



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136245
(43) 공개일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0039586
(22) 출원일자 2022년03월30일
심사청구일자 2022년03월30일
(30) 우선권주장
1020210041848 2021년03월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
성영훈
서울특별시 강북구 도봉로47길 26, 401호(미아동, 오봉예체뜰안)
김경남
울산광역시 울주군 범서읍 평천길 94, 101동 200 7호(천상 청구 그린타운)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

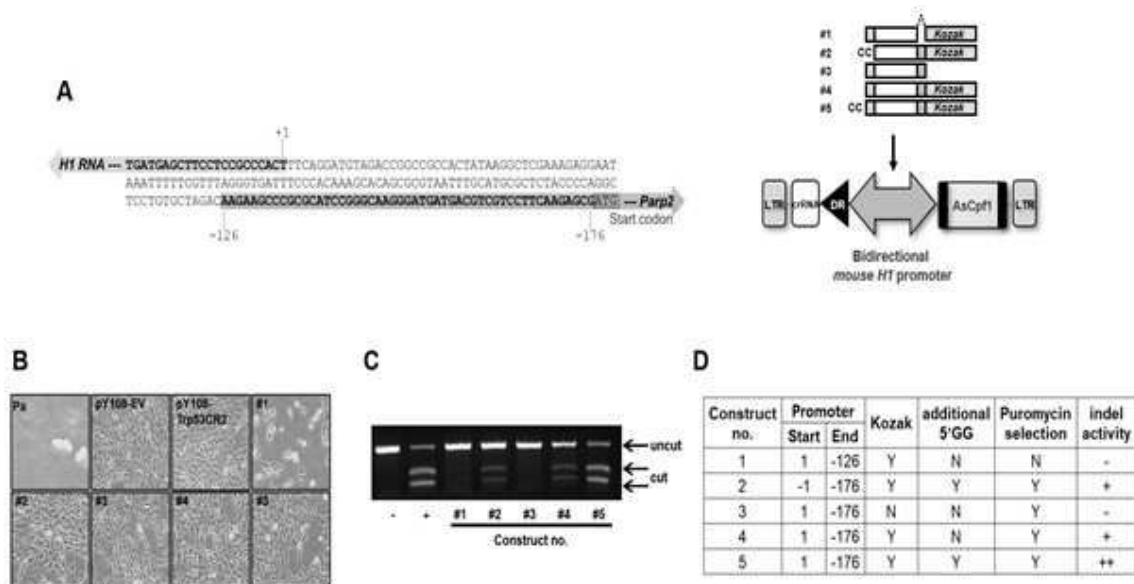
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 양방향성 H1 프로모터를 이용한 CRISPR-Cpf1 발현 단일 아데노-관련 바이러스 벡터

(57) 요약

본 발명은 AsCpf1 및 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현하는 단일 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터; 및 이를 이용하여 단일 위치 또는 다중 위치 유전자에서 표적화된 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는 유전자 교정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 양방향 프로모터를 이용하는 AsCpf1 및 crRNA 동시 발현이 가능한 AAV 벡터는 다중 유전자 교정 작업이 가능하며, 따라서 유전자치료 및 질환모델의 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2830/36 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711113404

과제번호 2018R1A2B6002192

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 CRISPR-Cpf1 Knockin 마우스 제작을 통한 새로운 질환모델마우스 확립 전략에 관한

연구

기 여 율 4/10

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415169756

과제번호 20012477

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업기술알키미스트프로젝트(R&D)

연구과제명 머신러닝 기반 유전대사성 간질환 대상 초정밀 CRISPR 유전자치료제 개발

기 여 율 6/10

과제수행기관명 울산대학교산학협력단

연구기간 2020.09.01 ~ 2021.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

AsCpf1 및 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현하는 단일 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 양방향성 H1 프로모터를 가지는 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 양방향성 H1 프로모터는 마우스 H1 프로모터인 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 마우스 H1 프로모터는 서열번호 1을 포함하는 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 AAV 벡터의 패키징 사이즈(packaging size)는 4,300 bp 내지 4,700 bp 인, 단일 AAV 벡터.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 양방향성 H1 프로모터는 마우스 H1 프로모터에 1개 내지 30개의 추가적인 염기서열이 도입된 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 추가적인 염기서열은 서열번호 2, 3, 4 및 5로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단일 AAV 벡터는 2개 이상의 crRNA를 발현하는 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 소 성장 호르몬 폴리아데닐레이션 신호 (BGHpA) 및 시미안 바이러스 40 폴리아데닐화 신호 (SV40pA)로 구성되는 그룹으로부터 선택된 전사 종결 신호를 포함하는 것인, 단일 AAV 벡터.

청구항 10

제1항의 단일 AAV 벡터를 이용하여 단일 위치 또는 다중 위치 유전자에서 표적화된 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는 유전자 교정 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 양방향성 H1 프로모터를 가지는 것인, 유전자 교정 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 양방향성 H1 프로모터는 마우스 H1 프로모터인 것인, 유전자 교정 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 양방향성 H1 프로모터는 마우스 H1 프로모터에 1개 내지 30개의 추가적인 염기서열이 도입된 것인, 유전자 교정 방법.

입된 것인, 유전자 교정 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 소 성장 호르몬 폴리아데닐레이션 신호 (BGHpA) 및 시미안 바이러스 40 폴리아데닐화 신호 (SV40pA)로 구성되는 그룹으로부터 선택된 전사 종결 신호를 포함하는 것인, 유전자 교정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 AsCpf1 및 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현하는 단일 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 및 이를 이용하여 단일 위치 또는 다중 위치 유전자에서 표적화된 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는 유전자 교정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Cpf1은 Cas9과 유사한 CRISPR-Cas system의 하나로, AsCpf1 및 LbCpf1의 세포주내 활성이 보고된 바 있고, Cas9과 몇 가지 다른 특성을 나타낸다. Cpf1 유전자가위의 특징 중 하나는 pre-crRNA 가공(processing) 활성을 나타내므로 여러 개의 crRNA를 하나로 연결하여 발현시킬지라도 각각의 crRNA로 분리되어 여러 개의 crRNA를 만들어 낼 수 있다는 점이다.

[0003] CRISPR-Cas system이 유전자교정 치료에 사용될 수 있다는 희망과 함께, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus; AAV) 벡터가 주목을 받고 있는데, 이는 AAV 벡터가 다른 바이러스 벡터에 비해 항원성이 낮고 게놈 통합(genome integration)되지 않으므로 보다 안전한 도구이기 때문이다. 하지만, AAV 입자(particle)를 생산하는데 있어서, 작은 패키징 사이즈(packaging size 4.7 kb 이하)로 인해 CRISPR-Cas system을 구현하는 데에 장애가 되고 있다. 실제로, LbCpf1과 단일 crRNA를 동시에 발현하는 AAV 벡터가 보고되기는 하였으나, 상기 언급한 패키징 사이즈의 한계로 인하여 Cpf1의 장점인 multiplex crRNA 발현이 어려웠다. LbCpf1에 비해 크기가 더 큰 AsCpf1과 crRNA를 동시에 발현하는 단일 AAV 벡터는 더욱이 개발되지 않았다.

[0004] H1 프로모터는 양방향성 프로모터로써 한쪽에서는 polymerase II에 의하여 Poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) 단백질을, 반대쪽은 polymerase III에 의존적으로 RNase P RNA를 동시에 발현시킨다. 인간과 마우스에서 이러한 H1 프로모터가 확인되었으며, 마우스 H1 프로모터는 인간의 H1 프로모터에 비해 그 크기가 작은 것으로 알려져 있다.

[0005] 하지만, 이와 같은 H1 프로모터를 이용한 다중 유전자교정이 가능한 단일 AAV 벡터시스템 관련 연구결과는 보고되지 않았다. 본 연구진은 H1 프로모터(예를 들어, 마우스 H1 프로모터)를 기반으로, 이를 다양하게 변형시켜서 AsCpf1에 의한 다중 유전자교정을 효율적으로 구현할 수 있는 단일 AAV 벡터를 개발하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Bernd Zetsche et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Cell. 2015;163, 759-771

(비특허문헌 0002) Fonfara et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature. 2016 Apr 28;532(7600):517-21.

(비특허문헌 0003) Zetsche et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol. 2017 Jan;35(1):31-34.

(비특허문헌 0004) Taeyoung Koo et al. CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. Nature Comm. 2018 May 10;1855

(비특허문헌 0005) Jean-Christophe Ame et al. A Bidirectional Promoter Connects the Poly(ADP-ribose) Polymerase 2 (PARP-2) Gene to the Gene for RNase P RNA. JBC. 2001 Apr 11092-11099

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 AsCpf1 및 crRNA의 동시 발현에 최적화된 H1 프로모터(예를 들어, 마우스 유래 H1 프로모터)를 기반으로 단일 AAV 벡터를 이용한 CRISPR system을 구축하고 다중 유전자교정을 구현하였다. 따라서 본 발명자들이 개발한 양방향 프로모터로부터 AsCpf1 및 crRNA 동시 발현이 가능한 AAV 벡터는 유전자치료 및 질환모델의 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, AsCpf1 및 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현하는 단일 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 측면은, 상기 단일 AAV 벡터를 이용하여 단일 위치 또는 다중 위치 유전자에서 표적화된 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는 유전자 교정 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 양방향 프로모터를 이용하는 AsCpf1 및 crRNA 동시 발현이 가능한 AAV 벡터는 다중 유전자 교정 작업이 가능하며, 따라서 유전자치료 및 질환모델의 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 여러 가지 방법으로 마우스 H1 프로모터를 조작하여 Cpf1-system 발현 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 마우스 H1 프로모터에 도입되는 추가 염기서열에 따른 프로모터 활성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 제작하고, 이의 AsCpf1 발현과 유전자가위 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 AAV-v2-SV40pA 및 AAV-v2-bGHpA 벡터를 제작하고, 이의 AsCpf1 발현과 유전자가위 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 단일 프로모터의 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 AAV 벡터의 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 일 측면은 AsCpf1 및 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현하는 단일 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 제공한다.

[0013] 본 발명의 용어 "AsCpf1"은 적절한 가이드 RNA와 조합될 경우 활성 CRISPR/Cpf1 엔도뉴클레아제 시스템을 형성하는 생화학적 및 생물학적 활성을 갖는 단백질을 포함하며, 서열번호 6과 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "벡터"는 핵산 분자로서 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 비제한적으로, 단일-가닥, 이중-가닥 또는 부분적 이중-가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 자유 말단, 비 자유 말단 (예를 들어, 환형)을 포함하는 핵산 분자; DNA, RNA 또는 이 둘 모두를 포함하는 핵산 분자; 및 당업계에 공지된 다른 다양한 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 CRISPR 전사물 (예를 들어, 핵산 전사물, 단백질 또는 효소)의 발현을 위해 설계될 수 있다. 일 예로, CRISPR 전사물은 대장균과 같은 박테리아 세포, 곤충 세포 (마블로바이러스 발현 벡터 사용), 효모 세포, 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다.

[0015] 한 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기에서 바이러스-유도된 DNA 또는 RNA 서열은 바이러스 (예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스) 내로 패키징하기 위한 벡터에 존재한다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포 내로의 형질감염을 위한 바이러스

에 의해 운반된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

- [0016] 본 발명의 용어 "아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터"는 그 안에 표적 세포로의 전달을 위해 핵산 서열이 포장되어 있는 AAV 단백질 캡시드를 가지는 AAV DNase-내성 입자이다. AAV 캡시드는 선택된 AAV에 따라 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비율로 정이십면체 대칭으로 정리된, 60개의 캡시드 (cap) 단백질 하위유닛, VP1, VP2 및 VP3으로 구성된다. AAV 캡시드는, 변종을 포함하여, 기술분야에 공지되어 있는 것들로부터 선택될 수 있다.
- [0017] 상기 AAV 벡터는 양방향성 H1 프로모터를 가지는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 양방향성 H1 프로모터는 인간 유래 또는 마우스 유래 H1 프로모터이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 마우스 H1 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 AAV 벡터의 패키징 사이즈(packaging size)는 대략적으로 4,300 bp 내지 4,700 bp일 수 있으며, 보다 구체적으로는 4,400 bp 내지 4650 bp, 4,450 bp 내지 4600 bp, 4,500 bp 내지 4,600 bp, 또는 4,504 bp 내지 4,588 bp 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 양방향성 H1 프로모터의 일례로서 마우스 H1 프로모터에 1개 내지 30개의 추가적인 염기서열이 도입된 것이 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 마우스 H1 프로모터에 도입된 추가적인 염기서열은 서열번호 2, 3, 4 및 5로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 일 예에서, 상기 단일 AAV 벡터는 2개 이상의 crRNA를 발현하는 것이다.
- [0021] 일 예에서, 상기 AAV 벡터는 소 성장 호르몬 폴리아데닐레이션 신호 (bGHpA) 및 시미안 바이러스 40 폴리아데닐화 신호 (SV40pA)로 구성되는 그룹으로부터 선택된 전사 종결 신호를 포함하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면은, 상기 단일 AAV 벡터를 이용하여 단일 위치 또는 다중 위치 유전자에서 표적화된 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는 유전자 교정 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 용어 "유전자 교정(gene editing)"은 표적 유전자 내의 표적 부위에 이중가닥 절단(double-stranded DNA cleavage)을 발생시켜서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 변이(결실, 치환, 및/또는 삽입 등)를 유발하는 과정을 의미한다. 일 예에서, 상기와 같은 유전자 교정은 표적 부위에 종료코돈을 생성시키거나, 야생형과 다른 아미노산을 코딩하는 코돈을 생성시킴으로써, 표적 유전자를 불활성화 (knock-out)시키거나, 단백질을 생성하지 않는 비코딩 DNA 서열에 변이를 도입하는 등 다양한 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 유전자 교정 방법은 원핵세포, 진핵세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에서 단일 위치 또는 다중 위치에 존재하는 표적 DNA(또는 유전자)를 교정하는 방법을 포함한다.
- [0025] 상기 원핵세포, 진핵세포는 분리된 세포로, 상기 진핵세포는 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유동물로부터 분리된 세포일 수 있다. 상기 진핵세포는 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포(인 비트로), 이식된 세포(graft cell) 및 일차세포 배양(인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보(in vivo) 세포, 또한 인간을 포함하는 포유동물로부터 분리된 세포(mammalian cell)일 수 있다.
- [0026] 상기 진핵 유기체는 진핵세포(예컨대, 효모 등의 균류, 진핵 동물 및/또는 진핵 식물 유래세포(예컨대, 배아세포, 줄기세포, 체세포, 생식세포 등) 등), 진핵 동물(예컨대, 인간을 제외한 원숭이 등의 영장류, 개, 돼지, 소, 양, 염소, 마우스, 래트 등), 및 진핵식물(예컨대, 녹조류 등의 조류, 옥수수, 콩, 밀, 벼 등)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0028] **실시예 1. 마우스 H1 프로모터 조작 및 Cpf1-system 발현 테스트**
- [0029] AsCpf1과 CRISPR RNA (crRNA)를 동시에 발현시킬 수 있는 마우스 H1 프로모터를 제작하기 위해 여러 가지 방법으로 마우스 H1 프로모터를 조작하여 Cpf1-system 발현 테스트를 진행하였다(도 1A). 제작 벡터를 통해 생산된 렌티바이러스(lentivirus)를 NIH3T3 세포에 감염시켜 퓨로마이신(puromycin)에 대한 저항성을 확인하고 gDNA 샘플을 확보하였다.
- [0030] Construct #1은 전사 개시 부위(Transcription start site; T)를 포함하고 parp2 염기서열을 포함하지 않는 마우스 H1 프로모터를 사용하여 제작되었다. 퓨로마이신 처리 시 감염 세포의 10%만 살아남을 수 있었고 유전자가

위 활성은 나타나지 않았다. Construct #2는 T 대신 H1 프로모터 5'에 염기서열 GG를 삽입하고 parp2와 Kozak 염기서열을 포함하여 제작하였다. 퓨로마이신 처리 시 세포가 살아남았고 유전자가위 활성은 약하게 나타났다. Construct #3은 T와 parp2 염기서열을 포함하되 GG와 Kozak 염기서열을 제외한 H1 promoter로 제작한 벡터이며 퓨로마이신에 대한 내성은 보였지만, 유전자가위 활성을 보이지 않았다. Construct #4는 염기서열 GG와 T를 제외하고 Kozak 염기서열만 가지는 H1 프로모터를 이용한 벡터로 퓨로마이신 저항성과 유전자가위 활성을 약하게 나타냈다. 마지막으로 H1 프로모터 5'의 GG, T, parp2, Kozak 염기서열을 모두 포함하는 H1 프로모터를 이용한 벡터인 Construct #5은 퓨로마이신 내성과 강한 유전자가위 활성을 나타냈다(도 1B, 1C 및 1D).

[0031] **실시예 2. 마우스 H1 프로모터에 추가 염기서열 도입 및 유전자가위 활성 확인**

[0032] 마우스 H1 프로모터에 도입되는 추가 염기서열에 따른 프로모터 활성을 비교하기 위하여, 마우스 H1 프로모터에 추가 염기서열을 도입하여 합성(쥘바이오니아)하였다. 합성된 염기서열 V1, V2, V3 및 V4를 pY108 (Addgene #84739)을 변형하여 제작한 pLG011 벡터의 KpnI 및 AgeI 부위에 클로닝하였고, 염기서열의 정확성을 확인(쥘마 크로젠)하였다.

[0033] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 Construct #5를 통해 CRISPR-Cpf1 system 발현이 증가한 것을 확인한 후, 그 효율을 더 높이기 위해 마우스 H1 프로모터에 몇 가지 염기서열을 추가하여 벡터를 제작하였다. 본 연구에서는 마우스 H1 프로모터에 1, 10, 15, 30 개의 염기서열을 추가하여 제작한 벡터를 각각 V1, V2, V3, V4라고 명칭한다(도 2A). 제작된 V1, V2, V3, V4 벡터로부터 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과, 추가된 염기서열에 따른 H1 프로모터에서의 표적 유전자 녹아웃 효율 변화는 관찰되지 않았다(도 2B).

[0034] Trp53 유전자를 표적하는 V2를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 통한 AsCpf1 발현과 T7E1 assay를 통한 유전자가위 효율을 비교하였다. 그 결과, V2는 pY108에 비해 AsCpf1의 발현은 낮지만, 유전자가위 작동 활성에는 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(도 2C 및 2D).

[0035] **실시예 3. 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 제작 및 이의 AsCpf1의 발현과 유전자가위 활성 확인**

[0036] 상기 실시예 2를 통해 도출한 AsCpf1의 발현 및 유전자가위 활성에 최적화된 마우스 H1 프로모터 V2를 이용하여 AAV 벡터를 제작하였다(도 3A). 인간 ATG5 유전자를 표적하는 유전자가위를 포함한 AAV 벡터를 293TA 세포에 트랜스펙션(transfection)시킨 후, 72시간 뒤 배지(media) 및 펠릿(pellet)으로부터 각각 AAV를 생산했다.

[0037] AAV를 HepG2 인간 간암세포주에 감염시킨 후, western blot을 통해 AsCpf1 발현을 비교하였고 펠릿으로부터 추출한 AAV에서의 AsCpf1 발현이 높은 것을 확인하였다(도 3B). 이 결과를 바탕으로 펠릿에서 추출한 AAV를 이용하여 유전자가위 활성을 관찰하기 위한 T7E1 assay를 진행하였고, crRNA에 의해 ATG5 녹아웃이 유도된 것을 볼 수 있었다(도 3C).

[0038] **실시예 4. AAV-v2-SV40pA과 AAV-v2-bGHpA 벡터의 제작 및 AsCpf1 발현과 유전자가위 활성 확인**

[0039] 다중 유전자교정 시스템을 AAV에 적용하기 위해서는 AAV 유전체 크기(genome size)의 축소가 필요하므로, 가능한 많은 유전자가위를 도입하기 위해 소 성장 호르몬(bovine growth hormone) 유전자의 polyadenylation 신호(bGHpA)를 SV40 polyadenylation 신호(SV40pA)로 대체하여 벡터를 제작하였다(도 4A).

[0040] AAV는 4.7 kb의 패키징 사이즈(packaging size) 한계를 가지므로 사이즈가 큰 유전자를 발현시키는 것이 불가능한 문제점이 있다. 반면, 이론적으로 208 bp의 bGHpA를 이용하여 제작한 AAV-v2-bGHpA에는 2개의 crRNA를, bGHpA보다 짧은 122 bp의 SV40pA가 사용된 AAV-v2-SV40pA 벡터에는 최대 4개의 crRNA 삽입이 가능하고, 따라서 AsCpf1을 매개로 하는 다중 유전자교정 작업이 가능하다.

[0041] SV40pA 및 bGHpA에 의한 CRISPR 시스템 발현율을 비교하기 위해 Western blot과 T7E1 assay를 진행하였고, 그 결과 SV40pA 및 bGHpA에 의한 AsCpf1 발현과 유전자가위 활성이 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(도 4B 및 4C). 더 정량화 된 indel frequency (%)를 분석하기 위해 T7E1 assay에 사용된 gDNA를 이용하여 deepseq를 진행하였다. 그 결과 AAV-v2-bGHpA가 19.8%의 indel frequency, AAV-v2-SV40pA가 8.2%의 indel frequency로 나타나, AAV-v2-bGHpA에 의한 유전자가위 효율이 더 높은 것을 확인하였다. 또한, 단일 프로모터로 CRISPR system을 발현시키는 pY108 (lenti) 벡터가 7.4%의 indel frequency를 가지는바, pY108 (lenti) 벡터보다도 AAV-v2-bGHpA에 의한 유전자 가위 효율이 더 높게 나타났다(도 4C).

[0042] **실시예 5. 단일 프로모터의 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트**

[0043] 단일 프로모터로부터의 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트를 진행하기 위해 중앙억제유전자로 알려진 Trp53, Pten

및 Nf1 유전자를 타겟으로 이용하였다. 먼저, 각 유전자에 대한 효율적인 단일 유전자가위를 선별하기 위해 pY108 벡터를 이용하여 단일 유전자가위를 클로닝하였다(도 5A). 제작된 벡터로 렌티바이러스를 생산하고 마우스 세포주에 감염시켜 gDNA를 확보하였고, SDS PAGE gel을 통한 유전자가위 활성 테스트를 진행하여 각 유전자에 대한 효율적인 단일 유전자가위를 선별하였다(도 5B).

[0044] 선별된 유전자가위를 이용하여 dimeric crRNAs (Trp53 및 Pten)와 triple crRNAs (Trp53, Pten 및 Nf1)를 연결하여 pY108에 클로닝하였다(도 5C). 제작된 벡터를 이용하여 SDS PAGE gel을 통한 다중 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과, dimeric crRNAs 와 triple crRNAs 유전자 가위 모두 동시 작동하는 것을 확인하였다(도 5D).

[0045] 실시예 6. AAV를 이용한 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트

[0046] 상기 실시예 5에서 렌티바이러스를 통해 검증된 multiplex crRNA array를 이용하여 AAV를 이용한 다중 유전자 동시 녹아웃 테스트 진행을 위해, AAV-v2-bGHPA 벡터를 이용하여 dimeric crRNAs 와 triple crRNAs를 연결하여 AAV-v2-bGHPA-TP 와 AAV-v2-bGHPA-TPN 벡터를 제작하였다(도 6A). T7E1 assay를 통한 유전자가위 동시 발현 테스트를 진행한 결과, dimeric crRNAs 와 triple crRNAs를 이용한 AAV 벡터로부터의 타겟 유전자가 모두 동시 녹아웃된 것을 확인하였다(도 6B 및 6C).

[0047] 본 연구 결과, AsCpf1 및 crRNA의 동시 발현에 최적화된 마우스 H1 프로모터를 통해 단일 AAV 벡터를 이용한 CRISPR system을 구축하고 다중 유전자교정을 구현하였다. 따라서 본 연구진이 개발한 양방향 프로모터로부터 AsCpf1 및 crRNA 동시 발현이 가능한 AAV 벡터는 유전자치료 및 질환모델의 생산에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 여겨진다.

[0048] 실험예 1. Trp53 유전자 녹아웃을 통한 마우스 H1 프로모터의 효율 검증

[0049] 실시예 2에서 제작된 벡터로 렌티바이러스(Lentivirus)를 생산하여 추가 염기서열에 따른 H1 프로모터의 효율을 비교하기 위해 pY108과 V1 내지 V4 벡터의 BsmBI site에 Trp53 유전자를 표적하는 crRNA (AGGTACCACGCTGTGGC)를 클로닝하여 ㈜마크로젠의 시퀀싱 서비스를 통해 검증하여 사용하였다.

[0050] 렌티바이러스 입자(Lentivirus particle)는, pY108-empty vector (EV)와 Trp53 유전자가위를 포함하여 제작한 벡터를 psPAX2 (Addgene #12260) 및 pMD2.G (Addgene #12259)와 함께 Lipofectamine Plus Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하고, 제작사의 매뉴얼에 따라 293TA cell로 감염시켜 제작하였다. NIH3T3 cell에 4 µg/ml polybrene (Sigma)와 함께 렌티바이러스를 24 시간 동안 배양하여 감염시켰다. 이후 렌티바이러스를 제거하고 2 µg/ml puromycin (Sigma)으로 비감염(non-infected) NIH3T3 cell이 모두 제거될 때까지 배양하였다.

[0051] 실험예 2. T7E1 assay

[0052] 확립된 세포 배양(cell culture)에서 유전체(genomic) DNA 샘플을 준비하고, 하기 표 1에 나타난 PCR 프라이머 쌍(primer pair)을 사용하여 각 crRNA의 표적 부위(target region)를 증폭하였다. 상기 PCR 산물(product)을 기존에 알려진 보고대로 이질듀플렉스(heteroduplex)를 형성시킨 후(Zhu, X. et al. 2014), 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)에 직접 전개하여 이동성 변화(mobility shift)되거나, T7 Endonuclease I (T7E1; NEB)를 처리한 후 아가로스 겔(agarose gel)에서 전개하였을 때 잘리는지의 여부를 동정하였다.

표 1

PCR 프라이머(primers)

TARGET GENES	ACC NO.	OLIGOMER NAME	OLIGOMER SEQUENCE (5' →3')	서열 번호	SIZE (bp)
Trp53	NC_000077	Trp53-CR2-F1	ACATGACGGAGGTCGTGAGA	7	533
		Trp53-CR2-R1	GGGATATTCCACCTGTTCGGC	8	
Pten	NC_000085	mPten-E1-F1	CTCTGGCTGCTGAGGAGAAG	9	516
		mPten-E1-R2	ACAATCCGTGCCTTGACACT	10	
Nf1	NC_000077	Nf1-F2	TTCGAGTGATAGCTGTGTGGC	11	415
		Nf1-R3	GAATTCCTTCAAAAACCCAGATGT	12	
ATG5	NC_000006	ATG5-CR1-F1	TGTGCTTCGAGATGTGTGGT	13	319
		ATG5-CR1-R2	GTCCAGAACGCATCATGACA	14	

[0054] 실험예 3. 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)

[0055] SDS-sample 준비와 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)은 다음의 항체들을 사용해서 기존에 보고한 대로 수행하였다(Sung et al. 2010): AsCpf1 (cellsignaling #38150), β -actin (novusbio #NB600-501).

[0056] 실험예 4. AAV-v2-SV40pA 및 AAV-v2-bGHpA 벡터 제작

[0057] 양방향성 프로모터를 가지는 AAV 벡터를 제작하기 위해 Lenti-v2의 H1 프로모터 염기서열과 AsCpf1 Direct repeat 및 유전자가위를 클로닝할 수 있는 BsaI 부위를 포함한 염기서열을 (주)바이오니아에서 합성하였다. AAV-v2-SV40pA 벡터는, pX601을 변형하여 제작한 pAG010 벡터의 XhoI 및 AgeI 부위에 (주)바이오니아에 합성 의뢰한 염기서열을 클로닝하여 제작하였다. AAV-v2-bGHpA 벡터는, pX601을 PCR 프라이머 쌍(Forward: TCAGGATCCTGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG, Reverse:ACGCGGCCGCTCCCCAGCATGCCTGTCTATT)을 사용하여 bGH poly A signal 부위를 증폭하여 AAV-v2-SV40pA의 BamHI 및 NotI 부위에 클로닝하였다.

[0058] 실험예 5. 유전자가위 제작

[0059] 표적 유전자를 녹아웃 시키기 위한 유전자가위 제작을 위해 클로닝에 필요한 올리고머(oligomer)를 (주)마크로젠에서 합성하였고, 합성된 올리고머는 어닐링(annealing) 후에 상기 실시예 6에서 제작한 AAV-v2-SV40pA 및 AAV-v2-bGHpA의 BsaI 부위에 클로닝하여 (주)마크로젠의 시퀀싱 서비스를 통해 검증하였다. 상기 올리고머에 대한 정보는 하기 표 2 및 3에 기재된 바와 같다.

표 2

[0060] pLG013 & pAG013 vector의 crRNAs 클로닝에 사용되는 올리고머

TARGET GENES	ACC NO.	crRNA NAME	ORIENTATION	OLIGOMER SEQUENCE (5' →3')	서열번호
Trp53	NC_000077	Trp53-CR2	F	AGATGCCACAGCGTGGTGGTACCT	15
			R	AAAAAGGTACCACCACGCTGTGGC	16
ATG5	NC_000006	ATG5-CR1	F	AGATCCACAATCAATGTACTTACA	17
			R	AAAATGTAAGTACATTGATTGTGG	18

표 3

[0061] 이량체(dimeric) crRNAs 클로닝에 사용되는 올리고머

TARGET GENES	crRNA NAME	ORIENTATION	OLIGOMER SEQUENCE (5' →3')	서열번호
Trp53 and Pten	TP	F	AGATGCCACAGCGTGGTGGTACCTAATTTCTACTCTTGTAGATTGCTAACGATCTCTTTGATGATG	19
		R	AAAACATCATCAAAGAGATCGTTAGCAATCTACAAGAGTAGAAATTAGGTACCACCACGCTGTGGC	20
Trp53, Pten and Nf1	TPN	F	AGATGCCACAGCGTGGTGGTACCTAATTTCTACTCTTGTAGATTGCTAACGATCTCTTTGATGATGAATTTCTACTCTTGTAGATCCACATGCTTTAGGCAC TAACCT	21
		R	AAAAAGGTTAGTGCCTAAAGCATGTGGATCTACAAGAGTAGAAATTCATCA TCAAAGAGATCGTTAGCAATCTACAAGAGTAGAAATTAGGTACCACCACGCTGTGGC	22

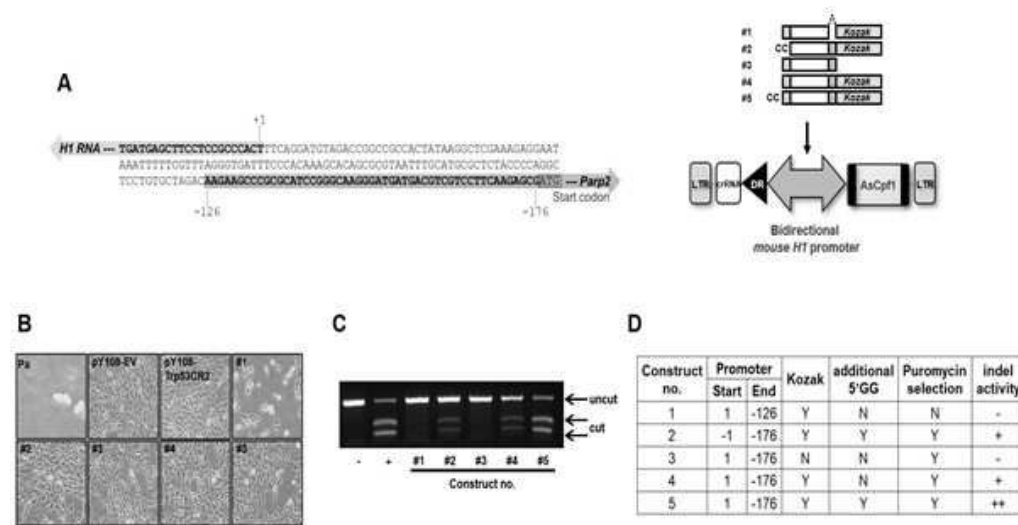
[0062] 실험예 6. AAV 제작 및 감염

[0063] AAV는, AAV-v2-SV40pA 및 AAV-v2-bGHpA의 EV 또는 전이유전자(transgene)를 포함하는 벡터를, pAAV-DJ (Cell Biolabs, Inc #VPK-420-DJ) 및 pHelper (Cell Biolabs, Inc #340202)와 함께 Lipofectamine Plus Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하고, 제작사의 매뉴얼에 따라서 293TA cell로 감염시켜서 제작하였다. 감염 72 시간 뒤 세포 배지(cell Media)와 펠릿(Pellet)에서 AAV를 추출하였다. 배지로부터 AAV를 생산하기 위해 AAVanced™ Concentration Reagent (System Biosciences #AAV110A-1)를 이용하여 매뉴얼에 따라서 추출하였다. 펠릿으로부터 AAV를 생산하기 위해서, 세포 펠릿을 스크레이퍼(scraper)로 긁어 50 mL 튜브에 옮긴 후 원심분리

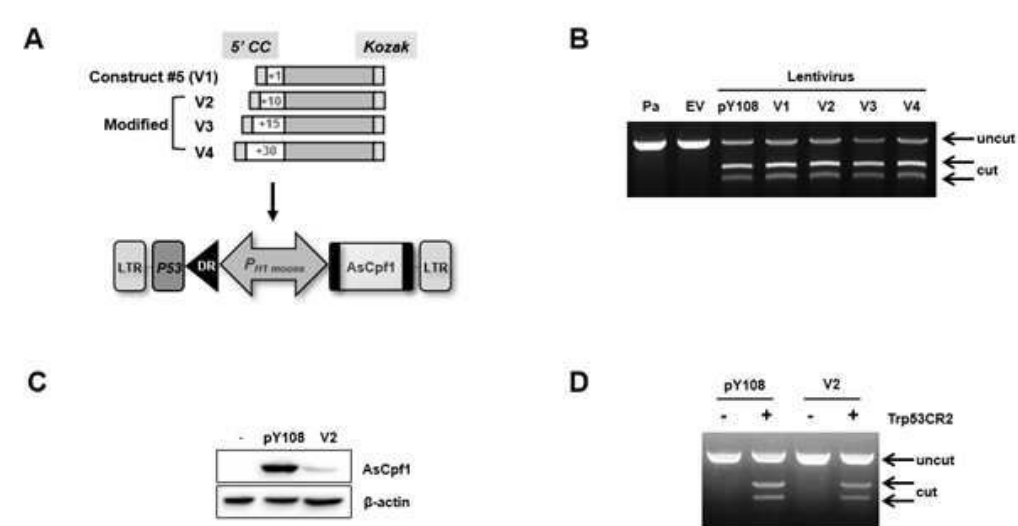
기(centrifuge)를 1500 rpm, 10 분 수행한 뒤 세포 펠릿을 확보했다. 확보한 펠릿을 DPBS에 재부유(resuspension) 후 액체질소와 37°C water bath를 이용하여 냉동 및 해동(freeze and thaw)을 반복한 뒤, 원심분리기를 13,200 rpm, 10 분 수행한 뒤 상층액을 확보하여 사용하였다. 생산된 AAV를 QuickTiter™ AAV Quantitation Kit (Cell Biolabs, Inc #VPK-145)를 사용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 AAV 정량을 실시하였다. 정량된 AAV는 ViraDuctin™ AAV Transduction Kit (Cell Biolabs, Inc #VPK-200)을 이용하여 매뉴얼에 따라서 타겟 세포에 처리 후 AAV를 감염시켰다. 확립된 세포 배양(cell culture)에서 유전체 DNA (genomic DNA) 샘플을 준비하여 타겟 유전자에 따른 PCR 프라이머 쌍을 사용하여 각 crRNA의 표적 영역(target region)을 증폭하고 상기 실험에 2 및 3과 같은 방법으로 AsCpf1 발현과 녹아웃 효율을 검증하였다.

도면

도면1



도면2

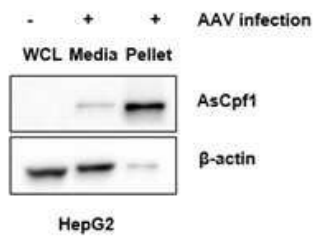


도면3

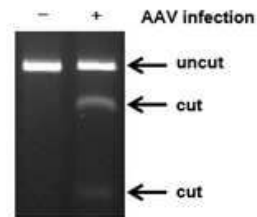
A



B

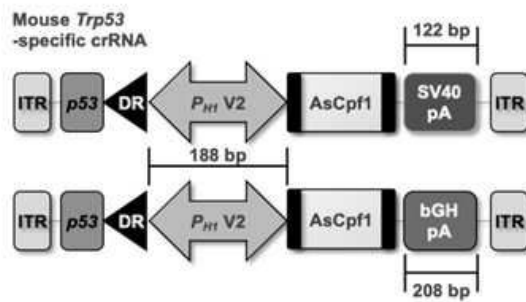


C

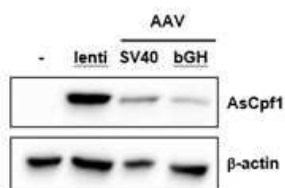


도면4

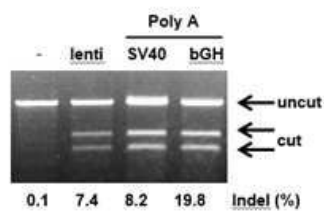
A



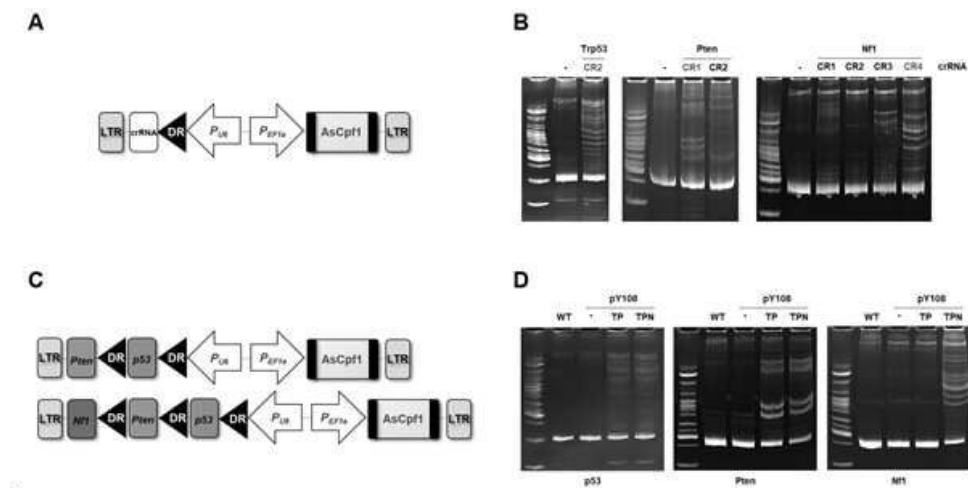
B



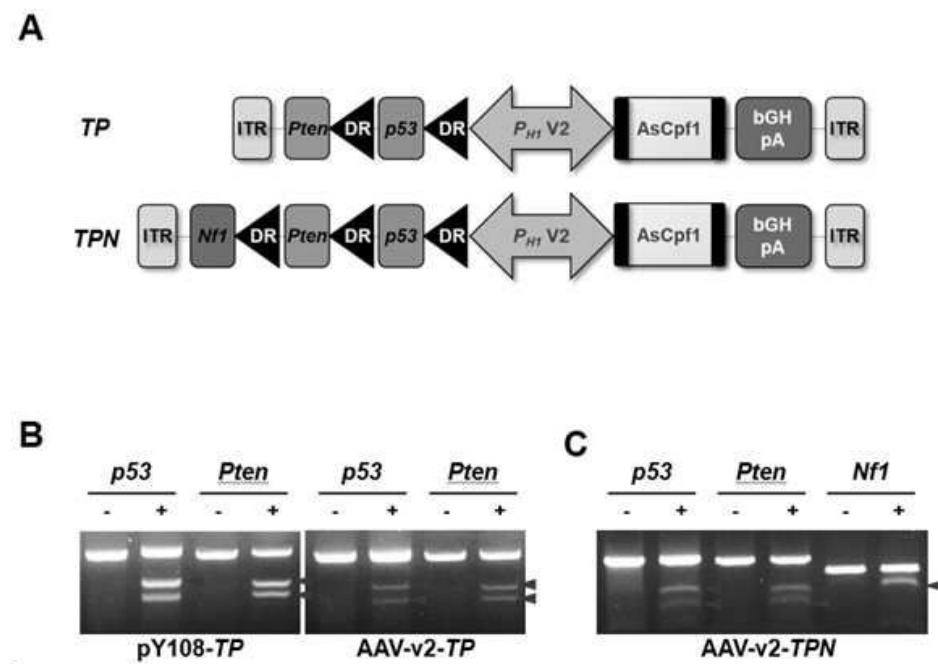
C



도면5



도면6



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> SINGLE ADENO-ASSOCIATED VIRUS(AAV) VECTOR EXPRESSING CRISPR-CPF1
USING A BIDIRECTIONAL H1 PROMOTER
- <130> FPD/202202-0036/C
- <150> KR 10-2021-0041848
- <151> 2021-03-31
- <160> 22
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1
 tticaggatg tagaccggcc gccactataa ggctcgaaag aggaataaat ttttcgttta 60
 gggtgatttc ccacaaagca cagcgcgtaa ttgcatgcg ctctaccca ggctcctgtg 120

 ctagacaaga agcccgcgca tccgggcaag ggatgatgac gtcgtccttc aagagcg 177
 <210> 2
 <211> 1
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> V1
 <400> 2
 c 1
 <210> 3
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> V2
 <400> 3
 cctccgcca c 11
 <210> 4
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> V3
 <400> 4
 cccttctcc gccac 16
 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> V4

<400> 5

ccggccccgc tgatgagctt cctccgccca c

31

<210> 6

<211> 1306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AsCpf1

<400> 6

Thr Gln Phe Glu Gly Phe Thr Asn Leu Tyr Gln Val Ser Lys Thr Leu

1 5 10 15

Arg Phe Glu Leu Ile Pro Gln Gly Lys Thr Leu Lys His Ile Gln Glu

20 25 30

Gln Gly Phe Ile Glu Glu Asp Lys Ala Arg Asn Asp His Tyr Lys Glu

35 40 45

Leu Lys Pro Ile Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Thr Tyr Ala Asp Gln Cys

50 55 60

Leu Gln Leu Val Gln Leu Asp Trp Glu Asn Leu Ser Ala Ala Ile Asp

65 70 75 80

Ser Tyr Arg Lys Glu Lys Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Leu Ile Glu

85 90 95

Glu Gln Ala Thr Tyr Arg Asn Ala Ile His Asp Tyr Phe Ile Gly Arg

100 105 110

Thr Asp Asn Leu Thr Asp Ala Ile Asn Lys Arg His Ala Glu Ile Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Thr Val Thr Thr Thr Glu His Glu Asn Ala Leu Leu Arg Ser

145 150 155 160

Phe Asp Lys Phe Thr Thr Tyr Phe Ser Gly Phe Tyr Glu Asn Arg Lys

165 170 175

Asn Val Phe Ser Ala Glu Asp Ile Ser Thr Ala Ile Pro His Arg Ile

180 185 190
 Val Gln Asp Asn Phe Pro Lys Phe Lys Glu Asn Cys His Ile Phe Thr
 195 200 205
 Arg Leu Ile Thr Ala Val Pro Ser Leu Arg Glu His Phe Glu Asn Val
 210 215 220
 Lys Lys Ala Ile Gly Ile Phe Val Ser Thr Ser Ile Glu Glu Val Phe

 225 230 235 240
 Ser Phe Pro Phe Tyr Asn Gln Leu Leu Thr Gln Thr Gln Ile Asp Leu
 245 250 255
 Tyr Asn Gln Leu Leu Gly Gly Ile Ser Arg Glu Ala Gly Thr Glu Lys
 260 265 270
 Ile Lys Gly Leu Asn Glu Val Leu Asn Leu Ala Ile Gln Lys Asn Asp
 275 280 285
 Glu Thr Ala His Ile Ile Ala Ser Leu Pro His Arg Phe Ile Pro Leu
 290 295 300

 Phe Lys Gln Ile Leu Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ser Phe Ile Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Ser Asp Glu Glu Val Ile Gln Ser Phe Cys Lys Tyr Lys
 325 330 335
 Thr Leu Leu Arg Asn Glu Asn Val Leu Glu Thr Ala Glu Ala Leu Phe
 340 345 350
 Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Leu Thr His Ile Phe Ile Ser His Lys
 355 360 365
 Lys Leu Glu Thr Ile Ser Ser Ala Leu Cys Asp His Trp Asp Thr Leu

 370 375 380
 Arg Asn Ala Leu Tyr Glu Arg Arg Ile Ser Glu Leu Thr Gly Lys Ile
 385 390 395 400
 Thr Lys Ser Ala Lys Glu Lys Val Gln Arg Ser Leu Lys His Glu Asp
 405 410 415
 Ile Asn Leu Gln Glu Ile Ile Ser Ala Ala Gly Lys Glu Leu Ser Glu
 420 425 430
 Ala Phe Lys Gln Lys Thr Ser Glu Ile Leu Ser His Ala His Ala Ala

435 440 445
 Leu Asp Gln Pro Leu Pro Thr Thr Leu Lys Lys Gln Glu Glu Lys Glu
 450 455 460
 Ile Leu Lys Ser Gln Leu Asp Ser Leu Leu Gly Leu Tyr His Leu Leu
 465 470 475 480
 Asp Trp Phe Ala Val Asp Glu Ser Asn Glu Val Asp Pro Glu Phe Ser
 485 490 495
 Ala Arg Leu Thr Gly Ile Lys Leu Glu Met Glu Pro Ser Leu Ser Phe
 500 505 510
 Tyr Asn Lys Ala Arg Asn Tyr Ala Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Val Glu
 515 520 525
 Lys Phe Lys Leu Asn Phe Gln Met Pro Thr Leu Ala Ser Gly Trp Asp
 530 535 540
 Val Asn Lys Glu Lys Asn Asn Gly Ala Ile Leu Phe Val Lys Asn Gly
 545 550 555 560
 Leu Tyr Tyr Leu Gly Ile Met Pro Lys Gln Lys Gly Arg Tyr Lys Ala
 565 570 575
 Leu Ser Phe Glu Pro Thr Glu Lys Thr Ser Glu Gly Phe Asp Lys Met
 580 585 590
 Tyr Tyr Asp Tyr Phe Pro Asp Ala Ala Lys Met Ile Pro Lys Cys Ser
 595 600 605
 Thr Gln Leu Lys Ala Val Thr Ala His Phe Gln Thr His Thr Thr Pro
 610 615 620
 Ile Leu Leu Ser Asn Asn Phe Ile Glu Pro Leu Glu Ile Thr Lys Glu
 625 630 635 640
 Ile Tyr Asp Leu Asn Asn Pro Glu Lys Glu Pro Lys Lys Phe Gln Thr
 645 650 655
 Ala Tyr Ala Lys Lys Thr Gly Asp Gln Lys Gly Tyr Arg Glu Ala Leu
 660 665 670
 Cys Lys Trp Ile Asp Phe Thr Arg Asp Phe Leu Ser Lys Tyr Thr Lys
 675 680 685

Thr Thr Ser Ile Asp Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser Ser Gln Tyr Lys
690 695 700

Asp Leu Gly Glu Tyr Tyr Ala Glu Leu Asn Pro Leu Leu Tyr His Ile
705 710 715 720

Ser Phe Gln Arg Ile Ala Glu Lys Glu Ile Met Asp Ala Val Glu Thr
725 730 735

Gly Lys Leu Tyr Leu Phe Gln Ile Tyr Asn Lys Asp Phe Ala Lys Gly
740 745 750

His His Gly Lys Pro Asn Leu His Thr Leu Tyr Trp Thr Gly Leu Phe
755 760 765

Ser Pro Glu Asn Leu Ala Lys Thr Ser Ile Lys Leu Asn Gly Gln Ala
770 775 780

Glu Leu Phe Tyr Arg Pro Lys Ser Arg Met Lys Arg Met Ala His Arg
785 790 795 800

Leu Gly Glu Lys Met Leu Asn Lys Lys Leu Lys Asp Gln Lys Thr Pro
805 810 815

Ile Pro Asp Thr Leu Tyr Gln Glu Leu Tyr Asp Tyr Val Asn His Arg
820 825 830

Leu Ser His Asp Leu Ser Asp Glu Ala Arg Ala Leu Leu Pro Asn Val
835 840 845

Ile Thr Lys Glu Val Ser His Glu Ile Ile Lys Asp Arg Arg Phe Thr
850 855 860

Ser Asp Lys Phe Phe Phe His Val Pro Ile Thr Leu Asn Tyr Gln Ala
865 870 875 880

Ala Asn Ser Pro Ser Lys Phe Asn Gln Arg Val Asn Ala Tyr Leu Lys
885 890 895

Glu His Pro Glu Thr Pro Ile Ile Gly Ile Asp Arg Gly Glu Arg Asn
900 905 910

Leu Ile Tyr Ile Thr Val Ile Asp Ser Thr Gly Lys Ile Leu Glu Gln
915 920 925

Arg Ser Leu Asn Thr Ile Gln Gln Phe Asp Tyr Gln Lys Lys Leu Asp
930 935 940

Asn Arg Glu Lys Glu Arg Val Ala Ala Arg Gln Ala Trp Ser Val Val

945 950 955 960

Gly Thr Ile Lys Asp Leu Lys Gln Gly Tyr Leu Ser Gln Val Ile His

965 970 975

Glu Ile Val Asp Leu Met Ile His Tyr Gln Ala Val Val Val Leu Glu

980 985 990

Asn Leu Asn Phe Gly Phe Lys Ser Lys Arg Thr Gly Ile Ala Glu Lys

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Leu Val Leu Lys Asp Tyr Pro Ala Glu Lys Val Gly Gly Val Leu Asn

1025 1030 1035 1040

Pro Tyr Gln Leu Thr Asp Gln Phe Thr Ser Phe Ala Lys Met Gly Thr

1045 1050 1055

Gln Ser Gly Phe Leu Phe Tyr Val Pro Ala Pro Tyr Thr Ser Lys Ile

1060 1065 1070

Asp Pro Leu Thr Gly Phe Val Asp Pro Phe Val Trp Lys Thr Ile Lys

1075 1080 1085

Asn His Glu Ser Arg Lys His Phe Leu Glu Gly Phe Asp Phe Leu His

1090 1095 1100

Tyr Asp Val Lys Thr Gly Asp Phe Ile Leu His Phe Lys Met Asn Arg

1105 1110 1115 1120

Asn Leu Ser Phe Gln Arg Gly Leu Pro Gly Phe Met Pro Ala Trp Asp

1125 1130 1135

Ile Val Phe Glu Lys Asn Glu Thr Gln Phe Asp Ala Lys Gly Thr Pro

1140 1145 1150

Phe Ile Ala Gly Lys Arg Ile Val Pro Val Ile Glu Asn His Arg Phe

1155 1160 1165

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

1170 1175 1180

Leu Glu Glu Lys Gly Ile Val Phe Arg Asp Gly Ser Asn Ile Leu Pro

1185 1190 1195 1200
Lys Leu Leu Glu Asn Asp Asp Ser His Ala Ile Asp Thr Met Val Ala
 1205 1210 1215
Leu Ile Arg Ser Val Leu Gln Met Arg Asn Ser Asn Ala Ala Thr Gly
 1220 1225 1230
Glu Asp Tyr Ile Asn Ser Pro Val Arg Asp Leu Asn Gly Val Cys Phe

 1235 1240 1245
Asp Ser Arg Phe Gln Asn Pro Glu Trp Pro Met Asp Ala Asp Ala Asn
 1250 1255 1260
Gly Ala Tyr His Ile Ala Leu Lys Gly Gln Leu Leu Leu Asn His Leu
1265 1270 1275 1280
Lys Glu Ser Lys Asp Leu Lys Leu Gln Asn Gly Ile Ser Asn Gln Asp
 1285 1290 1295
Trp Leu Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Arg Asn
 1300 1305

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Trp53-CR2-F1

<400> 7
acatgacgga ggtcgtgaga 20

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Trp53-CR2-R1

<400> 8
gggatattcc acctgttcgg c 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> mPten-E1-F1

<400> 9

ctctggctgc tgaggagaag

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mPten-E1-R2

<400> 10

acaatccgtg ccttgacact

20

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nf1-F2

<400> 11

ttcgagtgat agctgtgtgg c

21

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nf1-R3

<400> 12

gaattccttc aaaaaccag atgt

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATG5-CR1-F1

<400> 13

tgtgcttcga gatgtgtgt

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-CR1-R2
 <400> 14
 gtccagaacg catcatgaca 20
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Trp53-CR2_F
 <400> 15
 agatgccaca gcgtggtggt acct 24

 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Trp53-CR2_R
 <400> 16
 aaaaaggtag caccacgctg tggc 24
 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-CR1_F
 <400> 17
 agatccacaa tcaatgtact taca 24
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-CR1_R
 <400> 18
 aaaatgtaag tacattgatt gtgg 24

<210> 19
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP_F
 <400> 19
 agatgccaca gcgtgggtgt acctaatttc tactcttgta gattgctaac gatctctttg 60
 atgatg 66
 <210> 20
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP_R
 <400> 20
 aaaacatcat caaagagatc gtttagcaatc tacaagagta gaaattaggt accaccacgc 60
 tgtggc 66
 <210> 21
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TPN_F
 <400> 21
 agatgccaca gcgtgggtgt acctaatttc tactcttgta gattgctaac gatctctttg 60
 atgatgaatt tctactcttg tagatccaca tgctttaggc actaacct 108
 <210> 22
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TPN_R
 <400> 22
 aaaaaggtta gtgcctaaag catgtggatc tacaagagta gaaattcatc atcaaagaga 60
 tcgttagcaa tctacaagag tagaaattag gtaccaccac gctgtggc 108