돌연변이의 도입 없이 표적 부위에서 유전자 발현에 영향을 미치는 다른 단백질 (예컨대, 전사 억제자, 활성인자 및 모집 도메인)에 대한 귀소 장치 (homing device)로 사용될 수 있다. 예를 들어, dCas9는 KRAB 또는 SID 효과기와 같은 전사 억제 도메인에 융합되어 표적 부위에서 후생적 침묵 (epigenetic silencing)을 촉진할 수 있다. Cas9는 또한 VP16/VP64 또는 p64 활성화 도메인과의 융합에 의해 합성 전사 활성인자로 전환될 수 있다.

[0084] 핵산 조작 시약은 임의의 적합한 방법을 이용하여 줄기세포 내로 도입될 수 있다. 핵산 조작 시약을 도입하기 위한 예시적인 방법에는 형질감염, 전기천공 및 바이러스-기반 방법이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0085] 일부 경우에, 하나 이상의 세포 유입 시약은 형질감염 시약이다. 형질감염 시약에는, 예를 들어, 중합체 기반 (예컨대, DEAE 텍스트란) 형질감염 시약 및 양이온성 리포좀-매개 형질감염 시약이 포함된다. 전기천공 방법이 또한 핵산 조작 시약의 유입을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 외부장을 인가함으로써 세포내 변경된 막 투과 전위가 유도되고, 막투과 전위 순 가치 (인가된 전위 및 휴면 전위 차이의 합)가 역치보다 큰 경우, 일시적인 투과 구조가 막에서 생성되고 전기천공이 달성된다. 예컨대, 문헌 [Gehl et al., *Acta Physiol. Scand.* 177:437-447 (2003)]을 참조한다.

[0086] 핵산 조작 시약은 또한 바이러스 형질감염을 통해 줄기세포 내로 전달될 수 있다. 적합한 바이러스 전달 시스

템에는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 레트리바이러스 및 렌티바이러스 전달 시스템이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 바이러스 전달 시스템은 줄기세포가 형질감염에 저항성인 경우에 특히 유용하다. 바이러스-매개 전달 시스템을 사용하는 방법은 핵산 조작 시약을 인코딩하는 바이러스 벡터를 제조하고 상기 벡터를 바이러스 입자 내로 패키징하는 단계를 추가로 포함한다. 핵산 시약의 다른 전달 방법에는 리포택션, 뉴클레오텍션, 미세주입, 바이오리스틱스 (biolistics), 비로좀 (virosome), 리포좀, 면역리포좀, 다가양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 (naked) DNA, 인공 비리온, 및 핵산의 제제-증강 유입이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 문헌 [Neiwoehner et al., *Nucleic Acids Res.* 42: 1341-1353 (2014)]을 참조하고, 이는 모든 목적, 및 특히 시약 전달 시스템과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다.

[0087] 일 측면에서, 줄기세포에서 각각 이상증 표적 핵산 내 핵산 돌연변이는 줄기세포 내로 가공된 (engineered) 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR)/CRISPR 연관 단백질 9 (Cas9) 시스템을 도입함으로써 조작되고, 여기서 CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자 및 단일 가이드 RNA (sgRNA)를 포함하는 적어도 하나의 벡터를 포함하고, Cas9 뉴클레아제 및 상기 sgRNA는 자연적으로 함께 발생하지 않는다.

[0088] 용어 "비-자연 발생적인 (non-naturally occurring)" 또는 "가공된 (engineered)"은 호환적으로 사용되며 인간의 작용이 개입되어 있음을 나타낸다. 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 지칭하는 경우, 상기 용어는 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 본질적으로 자연계에서 연관되고 자연계에서 발견되는 것과 같은 적어도 하나의 다른 성분이 적어도 실질적으로 결여됨을 의미한다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제 및 sgRNA는 자연적으로 함께 발생하지 않는다.

[0089] 가공된 CRISPR/Cas9 시스템은 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 방법 및 본원에 기술된 것들을 이용하여 세포내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 도입은 배양 중의 줄기세포에, 또는 숙주 유기체 내에 본원에 기술된 가공된 CRISPR/Cas9 시스템을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기에 논의된 바와 같이, 가공된 CRISPR/Cas9 시스템을 도입하는 예시적인 방법에는 형질감염, 전기천공 및 바이러스-기반 방법이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일부 경우에, 하나 이상의 세포 유입 시약은 형질감염 시약이다. 형질감염 시약은, 예를 들어, 중합체 기반 (예컨대, DEAE 텍스트란) 형질감염 시약 및 양이온성 리포좀-매개 형질감염 시약을 포함한다. 전기천공 방법이 또한 핵산 조작 시약의 유입을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 외부장을 인가함으로써 세포에서 변경된 막투과 전위가 유도되고, 막투과 전위 순 가치 (인가된 전위 및 휴면 전위 차이의 합)가 역치보다 큰 경우, 일시적인 투과 구조가 막에서 생성되고 전기천공이 달성된다. 예컨대, 문헌 [Gehl et al., *Acta Physiol. Scand.* 177: 437-447 (2003)]을 참조한다. 가공된 CRISPR/Cas9 시스템은 또한 바이러스 형질감염을 통해 줄기세포 내로 전달될 수 있다. 적합한 바이러스 전달 시스템에는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 레트리바이러스 및 렌티바이러스 전달 시스템이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 바이러스 전달 시스템은 줄기세포가 형질감염에 저항성인 경우에 특히 유용하다. 바이러스-매개 전달 시스템을 사용하는 방법은 핵산 조작 시약을 인코딩하는 바이러스 벡터를 제조하고 상기 벡터를 바이러스 입자 내로 패키징하는 단계를 추가로 포함한다. 핵산 시약의 다른 전달 방법에는 리포택션, 뉴클레오텍션, 미세주입, 바이오리스틱스, 비로좀, 리포좀, 면역리포좀, 다가양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 핵산의 제제-증강 유입이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 문헌 [Neiwoehner et al., *Nucleic Acids Res.* 42: 1341-1353 (2014), 및 미국특허 제5,049,386호, 제4,946,787호; 및 제4,897,355호]을 참조하고, 이는 모든 목적, 및 특히 시약 전달 시스템과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 도입은 DNA 플라스미드, RNA (예컨대, 본원에 기술된 벡터의 전사체), 네이키드 핵산, 및 리포좀과 같은 전달 비히클과 함께 복합체화된 핵산을 포함하는 비-바이러스 벡터 전달 시스템에 의해 수행된다. 세포 (예컨대, 시험관 내 또는 생체 외 투여) 또는 표적 조직 (예컨대, 생체 내 투여)에 전달될 수 있다.

[0090] 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 Cas 유전자를 인코딩하는 서열, tracr (트랜스-활성화 CRISPR) 서열 (예컨대, tracrRNA 또는 부분적 활성 tracrRNA), tracr-mate 서열 (내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "직접 반복" 및 tracrRNA-프로세싱된 부분 직접 반복을 포함함), 가이드 서열 (본원에서 "crRNA", 또는 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서"로도 언급됨), 및/또는 CRISPR 유전자좌로부터의 다른 서열 및 전사체를 포함하는, CRISPR-연관 ("Cas") 유전자의 발현 또는 이의 활성을 지시하는데 관여하는 전사체 및 다른 요소를 종합적으로 지칭한다. 상기에 기술된 바와 같이, sgRNA는 적어도 tracrRNA 및 crRNA의 조합이다. 일부 실시양태에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 타입 II CRISPR 시스템 유래이다. 일부 실시양태에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체, 예컨대 스트렙토코커스 피로젠스 (*Streptococcus pyogenes*) 또는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)로부터 유래한다. 일반적으로, CRISPR 시

스템은 표적 서열 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하는 요소 (또한 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 프로토스페이서 (protospacer)로도 언급됨)를 특징으로 한다. CRISPR 복합체 형성의 맥락에서, "표적 서열"은 상보성을 갖도록 고안된 가이드 서열에 대한 서열을 지칭하고, 여기서 표적 서열과 가이드 서열 사이의 혼성화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성화를 유발하여 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 존재한다면 완전한 상보성이 요구되는 것은 아니다. 본 명세서에서, "표적 부위"는, 예를 들어 이중 가닥 뉴클레오티드에서 표적 서열과 그의 상보성 서열 둘 다를 포함하는 표적 서열의 부위를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 표적 부위는 CRISPR/Cas9 시스템의 sgRNA 또는 crRNA에 혼성화하는 제1 표적 서열, 및/또는 PAM의 5'-말단에 인접한 제2 표적 서열을 의미할 수 있다. 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질 내에 위치한다. 일부 실시양태에서, 표적 서열은 진핵 세포의 세포기관, 예를 들어, 미토콘드리아 또는 엽록체 내부에 위치한다.

[0091] sgRNA는 인공적, 인간-제작, 합성적, 및/또는 비-자연 발생적일 수 있다. 일부 실시양태에서, sgRNA는 (i) CRISPR 표적 RNA (crRNA) 서열 및 (ii) 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA) 서열을 포함하고, 이는 또한 "sgRNA 스캐폴드"로 불릴 수 있다. 일부 실시양태에서, crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 자연적으로 함께 발생하지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "sgRNA"는 (i) 가이드 서열 (crRNA 서열) 및 (ii) Cas9 뉴클레아제-모집 서열 (tracrRNA)을 함유하는 단일 가이드 RNA를 지칭할 수 있다. crRNA 서열은 관심 유전자의 영역에 상동인 서열일 수 있고 Cas9 뉴클레아제 활성을 지시할 수 있다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 자연적으로 함께 발생하지 않는다. sgRNA는 RNA로서 또는 프로모터 하에서 sgRNA-코딩 서열 (sgRNA 유전자)을 갖는 플라스미드로의 형질전환에 의해 전달될 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, sgRNA 또는 crRNA는 적어도 표적 서열의 일부 (예컨대, 표적 게놈 서열)에 혼성화하고, crRNA는 표적 서열에 대해 상보적인 서열을 가질 수 있다. "상보성 (complementarity)"은 핵산이 전통적인 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 또는 다른 비-전통적인 유형에 의해 다른 핵산 서열과 수소 결합(들)을 형성하는 능력을 지칭한다. 퍼센트 상보성은 제2 핵산 서열과 수소 결합 (예컨대, 왓슨-크릭 염기 짹짓기)을 형성할 수 있는 핵산 분자 내 잔기의 퍼센트를 지칭한다 (예컨대, 10개 중 5, 6, 7, 8, 9, 10개는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 100% 상보성임). "완전히 상보적인"은 핵산 서열의 모든 연속한 잔기가 제2 핵산 서열 내 동일한 수의 연속한 잔기와 수소 결합을 형성할 것임을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "실질적으로 상보적인"은 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 또는 그 이상의 뉴클레오티드의 영역에 걸쳐서 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%인 상보성의 정도를 지칭하거나, 또는 염격한 조건하에서 혼성화하는 2개의 핵산을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 혼성화를 위한 "엄격한 조건"은 표적 서열에 대해 상보성을 갖는 핵산이 표적 서열과 주로 혼성화되고 비-표적 서열에는 실질적으로 혼성화하지 않는 조건을 지칭한다. 염격한 조건은 일반적으로 서열-의존적이고, 여러 요인에 따라 달라진다. 일반적으로, 서열이 길수록 서열이 그의 표적 서열에 특이적으로 혼성화하는 온도가 더 높다. 염격한 조건의 비-제한적인 예시가 문헌 [Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y.]에 상세히 기술된다. "혼성화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 반응하여 뉴클레오티드 잔기의 염기 사이에서 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨 크릭 염기 짹짓기, 호그스테인 (Hoogstein) 결합, 또는 임의 다른 서열 특이적 방식에 의해 일어날 수 있다. 복합체는 이중체 가닥을 형성하는 2개의 가닥, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일의 셀프 (self) 17 혼성화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 PCR의 개시 또는 효소에 의한 폴리뉴클레오티드의 절단과 같은 보다 광범위한 과정 중의 한 단계를 구성할 수 있다. 미리 결정된 서열과 혼성화할 수 있는 서열은 미리 결정된 서열의 "보체"로서 언급된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 명시된 기준 값과 유사한 값의 범위를 지칭할 수 있다. 특정 실시양태에서, 용어 "약"은 명시된 기준 값의 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 이하 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다. 부가적 실시양태에서, crRNA 또는 가이드 서열은 약 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 또는 22개 뉴클레오티드 길이이다. 추가 실시양태에서, crRNA는 TAGGAAGCTAATCTATCATT (서열번호: 9)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 부가적 실시양태에서, crRNA는 서열번호: 9의 뉴클레오티드 서열을 갖는 crRNA 서열을 제외한다. 다른 추가 실시양태에서, crRNA는 케라틴 12 단백질 내 L132P를 초래하는 SNP를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 crRNA 서열을 제외한다. 다른 추가 실시양태에서, crRNA는 케라틴 12 단백질 내 돌연변이를 초래하는 SNP를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 crRNA 서열을 제외한다.

[0093]

일부 실시양태에서, tracrRNA는 crRNA 서열의 결합을 위해 dsDNA를 개방하도록 Cas9를 활성화하는 헤어핀 구조를 제공한다. TracrRNA는 회문 반복에 상보적인 서열을 가질 수 있다. tracrRNA가 짧은 회문 반복에 혼성화하는 경우, 이는 세균 이중-가닥 RNA-특이적 리보뉴클레아제, RNase III에 의한 프로세싱을 촉발할 수 있다. 부가적 실시양태에서, tracrRNA는 SPIDR (SPacer Interspersed Direct Repeats)을 가져, 일반적으로 특정 세균 종에 특이적인 DNA 유전자좌의 패밀리를 구성할 수 있다. CRISPR 유전자좌는 *E. coli*에서 인식된 산재된 짧은 서열 반복 (interspersed short sequence, SSR) (Ishino et al., *J. Bacteriol.*, 169: 5429-5433 [1987]; 및 Nakata et al., *J. Bacteriol.*, 171: 3553-3556 [1989]), 및 연관 유전자의 독특한 부류를 포함한다. 유사한 산재된 SSR이 할로페락스 메디테라네이 (*Haloferax mediterranei*), 스트렙토코커스 피로젠스, 아나바에나 (*Anabaena*), 및 미코박테리움 투베르콜로시스에서 동정되었다 (Groenen et al., *Mol. Microbiol.*, 10: 1057-1065 [1993]; Hoe et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 254-263 [1999]; Masepohl et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1307: 26-30 [1996]; 및 Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 17: 85-93 [1995] 참조). CRISPR 유전자좌는, 짧은 규칙적으로 이격된 반복 (short regularly spaced repeat, SRSR)으로 명명된, 반복 구조에 의해 다른 SSR과 구별될 수 있다 (Janssen et al., *OMICS J. Integ. Biol.*, 6: 23-33 [2002]; 및 Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 36: 244-246 [2000]). 특정 실시양태에서, 반복은 실질적으로 일정한 길이를 갖는 고유한 개입 서열에 의해 규칙적으로 이격된 클러스터에서 발생하는 짧은 요소이다 (Mojica et al., [2000], 상동). 반복 서열이 균주들 사이에서 고도로 보존되지만, 산재된 반복의 수 및 스페이서 영역의 서열은 전형적으로 균주마다 다르다 (van Embden et al., *J. Bacteriol.*, 182: 2393-2401 [2000]). tracrRNA 서열은 당해 분야에 공지된 CRISPR/Cas9 시스템용 tracrRNA에 대한 임의의 서열일 수 있다. 부가적 실시양태에서, tracrRNA는 서열번호: 2 및 6의 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드를 포함한다. 예시적인 CRISPR/Cas9 시스템, sgRNA, crRNA 및 tracrRNA, 및 이들의 제조 방법 및 사용은 미국특허 제8697359호, 미국특허출원공개 제20150232882호, 제20150203872호, 제20150184139호, 제20150079681호, 제20150073041호, 제20150056705호, 제20150031134호, 제20150020223호, 제20140357530호, 제20140335620호, 제20140310830호, 제20140273234호, 제20140273232호, 제20140273231호, 제20140256046호, 제20140248702호, 제20140242700호, 제20140242699호, 제20140242664호, 제20140234972호, 제20140227787호, 제20140189896호, 제20140186958호, 제20140186919호, 제20140186843호, 제20140179770호, 제20140179006호, 제20140170753호, 제20140093913호, 제20140080216호, 및 제W02016049024호에 기술되어 있고, 이를 모두는 그 전체가 본원에 포함된다.

[0094]

일부 실시양태에서, 본원에 기술된 Cas9 뉴클레아제는 공지되어 있는데; 예를 들어, *S. 피로젠* Cas9 단백질의 아미노산 서열은 등재 번호 Q99ZW2로서 SwissProt 데이터베이스에서 확인할 수 있다. Cas9 뉴클레아제는 Cas9 동족체 또는 이종상동체 (ortholog)일 수 있다. 개선된 특이성을 나타내는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제가 또한 사용될 수 있다 (예컨대, Ann Ran et al., *Cell* 154(6) 1380-89 (2013) 참조, 이 문현은 모든 목적 및 특히 표적 핵산에 대해 개선된 특이성을 갖는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제에 관한 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함됨). 핵산 조작 시약은 또한 비활성화 Cas9 뉴클레아제 (dCas9)를 포함할 수 있다. 핵산 요소에 대한 비활성화 Cas9 결합만으로도 RNA 폴리머라제 기구를 입체적으로 방해함으로써 전사를 억제할 수 있다. 또한, 비활성화 Cas9는 표적 핵산에 대한 비가역적 돌연변이의 도입 없이 표적 부위에서 유전자 발현에 영향을 미치는 다른 단백질 (예컨대, 전사 억제자, 활성인자 및 모집 도메인)을 위한 귀소 장치로서 사용될 수 있다. 예를 들어, dCas9는 표적 부위에서 KRAB 또는 SID 효과기와 같은 전사 억제자 도메인에 융합되어 표적 부위에서 후생적 침묵 (silencing)을 촉진할 수 있다. Cas9는 또한 VP16/VP64 또는 p64 활성화 도메인에의 융합에 의해 합성적 전사 활성인자로 전환될 수 있다.

[0095]

일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 표적 서열의 위치에서, 예컨대 표적 서열 내부 및/또는 표적 서열의 보체 내부에서 하나 또는 두 가닥 모두의 절단을 지시한다. Cas9 뉴클레아제에 의해 지시된 DNA 절단 후에, 세포에 이용가능한 2가지 DNA 복구 방식이 있다: 상동성 지시 복구 (homology directed repair) (HDR) 및 비-상동성 말단 연결 (non-homologous end joining) (NHEJ). 돌연변이 부위에 인접한 Cas9 절단 후에 HDR에 의한 돌연변이의 매끄러운 (seamless) 교정이 매력적이긴 하지만, 이 방법의 효율성은, 복구가 일어난 그러한 세포를 선택하고 변형된 세포만을 정제하는 추가적인 단계를 이용해 줄기세포 또는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)의 시험관 내/생체 외 변형을 위해서만 사용될 수 있음을 의미한다. HDR은 세포에서 고 빈도로 발생하지 않는다. NHEJ는 훨씬 더 높은 효율로 발생하고 다수의 각막 이상증에 대해 기술된 우성-음성 돌연변이에 적합하다. 부가적 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 스트렙토코커스로부터이다. 추가의 다른 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 스트렙토코커스 피로젠스, 스트렙토코커스 디스갈اكت이아에 (*Streptococcus dysgalactiae*), 스트렙토코커스 카니스 (*Streptococcus canis*), 스트렙토코커스 에쿠이 (*Streptococcus equi*), 스트렙토코커스 이니아에

(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 포카에 (*Streptococcus phocae*), 스트렙토코커스 슈도포르시너스 (*Streptococcus pseudoporcinus*), 스트렙토코커스 오랄리스 (*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 슈도포르시너스, 스트렙토코커스 인판타리우스 (*Streptococcus infantarius*), 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 아갈락ти아에 (*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 카발리 (*Streptococcus caballi*), 스트렙토코커스 에퀴너스 (*Streptococcus equines*), 스트렙토코커스 속 오랄 턱손 (*Streptococcus sp. oral taxon*), 스트렙토코커스 미티스 (*Streptococcus mitis*), 스트렙토코커스 갈로리티쿠스 (*Streptococcus gallolyticus*), 스트렙토코커스 고르도니 (*Streptococcus gordoni*), 또는 스트렙토코커스 파스퇴리아누스 (*Streptococcus pasteurianus*), 또는 이의 변형체로부터이다. 이러한 변형체는 문헌 [Kleininstiver et al, 2016 Nature, 529, 490-495]에 기술된 바와 같은, D10A 닉케이즈 (Nickase), Spy Cas9-HF1을 포함할 수 있다. 부가적 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 스타필로코커스로부터이다. 추가의 다른 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 스타필로코커스 아우레우스, *S. 시미아에* (*S. simiae*), *S. 아우리쿨라리스* (*S. auricularis*), *S. 카르노수스* (*S. carnosus*), *S. 콘디멘티* (*S. condimenti*), *S. 마스실리엔시스* (*S. massiliensis*), *S. 피스시페르멘坦스* (*S. piscifermentans*), *S. 시뮬란스* (*S. simulans*), *S. 카피티스* (*S. capitis*), *S. 카프라에* (*S. caprae*), *S. 에피더미디스* (*S. epidermidis*), *S. 사카로리티쿠스* (*S. saccharolyticus*), *S. 데브리에세이* (*S. devriesei*), *S. 헤모리티쿠스* (*S. haemolyticus*), *S. 호미니스* (*S. hominis*), *S. 아그네티스* (*S. agnetis*), *S. 크로모젠스* (*S. chromogenes*), *S. 펠리스* (*S. felis*), *S. 텔피니* (*S. delphini*), *S. 하이이쿠스* (*S. hyicus*), *S. 인터메디우스* (*S. intermedius*), *S. 루트라에* (*S. lutrae*), *S. 마이크로티* (*S. microti*), *S. 무스카아에* (*S. muscae*), *S. 슈딘테르메디우스* (*S. pseudintermedius*), *S. 로스트리* (*S. rostri*), *S. 스클레이페리* (*S. schleiferi*), *S. 러그도네시스* (*S. lugdunensis*), *S. 아를레타에* (*S. arlettae*), *S. 콜니* (*S. cohnii*), *S. 에쿠오루ム* (*S. equorum*), *S. 갈리나루ム* (*S. gallinarum*), *S. 클루시* (*S. kloosii*), *S. 레에이* (*S. leei*), *S. 네팔렌시스* (*S. nepalensis*), *S. 사프로피티쿠스* (*S. saprophyticus*), *S. 숙시누스* (*S. succinus*), *S. 자일로수스* (*S. xylosus*), *S. 플레우레티* (*S. fleurettii*), *S. 렌투스* (*S. lentus*), *S. 스치우리* (*S. sciuri*), *S. 스텔파노비치* (*S. stePMovicii*), *S. 비톨리누스* (*S. vitulinus*), *S. 시뮬란스* (*S. simulans*), *S. 파스퇴리* (*S. pasteurii*), *S. 와르네리* (*S. warneri*), 또는 이의 변형체로부터이다.

[0096]

부가적 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 서열번호: 4 또는 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 약 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 추가 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자는 서열번호: 3 또는 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0097]

일부 실시양태에서, 본원에 기술된 CRISPR/Cas9 시스템 및 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하는 방법은 NHEJ에 의해 DNA 서열을 변경한다. 부가적 실시양태에서, 본원에 기술된 CRISPR/Cas9 시스템 또는 적어도 하나의 벡터는 복구 뉴클레오티드 분자를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법은 본원에 기술된 HDR에 의해 DNA 서열을 변경한다. 부가적 실시양태에서, 이 HDR 접근법은 MECD에서 유전자 요법에 대한 생체 외 접근법으로 사용될 수 있다. 추가 실시양태에서, 이 접근법은 대립유전자 특이적이지 않을 수 있고 KRT12 코돈 129, 130, 132, 133 및 135 내 돌연변이를 복구하는데 사용될 수 있다.

[0098]

일부 실시양태에서, 가공된 CRISPR/Cas9 시스템은 (a) 본원에 기술된 표적 서열과 혼성화하는 sgRNA에 작동적으로 연결된 제1 조절 요소, 및 (b) Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 분자에 작동적으로 연결된 제2 조절 요소를 포함하고, 여기서 구성요소 (a) 및 (b)는 시스템의 동일한 벡터 상에 또는 다른 벡터 상에 위치하고, sgRNA은 표적 서열을 표적하고 (예컨대, 그와 혼성화하고), Cas9 뉴클레아제는 DNA 분자를 절단한다. 표적 서열은 PAM의 5' 말단에 인접한 16 내지 25개 뉴클레오티드에 상보적인 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 본원에서 "바로 인접한"을 비롯해 "인접한"은 기준 부위의 2 또는 3개 뉴클레오티드 이내인 것을 의미하고, 이는 바로 인접한 뉴클레오티드 서열 사이에 개재 (intervening) 뉴클레오티드가 존재하지 않고 바로 인접한 뉴클레오티드 서열이 서로 1개 뉴클레오티드 이내인 것을 의미한다. 부가적 실시양태에서, 세포는 진핵 세포, 또는 포유류 또는 인간 세포이고, 조절 요소는 진핵 조절인자이다. 추가 실시양태에서, 세포는 본원에 기술된 줄기세포이다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 진핵 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0099]

일부 실시양태에서, 제1 조절 요소는 폴리머라제 III 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 제2 조절 요소는 폴리

머라제 II 프로모터이다. 용어 "조절 요소"는 프로모터, 인핸서, 내부 리보좀 진입 부위 (IRES), 및 다른 발현 제어 요소 (예컨대, 폴리아데닐화 신호 및 폴리-U 서열과 같은, 전사 종결 신호)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 기술되어 있다. 조절 요소는 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 지시하는 것들 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열 (예컨대, 조직-특이적 조절 서열)의 발현을 지시하는 것들을 포함한다. 조직-특이적 프로모터는 주로 원하는 관심 조직, 예컨대 근육, 신경세포, 뼈, 피부, 혈액, 특정 장기 (예컨대, 간, 췌장), 또는 특정 세포 유형 (예컨대, 럼프구)에서 발현을 지시할 수 있다. 조절 요소는 또한 조직 또는 세포-유형 특이적이거나 특이적이지 않을 수 있는, 세포-주기 의존적 또는 발달 단계-의존적 방식과 같은, 일시적-의존적 방식으로 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 pol III 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 이상의 pol I 프로모터), 하나 이상의 pol II 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 이상의 pol II 프로모터), 하나 이상의 pol I 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 이상의 pol I 프로모터), 또는 이들의 조합을 포함한다. pol III 프로모터의 예시에는 U6 및 H1 프로모터가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. pol II 프로모터의 예시에는 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (Rous sarcoma virus) (RSV) LTR 프로모터 (선택적으로 RSV 인핸서 포함), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (선택적으로 CMV 인핸서 포함) [예컨대, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985) 참조], SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터, 및 EF1 $\alpha$  프로모터가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. WPRE; CMV 인핸서; HTLV-I의 LTR 내 R-U5' 분절 (Mol. Cell. Biol., Vol. 8(1), p. 466-472, 1988); SV40 인핸서; 및 토끼  $\beta$ -글로빈의 엑손 2 및 2 사이의 인트론 서열 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78(3), p. 1527-31, 1981)과 같은 인핸서 요소가 또한 용어 "조절 요소"에 의해 포함된다.

## [0100]

일부 실시양태에서, 본원에 제공된 Cas9 뉴클레아제는 일시적 또는 세포-유형 의존적 방식의 발현을 위해 최적화되는 유도성 Cas9 뉴클레아제이다. 제1 조절 요소는 Cas9 뉴클레아제에 연결될 수 있는 유도성 프로모터일 수 있고, 이는 테트라사이클린-유도성 프로모터, 메탈로치오네인 프로모터; 테트라사이클린-유도성 프로모터, 메치오닌-유도성 프로모터 (예컨대, MET25, MET3 프로모터); 및 갈락토스-유도성 프로모터 (GAL1, GAL7 및 GAL10 프로모터)를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 적합한 프로모터에는 ADH1 및 ADH2 알코올 디히드로게나제 프로모터 (글루코스 중에 억제됨, 글루코스가 고갈되고 에탄올이 생성되는 경우 유도됨), CUP1 메탈로치오네인 프로모터 ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 의 존재하에서 유도됨), PHO5 프로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터, 및 AOX1 프로모터가 포함된다.

## [0101]

발현 벡터의 고안이 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 원하는 발현 수준 등과 같은 인자에 좌우될 수 있음이 당해 분야의 숙련자에게 인식될 것이다. 벡터는 숙주 세포 내로 도입될 수 있고, 그로써 본원에 기술된 바와 같은 핵산에 의해 인코딩되는, 융합 단백질 또는 웨პ티드를 비롯해 전사체, 단백질, 또는 웨პ티드 (예컨대, 클러스터형 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복 (CRISPR) 전사체, 단백질, 효소, 이의 돌연변이 형태, 이의 융합 단백질 등)를 생산할 수 있다.

## [0102]

용어 "벡터"는 그에 연결된 또 다른 핵산을 운송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 단일-가닥, 이중-가닥, 또는 부분적으로 이중-가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 유리 말단을 포함하거나 유리 말단을 포함하지 않는 (예컨대, 환형) 핵산 분자; DNA, RNA, 또는 둘 다를 포함하는 핵산 분자; 및 당해 분야에 공지된 폴리뉴클레오티드의 다른 변형체를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 하나의 벡터 유형은 "플라스미드"인데, 이는 추가의 DNA 분절이 예컨대 표준 문자 클로닝 기법에 의해 그 내로 삽입될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 다른 유형은 바이러스-유래된 DNA 또는 RNA 서열이 바이러스 (예컨대, 레트로바이러스, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결합 아데노바이러스, 및 아데노-연합 바이러스) 내로의 패키징을 위해 벡터 내에 존재하는, 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포 내로의 형질감염을 위해 바이러스에 의해 운반되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자율적 (autonomous) 복제를 할 수 있다 (예컨대, 세균성 복제 기원을 갖는 세균 벡터 및 에피좀 포유류 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피좀 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 계놈 내로 통합되고, 그로 인해 숙주 계놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 언급된다. 재조합 DNA 기법에서 유용한 통상의 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함할 수 있고, 이는 재조합 발현 벡터가, 일부 경우에는, 발현에 사용되는 숙주 세포에 기초하여 선택되는,

발현되는 핵산 서열에 작동적으로 연결된, 하나 이상의 조절 요소를 포함함을 의미한다. 재조합 발현 벡터에서, "작동적으로 연결된"은 관심 뉴클레오티드 서열이 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 방식으로 (예컨대, 시험관 내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포 내로 도입된 경우 숙주 세포에서) 조절 요소(들)에 연결되는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 유리한 벡터는 렌티바이러스 및 아데노-연관 바이러스를 포함하고, 이러한 벡터 유형은 또한 특정 유형의 세포를 표적하도록 선택될 수 있다.

[0103] 핵산 조작 과정을 거친 줄기세포 (즉, "조작된" 줄기세포)는 임의의 적합한 방법을 이용하여 단리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복구 핵산은 선택가능 마커를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 이를 실시양태에서, 숙주 줄기세포 계놈 내로의 복구 핵산의 성공적인 상동 재조합은 또한 선택가능 마커의 통합을 수반한다. 따라서, 이러한 실시양태에서, 양성 마커는 조작된 줄기세포의 선별을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 선택가능 마커는 그렇지 않은 경우에는 세포를 죽일 수 있는 약물의 존재하에서 조작된 줄기세포가 생존하는 것을 가능케 한다. 이러한 선택가능 마커에는 네오마이신, 퓨로마이신 또는 하이그로마이신 B에 대해 저항성을 부여하는 양성 선택가능 마커가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 선택가능 마커는 이들 중 일부는 선택가능 마커를 함유하지 않는, 줄기세포의 집단 중에서 조작된 줄기세포를 시각적으로 식별할 수 있게 하는 제품일 수 있다. 이러한 선택가능 마커의 예시에는 그의 형광에 의해 시각화될 수 있는 녹색 형광 단백질 (GFP); 그의 기질 루시페란에 노출되는 경우, 발광에 의해 시각화될 수 있는 루시페라제 유전자; 및 그의 기질과 접촉하는 경우, 특징적 색깔을 발색하는  $\beta$ -갈락토시다제 ( $\beta$ -gal)가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 선택가능 마커는 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 이를 마커를 인코딩하는 핵산 서열은 상업적으로 이용가능하다 (예컨대, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 참조). 형광에 의해 시각화될 수 있는 선택가능 마커를 사용하는 방법은 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 기법을 이용하여 더 분류될 수 있다.

[0104] 일부 실시양태에서, 단리된 조작된 줄기세포를 사용하여 이식용 세포주를 확립한다. 단리된 조작된 세포는 임의의 적합한 방법을 이용하여 배양되어 안정한 세포주를 생산할 수 있다. 예를 들어, 배양은 피더 세포로서 섬유아세포 (예컨대, 3T3)의 존재 또는 부재하에서 유지될 수 있다. 다른 경우에, 인간 양막 상피세포 또는 인간 배아 섬유아세포가 배양을 위한 피더 층으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 조작된 줄기세포는 보충된 호르몬 상피 배지 (SHEM)에서 섬유아세포 (예컨대, 3T3 세포)의 피더 층 상에서 배양된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조작된 줄기세포를 배양하는데 적합한 배지는 다음 성분의 하나 이상을 포함한다: 소 태아 혈청, 환자의 자가 혈청, EGF, 인슐린, 트랜스페린, 소디움 셀레나이트, 히드로코르티손, 콜레라 독소 서브유닛 A, DMSO, 트리이오도티로닌 (triiodothyronine), 항생제 (예컨대, 페니실린/스트렙토마이신 및 젠타마이신) 및 항진균제 (예컨대, 암포테리신 B). LESC의 배양에 적합한 기법이 문헌 [Takacs et al. *CytometryA* 75: 54-66 (2009), Shortt et al., *Surv Ophthalmol VisSci* 52: 483-502 (2007); and Cauchi et al. *Am J Ophthalmol* 146: 251-259 (2008)]에 상세히 기술되고, 이들은 모든 목적 및 특히 LESC의 배양과 관련된 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다. 확립된 세포주에서 원하는 핵산 조작의 확인은, 예를 들어, 본원에서 논의된 바와 같은 선택가능 마커의 선택 및 원하는 핵산 조작의 서열을 확인하기 위한 핵산 서열을 포함하는 임의의 적합한 기법을 이용하여 수행될 수 있다.

## V. 이식

[0105] 일 측면에서, 조작된 줄기세포의 단리 및 조작된 줄기세포로부터 세포주의 선택적 확립 또는 배양 후에, 조작된 줄기세포를 치료를 필요로 하는 대상체 내로 이식한다. 조작된 줄기세포는 임의의 적합한 방법에 의해 대상체에 이식된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 이식용 수술 이식편은 그 후에 대상체 내로 이식되는 조작된 줄기세포로부터 발생된다. 특정 실시양태에서, 조작된 줄기세포가 이식을 위해 적당한 크기의 영역으로 확장하기에 충분한 시간 동안 조작된 줄기세포를 양막 상에서 배양한다. 성장 확인은 직접 관찰, 온조직표본 (whole mount) 염색 준비, 조직병리학, 면역조직화학, 티미딘 통합 및 세포 주기에 대한 마커를 사용하는 유동 세포계측을 포함하는 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 배양된 조작된 줄기세포는 그 후에 양막과 함께 직접적으로 이식될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조작된 줄기세포는 양막으로부터 분리되어 비-양막 상에 이식되어 수술 이식편을 얻는다. 적합한 담체에는 파라핀 거즈, 콘텍트 렌즈, 콜라주 쉴드, 생체고분자, 피브린 겔 및 전방 렌즈 캡슐이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0107] 이식 후, 대상체에서의 시각 기능의 평가는 비교정 시력 (UCVA), 최대-교정 시력 (BCVA) 및 밝기 시력 검사 (BAT)의 평가를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 적합한 시험을 이용하여 수행될 수 있다. 예컨대, 문

현 [Awaad et al., *Am J Ophthalmol.* 145(4): 656-661 (2008) 및 Sharhan et al., *Br J Ophthalmol* 84:837-841 (2000)]을 참조하며, 이들은 모든 목적 및 특히 시력 평가를 위한 표준에 관한 모든 교시에 대해 그 전체가 참조로서 포함된다. 특정 실시양태에서, 대상체의 시력을 치료를 받기 전에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 개선된다.

[0109] 일부 실시양태에서, 방법은 1회 이상의 미리 결정된 빈도 (예컨대, 매주, 매월, 분기별, 반년마다, 매년 등)로 대상체 내로 하나 이상의 조작된 줄기세포의 이식을 반복하는 것을 추가로 포함한다.

## VI. 키트

[0111] 또 다른 측면에서, 각막 이상증의 치료를 위한 핵산 조작 시약을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 CRISPR 시약, 예를 들어, 관심 핵산을 표적하는 하나 이상의 가이드 RNA, 및 뉴클레아제 (예컨대, 타입-II 뉴클레아제)를 포함한다. 부가적 실시양태에서, 키트는 본원에 기술된 바와 같이 복구되는 돌연변이의 야생형 대립유전자를 포함하는 복구 핵산을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포에 의한 핵산 조작의 유입을 촉진하는 제제, 예를 들어, 형질감염 제제 또는 전기천공 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 본 발명의 키트는 줄기세포의 검출 또는 단리를 위한 하나 이상의 시약, 예를 들어, FACS와 함께 사용될 수 있는 하나 이상의 양성 줄기세포 마커에 대한 표지된 항체를 포함한다.

## 실시예

[0113] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 실시양태를 설명하기 위해 제시된다. 이러한 실시예는 배타적인 실시양태를 나타내지 않고 이를 나타내도록 의도되지 않는 것으로 이해되고; 이러한 실시예는 단지 본 발명의 실시를 설명하기 위해 제공된다.

[0114] **돌연변이 분석:** 다양한 각막 이상증과 연관된 돌연변이를 분석하여 이들이 단지 미스센스 돌연변이인지 또는 인-프레임 삽입/결실 돌연변이 (in-frame indel)인지를 결정하였다. 이 분석은 K12 및 TGFBI 질환의 대부분의 경우에, 넌센스 (nonsense) 또는 프레임시프트 (frameshifting) indel 돌연변이가 질환과 연관되지 않음을 나타낸다. 나아가, 엑솜 (exome) 변형체 데이터베이스의 분석으로부터 이를 유전자에서 발견되는 임의의 자연 발생적인 넌센스, 프레임시프트 indel 또는 스플라이스 부위 돌연변이가 이를 개인의 질환과 연관된 것으로 보고되지 않은 것으로 확인된다.

[0115] 돌연변이 분석을 통해 하기 각막-이상증 유전자가 표적된 뉴클레아제 유전자 요법에 적합하다는 것이 밝혀졌다 (표 1).

### 표 1

CRISPR/Cas9 매개 접근법에 적합한 유전자 및 이들의 연관된 각막 이상증

유전자	연관된 각막 이상증
<i>TGFBI</i>	아벨리노 각막 이상증
	라이스-뷔클러 각막 이상증
	티엘-뱅케 각막 이상증
	그레이슨-빌브란트 (Grayson-Wilbrandt) 각막 이상증
	격자 각막 이상증 I & II
	과립 각막 이상증 I, II & III
	상피 기저막 이상증
<i>KRT3</i>	메스만 (Meesmann) 상피 각막 이상증
<i>KRT12</i>	메스만 상피 각막 이상증
<i>UBIAD1</i>	슈나이더 각막 이상증

[0117] PAM-특이적 접근법 또는 가이드 대립유전자-특이적 접근법 중 하나에 의해 표적화될 수 있는 돌연변이의 수를 결정하기 위한 이 보고를 위해 적합한 각막 이상증 유전자의 조사가 수행되었다. PAM-특이적 접근법은 질환 유발 SNP가 새로운 PAM을 생성하는 것을 필요로 하는 반면, 대립유전자 특이적 접근법은 질환 유발 SNP를 함유하는 가이드의 고안을 포함한다.

[0118] >10%의 최소 대립유전자 빈도 (MAF)를 갖는 새로운 PAM을 생성하는 TGFBI 내 모든 비-질환 유발 SNP를 동정하였다. >10%의 MAF를 갖는 SNP의 선택은 새로운 PAM을 초래하는 SNP가 질환 유발 돌연변이와 함께 cis로 발견될

것이라는 합리적인 기회를 제공할 수 있다. 새로운 PAM이 생성되었는지 여부를 결정하기 위해 TGFBI 내 모든 변형체를 분석하였다 (표 2). 이전 보고서는 이 접근법을 사용하여 돌연변이 대립유전자의 영구적 불활성화를 증명하였다 (Shin et al., 2016. Human Molecular Genetics).

## 표 2

[0119] >10%의 MAF를 갖는 새로운 PAM을 초래하는 TGFBI 내의 변형. 새로운 PAM은 밑줄로 표시된 필요한 변형과 함께 보여진다.

엑손 번호	위치	SNP	변이	새로운 PAM (밑줄친 필수 변이)	MAF
1					
b/w 1&2	인트론 변형, 엑손 2로부터 1507bp 떨어짐	rs756462	T/C	<u>c</u> cc	0.31
2					
b/w 2&3	인트론 변형	rs1989972	A/C	at <u>c</u> cca	0.43
	인트론 변형, 엑손 3으로부터 1945bp 떨어짐	rs1989972	A/C	<u>c</u> cc	0.43
	인트론 변형, 엑손 3으로부터 966bp 떨어짐	rs3805700	A/G	agg	0.41
3					
b/w 3&4					
4					
b/w 4&5					
5					
b/w 5&6					
6	동의 (Synonymous) 변형 단백질 위치 217	rs1442	G/C	<u>C</u> CT	0.32
b/w 6&7	인트론 변형, 엑손 6으로부터 119bp 떨어짐	rs764567	A/G	cgg	0.3
	인트론 변형, 엑손 6으로부터 119bp 떨어짐	rs764567	A/G	gc <u>g</u> ggt	0.3
	인트론 변형, 변형으로부터 268bp 떨어짐	rs2073509	T/G	ggg	0.4
	인트론 변형, 변형으로부터 268bp 떨어짐	rs2073509	T/G	cagggt	0.4
	인트론 변형, 변형으로부터 784bp 떨어짐	rs2073511	T/C	<u>c</u> ct	0.4
	인트론 변형, 엑손 7로부터 685bp 떨어짐	rs916951	A(ancestral)/C/G	cgg	037(G)
7					
b/w 7&8	인트론 변형, 엑손 7로부터 509bp 떨어짐	rs1137550	T/C	act <u>c</u> tg	0.37
8	동의 변형 단백질 위치 327	rs1054124	A/G	TGG	0.39
b/w 8&9	인트론 변형, 엑손 9로부터 207bp 떨어짐	rs6889640	C/A	<u>a</u> ctctc	0.37
9					
b/w 9&10					
10					
b/w 10&11	인트론 변형, 엑손 11로부터 43bp 떨어짐	rs6860369	A/G	ggg	0.4
11					
b/w 11&12					
12					
b/w 12&13	인트론 변형, 엑손 12로부터 713bp 떨어짐	rs6871571	A/G	tt <u>g</u> aat	0.42
13					
b/w 13&14	인트론 변형, 엑손 13으로부터 530bp 떨어짐	rs6893691	A/G	cgg	0.39

	인트론 변형, 엑손 13으로부터 640bp 떨어짐	rs1990199	G/C	<u>c</u> ca	0.39
	인트론 변형, 엑손 14로부터 659bp 떨어짐	rs6894815	G/C	<u>c</u> cc	0.42
	인트론 변형, 엑손 14로부터 230bp 떨어짐	rs10064478	T/G	<u>c</u> gg	0.42
14					
b/w 14&15	인트론 변형, 엑손 14로부터 44bp 떨어짐	rs6880837	T/C	<u>c</u> ca	0.41
15					
b/w 15&16					
16					
b/w 16&17					
17					

[0120] 표 2에서, "b/w"는 변형 (예컨대, 돌연변이)이 2개의 엑손 사이에 위치함을 나타낸다. 예를 들어, "b/w 1 & 2"는 도 3에 나타난 바와 같이, 변형이 엑손 1과 엑손 2 사이에 위치하는 것을 의미한다 (예컨대, 변형은 인트론 내에 위치함). 도 3에서, 번호가 매겨진 상자는 TGFBI 내 엑손을 나타낸다. 다양한 질환-유발 돌연변이가 발견되는 TGFBI 내 핫스팟은 적색 박스로 표시된다. 각각의 청색 화살표는 새로운 PAM을 생성하는 SNP의 위치를 나타낸다. 새로운 PAM은 각 화살로 표시되고, 필요한 변형이 적색으로 강조 표시된다.

[0121] 컨스트럭트: Cas9 및 sgRNA를 발현하는 3개의 플라스미드를 모든 실험 전체에서 사용하였다. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Broad Institute, MIT; Addgene plasmid 48139; 도 4)를 비-표적 플라스미드로 사용하였다. 공개된 프로토콜을 따라서 (Ran FA, et al., Nat Protoc 2013; 8: 2281-2308), K12-L132P 대립유전자에 특이적인 sgRNA를 함유하는 플라스미드를 다음 2개의 프라이머를 사용해 pSpCas9(BB)-2A-Puro 내로 어닐링하고 클로닝함으로써 고안하였다 (Life Technologies, Paisley, UK): 5'-CACCGTAGGAAGCTTAATCTATCATT-3' 및 5'-AAACATGATAGATTAGCTTCCTAC-3'. 이 sgRNA는 K12-L132P 대립유전자에서 발견된 대립유전자-특이적 PAM의 3'의 20개 뉴클레오티드에 직접적으로 상응하고 (도 5, 적색), 이후에 sgK12LP로 명명된다. 야생형 및 돌연변이 K12 서열 둘 다를 표적하는 Cas9/sgRNA 플라스미드를 제작하여 (Sigma, Gillingham, UK) 양성 대조군으로 사용하였다 (도 5, 녹색).

[0122] 이전에 기술된 추가적인 K12 발현 컨스트럭트를 사용하여 대립유전자 특이성 및 효능을 평가하였다. 이후에 K12WT-Luc 및 K12LP-Luc으로 각각 명명된, 정지 코돈의 3'에 삽입된 K12-WT 또는 K12-L132P에 대한 전체 mRNA 서열을 갖는 반딧불이 루시퍼라제 플라스미드 (Liao H, et al. PLoS One 2011; 6: e28582), 및 이후에 각각 K12WT-HA 및 K12LP-HA로 알려진, 성숙한 혜마글루터닌 (HA)-태그된 K12-WT 및 K12-L132P 단백질에 대한 발현 플라스미드 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 3352-3360)를 사용하였다. 레닐라 (Renilla) 루시퍼라제에 대한 발현 컨스트럭트 (pRL-CMV, Promega, Southampton, UK)를 형질감염 효율을 표준화하기 위해 이중-루시퍼라제 어세이에 사용하였다.

[0123] **이중-루시퍼라제 어세이:** 이전에 기술된 바와 같이 개조된 방법을 이용하여, 외인성 컨스트럭트에서 3개의 시험 sgRNA의 효능 및 대립유전자-특이성을 정량화하기 위해 이중-루시퍼라제 어세이를 사용하였다 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985; Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502; Atkinson SD, et al. J Invest Dermatol 2011; 131: 2079-2086). 간략히, HEK AD293 세포 (Life Technologies)를 리포펙타민 2000 (Life Technologies)을 사용하여 1:4의 비율로 K12WT-Luc 또는 K12LP-Luc 발현 컨스트럭트 및 sgNSC, sgK12 또는 sgK12LP 컨스트럭트 둘 다로 형질감염시켰다. 세포를 용해되기 전에 72시간 동안 배양하고 반딧불이 및 레닐라 루시퍼라제 둘 다의 활성을 정량하였다. 모든 경우에, 8번의 복제가 각 형질감염 조건에 대해 수행되었다.

[0124] **웨스턴 블로팅:** HA-태그된 야생형 (K12WT-HA) 및 돌연변이 (K12LP-HA) 발현 컨스트럭트 (Liao H, et al. PLoS One 2011; 6: e28582.)를 이전에 기술된 것과 유사한 방법을 이용하여, 리포펙타민 2000 (Invitrogen)을 사용해 2회 반복하여 HEK AD293 세포 내로 1:4의 비율로 각각의 sgRNA로 일시적으로 동시-형질감염시켰다 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985; Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502). 형질감염된 세포를 72시간 동안 인큐베이션하였다. HA-태그된 K12 및  $\beta$ -액틴의 발현을

표준 방법을 이용하여 HA에 대한 토끼 다중클론 항체 (Abcam, Cambridge, UK; ab9110, 1:2000) 및  $\beta$ -액틴에 대한 마우스 단일클론 항체 (Sigma, 1:15000)를 사용해 분석하였다 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985; Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502). 막을 2차 호스래디쉬 페옥시다제-접합 다중클론 돼지 항-토끼 항체 (DakoCytomation, Ely, UK) 또는 호스래디쉬 페옥시다제-접합 염소 항-마우스 항체 (DakoCytomation) 각각과 인큐베이션하였다. 표준 화학발광에 의해 단백질 결합을 검출하였다 (Life Technologies). 이미지J (ImageJ) (Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. Nat Methods 2012; 9: 671-675)를 사용해 농도계측을 수행하여 HA-태그된 K12의 밴드 강도를 정량하였다 ( $n=4$ ). 이를  $\beta$ -액틴의 밴드 강도에 대해 표준화하였다.

**[0125] 정량적 실시간 PCR:** 웨스턴 블로팅에 대해 기술된 바와 동일한 방식으로 형질감염을 실시하였으나; K12WT-HA 및 K12LP-HA 둘 다를 동시에 세포 내로 형질감염시켰다. 모든 형질감염은 3회 반복 실시하였다. 형질감염 후, 세포를 48시간 동안 인큐ベ이션하고 RNAeasy Plus 키트 (Qiagen, Venlo, The Netherlands)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 500 ng의 RNA의 cDNA 전환 (Life Technologies) 후 정량적 실시간 PCR을 수행하여 KRT12 mRNA의 수준을 정량하였다. KRT12 어세이 (assay Id 140679; Roche, West Sussex, UK)를 HPRT 어세이 (어세이 ID 102079; Roche) 및 GAPDH 어세이 (어세이 ID 141139; Roche)와 함께 사용하였다. 각 샘플을 각 어세이에 대해 3회 반복으로 운영하였고 상대적 유전자 발현을  $\Delta\Delta CT$  방법을 이용하여 계산하였다 (Livak KJ, Schmittgen TD. Methods 2001; 25: 402-408). KRT12 발현 수준을 HPRT 및 GAPDH에 대해 표준화하였고, 여기서 두 참조 유전자의 발현은 BestKeeper 소프트웨어 도구를 사용하여 처리군에 걸쳐서 "안정한" 것으로 간주되었다 (Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Biotechnol Lett 2004; 26: 509-515).

**[0126] 파이로시퀀싱 (Pyrosequencing):** 정량적 역전사효소-PCR에 의해 평가된 동일한 cDNA 샘플을 사용하여, 정확히 이전에 기술된 바와 같이, 파이로시퀀싱을 수행하여 K12-WT mRNA에 대한 잔여 K12-L132P mRNA의 비율을 결정하였다 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 3352-3360).

**[0127] KRT12 형질전환 마우스:** 내인성 마우스 Krt12 코딩 서열을 대체하도록 네-인 (knocked in)된 인간 K12-L132P 대립유전자를 갖는 C57 마우스 모델을 수득하였다. 이는 대립유전자-특이적 sgRNA 및 Cas9에 의한 KRT12-L132P의 생체 내 표적화를 가능케 하였다. 24주령의 암컷 이형접합 마우스를 사용하였는데, 여기에는 한 카피의 인간 K12-L132P 대립유전자 및 한 카피의 마우스 Krt12가 존재하였다. 표준 PCR 및 생거 (Sanger) 디테옥시뉴클레오티드 시퀀싱을 사용하여 마우스의 유전자형을 분석하고 K12-L132P 대립유전자의 이형접합성을 확인하였다. 본 연구가 한 각막에 대한 치료 효과를 조사한 반면, 같은 동물의 다른 각막은 음성 대조군으로 사용되었기 때문에, 동물의 무작위화는 필요하지 않았다. 조사자는 본 연구에 대해 예비 지식이 없지 않았다. 모든 실험은 윤리적 규정을 준수하고 지역 윤리위원회의 승인을 받았다.

**[0128] 생체 내 기질내 (intrastromal) 안구 주입:** 대립유전자-특이적 sgRNA 및 Cas9의 일시적 발현을 달성하기 위하여, sgK12LP 플라스미드를 이전에 보고된 프로토콜에 따라서, 기질내 안구 주입에 의해 이형접합 네-인 마우스의 각막 기질 내로 도입하였다 (Moore JE, McMullen CBT, Mahon G, Adamis AP. DNA Cell Biol 21: 443-451). 이 전달 방법을 평가하기 위하여, 야생형 마우스에 4  $\mu$ g의 Cas9-GFP 플라스미드 (pCas9D10A\_GFP) (Addgene plasmid 44720)를 먼저 주입하였다. 마우스를 24, 48 및 72시간째에 희생시키고 (culled), 각막을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 표준 조직학적 절차를 이용하여 처리하였다. 5  $\mu$ m 두께의 절편을 잘라내고, 탈수한 후 형광 현미경으로 이미지화하였다. 마우스에 전신 마취제 및 각막에 대한 국소 마취제를 투여하였다. 적격의 안과의사가 총 3  $\mu$ l의 인산염-완충 식염수 중에 희석된 4  $\mu$ g의 sgK12LP 또는 sgNSC 플라스미드를 4마리 마우스의 좌안 및 우안 각각의 각막 내로 주입하였다. 마우스를 치료 48시간 후 희생시켰다.

**[0129] 시퀀싱 및 NHEJ의 결정:** 일단 마우스가 희생되면, 눈으로부터 핵을 제거하고 각막을 절개하였다. gDNA를 DNA 추출 키트 (Qiagen)를 사용하여 추출하고 샘플을 2개의 처리군으로 모았다 (pooled): sgK12LP 및 sgNSC. 샘플은 K12-L132P 돌연변이 주위의 영역을 증폭하기 위해 다음 2개의 프라이머를 사용해 PCR 증폭을 수행하였다: 5'-ACACCCATCTGCAGCCTAT-3' 및 5'-AAAATTCCCAAAGCGCTC-3'. PCR 산물을 겔 정제하고 CloneJet 클로닝 벡터 (Life Technologies) 내로 결찰한 후 DH5 $\alpha$  적격 세포 (Life Technologies)를 형질전환하는데 사용하였다. 총 13개의 클론을 선별하고 제조사의 지침에 따라서 미니프렙 키트 (Qiagen)를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조하였다. 이어서 13개 클론으로부터의 DNA를 CloneJet 벡터와 함께 제공된 시퀀싱 프라이머를 사용하여 시퀀싱하였다 (Department of Zoology, University of Oxford). Zhang Lab 온라인 툴 (crispr.mit.edu)에 의해 예측되는 바와 같이, 마우스 계놈 내 sgK12LP에 대한 2개의 가장 유력한 엑손 (exonic) 오프-표적 부위를 동일한 방식으로 평가하였고, 여기서 10개 콜로니가 각각의 예측된 오프 표적에 대한 분석을 위해 선택되었다. 예측된 오프-표적 부위는 5'-TAAGTAGCTGATCTATCAGTGGG-3' (Gon41) 및 5'-TGGGAAGCATATCTGTCAATTGG-3' (Asphd1)이었다.

이들이 >0.1의 계산된 오프-표적 점수를 갖는 유일한 2개였기 때문에, 이들 2개 부위만이 선택되었다.

[0130] **통계학:** 모든 오차 막대는 달리 언급되지 않는 한 s.e.m.을 나타낸다. 모든 시료가 동일한 분포를 나타내었기 때문에 언페어드 (unpaired) t-검정을 이용하여 유의성을 계산하였다. 통계학적 유의성은 0.05%로 설정하였다. 차이는 그룹 간에 계산되어 유사한 것으로 간주되었다.

[0131] **KRT12-특이적 sgRNA의 제작:** MECD-유발 KRT12 미스센스 돌연변이로 인한 서열 변화의 분석은 MECD의 중증 형태를 유발하는 L132P 돌연변이가 동시에 새로운 PAM 부위 (AAG>AGG)의 생성을 초래함을 규명하였다. KRT12 L132P 돌연변이에 의해 생성된 새로운 PAM 부위의 5'-말단에 인접한 20개 뉴클레오티드 서열에 상보적인 sgRNA (sgK12LP)를 고안하고 Zhang lab, MIT 2013에 의해 온라인으로 제공되는 'Optimized CRISPR Design Tool'을 사용하여 잠재적 오프 표적에 대해 평가하였다 (도 5, 적색). sgRNA는 이 시스템을 사용하여 66%의 점수를 갖는 것으로 계산되었고, 여기서 >50%의 점수는 예측된 가능한 오프 타겟의 제한된 수를 갖는 고품질로 간주된다.

[0132] **시험관 내 sgK12LP 대립유전자 특이성 및 효능의 평가:** sgK12LP의 대립유전자-특이성 및 효능을 시험관 내 HEK AD293 세포에서 야생형 및 돌연변이 K12에 대한 외인성 발현 컨스트럭트를 사용하여 평가하였다. 이중-루시퍼라제 리포터 어세이를 이용하여 대립유전자 특이성을 먼저 결정하였다 (도 6, 항목 a). 반딧불이 루시퍼라제 활성은 K12WT-Luc 또는 K12LP-Luc를 발현하고 sgK12로 처리된 세포에서 유의미하게 감소된 것으로 밝혀졌다. sgK12LP로 처리된 세포에서 반딧불이 루시퍼라제 활성의 강력하고 대립유전자-특이적인 감소가 관찰되었다. K12LP-Luc 발현 세포에서,  $73.4 \pm 2.7\%$ 의 감소가 관찰되었다 ( $P<0.001$ ) (도 6, 항목 a). 이 대립유전자-특이적이고 강력한 낭다운은 또한 K12WT-HA 또는 K12LP-HA를 발현하는 세포에서 웨스턴 블로팅에 의해 관찰되었고 (도 6, 항목 b; 4개 블록을 대표하는 이미지), 농도계측에 의한 정량은 K12WT-HA 단백질에 비해 sgK12LP에 의한 K12LP-HA 단백질에서 32%의 유의미한 감소를 나타내었다 ( $P<0.05$ ). sgK12로 처리된 세포에서, 야생형 및 돌연변이 K12 단백질 둘 다는 감소된 것으로 나타난 반면, sgK12LP로 처리된 세포에서는 야생형 단백질의 발현에는 영향을 미치지 않았지만 돌연변이 K12 단백질의 유의미한 낭다운이 나타났다 (도 6, 항목 b).

[0133] 단백질 수준에서 관찰된 이 데이터를 뒷받침하기 위해, 정량적 역전사효소-PCR 및 파이로시퀀싱을 수행하여 mRNA 수준에서 대립유전자 특이성 및 효능을 결정하였다. 야생형 및 돌연변이 K12 둘 다를 동시에 발현하고 (1:1 발현 비율로) 3개의 시험 Cas9/sgRNA 발현 컨스트럭트 (NSC, K12 및 K12LP) 중 하나로 처리된 세포에서, 정량적 역전사효소-PCR을 사용하여 총 K12 mRNA의 낭다운을 결정하였다 (도 6, 항목 c). 총 K12 mRNA의  $73.1 \pm 4.2\%$ 의 강력한 감소 ( $P<0.001$ )가 sgK12-처리된 세포에서 관찰되었고,  $52.6 \pm 7.0\%$  ( $P<0.01$ )의 더 낮은 감소가 sgK12LP-처리된 세포에서 측정되었다 (도 6, 항목 c). 파이로시퀀싱을 사용하여 이들 sgRNA로의 처리 후 잔존하는 성숙 mRNA 종의 세포내 비율을 결정하였다 (도 6, 항목 d). mRNA의 비율을 'K12-L132P의 퍼센트/K12-WT의 퍼센트'로 계산하였다. 돌연변이 및 야생형 K12 mRNA 사이의 비율을 1:1로 가정하고 sgNSC로 처리된 세포를 1로 표준화하였다. sgK12로 처리된 세포에서,  $0.89 \pm 0.03$ 의 K12 돌연변이 mRNA 비율이 관찰되었지만, NSC 대조군에 대한 차이는 유의미하지 않았다 ( $P<0.14$ ). sgK12LP로 처리된 이들 세포에서,  $0.28 \pm 0.02$ 의 K12 돌연변이 mRNA 비율이 검출되었고 sgNSC-처리된 세포에 비해 유의미하게 변경되었다 ( $P<0.001$ ) (도 6, 항목 d).

[0134] **생체 내에서 sgRNA-K12LP 효능의 결정:** Cas9-GFP 컨스트럭트의 기질내 주입은 주입 후 24시간째에 각막 상피에서 녹색 형광 단백질 (GFP) 단백질의 존재를 초래하였다 (도 7, 항목 a). GFP의 일시적 발현은 주입 후 48시간째에 발견되었다. sgK12LP 또는 sgNSC 발현 컨스트럭트의 K12-L132P 인간화 이형접합 마우스 내로의 기질내 주입 및 48시간의 인큐베이션 후 마우스를 안락사시키고 각막으로부터 게놈 DNA (gDNA)를 제조하였다. sgK12LP- 또는 sgNSC-처리된 4마리 동물의 각막으로부터의 gDNA를 풀링하고 (pooled) 인간화된 K12-L132P 유전자의 엑손 1의 PCR 증폭, 클로닝 및 시퀀싱을 수행하였다. sgNSC로 처리된 눈의 gDNA로부터 확립된 10개 클론 중에서, K12-L132P 서열은 10개 모두에서 온전히 유지되었다. sgK12LP-처리된 눈으로부터의 13개 개별 클론의 서열을 분석하였고; 8개는 변형되지 않은 KRT12 L132P 인간 서열을 함유하는 것으로 나타난 반면, 5개 클론은 Cas9/sgK12LP 복합체의 예측된 절단 부위에서 NHEJ를 나타내었다 (도 7, 항목 b). 하나의 클론 (1)에서, 32개 뉴클레오티드의 결실과 함께, 1개 뉴클레오티드의 삽입이 발견되었다. 최대 53개 뉴클레오티드의 거대 결실이 생체 내에서 관찰되었다 (클론 5). 이들 5개 클론 중에서, 4개 (클론 1 및 3 내지 5)는 초기 정지 코돈의 발생을 유발하는 프레임쉬프트를 초래할 것으로 예상되는 결실을 함유한다. 마우스에서 sgK12LP의 상위 2개 예측된 엑손 오프-표적 부위를 또한 이 방법을 이용하여 평가하였다. 각 표적에 대해 10개 클론의 서열을 분석하였고 어느 것도 비-특이적 절단을 거치지 않은 것으로 나타났다.

[0135] R514P, L518R 및 L509R에서의 돌연변이에 의해 생성된 PAM 부위와 연관된 TGFBI 돌연변이: 단일 가이드 RNA를 이들 돌연변이 각각에 대해 표적하도록 고안하고 sgRNA/Cas9 발현 플라스미드 내로 클로닝하였다. 또한, 자연 발

생적인 근접 (near-by) PAM을 이용하는 양성 대조군 가이드 RNA를 각 돌연변이에 대해 고안하였다. 야생형 및 돌연변이 표적 서열을 루시퍼라제 리포터 플라스미드 내로 클로닝하여 WT 및 MUT 발현의 발현에 대한 유전자 편집 효과의 모니터링을 가능케 하였다. 두 플라스미드 모두를 사용하여 AD293 세포를 형질감염시키고 루시퍼라제 발현을 본 발명의 고성능 리포터 유전자 어세이를 사용하여 CRISPR Cas9 처리 48시간 후에 측정함으로써 세포에 존재하는 MUT 및 WT DNA의 양을 측정하였다.

[0136] 도 8은 SNP 유래 PAM 접근법을 이용하여 평가된 3개 TGFBI 돌연변이 (R514P, L518R, 및 L509R)의 경우 유의미한 대립유전자-특이성이 달성되었고, 돌연변이 대립유전자는 CRISPR Cas9 시스템에 의해 절단되고 WT DNA는 일부 가이드에 대해 일정 정도 절단되었다.

[0137] PAM 부위에 인접한 표적 영역 내부에 놓여 있는 SNP 돌연변이와 연관된 TGFBI 돌연변이: 단일 가이드 RNA를 이들 돌연변이를 표적하도록 고안하고 sgRNA/Cas9 발현 플라스미드 내로 클로닝하였다. 야생형 및 돌연변이 표적 서열을 루시퍼라제 리포터 플라스미드 내로 클로닝하고 본 발명의 고성능 리포터 유전자 어세이로 평가하였다. 두 플라스미드 모두를 사용하여 AD293 세포를 형질감염시키고 루시퍼라제 발현을 그로부터 2일 후에 측정하였다. 먼저, 20 bp 표적 특이적 서열을 함유하는 sgRNA를 시험하였다. 그러나, 이들은 충분한 대립유전자 특이성을 제공하지 못하였다. 이어서, 표적 서열이 18 bp로 감소된, 절단된 (truncated) sgRNA (TRU-가이드)를 고안하였다. 향상된 대립유전자-특이성이 확인되었다 (도 9, 항목 a-f).

[0138] **생체 외 유전자 교정:** 루시퍼라제 리포터 마우스로부터 각막에서 유전자-침묵을 달성하는 능력이 입증되었다. *Luc2*에 대한 마우스 이형접합체를 희생시키고 이들의 각막을 절개한 후 세포 배양 배지로 옮겼다. 절개된 각막을 리포펙타민 2000을 사용하여 비-특이적 대조군 sgRNA 또는 루시퍼라제 리포터 유전자에 표적된 sgRNA 중 하나로 형질감염시켰다. 각막을 3일간 배양 상태로 유지하고 루시퍼라제 발현을 측정하였다.

[0139] 루시퍼라제 리포터 유전자의 강력한 침묵 (도 10)이 생체 외 표적 유전자의 성공적인 CRISPR 유전자 편집을 나타내는 *Luc2*를 표적하는 sgRNA로 형질감염된 각막에서 관찰되었다. *Luc2*에 대한 마우스 이형접합체로부터의 각막을 절개하고 CRISPR 유전자 편집을 생체 외에서 수행하였다. 마우스 각막 상피 줄기세포는 윤부 영역에만 국한되는 것이 아니고, 이에 본 발명자들은 도 10에 나타난 바와 같이 전체 상피에 걸쳐서 유전자 편집을 보여줄 필요가 있었다. 처리 직후에 대한 도면의 짙은 색은 완전한 유전자 편집 및 전체 마우스 각막에서 *Luc* 유전자의 생체 외 넉아웃을 입증하였다 (Moore JE, McMullen CBT, Mahon G, Adamis AP (2002). The Corneal Epithelial Stem Cell. DNA & Cell Biology, 21 (5-6) pp. 443-451)

#### 과립 각막 이상증 타입 II의 치료를 위한 수술적 이식

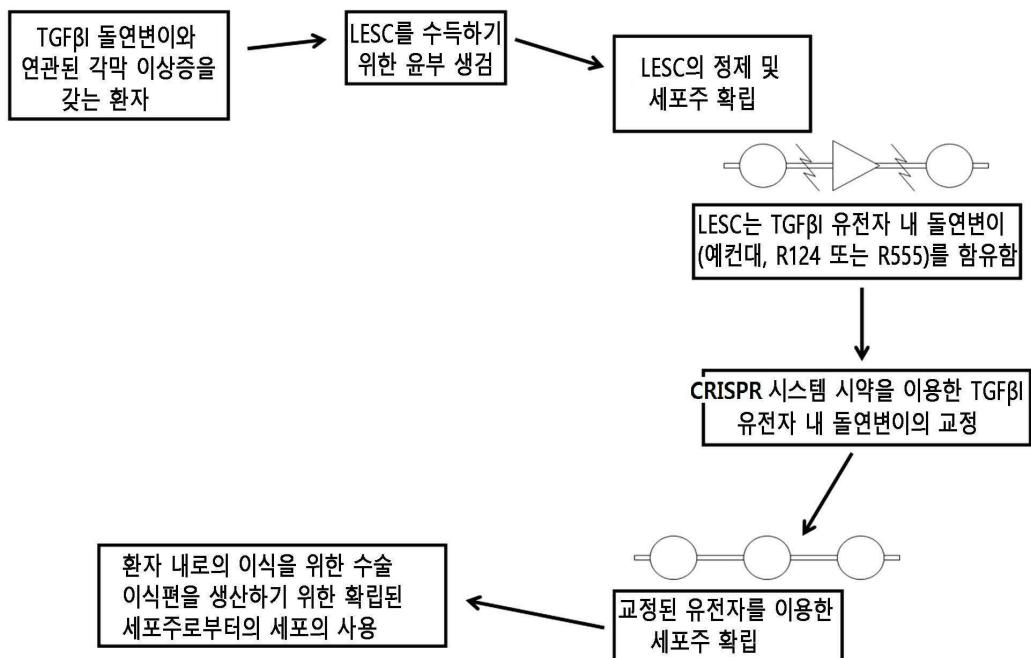
[0141] 과립 각막 이상증 타입 II에 대해 치료를 받은 환자로부터 수득된 윤부 생검 샘플로부터의 세포를 배양한다. 치료를 받은 환자는 다음 아미노산 치환 중 하나를 인코딩하는 TGFBI 유전자 내 돌연변이를 수반한다: R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q, 및 H626P. 세포를 세척하고 윤부 상피 줄기세포 (LESC)를 다음 마커 중 하나 이상을 기준으로 분류한다: 전사인자 p63, ABCG2, C/EBP δ 또는 Bmi-1. 3T3 피더 세포의 존재하에서 단리된 LESCs로부터 세포주를 확립한다. 그 후에 확립된 LESCs 세포주를 다음 양성 마커 중 하나 이상의 존재에 의해 확인하고: 전사인자 p63, ABCG2, C/EBP δ 또는 Bmi-1, 다음 음성 마커의 하나 이상의 부재에 의한 확인한다: 사이토케라틴 3 (CK3), 사이토케라틴 12 (CK12), 코넥신 43 또는 인볼루크린.

[0142] CRISPR 시스템 시약을 문헌 [Shalem et al., *Nature Reviews Genetics* 16: 299-311 (2013); Zhang et al., *Human Molecular Genetics* 23(R1): R40-6 (2014); Zetsche et al. dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038 (2015) 및 Zhu et al. *Cell* 157: 1262-1278 (2014)]에 따라서 준비한다. CRISPR 시스템 시약은 동일한 벡터 상에 포함된 하나 이상의 가이드 RNA (gRNA), 및 타입-II 뉴클레아제 (예컨대, Cas9 또는 Cpf1) 및 대략 150 bp 길이인 복구 핵산을 포함한다. 복구 핵산은 R124, R555, 또는 H626의 야생형 대립유전자뿐만 아니라 상동 재조합 과정을 위한 위치 선택을 허용하는 선택가능한 GFP 마커를 포함한다. CRISPR 시스템 시약을 표준 중합체 기반 (DEAE 텍스트란) 형질감염 기법을 이용하여 LESCs 세포 내로 도입하였다. LESCs는 핵산 조작 과정을 거치도록 허용되고, 이러한 과정에 대해 양성인 세포를 GFP 마커 및 FACS를 사용하여 단리한다. 원하는 상동 재조합 과정은 FACS 분류된 LESCs에서 관심 TGFBI 영역의 시퀀싱에 의해 추가로 확인된다.

[0143] 원하는 야생형 TGFBI 대립유전자를 함유하는 조작된 LESCs를, 조작된 LESCs가 이식을 위한 적절한 면적의 크기로 확장하기에 충분한 시간 동안 양막 상에서 배양한다. 일단 원하는 크기가 달성되면, 조작된 LESCs는 담체로서 양막을 사용하여 이식될 수 있다.

## 도면

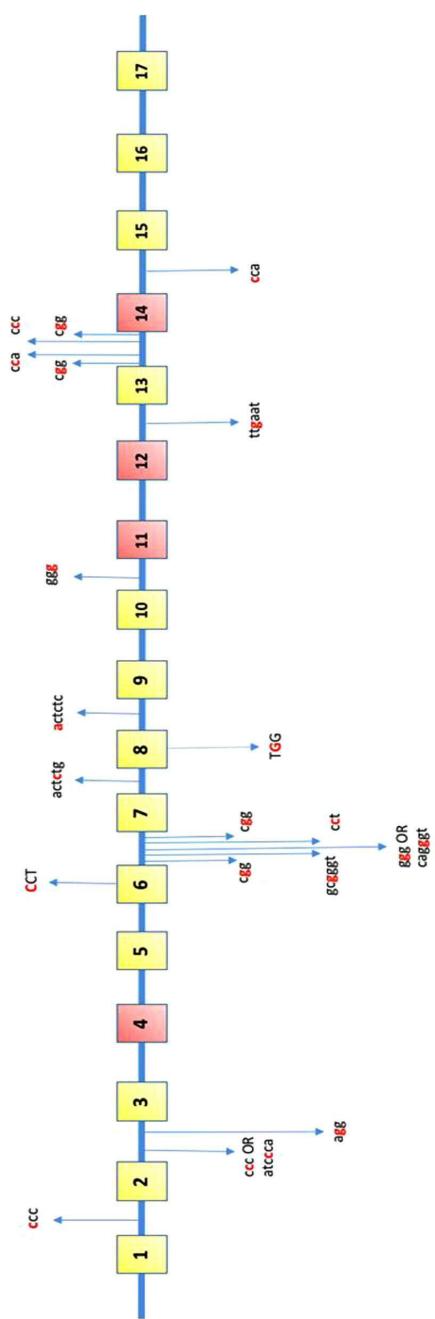
### 도면1



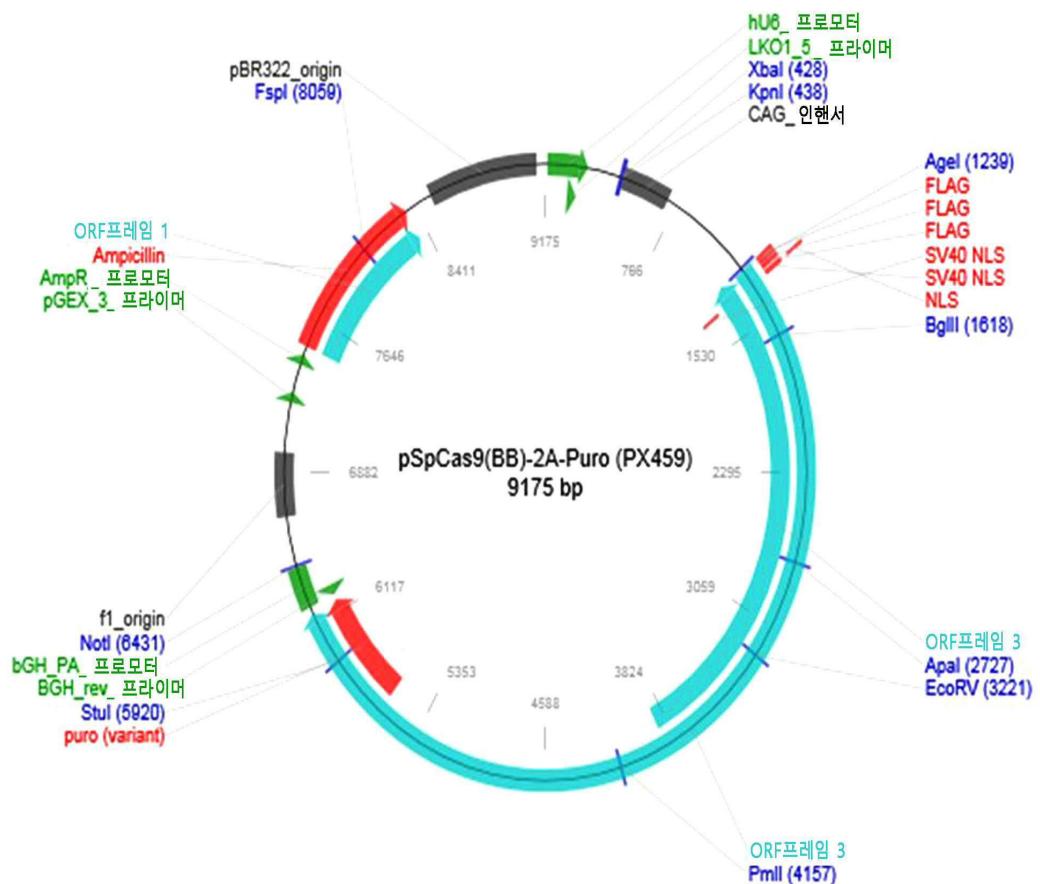
## 도면2

POS	#CHROM	Cytoband	Symbol	ID	REF	ALT	Effect	Effect Impact	Codon Change	Amino Acid Change	Functional Class	MAF/1000 genomes
11:0819598	13	q34	COL4A1	rs3742207	T	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	caA/caC	Q1334H	Missense	G=0.2883/1444
11:1113936	13	q34	COL4A2	rs3803230	G	C	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	g/Ga/g/Ca	G683A	Missense	C=0.1038/520
11:1121620	13	q34	COL4A2	rs95833500	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	Ccc/Tcc	P718S	Missense	T=0.199/956
11:1111235	13	q34	COL4A2	rs7980383	G	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	a/Ga/Aa	R517K	Missense	G=0.4908/2458
228121101	2	q36.3	COL4A3	rs5703767	G	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	Gat/Tat	D326Y	Missense	T=0.1158/580
228131169	2	q36.3	COL4A3	rs11677877	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	caC/cGc	H451R	Missense	G=0.1114/558
227892720	2	q36.3	COL4A4	rs229813	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	GrG/Atg	V1327M	Missense	T=0.4930/2469
121413208	5	q23.2	LOX	rs1800449	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	GgG/cAq	R158Q	Missense	T=0.1567/785
151043103	5	q33.1	SPARC	rs1053411	G	C	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	2831	C=0.2280/1142		
151054137	5	q33.1	SPARC	rs2116780	A	C	INTRAGENIC	Moderate	acC/acA	T132	SILENT	C=0.2288/1151
38866721	3	p26.2	LRRN1	rs3749350	C	A	SYNONYMOUS_CODING	Low	acC/acA	T132	SILENT	A=0.2911/1458
81355449	7	q21.11	HGF	rs2286194	T	A	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	A1046T	Missense	A=0.2051/1027
81350208	7	q21.11	HGF	rs12536657	A	G	INTRAGENIC	Moderate	Gcg/Acq	G624V	Missense	A=0.1152/577
86287867	15	q25.3	AKAP13	rs2614668	G	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	ggG/gTg	G2358R	Missense	A=0.1883/944
86123170	15	q25.3	AKAP13	rs745191	G	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	Ggg/Cgg	3692	C=0.2951/1478	
88501034	16	q24.2	ZNF469	rs12598474	G	C	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	3/4	SILENT	A=0.0596/479
232376566	2	q36.1	ATG122	rs10932976	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	1150	SILENT	G=0.1560/589
142605005	X	q27.3	GS1-256022.5	rs2286194	G	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	EXON	SILENT	A=0.2003/1003
204242731	1	q32.1	PLEKH46	rs33803438	C	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	EXON	SILENT	A=0.4523/2265
36597652	22	q12.3	APOL4	rs132728	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	EXON	SILENT	C=0.4555/2281
36597655	22	q12.3	APOL4	rs132729	C	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	EXON	SILENT	A=0.4553/2285
36597657	22	q12.3	APOL4	rs132730	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	DOWNSTREAM	SILENT	G=0.4527/2267
142605005	1	p21.3	SLC44A3	rs59063	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	DOWNSTREAM	SILENT	C=0.4343/2171
93303659	1	p21.3	SLC44A3	rs2893276	T	C	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	DOWNSTREAM	SILENT	C=0.4429/2218
95290003	1	p21.3	SLC44A3	rs6687749	C	T	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	G=0.4125/2081
1238375	5	p15.33	SLC6A18	rs13198855	A	G	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	C=0.3904/1955
1238396	5	p15.33	SLC6A18	rs6876514	G	C	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	A=0.3904/1955
1238397	5	p15.33	SLC6A18	rs6876515	G	A	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	G=0.3227/1616
1243427	5	p15.33	SLC6A18	rs131361701	T	G	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	A=0.2841/1423
73104178	10	q22.1	SLC29A3	rs883764	G	A	INTRAGENIC	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
73111258	10	q22.1	SLC29A3	rs780667	G	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	T=0.4798/2403
73111408	10	q22.1	SLC29A3	rs780668	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
36257864	5	p13.2	RANBP3L	rs13166148	A	C	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
36301362	5	p13.2	RANBP3L	rs10941287	T	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
78880943	10	q22.3	KCNMA1	rs7907270	A	G	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
1212847	11	p15.5	MUC5AC	rs20922784	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
17265560	1	p36.13	CROCC	rs9435793	C	T	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
2945437	11	p15.5	ATHL1	rs1630974	T	A	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	unknown
103040400	X	q22.2	PLP1	rs2233996	T	C	NON_SYNONYMOUS_CODING	Moderate	MODIFIER	INTRON	SILENT	C=0.4426/1682

## 도면3

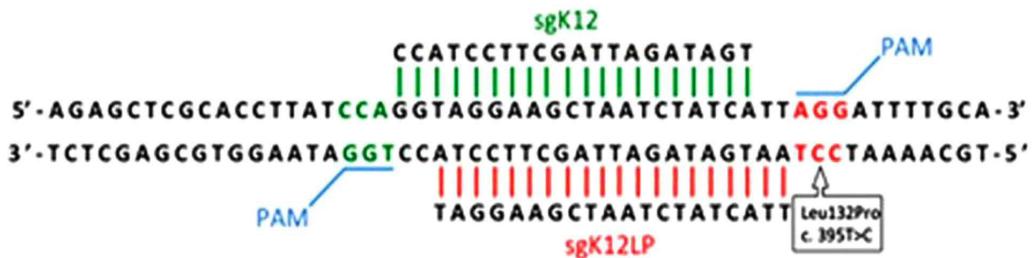


## 도면4

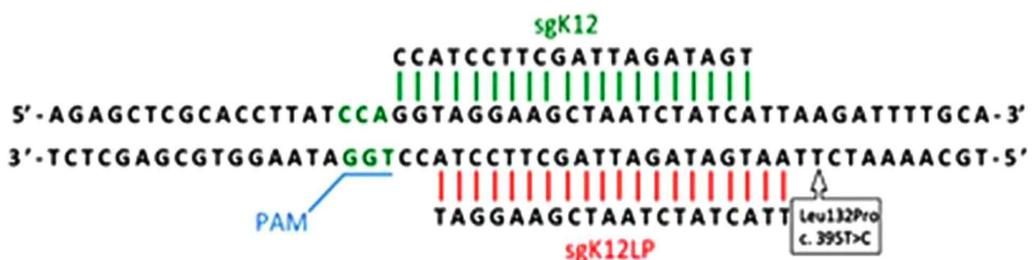


## 도면5

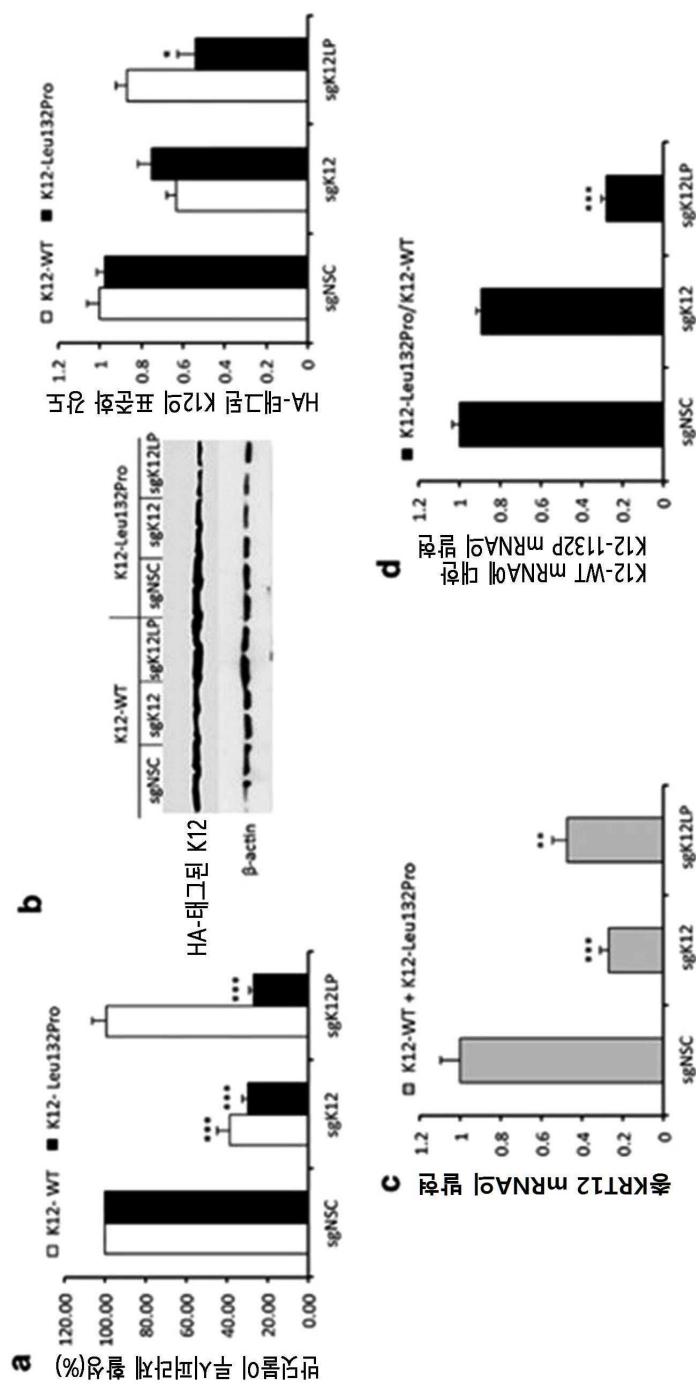
## 돌연변이 KRT12 대립유전자



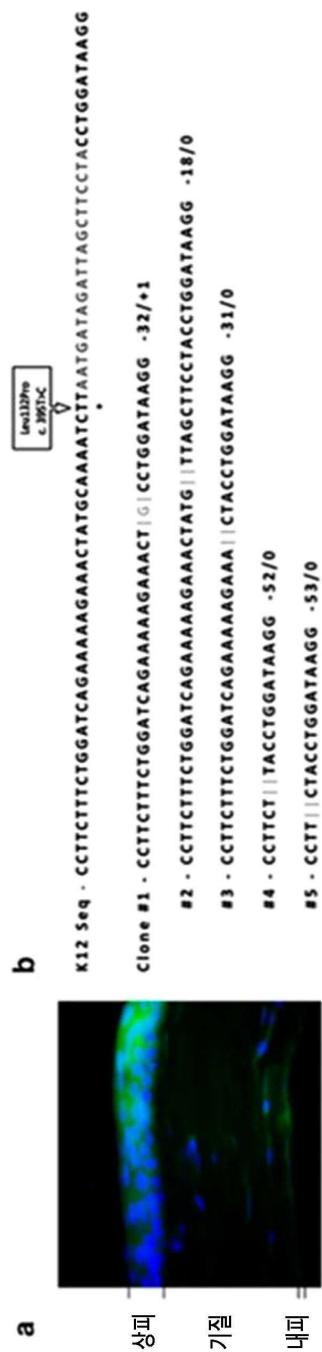
## 야생형 KRT12 대립유전자



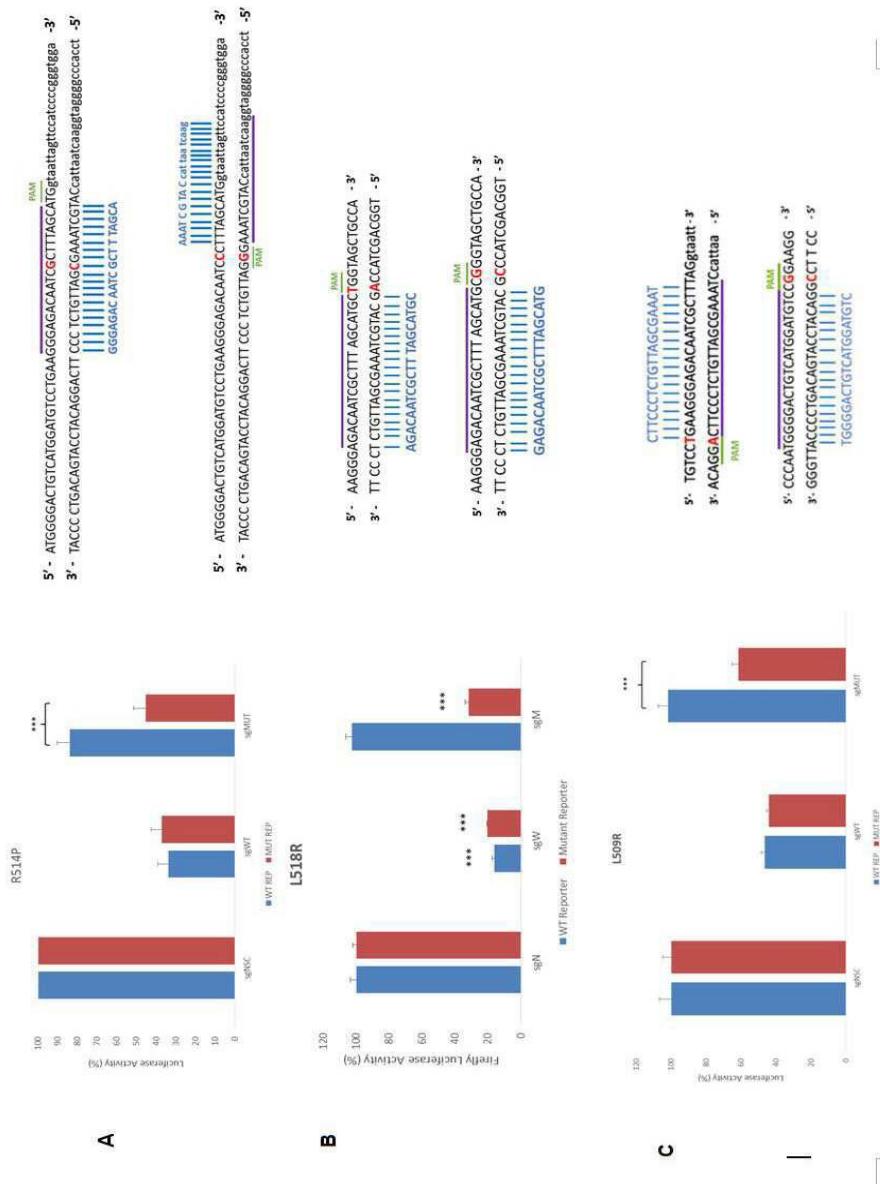
## 도면6



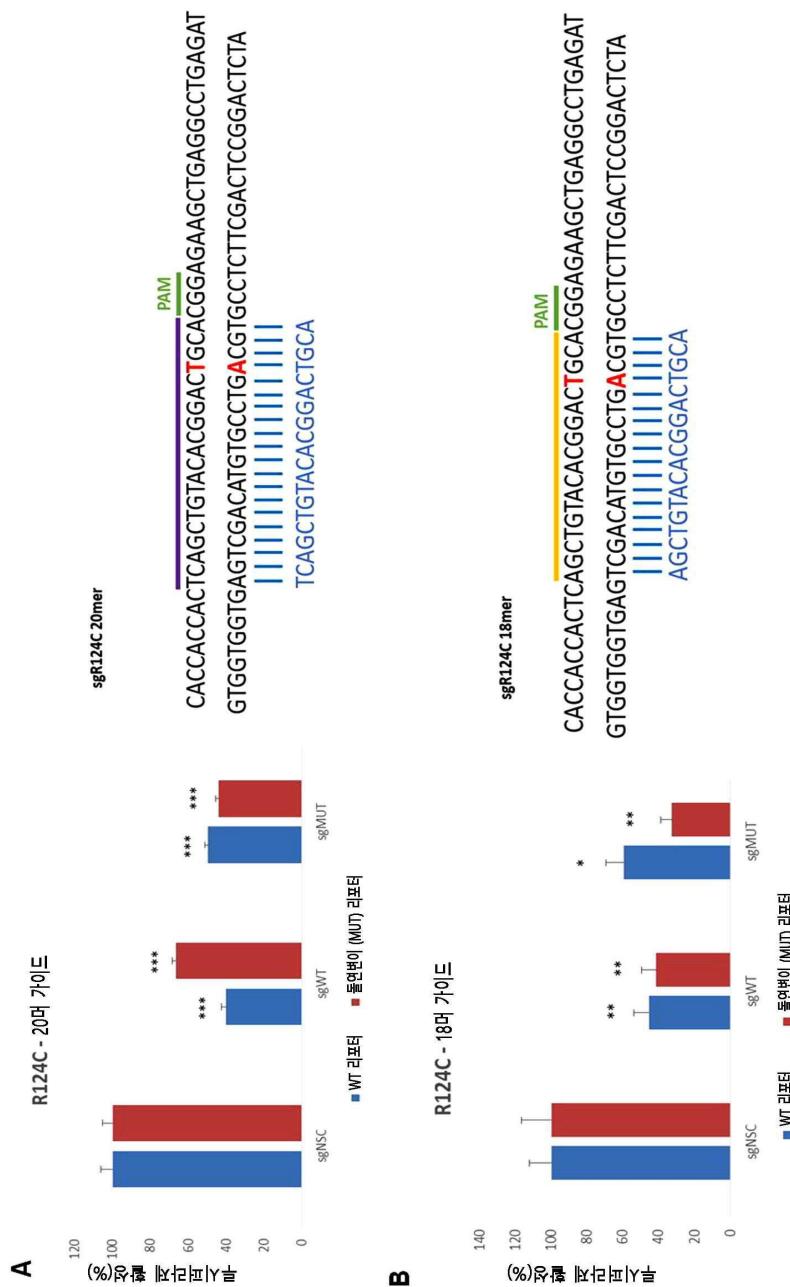
도면7



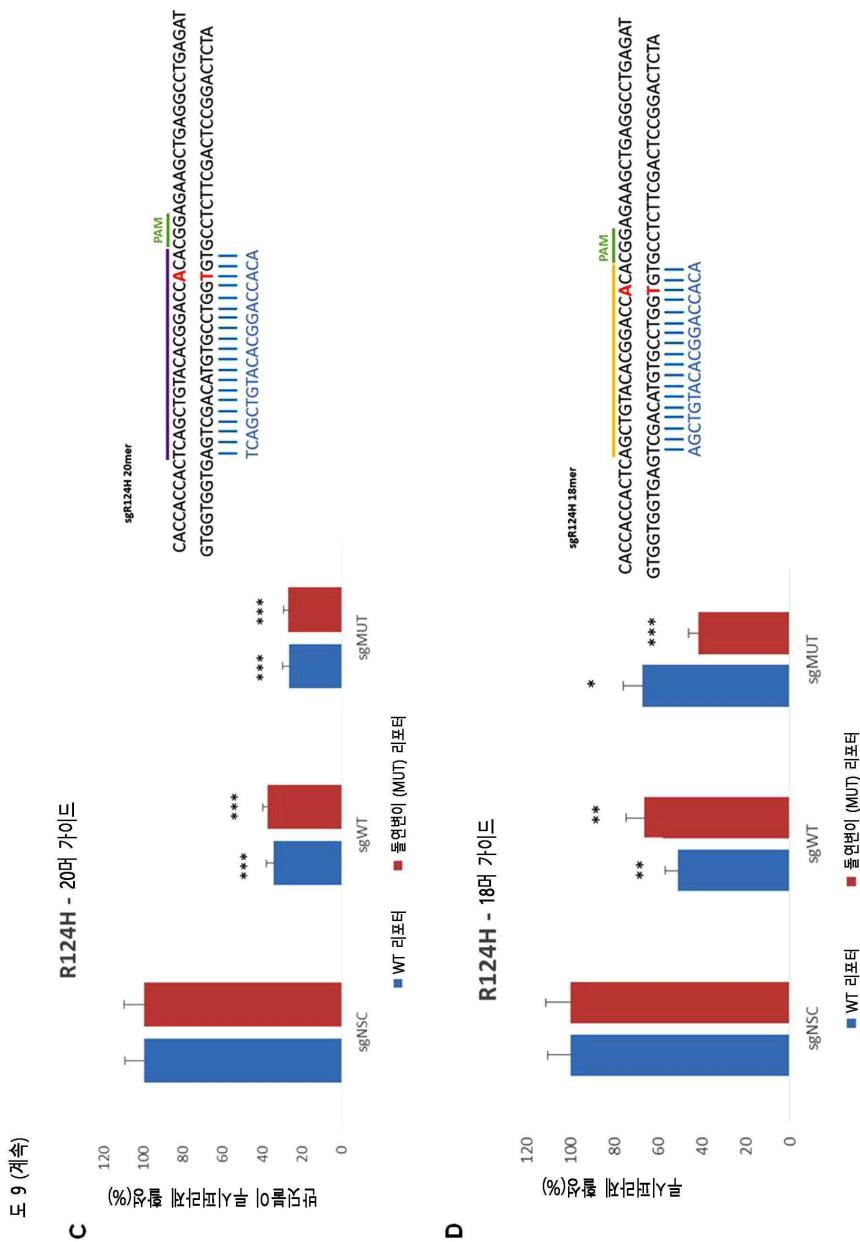
## 도면8



## 도면9a

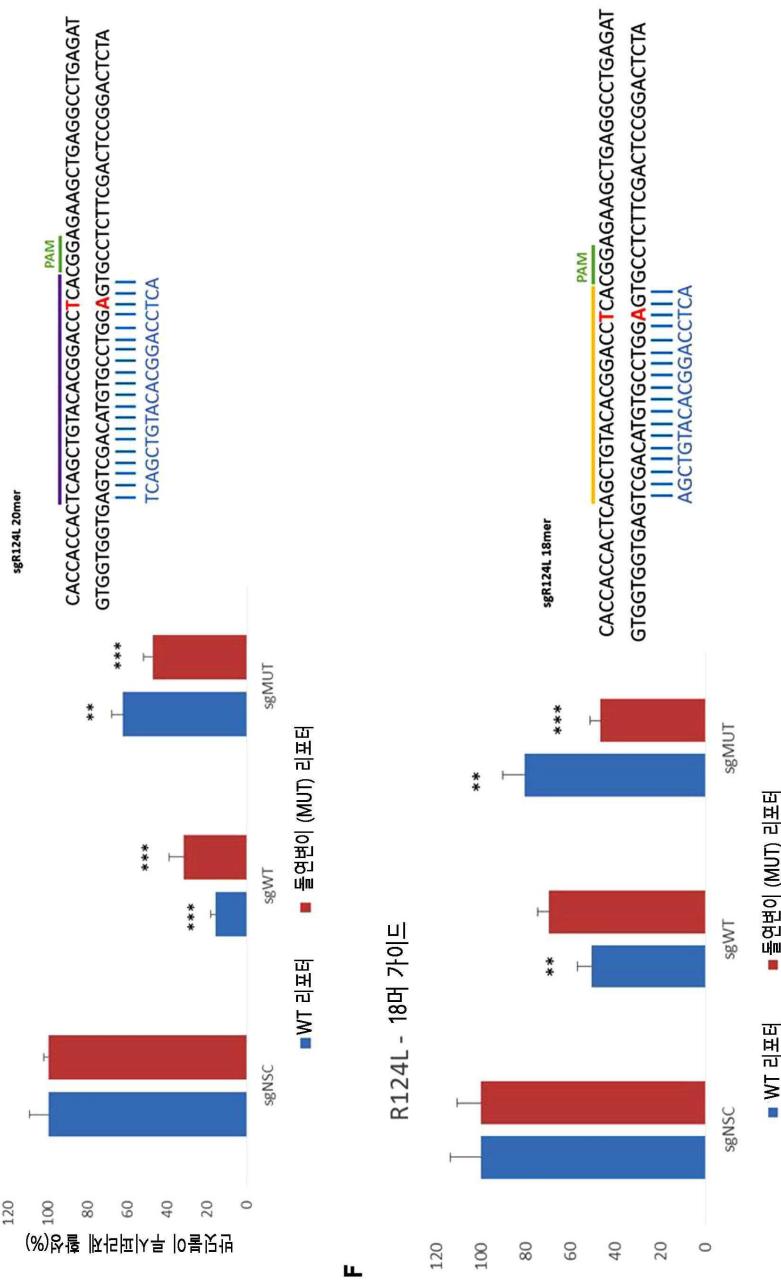


## 도면 9b



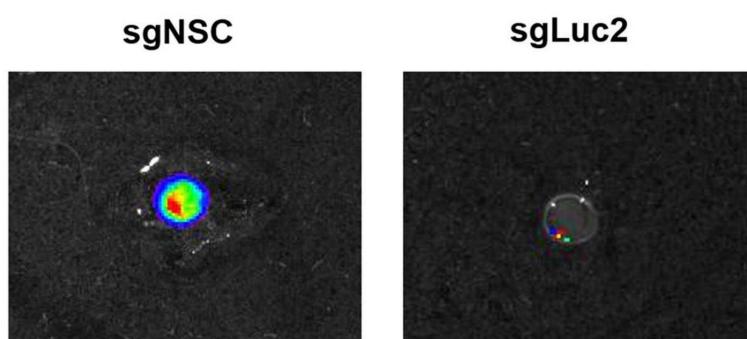
도 9 (계속)

## 도면9c



도 9 (계속)

## 도면10



## 도면11a

### **Spy Cas9 sgRNA sequence**

NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAAGGCU  
AGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU (SEQ ID NO: 1)

여기서 "NNNNNNNNNNNNNNNNNN"은 sgRNA 내 가이드 서열 (crRNA)을 나타냄,  
및

"GUUUUAGAGCUAGAAAUGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCGUUAUCAACUUGAAA  
AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU" (서열번호: 2)는 예시적인 tracrRNA 또는 sgRNA  
스캐폴드 서열임.

N의 수는 가이드 서열 내 뉴클레오티드의 실제 수를 나타내지 않음.

### **Spy Cas9 뉴클레오티드 서열**

atggactataaggaccacgacggagactacaaggatcatgatattgattacaagaacgtgacgataagatggcccaaagaagaagcggaaagg  
tgggtatccacggagtcccagcagccgacaagaactacgatcgccctggacatcgceaccaactctgtgggtggccgtgtacccgacg  
agtacaagggtcccaagcaagaattcaagggtgtggcaacacccggcagccacagcatcaagaagaacactgtatccgtggagccctgtgttcgaca  
gcggcggaaacacccggcggccacccggcgtgaagagaacccggcagaagaagatacaccacgacgagaacccggatctgtatctgcaagagat  
cttcageacacggatggccaagggtggacgacactttccacacagactggaaagactgtccctctgtggaaagaggataagaacggacggcgeac  
cccatcttcgcaacatcggtggacgggtggccatccacgagaacttccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat  
aggccgacccgtcgccgtcatctggccctggcccatgtcaagttcccgccacttccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat  
cgacgtggacaaggatgttcatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat  
catccat  
attggcccttgccat  
acgacccgtggacaacccgtccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccat  
catccat  
aaagetctcgatccat  
ccat  
gctcgccat  
ttaccat  
gattcgccat  
cgatccat

### 도면11b

### 도 11(계속)

## Spy Cas9 아미노산 서열

MDYKDHDGDKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKVGIGHVPAADKKYSIGLDIGTNSGVWAV  
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQ  
EIFSNEMAKVDDSSFFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST  
DKADLRLIYLALAHMKFRGHFLIEGDLNPNSDVKLFQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK  
AIALSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYD  
DDLDNLQAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLL  
KALVRQQLPEKYKEIFFDQSCKNGYAGYIDGGASQEELYFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED  
LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRKIEKILTFRIPYYYVGPLARGNSRF  
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSIERMTNFDKNLPNEEKVLPKHSLLYEYFTVYNEL  
TKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR  
FNASLGTYHDLJKJDKDFLDNE

**도면11c****도 11(계속)**

ENEDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRTGWRGLSRKLINGIRD  
 KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKK  
 GILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEGLSQLK  
 EHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMDYVDQELDINRLSDYDVDHVIPQSFLKDDSIDNKVLT  
 RSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFNDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR  
 QLVETRQITKHVAQILDLSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNY  
 HHAHDAYLNAVVGTLALKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNI  
 MNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGG  
 FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVKGSKKLKSVKELLGI  
 TIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP  
 SKYVNFLYLA SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVLS  
 AYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLY  
 ETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKK (서열번호 4)

**Sau Cas9 sgRNA**

GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACA  
 AGGCAAAUGCUGUUUAUCUCGUACUUGUUGCGAAGAUUUUUU (서열번호 5)

여기서 "NNNNNNNNNNNNNNNNNN"은 sgRNA 내 가이드 서열 (crRNA)을 나타내고,  
 "GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAUGCUGUUUAUCU  
 CGUCAACUUGUUGCGAAGAUUUUUU" (서열번호: 6)는 예시적인 tracrRNA 또는 sgRNA  
 스파스 서열임.

**Sau Cas9 뉴클레오티드 서열**

ATGGCCCCAAAGAAGAACCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCAAGCGGAAC TACA  
 TCCTGGGCCTGGACATCGGCATCAC CAGCGTGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGA  
 CGTGATCGATGCCGGCGTGC GGCTGTTCAAAGAGGCCAACGTGGAAACACAACGAGGGCAGGCGG  
 AGCAAGAGAGGCGCCAGAAGGCTGAAGCGGGAGGCCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAG  
 CTGCTGTTGCACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGC  
 CAGAGTGAAGGGCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTGCCGCCTGCTGCACCTG  
 GCCAAGAGAAGAGCGTGCACAACGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCC  
 ACCAAAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAATACGTGGCCGAACTGCAG  
 CTGGAACGGCTGAAGAAAGACGGGAAGTGC GGGGGCAGCATCAACAGATTCAAGACCAGCAG  
 TACGTGAAGAGAACAGCTGCTGAAGGTGAGAAGGCCTACCAACAGCTGGACCAGAGCT  
 TCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAACCCGGCGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGG  
 CAGCCCCTCGGCTGGAAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTAC  
 TTCCCCGAGGA ACTGC GGAGCGTGAAGTACGCC TACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACG  
 ACCTGAACAATCTCGTGA

**도면11d****도 11(계속)**

TCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATTACGAGAACGAGATCCAGATCATCGAGAACGTGTT  
 CAAGCAGAAGAAGAACGCCACCTGAAGCAGATGCCAAGAACAAATCCTCGTAACGAAGAGGA  
 TATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCAGCAAGGCCAGTTCACCAACCTGAAGGTGTACAC  
 GACATCAAGGACATTACCGCCCGAAAGAGATTATTGAGAACGCCAGCTGCTGGATCAGATTG  
 CCAAGATCCTGACCATCTACCAAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAACGACCAATCTGAACCTC  
 CGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAACTGAGGGCTATACCGGCACCCACAAC  
 CTGAGCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACAGCTGTCGGCACACCAAGACAAACAGATCG  
 CTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTCCCAGAACAGGTGGACCTGTCAGCAGAAAGAGATCCC  
 CACCAACCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGGCCGCTGAGAACAGGAGCTTCATCCAGAGCATCA  
 AAGTGTACACGCCATCATCAAGAACGAGTACGGCCTGCCAACGACATCATTATCGAGCTGGCCCGC  
 GAGAACACTCCAAGGAGCAGCCAGAAAATGATCAACGAGATGCAGAACGCCAACGGCAGACC  
 AACGAGCGGATCGAGGAAATCATCGGACCACCGGCAAAGAACGCAAGTACCTGATCGAG  
 AAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAAGCCATCCCTCTGG  
 AAGATCTGCTGAACAAACCCCTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCCAGAACGCTGTCCTTC  
 GACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTGTGAAGCAGGAAGAACAGCAAGAACGGCAACCGG  
 ACCCCATTCCAGTACCTGAGCAGCAGCAAGATCAGCTACGAAACCTTCAAGAACGACA  
 TCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAACATCAGCAAGACCAAGAACAGATCTGCTGGAAGA  
 ACGGGACATCAACAGGTTCTCGTGCAGAACAGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGATACCAGA  
 TACGCCACCAAGGGCCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAACAACCTGGACGTGA  
 AAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAAGCCTGTTCTCGGGCGGAAGTGGAGITTAAGAAC  
 GCGGAACAAGGGGTACAAGCACACGCCAGGGACGCCCTGATCATGCCAACGCCATTTCATC  
 TTCAAAGAGTGGAAAGAACACTGGACAAGGCCAAAAAGTGTGGAAAACCAAGATTTGAGGAA  
 AACGAGGCCAGAGCATGCCAGAGATCGAACCCAGCAGCAGGAGTACAAGAGATCTTCATCACCC  
 CCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTCAAGGACTACAAGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAA  
 GCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCCTGACTCCACCCGGAAAGGACGACAAGGGAACACC  
 CTGATCGTGAACAATCTGAACGCCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTGAAAAGCTGATCA  
 ACAAGAGGCCAGAAAGCTGCTGATGTACCAACGACCCCCAGACCTACCAAGAACGCT  
 GATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAACATCCCTGTACAAGTACTACGAGGAAACCGGGAAC  
 TACCTGACCAAGTACTCCAAAAGGACAACGGCCCCGTGATCAAGAACAGATTAAGTATTACGGCA  
 ACAAACTGAACGCCCATCTGGACATCACCAGCAACTACCCCAACAGCAGAACAGGTCGTGAA  
 GCTGTCCTGAAGCCCTACAGATTGACGTGTACCTGGACAATGGCGTGTACAAGITCGTGACCG  
 TGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAAGTACTACGAAGTGAATAGCAAGTGTATGAGGA  
 AGCTAAGAACGCTGAAGAACAGTACGCAACCAGGCCAGTGTATCGCCTCTACAACACGAT  
 CTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGTGACCGTGAACAAACGACCTGCTGAACCGGA  
 TCGAAGTGAACATGATCGACATACCTACCGCGAGTACCTGGAAAACATGAACGACAAGAGGCC  
 CCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAAGAACAGTACAGCACAGACATT  
 CTGGGCAACCTGTATGAAAGTGAATCTAAGAACGACCCCTCAGATCATCAAAAGGGCAAAAGGC  
 CGGCCGCCACGAAAAGGCCGGCAGGCAAAAAGAAAAAGggatccTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtaa

(서열 번호 7)

**도면11e****도 11 (계속)****Sau Cas9 아미노산 서열**

MAPKKKRVKVGIHGVPAAKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEG  
 RRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEFSAA  
 LLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINR  
 FKTSDYVKEAKQLLKVKAYHQLDQSFDITYIDLLETTRRTYYEGPGEGPSFGWWDIKEWYE  
 MLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNLVITRDENEKLEYEKFQIIENVFKQKK  
 KPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTI  
 YQSSEDIQEELTNLNSETTQEEIEQISNLKGYTGTNLKSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLK  
 LVPKKVDSLQQKEIPTLVDDFILSPVVKRSFIQSIIKVINAIKKYGLPNDDSKISYETFKKHILNLAKG  
 KMINEMQKRNQRTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPF  
 NYEVVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKG  
 KGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSI  
 NGGFTSFLRRWKFKKERNKGYKHADALIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEK  
 QAESMPEIETEQEYKEFITPHQIKHDFKDYKSHRVDDKPNRELINDTLYSTRKDDKGNT  
 LIVNNLNGLYDKDNKLINKSPEKLLMYHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEE  
 TGNYLTYSKKDNGPVKKIKYYGNKLNNAHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNG  
 VYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKLKKISNQAIFIASFYNNDLIKINGELYRVIGV  
 NNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVSKKKHPQ  
 IIKKGKRPAATKAGQAKKKGSYPYDVPDYAYPYDVPDYAYPYDVPDYA (서열 번호 8)

**서 열 목 록**

## SEQUENCE LISTING

- <110> MOORE, Tara, etc.
- <120> METHODS FOR THE TREATMENT OF CORNEAL DYSTROPHIES
- <130> IPA180573-US
- <140> PCT/US2016/061893
- <141> 2016-11-14
- <150> 62/255,310
- <151> 2015-11-13
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 102
- <212> RNA
- <213> artificial
- <220><223> Spy Cas9 sgRNA
- <220><221> misc\_feature
- <222> (1)..(20)
- <223> n is a, c, g, or u
- <400> 1

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
 cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu	102
<210> 2	
<211> 82	
<212> RNA	
<213> artificial	
<220><223> tracrRNA or sgRNA scaffold sequence	
<400> 2	
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu	60
ggcacccgagu cggugcuuuu uu	82
<210> 3	
<211> 3974	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> Spy Cas9 nucleotide sequence	
<400> 3	
atggactata aggaccacga cggagactac aaggatcatg atattgatta caaagacgt	60
 gacgataaga tggccccaaa gaagaagcg aaggctggta tccacggagt cccagcagcc	120
gacaagaagt acagcatcg cctggacatc ggcaccaact ctgtgggctg gcccgtgatc	180
accgacgagt acaaggtgcc cagcaagaaa ttcaaggtgc tggcaacac cgaccggcac	240
agcatcaaga agaacctgat cggagccctg ctgttcgaca gcggcgaaac agccgaggcc	300
acccggctga agagaaccgc cagaagaaga tacaccagac ggaagaaccg gatctgtat	360
ctgcaagaga tcttcagcaa cgagatggcc aaggtggacg acagttctt ccacagactg	420
gaagagtct tcctggtgga agaggataag agcacgagc ggcacccat cttcgcaac	480
 atcggtggacg aggtggccta ccacgagaag tacccacca tctaccacct gagaaagaaa	540
ctgggtggaca gcacccgacaa ggccgacctg cggctgatct atctggccct ggcccacatg	600
atcaagttcc gggccactt cctgatcgag ggcgacctga accccgacaa cagcgacgtg	660
gacaagctgt tcatccagct ggtgcagacc tacaaccagc tggtcgagga aaaccccatc	720
aacgccagcg gcgtggacgc caaggccatc ctgtctgcca gactgagcaa gagcagacgg	780
ctggaaaatc ttagtcggcc gctgcccggc gagaagaaga atggctgtt cgaaacctg	840
attggccctga gcctggccct gaccccaac ttcaagagca acttcgaccc ggccgaggat	900

gccaaactgc agctgagcaa ggacacctac gacgacgacc tggacaacct gctggcccag	960
atcggcgacc agtacgcccga cctgttctg gccgccaaga acctgtccga cgccatcctg	1020
ctgagcgaca tcctgagagt gaacaccgag atcaccaagg cccccctgag cgcctctatg	1080
atcaagagat acgacgagca ccaccaggac ctgaccctgc taaaagctct cgtgcggcag	1140
cagctgcctg agaagtacaa agagatttc ttgcaccaga gcaagaacgg ctacgcggc	1200
tacattgacg gcgaggccag ccaggaagag ttctacaagt tcatcaagcc catcctggaa	1260
aagatggacg gcaccgagga actgctcgtg aagctgaaca gagaggaccc gctgcggaa	1320
cagcggacct tcgacaacgg cagcatcccc caccagatcc acctgggaga gctgcacgcc	1380
attctgcggc ggcaggaaga ttttaccca ttccctgaagg acaaccggga aaagatcgag	1440
aagatcctga cttccgcat cccctactac gtggccctc tggccagggg aaacagcaga	1500
ttcgcctgga tgaccagaaa gagcgaggaa accatcaccc cctggaactt cgaggaagt	1560
gtggacaagg gcgctccgc ccagagcttc atcgagcggta tgaccaactt cgataagaac	1620
ctgccaacg agaaggtgct gccaagcac accctgctgt acgagtaactt caccgttat	1680
aacgagctga ccaaagtgaa atacgtgacc gaggaaatga gaaagccgc cttcctgagc	1740
ggcgagcaga aaaaggccat cgtggacctg ctgttcaaga ccaaccggaa agtgaccgtg	1800
aagcagctga aagaggacta cttcaagaaa atcgagtgt tcgactccgt ggaaatctcc	1860
ggcgtggaag atcggttcaa cgcctccctg ggcacatacc acgatctgt gaaaattatc	1920
aaggacaagg acttccctgga caatgaggaa aacgaggaca ttctggaaga tatcgtgctg	1980
accctgacac ttttgagga cagagatgt atcgaggaac ggctgaaaac ctatcccac	2040
ctgttcgacg acaaagtgtat gaagcagctg aacggccgga gatacaccgg ctggggcagg	2100
ctgagccgga agctgatcaa cggcatccgg gacaaggactt ccggcaagac aatcctggat	2160
ttcctgaagt ccgacggctt cgccaaacaga aacttcatgc agctgatcca cgacgacagc	2220
ctgaccttta aagaggacat ccagaaagcc caggtgtccg gccagggcga tagcctgcac	2280
gagcacattg ccaatctggc cggcggcccc gccattaaga agggcatct gcagacagt	2340
aagggttgtt acgagctgt gaaagtgtat ggccggcaca agcccgagaa catcgtgtat	2400
gaaatggcca gagagaacca gaccacccag aagggacaga agaacagccg cgagagaatg	2460
aagcggatcg aagagggcat caaagagctg ggcagccaga tcctgaaaga acacccctgt	2520
gaaaacaccc agctgcagaa cgagaagctg tacctgtact acctgcagaa tggcggat	2580
atgtacgtgg accaggaact ggacatcaac cggctgtccg actacgtatgt ggaccatatc	2640
gtgcctcaga gcttctgaa ggacgactcc atcgacaaca aggtgctgac cagaagcgcac	2700
aagaaccggg gcaagagcga caacgtgcc tccgaagagg tcgtgaagaa gatgaagaac	2760

tactggcggc agctgctgaa cgccaagctg attaccaga gaaagttcga caatctgacc	2820
aaggccgaga gaggccgcct gagcgaactg gataaggccg gttcatcaa gagacagctg	2880
gtggaaaccc ggcagatcac aaagcacgtg gcacagatcc tggactcccg gatgaacact	2940
aagtacgacg agaatgacaa gctgatccgg gaagtgaaag tgatcaccct gaagtccaag	3000

ctgggtgtccg attccggaa ggatttccag ttttacaag tgcgcgagat caacaactac	3060
caccacgccc acgacgccta cctgaacgcc gtcgtggaa ccgcctgtat caaaaagtac	3120
cctaagctgg aaagcgagtt cgtgtacggc gactacaagg tgtacgacgt gcggaaagatg	3180
atcgccaaga gcgagcagga aatcgcaag gctaccgcca agtacttctt ctacagcaac	3240
atcatgaact tttaaagac cgagattacc ctggccaacg gcgagatccg gaagcggcct	3300
ctgatcgaga caaacggcga aaccggggag atcgtgtgg ataaggccg ggattttgcc	3360
accgtgcgga aagtgcgttag catgccccaa gtgaatatcg tgaaaaagac cgaggtgcag	3420

acaggcggct tcagcaaaga gtctatcctg cccaaaggaa acagcgataa gctgatgcc	3480
agaaagaagg actgggaccc taagaagtac ggccgtttcg acagccccac cgtggcttat	3540
tctgtgtgg tggggccaa agtggaaaag ggcaagtcca agaaactgaa gagtgtgaaa	3600
gagctgtgg ggatcaccat catggaaaga agcagcttcg agaagaatcc catcgacttt	3660
ctggaaaggca agggtacaa agaagtggaa aaggacctga tcatcaagct gcctaagtac	3720
tccctgttcg agtggaaaaa cggccggaaag agaatgctgg cctctgccgg cgaactgcag	3780
aaggaaacg aactggccct gccctccaaa tatgtgaact tcctgtaccc ggccagccac	3840

tatgagaagc tgaagggctc ccccgaggat aatgagcaga aacagctgtt tgtgaaacag	3900
cacaaggact acctggacga gatcatcgag cagatcagcg agttctccaa gagagtgtac	3960
ctggccgacg ctaa	3974

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1423

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Spy Cas9 amino acid sequence

&lt;400&gt; 4

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Arg Lys Val

Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu  
 35 40 45  
 Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr  
 50 55 60  
 Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His  
 65 70 75 80  
 Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu  
 85 90 95  
 Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr  
 100 105 110  
 Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu  
 115 120 125  
 Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe  
 130 135 140  
 Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His  
 165 170 175  
 Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu  
 180 185 190  
 Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu  
 195 200 205  
 Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe  
 210 215 220  
 Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser  
 245 250 255  
 Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys  
 260 265 270  
 Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr

275	280	285
Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln		
290	295	300
Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln		
305	310	315
Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser		
325	330	335
Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr		
340	345	350
Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His		
355	360	365
Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu		
370	375	380
Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly		
385	390	395
Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys		
405	410	415
Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu		
420	425	430
Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser		
435	440	445
Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg		
450	455	460
Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu		
465	470	475
Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg		
485	490	495
Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile		
500	505	510
Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln		
515	520	525

Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu

530	535	540
Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr		
545	550	555
Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro		
565	570	575
Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe		
580	585	590
Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe		

595	600	605
Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp		
610	615	620
Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile		
625	630	635
640		
Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu		
645	650	655
Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu		

660	665	670
Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys		
675	680	685
Gln Leu Lys Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys		
690	695	700
Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp		
705	710	715
720		
Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile		

725	730	735
His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val		
740	745	750
Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly		
755	760	765
Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp		

770	775	780
Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile		
785	790	795
Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser		
805	810	815
Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser		
820	825	830
Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu		
835	840	845
Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp		
850	855	860
Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile		
865	870	875
Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu		
885	890	895
Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu		
900	905	910
Glu Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala		
915	920	925
Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg		
930	935	940
Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu		
945	950	955
Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser		
965	970	975
Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val		
980	985	990
Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp		
995	1000	1005
Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala		
1010	1015	1020

His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys  
 1025 1030 1035  
 Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys  
 1040 1045 1050  
 Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile  
 1055 1060 1065  
 Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn  
 1070 1075 1080  
 Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys  
 1085 1090 1095  
 Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp  
 1100 1105 1110  
 Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met  
 1115 1120 1125  
 Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly  
 1130 1135 1140  
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu  
 1145 1150 1155  
 Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe  
 1160 1165 1170  
 Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val  
 1175 1180 1185  
 Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu  
 1190 1195 1200  
 Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile  
 1205 1210 1215  
 Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu  
 1220 1225 1230  
 Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly  
 1235 1240 1245  
 Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn

1250	1255	1260
Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala		
1265	1270	1275
Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln		
1280	1285	1290
Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile		
1295	1300	1305
Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp		
1310	1315	1320
Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp		
1325	1330	1335
Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr		
1340	1345	1350
Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr		
1355	1360	1365
Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp		
1370	1375	1380
Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg		
1385	1390	1395
Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Lys Arg Pro Ala Ala Thr		
1400	1405	1410
Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys		
1415	1420	
<210> 5		
<211> 105		
<212> RNA		
<213> artificial		
<220><223> Sau Cas9 sgRNA		
<220><221> misc_feature		
<222> (2)..(22)		
<223> n is a, c, g, or u		
<400> 5		

gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnguuuuagu acucuggaaa cagaaucuac uaaaacaagg 60  
 caaaugccgu guuuauucug ucaacuuguu ggcgaagauu uuuuu 105  
 <210> 6  
 <211> 83  
 <212> RNA

<213> artificial

<220><223> tracrRNA or sgRNA scaffold sequence  
 <400> 6  
 guuuuaguac ucuggaaaca gaaucuacua aaacaaggca aaugccgugu uuaucucguc 60  
 aacuuguugg cgaagauuuu uuu 83

<210> 7

<211> 3345

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Sau Cas9 nucleotide sequence  
 <400> 7

atggccccaa agaagaagcg gaaggtcggt atccacggag tcccagcagc caagcggAAC 60  
 tacatcctgg gcctggacat cggcatcacc agcgtggct acggcatcat cgactacgag 120  
 acacgggacg ttagtgcgtgc cggcgtgcgg ctgttcaaag aggccaacgt ggaaaacaac 180

gagggcaggc ggagcaagag aggcccaga aggctgaagc ggcggaggcg gcatagaatc 240  
 cagagagtga agaagctgct gttcgactac aacctgctga ccgaccacag cgagctgagc 300  
 ggcataacc cctacgaggc cagagtgaag ggcctgagcc agaagctgag cgaggaagag 360  
 ttctctgccc ccctgctgca cctggccaag agaagaggcg tgcacaacgt gaacgaggtg 420  
 gaagaggaca cggcaacga gctgtccacc aaagagcaga tcagccggaa cagcaaggcc 480  
 ctggaaagaga aatacgtggc cgaactgcag ctggAACGGC tgaagaaaga cggcgaagtg 540  
 cggggcagca tcaacagatt caagaccagc gactacgtga aagaagccaa acagctgctg 600

aagggtgcaga aggcttacca ccagctggac cagagcttca tcgacaccta catcgacctg 660  
 ctggaaaccc ggcggaccta ctatgaggga cctggcgagg gcagccctt cggctggaag 720  
 gacatcaaag aatggtaacga gatgctgtatg ggccactgca cctacttccc cgaggaactg 780  
 cggagcgtga agtacgccta caacggcgac ctgtacaacg ccctgaacga cctgaacaat 840  
 ctcgtgtatca ccagggacga gaacgagaag ctggaatatt acgagaagtt ccagatcatc 900  
 gagaacgtgt tcaagcagaa gaagaagccc accctgaagc agatcgccaa agaaatcctc 960

gtgaacgaag aggatattaa gggctacaga gtgaccagca cggcaagcc cgagttcacc	1020
aacctgaagg tgtaccacga catcaaggac attaccgcc ggaaagagat tattgagaac	1080
gccgagctgc tggatcatcgat tgccaagatc ctgaccatct accagagcag cgaggacatc	1140
caggaagaac tgaccaatct gaactccgag ctgaccagg aagagatcga gcagatctct	1200
aatctgaagg gctataccgg cacccacaac ctgaccctga aggccatcaa cctgatcctg	1260
gacgagctgt ggcacaccaa cgacaaccag atcgctatct tcaaccggct gaagctggtg	1320
cccaagaagg tggacctgtc ccagcagaaa gagatcccc caaccctggt ggacgacttc	1380
atccgtgagcc ccgtcgtaa gagaagcttc atccagagca tcaaagtgtat caacgccatc	1440
atcaagaagt acggcctgcc caacgacatc attatcgac tggccgcga gaagaactcc	1500
aaggacgccc agaaaatgtat caacgagatg cagaagcgga accggcagac caacgagcgg	1560
atcgaggaaa tcatccggac cacccggcaaa gagaacgcca agtacctgtat cgagaagatc	1620
aagctgcacg acatgcagga aggcaagtgc ctgtacagcc tggaaaggccat ccctctggaa	1680
gatctgtga acaacccctt caactatgag gtggaccaca tcatcccgaa aagcgtgtcc	1740
ttcgacaaca gcttaacaa caaggtgctc gtgaaggcagg aagaaaacag caagaaggc	1800
aaccggaccc cattccagta cctgagcagc agcgacagca agatcagcta cgaaacccatc	1860
aagaagcaca tcctgaatct ggccaaggc aagggcagaa tcagcaagac caagaaagag	1920
tatctgttgtt aagaacggga catcaacagg ttctccgtgc agaaagactt catcaaccgg	1980
aacctgggtt ataccagata cgccaccaga ggcctgtatga acctgctgctg gagctacttc	2040
agagtgaaca acctggacgt gaaagtgaag tccatcaatg gcccgttcac cagcttctg	2100
cggcggaaat ggaagtttaa gaaagagcgg aacaaggggt acaagcacca cgccgaggac	2160
gcccgtatca ttgccaacgc cgatttcattt ttcaaagagt ggaagaaact ggacaaggcc	2220
aaaaaaagtga tggaaaacca gatgttcgag gaaaagcagg ccgagagcat gcccggatc	2280
gaaaccgagc aggagtacaa agagatcttc atcaccctcc accagatcaa gcacattaag	2340
gacttcaagg actacaagta cagccacccgg gtggacaaga agcctaatacg agagctgatt	2400
aacgacaccc tgtactccac ccggaaaggac gacaaggcga acaccctgtat cgtgaacaat	2460
ctgaacggcc tgtacgacaa ggacaatgac aagctgaaaa agctgtatcaa caagagcccc	2520
gaaaagctgc tgaatgtatcca ccacgacccccc cagacccatcc agaaactgaa gctgattatg	2580
gaacagtagc gcgacgagaa gaatccccctg tacaagtact acgaggaaac cgggaactac	2640
ctgaccaagt actccaaaaa ggacaacggc cccgtatca agaagattaa gtattacggc	2700

aacaaactga acgcccattt ggacatcacc gacgactacc ccaacagcag aaacaaggtc	2760
gtgaagctgt ccctgaagcc ctacagattt gacgtgtacc tggacaatgg cgtgtacaag	2820
ttcggtaccg tgaagaatct ggatgtgatc aaaaaagaaa actactacga agtgaatagc	2880
aagtgtatg aggaagctaa gaagctgaag aagatcagca accagggcga gtttatcgcc	2940
tccttctaca acaacgatct gatcaagatc aacggcgagc tgtatagagt gatggcggt	3000
aacaacgacc tgctgaaccg gatcgaagtg aacatgatcg acatcaccta ccgcgactac	3060
ctggaaaaca tgaacgacaa gagggccccc aggatcatta agacaatcgc ctccaagacc	3120

cagagcatta agaagtacag cacagacatt ctggcaacc tgtatgaagt gaaatctaag	3180
aagcaccctc agatcatcaa aaagggcaaa aggccggcgg ccacgaaaaa ggccggccag	3240
gcaaaaaaga aaaagggatc ctaccatac gatgttccag attacgctta cccatacgat	3300
gttcagatt acgettaccc atacgatgtt ccagattacg cttaa	3345

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sau Cas9 amino acid sequence

&lt;400&gt; 8

Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala

1 5 10 15

Ala Lys Arg Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ile Thr Ser Val

20 25 30

Gly Tyr Gly Ile Ile Asp Tyr Glu Thr Arg Asp Val Ile Asp Ala Gly

35 40 45

Val Arg Leu Phe Lys Glu Ala Asn Val Glu Asn Asn Glu Gly Arg Arg

50 55 60

Ser Lys Arg Gly Ala Arg Arg Leu Lys Arg Arg Arg Arg His Arg Ile

65 70 75 80

Gln Arg Val Lys Lys Leu Leu Phe Asp Tyr Asn Leu Leu Thr Asp His

85 90 95

Ser Glu Leu Ser Gly Ile Asn Pro Tyr Glu Ala Arg Val Lys Gly Leu

100 105 110

Ser Gln Lys Leu Ser Glu Glu Glu Phe Ser Ala Ala Leu Leu His Leu

115	120	125
Ala Lys Arg Arg Gly Val His Asn Val Asn Glu Val Glu Glu Asp Thr		
130	135	140
Gly Asn Glu Leu Ser Thr Lys Glu Gln Ile Ser Arg Asn Ser Lys Ala		
145	150	155
Leu Glu Glu Lys Tyr Val Ala Glu Leu Gln Leu Glu Arg Leu Lys Lys		
165	170	175
Asp Gly Glu Val Arg Gly Ser Ile Asn Arg Phe Lys Thr Ser Asp Tyr		
180	185	190
Val Lys Glu Ala Lys Gln Leu Leu Lys Val Gln Lys Ala Tyr His Gln		
195	200	205
Leu Asp Gln Ser Phe Ile Asp Thr Tyr Ile Asp Leu Leu Glu Thr Arg		
210	215	220
Arg Thr Tyr Tyr Glu Gly Pro Gly Glu Gly Ser Pro Phe Gly Trp Lys		
225	230	235
Asp Ile Lys Glu Trp Tyr Glu Met Leu Met Gly His Cys Thr Tyr Phe		
245	250	255
Pro Glu Glu Leu Arg Ser Val Lys Tyr Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Tyr		
260	265	270
Asn Ala Leu Asn Asp Leu Asn Asn Leu Val Ile Thr Arg Asp Glu Asn		
275	280	285
Glu Lys Leu Glu Tyr Tyr Glu Lys Phe Gln Ile Ile Glu Asn Val Phe		
290	295	300
Lys Gln Lys Lys Pro Thr Leu Lys Gln Ile Ala Lys Glu Ile Leu		
305	310	315
Val Asn Glu Glu Asp Ile Lys Gly Tyr Arg Val Thr Ser Thr Gly Lys		
325	330	335
Pro Glu Phe Thr Asn Leu Lys Val Tyr His Asp Ile Lys Asp Ile Thr		
340	345	350
Ala Arg Lys Glu Ile Ile Glu Asn Ala Glu Leu Leu Asp Gln Ile Ala		
355	360	365

Lys Ile Leu Thr Ile Tyr Gln Ser Ser Glu Asp Ile Gln Glu Glu Leu

370 375 380

Thr Asn Leu Asn Ser Glu Leu Thr Gln Glu Glu Ile Glu Gln Ile Ser

385 390 395 400

Asn Leu Lys Gly Tyr Thr Gly Thr His Asn Leu Ser Leu Lys Ala Ile

405 410 415

Asn Leu Ile Leu Asp Glu Leu Trp His Thr Asn Asp Asn Gln Ile Ala

420 425 430

Ile Phe Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Lys Lys Val Asp Leu Ser Gln

435 440 445

Gln Lys Glu Ile Pro Thr Thr Leu Val Asp Asp Phe Ile Leu Ser Pro

450 455 460

Val Val Lys Arg Ser Phe Ile Gln Ser Ile Lys Val Ile Asn Ala Ile

465 470 475 480

Ile Lys Lys Tyr Gly Leu Pro Asn Asp Ile Ile Ile Glu Leu Ala Arg

485 490 495

Glu Lys Asn Ser Lys Asp Ala Gln Lys Met Ile Asn Glu Met Gln Lys

500 505 510

Arg Asn Arg Gln Thr Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Thr

515 520 525

Gly Lys Glu Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Glu Lys Ile Lys Leu His Asp

530 535 540

Met Gln Glu Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Leu Glu Ala Ile Pro Leu Glu

545 550 555 560

Asp Leu Leu Asn Asn Pro Phe Asn Tyr Glu Val Asp His Ile Ile Pro

565 570 575

Arg Ser Val Ser Phe Asp Asn Ser Phe Asn Asn Val Leu Val Lys

580 585 590

Gln Glu Glu Asn Ser Lys Lys Gly Asn Arg Thr Pro Phe Gln Tyr Leu

595 600 605

Ser Ser Ser Asp Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Phe Lys Lys His Ile

610	615	620
Leu Asn Leu Ala Lys Gly Lys Gly Arg Ile Ser Lys Thr Lys Lys Glu		
625	630	635
Tyr Leu Leu Glu Glu Arg Asp Ile Asn Arg Phe Ser Val Gln Lys Asp		
645	650	655
Phe Ile Asn Arg Asn Leu Val Asp Thr Arg Tyr Ala Thr Arg Gly Leu		
660	665	670
Met Asn Leu Leu Arg Ser Tyr Phe Arg Val Asn Asn Leu Asp Val Lys		
675	680	685
Val Lys Ser Ile Asn Gly Gly Phe Thr Ser Phe Leu Arg Arg Lys Trp		
690	695	700
Lys Phe Lys Lys Glu Arg Asn Lys Gly Tyr Lys His His Ala Glu Asp		
705	710	715
Ala Leu Ile Ile Ala Asn Ala Asp Phe Ile Phe Lys Glu Trp Lys Lys		
725	730	735
Leu Asp Lys Ala Lys Lys Val Met Glu Asn Gln Met Phe Glu Glu Lys		
740	745	750
Gln Ala Glu Ser Met Pro Glu Ile Glu Thr Glu Gln Glu Tyr Lys Glu		
755	760	765
Ile Phe Ile Thr Pro His Gln Ile Lys His Ile Lys Asp Phe Lys Asp		
770	775	780
Tyr Lys Tyr Ser His Arg Val Asp Lys Lys Pro Asn Arg Glu Leu Ile		
785	790	795
Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Thr Arg Lys Asp Asp Lys Gly Asn Thr Leu		
805	810	815
Ile Val Asn Asn Leu Asn Gly Leu Tyr Asp Lys Asp Asn Asp Lys Leu		
820	825	830
Lys Lys Leu Ile Asn Lys Ser Pro Glu Lys Leu Leu Met Tyr His His		
835	840	845
Asp Pro Gln Thr Tyr Gln Lys Leu Lys Leu Ile Met Glu Gln Tyr Gly		
850	855	860

Asp Glu Lys Asn Pro Leu Tyr Lys Tyr Tyr Glu Glu Thr Gly Asn Tyr  
 865                    870                    875                    880  
 Leu Thr Lys Tyr Ser Lys Lys Asp Asn Gly Pro Val Ile Lys Lys Ile  
 885                    890                    895  
 Lys Tyr Tyr Gly Asn Lys Leu Asn Ala His Leu Asp Ile Thr Asp Asp  
 900                    905                    910

Tyr Pro Asn Ser Arg Asn Lys Val Val Lys Leu Ser Leu Lys Pro Tyr  
 915                    920                    925  
 Arg Phe Asp Val Tyr Leu Asp Asn Gly Val Tyr Lys Phe Val Thr Val  
 930                    935                    940  
 Lys Asn Leu Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Glu Val Asn Ser  
 945                    950                    955                    960  
 Lys Cys Tyr Glu Glu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Ile Ser Asn Gln Ala  
 965                    970                    975

Glu Phe Ile Ala Ser Phe Tyr Asn Asn Asp Leu Ile Lys Ile Asn Gly  
 980                    985                    990  
 Glu Leu Tyr Arg Val Ile Gly Val Asn Asn Asp Leu Leu Asn Arg Ile  
 995                    1000                    1005  
 Glu Val Asn Met Ile Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Asn  
 1010                    1015                    1020  
 Met Asn Asp Lys Arg Pro Pro Arg Ile Ile Lys Thr Ile Ala Ser  
 1025                    1030                    1035

Lys Thr Gln Ser Ile Lys Lys Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Gly Asn  
 1040                    1045                    1050  
 Leu Tyr Glu Val Lys Ser Lys Lys His Pro Gln Ile Ile Lys Lys  
 1055                    1060                    1065  
 Gly Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys  
 1070                    1075                    1080  
 Lys Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Tyr Pro  
 1085                    1090                    1095

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr

1100	1105	1110
Ala		
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> artificial		
<220><223> crRNA		
<400> 9		
taggaagcta atctatcatt		20