명세서

발명의 명칭: 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 시스템

기술분야

[1] 본 발명은 SC 기능 조절 및/또는 SC 기능 장애로 인한 질환의 치료 또는 개선을 위한, 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 및 이의 이용에 관한 것이다. 보다 구체적으로, SC 기능 조절 및/또는 SC 기능 장애로 인한 질환 치료 또는 개선을 위하여 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 및/또는 이를 위한 조성물을 포함하는, 인위적으로 SC 기능 조절 및/또는 SC 기능 장애로 인한 질환 치료 또는 개선할 수 있는 시스템에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 슈반세포(Schwann cell, 이하 SC로 약칭하기도 함) 혹은 신경초세포(neurolemmocyte)는 말초신경계의 기본적인 신경교세포이다. 신경교세포는 뉴런을 지지하는 기능을 하며, 말초신경계의 신경교세포로는 위성세포, 후각덮개세포(olfactory ensheathing cell), 창자신경교세포, 파치니 소체 등 감각신경종말에 있는 신경교세포 등이 있다.

[4] 수초(myelin)가 있는 축삭(axon)에서 슈반세포는 수초를 형성한다. 수초는 연속적이지 않으며, 각 슈반세포는 축삭을 100 μm 정도 감싼다. 인접한 슈반세포까지의 틈을 랑비에결절이라고 한다. 척추동물의 신경계는 수초로 절연되어 있어 축삭의 막 전기용량을 유지한다. 활동전위는 랑비에결절에서 결절로 도약전도한다. 이를 통하여 축삭 지름이 증가하지 않고도 전도 속도가 최대 10배 증가하고, 에너지를 절약할 수 있다. 슈반세포는 중추신경계에서 같은 역할을 하는 희소돌기아교세포의 유사체라 할 수 있다. 다만 희소돌기아교세포와 달리 슈반세포는 오직 하나의 축삭에만 수초를 형성한다.

[5] 유전병인 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환은 말초신경계에서 수초를 형성하는 슈반세포의 이상으로 손과 발의 근육들이 점점 위축되는 질환이다. 그 중 샤르코-마리-투스 타입 1A(Charcot-Marie-Tooth type 1A, CMT1A)은 말초신경계에서 가장 빈번히 발생하는 유전 질환 중 하나로, 동물모델에서 얻어진 정보들로 CMT1A 의 유전학적 원인 및 그 해법을 찾기에는 인간과 동물모델 간의 유전정보 차이가 워낙 커 매칭에 문제가 있다.

[6] CMT1A는 전체 CMT 사례의 절반 이상과 CMT1 사례 중 약 70%정도를 차지하고, CMT의 발병률은 1/2500이다. CMT1A는 근육 약화 및 손실, 반사신경 감소, 말단 감각 손상, 손과 발의 기형, 신경 전도 속도(nerve conduction velocity, NCV)의 둔화, 및 비대성 분절 탈수초화(demyelination) 및 양파 비늘줄기(onion bulb) 같이 나타나는 재수초화(remyelination) 등의 병리학적 특성을 나타낸다.

[7] 이러한 CMT1A와 같은 슈반세포 기능 이상에 따른 질환에 대한 근본적인

치료제 또는 치료 방법은 현재 없는 실정이다. 단지 물리치료, 보조기 및 정형외과 수술을 이용한 증상 악화를 부분적으로 감소시키는 방법이 전부이다. 따라서, 슈반세포 기능 이상에 따른 질병의 근본적인 치료법의 개발 요구가 매우 큰 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 개선된 SC 기능 조절 효과를 갖는, 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 시스템에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 및 이에 의한, 인위적으로 SC 기능 조절 및/또는 SC 기능 조절 인자의 발현을 변형시킨 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템이라고도 함)에 관한 것이다.

[10]

[11] 본 발명은 특정 목적을 위해 유전적으로 조작된 또는 변형된 SC 기능 조절 인자를 제공한다.

[12] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 시스템을 제공하고자 한다.

[13] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 변형 시스템을 제공하고자 한다.

[14] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 및 이의 발현 산물을 제공하고자 한다.

[15] 본 발명은 일 구체예로서 SC 기능 조절 인자의 조작을 위한 유전자 조작용 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공하고자 한다.

[16] 본 발명은 일 구체예로서 SC 기능을 조절하는 방법을 제공하고자 한다.

[17] 본 발명은 일 구체예로서 SC 기능장애 관련 질환을 치료하기 위한 치료용 또는 약학적 조성물 및 이의 다양한 용도를 제공하고자 한다.

[18] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 PMP22의 SC 기능 조절 인자들 및/또는 이의 발현 산물을 제공하고자 한다.

[19] 본 발명은 일 구체예로서 PMP22의 SC 기능 조절 인자들의 인위적 조작을 위한 유전자 조작용 조성물을 제공하고자 한다.

[20] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 PMP22의 SC 기능 조절 인자들 및/또는 상기 인위적으로 조작을 위한 유전자 조작용 조성물의 치료적 용도를 제공하고자 한다.

[21] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 PMP22의 SC 기능 조절인자들 및/또는 상기 인위적 조작을 위한 유전자 조작용 조성물의 부가적 용도를 제공하고자 한다.

[22]

과제 해결 수단

[23] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 SC 기능 조절 및/또는 SC 기능장애 관련 질환을 치료 또는 개선하기 위한 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 및/또는 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조성물을 포함하는, 인위적으로 SC 기능을 조절할 수 있는 시스템에 관한 것이다.

[24]

[25] 본 발명은 특정 목적을 위해 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자를 제공한다.

[26] "SC 기능 조절 인자"는 SC 기능 조절에 직접적으로 참여하거나 또는 간접적으로 영향을 미치는 모든 요소를 의미한다. 이때, 상기 요소는 DNA, RNA, 유전자, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다. 또한, SC 기능 조절 인자는 슈반세포뿐만 아니라, 신경교세포(glial cells) 및/또는 섬유아세포(fibroblasts) 기능 조절에 직접적으로 참여하거나 또는 간접적으로 영향을 미치는 모든 요소를 포함한다.

[27] 구현예에서, 비자연적인, 즉, 인위적으로 조작된, SC 기능 조절에 관여하는 다양한 물질을 모두 포함한다. 예를 들어, 유전적으로 조작된 또는 변형된, 슈반세포에서 발현되는 유전자 또는 단백질 일 수 있다.

[28] 상기 SC 기능 조절 인자는 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[29] 상기 SC 기능 조절 인자는 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행를 촉진시킬 수 있다.

[30] 상기 SC 기능 조절 인자는 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 분화를 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[31] 상기 SC 기능 조절 인자는 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[32] 상기 SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해할 수 있다.

[33] 상기 SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해할 수 있다.

[34] 상기 SC 기능 조절 인자는 신경세포 축삭의 수초 형성을 조절할 수 있다.

[35] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화 또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[36] 상기 SC 기능 조절 인자는 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 기능장애 또는 결함에 의한 질병의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[37]

[38] 본 발명의 일 구현예에서 SC 기능 조절 인자로서, 예를 들어, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자일 수 있다.

[39] 본 발명의 일 구현예에서 SC 기능 조절 인자로서 인위적으로 조작된 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, PMP22 유전자를 인위적으로 조작할 수 있다.

[40]

[41] 그러므로, 본 발명의 일 구현예에서는 핵산 서열 내 변형이 일어난 PMP22 유전자를 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자로 제공한다.

[42] 상기 핵산서열 내 변형은 비제한적으로, 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 조작될 수 있다.

[43] "가이드핵산-에디터단백질 복합체"는 가이드핵산과 에디터단백질의 상호작용을 통해 형성된 복합체를 의미하며, 핵산-단백질 복합체는 가이드핵산과 에디터단백질을 포함한다.

[44] 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 대상을 변형시킬 수 있다. 상기 대상은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질일 수 있다.

[45]

[46] 예를 들어, 상기 유전자는 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자로서,

[47] 상기 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내 PAM(proto-spacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp의 염기 서열 부위 내의

[48] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;

[49] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;

[50] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입

[51] 중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는

[52] 상기 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자일 수 있다.

[53] 상기 핵산의 변형은 유전자의 프로모터 영역에서 일어날 수 있다.

[54] 상기 핵산의 변형은 유전자의 엑손 영역에서 일어날 수 있다.

[55] 상기 핵산의 변형은 유전자의 인트론 영역에서 일어날 수 있다.

[56] 상기 핵산의 변형은 유전자의 인핸서 영역에서 일어날 수 있다.

[57] 상기 PAM 서열은 예를 들어, 하기의 서열 중 1 이상일 수 있다(5'에서 3'방향으로 기재함).

[58] NGG(N은 A, T, C 또는 G임);

[59] NNNNRYAC(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C또는 T임);

[60] NNAGAAW(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임);

[61] NNNNGATT(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임);

[62] NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는

C 또는 T임); 및

[63] TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[64] 상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 노카르디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 알리사이클로바클루스 아시도칼다리우스(AlicyclobacHlus acidocaldarius), 바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides), 바실러스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens), 엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum), 락토바실러스 델브루에키이(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 미크로스 킬라 마리나(Microscilla marina), 부르크홀데리아레스 박테리움(Burkholderiales bacterium), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans), 폴라로모나스 속(Polaromonas sp.), 크로코스파에라 와트소니이(Crocosphaera watsonii), 시아노테세 속(Cyanothece sp.), 마이크로시스티스 아에루기노사(Microcystis aeruginosa), 시네코코커스 속(Synechococcus sp.), 아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum), 암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii), 칼디셀룰로시럽토 베시이(Caldicelulosiruptor bescii), 칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 나트라나에로비우스 써모필러스 (Natranaerobius thermophilus), 펠로토마쿨럼 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum), 아시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus), 아시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans), 알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum), 마리노박터 속(Marinobacter sp.), 니트로소코커스 할로필러스(Nitrosococcus halophilus), 니트로소코커스 와트소니(Nitrosococcus watsoni), 슈도알테로 모나스 할로플란크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis), 크테도노박테르 라세미페르(Ktedonobacter racemifer), 메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum), 아나베나 바리아빌리스(Anabaena variabilis), 노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena), 노스톡 속(Nostoc sp.), 아르트로스피라 맥시마(Arthrospira maxima), 아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis), 아르트로스피라 속(Arthrospira sp.),

링비아속(Lyngbya sp.), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes), 오실라토리아 속(Oscillatoria sp.), 페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis), 써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus) 또는 아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina)로부터 유래될 수 있다.

[65] 일 구체예에서, 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 일 예에서, 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질 또는 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질일 수 있다.

[66]

[67] 또한, 다른 구현예에서,

[68] 본 발명은 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 염색체 17, 15,267,977 ~ 15,273,977(regulatory resign)번째 염기들; 염색체 17, 15,229,777 ~ 15,265,326 (coding resign)번째 염기들; 또는 염색체 17, 15,268,191 ~ 15,437,045번째 염기들, 염색체 17, 15,239,833 ~ 15,258,667번째 염기들 또는 염색체 17, 15,342,770 ~ 15,435,639번째 염기들(non-coding resign)를 포함하는 영역 중 일부를 표적하는 가이드 핵산을 제공한다.

[69] 일 구체예에서, PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산을 제공한다.

[70] 상기 가이드 핵산은 PMP22 유전자의 핵산 서열의 일부와 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있다. 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 3, 0 내지 2개의 미스매치(mismatches)를 포함할 수 있다. 바람직한 예로서, 상기 가이드 핵산은 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열 중 1 이상에 각각 상보적인 결합을 형성하는 뉴클레오타이드일 수 있다.

[71] 예를 들어, 이하의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 가이드 핵산을 제공할 수 있다:

[72] PMP22 유전자 핵산 서열 중 서열 번호 1, 3, 25, 27, 28, 41, 44, 45 및 53의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산.

[73] 상기 가이드 핵산은 비제한적으로, 18 내지 25 bp, 18 내지 24 bp, 18 내지 23 bp, 19 내지 23 bp, 19 내지 23 bp, 또는 20 내지 23 bp의 뉴클레오타이드일 수 있다. 이때, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 3, 0 내지 2개, 또는 0 내지 1개의 미스매치(mismatches)를 포함할 수 있다.

[74]

[75] 또한, 본 발명의 목적을 위해 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 유전자 조작용 조성물을 제공한다.

[76] 일 구현예에서, 유전자 조작용 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체 또는 이들을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[77] 일 구체예에서, 유전자 조작용 조성물은

[78] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 염색체 17, 15,267,977 ~ 15,273,977(regulatory resign)번째 염기들; 염색체 17, 15,229,777 ~ 15,265,326 (coding resign)번째 염기들; 또는 염색체 17, 15,268,191 ~ 15,437,045번째 염기들, 염색체 17, 15,239,833 ~ 15,258,667번째 염기들 또는 염색체 17, 15,342,770 ~ 15,435,639번째 염기들(non-coding resign)를 포함하는 영역 중 일부를 표적하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[79] (b) 상기 가이드 핵산과 복합체를 형성하여 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 표적하는 부위를 절단 또는 변형시키는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[80] 을 포함할 수 있다.

[81]

[82] 일 구체예에서, 유전자 조작용 조성물은

[83] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[84] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[85] 을 포함할 수 있다.

[86] 일 구현예에서, 상기 가이드핵산은 서열번호 1, 3, 25, 27, 28, 41, 44, 45 및 53의 표적 서열 중 1 이상에 각각 상보적인 결합을 형성하는 핵산서열일 수 있다.

[87] 일 구현예에서, 상기 유전자 조작용 조성물은 바이러스 벡터 시스템을 포함할 수 있다.

[88] 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

[89]

[90] 일 구체예에서, 본 발명은 세포에

[91] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 염색체 17, 15,267,977 ~ 15,273,977(regulatory

resign)번째 염기들; 염색체 17, 15,229,777 ~ 15,265,326 (coding resign)번째 염기들; 또는 염색체 17, 15,268,191 ~ 15,437,045번째 염기들, 염색체 17, 15,239,833 ~ 15,258,667번째 염기들 또는 염색체 17, 15,342,770 ~ 15,435,639번째 염기들(non-coding resign)를 포함하는 영역 중 일부를 표적하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[92] (b) 상기 가이드 핵산과 복합체를 형성하여 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 표적하는 부위를 절단 또는 변형시키는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[93] 을 도입시키는 단계를 포함하는, 세포를 인위적으로 조작하는 방법을 제공한다.

[94]

[95] 일 구체예에서, 본 발명은 세포에

[96] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[97] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[98] 을 도입시키는 단계를 포함하는, 세포를 인위적으로 조작하는 방법을 제공한다.

[99] 상기 가이드핵산 및 에디터단백질은, 각각 핵산 서열의 형태로 1 이상의 벡터에 존재하거나, 또는 가이드핵산과 에디터단백질의 결합으로 복합체를 형성하여 존재할 수 있다.

[100] 상기 도입 단계는 생체 내 또는 생체 외에서 수행될 수 있다.

[101] 도입 단계는 전기천공법 (electroporation), 리포좀, 플라스미드, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles) 및 PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 중 선택되는 1이상의 방법으로 수행될 수 있다.

[102] 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

[103]

[104] 또한, 구현예에서 본 발명은 SC 기능장애 관련 질환 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환을 치료하기 위한 치료용 및/또는 약학적 조성물을 제공한다.

[105] 약학적 조성물은 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 유전자

조작용 조성물을 포함할 수 있다.

[106] 상기 유전자 조작용 조성물 관련 구성 설명은 상기 기술한 바와 같다.

[107]

[108] 구현예에서, PMP22 유전자를 서열분석함으로써 대상체에서 인위적으로 조작 가능한 표적 위치의 서열에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[109] 또한, 이러한 방법으로 제공받은 정보를 이용하여 라이브러리를 구축하는 방법을 제공한다.

[110]

[111] 일 구현예에서, 다음을 포함하는 유전자 조작용 키트를 제공한다:

[112] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 염색체 17, 15,267,977 ~ 15,273,977(regulatory resign)번째 염기들; 염색체 17, 15,229,777 ~ 15,265,326 (coding resign)번째 염기들; 또는 염색체 17, 15,268,191 ~ 15,437,045번째 염기들, 염색체 17, 15,239,833 ~ 15,258,667번째 염기들 또는 염색체 17, 15,342,770 ~ 15,435,639번째 염기들(non-coding resign)를 포함하는 영역 중 일부를 표적하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[113] (b) 상기 가이드 핵산과 복합체를 형성하여 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 표적하는 부위를 절단 또는 변형시키는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열.

[114]

[115] 일 구현예에서, 다음을 포함하는 유전자 조작용 키트를 제공한다:

[116] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[117] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열.

[118] 이러한 키트를 이용하여 목적하는 유전자를 인위적으로 조작할 수 있다.

[119]

[120] 구현예에서, 본 발명은

[121] PMP22 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[122] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[123] 을 포함하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[124] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 염색체 17, 15,267,977 ~

15,273,977(regulatory resign)번째 염기들; 염색체 17, 15,229,777 ~ 15,265,326 (coding resign)번째 염기들; 또는 염색체 17, 15,268,191 ~ 15,437,045번째 염기들, 염색체 17, 15,239,833 ~ 15,258,667번째 염기들 또는 염색체 17, 15,342,770 ~ 15,435,639번째 염기들(non-coding resign)를 포함하는 영역 중 일부일 수 있다.

[125] 상기 표적 서열은 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열 번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열 중 1 이상일 수 있다.

[126] 일 실시예에서, 상기 에디터단백질은 캄필로박터 제주니 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질을 사용하였다.

[127] 일 실시예에서, 상기 SC 기능장애 질환은 SC 기능 조절 인자 관련 질환일 수 있다.

[128] 일 실시예에서, 상기 SC 기능 조절 인자 관련 질환은 샤르코-마리-투스 질환 형태 1A(Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A), 데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSS), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN) 또는 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS)일 수 있다.

[129]

[130] 구현예에서, 본 발명은 대상체에 대한 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자 또는 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작하는 유전자 조작용 조성물을 이용한 질환 치료 용도의 모든 양태를 제공한다.

[131] 치료 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[132]

발명의 효과

[133] 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 인자 및 이에 의해 인위적으로 기능 변형시킨 SC 기능 조절 시스템에 의해서, 효과적인 SC 기능장애 질환, 예를 들어, 샤르코-마리-투스 질환 형태 1A(Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A), 데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSS), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN), 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS) 등의 SC 기능 조절 인자 관련 질환의 치료적 용도로 이용할 수 있다. SC 기능 조절 인자들이 관여하는 다양한 체내 메커니즘을 조절을 통해 SC 기능 조절 시스템의 효능을 개선시킬 수 있다.

[134] 예를 들어, PMP22 유전자를 이용할 수 있다.

[135]

도면의 간단한 설명

[136] 도 1은 SpCas9-sgRNA 매개 유전자 조작으로 인한 인델 빈도(%)를 나타낸 결과로, sgRNA의 표적 부위를 (a) CDS, (b) TATA-box, (c) Enhancer로 나누어 각각 인델빈도를 나타낸다.

[137] 도 2는 CjCas9-sgRNA 매개 유전자 조작으로 인한 인델 빈도(%)를 나타낸 결과로, sgRNA의 표적 부위를 (a) CDS, (b) TATA-box, (c) Enhancer로 나누어 각각 인델빈도를 나타낸다.

[138] 도 3은 슈반 유사 세포에서 인간 PMP22 유전자의 조절 인자(regulatory elements)를 표적한 SpCas9-sgRNA에 의한 유전자 조작 효과를 나타낸다.

[139] 도 4는 인간 PMP22 유전자의 CDS 부위를 표적한 SpCas9-sgRNA에 의한 프래임시프트 돌연변이 비율을 보여준다.

[140] 도 5는 이중 sgRNA를 이용한 인간 PMP22 유전자의 작은 일부분 삭제를 보여준다.

[141] 도 6은 인간 슈반 유사 세포에서 SpCas9-sgRNA에 의한 인간 PMP22의 mRNA 발현감소를 나타낸 그래프이다.

[142] 도 7은 인간 슈반세포에서 인간 PMP22 유전자의 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA에 의한 PMP22의 효과적 및 특이적 발현감소를 나타낸 그래프로, (a)는 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA에 의한 인델 빈도 측정결과, (b)는 수초화 신호 인자 및 각 표적 부위별 RNP 복합체의 처리 유무에 따른 qRT-PCR로 측정한 상대적인 PMP22의 mRNA 발현 비교결과(n=3, One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests: * $p < 0.05$), (c)는 원거리 인해서 부위(distal enhancer region) B 및 C를 표적하는 SpCas9-sgRNA에 의한 인델 빈도 측정결과를 나타낸다.

[143] 도 8은 in vitro에서 인간 PMP22 유전자의 TATA-box 부위를 표적하는 CRISPR-Cas9을 통한 PMP22의 효과적 및 특이적 발현감소를 나타낸 그래프로, (a)는 인간 PMP22 위치의 프로모터 부위를 표적하는 표적서열, (b)의 가장 좌측의 그래프는 인간 슈반세포에서 표적 딥 시퀀싱을 이용한 인델 빈도 측정결과, 가운데 그래프는 전체 인델 빈도 중 TATA-box 1 돌연변이 빈도 측정결과(n=3), 가장 우측의 그래프는 인간 슈반세포에서 수초화 신호 인자 및 RNP 복합체의 처리 유무에 따른 qRT-PCR로 측정한 상대적인 PMP22의 mRNA 발현 비교결과(n=3, One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests: * $p < 0.05$)를 나타낸다.

[144] 도 9은 인간 슈반세포에서 표적 딥 시퀀싱에 의한 in silico 오프-타겟 분석을 통해 발견한 오프-타겟 및 온-타겟에서 PMP22-TATA RNP에 의한 인델 빈도를 나타낸 것으로, (a)는 인델 빈도를 나타낸 그래프이고, (b)는 빈도가 높은 인델 패턴을 보여주며, (c)는 in silico 오프-타겟 분석을 통해 발견한 오프-타겟 위치를 나타낸다.

[145] 도 10는 인간 전체 게놈에서의 PMP22-TATA RNP에 의해 절단된 위치는 보여주는 결과로, (a)는 Genome-wide Circos plot을 보여주고, (b)는 in silico 오프-타겟 분석을 통해 발견한 오프-타겟 위치 중 Digenome-seq에 의해 나타난 오프-타겟 위치를 보여주며, (c)는 오프-타겟 위치에서 인델 빈도를 나타낸 그래프이다.

[146] 도 11은 C22 마우스에서 PMP22-TATA RNA 치료법을 이용한 치료 접근법을

도식화하여 나타낸다.

[147] 도 12은 CMT1A 마우스에서 CRISPR/Cas9에 의한 PMP22의 발현저해를 통한 병증 표현형 완화를 보여주는 결과로, (a)는 mRosa26 또는 PMP22-TATA RNP 복합체를 처리한 좌골 신경에서 표적 딥 시퀀싱을 이용한 인델 빈도를 나타낸 그래프이고(n=3), (b)는 도 11a의 전체 인델 빈도 중 TATA-box 1 돌연변이 빈도 측정결과(n=3)이며, (c)는 mRosa26 또는 PMP22-TATA RNP 복합체를 처리한 좌골 신경으로부터 qRT-PCR을 이용한 상대적인 PMP22의 mRNA 발현양을 비교한 그래프이다.

[148] 도 13는 in silico 분석에 의한 마우스 게놈에서의 PMP22-TATA sgRNA의 오프-타겟 위치 및 인델 빈도를 보여주는 결과로, (a)는 오프-타겟 위치를 보여주며, (b)는 각 오프-타겟의 위치에서 인델 빈도를 나타낸 그래프이다.

[149] 도 14은 CMT1A 마우스에서 CRISPR/Cas9에 의한 PMP22의 발현저해를 통한 병증 표현형 완화를 보여주는 결과로, (a)는 mRosa26 또는 PMP22-TATA RNP 복합체를 처리한 좌골 신경 조직의 semithin section의 이미지이며, (b)의 상단 그래프는 PMP22-TATA RNP를 처리한 마위스에서 g-ratio가 증가함을 보여주는 산점도(scatter plot)이고, 하단 그래프는 MP22-TATA RNP를 처리한 마위스에서 수초화된 축산의 직경이 증가함을 보여주는 그래프이다.

[150] 도 15는 CMT1A 마우스에서 CRISPR/Cas9에 의한 PMP22의 발현저해를 통한 전기 생리학적 변화를 보여주는 결과로, (a)는 말단 지연속도(Distal latency, DL)의 변화를 나타낸 그래프이고, (b)는 운동 신경 전도 속도(nerve conduction velocity, NCV)의 변화를 나타낸 그래프이며, (c)는 복합 근육 활동 전위(compound muscle action potential, CMAP)의 변화를 나타낸 그래프이다(n=7 for mRosa26 RNP; n=10 PMP22-TATA, n=10).

[151] 도 16는 CMT1A 마우스에서 CRISPR/Cas9에 의한 PMP22의 발현저해로 인한 이주 행동(locomotor behaviour)을 분석 결과로, (a)의 상단 그래프는 로타로드 테스트 결과(n=7 for mRosa26 RNP, n=11 for PMP22-TATA)이고, 하단 그래프는 8주령부터 16주령이 될 때까지 매주마다 측정한 로타로드 테스트 결과(n=7 for mRosa26 RNP, n=11 for PMP22-TATA)이며, (b)의 상단 그래프는 mRosa26 또는 PMP22-TATA RNP 복합체를 처리한 C22 마우스의 비장근(gastrocnemius muscle) 무게/체중 비율을 나타낸 그래프이고, 하단 이미지는 mRosa26 또는 PMP22-TATA RNP 복합체를 처리한 C22 마우스의 비장근(gastrocnemius muscle) 이미지이다.

[152]

[153]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[154] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한

의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 이하에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 다른 참고문헌은 전체가 참고로 포함된다. 추가로, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[155]

[156] 본 발명의 일 태양은

[157] 슈반세포(schwann cells) 기능장애 개선 또는 회복 효과를 가지는, 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 시스템에 관한 것이다.

[158] 구체적으로, SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작함으로써 SC 기능 조절 인자의 발현을 조절하거나 또는 비정상적인 슈반세포의 기능을 회복시킴으로 SC 기능 조절 인자 발현 이상 질환 또는 슈반세포 기능장애 관련 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 다양한 양태의 구성에 관한 것이다. 인위적으로 발현 및/또는 기능을 변형시킨 SC 기능 조절 인자 및 이의 제조방법, 이들을 포함하는 조성물, 및 이의 치료적 용도 등을 포함한다.

[159]

[160] 본 발명의 다른 태양은

[161] 인위적으로 발현 및/또는 기능을 변형시킨 SC 기능 조절 인자의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템에 관한 것이다.

[162] 구체적으로, 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 인자가 관여하는 수초화(myelination) 기능뿐만 아니라, 체내의 제3의 기능을 표적화하여 해당 메커니즘을 조절할 수 있다. 인위적으로 발현 및/또는 기능을 변형시킨 SC 기능 조절 인자 및 이의 제조방법, 이들을 포함하는 조성물, 및 제3의 기능과 관련된 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 이들의 치료적 용도 등을 포함한다.

[163]

[164] **[SC 기능]**

[165] 본 발명의 일 구현예는 SC 기능 조절 시스템의 개선 및 변형에 관한 것이다.

[166] "SC 기능 조절"은 SC 기능 인자, 예를 들어, PMP22 유전자의 기능에 의해 영향을 받는 슈반세포(Schwann cells), 신경교세포(glial cells) 및/또는 섬유아세포(fibroblasts)의 전반적인 기능 조절을 의미하며, 여기서 기능은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포 의 성장, 분화, 사멸에 이르기까지의 전체적인 발달 및 생장 과정을 포함하며, 또한 슈반세포의 말초신경세포의 생존, 유지 및 축삭(axon)에서 수초 형성(myelination) 등의 기능도 모두 포함한다. 또한, 상기 SC 기능 조절은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 전반적인 기능, 예를 들어, 세포의 성장, 분화, 사멸에 이르기까지의 전체적인 발달 및 생장 과정 등의 조절을 포함한다

[167] SC 기능 조절은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[168] SC 기능 조절은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행를 촉진시키는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[169] SC 기능 조절은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 분화를 촉진시키거나 억제시키는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[170] SC 기능 조절은 슈반세포, 신경교세포 및/또는 섬유아세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시키는 메커니즘, 예를 들면, apoptosis의 조절 등의 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[171] 또한, SC 기능 조절은 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해하는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[172] SC 기능 조절은 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해하는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[173] SC 기능 조절은 신경세포의 축삭(axon)의 수초 형성에 관여하는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[174] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화 또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[175] 또한, SC 기능 조절은 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 생장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[176] SC 기능 조절은 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 활성에 관여된 모든 메커니즘의 조절을 포함한다.

[177]

[178] 일 구체예에서, SC 기능 조절은 PMP22 중복에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 개선에 관여하는 것일 수 있다.

[179] 예를 들어, SC 기능 조절 인자, 예를 들면 PMP22의 발현변형(돌연변이 포함)에 따른 질병의 치료 또는 개선에 관여하는 메커니즘에 관여할 수 있다.

[180] 일 구체예에서, SC 기능 조절은 수초 형성을 조절하는 것일 수 있다.

[181] 예를 들어, SC 기능 조절 인자, 예를 들면, PMP22의 과발현은 수초를 불안정화시킴으로써 수초의 유지 및 형성을 방해하여 신경병증을 유발하는 특징을 가지므로, SC 기능 조절 인자의 발현을 조절을 통한 SC 기능 조절은 수초 형성을 조절할 수 있다.

[182] 다른 일 구체예에서, SC 기능 조절은 슈반세포의 분화를 조절하는 것일 수 있다.

[183] 예를 들어, SC 기능 조절 인자, 예를 들면, PMP22는 슈반세포의 분화시 발현이 증가하는 특징을 가지므로, SC 기능 조절 인자의 발현을 조절을 통한 SC 기능 조절은 슈반세포의 분화를 조절할 수 있다.

[184] 일 구체예에서, SC 기능 조절은 신경세포의 신호 전달을 조절하는 것일 수

있다.

[185] 예를 들어, SC 기능 조절 인자, 예를 들면, PMP22의 과발현은 수초를 불안정화시킴으로써 수초의 유지 및 형성을 방해하여 신경세포의 신호 전달, 즉, 전도 속도를 감소시키는 특징을 가지므로, C 기능 조절 인자의 발현을 조절을 통한 SC 기능 조절은 신경세포의 신호 전달을 조절할 수 있다.

[186]

[187] **[SC 기능 조절 인자]**

[188] SC 기능 조절 인자(SC function-controlling factor)

[189] 본 발명의 일 구현예는 인위적으로 조작된 또는 변형된 SC 기능 조절 인자이다.

[190] "SC 기능 조절 인자"는 SC 기능 조절에 직접적으로 참여하거나 또는 간접적으로 영향을 미치는 모든 요소를 의미한다. 이때, 요소는 DNA, RNA, 유전자, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[191] 구현예에서, 비자연적인, 즉, 인위적으로 조작된, SC 기능 조절에 관여하는 다양한 물질을 모두 포함한다. 예를 들어, 유전적으로 조작된 또는 변형된, 슈반세포에서 발현되는 유전자 또는 단백질 일 수 있다.

[192] "인위적으로 조작된"이라는 용어는 자연상태에서 일어나는 존재 그대로의 상태가 아닌 인위적으로 변형을 가한 상태를 의미한다.

[193] "유전적으로 조작된"이라는 용어는 본 발명에서 언급하는 생물 또는 비생물 유래 물질에 대하여 인위적으로 유전적 변형을 가하는 조작이 이루어진 경우를 의미하는 것으로, 예를 들어, 특정 목적 하 인위적으로 게놈을 변형시킨 유전자 및/또는 유전자 산물(폴리펩타이드, 단백질 등)일 수 있다.

[194] 바람직한 예로서, 본 발명은 특정 목적을 위해 유전적으로 조작된 또는 변형된 SC 기능 조절 인자를 제공한다.

[195] 이하 나열된 기능을 가지는 유전자 또는 단백질은 한 종류의 SC 기능 조절 관련 기능만 갖는 것이 아니라, 복수 종류의 기능이 있을 수 있다. 또한, 필요에 따라 2 이상의 SC 기능 조절 관련 기능 및 인자를 제공할 수 있다.

[196] SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[197] SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행를 촉진시킬 수 있다.

[198] SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 분화를 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[199] SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[200] SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해할 수 있다.

[201] SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해할 수 있다.

[202] SC 기능 조절 인자는 신경세포 축삭(axon)의 수초 형성을 조절할 수 있다.

[203] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화

또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[204] SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 기능장애 또는 결함에 의한 질병의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[205] 또한, SC 기능 조절 인자는 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 생장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절할 수 있다.

[206] SC 기능 조절 인자는 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 활성에 관여된 모든 메커니즘을 조절할 수 있다.

[207]

[208] 구현예에서, SC 기능 조절 인자는 PMP22일 수 있다.

[209] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 인자는 PMP22일 수 있다.

[210] PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자는 GAS3 또는 GAS-3으로도 칭해지는 단백질 PMP22를 암호화하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, PMP22 유전자는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 PMP22(e.g., NCBI Accession No. NP_000295.1, NP_001268384.1, NP_001268385.1, NP_001317072.1, NP_696996.1, NP_696997.1 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_000304.3, NM_001281455.1, NM_001281456.1, NM_001330143.1, NM_153321.2, NM_153322.2 등으로 표현되는 PMP22 유전자.

[211] PMP22(Peripheral myelin protein 22 kDa)는 myelin의 transmembrane glycoprotein 구성요소로, PMP22는 말초 신경 시스템의 myelin을 형성하는 슈반세포(Schwann cells)에서 발현되며, compact myelin의 형성 및 유지 보수에 중요한 역할을 수행한다. PMP22 유전자는 인간 염색체 17p11.2-p12에 맵핑되며, 이는 PMP22 glycoprotein의 생산을 암호화한다. PMP22 유전자 발현의 변형은 유전성 탈수초성 말초신경 병증과 관련이 있으며, myelin sheaths의 비정상적인 합성 및 기능을 야기한다. PMP22 중복(duplication)으로 인한 PMP22의 발현증가가 질병을 발생시키는 가장 가능성 있는 메카니즘이다.

[212] PMP22의 점돌연변이 또는 프레임시프트 돌연변이는 압박마비 유전신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsy, HNPP)를 유발하며, 미스센스 돌연변이의 경우 데제린 소타스병(Dejerine.Sottas syndrome, DSS) 및 선천성 저수초성 신경병증(congenital hypomyelinating neuropathy, CHN)로 불리는 CMT의 다양한 형태를 야기한다. 또한, 루시 레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS)은 PMP22 중복에 의해 야기되며, 일반적으로 CMT1A의 표현형 변이체로 간주된다.

[213]

[214] 상기 SC 기능 조절 인자는 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있다.

[215] 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의

GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있다.

[216]

[217] 본 발현의 일 구현예로서 SC 기능 조절 인자, 예를 들어, PMP22는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자일 수 있다.

[218] 임의의 구체예에서, 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자는 유전적으로 조작된 것일 수 있다.

[219] 상기 유전자 조작 또는 변형은 야생 형태(wild type) 유전자의 게놈 서열 중 일부 또는 전부 영역에 인위적으로 삽입, 결실, 치환, 역위 변이를 일으킴으로써 수득할 수 있다. 또한, 상기 유전자 조작 또는 변형은 2 이상의 유전자의 조작 또는 변형을 융합시킴으로써 수득할 수도 있다.

[220] 예를 들어, 이러한 유전자 조작 또는 변형으로 상기 유전자를 불활성화시킴으로써 이 유전자로부터 코딩되는 단백질이 본래의 기능을 갖는 단백질 형태로 발현되지 않도록 하는 것일 수 있다.

[221] 예를 들어, 이러한 유전자 조작 또는 변형으로 상기 유전자를 더욱 활성화시킴으로써 이 유전자로부터 코딩되는 단백질이 본래의 기능보다 향상된 기능을 갖는 단백질 형태로 발현되도록 하는 것일 수 있다. 일 예로, 특정 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 기능이 A인 경우, 조작된 유전자에 의해 발현되는 단백질의 기능은 A와 전혀 다르거나 또는 A를 포함하는 추가의 기능(A+B)을 함께 가질 수 있다.

[222] 예를 들어, 이러한 유전자 조작 또는 변형으로 서로 상이한 또는 서로 보완되는 기능을 가지는 2 이상의 유전자를 이용하여 2 이상의 단백질이 융합된 형태로 발현되도록 하는 것일 수 있다.

[223] 예를 들어, 이러한 유전자 조작 또는 변형으로 서로 상이한 또는 서로 보완되는 기능을 가지는 2 이상의 유전자를 이용하여 2 이상의 단백질이 세포 내에서 각각 분리된 독립적인 형태로 발현되도록 하는 것일 수 있다.

[224] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[225] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행을 촉진시킬 수 있다.

[226] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 분화를 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[227] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[228] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해할 수 있다.

[229] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해할 수 있다.

[230] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 신경세포 축삭(axon)의 수초 형성을 조절할

수 있다.

[231] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화 또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[232] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 슈반세포의 기능장애 또는 결함에 의한 질병의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[233] 또한, 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 생장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절할 수 있다.

[234] 상기 조작된 SC 기능 조절 인자는 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 활성에 관여된 모든 메커니즘을 조절할 수 있다.

[235]

[236] 상기 조작은 SC 기능 조절 인자의 구조적 또는 기능적 변형을 모두 포함한다.

[237] 상기 SC 기능 조절 인자의 구조적 변형은 자연상태의 존재하는 야생형(wildtype)과 동일하지 않는 모든 변형을 포함한다.

[238] 예를 들면, SC 기능 조절 인자가 DNA 또는 RNA 유전자인 경우,

[239] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 손실되는 것 일 수 있다.

[240] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입되는 것일 수 있다.

[241] 이때, 삽입된 뉴클레오타이드는 SC 기능 조절 인자를 포함하는 대상 또는 대상 외부에서 유입된 뉴클레오타이드 모두를 포함한다.

[242] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 치환되는 것일 수 있다.

[243] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함하는 것일 수 있다.

[244] 이때, 화학적 변형은 화학적 기능기(functional groups)의 추가, 제거 또는 치환 모두 포함한다.

[245] 또 다른 예로, SC 기능 조절 인자가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질인 경우,

[246] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 아미노산이 손실되는 것일 수 있다.

[247] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 아마노산이 삽입되는 것일 수 있다.

[248] 이때, 삽입된 아미노산은 SC 기능 조절 인자를 포함하는 대상 또는 대상 외부에서 유입된 아미노산 모두를 포함한다.

[249] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 아미노산이 치환되는 것일 수 있다.

[250] 상기 구조적 변형은 하나 이상의 아미노산의 화학적 변형을 포함하는 것일 수 있다.

[251] 이때, 화학적 변형은 화학적 기능기(functional groups)의 추가, 제거 또는 치환 모두 포함한다.

[252] 상기 구조적 변형은 다른 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 일부 또는 전체가 부착된 것일 수 있다.

[253] 이때, 다른 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 SC 기능 조절 인자일 수 있고, 또는 다른 기능을 하는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[254]

[255] 상기 SC 기능 조절 인자의 기능적 변형은 자연상태의 존재하는 야생형(wildtype)에 비해 향상된 기능 또는 저하된 기능을 가지는 모든 변형을 포함하거나, 또는 제3의 다른 기능을 가지는 모든 변형을 포함한다.

[256] 예를 들면, SC 기능 조절 인자가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질인 경우,

[257] 상기 기능적 변형은 SC 기능 조절 인자의 돌연변이일 수 있다.

[258] 이때, 돌연변이는 SC 기능 조절 인자의 기능이 향상되거나, 또는 저해되는 돌연변이일 수 있다.

[259] 상기 기능적 변형은 SC 기능 조절 인자의 기능이 추가된 된 것일 수 있다.

[260] 이때, 추가된 기능은 동일한 기능이거나 다른 기능일 수 있다. 또한, 기능이 추가된 SC 기능 조절 인자는 다른 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질과 융합된 것일 수 있다.

[261] 상기 기능적 변형은 SC 기능 조절 인자 발현 증가로 인한 기능 증가일 수 있다.

[262] 상기 기능적 변형은 SC 기능 조절 인자 발현 감소로 인한 기능 감소일 수 있다.

[263] 상기 기능적 변형은 SC 기능 조절 인자 발현 감소에 따른 기능 회복일 수 있다.

[264]

[265] 일 구체예로, SC 기능 조절 인자는 다음 중 하나 이상에 의하여 유도된 것일 수 있다:

[266] SC 기능 조절 인자, 즉, 조작 대상 유전자(이하, 표적 유전자) 전부 또는 일부 결실, 예컨대, 표적 유전자의 1bp 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지 30개, 1내지 27개, 1 내지 25개, 1 내지 23개, 1 내지 20개, 1 내지 15개, 1 내지 10개, 1내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1개의 뉴클레오타이드의 결실,

[267] 표적 유전자의 1bp 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지 30개, 1 내지 27개, 1 내지 25개, 1 내지 23개, 1 내지 20개, 1 내지 15개, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1개의 뉴클레오타이드의 야생형과 상이한 뉴클레오타이드로의 치환, 및

[268] 하나 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지 30개, 1 내지 27개, 1 내지 25개, 1 내지 23개, 1 내지 20개, 1 내지 15개, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 또는 1개의 뉴클레오타이드 (각각 독립적으로 A, T, C 및 G 중에서 선택됨)의 표적 유전자의 임의의 위치에의 삽입.

[269] 상기 표적 유전자의 변형되는 일부('표적 부위')는 상기 유전자 중의 1bp 이상, 3bp 이상, 5bp 이상, 7bp 이상, 10bp 이상, 12bp 이상, 15bp 이상,17bp 이상, 20bp 이상, 예컨대, 1bp 내지 30bp, 3bp 내지 30bp, 5bp 내지 30bp,7bp 내지 30bp, 10bp 내지 30bp, 12bp 내지 30bp, 15bp 내지 30bp, 17bp 내지 30bp, 20bp 내지 30bp, 1bp 내지 27bp, 3bp 내지 27bp, 5bp 내지 27bp, 7bp 내지 27bp, 10bp 내지 27bp, 12bp 내지 27bp, 15bp 내지 27bp, 17bp 내지 27bp, 20bp 내지 27bp, 1bp 내지 25bp, 3bp

내지 25bp, 5bp 내지 25bp, 7bp 내지 25bp, 10bp 내지 25bp, 12bp 내지 25bp, 15bp 내지 25bp, 17bp 내지 25bp, 20bp 내지 25bp, 1bp 내지 23bp, 3bp 내지 23bp, 5bp 내지 23bp, 7bp 내지 23bp, 10bp 내지 23bp, 12bp 내지 23bp, 15bp 내지 23bp, 17bp 내지 23bp, 20bp 내지 23bp, 1bp 내지 20bp, 3bp 내지 20bp, 5bp 내지 20bp, 7bp 내지 20bp, 10bp 내지 20bp, 12bp 내지 20bp, 15bp 내지 20bp, 17bp 내지 20bp, 21bp 내지 25bp, 18bp 내지 22bp, 또는 21bp 내지 23bp의 연속하는 염기서열 부위일 수 있다.

[270]

[271] 한편, 본 발명의 다른 구현예는

[272] 상기 설명한 인위적으로 기능을 변형시킨 SC 기능 조절 인자들의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템에 관한 것이다.

[273] 일 구체예로서, PMP22의 제3의 체내 메커니즘의 조절에 관여할 수 있다.

[274] 상당수의 연구를 통해 종양세포에서 PMP22의 발현이 증가됨을 확인되었고, 이는 다양한 암 질환에서 PMP22의 발현이 종양세포의 증식 관련 메커니즘에 영향을 미치는 것임을 의미하므로, 인위적으로 조작된 PMP22는, 예를 들어, PMP22의 발현 저해 또는 불활성화 조작으로 각종 종양(예를 들어, 유방암, 위암, 췌장암 등)의 세포증식을 억제하거나 저해시킬 수 있다. 또는 인위적으로 조작된 PMP22에 의한 각종 암 질환의 진행 또는 전이를 억제 또는 저해하거나 암 질환의 개선 또는 치료 효과를 제공할 수 있다.

[275]

[276] 이처럼, 인위적으로 조작한 본 발명의 예시적 인자들은 SC 기능 조절뿐만 아니라, 체내의 제3의 기능을 표적화하여 해당 메커니즘을 조절할 수 있다. 본 발명의 구현예는 인위적으로 기능을 변형시킨 이러한 SC 기능 조절 인자 및 이의 제조방법, 이들을 포함하는 조성물, 및 제3의 기능과 관련된 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 이들의 치료적 용도 등을 포함한다.

[277]

[278] **[SC 기능 조절 시스템]**

[279] 본 발명의 일 구현예는 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작하여 SC 기능을 조절하는 SC 기능 조절 시스템이다.

[280] 본 발명의 "SC 기능 조절 시스템(system)"은 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자의 발현 변경 및/또는 기능 변경에 의한 SC 기능의 촉진, 증가, 저해, 억제 및/또는 정상기능 회복에 영향을 끼치는 모든 현상을 포함하는 용어로, 이러한 SC 기능 조절 시스템에 직접적으로 또는 간접적으로 관여하는 모든 물질, 조성물, 방법 및 용도를 포함한다.

[281] 이러한 SC 기능 조절 시스템을 구성하는 각 요소들을 통칭하여 "SC 기능 조절 요소(SC function-controlling elements)"로 말하기도 한다.

[282]

[283] 또한, SC 기능 조절 시스템은 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작하여 발현

변형 및/또는 기능 변형하는 SC 기능 조절 인자 변형 시스템을 포함한다.

[284] "SC 기능 조절 인자 변형 시스템"은 대상체의 게놈 내 존재하는 또는 외부에서 도입된 SC 기능 조절 인자의 전사, 전사된 유전정보(예를 들어, mRNA)로 부터 단백질로 발현되는 전반적인 SC 기능 조절 인자의 발현을 변형, 즉, 발현 감소, 발현 증가, 발현 유지 등의 과정 및 이의 결과물을 통칭하여 의미한다.

[285] 또한, SC 기능 조절 인자의 돌연변이에 의한 정상적인 SC 기능 조절 인자의 발현 및/또는 기능 방해, 또는 SC 기능 조절 인자의 돌연변이 발현 등의 정상적인 SC 기능 조절 인자, 비정상적 SC 기능 조절 인자 및 인위적으로 변형된 SC 기능 조절 인자의 발현의 전반적인 과정 및 이의 결과물도 포함한다.

[286]

[287] 일 구현예로서, 본 발명의 시스템은 SC 기능 조절 요소(SC function-controlling elements)로서, SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22 변형 시스템을 포함하며, 이때 SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자를 포함한다.

[288] "PMP22 변형 시스템"은 대상체의 게놈 내 존재하는 또는 외부에서 도입된 PMP22 유전자의 전사, 전사된 유전정보(예를 들어, mRNA)로 부터 단백질로 발현되는 전반적인 PMP22의 발현을 조절, 즉, 발현 감소, 발현 증가, 발현 유지 등의 과정 및 이의 결과물을 통칭하여 의미한다.

[289] 또한, PMP22의 돌연변이에 의한 정상적인 PMP22의 발현 및/또는 기능 방해 또는 PMP22 돌연변이의 발현 등의 정상적인 PMP22, 비정상적 PMP22 및 인위적으로 변형된 PMP22의 발현의 전반적인 과정 및 이의 결과물도 포함한다.

[290] PMP22 변형 시스템에서, 인위적으로 조작된 PMP22에 의해서,

[291] 임의의 구체예에서, PMP22의 발현이 증가 또는 촉진될 수 있다.

[292] 임의의 구체예에서, PMP22의 발현이 저해 또는 억제될 수 있다.

[293] 예를 들어, PMP22 유전자가 중복(duplication)되어 과발현(overexpression)하는 경우, 인위적으로 조작된 PMP22에 의해서 발현이 저해되거나 정상적인 발현 수준으로 감소할 수 있다.

[294] 임의의 구체예에서, PMP22의 기능이 향상 또는 촉진될 수 있다.

[295] 임의의 구체예에서, PMP22의 기능이 저하 또는 억제될 수 있다.

[296]

[297] 또한, PMP22 변형 시스템에서, 인위적으로 조작된 PMP22에 의해서,

[298] 임의의 구체예에서, 슈반세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[299] 임의의 구체예에서, 슈반세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행를 촉진시킬 수 있다.

[300] 임의의 구체예에서, 슈반세포의 분화를 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[301] 임의의 구체예에서, 슈반세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[302] 임의의 구체예에서, 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해할 수 있다.

[303] 임의의 구체예에서, 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해할 수

있다.

[304] 임의의 구체예에서, 신경세포 축삭(axon)의 수초 형성을 조절할 수 있다.

[305] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화 또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[306] 임의의 구체예에서, 슈반세포의 기능장애 또는 결함에 의한 질병의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[307] 임의의 구체예에서, 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 생장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절할 수 있다.

[308] 임의의 구체예에서, 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 활성에 관여된 모든 메커니즘을 조절할 수 있다.

[309] 임의의 구체예에서, PMP22가 관여하는 체내의 제3의 기능을 표적화하여 해당 메커니즘을 조절할 수 있다.

[310]

[311] 구현예에서, 본 발명의 SC 기능 조절 시스템은 SC 기능 조절 요소(SC function-controlling elements)로서, SC 기능 조절 인자 조작용 조성물을 포함한다.

[312] 구현예에서, 본 발명의 SC 기능 조절 인자 변형 시스템은 SC 기능 조절 인자 조작용 조성물을 포함한다.

[313] 상기 조작용 조성물은 인위적으로 SC 기능 조절 인자를 조작할 수 있는 조성물로, 바람직하게는 유전자 조작을 위한 조성물일 수 있다.

[314] 이하, 상기 유전자 조작을 위한 조성물에 대해 기술한다.

[315]

[316] [SC 기능 조절 인자 조작용 조성물]

[317] 본 발명의 SC 기능 조절 인자 및 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)에 관여하는 물질의 조작 또는 변형은, 바람직하게는 유전자 조작을 통해 이루어질 수 있다.

[318]

[319] 일 양태에서, SC 기능 조절 인자의 조절 영역(regulatory region), 비 암호 영역 또는 암호 영역의 일부 또는 전부를 표적하여 유전자 조작하는 조성물 및 방법을 제공할 수 있다.

[320]

[321] 상기 조성물 및 방법은

[322] 구현예에서, 목적하는 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)의 형성을 위해, 이에 관여하는 SC 기능 조절 유전자 중 하나 이상을 조작하거나 변형시킬 수 있다. 이는 유전자를 구성하는 핵산의 변형을 통해 이루어질 수 있다. 조작 결과로서, 넉다운(knock down), 넉아웃(knock out), 넉인(knock in) 형태를 모두 포함한다.

[323] 구현예에서, 조절 영역(regulatory region). 비 암호 영역 또는 암호 영역의 일부 또는 전부를 타겟으로 할 수 있다.

[324] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 유전자를 구성하는 핵산서열 중 조절 영역(regulatory region)을 조작 타겟으로 할 수 있다.

[325] 예를 들어, 프록시말 프로모터(proximal promoter), 인핸서(enhancer), TATA box, 이니시에이터(initiator)의 조절요소(regulatory element) 등의 일부 또는 전부 서열을 타겟으로 할 수 있다. 구체적인 예로서 Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site, Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box의 일부 또는 전부 서열을 타겟으로 할 수 있다.

[326] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 유전자를 구성하는 핵산서열 중 인핸서 부위(예를 들어, EGR2-, SOX10- 또는 TEAD1-결합 부위) 또는 원거리 인핸서 부위(distal Enhancer region)를 타겟으로 할 수 있다.

[327] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 유전자를 구성하는 핵산서열 중 전사서열 영역(coding region)을 조작 타겟으로 할 수 있다.

[328] 예를 들어 인트론 또는 엑손 서열을 타겟으로 할 수 있다. 또한, 암호 서열, 예를 들어 암호 영역, 초기 암호 영역은 발현의 변경 및 넉아웃을 위해 표적화될 수 있다.

[329] 구현예에서, 핵산 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지 30bp, 1 내지 27bp, 1 내지 25bp, 1 내지 23bp, 1 내지 20bp, 1 내지 15bp, 1 내지 10bp, 1 내지 5bp, 1 내지 3bp, 또는 1bp의 뉴클레오타이드의 치환, 결실, 및/또는 삽입일 수 있다.

[330] 구현예에서, SC 기능 조절 유전자 중 하나 이상을 넉아웃하기 위해, 또는 하나 이상의 발현을 제거하기 위해, 또는 하나 이상의 1 개, 2 개 또는 3 개의 대립유전자를 넉아웃하기 위해, SC 기능 조절 유전자 중 하나 이상에서의 결실 또는 돌연변이를 포함하도록 표적화될 수 있다.

[331] 구현예에서, 유전자 넉다운은 원치않는 대립유전자 또는 전사체의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[332] 구현예에서, 조절 영역(regulatory region). 비 암호 영역 또는 암호 영역의 일부 또는 전부를 표적화함으로써 슈반세포의 기능에 영향을 미치는 SC 기능 조절 유전자를 변경하기 위해 사용될 수 있다.

[333] 구현예에서, 상기 유전자 핵산 변경을 통해 SC 기능 조절 유전자의 활성 조절, 예컨대, 활성화 또는 불활성화를 야기할 수 있다. 또한, 이를 통해 슈반세포의 기능의 활성화 또는 불활성화를 야기할 수 있다.

[334] 구현예에서, 상기 유전자 핵산 변형은 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의하여 표적된 유전자 내의 특정 부위의 단일가닥 또는 이중가닥 절단(cleavage), 즉 핵산 가닥 손상을 촉매화하여 표적된 유전자를 불활성화시키는 것일 수 있다.

[335] 구현예에서, 핵산 가닥 손상(breaks)은 상동(homologous) 재조합(recombination)

또는 비상동 말단 연결 (nonhomologous end joining; NHEJ) 등의 메커니즘들을 통하여 수선될 수 있다.

[336] 이 경우, NHEJ 메커니즘이 일어나면, 절단 위치(cleavage site)에서 DNA 서열에 변화가 유발되고, 이에 의하여 유전자가 불활성화될 수 있다. NHEJ을 통한 수선은 짧은 유전자 단편의 치환들, 삽입들 또는 결실을 야기하고, 해당 유전자 넉아웃(knockouts) 또는 넉다운(knockdown)의 유도에 사용될 수 있다. 또한, 이러한 SC 기능 조절 유전자의 넉아웃(knockouts) 또는 넉다운(knockdown)의 유도에 의해 슈반세포의 기능 및/또는 이의 작용 메커니즘에 영향을 끼칠 수 있다.

[337]

[338] 다른 양태에서, 본 발명은 SC 기능 조절 인자 조작용 조성물을 제공한다.

[339] 상기 조작용 조성물은 인위적으로 SC 기능 조절 인자를 조작할 수 있는 조성물로, 바람직하게는 유전자 조작을 위한 조성물일 수 있다.

[340] 상기 조성물은 목적하는 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)의 형성을 위해, 이에 관여하는 SC 기능 조절 인자 중 하나 이상을 유전자 조작할 수 있다.

[341] 상기 유전자 조작은 유전자 발현 조절 과정을 고려하여 이루어질 수 있다.

[342]

[343] 구현예에서, 전사조절, RNA 가공 조절, RNA 수송 조절, RNA 분해 조절, 번역 조절 또는 단백질 변형 조절 단계에서 각 단계에 적합한 조작수단을 선택하여 이루어질 수 있다.

[344] 구현예에서, RNAi (RNA 간섭 or RNA silencing)을 이용하여, small RNA(sRNA)가 mRNA를 방해하거나 안정성을 저하시키며, 경우에 따라서는 파괴하여 단백질 합성정보가 중간에서 전달되지 못하게 함으로써 유전정보의 발현을 제어할 수 있다.

[345] 상기 유전자 조작은 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산의 변형을 통해 이루어질 수 있다. 조작 결과로, 넉다운(knock down), 넉아웃(knockout), 넉인(knockin) 형태를 모두 포함한다.

[346] 임의의 구체예에서, 핵산 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지 30bp, 1 내지 27bp, 1 내지 25bp, 1 내지 23bp, 1 내지 20bp, 1 내지 15bp, 1 내지 10bp, 1 내지 5bp, 1 내지 3bp, 또는 1bp의 뉴클레오타이드의 치환, 결실, 및/또는 삽입일 수 있다.

[347] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 인자 중 하나 이상을 넉아웃하기 위해, 또는 하나 이상의 발현을 제거하기 위해, 또는 하나 이상의 1 개, 2 개 또는 3 개의 대립유전자를 넉아웃하기 위해, SC 기능 조절 인자 중 하나 이상에서의 결실 또는 돌연변이를 포함하도록 조작할 수 있다.

[348] 임의의 구체예에서, SC 기능 조절 인자의 넉다운은 원치 않는 대립유전자 또는 전사체의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[349] 임의의 구체예에서, 핵산 변형은 하나 이상의 핵산 절편(fragmant) 또는 유전자의 삽입일 수 있다. 이때, 핵산 절편은 하나 이상의 뉴클레오타이드로 이루어진 핵산 서열로, 핵산 절편의 길이는 1 내지 40bp, 1 내지 50bp, 1 내지 60bp, 1 내지 70bp, 1 내지 80bp, 1 내지 90bp, 1 내지 100bp, 1 내지 500bp 또는 1 내지 1000bp일 수 있다. 이때, 삽입되는 유전자는 SC 기능 조절 인자 중 하나이거나, 다른 기능을 하는 유전자일 수 있다.

[350]

[351] 구현예에서, 핵산 변형은 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내 핵산들 사이의 결합들(bonds)의 가수분해(절단(cleavage))을 촉매화할 수 있는 야생형 또는 변종(variant) 효소를 이용할 수 있다. 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 이용할 수 있다.

[352] 예를 들어, 메가뉴클레아제(meganuclease), 징크핑거(Zinc finger) 뉴클레아제, CRISPR/Cas9(Cas9 단백질), CRISPR-Cpf1(Cpf1 단백질) 및 TALE-뉴클레아제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 뉴클레아제를 이용하여 유전자를 조작하여 유전정보의 발현을 제어할 수 있다.

[353] 임의의 구체예에서, 비제한적으로, 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 이용하여, 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 비-상동성 말단 결합(nonhomologous end joining:NHEJ) 또는 상동성 재조합 복구(homology-directed repair:HDR)에 의해 매개될 수 있다.

[354] 이 경우, NHEJ 메커니즘이 일어나면, 절단 위치(cleavage site)에서 DNA 서열에 변화가 유발되고, 이에 의하여 유전자의 불활성화 또는 발현 저해가 발생할 수 있다. NHEJ을 통한 수선은 짧은 유전자 단편의 치환들, 삽입들 또는 결실을 야기하고, 해당 유전자 넉아웃(knockout) 또는 넉다운(knockdown)의 유도에 사용될 수 있다.

[355]

[356] 다른 양태에서, 본 발명은 상기 유전자 조작 위치를 제공할 수 있다.

[357] 구현예에서, NHEJ-매개 변경에 의해 변경된다면, SC 기능 조절 유전자 산물의 발현의 감소 또는 제거를 야기하는 상기 유전자 내의 위치를 지칭한다.

[358] 예를 들어,

[359] 초기 암호 영역에 있을 수 있다.

[360] 프로모터 서열에 있을 수 있다.

[361] 인핸서 서열에 있을 수 있다.

[362] 특정 인트론 서열에 있을 수 있다.

[363] 특정 엑손 서열에 있을 수 있다.

[364]

[365] 일 구체예로서, SC 기능 조절 인자 조작용 조성물은

[366] 그 조작 대상으로서, 슈반세포의 기능에 영향을 미치는 SC 기능 조절인자인 PMP22 유전자를 대상으로 할 수 있다.

[367] 상기 PMP22 유전자의 표적 부위, 즉, 유전자 조작이 발생하거나 유전자 조작을 위해 인지되는 부위에 대한 표적 서열의 일 예들을 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 정리하였다.

[368] 표적 서열은 하나 이상의 유전자를 표적할 수 있다.

[369] 표적 서열은 둘 이상의 유전자를 동시에 표적할 수 있다. 이때, 둘 이상의 유전자는 동종 유전자이거나 이종 유전자 일 수 있다.

[370] 유전자는 하나 이상의 표적 서열을 포함할 수 있다.

[371] 유전자는 둘 이상의 표적 서열로 동시에 표적할 수 있다.

[372] 유전자는 표적 서열의 개 수에 따라 유전자 조작 위치와 수가 변할 수 있다.

[373] 유전자 조작은 표적 서열의 개수와 위치에 따라 다양하게 설계할 수 있다.

[374] 유전자 조작은 둘 이상의 표적 서열에서 동시에 발생할 수 있다. 이때, 둘 이상의 표적 서열은 동종 유전자 또는 이종 유전자 내에 존재할 수 있다.

[375] 유전자 조작은 둘 이상의 유전자를 동시에 발생할 수 있다. 이때, 둘 이상의 유전자는 동종 유전자이거나 이종 유전자 일 수 있다.

[376]

[377] 이하, 본 발명의 일 구체예에서 사용할 수 있는 표적 서열들의 일 예들을 표로 나타낸다:

[378] 표 1. PMP22 유전자의 암호화 서열에 대한 SpCas9을 위한 표적 서열

[379] 표 2. PMP22 유전자의 암호화 서열에 대한 CjCas9을 위한 표적 서열

[380] 표 3. PMP22 유전자의 프로모터 서열에 대한 SpCas9을 위한 표적 서열

[381] 표 4. PMP22 유전자의 프로모터 서열에 대한 CjCas9을 위한 표적 서열

[382] 표 5. PMP22 유전자의 인핸서 서열에 대한 SpCas9을 위한 표적 서열

[383] 표 6. PMP22 유전자의 인핸서 서열에 대한 CjCas9을 위한 표적 서열

[384] 표 7. PMP22 유전자의 원거리 인핸서 부위(distal Enhancer region) B 및 C에 대한 SpCas9을 위한 표적 서열

[385]

[386] [표1]

Gene	No.	Exon	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	2	CGATGATACTCAGCAACAGG (서열번호 1)	sgRNA_CDS_Sp #1
PMP22	2	2	GGACGATGATACTCAGCAAC (서열번호 2)	sgRNA_CDS_Sp #2
PMP22	3	3	ATGGACACGCAACTGATCTC (서열번호 3)	sgRNA_CDS_Sp #3
PMP22	4	4	GATGATCGACAGGATCATGG (서열번호 4)	sgRNA_CDS_Sp #4
PMP22	5	4	GAAGATGATCGACAGGATCA (서열번호 5)	sgRNA_CDS_Sp #5
PMP22	6	4	AACTCTTCACCCTCACCAAG (서열번호 6)	sgRNA_CDS_Sp #6
PMP22	7	4	AAAACCTGCCCCCCTTGGTG (서열번호 7)	sgRNA_CDS_Sp #7
PMP22	8	4	GGAATCTTCCAAATTCTTGC (서열번호 8)	sgRNA_CDS_Sp #8

[387]

[388] [표2]

Gene	No.	Exon	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	2	GATCGTGGAGACGAACAGCAGC (서열번호 9)	sgRNA_CDS_Cj# 1
PMP22	2	2	GCTGACGATCGTGGAGACGAAC (서열번호 10)	sgRNA_CDS_Cj# 2
PMP22	3	3	CGCAACTGATCTCTGGCAGAAC (서열번호 11)	sgRNA_CDS_Cj# 3
PMP22	4	4	GTGCGTGATGAGTGCTGCGGCC (서열번호 12)	sgRNA_CDS_Cj# 4
PMP22	5	4	GTGTAGATGGCCGCAGCACTCA (서열번호 13)	sgRNA_CDS_Cj# 5

[389]

[390] [표3]

Gene	No.	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	GGACCAGCCCCTGAATAAAC (서열번호 14)	sgRNA_TATA_Sp#1
PMP22	2	GGCGTCTTTCCAGTTTATTC (서열번호 15)	sgRNA_TATA_Sp#2
PMP22	3	GCGTCTTTCCAGTTTATTCA (서열번호 16)	sgRNA_TATA_Sp#3
PMP22	4	CGTCTTTCCAGTTTATTCAG (서열번호 17)	sgRNA_TATA_Sp#4
PMP22	5	TTCAGGGGCTGGTCCAATGC (서열번호 18)	sgRNA_TATA_Sp#5
PMP22	6	TCAGGGGCTGGTCCAATGCT (서열번호 19)	sgRNA_TATA_Sp#6
PMP22	7	ACCATGACATATCCCAGCAT (서열번호 20)	sgRNA_TATA_Sp#7
PMP22	8	TTTCCAGTTTATTCAGGGGC (서열번호 21)	sgRNA_TATA_Sp#8
PMP22	9	CAGTTACAGGGAGCACCACC (서열번호 22)	sgRNA_TATA_Sp#9
PMP22	10	CTGGTCTGGCTTCAGTTACA (서열번호 23)	sgRNA_TATA_Sp#10
PMP22	11	CCTGGTCTGGCTTCAGTTAC (서열번호 24)	sgRNA_TATA_Sp#11
PMP22	12	AACTGGAAAGACGCCTGGTC (서열번호 25)	sgRNA_TATA_Sp#12
PMP22	13	GAATAAACTGGAAAGACGCC (서열번호 26)	sgRNA_TATA_Sp#13
PMP22	14	TCCAATGCTGGGATATGTCA (서열번호 27)	sgRNA_TATA_Sp#14
PMP22	15	AATGCTGGGATATGTCATGG (서열번호 28)	sgRNA_TATA_Sp#15
PMP22	16	ATAGAGGCTGAGAACCTCTC (서열번호 29)	sgRNA_TATA_Sp#16

[391]

[392] [표4]

Gene	No.	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	GCCCTCTGAATCTCCAGTCAAT (서열번호 30)	sgRNA_TATA_Cj#1
PMP22	2	AATCTCCAGTCAATTCCAACAC (서열번호 31)	sgRNA_TATA_Cj#2
PMP22	3	AATTAGGCAATTCTTGTAAAGC (서열번호 32)	sgRNA_TATA_Cj#3
PMP22	4	TTAGGCAATTCTTGTAAAGCAT (서열번호 33)	sgRNA_TATA_Cj#4
PMP22	5	AAAGCATAGGCACACATCACCC (서열번호 34)	sgRNA_TATA_Cj#5
PMP22	6	GCCTGGTCTGGCTTCAGTTACA (서열번호 35)	sgRNA_TATA_Cj#6
PMP22	7	GTGTCCAACTTTGTTTGCTTTC (서열번호 36)	sgRNA_TATA_Cj#7
PMP22	8	GTATTCTGGAAAGCAAACAAAG (서열번호 37)	sgRNA_TATA_Cj#8
PMP22	9	CAGTCTTGGCATCACAGGCTTC (서열번호 38)	sgRNA_TATA_Cj#9
PMP22	10	GGACCTCTTGGCTATTACACAG (서열번호 39)	sgRNA_TATA_Cj#10
PMP22	11	GGAGCCAGTGGGACCTCTTGGC (서열번호 40)	sgRNA_TATA_Cj#11

[393]

[394] [표5]

Gene	No.	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	TTGGGCATGTTTGAGCTGGT (서열번호 41)	sgRNA_Enh_Sp#1
PMP22	2	TTTGGGCATGTTTGAGCTGG (서열번호 42)	sgRNA_Enh_Sp#2
PMP22	3	GAGCTGGTGGGCGAAGCATA (서열번호 43)	sgRNA_Enh_Sp#3
PMP22	4	AGCTGGTGGGCGAAGCATAT (서열번호 44)	sgRNA_Enh_Sp#4
PMP22	5	TGGGCGAAGCATATGGGCAA (서열번호 45)	sgRNA_Enh_Sp#5
PMP22	6	GGCCTCCATCCTAAACAATG (서열번호 46)	sgRNA_Enh_Sp#6
PMP22	7	GGGTTGGGAGGTTTGGGCGT (서열번호 47)	sgRNA_Enh_Sp#10
PMP22	8	AGGTTTGGGCGTGGGAGTCC (서열번호 48)	sgRNA_Enh_Sp#11
PMP22	9	TTCAGAGACTCAGCTATTT (서열번호 49)	sgRNA_Enh_Sp#12
PMP22	10	GGCCACATTGTTTAGGATG (서열번호 50)	sgRNA_Enh_Sp#13
PMP22	11	GGCTTTGGGCATGTTTGAG (서열번호 51)	sgRNA_Enh_Sp#14
PMP22	12	AACATGCCCAAAGCCCAGC (서열번호 52)	sgRNA_Enh_Sp#15
PMP22	13	ACATGCCCAAAGCCCAGCG (서열번호 53)	sgRNA_Enh_Sp#16

[395]

[396] [표6]

Gene	No.	Target sequence(5' to 3')	sgRNAs
PMP22	1	TTAAATCACAGAGGCAAAGAGTT (서열번호 54)	sgRNA_Enh_Cj#1
PMP22	2	TTGCATAGTGCTAGACTGTTTT (서열번호 55)	sgRNA_Enh_Cj#2
PMP22	3	GGGTCATGTGTTTTGAAAACAG (서열번호 56)	sgRNA_Enh_Cj#3
PMP22	4	CCCAAACCTCCCAACCCACAAC (서열번호 57)	sgRNA_Enh_Cj#4
PMP22	5	ACTCAGCTATTTCTGGAATGAC (서열번호 58)	sgRNA_Enh_Cj#5
PMP22	6	TCATCGCCTTTGTGAGCTCCAT (서열번호 59)	sgRNA_Enh_Cj#6
PMP22	7	CAGACACAGGCTTTGCTCTAGC (서열번호 60)	sgRNA_Enh_Cj#7
PMP22	8	CAAAGCCTGTGTCTGGCCACTA (서열번호 61)	sgRNA_Enh_Cj#8
PMP22	9	AGCAGTTTGTGCCCACTAGTGG (서열번호 62)	sgRNA_Enh_Cj#9
PMP22	10	ATGTCAAGGTATTCCAGCTAAC (서열번호 63)	sgRNA_Enh_Cj#10
PMP22	11	GAATAACTGTATCAAAGTTAGC (서열번호 64)	sgRNA_Enh_Cj#11
PMP22	12	TTCCTAATTAAGAGGCTTTGTG (서열번호 65)	sgRNA_Enh_Cj#12
PMP22	13	GAGCTAGTTTGTCAGGGTCTAG (서열번호 66)	sgRNA_Enh_Cj#13

[397]

[398] [표7]

Gene	No.	Target sequence(5' to 3') with PAM	sgRNAs
PMP22	1	TATGGAATTCCCAAGCCCCCTGG (서열번호 143)	sgRNA_DEnhB_Sp#1
PMP22	2	GGAATTCCATATGAGTCATCTGG (서열번호 144)	sgRNA_DEnhB_Sp#2
PMP22	3	CACAGCCTACACTTTGATTATGG (서열번호 145)	sgRNA_DEnhB_Sp#3
PMP22	4	TCAGGAGCATTAAGCATATAGGG (서열번호 146)	sgRNA_DEnhB_Sp#4
PMP22	5	GACCACGGTCCATGAATTCCTGG (서열번호 147)	sgRNA_DEnhC_Sp#1
PMP22	6	AGTATTTGCAGCTGAACAAAAGG (서열번호 148)	sgRNA_DEnhC_Sp#2
PMP22	7	ATGGAGTACAGAGAGACATAAGG (서열번호 149)	sgRNA_DEnhC_Sp#3
PMP22	8	AAAGAATCAATGCACAGCCATGG (서열번호 150)	sgRNA_DEnhC_Sp#4

[399]

[400]

[401] **[조작용 조성물-유전자 가위 시스템]**

[402] 본 발명의 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)은 SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22를 조작하기 위한 조작용 조성물로서, 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[403]

[404] 가이드핵산-에디터단백질 복합체

[405] "가이드핵산-에디터단백질 복합체"는 가이드핵산과 에디터단백질의 상호작용을 통해 형성된 복합체를 의미하며, 핵산-단백질 복합체는 가이드핵산과 에디터단백질을 포함한다.

[406] 상기 "가이드핵산"은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 인식할 수 있는 핵산을 의미한다.

[407] 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 DNA/RNA 혼합의 형태일 수 있고, 5 내지 150개의 핵산서열을 가질 수 있다.

[408] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다.

[409] 상기 도메인은 가이드 도메인, 제 1 상보적 도메인, 연결 도메인, 제 2 상보적

도메인, 근위 도메인, 꼬리 도메인 등 일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[410] 상기 가이드핵산은 두 개 이상의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 동일한 도메인을 반복적으로 포함하거나, 서로 다른 도메인을 포함할 수 있다.

[411] 상기 가이드핵산은 하나의 연속된 핵산서열일 수 있다.

[412] 예를 들어, 하나의 연속된 핵산 서열은 $(N)_m$일 수 있고, 이때 N은 A, T, C 또는 G, 또는 A, U, C 또는 G이며, m은 1 내지 150의 정수를 의미한다.

[413] 상기 가이드핵산은 연속된 핵산서열이 두 개 이상일 수 있다.

[414] 예를 들어, 두 개 이상의 연속된 핵산서열은 $(N)_m$과 $(N)_o$ 일 수 있고, 이때 N은 A, T, C 또는 G, 또는 A, U, C 또는 G이며, m 및 o는 1 내지 150의 정수를 의미하며, m과 o는 서로 같거나 다를 수 있다.

[415]

[416] 상기 "에디터단백질"은 핵산과 직접적으로 결합하거나, 또는 직접 결합하지는 않지만 상호작용할 수 있는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미한다.

[417] 상기 에디터단백질은 효소일 수 있다.

[418] 상기 에디터단백질은 융합 단백질일 수 있다.

[419] 이때, 상기 "융합 단백질"은 효소 및 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 융합하여 생성한 단백질을 의미한다.

[420] 상기 "효소"는 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 절단할 수 있는 도메인을 포함하는 단백질을 의미한다.

[421] 상기 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 상기 효소와 동일하거나 다른 기능을 가지는 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[422] 상기 융합 단백질은 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 효소의 중간부; 또는 이들 조합의 하나 이상에 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[423] 상기 융합 단백질은 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 효소의 중간부; 또는 이들 조합의 하나 이상에 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[424]

[425] 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 대상을 변형시킬 수 있다.

[426] 상기 대상은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질일 수 있다.

[427] 예를 들어, 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 최종적으로 대상하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 할 수 있도록 하거나, 또는 단백질을 제거 또는 새로운 단백질을 발현할 수 있도록 한다.

[428] 이때, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 DNA, RNA, 유전자 또는 염색체 수준에서 작용할 수 있다.

[429] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 유전자의 전사와 번역의 단계에서 작용할 수 있다.

[430] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 단백질 수준에서 작용할 수 있다.

[431]

[432] **1. 가이드핵산**

[433] 가이드핵산은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 인식할 수 있는 핵산으로, 가이드핵산-단백질 복합체를 형성한다.

[434] 이때, 가이드핵산은 가이드핵산-단백질 복합체가 표적하는 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 인식 또는 표적하도록 역할한다.

[435] 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 DNA/RNA 혼합의 형태일 수 있고, 5 내지 150개의 핵산서열을 가질 수 있다.

[436] 상기 가이드핵산은 선형 또는 원형일 수 있다.

[437] 상기 가이드핵산은 하나의 연속된 핵산서열일 수 있다.

[438] 예를 들어, 하나의 연속된 핵산 서열은 $(N)_m$ 일 수 있고, 이때 N은 A, T, C 또는 G, 또는 A, U, C 또는 G이며, m은 1 내지 150의 정수를 의미한다.

[439] 상기 가이드핵산은 연속된 핵산서열이 두 개 이상일 수 있다.

[440] 예를 들어, 두 개 이상의 연속된 핵산서열은 $(N)_m$과 $(N)_o$일 수 있고, 이때 N은 A, T, C 또는 G, 또는 A, U, C 또는 G이며, m 및 o는 1 내지 150의 정수를 의미하며, m과 o는 서로 같거나 다를 수 있다.

[441] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다.

[442] 이때, 상기 도메인은 가이드 도메인, 제 1 상보적 도메인, 연결 도메인, 제 2 상보적 도메인, 근위 도메인, 꼬리 도메인 등 일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[443] 상기 가이드핵산은 두 개 이상의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 동일한 도메인을 반복적으로 포함하거나, 서로 다른 도메인을 포함할 수 있다.

[444] 상기 도메인에 대한 설명은 하단에 기술한다.

[445]

[446] **i) 가이드 도메인**

[447] "가이드 도메인"은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 가이드 서열이 포함된 도메인으로, 표적 유전자 또는 핵산과의 특이적인 상호작용을 위해 역할한다.

[448] 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산서열로, 예를 들어 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[449] 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[450] 일 예로, 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열, 10 내지 50개의 염기서열, 15 내지 50개의 염기서열, 20 내지 50개의 염기서열, 25 내지 50개의 염기서열, 30 내지 50개의 염기서열, 35 내지 50개의 염기서열, 40 내지 50개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[451] 다른 일 예로, 상기 가이드 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의

염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[452] 상기 가이드 도메인은 가이드 서열을 포함할 수 있다.

[453] 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 염기서열일 수 있다.

[454] 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[455] 상기 가이드 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[456] 일 예로, 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열, 10 내지 50개의 염기서열, 15 내지 50개의 염기서열, 20 내지 50개의 염기서열, 25 내지 50개의 염기서열, 30 내지 50개의 염기서열, 35 내지 50개의 염기서열, 40 내지 50개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[457] 다른 일 예로, 상기 가이드 서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[458] 또한, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열 및 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[459] 상기 추가 염기서열은 가이드 도메인의 기능 향상 또는 저하를 위한 것일 수 있다.

[460] 상기 추가 염기서열은 가이드 서열의 기능 향상 또는 저하를 위한 것일 수 있다.

[461] 상기 추가 염기서열은 1 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[462] 일 예로, 상기 추가 염기서열은 5 내지 35개의 염기서열, 10 내지 35개의 염기서열, 15 내지 35개의 염기서열, 20 내지 35개의 염기서열, 25 내지 35개의 염기서열 또는 30 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[463] 다른 일 예로, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열 또는 30 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[464] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 서열의 5' 말단에 위치할 수 있다.

[465] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[466]

[467] **ii) 제 1 상보적 도메인**

[468] "제 1 상보적 도메인"은 제 2 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하는 핵산 서열로, 제 2 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 상보성을 가진다.

[469] 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[470] 일 예로, 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열, 10 내지 35개의

염기서열, 15 내지 35개의 염기서열, 20 내지 35개의 염기서열, 25 내지 35개의 염기서열 또는 30 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[471] 다른 일 예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열 또는 30 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[472]

[473] **iii) 연결 도메인**

[474] "연결 도메인"은 두 개 이상의 도메인을 연결하는 핵산 서열로, 연결 도메인은 동일한 또는 서로 다른 두 개 이상의 도메인을 연결한다. 연결 도메인은 두 개 이상의 도메인과 공유결합 또는 비공유결합을 할 수 있고, 또는 두 개 이상의 도메인을 공유적 또는 비공유적으로 연결할 수 있다.

[475] 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열일 수 있다.

[476] 일 예로서, 상기 연결 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열일 수 있다.

[477] 다른 일 예로서, 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열, 5 내지 30개의 염기서열, 10 내지 30개의 염기서열, 15 내지 30개의 염기서열, 20 내지 30개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열일 수 있다.

[478]

[479] **iv) 제 2 상보적 도메인**

[480] "제 2 상보적 도메인"은 제 1 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하는 핵산서열로, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 상보성을 가진다.

[481] 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 염기서열 및 제 1 상보적 도메인과의 상보성이 없는 염기서열, 예를 들어, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하지 않는 염기서열을 포함할 수 있으며, 제 1 상보적 도메인보다 염기서열의 길이가 길 수 있다.

[482] 상기 제 2 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[483] 일 예로, 상기 제 2 상보적 도메인은 1 내지 35개의 염기서열, 5 내지 35개의 염기서열, 10 내지 35개의 염기서열, 15 내지 35개의 염기서열, 20 내지 35개의 염기서열, 25 내지 35개의 염기서열 또는 30 내지 35 염기서열일 수 있다.

[484] 다른 일 예로, 상기 제 2 상보적 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열 또는 30 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[485]

[486] **v) 근위 도메인(proximal domain)**

[487] "근위 도메인"은 제 2 상보적 도메인에 근접하게 위치하는 핵산서열이다.

[488] 근위 도메인은 근위 도메인 내의 상보적인 염기서열을 포함할 수 있으며, 상보적인 염기서열에 의해 이중가닥을 형성할 수 있다.

[489] 상기 근위 도메인은 1 내지 20개의 염기서열일 수 있다.

[490] 일 예로서, 상기 근위 도메인은 1 내지 20개의 염기서열, 5 내지 20개의 염기서열, 10 내지 20개의 염기서열 또는 15 내지 20개의 염기서열일 수 있다.

[491] 다른 일 예로서, 상기 근위 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열 또는 15 내지 20개의 염기서열일 수 있다.

[492]

[493] **vi) 꼬리 도메인**

[494] "꼬리 도메인"은 가이드핵산의 양 말단 중 어느 하나 이상의 말단에 위치하는 핵산서열이다.

[495] 꼬리 도메인은 꼬리 도메인 내의 상보적인 염기서열을 포함할 수 있으며, 상보적인 염기서열에 의해 이중가닥을 형성할 수 있다.

[496] 상기 꼬리 도메인은 1 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[497] 일 예로, 상기 꼬리 도메인은 5 내지 50개의 염기서열, 10 내지 50개의 염기서열, 15 내지 50개의 염기서열, 20 내지 50개의 염기서열, 25 내지 50개의 염기서열, 30 내지 50개의 염기서열, 35 내지 50개의 염기서열, 40 내지 50개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[498] 다른 일 예로, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[499]

[500] 한편, 상기 도메인들, 즉, 가이드 도메인, 제 1 상보적 도메인, 연결 도메인, 제 2 상보적 도메인, 근위 도메인 및 꼬리 도메인이 포함하는 핵산 서열의 일부 또는 전부는 선택적 또는 추가적으로 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[501] 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[502]

[503] 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함한다.

[504] 상기 가이드핵산은 가이드 도메인을 포함할 수 있다.

[505] 상기 가이드핵산은 제 1 상보적 도메인을 포함할 수 있다.

[506] 상기 가이드핵산은 연결 도메인을 포함할 수 있다.

[507] 상기 가이드핵산은 제 2 상보적 도메인을 포함할 수 있다.

[508] 상기 가이드핵산은 근위 도메인을 포함할 수 있다.

[509] 상기 가이드핵산은 꼬리 도메인을 포함할 수 있다.

[510] 이때, 상기 도메인의 개수는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상일 수 있다.

[511] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 가이드 도메인을 포함할 수 있다.

[512] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 제 1 상보적 도메인을 포함할 수 있다.

[513] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 연결 도메인을 포함할 수 있다.

[514] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 제 2 상보적 도메인을 포함할 수 있다.

[515] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 근위 도메인을 포함할 수 있다.

[516] 상기 가이드핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 꼬리 도메인을 포함할 수 있다.

[517]

[518] 이때, 상기 가이드핵산은 하나의 도메인이 중복되어 포함될 수 있다.

[519] 상기 가이드핵산은 여러 도메인을 중복 또는 중복시키지 않고 포함할 수 있다.

[520] 상기 가이드핵산은 같은 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 같은 종류의 도메인은 동일한 핵산서열을 가지거나 또는 서로 다른 핵산서열을 가질 수 있다.

[521] 상기 가이드핵산은 두 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 다른 두 종류의 도메인은 서로 다른 핵산서열을 가지거나 또는 동일한 핵산서열을 가질 수 있다.

[522] 상기 가이드핵산은 세 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 다른 세 종류의 도메인은 서로 다른 핵산서열을 가지거나 또는 동일한 핵산서열을 가질 수 있다.

[523] 상기 가이드핵산은 네 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 다른 네 종류의 도메인은 서로 다른 핵산서열을 가지거나 또는 동일한 핵산서열을 가질 수 있다.

[524] 상기 가이드핵산은 다섯 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 다른 다섯 종류의 도메인은 서로 다른 핵산서열을 가지거나 또는 동일한 핵산서열을 가질 수 있다.

[525] 상기 가이드핵산은 여섯 종류의 도메인을 포함할 수 있으며, 이때, 다른 여섯 종류의 도메인은 서로 다른 핵산서열을 가지거나 또는 동일한 핵산서열을 가질 수 있다.

[526] 예를 들면, 가이드핵산은 [가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]으로 구성될 수 있으며, 이때, 두 개의 가이드 도메인은 서로 다른 또는 동일한 표적을 위한 가이드 서열을 포함할 수 있으며, 상기 두 개의 제 1 상보적 도메인과 두 개의 제 2 상보적 도메인 동일한 핵산서열을 가지거나 다른 핵산서열을 가질 수 있다. 가이드 도메인이 서로 다른 표적을 위한 가이드 서열을 포함하는 경우, 상기 가이드핵산은 두 개의 표적에 특이적으로 결합할 수 있으며, 이때, 특이적 결합을 동시에 일어나거나 순차적으로 일어날 수 있다. 또한, 상기 연결 도메인은 특정 효소에 의해 절단될 수 있으며, 특정 효소의 존재 하에서 상기 가이드핵산은 두 부분 또는 세 부분으로 나누어질 수 있다.

[527]

[528] 본 발명의 가이드핵산의 일 구체예로서, gRNA에 대해 하단에 기술하였다.

[529] **gRNA**

[530] "gRNA"는 표적 유전자 또는 핵산에 대한 gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체의 특이적 표적화할 수 있는 핵산을 지칭한다. 또한, 상기 gRNA는 표적 유전자 또는 핵산 특이적 RNA를 의미하며, CRISPR 효소과 결합하여 CRISPR 효소를 표적 유전자 또는 핵산으로 인도할 수 있다.

[531] 상기 gRNA는 다수의 도메인을 포함할 수 있다. 각각의 도메인에 의해 3차원 행태 또는 gRNA의 활성 형태의 가닥 내 또는 가닥 간 상호작용을 할 수 있다.

[532] gRNA는 단일가닥 gRNA(단일 RNA 분자); 또는 이중 gRNA(하나 초과의 통상적으로 2개의 별개의 RNA 분자를 포함함)로서 지칭될 수 있다.

[533] 일 구체예에서, 단일가닥 gRNA는 5'으로부터 3' 방향으로 가이드 도메인, 즉 표적 유전자 또는 핵산에 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드 서열(guide sequence)를 포함하는 도메인; 제 1 상보적 도메인; 연결 도메인; 제 2 상보적 도메인, 상기 제 1 상보적 도메인 서열에 상보적인 서열을 가지므로 제 1 상보적 도메인과 이중가닥 핵산을 형성할 수 있는 도메인; 근위 도메인(proximal domain); 및 선택적으로 꼬리 도메인을 포함할 수 있다.

[534] 다른 일 구체예로서, 이중 gRNA는 5'으로부터 3' 방향으로 가이드 도메인, 즉 표적 유전자 또는 핵산에 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드 서열(guide sequence)를 포함하는 도메인 및 제 1 상보적 도메인을 포함하는 제 1가닥; 및 제 2 상보적 도메인, 상기 제 1 상보적 도메인 서열에 상보적인 서열을 가지므로 제 1 상보적 도메인과 이중가닥 핵산을 형성할 수 있는 도메인, 근위 도메인(proximal domain); 및 선택적으로 꼬리 도메인을 포함하는 제 2 가닥을 포함할 수 있다.

[535] 이때, 상기 제 1가닥은 crRNA라고 지칭될 수 있고, 상기 제 2가닥은 tracrRNA로 지칭될 수 있다. 상기 crRNA는 가이드 도메인과 제 1 상보적 도메인을 포함할 수 있으며, 상기 tracrRNA는 제 2 상보적 도메인, 근위 도메인 및 선택적으로 꼬리 도메인을 포함할 수 있다.

[536] 또 다른 일 구체예로서, 단일가닥 gRNA는 3'으로부터 5' 방향으로 가이드 도메인, 즉 표적 유전자 또는 핵산에 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드 서열(guide sequence)를 포함하는 도메인; 제 1 상보적 도메인; 및 제 2 상보적 도메인, 상기 제 1 상보적 도메인 서열에 상보적인 서열을 가지므로 제 1 상보적 도메인과 이중가닥 핵산을 형성할 수 있는 도메인을 포함할 수 있다.

[537]

[538] i) 가이드 도메인

[539] 상기 가이드 도메인은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 가이드 서열을 포함한다. 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산 서열로, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게

상보적인 핵산 서열일 수 있다. 가이드 도메인은 gRNA-Cas 복합체, 즉, CRISPR 복합체의 표적 유전자 또는 핵산과의 특이적인 상호작용을 할 수 있도록 역할을 한다고 여겨진다.

[540] 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[541] 구현예로서, 상기 가이드 도메인은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[542] 구현예로서, 상기 가이드 도메인은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[543] 이때, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열을 포함할 수 있다.

[544] 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 염기서열일 수 있다.

[545] 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[546] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[547] 상기 가이드 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[548] 구현예로서, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[549] 구현예로서, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[550] 일 구체예로서, 가이드 서열은 PMP22 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[551] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열은 각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

[552] 이때, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열 및 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[553] 상기 추가 염기서열은 1 내지 35개의 염기서열일 수 있다.

[554] 일 구체예로서, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열, 2개의 염기서열, 3개의 염기서열, 4개의 염기서열, 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열,

8개의 염기서열, 9개의 염기서열 또는 10개의 염기서열일 수 있다.

[555] 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열 G(구아닌)일 수 있으며, 또는 2개의 염기서열 GG일 수 있다.

[556] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 서열의 5' 말단에 위치할 수 있다.

[557] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[558]

[559] 선택적으로 상기 가이드 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[560]

[561] ii) 제 1 상보적 도메인

[562] 제 1 상보적 도메인은 제 2 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 2 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 상보성을 가진다.

[563] 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열일 수 있다. 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[564] 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[565] 다른 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[566] 상기 제 1 상보적 도메인은 자연유래의 제 1 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 1 상보적 도메인으로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 제 1 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 1 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인으로부터 유래될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[567] 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스

아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50%이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[568] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 1 상보적 도메인인 경우, 상기 제 1 상보적 도메인은 5'-GUUUUAGAGCUA-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUA-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-GUUUUAGAGCUA$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 5 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[569] 또 다른 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 1 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 1 상보적 도메인인 경우, 상기 제 1 상보적 도메인은 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 5 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[570] 다른 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae), 라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella* disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(*Candidatus* Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50%이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[571] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 팔쿠박테리아 박테리움의 제 1 상보적

도메인 또는 팔쿠박테리아 박테리움 유래 제 1 상보적 도메인인 경우, 상기 제 1 상보적 도메인은 5'-UUUGUAGAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UUUGUAGAU-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-$(X)_n$UUUGUAGAU-3' 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 5의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[572]

[573] 선택적으로 상기 제 1 상보적 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[574]

[575] iii) 연결 도메인

[576] 연결 도메인은 두 개 이상의 도메인을 연결하는 핵산 서열로, 연결 도메인은 동일한 또는 서로 다른 두 개 이상의 도메인을 연결한다. 연결 도메인은 두 개 이상의 도메인과 공유결합 또는 비공유결합을 할 수 있고, 또는 두 개 이상의 도메인을 공유적 또는 비공유적으로 연결할 수 있다.

[577] 상기 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 연결하여 단일가닥 gRNA을 생성할 수 있도록 하는 핵산서열일 수 있다.

[578] 상기 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인과 공유결합 또는 비공유결합을 할 수 있다.

[579] 상기 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 공유적 또는 비공유적으로 연결할 수 있다.

[580] 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열일 수 있다. 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[581] 구현예로서, 상기 연결 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열일 수 있다.

[582] 구현예로서, 상기 연결 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[583] 상기 연결 도메인은 단일가닥 gRNA 분자에 사용하기에 적합하며, 이중 gRNA의 제 1 가닥 및 제 2 가닥과 공유결합 또는 비공유결합 하거나, 또는 제 1 가닥 및 제 2 가닥을 공유적 또는 비공유적으로 연결하여 단일가닥 gRNA을 생성에 사용될 수 있다. 상기 연결 도메인은 이중 gRNA의 crRNA 및 tracrRNA과

공유결합 또는 비공유결합 하거나, 또는 crRNA 및 tracrRNA를 공유적 또는 비공유적으로 연결하여 단일가닥 gRNA를 생성에 사용될 수 있다.

[584] 상기 연결 도메인은 자연유래 서열, 예를 들어 tracrRNA의 일부 서열과 상동성을 같거나, 또는 이로부터 유래될 수 있다.

[585]

[586] 선택적으로 상기 연결 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[587]

[588] iv) 제 2 상보적 도메인

[589] 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 상보성을 가진다. 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 염기서열 및 제 1 상보적 도메인과의 상보성이 없는 염기서열, 예를 들어, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하지 않는 염기서열을 포함할 수 있으며, 제 1 상보적 도메인보다 염기서열의 길이가 길 수 있다.

[590] 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열일 수 있다. 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[591] 구현예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[592] 구현예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[593] 또한, 상기 제 2 상보적 도메인은 자연유래의 제 2 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 2 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 제 2 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 2 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[594] 일 구체예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 제 2 상보적 도메인 또는 유래된 제 2 상보적 도메인과 일부, 최소 50 %이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[595] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 2 상보적 도메인인 경우, 상기 제 2 상보적 도메인은 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다(밑줄 표시는 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하는 염기서열). 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$ 또는/및 $(X)_m$을 포함, 즉, 5'-$(X)_n$ UAGCAAGUUAAAAU$(X)_m$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n 및 m은 염기서열의 개수로, 상기 n은 1 내지 15의 정수일 수 있고, 상기 m은 1 내지 6일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다. 또한 $(X)_m$은 동일한 염기서열의 정수 m개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 m개의 염기서열일 수 있다.

[596] 또 다른 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 2 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 2 상보적 도메인인 경우, 상기 제 2 상보적 도메인은 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU -3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다(밑줄 표시는 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하는 염기서열). 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$ 또는/및 $(X)_m$을 포함, 즉, 5'-$(X)_n$AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU$(X)_m$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 1 내지 15의 정수일 수 있고, 상기 m은 1 내지 6일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다. 또한 $(X)_m$은 동일한 염기서열의 정수 m개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 m개의 염기서열일 수 있다.

[597] 다른 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae),

라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella* disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(*Candidatus* Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50%이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[598] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 팔쿠박테리아 박테리움의 제 2 상보적 도메인 또는 팔쿠박테리아 박테리움 유래 제 2 상보적 도메인인 경우, 상기 제 2 상보적 도메인은 5'-AAAUU<u>UCUAC</u>U-3' 일 수 있고, 또는 5'-AAAUU<u>UCUAC</u>U-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다(밑줄 표시는 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하는 염기서열). 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$ 또는/및 $(X)_m$을 포함, 즉, 5'-$(X)_n$AAAUU<u>UCUAC</u>U$(X)_m$-3' 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n 및 m은 염기서열의 개수로, 상기 n은 1 내지 10의 정수일 수 있고, 상기 m은 1 내지 6일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다. 또한 $(X)_m$은 동일한 염기서열의 정수 m개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 m개의 염기서열일 수 있다.

[599]

[600] 선택적으로 상기 제 2 상보적 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[601]

[602] v) 근위 도메인(proximal domain)

[603] 근위 도메인은 제 2 상보적 도메인에 근접하게 위치하는 1 내지 20개의 염기서열로, 제 2 상보적 도메인의 3' 방향에 위치하는 도메인이다. 이때, 상기 근위 도메인은 근위 도메인 내의 상보적인 염기서열간의 이중가닥 결합을 형성할 수 있다.

[604] 일 구체예로서, 상기 근위 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열 14개의 염기서열 또는 15개의 염기서열일 수 있다.

[605] 다른 구체예로서, 상기 근위 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의

염기서열, 8개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열 14개의 염기서열 또는 15개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[606] 또한, 상기 근위 도메인은 자연유래의 근위 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 근위 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 근위 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 근위 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 근위 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[607] 일 구체예로서, 상기 근위 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 근위 도메인 또는 유래된 근위 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[608] 예를 들어, 상기 근위 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 근위 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 근위 도메인인 경우, 상기 근위 도메인은 5'-AAGGCUAGUCCG-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGGCUAGUCCG-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 근위 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-AAGGCUAGUCCG$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[609] 또 다른 예를 들어, 상기 근위 도메인이 캄필로박터 제주니의 근위 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 근위 도메인인 경우, 상기 근위 도메인은 5'-AAAGAGUUUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-AAAGAGUUUGC-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 근위 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-AAAGAGUUUGC$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 40의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[610]

[611] 선택적으로 상기 근위 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

[612]

[613] vi) 꼬리 도메인

[614] 꼬리 도메인은 단일가닥 gRNA 또는 이중 gRNA의 3' 말단에 선택적으로 추가될 수 있는 도메인으로, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 상기 꼬리 도메인은 1 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 꼬리 도메인은 꼬리 도메인 내의 상보적인 염기서열간의 이중가닥 결합을 형성할 수 있다.

[615] 구현예로서, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[616] 구현예로서, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[617] 또한, 상기 꼬리 도메인은 자연유래의 꼬리 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 꼬리 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 꼬리 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 꼬리 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 꼬리 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[618] 일 구체예로서, 상기 꼬리 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 꼬리 도메인 또는 유래된 꼬리 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[619] 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 꼬리 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 꼬리 도메인인 경우, 상기 꼬리 도메인은 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 꼬리 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의

정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[620] 또 다른 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 캄필로박터 제주니의 꼬리 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 꼬리 도메인인 경우, 상기 꼬리 도메인은 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 꼬리 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉, 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

[621] 다른 일 구체예에서, 상기 꼬리 도메인은 시험관 내 또는 생체 내 전사 방법과 관련된 3' 말단에 1 내지 10개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[622] 예를 들어, T7 프로모터가 gRNA의 시험관 내 전사를 위해 사용될 때, 상기 꼬리 도메인은 DNA 주형의 3' 말단에 존재하는 임의의 염기서열일 수 있다. 또한, U6 프로모터가 생체 내 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUUUU 일 수 있으며, H1 프로모터가 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUU 일 수 있고, pol-III 프로모터를 사용하는 경우에는, 상기 꼬리 도메인은 여러 개의 우라실 염기이거나 또는 대안 될 수 있는 염기를 포함할 수 있다.

[623]

[624] 선택적으로 상기 꼬리 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[625]

[626] gRNA는 상기에 기재된 바와 같이 다수의 도메인을 포함할 수 있어, gRNA가 포함하는 도메인의 따라 핵산 서열의 길이를 조절할 수 있으며, 각각의 도메인에 의해 3차원 형태 또는 gRNA의 활성 형태의 가닥내 또는 가닥간 상호작용을 할 수 있다.

[627] gRNA는 단일가닥 gRNA(단일 RNA 분자); 또는 이중 gRNA(하나 초과의 통상적으로 2개의 별개의 RNA 분자를 포함함)로서 지칭될 수 있다.

[628]

[629] **<u>이중 gRNA</u>**

[630] 이중 gRNA는 제 1 가닥 및 제 2 가닥으로 구성된다.

[631] 이때, 상기 제 1 가닥은

[632] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-3'으로 구성될 수 있고,

[633] 상기 제 2 가닥은

[634] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-3' 또는

[635] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[636] 이때, 상기 제 1 가닥은 crRNA라고 지칭될 수 있고, 상기 제 2 가닥은 tracrRNA로 지칭될 수 있다.

[637]

[638] *제 1 가닥*

[639] *가이드 도메인*

[640] 상기 제 1 가닥에서 상기 가이드 도메인은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 가이드 서열을 포함한다. 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산 서열로, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다. 가이드 도메인은 gRNA-Cas 복합체, 즉, CRISPR 복합체의 표적 유전자 또는 핵산과의 특이적인 상호작용을 할 수 있도록 역할을 한다고 여겨진다.

[641] 이때, 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예들 들어 상기 가이드 도메인은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[642]

[643] 또한, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열을 포함할 수 있다.

[644] 이때, 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 염기서열 또는 상보성을 가지는 염기서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 염기서열일 수 있다.

[645] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[646] 이때, 상기 가이드 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[647] 일 구체예로서, 가이드 서열은 PMP22 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의

염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[648] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

[649] 선택적으로, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열 및 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[650] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 35개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열, 2개의 염기서열, 3개의 염기서열, 4개의 염기서열, 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열 또는 10개의 염기서열일 수 있다.

[651] 일 구체예로서, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열 G(구아닌)일 수 있으며, 또는 2개의 염기서열 GG일 수 있다.

[652] 이때, 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 도메인의 5' 말단에 위치할 수 있으며, 또는 가이드 서열의 5' 말단에 위치할 수 있다.

[653] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 도메인의 3' 말단에 위치할 수 있으며, 또는 가이드 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[654]

[655] ***제 1 상보적 도메인***

[656] 제 1 상보적 도메인은 제 2 가닥의 제 2 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 2 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도의 상보성을 가지는 도메인이다.

[657] 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열이거나, 또는 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예들 들어, 상기 제 1 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[658] 상기 제 1 상보적 도메인은 자연유래의 제 1 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 1 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 제 1 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 1 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[659] 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(

Streptococcus pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[660] 선택적으로, 상기 제 1 상보적 도메인은 제 2 가닥의 제 2 상보적 도메인과 상보적 결합을 하지 않는 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[661] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 15개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 또는 10 내지 15개의 염기서열일 수 있다.

[662]

[663] 선택적으로 상기 가이드 도메인 또는/및 제 1 상보적 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[664]

[665] 따라서, 제 1 가닥은 상기 기재와 같이 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[666] 또한, 상기 제 1 가닥은 선택적으로 추가적인 염기서열을 포함할 수 있다.

[667] 일 예로서, 상기 제 1 가닥은

[668] $5'-(N_{target})-(Q)_m-3'$; 또는

[669] $5'-(X)_a-(N_{target})-(X)_b-(Q)_m-(X)_c-3'$일 수 있다.

[670] 이때, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열로서, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열에 따라 변할 수 있는 염기서열 부위이다.

[671] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

[672] 이때, 상기 $(Q)_m$은 제 1 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 2 가닥의 제 2 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Q)_m$은 자연에 존재하는 종의 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 제 1 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 Q는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 m은 염기서열의 개수로, 5 내지 35의 정수일 수 있다.

[673] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGAGCUA-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUA-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는

염기서열일 수 있다.

[674] 다른 예로, 상기 제 1 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 1 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[675] 또 다른 예로, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[676] 또한, 상기 $(X)_a$, $(X)_b$ 및 $(X)_c$는 선택적으로 추가할 수 있는 염기서열로, 상기 X는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 a, b 및 c는 염기서열의 개수로, 0 또는 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[677]

[678] *제 2 가닥*

[679] 제 2 가닥은 제 2 상보적 도메인과 근위 도메인으로 구성되며, 선택적으로 꼬리 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[680] ***제 2 상보적 도메인***

[681] 상기 제 2 가닥에서 제 2 상보적 도메인은 상기 제 1 가닥의 제 1 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 상보성을 가진다. 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 염기서열 및 제 1 상보적 도메인과의 상보성이 없는 염기서열, 예를 들어, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하지 않는 염기서열을 포함할 수 있으며, 제 1 상보적 도메인보다 염기서열의 길이가 길 수 있다.

[682] 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열이거나, 또는 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[683] 상기 제 2 상보적 도메인은 자연유래의 제 2 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 2 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 제 2 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 2 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2

상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[684] 일 구체예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 제 2 상보적 도메인 또는 유래된 제 2 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[685] 선택적으로, 상기 제 2 상보적 도메인은 제 1 가닥의 제 1 상보적 도메인과 상보적 결합을 하지않는 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[686] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 25개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열 또는 20 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[687]

[688] ***근위 도메인***

[689] 상기 제 2 가닥에서 근위 도메인은 1 내지 20개의 염기서열로, 제 2 상보적 도메인의 3' 방향에 위치하는 도메인이다. 예를 들어, 상기 근위 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열 14개의 염기서열 또는 15개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[690] 이때, 상기 근위 도메인은 근위 도메인 내의 상보적인 염기서열 간의 이중가닥 결합을 형성할 수 있다.

[691] 또한, 상기 근위 도메인은 자연유래의 근위 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 근위 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 근위 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 근위 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 근위 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[692] 일 구체예로서, 상기 근위 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 근위 도메인 또는 유래된 근위 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[693]

[694] ***꼬리 도메인***

[695] 선택적으로, 상기 제 2 가닥에서 꼬리 도메인은 제 2 가닥의 3' 말단에 선택적으로 추가될 수 있는 도메인으로, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 1 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 꼬리 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열, 25 내지 30개의 염기서열, 30 내지 35개의 염기서열, 35 내지 40개의 염기서열, 40 내지 45개의 염기서열 또는 45 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[696] 이때, 상기 꼬리 도메인은 꼬리 도메인 내의 상보적인 염기서열 간의 이중가닥 결합을 형성할 수 있다.

[697] 또한, 상기 꼬리 도메인은 자연유래의 꼬리 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 꼬리 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 꼬리 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 꼬리 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 꼬리 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[698] 일 구체예로서, 상기 꼬리 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter* jejuni), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus* thermophilus), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus* aureus) 또는 네이세리아 메닝기디티스(*Neisseria* meningitides)의 꼬리 도메인 또는 유래된 꼬리 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[699] 다른 일 구체예에서, 상기 꼬리 도메인은 시험관 내 또는 생체 내 전사 방법과 관련된 3' 말단에 1 내지 10개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[700] 예를 들어, T7 프로모터가 gRNA의 시험관 내 전사를 위해 사용될 때, 상기 꼬리 도메인은 DNA 주형의 3' 말단에 존재하는 임의의 염기서열일 수 있다. 또한, U6 프로모터가 생체 내 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUUUU 일 수 있으며, H1 프로모터가 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUU 일 수 있고, pol-III 프로모터를 사용하는 경우에는, 상기 꼬리 도메인은 여러 개의 우라실 염기이거나 또는 대안 될 수 있는 염기를 포함할 수 있다.

[701]

[702] 선택적으로 상기 제 2 상보적 도메인, 근위 도메인 또는/및 꼬리 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[703]

[704] 따라서, 제 2 가닥은 상기 기재와 같이 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인]-3'

또는 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[705] 또한, 상기 제 2 가닥은 선택적으로 추가적인 염기서열을 포함할 수 있다.

[706] 일 구체예로서, 상기 제 2 가닥은

[707] $5'-(Z)_h-(P)_k-3'$; 또는

[708] $5'-(X)_d-(Z)_h-(X)_e-(P)_k-(X)_f-3'$ 일 수 있다.

[709] 다른 일 구체예로서, 상기 제 2 가닥은

[710] $5'-(Z)_h-(P)_k-(F)_i-3'$; 또는

[711] $5'-(X)_d-(Z)_h-(X)_e-(P)_k-(X)_f-(F)_i-3'$ 일 수 있다.

[712] 이때, 상기 $(Z)_h$는 제 2 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 1 가닥의 제 1 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Z)_h$은 자연에 존재하는 종의 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래 된 종에 따라 상기 제 2 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 Z는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 h은 염기서열의 개수로, 5 내지 50의 정수일 수 있다.

[713] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[714] 다른 예로, 상기 제 2 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 2 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[715] 또 다른 예로, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[716] 상기 $(P)_k$는 근위 도메인을 포함하는 염기서열로, 자연에 존재하는 종의 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 근위 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 P는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 k은 염기서열의 개수로, 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[717] 예를 들어, 상기 근위 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 근위 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAGGCUAGUCCG-3'일 수 있고, 또는

5'-AAGGCUAGUCCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[718] 다른 예로, 상기 근위 도메인이 캄필로박터 제주니의 근위 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAAGAGUUUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-AAAGAGUUUGC-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[719] 또 다른 예로, 상기 근위 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 근위 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAGGCUUAGUCCG-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGGCUUAGUCCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[720] 상기 $(F)_i$는 꼬리 도메인을 포함하는 염기서열로, 자연에 존재하는 종의 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 꼬리 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 F는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 i은 염기서열의 개수로, 1 내지 50의 정수일 수 있다.

[721] 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 꼬리 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[722] 다른 예로, 상기 꼬리 도메인이 캄필로박터 제주니의 꼬리 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[723] 또 다른 예로, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 꼬리 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[724] 또한, 상기 $(F)_i$는 시험관 내 또는 생체 내 전사 방법과 관련된 3' 말단에 1 내지 10개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[725] 예를 들어, T7 프로모터가 gRNA의 시험관 내 전사를 위해 사용될 때, 상기 꼬리 도메인은 DNA 주형의 3' 말단에 존재하는 임의의 염기서열일 수 있다. 또한, U6

프로모터가 생체 내 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUUUU 일 수 있으며, H1 프로모터가 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUU 일 수 있고, pol-III 프로모터를 사용하는 경우에는, 상기 꼬리 도메인은 여러 개의 우라실 염기이거나 또는 대안될 수 있는 염기를 포함할 수 있다.

[726] 또한, 상기 $(X)_d$, $(X)_e$ 및 $(X)_f$는 선택적으로 추가할 수 있는 염기서열로, 상기 X는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 d, e 및 f는 염기서열의 개수로, 0 또는 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[727]

[728] ***단일가닥 gRNA***

[729] 단일가닥 gRNA는 두 가지로 종류로 나뉠 수 있다.

[730] ***i) 단일가닥 gRNA***

[731] 우선, 상기 이중 gRNA의 제 1 가닥과 제 2 가닥을 연결 도메인으로 연결한 단일가닥 gRNA이 있으며, 이때, 상기 단일가닥 gRNA는 5'-[제 1 가닥]-[연결 도메인]-[제 2 가닥]-3'로 이루어져 있다.

[732] 구체적으로, 상기 단일가닥 gRNA는

[733] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-3' 또는

[734] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[735]

[736] 연결 도메인을 제외한 각각의 도메인은 상기 이중 gRNA의 제 1 가닥 및 제 2 가닥의 각 도메인에 관한 기재와 동일하다.

[737]

[738] ***<u>연결 도메인</u>***

[739] 상기 단일가닥 gRNA에서 상기 연결 도메인은 제 1 가닥과 제 2 가닥을 연결하는 도메인으로, 구체적으로는 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 연결하여 단일가닥 gRNA을 생성할 수 있도록 하는 핵산서열이다. 이때, 상기 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인과 공유결합 또는 비공유결합을 할 수 있고, 또는 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 공유적 또는 비공유적으로 연결할 수 있다.

[740] 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열이거나, 또는 1 내지 30개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 연결 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[741] 상기 연결 도메인은 단일가닥 gRNA 분자에 사용하기에 적합하며, 이중 gRNA의 제 1 가닥 및 제 2 가닥과 공유결합 또는 비공유결합 하거나, 또는 제 1 가닥 및 제 2 가닥을 공유적 또는 비공유적으로 연결하여 단일가닥 gRNA을

생성에 사용될 수 있다. 상기 연결 도메인은 이중 gRNA의 crRNA 및 tracrRNA과 공유결합 또는 비공유결합 하거나, 또는 crRNA 및 tracrRNA를 공유적 또는 비공유적으로 연결하여 단일가닥 gRNA를 생성에 사용될 수 있다.

[742] 상기 연결 도메인은 자연유래 서열, 예를 들어 tracrRNA의 일부 서열과 상동성을 같거나, 또는 이로부터 유래될 수 있다.

[743] 선택적으로 상기 연결 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[744]

[745] 따라서, 단일가닥 gRNA는 상기 기재와 같이 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-3' 또는 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[746] 또한, 상기 단일가닥 gRNA는 선택적으로 추가적인 염기서열을 포함할 수 있다.

[747] 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[748] 5'-(N_{target})-$(Q)_m$-$(L)_j$-$(Z)_h$-$(P)_k$-3'; 또는

[749] 5'-(N_{target})-$(Q)_m$-$(L)_j$-$(Z)_h$-$(P)_k$-$(F)_i$-3'일 수 있다.

[750] 다른 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[751] 5'-$(X)_a$-(N_{target})-$(X)_b$-$(Q)_m$-$(X)_c$-$(L)_j$-$(X)_d$-$(Z)_h$-$(X)_e$-$(P)_k$-$(X)_f$-3'; 또는

[752] 5'-$(X)_a$-(N_{target})-$(X)_b$-$(Q)_m$-$(X)_c$-$(L)_j$-$(X)_d$-$(Z)_h$-$(X)_e$-$(P)_k$-$(X)_f$-$(F)_i$-3'일 수 있다.

[753] 이때, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열로서, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열에 따라 변할 수 있는 염기서열 부위이다.

[754] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

[755] 상기 $(Q)_m$은 제 1 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 2 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Q)_m$은 자연에 존재하는 종의 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 제 1 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 Q는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 m은 염기서열의 개수로, 5 내지 35의 정수일 수 있다.

[756] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGAGCUA-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUA-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는

염기서열일 수 있다.

[757] 다른 예로, 상기 제 1 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 1 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGUCCCUUUUUAAAUUUCUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[758] 또 다른 예로, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[759] 또한, 상기 $(L)_j$는 연결 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 연결하여 단일가닥 gRNA을 생성할 수 있도록 하는 염기서열이다. 이때, 상기 L은 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 j은 염기서열의 개수로, 1 내지 30의 정수일 수 있다.

[760] 상기 $(Z)_h$는 제 2 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 1 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Z)_h$은 자연에 존재하는 종의 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 제 2 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 Z는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 h은 염기서열의 개수로, 5 내지 50의 정수일 수 있다.

[761] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[762] 다른 예로, 상기 제 2 상보적 도메인이 캄필로박터 제주니의 제 2 상보적 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[763] 또 다른 예로, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[764] 상기 $(P)_k$는 근위 도메인을 포함하는 염기서열로, 자연에 존재하는 종의 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 근위 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 P는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 k은 염기서열의 개수로, 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[765] 예를 들어, 상기 근위 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 근위 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAGGCUAGUCCG-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGGCUAGUCCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[766] 다른 예로, 상기 근위 도메인이 캄필로박터 제주니의 근위 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAAGAGUUUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-AAAGAGUUUGC-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[767] 또 다른 예로, 상기 근위 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 근위 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 근위 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(P)_k$는 5'-AAGGCUUAGUCCG-3'일 수 있고, 또는 5'-AAGGCUUAGUCCG-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[768] 상기 $(F)_i$는 꼬리 도메인을 포함하는 염기서열로, 자연에 존재하는 종의 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 꼬리 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 F는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 i은 염기서열의 개수로, 1 내지 50의 정수일 수 있다.

[769] 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 꼬리 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'일 수 있고, 또는 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[770] 다른 예로, 상기 꼬리 도메인이 캄필로박터 제주니의 꼬리 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[771] 또 다른 예로, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 써모필러스의 꼬리 도메인 또는 스트렙토코커스 써모필러스 유래 꼬리 도메인과 일부 또는 완전한

상동성을 가질 경우에, 상기 $(F)_i$는 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[772] 또한, 상기 $(F)_i$는 시험관 내 또는 생체 내 전사 방법과 관련된 3' 말단에 1 내지 10개의 염기서열을 포함할 수 있다.

[773] 예를 들어, T7 프로모터가 gRNA의 시험관 내 전사를 위해 사용될 때, 상기 꼬리 도메인은 DNA 주형의 3' 말단에 존재하는 임의의 염기서열일 수 있다. 또한, U6 프로모터가 생체 내 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUUUU 일 수 있으며, H1 프로모터가 전사를 위해 사용되는 경우, 상기 꼬리 도메인은 UUUU 일 수 있고, pol-III 프로모터를 사용하는 경우에는, 상기 꼬리 도메인은 여러 개의 우라실 염기이거나 또는 대안 될 수 있는 염기를 포함할 수 있다.

[774] 또한, 상기 $(X)_a$, $(X)_b$, $(X)_c$, $(X)_d$, $(X)_e$ 및 $(X)_f$는 선택적으로 추가할 수 있는 염기서열로, 상기 X는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 a, b, c, d, e 및 f는 염기서열의 개수로, 0 또는 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[775]

[776] ***ii) 단일가닥 gRNA***

[777] 그 다음으로, 단일가닥 gRNA는 가이드 도메인, 제 1 상보적 도메인 및 제 2 상보적 도메인으로 구성되는 단일가닥 gRNA일 수 있으며,

[778] 이때, 상기 단일가닥 gRNA는

[779] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3'; 또는

[780] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[781]

[782] *<u>가이드 도메인</u>*

[783] 상기 단일가닥 gRNA에서 상기 가이드 도메인은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 가이드 서열을 포함한다. 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열에 상보성인 핵산 서열로, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다. 가이드 도메인은 gRNA-Cas 복합체, 즉, CRISPR 복합체의 표적 유전자 또는 핵산과의 특이적인 상호작용을 할 수 있도록 역할을 한다고 여겨진다.

[784] 이때, 상기 가이드 도메인은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예들 들어 상기 가이드 도메인은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[785] 또한, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열을 포함할 수 있다.

[786] 이때, 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 염기서열 또는 상보성을 가지는 염기서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 염기서열일 수 있다.

[787] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[788] 이때, 상기 가이드 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[789] 일 구체예로서, 가이드 서열은 PMP22 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[790] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

[791] 선택적으로, 상기 가이드 도메인은 가이드 서열 및 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[792] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 35개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열, 2개의 염기서열, 3개의 염기서열, 4개의 염기서열, 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열 또는 10개의 염기서열일 수 있다.

[793] 일 구체예로서, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열 G(구아닌)일 수 있으며, 또는 2개의 염기서열 GG일 수 있다.

[794] 이때, 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 도메인의 5' 말단에 위치할 수 있으며, 또는 가이드 서열의 5' 말단에 위치할 수 있다.

[795] 상기 추가 염기서열은 상기 가이드 도메인의 3' 말단에 위치할 수 있으며, 또는 가이드 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[796]

[797] ***제 1 상보적 도메인***

[798] 제 1 상보적 도메인은 제 2 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 2 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도의 상보성을 가지는 도메인이다.

[799] 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열이거나, 또는 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예들 들어, 상기 제 1 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[800] 상기 제 1 상보적 도메인은 자연유래의 제 1 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 1 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 제 1 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 1 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[801] 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae), 라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella* disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(*Candidatus* Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[802] 선택적으로, 상기 제 1 상보적 도메인은 제 2 상보적 도메인과 상보적 결합을 하지 않는 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[803] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 15개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 또는 10 내지 15개의 염기서열일 수 있다.

[804]

[805] ***제 2 상보적 도메인***

[806] 제 2 상보적 도메인은 상기 제 1 가닥의 제 1 상보적 도메인과 상보적 핵산서열을 포함하며, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로

상보성을 가진다. 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 염기서열 및 제 1 상보적 도메인과의 상보성이 없는 염기서열, 예를 들어, 제 1 상보적 도메인과 이중가닥을 형성하지 않는 염기서열을 포함할 수 있으며, 제 1 상보적 도메인보다 염기서열의 길이가 길 수 있다.

[807] 이때, 상기 제 2 상보적 도메인은 5 내지 35개의 염기서열이거나, 또는 5 내지 35개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열, 14개의 염기서열, 15개의 염기서열, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[808] 상기 제 2 상보적 도메인은 자연유래의 제 2 상보적 도메인과 상동성을 가지거나, 또는 자연유래의 제 2 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 또한, 상기 제 2 상보적 도메인은 자연에 존재하는 종에 따라 제 2 상보적 도메인의 염기서열에 차이가 존재할 수 있으며, 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2 상보적 도메인으로부터 유래 될 수 있고, 또는 자연에 존재하는 종이 포함하는 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[809] 일 구체예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae), 라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella* disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(*Candidatus* Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*)의 제 2 상보적 도메인 또는 유래된 제 2 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

[810] 선택적으로, 상기 제 2 상보적 도메인은 제 1 상보적 도메인과 상보적 결합을 하지 않는 추가 염기서열을 포함할 수 있다.

[811] 이때, 상기 추가 염기서열은 1 내지 15개의 염기서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 또는 10 내지 15개의 염기서열일 수 있다.

[812]

[813] ***연결 도메인***

[814] 선택적으로, 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 연결하여 단일가닥 gRNA을 생성할 수 있도록 하는 핵산서열이다. 이때, 상기 연결 도메인은 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인과 공유결합 또는 비공유결합을 할 수 있고, 또는 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 공유적 또는 비공유적으로 연결할 수 있다.

[815] 상기 연결 도메인은 1 내지 30개의 염기서열이거나, 또는 1 내지 30개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 연결 도메인은 1 내지 5개의 염기서열, 5내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의 염기서열 또는 25 내지 30개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[816] 선택적으로 상기 가이드 도메인, 제 1 상보적 도메인, 제 2 상보적 도메인 및 연결 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[817]

[818] 따라서, 상기 단일가닥 gRNA는 상기 기재와 같이 5'-[제 2 상보적 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3' 또는 5'-[제 2 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[819] 또한, 상기 단일가닥 gRNA는 선택적으로 추가적인 염기서열을 포함할 수 있다.

[820] 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[821] $5'-(Z)_h-(Q)_m-(N_{target})-3'$; 또는

[822] $5'-(X)_a-(Z)_h-(X)_b-(Q)_m-(X)_c-(N_{target})-3'$일 수 있다.

[823] 다른 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[824] $5'-(Z)_h-(L)_j-(Q)_m-(N_{target})-3'$; 또는

[825] $5'-(X)_a-(Z)_h-(L)_j-(Q)_m-(X)_c-(N_{target})-3'$일 수 있다.

[826] 이때, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열로서, 상기 N_{target}은 표적 유전자 또는 핵산 상의 표적 서열에 따라 변할 수 있는 염기서열 부위이다.

[827] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, PMP22 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

[828] 상기 $(Q)_m$은 제 1 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 2 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Q)_m$은 자연에 존재하는 종의 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 제 1 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기

Q는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 m은 염기서열의 개수로, 5 내지 35의 정수일 수 있다.

[829] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 팔쿠박테리아 박테리움의 제 1 상보적 도메인 또는 팔쿠박테리아 박테리움 유래 제 1 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Q)_m$은 5'-UUUGUAGAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UUUGUAGAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[830] 상기 $(Z)_h$는 제 2 상보적 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 1 상보적 도메인과 상보적 결합을 할 수 있는 염기서열을 포함한다. 상기 $(Z)_h$은 자연에 존재하는 종의 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가지는 서열일 수 있으며, 유래된 종에 따라 상기 제 2 상보적 도메인의 염기서열은 변경될 수 있다. 상기 Z는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 h은 염기서열의 개수로, 5 내지 50의 정수일 수 있다.

[831] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 팔쿠박테리아 박테리움의 제 2 상보적 도메인 또는 팔쿠박테리아 박테리움 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은 5'-AAAUUUCUACU-3'일 수 있고, 또는 5'-AAAUUUCUACU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[832] 또한, 상기 $(L)_j$는 연결 도메인을 포함하는 염기서열로, 제 1 상보적 도메인과 제 2 상보적 도메인을 연결하는 염기서열이다. 이때, 상기 L은 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 j은 염기서열의 개수로, 1 내지 30의 정수일 수 있다.

[833] 또한, 상기 $(X)_a$, $(X)_b$ 및 $(X)_c$는 선택적으로 추가할 수 있는 염기서열로, 상기 X는 A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 a, b 및 c는 염기서열의 개수로, 0 또는 1 내지 20의 정수일 수 있다.

[834]

[835] **2. 에디터단백질**

[836] 에디터단백질은 핵산과 직접적으로 결합하거나, 또는 직접 결합하지는 않지만 상호작용할 수 있는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미한다.

[837] 상기 핵산은 타겟 핵산, 유전자 또는 염색체에 포함된 핵산일 수 있다.

[838] 상기 핵산은 가이드핵산일 수 있다.

[839] 상기 에디터단백질은 효소일 수 있다.

[840] 상기 에디터단백질은 융합 단백질일 수 있다.

[841] 이때, 상기 융합 단백질은 효소 및 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 융합하여 생성한 단백질을 의미한다.

[842] 상기 효소는 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 절단할 수 있는 도메인을 포함하는 단백질을 의미한다.

[843] 상기 효소는 뉴클레아제, 프로테아제 또는 제한효소일 수 있다.

[844] 상기 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 상기 효소와

동일하거나 다른 기능을 가지는 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[845] 상기 융합 단백질은 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 효소의 중간부; 또는 이들 조합의 하나 이상에 추가적인 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[846] 상기 융합 단백질은 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 효소의 중간부; 또는 이들 조합의 하나 이상에 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[847] 이때, 상기 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 메틸라아제(methylase) 활성, 디메틸라아제(demethylase) 활성, 전사촉진(transcription activation) 활성, 전사 저해(transcription repression) 활성, 전사 방출 인자(transcription release factor) 활성, 히스톤 변형(histone modification) 활성, RNA 절단(cleavage) 활성 또는 핵산 결합(nucleic acid binding) 활성을 가지는 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 일 수 있으며, 또는 단백질(펩타이드 포함)의 분리정제를 위한 태그(tag) 또는 리포터 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[848] 상기 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 디아미네이즈(deaminase)일 수 있다.

[849] 상기 태그는 히스티딘(His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그 및 티오레독신(Trx) 태그 등을 포함하며, 상기 리포터 유전자는 글루타티온-S-트랜스 퍼라제(GST), 호스래디시(horseradish) 과산화효소(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 녹색 형광 단백질(GFP), HcRed, DsRed, 청록색 형광 단백질(CFP), 황색 형광 단백질(YFP) 및 청색 형광 단백질(BFP)을 포함하는 자가형광 단백질을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[850] 또한, 상기 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 NLS(nuclear localization sequence or signal) 또는 NES(nuclear export sequence or signal)일 수 있다.

[851] 상기 NLS는 아미노산 서열 PKKKRKV를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin)으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKKAGQAKKKK를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD 또는 RQRRNELKRSP를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY를 갖는 hRNPA1 M9 NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 마이오마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP 및 PPKKARED; 인간 p53의 서열 POPKKKPL; 마우스 c-abl IV의 서열 SALIKKKKKMAP; 인플루엔자 바이러스

NS1의 서열 DRLRR 및 PKQKKRK; 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL; 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR; 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK; 또는 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNLEARKTKK로부터 유래된 NLS 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[852]

[853] 상기 에디터단백질은 완전 활성 효소를 포함할 수 있다.

[854] 이때, 상기 "완전 활성 효소"는 야생형(wild type)의 효소의 기능과 동일한 기능을 가지고 있는 효소를 의미하며, 예를 들면, DNA의 이중 가닥을 절단하는 야생형 효소는 DNA 이중 가닥을 모두 절단하는 완전한 효소 활성을 가진다.

[855] 또한, 상기 완전 활성 효소는 야생형의 효소의 기능보다 향상 된 기능을 가지고 있는 효소를 포함하며, 예를 들면, DNA의 이중 가닥을 절단하는 야생형 효소의 특정 변형 또는 조작 형태는 야생형 효소보다 증가 된 완전한 효소 활성, 즉, DNA 이중 가닥을 절단하는 활성을 가진다.

[856] 상기 에디터단백질은 불완전 또는 부분 활성 효소를 포함할 수 있다.

[857] 이때, 상기 "불완전 또는 부분 활성 효소"는 야생형의 효소의 기능의 일부만을 가지는 효소를 의미하며, 예를 들면, DNA의 이중 가닥을 절단하는 야생형 효소의 특정 변형 또는 조작된 형태는 DNA 이중 가닥 중 일부, 즉 단일 가닥만 절단하는 불완전한 또는 일부의 효소 활성을 가진다.

[858] 상기 에디터단백질은 불활성 효소를 포함할 수 있다.

[859] 이때, 상기 "불활성 효소"는 야생형의 효소의 기능이 모두 불활성화 된 효소를 의미하며, 예를 들면, DNA의 이중 가닥을 절단하는 야생형 효소의 특정 변형 또는 조작된 형태는 DNA 이중 가닥을 모두 절단하지 못하도록 불활성을 가진다.

[860]

[861] 상기 에디터단백질은 자연 상태에 존재하는 효소 또는 융합 단백질일 수 있다.

[862] 상기 에디터단백질은 자연 상태에 존재하는 효소 또는 융합 단백질의 일부가 변형된 형태일 수 있다.

[863] 상기 에디터단백질은 자연 상태에 존재하지 않는 인위적으로 생성된 효소 또는 융합 단백질일 수 있다.

[864] 상기 에디터단백질은 자연 상태에 존재하지 않는 인위적으로 생성된 효소 또는 융합 단백질의 일부가 변형된 형태일 수 있다.

[865] 이때, 상기 변형은 에디터단백질에 포함된 아미노산의 치환, 제거, 부가 또는 이의 혼합일 수 있다.

[866] 또는 상기 변형은 에디터단백질을 암호화하는 염기서열 중 일부 염기의 치환, 제거, 부가 또는 이의 혼합일 수 있다.

[867]

[868] 본 발명의 에디터단백질의 일 구체예로서, CRISPR 효소에 대해 하단에

기술하였다.

[869] **CRISPR 효소**

[870] "CRISPR 효소"는 CRISPR-Cas 시스템의 주요 단백질 구성 요소로, gRNA와 복합체를 형성하여 CRISPR-Cas 시스템을 형성한다.

[871] 상기 CRISPR 효소는 CRISPR 효소를 암호화하는 서열을 가지는 핵산 또는 폴리펩타이드(또는 단백질)로, 대표적으로 Type II CRISPR 효소 또는 Type V CRISPR 효소가 많이 사용된다.

[872] 상기 Type II CRISPR 효소으로는 Cas9이 있으며, 상기 Cas9은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 노카르디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 알리사이클로바클루스 아시도칼다리우스(AlicyclobacHlus acidocaldarius), 바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides), 바실러스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens), 엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum), 락토바실러스 델브루에키이(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 미크로스 킬라 마리나(Microscilla marina), 부르크홀데리아레스 박테리움(Burkholderiales bacterium), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans), 폴라로모나스 속(Polaromonas sp.), 크로코스파에라 와트소니이(Crocosphaera watsonii), 시아노테세 속(Cyanothece sp.), 마이크로시스티스 아에루기노사(Microcystis aeruginosa), 시네코코커스 속(Synechococcus sp.), 아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum), 암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii), 칼디셀룰로시럽토 베시이(Caldicelulosiruptor bescii), 칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 나트라나에로비우스 써모필러스 (Natranaerobius thermophilus), 펠로토마큘럼 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum), 아시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus), 아시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans), 알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum), 마리노박터 속(Marinobacter sp.), 니트로소코커스 할로필러스(Nitrosococcus halophilus), 니트로소코커스 와트소니(Nitrosococcus watsoni), 슈도알테로 모나스

할로플란크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis), 크테도노박테르 라세미페르(Ktedonobacter racemifer), 메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum), 아나베나 바리아빌리스(Anabaena variabilis), 노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena), 노스톡 속(Nostoc sp.), 아르트로스피라 맥시마(Arthrospira maxima), 아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis), 아르트로스피라 속(Arthrospira sp.), 링비아속(Lyngbya sp.), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes), 오실라토리아 속(Oscillatoria sp.), 페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis), 써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus) 또는 아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina) 등 다양한 미생물 유래의 Cas9일 수 있다.

[873] "Cas9"은 gRNA와 결합하여 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열 또는 위치를 절단 또는 변형시키는 효소로서, gRNA가 상보적인 결합을 하는 핵산 가닥(strand)을 절단할 수 있는 HNH 도메인, gRNA와 비상보적인 결합을 하는 핵산 가닥(strand)을 절단할 수 있는 RuvC 도메인, 표적, 즉, 타겟을 인식하는 REC 도메인 및 PAM을 인식하는 PI 도메인으로 구성될 수 있다. 구체적인 Cas9의 구조적 특성은 Hiroshi Nishimasu et al. (2014) Cell 156:935-949를 참고할 수 있다.

[874] 또한, 상기 Type V CRISPR 효소으로는 Cpf1이 있으며, 상기 Cpf1은 Streptococcus, Campylobacter, Nitratifractor, Staphylococcus, Parvibaculum, Roseburia, Neisseria, Gluconacetobacter, Azospirillum, Sphaerochaeta, Lactobacillus, Eubacterium, Corynebacter, Carnobacterium, Rhodobacter, Listeria, Paludibacter, Clostridium, Lachnospiraceae, Clostridiaridium, Leptotrichia, Francisella, Legionella, Alicyclobacillus, Methanomethyophilus, Porphyromonas, Prevotella, Bacteroidetes, Helcococcus, Letospira, Desulfovibrio, Desulfonatronum, Opitutaceae, Tuberibacillus, Bacillus, Brevibacilus, Methylobacterium 또는 Acidaminococcus 유래의 Cpf1일 수 있다.

[875] 상기 Cpf1은 Cas9의 RuvC 도메인에 상응하는 유사한 RuvC 도메인이 있으며, Cas9의 HNH 도메인은 결핍되어 있고, 대신에 Nuc 도메인을 포함하며, 타겟을 인식하는 REC 도메인과 WED 도메인 및 PAM을 인식하는 PI 도메인으로 구성될 수 있다. 구체적인 Cpf1의 구조적 특성은 Takashi Yamano et al. (2016) Cell 165:949-962를 참고할 수 있다.

[876] 상기 Cas9 또는 Cpf1 단백질 등의 CRISPR 효소는 자연상태에서 존재하는 미생물에서 분리된 것 또는 재조합적 방법 또는 합성적 방법으로 비자연적으로 생산된 것일 수 있다.

[877]

[878] ***Type II CRISPR 효소***

[879] Type II CRISPR 효소의 결정 구조는 2종 이상의 자연유래 미생물 Type II CRISPR 효소 분자에 대한 연구(Jinek et al., Science, 343(6176):1247997, 2014) 및 gRNA와 함께 복합체를 이루는 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9(SpCas9)에

대한 연구(Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014; 및 Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579)를 통해 결정되었다.

[880] Type II CRISPR 효소는 2개의 로브, 즉, 인식(REC) 및 뉴클레아제(NUC) 로브를 포함하며, 각각의 로브는 여러 개의 도메인을 포함한다.

[881] 상기 REC 로브는 아르기닌-풍부 브릿지 나선(BH), REC1 도메인 및 REC2 도메인을 포함한다.

[882] 이때, 상기 BH 도메인은 긴 α-나선 및 아르기닌 풍부 영역이며, 상기 REC1 및 REC2 도메인은 gRNA 내의 형성되는 이중가닥의, 예를 들어, 단일가닥 gRNA, 이중 gRNA 또는 tracrRNA의 인식에 중요한 역할을 한다.

[883] 상기 NUC 로브는 RuvC 도메인, HNH 도메인 및 PAM-상호작용(PI) 도메인을 포함한다. 이때, 상기 RuvC 도메인은 RuvC-유사 도메인을 포괄하는 의미로 사용되고, 또한 상기 HNH 도메인은 HNH-유사 도메인을 포괄하는 의미로 사용된다.

[884] 이때, 상기 RuvC 도메인은 Type II CRISPR 효소를 포함하는 자연상태에 존재하는 미생물의 구성원에 대해 구조적으로 유사성을 공유하며, 단일가닥, 예를 들어 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단한다. 상기 RuvC 도메인은 종종 당업계에서 RuvCI 도메인, RuvCII 도메인 및 RuvCIII 도메인으로서, 통상적으로 RuvC I, RuvCII 및 RuvCIII로 지칭된다. 예를 들어, SpCas9의 경우, 상기 RuvC 도메인은 SpCas9의 아미노산 서열 1 내지 59, 718 내지 769 및 909 내지 1098에 위치하는 각각 3 개의 분할 RuvC 도메인(RuvC I, RuvCII 및 RuvCIII)으로부터 조립된다.

[885] 상기 HNH 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 구조적 유사성을 공유하며, 단일가닥, 예를 들어 표적 핵산 분자의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단한다. HNH 도메인은 RuvC II와 III 모티프 사이에 위치한다. 예를 들어, SpCas9의 경우, HNH 도메인은 SpCas9의 아미노산 서열 775 내지 908에 위치한다.

[886] 상기 PI 도메인은 표적 유전자 또는 핵산 내의 특정 염기서열, 즉, PAM(Protospacer adjacent motif)을 인식하거나 또는 PAM과 상호작용한다. 예를 들어, SpCas9의 경우, PI 도메인은 SpCas9의 아미노산 서열 1099 내지 1368에 위치한다.

[887] 이때, 상기 PAM은 Type II CRISPR 효소의 유래에 따라 다를 수 있다. 예를 들어, CRISPR 효소가 SpCas9 인 경우 PAM은 5'-NGG-3'일 수 있고, 스트렙토코커스 써모필러스 Cas9(StCas9)인 경우 PAM은 5'-NNAGAAW-3'(W = A or T)일 수 있고, 네이세리아 메닝기디티스 Cas9(NmCas9)인 경우 PAM은 5'-NNNNGATT-3'일 수 있고, 캄필로박터 제주니 Cas9(CjCas9)의 경우 PAM은 5'-NNNVRYAC-3' (V = G or C or A, R = A or G, Y = C or T)일 수 있으며, 이때 상기 N은 A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C일 수 있다.

[888]

[889] ***Type V CRISPR 효소***

[890] Type V CRISPR 효소는 Type II CRISPR 효소의 RuvC 도메인에 상응하는 유사한 RuvC 도메인이 있으며, Type II CRISPR 효소의 HNH 도메인은 결핍되어 있고, 대신에 Nuc 도메인을 포함하며, 타겟을 인식하는 REC 도메인과 WED 도메인 및 PAM을 인식하는 PI 도메인으로 구성될 수 있다. 구체적인 Type V CRISPR 효소의 구조적 특성은 Takashi Yamano et al. (2016) Cell 165:949-962를 참고할 수 있다.

[891] Type V CRISPR 효소는 gRNA와 상호작용할 수 있으며, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 형성할 수 있고, gRNA와 협력하여 가이드 서열을 및 PAM 서열을 포함하는 표적 서열로 근접시킬 수 있다. 이때, 표적 유전자 또는 핵산과 상호작용하기 위한 Type V CRISPR 효소의 능력은 PAM 서열에 의존적이다.

[892] 상기 PAM 서열은 표적 유전자 또는 핵산 내에 존재하는 서열로, Type V CRISPR 효소의 PI 도메인에 의해 인식될 수 있다. 상기 PAM 서열은 Type V CRISPR 효소의 유래에 따라 그 서열이 다를 수 있다. 즉, 종마다 특이적으로 인식할 수 있는 PAM 서열이 존재한다.

[893] 일 예로, Cpf1이 인식하는 PAM 서열은 5'-TTN-3' (N은 A, T, C 또는 G)일 수 있다.

[894]

[895] **CRISPR 효소 활성**

[896] CRISPR 효소는 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하며, 이중가닥 또는 단일가닥의 파손 또는 결손을 초래하는 뉴클레아제 활성을 가진다. 일반적으로 야생형 Type II CRISPR 효소 또는 Type V CRISPR 효소는 일반적으로 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 절단한다.

[897] CRISPR 효소의 상기와 같은 뉴클레아제 활성을 변형 또는 변경하기 위해서, CRISPR 효소는 조작 또는 변형될 수 있으며, 이러한 조작 또는 변형된 CRISPR 효소는 불완전 또는 부분 활성 효소 또는 불활성 효소로 변형될 수 있다.

[898]

[899] ***불완전 또는 부분 활성 효소***

[900] CRISPR 효소가 변형하여 효소 활성을 변경시켜 불완전 또는 부분 활성을 가지도록 한 CRISPR 효소를 니카아제(nickase)로 명칭한다.

[901] "니카아제(nickase)"는 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 중 한 가닥만 절단되도록 조작 또는 변형된 CRISPR 효소를 의미하며, 상기 니카아제는 단일가닥, 예를 들어, 표적 유전자 또는 핵산의 gRNA와 비상보성 가닥 또는 상보성 가닥을 절단하는 뉴클레아제 활성을 가진다. 따라서, 이중가닥을 절단하기 위해서는 2개의 니카아제의 뉴클레아제 활성이 필요하다.

[902] 예를 들어, 상기 니카아제는 RuvC 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가질 수 있다. 즉, 상기 니카아제는 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 포함하지

않을 수 있으며, 이를 위해 HNH 도메인은 조작 또는 변경될 수 있다.

[903] 일 예로, CRISPR 효소가 Type II CRISPR 효소일 때,

[904] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 840번 히스티딘을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, HNH 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 RuvC 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가지므로, 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 있다.

[905] 다른 일 구체예로, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 559번 히스티딘을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, HNH 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 RuvC 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가지므로, 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 있다.

[906] 예를 들어, 상기 니카아제는 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가질 수 있다. 즉, 상기 니카아제는 RuvC 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 포함하지 않을 수 있으며, 이를 위해 RuvC 도메인은 조작 또는 변경될 수 있다.

[907] 일 예로, CRISPR 효소가 Type II CRISPR 효소일 때,

[908] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 10번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가지므로, 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 있다.

[909] 다른 일 구체예로서, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 8번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가지므로, 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 있다.

[910]

[911] ***불활성 효소***

[912] CRISPR 효소를 변형시켜 효소 활성이 완전히 불활성화 된 CRISPR 효소를 불활성 CRISPR 효소로 명칭한다.

[913] "불활성 CRISPR 효소"는 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 모두 절단할 수 없도록 변형된 CRISPR 효소를 의미하며, 상기 불활성 CRISPR 효소는 야생형 CRISPR 효소의 뉴클레아제 활성을 가지는 도메인에 변이로 인한 뉴클레아제 불활성을 가진다. 상기 불활성 CRISPR 효소는 RuvC 도메인 및 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 불화성화된 것일 수 있다.

[914] 예를 들어, 상기 불활성 CRISPR 효소는 뉴클레아제 활성을 불활성화시키기 위해, RuvC 도메인 및 HNH 도메인을 조작 또는 변경할 수 있다.

[915] 일 예로, CRISPR 효소가 Type II CRISPR 효소일 때,

[916] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 10번 아스파르트산과 840번 히스티딘을 모두 알라닌으로 변이(mutation)시키면, RuvC 도메인 및 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 모두 절단할 수 없다.

[917] 다른 일 구체예로서, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 8번 아스파르트산과 559번 히스티딘을 모두 알라닌으로 변이(mutation)시키면, RuvC 도메인 및 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 모두 절단할 수 없다.

[918]

[919] *그 밖의 활성*

[920] CRISPR 효소는 상기 기재된 뉴클레아제 활성 외에도, 엔도뉴클레아제 활성, 엑소뉴클레아제 활성 또는 헬리카제 활성, 즉, 이중가닥 핵산의 나선 구조를 푸는 능력을 가질 수 있다.

[921] 또한, CRISPR 효소는 CRISPR 효소의 엔도뉴클레아제 활성, 엑소뉴클레아제 활성 또는 헬리카제 활성은 완전 활성, 불완전 또는 부분 활성, 또는 불활성이 되도록 CRISPR 효소를 변형시킬 수 있다.

[922]

[923] **CRISPR 효소의 표적화**

[924] CRISPR 효소는 gRNA와 상호작용할 수 있으며, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 형성할 수 있고, gRNA와 협력하여 가이드 서열을 및 PAM 서열을 포함하는 표적 서열로 근접시킬 수 있다. 이때, 표적 유전자 또는 핵산과 상호작용하기 위한 CRISPR 효소의 능력은 PAM 서열에 의존적이다.

[925] 상기 PAM 서열은 표적 유전자 또는 핵산 내에 존재하는 서열로, CRISPR 효소의 PI 도메인에 의해 인식될 수 있다. 상기 PAM 서열은 CRISPR 효소의 유래에 따라 그 서열이 다를 수 있다. 즉, 종마다 특이적으로 인식할 수 있는 PAM 서열이 존재한다.

[926] 일 예로, CRISPR 효소가 Type II CRISPR 효소일 때,

[927] SpCas9인 경우, PAM 서열은 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' 또는/및 5'-NGA-3'일 수 있고,

[928] StCas9인 경우, PAM 서열은 5'-NGGNG-3' 또는/및 5'-NNAGAAW-3'(W = A 또는 T)일 수 있으며,

[929] NmCas9인 경우, PAM 서열은 5'-NNNNGATT-3' 또는/및 5'-NNNGCTT-3'일 수 있고,

[930] CjCas9의 경우, PAM 서열은 5'-NNNVRYAC-3' (V = G, C 또는 A; R = A 또는 G; Y = C 또는 T)일 수 있으며,

[931] 스트렙토코커스 뮤탄스 Cas9(SmCas9)의 경우, PAM 서열은 5'-NGG-3' 및/또는 5'-NAAR-3'(R = A 또는 G)일 수 있고,

[932] 스타필로코커스 아우레우스 Cas9(SaCas9)의 경우, PAM 서열은 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' 또는/및 5'-NNGRRV-3' (R = A 또는 G; V = G, C 또는 A)일 수 있다.

[933] 다른 일 예로, CRISPR 효소가 Type V CRISPR 효소일 때,

[934] Cpf1의 경우, PAM 서열은 5'-TTN-3'일 수 있다.

[935] 이때, 상기 N은 A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C일 수 있다.

[936] 이러한 종마다 특이적으로 인식할 수 있는 PAM 서열을 이용하면, 특이적 PAM 서열을 인식할 수있는 CRISPR 효소를 조작 또는 변형할 수 있다. 예를 들어, SpCas9의 뉴클레아제 활성을 가지며, CjCas9 특이적 PAM 서열을 인식할 수 있도록 SpCas9의 PI 도메인을 CjCas9의 PI 도메인으로 교체할 수 있고, 이를 통해 CjCas9 특이적 PAM 서열을 인식하는 SpCas9을 생성할 수 있다. 이러한 PI 도메인의 치환 또는 교체를 통해, 특이적으로 인식하는 PAM 서열을 변경 설계할 수 있다.

[937]

[938] **CRISPR 효소 변이체**

[939] CRISPR 효소의 뉴클레아제 활성, 헬리카제 활성, gRNA와 상호작용 능력, 및 표적 유전자 또는 핵산에 근접 능력, 예를 들어 PAM 인식 능력 등의 다양한 특성을 향상 또는 저해시킬 수 있도록, CRISPR 효소를 변이시킬 수 있다.

[940] 또한, CRISPR 효소 변이체는 gRNA와 상호작용을 통한 gRNA-CRISPR 효소 복합체 형성, 즉, CRISPR 복합체를 형성하여 표적 유전자 또는 핵산에 근접 또는 국소화될 때, gRNA와 일부 상보적 결합을 하는 비표적 유전자 또는 핵산 및 상보적 결합을 하지 않는 비표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하지 않고, 오직 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥만을 절단할 수 있도록 표적 특이성을 향상시킨 변형 또는 조작된 CRISPR 효소일 수 있다.

[941] 이때, 상기 gRNA와 일부 상보적 결합을 하는 비표적 유전자 또는 핵산 및 상보적 결합을 하지 않는 비표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥이 절단되는 효과를 오프-타겟(off-target) 효과로 지칭되며, 상기 gRNA와 일부 상보적 결합을 하는 비표적 유전자 또는 핵산 및 상보적 결합을 하지 않는 비표적 유전자 또는 핵산의 위치 또는 염기서열은 오프-타겟으로 지칭되고, 이때, 오프-타겟의 개수는 하나 이상일 수 있다. 이와 반대로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥의 절단 효과는 온-타겟(on-target) 효과라 지칭되면, 표적 유전자 또는 핵산의 위치 또는 표적서열은 온-타겟으로 지칭된다.

[942] CRISPR 효소 변이체는 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소의 아미노산이 적어도 하나 이상 변형된 것으로, 변형되지 않은 CRISPR 효소에 비해 뉴클레아제 활성, 헬리카제 활성, gRNA와 상호작용 능력, 표적 유전자 또는 핵산에 근접 능력 및 표적 특이성 중 하나 이상의 특성이 변형, 예를 들어, 향상 또는 저해될 수 있다. 이때, 상기 변형은 아미노산 치환, 제거, 부가 또는 이의 혼합일 수 있다.

[943] CRISPR 효소 변이체에서,

[944] 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 양전하를 가지는 아미노산들로 구성된 부위(region)에 위치한 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[945] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 양전하를 가지는 아미노산, 즉, 리신(Lysine, K), 아르기닌(Arginine, R) 및 히스티딘(histidine, H) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[946] 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 양전하를 가지지 않는 아미노산들로 구성된 부위(region)에 위치한 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[947] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 양전하를 가지지 않는 아미노산, 즉, 아스파르트산(Aspartic aicd, D), 글루탐산(Glutamic acid, E), 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I), 류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[948] 다른 예로, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 전하를 가지지 않는 아미노산, 즉, 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I), 류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[949] 또한, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 소수성(hydrophobic) 잔기를 가지는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[950] 예를 들면, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I), 류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[951] 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 극성(polar) 잔기를 가지는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[952] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 리신(Lysine, K), 아르기닌(Arginine, R), 히스티딘(histidine, H), 아스파르트산(Aspartic aicd, D)

및 글루탐산(Glutamic acid, E) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[953] 또는, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 리신(Lysine, K), 아르기닌(Arginine, R) 및 히스티딘(histidine, H)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[954] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 리신(Lysine, K), 아르기닌(Arginine, R) 및 히스티딘(histidine, H)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 치환일 수 있다.

[955] 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 아스파르트산(Aspartic aicd, D) 및 글루탐산(Glutamic acid, E)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[956] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 아스파르트산(Aspartic aicd, D) 및 글루탐산(Glutamic acid, E)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 치환일 수 있다.

[957] 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I), 류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[958] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I), 류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 치환일 수 있다.

[959]

[960] 또한, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 아미노산들 중 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱 또는 그 이상의 아미노산들의 변형일 수 있다.

[961]

[962] 또한, CRISPR 효소 변이체에서,

[963] 상기 변형은 CRISPR 효소의 RuvC 도메인에 존재하는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다. 이때, 상기 RuvC 도메인은 RuvCI, RuvCII 또는 RuvCIII 도메인일 수 있다.

[964] 상기 변형은 CRISPR 효소의 HNH 도메인에 존재하는 아미노산 중 하나 또는

둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[965] 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC 도메인에 존재하는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[966] 상기 변형은 CRISPR 효소의 PI 도메인에 존재하는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[967] 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC, RuvC, HNH 또는 PI 도메인 중 적어도 둘 이상의 도메인에 포함된 아미노산 중 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[968] 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC 및 RuvC 도메인에 포함된 아미노산 중 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[969] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC 및 RuvC 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965 및 F1038 아미노산 중 적어도 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[970] 다른 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC 및 HNH 도메인에 포함된 아미노산 중 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[971] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC 및 HNH 도메인에 포함된 포함된 A203, H277, G366, F539, I601 및 K890 아미노산 중 적어도 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[972] 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC 및 PI 도메인에 포함된 아미노산 중 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[973] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC 및 PI 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, T1102 및 D1127 아미노산 중 적어도 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[974] 다른 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC, RuvC 및 HNH 도메인에 포함된 아미노산 중 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[975] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC, RuvC 및 HNH 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965 및 F1038 아미노산 중 적어도 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[976] 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC, RuvC 및 PI 도메인에 포함된 아미노산 중 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[977] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC, RuvC 및 PI 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965, F1038, T1102 및 D1127 아미노산 중 적어도 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[978] 다른 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC, HNH 및 PI 도메인에 포함된 아미노산 중 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[979] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC, HNH 및 PI 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, K890, T1102 및 D1127 아미노산 중 적어도 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[980] 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 RuvC, HNH 및 PI 도메인에 포함된

아미노산 중 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[981] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 RuvC, HNH 및 PI 도메인에 포함된 M763, K890, D965, F1038, T1102 및 D1127 아미노산 중 적어도 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[982] 다른 일 예로, 상기 변형은 CRISPR 효소의 REC, RuvC, HNH 및 PI 도메인에 포함된 아미노산 중 넷 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[983] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC, RuvC, HNH 및 PI 도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965, F1038, T1102 및 D1127 아미노산 중 적어도 넷 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[984]

[985] 또한, CRISPR 효소 변이체에서,

[986] 상기 변형은 CRISPR 효소의 뉴클레아제 활성에 참여하는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[987] 예를 들어, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 D10, E762, H840, N854, N863 및 D986로 구성된 아미노산 그룹 중에 하나 또는 둘 이상의 변형일 수 있으며, 또는 다른 Cas9 orthologs의 이에 대응되는 아미노산 그룹 중에 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

[988] 상기 변형은 CRISPR 효소의 뉴클레아제 활성을 일부 불활성화시키는 변형일 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 니카아제일 수 있다.

[989] 이때, 상기 변형은 CRISPR 효소의 RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성을 불활성화시키는 변형일 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 없다.

[990] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 10번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, D10A로 변이시키면, RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 없다.

[991] 다른 일 구체예로서, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 8번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, D8A로 변이시키면, RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 없다.

[992] 또한 이때, 상기 변형은 CRISPR 효소의 HNH 도메인의 뉴클레아제 활성을 불활성화시키는 변형일 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 없다.

[993] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 840번 히스티딘을

알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, H840A로 변이시키면, HNH 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 없다.

[994] 다른 일 구체예로, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 559번 히스티딘을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, H559A로 변이시키면, HNH 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 없다.

[995]

[996] 또한, 상기 변형을 CRISPR 효소의 뉴클레아제 활성을 완전히 불활성화시키는 변형일 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 불활성 CRISPR 효소일 수 있다.

[997] 이때, 상기 변형은 CRISPR 효소의 RuvC 및 HNH 도메인의 뉴클레아제 활성을 불활성화 시키는 변형일 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 절단할 수 없다.

[998] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 10번 아스파르트산과 840번 히스티딘을 모두 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, D10A 및 H840A로 변이시키면, RuvC 도메인 및 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 모두 절단할 수 없다.

[999] 다른 일 구체예로서, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 8번 아스파르트산과 559번 히스티딘을 모두 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, D8A 및 H559A로 변이시키면, RuvC 도메인 및 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥을 모두 절단할 수 없다.

[1000]

[1001] 또한, CRISPR 효소 변이체는 CRISPR 효소의 원래 특성 이외에 선택적으로 기능적(functional) 도메인을 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 CRISPR 효소 변이체는 원래의 특성 이외에 부가적인 특성을 가질 수 있다.

[1002] 이때, 상기 기능적 도메인은 메틸라아제(methylase) 활성, 디메틸라아제(demethylase) 활성, 전사촉진(transcription activation) 활성, 전사 저해(transcription repression) 활성, 전사 방출 인자(transcription release factor) 활성, 히스톤 변형(histone modification) 활성, RNA 절단(cleavage) 활성 또는 핵산 결합(nucleic acid binding) 활성을 가지는 도메인일 수 있으며, 또는 단백질(펩타이드 포함)의 분리정제를 위한 태그(tag) 또는 리포터 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1003] 상기 기능적 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 디아미네이즈(deaminase)일 수 있다.

[1004] 예를 들어, 불완전 또는 부분 CRISPR 효소에 시티딘 디아미네이즈(cytidine deaminase)를 기능적 도메인으로 추가로 포함할 수 있다. 일 구체예로, SpCas9 니카아제에 시티딘 디아미네이즈, 예를 들면, APOBEC1(apolipoprotein B editing complex 1)를 추가하여 융합 단백질을 생성할 수 있다. 이렇게 형성된 [SpCas9 니카아제]-[APOBEC1]은 염기 C를 T 또는 U로 염기 교정 또는 편집에 이용되거나, 또는 염기 G를 A로 염기 교정 또는 편집에 이용될 수 있다.

[1005] 상기 태그는 히스티딘(His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그 및 티오레독신(Trx) 태그 등을 포함하며, 상기 리포터 유전자는 글루타티온-S-트랜스 퍼라제(GST), 호스라디시(horseradish) 과산화효소(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 녹색 형광 단백질(GFP), HcRed, DsRed, 청록색 형광 단백질(CFP), 황색 형광 단백질(YFP) 및 청색 형광 단백질(BFP)을 포함하는 자가형광 단백질을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[1006] 또한, 상기 기능적 도메인은 NLS(nuclear localization sequence or signal) 또는 NES(nuclear export sequence or signal)일 수 있다.

[1007] 일 예로, CRISPR 효소는 하나 이상의 NLS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 NLS는 CRISPR 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 또는 이들의 조합에 하나 이상의 NLS를 포함할 수 있다. 상기 NLS는 하기로부터 유래된 NLS 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: 아미노산 서열 PKKKRKV를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin)으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKKAGQAKKKK를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD 또는 RQRRNELKRSP를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY를 갖는 hRNPA1 M9 NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 마이오마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP 및 PPKKARED; 인간 p53의 서열 POPKKKPL; 마우스 c-abl IV의 서열 SALIKKKKKMAP; 인플루엔자 바이러스 NS1의 서열 DRLRR 및 PKQKKRK; 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL; 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR; 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK; 및 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNLEARKTKK.

[1008]

[1009] 또한, CRISPR 효소 변이체는 CRISPR 효소를 분할하여 두 개 이상의 부분으로 나눈 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소를 포함할 수 있다. "스플릿(split)"은 단백질을 기능적으로 또는 구조적으로 또는 임의로 두 개 이상으로 분할하는

것을 의미한다.

[1010] 이때, 상기 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소는 완전 활성 효소, 불완전 또는 부분 활성 효소 또는 불활성 효소일 수 있다.

[1011] 예를 들어, SpCas9의 경우, 656번 타이로신과 657번 트레오닌 사이를 분할하여 두 개의 부분으로 나눈 스플릿 SpCas9을 생성할 수 있다.

[1012] 또한, 상기 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소는 선택적으로 재구성(reconstitution)을 위한 추가 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[1013] 이때, 상기 "재구성"은 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소가 구조적으로 야생형 CRISPR 효소와 동일하거나 유사하도록 하는 것을 의미한다.

[1014] 상기 재구성(reconstitution)을 위한 추가 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 FRB 및 FKBP dimerization domains; 인테인(intein); ERT 및 VPR domains 또는 특정 조건에서 이량이질체(heterodimer)를 형성하는 도메인일 수 있다.

[1015] 예를 들어, SpCas9의 경우, 713번 세린과 714번 글라이신 사이를 분할하여 두 개의 부분으로 나눈 스플릿 SpCas9에 두 부분 중 하나에 FRB 도메인을 연결하고, 나머지 하나에 FKBP 도메인을 연결할 수 있다. 이렇게 생성된 스플릿 SpCas9은 라파마이신이 존재하는 환경에서 FRB 도메인과 FKBP 도메인이 다이머를 형성하여 재구성된 CRISPR 효소를 생성할 수 있다.

[1016]

[1017] 본 발명에서 기재한 CRISPR 효소 또는 CRISPR 효소 변이체는 폴리펩타이드, 단백질 또는 이를 암호화하는 서열을 가지는 핵산일 수 있으며, 상기 CRISPR 효소 또는 CRISPR 효소 변이체를 도입하고자 하는 대상에 맞추어 코돈 최적화(codon optimization)된 것일 수 있다.

[1018] "코돈 최적화"는 고유 서열의 적어도 하나의 코돈을 숙주 세포의 유전자에 더욱 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체하면서, 고유 아미노상 서열을 유지함으로써 관심 숙주 세포에서의 발현의 증진을 위해 핵산서열을 변형시키는 과정을 의미한다. 다양한 종은 특정 아미노산의 특정 코돈에 대한 특정 편향을 가지며, 코돈 편향(유기체 간의 코돈 사용의 차이)은 종종 mRNA의 번역의 효율과 상호관련 되며, 이는 번역되는 코돈의 특성 및 특정 tRNA 분자의 이용가능성에 의해 좌우되는 것을 여겨진다. 세포에서 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩타이드 합성에 가장 빈번하게 사용되는 코돈을 반영한 것이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화에 기초하여 주어진 유기체에서 최적의 유전자 발현을 위해 맞춤화될 수 있다.

[1019]

[1020] **3. 표적 서열**

[1021] "표적 서열"은 표적 유전자 또는 핵산 내에 존재하는 염기서열로, 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보성을 가진다. 표적

서열은 표적 유전자 또는 핵산에 따라, 즉 유전자 조작 또는 교정하고자 하는 대상에 따라 달라질 수 있는 염기서열로, 표적 유전자 또는 핵산에 따라 다양하게 설계될 수 있다.

[1022] 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열과 상보적인 결합을 할 수 있으며, 상기 표적 서열의 길이는 가이드 서열의 길이와 동일할 수 있다.

[1023] 상기 표적 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[1024] 구현예로서 상기 표적서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[1025] 상기 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[1026] 일 예로, 상기 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적이지 않은 1 내지 8개의 염기서열을 가지거나 또는 포함할 수 있다.

[1027] 또한, 상기 표적 서열은 에디터단백질이 인식할 수 있는 핵산서열에 근접한 위치에 위치한 염기서열일 수 있다.

[1028] 일 예로, 상기 표적 서열은 에디터단백질이 인식할 수 있는 핵산서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[1029]

[1030] 본 발명의 표적 서열의 일 구체예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 대한 표적 서열을 하단에 기술하였다.

[1031] gRNA-CRISPR 효소 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 표적하는 경우,

[1032] 표적 서열은 gRNA의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보성을 가진다. 표적 서열은 표적 유전자 또는 핵산에 따라, 즉 유전자 조작 또는 교정하고자 하는 대상에 따라 달라질 수 있는 염기서열로, 표적 유전자 또는 핵산에 따라 다양하게 설계될 수 있다.

[1033] 또한, 표적 서열은 CRISPR 효소, 즉 Cas9 또는 Cpf1이 인식할 수 있는 PAM 서열에 근접한 위치에 위치한 염기서열일 수 있다.

[1034] 일 예로, 상기 표적 서열은 CRISPR 효소가 인식할 수 있는 PAM 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[1035] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SpCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' 또는/및 5'-NGA-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일

수 있다.

[1036] 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 StCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGGNG-3' 또는/및 5'-NNAGAAW-3' (W = A 또는 T이며, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1037] 또 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 NmCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNNNGATT-3' 또는/및 5'-NNNGCTT-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1038] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 CjCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNNVRYAC-3' (V = G, C 또는 A; R = A 또는 G 이며, Y = C 또는 T 이고, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1039] 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SmCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGG-3' 및/또는 5'-NAAR-3'(R = A 또는 G이며, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1040] 또 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SaCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' 또는/및 5'-NNGRRV-3' (R = A 또는 G이며, V = G, C 또는 A이고, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1041] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 Cpf1인 경우, 상기 표적 서열은 5'-TTN-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[1042]

[1043] 본 발명의 일 구체예로서,

[1044] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1045] 또는

[1046] 상기 표적서열은 PMP22 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1047] 또는

[1048] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 조절영역, 암호화 영역, 비 암호화 영역 또는 이들 조합의 핵산 서열일 수 있다.

[1049] 또는

[1050] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site, Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box의 서열 또는 이의 조합의 핵산 서열일 수 있다.

[1051] 또는

[1052] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 조합의 핵산 서열일 수 있다.

[1053] 또는

[1054] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 돌연변이 부분(예를 들면, 야생형 유전자와 다른 부분)을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1055] 또는

[1056] 상기 표적 서열은 PMP22 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1057]

[1058] 본 발명의 일 구체예로서, PMP22 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 나타낸 서열일 수 있다.

[1059]

[1060] **[조작 생성물]**

[1061] **4.** 가이드핵산-에디터단백질 복합체 및 이의 이용

[1062] 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 대상을 변형시킬 수 있다.

[1063] 상기 대상은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질일 수 있다.

[1064] 예를 들어, 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 최종적으로 대상하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 할 수 있도록 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 새로운 단백질을 발현할 수 있도록 한다.

[1065] 이때, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 DNA, RNA, 유전자 또는 염색체 수준에서 작용할 수 있다.

[1066] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 DNA를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1067] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 RNA를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1068] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1069] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 염색체를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1070] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 유전자의 전사와 번역의 단계에서 작용할 수 있다.

[1071] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자의 전사를 촉진 또는 저해하여 표적 유전자가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1072] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자의 번역을 촉진 또는 저해하여 표적 유전자가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1073] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 단백질 수준에서 작용할 수 있다.

[1074] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 단백질을 조작 또는 변형하여 표적 단백질 제거 또는 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1075]

[1076] 일 구체예로서, 본 발명은 SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22 유전자를 조작하기 위해 사용되는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 제공한다. 바람직하게는 gRNA-CRISPR 효소 복합체를 제공한다.

[1077] 특히, 유전자로부터의 표적 서열과 상보적 결합을 할 수 있는 가이드 도메인을 포함하는 gRNA, 예를 들어 단리된 또는 비천연 유래 gRNA 및 이를 암호화하는 DNA를 제공할 수 있다. 상기 gRNA 및 이를 암호화하는 DNA 서열은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7의 표적 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 설계될 수 있다.

[1078] 또한, gRNA의 표적 부위는 PMP22 유전자에서 핵산 변형, 예를 들어 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손; 또는 표적 위치에 특정 기능을 가지는 제 3의 유전자를 제공하도록 구성된다.

[1079] 또한, 2 개 이상의 gRNA가 표적 유전자에서 2 개 이상의 절단 사건, 예를 들어 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 위치시키기 위해 사용될 때, 2 개 이상의 절단 사건이 동일 또는 상이한 Cas9 단백질에 의해 생성될 수 있다.

[1080] 상기 gRNA 는 예를 들어,

[1081] PMP22 유전자의 유전자 내에서 2 이상의 부위를 표적으로 할 수 있고,

[1082] PMP22 유전자의 이중 가닥 및/또는 단일 가닥 절단을 독립적으로 유도할 수 있고,

[1083] PMP22 유전자의 절단 부위에 하나 외부 유래 뉴클레오타이드의 삽입을 유도할 수도 있다.

[1084]

[1085] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 구성하는 핵산은

[1086] (a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 PMP22 유전자의 표적 서열에 상보성인 가이드 도메인을 포함하는 가이드핵산을 암호화하는 서열; 및

[1087] (b) 에디터단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

[1088] 이때, 상기 (a)는 표적 부위에 따라 2 이상 존재할 수 있고, (b)는 동종 또는 2종 이상의 에디터단백질을 사용할 수 있다.

[1089] 구현예에서, 핵산은 PMP22 유전자의 발현을 감소시키거나, 줄이거나 또는 억제하기 위해 넉아웃 또는 넉다운 표적 위치에 충분히 가깝도록 효소적으로 활성이거나 또는 부분활성인 에디터단백질을 표적화하도록 구성한다.

[1090] 다른 구현예에서, 핵산은 PMP22 유전자의 발현을 감소시키거나, 줄이거나 또는 억제하기 위해 넉다운 표적 위치에 충분히 가깝도록 효소적으로 불활성인 에디터단백질 또는 이의 융합단백질(예를 들어, 전사 리프레서 도메인 융합)을 표적화하도록 구성한다.

[1091]

[1092] 이 밖에도, 앞서 설명한 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 구조, 기능, 활용의 모든 양태를 적용하여, SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22 유전자의 조작에 사용할 수 있음은 자명할 것이다.

[1093]

[1094] **가이드핵산-에디터단백질 복합체의 이용**

[1095] 본 발명의 가이드핵산-에디터단백질 복합체 이용의 일 구체예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체를 이용한 표적 DNA, RNA, 유전자 또는 염색체의 조작 또는 변형에 대해 하단에 기술하였다.

[1096]

[1097] *유전자 조작*

[1098] 앞서 기재한 gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정할 수 있다. 이때, 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정은 i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상과 ii) 손상된 표적 유전자 또는 핵산의 수선 또는 수복하는 단계를 모두 포함한다.

[1099]

[1100] ***i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상***

[1101] i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상일 수 있으며, 구체적으로는 표적 유전자 또는 핵산 내의 표적 서열의 절단 손상일 수 있다.

[1102] 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 표적 서열의 이중가닥이 모두 절단 또는 손상되는 것일 수 있다.

[1103] 일 구체예로서, 야생형의 SpCas9을 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 모두 절단될 수 있다.

[1104] 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단될 수 있고,

각각의 절단은 순차적으로 또는 동시에 발생할 수 있다.

[1105] 또 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)와 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNS와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단될 수 있고, 각각의 절단은 순차적으로 또는 동시에 발생할 수 있다.

[1106]

[1107] 다른 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 표적 서열 중 단일가닥만 절단 또는 손상되는 것일 수 있다. 이때, 단일가닥은 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥일 수 있고, 또는 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥일 수 있다.

[1108] 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 절단되지 않을 수 있다.

[1109] 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 절단되지 않을 수 있다.

[1110]

[1111] 또 다른 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 일부 핵산 조각(fragment)를 제거하는 것일 수 있다.

[1112] 일 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 야생형 SpCas9을 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥을 절단하고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥을 절단하여 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 SpCas9에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1113] 다른 일 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 야생형 SpCas9 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 야생형 SpCas9에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 야생형 SpCas9, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1114] 또 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 SpCas9

니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1115] 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 세 개의 gRNA와 야생형 SpCas9 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 야생형 SpCas9에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되며, 제 3 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA, 제 2 gRNA 및 제 3 gRNA와 야생형 SpCas9, SpCas9 니카아제(D10A) 및 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1116] 또 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 네 개의 gRNA와 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되며, 제 3 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 4 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA, 제 2 gRNA, 제 3 gRNA 및 제 4 gRNA와 SpCas9 니카아제(D10A)및 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1117]

[1118] ***ii) 손상된 표적 유전자 또는 핵산의 수선 또는 수복***

[1119] 상기 CRISPR 복합체에 의해 절단 또는 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 비-상동성 말단-결합 (NHEJ) 및 상동 재조합 수리(HDR)을 통해 수선 또는 수복될 수 있다.

[1120]

[1121] ***비-상동성 말단-결합 (Non-homologous end joining, NHEJ)***

[1122] NHEJ는 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 양 말단이 함께 결합함으로써 DNA 내 이중가닥 파손을 수복 또는 수선하는 방법으로, 일반적으로, 이중가닥의 파손(예를 들어, 절단)에 의해 형성된 2 개의 적합성 말단이 빈번한 접촉을 반복하여 2개의 말단이 완전히 결합되는 경우 파손된 이중가닥이 복구된다. NHEJ는 모든 세포주기에서 가능한 수복 방식으로, 주로 G1 시기와 같이 세포 내에 주형으로 쓸 상동유전체가 없을 때 발생한다.

[1123] NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에서 NHEJ 수선 부위에 핵산 서열의 일부 삽입 및/또는 결실(삽입결실)을 초래하며, 이러한 삽입 및/또는 결실은 리딩 프레임을 변경시키고, 프레임쉬프트 된 전사체 mRNA를 만들어내고, 결과적으로 넌센스-매개 붕괴(nonsense mediated decay)를 겪거나 정상적인 단백질을 합성하는데 실패함으로써 본래의 기능을 상실하게 된다. 또는 추가적으로, 리딩 프레임을 유지하지만, 상당한 양의 서열을 삽입 또는 결실시키는 돌연변이를 초래해 단백질의 기능성을 파괴할 수 있다. 이는 중요한 기능적 도메인의 돌연변이가 단백질의 비중요 영역에서의 돌연변이보다 덜 용인될 가능성이 있기 때문에 좌위 의존적이다.

[1124] NHEJ에 의해 생성된 삽입결실 돌연변이는 자연 상태에서 예측 불가능하지만, 주어진 파손 부위에서 특정 삽입 결실 서열이 선호되며, 이는 마이크로상동성의 작은 영역에 기인할 가능성이 있다. 통상적으로 결실 길이는 1 bp 내지 50 bp 범위이며, 삽입은 더 짧게 되는 경향이 있고, 종종 파손 부위를 바로 둘러싸는 짧은 중복 서열을 포함한다.

[1125] 또한, NHEJ는 돌연변이를 유발하는 과정으로, 특이적 최종 서열의 생성이 필요하지 않은 경우, 작은 서열의 모티프를 결실시키는데 사용될 수 있다.

[1126] 이러한 NHEJ를 이용하면, CRISPR 복합체에 의해 표적되는 유전자의 특이적 넉아웃(knockout)할 수 있다. CRISPR 효소, 예를 들어, Cas9 또는 Cpf1을 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 두 개의 단일가닥의 절단하고, 파손된 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 두 개의 단일가닥은 NHEJ에 의해 삽입결실이 생성되며, 이를 통해 표적 유전자 또는 핵산의 특이적 넉아웃을 유도할 수 있다. 이때, 상기 CRISPR 효소에 의해 절단되는 표적 유전자 또는 핵산의 위치는 비암호 영역 또는 암호 영역일 수 있으며, 더불어 NHEJ에 의해 수복되는 표적 유전자 또는 핵산의 위치는 비암호 영역 또는 암호 영역일 수 있다.

[1127]

[1128] ***상동 재조합 수리(homology directed repairing, HDR)***

[1129] HDR은 손상된 유전자 또는 핵산을 수선 또는 수복하기 위해 상동성을 가진 서열을 주형으로 이용하는 방식으로 오류 없이 교정할 수 있는 방법으로, 일반적으로, 파손된 DNA을 수선 또는 수복하기 위해, 즉 세포가 가지고 있는 원래의 정보를 복원하기 위해, 변형이 이루어지지 않은 상보적인 염기서열의 정보를 이용하거나 자매 염색분체의 정보를 이용하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복한다. HDR의 가장 일반적인 형태는 상동성 재조합(homologous recombination, HR)이다. HDR은 통상적으로 활발하게 분열하는 세포의 S나 G2/M 시기에 주로 발생하는 수선 또는 수복 방식이다.

[1130] HDR을 이용한 손상된 DNA 수선 또는 수복을 위해, 세포가 본래 가지는 상보적인 염기서열 또는 자매 염색분체를 이용하는 대신에, 상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열 정보를 이용한 인공적으로 합성한 DNA 주형, 즉,

상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복할 수 있다. 이때, 상기 핵산 주형에 추가로 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함시켜 파손된 DNA를 수선 또는 수복 할 때, 파손된 DNA에 추가로 포함시킨 핵산 서열 또는 핵산 조작을 삽입(Knock-In)할 수 있다. 추가로 포함시킨 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1131] 일 예로, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하고, 절단 위치와 근접한 염기서열과 상보적인 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 염기서열을 HDR 방법으로 수선 또는 수복할 수 있다.

[1132] 이때, 상기 상보적인 염기서열을 포함하는 핵산 주형은 파손된 DNA, 즉 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 상보적인 염기서열을 가지며, 추가로 파손된 DNA에 삽입하기 원하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함할 수 있다. 이와 같이 상보적인 염기서열과 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함하는 핵산 주형을 이용하여 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 위치에 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각을 삽입할 수 있다. 이때, 상기 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각 및 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있다. 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 오른쪽 및 왼쪽의 염기서열과 상보적인 결합을 하는 염기서열일 수 있다. 또는 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 3' 및 5' 말단과 상보적인 결합을 하는 염기서열일 수 있다. 상기 상보적인 염기서열은 15 내지 3000개의 염기서열일 수 있으며, 핵산 주형의 크기 또는 표적 유전자 또는 핵산에 따라 적절하게 상기 상보적인 염기서열의 길이 또는 크기를 설계할 수 있다. 이때, 핵산 주형을 이중가닥 또는 단일가닥의 핵산일 수 있으며, 선형 또는 원형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1133] 다른 일 예로, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하고, 절단 위치와 근접한 염기서열과 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 염기서열을 HDR 방법으로 수선 또는 수복할 수 있다.

[1134] 이때, 상기 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형은 파손된 DNA, 즉 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 상동성 염기서열을 가지며, 추가로 파손된 DNA에 삽입하기 원하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함할 수 있다. 이와 같이 상동성 염기서열과 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함하는 핵산 주형을

이용하여 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 위치에 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각을 삽입할 수 있다. 이때, 상기 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각 및 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있다. 상기 상동성 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 오른쪽 및 왼쪽의 염기서열과 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 또는 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 3' 및 5' 말단과 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 상기 상동성 염기서열은 15 내지 3000개의 염기서열일 수 있으며, 핵산 주형의 크기 또는 표적 유전자 또는 핵산에 따라 적절하게 상기 상동성 염기서열의 길이 또는 크기를 설계할 수 있다. 이때, 핵산 주형을 이중가닥 또는 단일가닥의 핵산일 수 있으며, 선형 또는 원형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1135]

[1136] 상기의 NHEJ와 HDR 외에도 파손된 DNA를 수선 또는 수복하는 방법이 존재한다.

[1137] ***단일가닥 어닐링(Single-strand annealing, SSA)***

[1138] SSA는 표적 핵산 중에 존재하는 2개의 반복부 서열 사이의 이중가닥 파손을 수선하는 방법으로, 일반적으로 30개 초과의 염기서열의 반복부 서열을 이용한다. 파손 말단에서 표적 핵산의 이중가닥에 대해 반복부 서열을 각각의 단일가닥이 가지도록 절단(Sticky end가 되도록)되며, 절단 후 반복부 서열을 함유하는 단일가닥 돌출부는 반복체 서열이 자체적으로 부적절하게 어닐링되는 것을 방지하기 위해 RPA 단백질로 코팅된다. RAD52는 돌출부 상의 각각의 반복부 서열에 결합하고, 상보성 반복부 서열의 어닐링을 가능하게 하는 서열을 정렬한다. 어닐링 후에, 돌출부의 단일가닥 플랩(flap)은 절단되고, 새로운 DNA 합성이 임의의 갭을 채우면서 DNA 이중가닥을 복원한다. 이러한 수복 또는 수선의 결과로, 2개의 반복체 사이의 DNA 서열이 결실되며, 결실 길이는 이용되는 2개의 반복체의 위치를 포함하는 다수의 인자 및 절단 경로 또는 진행도에 의존될 수 있다.

[1139] SSA는 HDR 방식과 유사하게는 상보성 서열, 즉 상보성 반복부 서열을 이용하고, 대조적으로는 표적 핵산 서열을 변경 또는 수정하기 위한 핵산 주형을 필요로 하지 않는다.

[1140]

[1141] ***단일가닥 파손 수선(Single-strand break repair, SSBA)***

[1142] 게놈 내 단일가닥 파손은 상기 논의된 수선 메커니즘과는 별도의 메커니즘인 SSBR을 통해 수선 또는 수복된다. DNA 파손의 형태가 단일가닥 파손일 때, PARP1 및/또는 PARP2는 파손을 인식하고 수선 기작을 동원한다. DAN 파손에서

PARP1의 결합 및 활성을 일시적이며, 손상부에 SSBR 단백질 복합체의 안정성을 촉진함으로써 SSBR을 촉진시킨다. SSBR 복합체에서 가장 중요한 단백질은 XRCC1으로, 이는 DNA의 3' 및 5' 말단 가공을 촉진하는 단백질과 상호작용하며, 안정화시킨다. 말단 가공은 일반적을 손상된 3' 말단을 하이드록실화 된 상태 및/또는 5' 말단을 인산염 모이어티로 복구하는 것을 수반하며, 말단이 가공되면, DNA 갭 채우기가 일어난다. DNA 갭 채우기에는 2가지 방법, 즉, 짧은 패치 수선 및 긴 패치 수선이 있으며, 이때 짧은 패치 수선은 빠져있는 단일 염기의 삽입을 수반한다. DNA 갭 채우기 후, DNA 리가아제는 말단의 결합을 촉진한다.

[1143]

[1144] ***미스매치 수선(Mismatch repair, MMR)***

[1145] MMR은 잘못 짝지어진 DNA 염기상에서 작용한다. MSH2/6 또는 MSH2/3 복합체는 둘 다 미스매치 인식 및 수선의 개시에서 중요한 역할을 하는 ATP 분해효소 활성을 가지며, MSH2/6는 염기-염기 미스매치를 우선적으로 인식하고, 1개 또는 2개의 염기의 미스매치를 동정하는 반면, MSH2/3는 더 큰 미스매치를 우선적으로 인식한다.

[1146]

[1147] ***염기 절단 수선(Base excision repair, BER)***

[1148] BER은 세포주기 전체에서 활성이며, 게놈으로부터 작은 비-나선-뒤틀림 염기 손상부를 제거하는데 이용되는 수선 방식이다. 손상된 DNA는 당 인산화 백본에 염기를 연결하는 N-글리코사이드 결합을 절단하여 손상된 염기를 절단하고, 이어서 포스포디에스테르 백본을 절단하여 DNA 단일가닥 파손을 생성한다. 이렇게 형성된 파손된 단일가닥 말단을 제거하고, 제거된 단일가닥에 의해 발생된 갭을 새로운 상보성 염기로 채운 후, DNA 리가아제로 새로 채워진 상보성 염기 말단과 백본을 결합시켜 손상된 DNA를 수선 또는 수복한다.

[1149]

[1150] ***뉴클레오타이드 절단 수선(Nucleotide excision repair, NER)***

[1151] NER은 DNA로부터 큰 나선-뒤틀림 손상을 제거하는 중요한 절단 메커니즘으로, 손상이 인식되면, 손상부를 함유하는 짧은 단일가닥 DNA 세그먼트를 제거하여, 22개 내지 30개 염기의 단일가닥 갭을 생성한다. 생성된 갭은 새로운 상보성 염기로 채운 후, DNA 리가아제로 새로 채워진 상보성 염기 말단과 백본을 결합시켜 손상된 DNA를 수선 또는 수복한다.

[1152]

[1153] *유전자 조작 효과*

[1154] 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정은 크게 넉아웃(knockout), 넉다운(knockdown), 넉인(knockin)의 효과를 초래할 수 있다.

[1155]

[1156] ***넉아웃(Knockout)***

[1157] "넉아웃(knockout)"은 표적 유전자 또는 핵산을 불활성화시키는 것을 의미하며, “표적 유전자 또는 핵산의 불활성화”는 표적 유전자 또는 핵산의 전사 및/또는 번역이 되지 못하는 상태를 의미한다. 넉아웃을 통해 질병을 유발하는 유전자 또는 비정상적 기능을 가지는 유전자의 전사 및 번역을 억제하여 단백질의 발현을 막을 수 있다.

[1158] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 절단할 수 있다. CRISPR 복합체를 이용하여 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 NHEJ를 통해 손상된 유전자 또는 핵산이 수복될 수 있다. 파손된 표적 유전자 또는 핵산은 NHEJ에 의해 삽입결실이 생성되며, 이를 통해 표적 유전자 또는 핵산의 특이적 넉아웃을 유도할 수 있다.

[1159]

[1160] ***넉다운(Knockdown)***

[1161] "넉다운(knockdown)"은 표적 유전자 또는 핵산의 전사 및/또는 번역을 감소시키거나 표적 단백질의 발현이 감소하는 것을 의미한다. 넉다운을 통해 과발현되는 유전자 또는 단백질의 발현을 조절하여 질병의 발생을 막거나 질병을 치료할 수 있다.

[1162] 예를 들어, gRNA- CRISPR 불활성 효소-전사 저해 활성 도메인 복합체, 즉, 전사 저해 활성 도메인을 포함하는 CRISPR 불활성 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, 상기 CRISPR 불활성 복합체가 표적 유전자 또는 핵산에 특이적으로 결합하고, CRISPR 불활성 복합체에 포함된 전사 저해 활성 도메인에 의해 표적 유전자 또는 핵산의 전사가 저해되어 해당 유전자 또는 핵산의 발현이 저해되는 넉다운을 유도할 수 있다.

[1163]

[1164] ***넉인(Knockin)***

[1165] "넉인(knockin)"은 표적 유전자 또는 핵산에 특정 핵산 또는 유전자를 삽입하는 것을 의미하며, 이때, "특정 핵산"은 삽입하고자 하는 또는 발현시키기 원하는 유전자 또는 핵산을 의미한다. 넉인을 통해 질병을 유발하는 돌연변이 유전자를 올바르게 교정하거나, 정상 유전자를 삽입하여 정상 유전자의 발현을 유도하여 질병 치료에 이용할 수 있다.

[1166] 더불어, 넉인은 추가적으로 도너(donor)를 필요로 할 수 있다.

[1167] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 절단할 수 있다. CRISPR 복합체를 이용하여 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 HDR를 통해 손상된 유전자 또는 핵산이 수복될 수 있다. 이때, 도너를 이용하여 손상된 유전자 또는 핵산에 특정 핵산을 삽입할 수 있다.

[1168] 상기 "도너(donor)"는 손상된 유전자 또는 핵산의 HDR을 통한 수복을 돕는 핵산서열을 의미하며, 이때, 도너는 특정 핵산을 포함할 수 있다.

[1169] 상기 도너는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1170] 상기 도너는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1171] 상기 도너는 표적 유전자 또는 핵산에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1172] 예를 들어, 도너는 특정 핵산을 삽입하고자 하는 위치, 예를 들어, 손상된 핵산의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이때, 삽입하고자 하는 특정 핵산은 손상된 핵산의 오른쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열과 손상된 핵산의 왼쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열 사이에 위치할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1173] 상기 도너는 선택적으로 부수적인 핵산서열을 포함할 수 있다. 이때, 부수적인 핵산서열은 도너의 안정성, 넉인 효율 또는 HDR 효율을 높이는 역할을 하는 것일 수 있다.

[1174] 예를 들어, 상기 부수적인 핵산서열은 염기 A, T가 풍부한 핵산서열, 즉, A-T 풍부 도메인(A-T rich domain)일 수 있다. 또는 상기 부수적인 핵산서열은 SMAR(scaffold/matrix attachment region)일 수 있다.

[1175]

[1176] 본 발명의 유전자 조작 효과에 관한 일 구체예로서, gRNA-CRISPR효소 복합체를 이용하여 수득한 조작된 표적 유전자, 즉, 조작된 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 조작된 PMP22는 하기와 같은 구성을 가질 수 있다.

[1177] 일 구체예로서, PMP22가 유전자인 경우,

[1178] gRNA-CRISPR효소 복합체에 의해 인위적으로 조작된 PMP22의 구성은,

[1179] 상기 PMP22 유전자를 구성하는 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1180] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;

[1181] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;

[1182] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입

[1183] 중 하나 이상의 핵산의 변형을 포함할 수 있다.

[1184] 또한, 상기 PMP22 유전자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[1185] 이때, "외부 유래 뉴클레오타이드"는 PMP22 유전자를 포함하는 대상체가 본래 가지고 있는 뉴클레오타이드가 아니라, 외부로부터 생성된, 예를 들어, 이종 생물 유래 또는 인위적으로 합성한 뉴클레오타이드를 모두 포함하는 개념이다. 50bp 이하의 작은 크기의 올리고뉴클레오타이드뿐만 아니라, 특정 기능을 가지는 단백질의 발현을 위한 큰 크기의 수백, 수천, 또는 수만 bp의 뉴클레오타이드도 포함한다. 이러한 외부 유래 뉴클레오타이드는 도너(donor)일

수 있다.

[1186] 상기 화학적 변형은 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 글리코실화 등을 포함하고, 예를 들어, 뉴클레오티드가 가지고 있는 작용기의 일부가 수소원자, 불소원자, -O-알킬기, -O-아실기, 및 아미노기 중 어느 하나로 치환되거나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 핵산 분자의 전달능을 높이기 위해 -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N3 및 -CN (R= alkyl, aryl, alkylene) 중 어느 하나로도 치환될 수 있다. 또한, 적어도 1개의 뉴클레오티드의 포스페이트 백본이 alkylphosphonate form, phosphoroamidate form 및 boranophosphate form 중 어느 하나로 치환될 수 있다. 또한, 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오티드가 LNA (locked nucleic acid), UNA(unlocked nucleic acid), Morpholino, PNA (peptide nucleic acid) 중 어느 하나로 치환된 것임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자가 지질, 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide) 및 세포 표적 리간드로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상과 결합 되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[1187]

[1188] 목적하는 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)을 형성하기 위하여 gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 인위적으로 SC 기능 조절 인자, 즉, PMP22 유전자를 구성하는 핵산에 변형을 가할 수 있다.

[1189] PMP22 유전자의 핵산 변형을 포함하는 부위는 표적 부위 또는 표적 서열일 수 있다.

[1190] 이러한 표적 서열은 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 타겟이 될 수 있고, 상기 표적 서열은 CRISPR 효소가 인식하는 PAM 서열을 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 이러한 표적 서열은 실시자에게 gRNA 설계 단계에서 중요한 기준을 제공할 수 있다.

[1191] 이러한 핵산 변형은 핵산의 "절단(cleavage)"을 포함한다.

[1192] 표적 부위의 "절단(cleavage)"은 폴리뉴클레오타이드의 공유결합(covalent backbone)의 파손(breakage)을 의미한다. 절단은 포스포다이에스터(phosphodiester) 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 이외의 다양한 여러 가지 방법들에 의하여 수행될 수 있다. 단일가닥의 절단 및 이중가닥의 절단 모두 가능하며, 이중가닥의 절단은 두 개의 구별되는(distinct) 단일-가닥의 절단의 결과로서 발생할 수 있다. 이중 가닥의 절단은 blunt ends 또는 staggered end를 생성할 수 있다.

[1193] 불활성화된 CRISPR 효소를 사용하는 경우, 상기 절단 프로세스 없이, 특정 기능을 보유하는 인자를 표적 부위 또는 PMP22 유전자의 임의의 부위에 가깝게 위치할 수 있도록 유도할 수 있다. 이러한 특정 기능에 따라 PMP22 유전자의 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[1194] 일 예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 형성되는 핵산의 절단을 통해,

표적 및 비표적 활성에 의해 다양한 인델 (indel; insertion and deletion)이 발생할 수 있다.

[1195] "인델(indel)"은 DNA의 염기 배열에서 일부 염기가 중간에 삽입 (insertion)되거나 결실 (deletion) 된 변이를 총칭한다. 인델은 상술한 바와 같이 gRNA-CRISPR 효소 복합체가 PMP22 유전자의 핵산(DNA, RNA)을 절단하는 경우, HDR 또는 NHEJ 기작에 의해 수선되는 과정에서 표적 서열에 도입되는 것일 수 있다.

[1196] 본 발명의 인위적으로 조작된 PMP22 유전자란, 이러한 핵산의 절단 및 인델, 도너를 이용한 삽입 등으로 본래 유전자의 핵산서열에 변형이 이루어진 것으로서, 목적하는 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함), 예를 들어 PMP22의 발현 및/또는 기능 변형을 통한 슈반세포의 기능을 조절 효과를 발휘하는 데 기여한다.

[1197] 예를 들어,

[1198] 상기 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 특정 단백질의 발현 및 활성을 저해시킬 수 있다.

[1199] 상기 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 특정 단백질을 불활성화시킬 수 있다.

[1200] 일 예로, 유전체(genome) 중 PMP22 유전자의 특정 타겟 부위를 절단하여 상기 유전자를 넉다운 또는 넉아웃시킬 수 있다.

[1201] 다른 예로, 표적화된 넉다운은 전사를 변경하기 위해, 예를 들어 PMP22 유전자의 전사를 차단하거나, 저감시키거나 또는 감소시키기 위해 전사 리프레서 도메인 또는 염색질 변형 단백질에 융합된 효소적으로 불활성인 CRISPR 효소를 이용함으로써 매개될 수 있다.

[1202] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 슈반세포의 성장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[1203] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 슈반세포의 세포주기(cell cycle)의 진행을 방해 또는 어레스트(arrest)하거나, 세포주기의 진행을 촉진시킬 수 있다.

[1204] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 슈반세포의 분화를 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[1205] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 슈반세포의 사멸을 촉진시키거나 억제시킬 수 있다.

[1206] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 말초신경세포의 생존을 돕거나 방해할 수 있다.

[1207] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 말초신경세포의 유지 및 신호 전달을 돕거나 방해할 수 있다.

[1208] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22

유전자에 의해 신경세포 축삭(axon)의 수초 형성을 조절할 수 있다.

[1209] 이때, 수초 형성은 수초의 생성, 수초의 퇴화, 수초의 재생, 수초의 유지 및 수초의 형성밀도(compact myelin) 등의 수초 형성의 전반적인 과정 및 수초 퇴화 또는 수초의 기능에 관한 모든 메커니즘을 포함한다.

[1210] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 슈반세포의 기능장애 또는 결함에 의한 질병의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[1211] 또한, 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 생장을 억제 또는 저해하거나, 성장을 촉진 또는 증가시키는 모든 메커니즘의 조절할 수 있다.

[1212] 상기 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자에 의해 섬유아세포(fibroblasts) 또는 신경교세포(glial cells)의 활성에 관여된 모든 메커니즘을 조절할 수 있다.

[1213]

[1214] 본 발명의 일 구체예로서, 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 즉, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자는 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 구성적 특징(예를 들면, PMP22 유전자의 표적 부위에 포함 또는 근접한 주요 PAM 서열의 상이함)에 따라 다양한 인위적으로 조작된 PMP22를 제공할 수 있다.

[1215] 이하, 대표적인 CRISPR 효소 예들 중심으로 기술하지만, 이는 특정 예시에 지나지 않고 이러한 내용으로 본 발명이 제한되지는 않는다.

[1216] 예를 들어, CRISPR 효소가 SpCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NGG-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 표적 유전자 내의 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1217] PMP22 유전자의 핵산서열 내의

[1218] a) 5'-NGG-3' (N은 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1219] b) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1220] c) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1221] d) 상기 a) 내지 c) 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1222] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1223]

[1224] 예를 들어, CRISPR 효소가 CjCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNNNRYAC-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C 또는 T임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNNNRYAC-3' 서열의5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1225] PMP22 유전자의 핵산서열 내의

[1226] a') 5'-NNNNRYAC-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C 또는 T임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1227] b') 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1228] c') 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1229] d') 상기 a') 내지 c') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1230] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1231]

[1232] 예를 들어, CRISPR 효소가 StCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNAGAAW-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1233] PMP22 유전자자의 핵산서열 내의

[1234] a'') 5'-NNAGAAW-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임)서열의 5' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1235] b'') 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1236] c'') 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1237] d'') 상기 a'') 내지 c'') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1238] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1239]

[1240] 예를 들어, CRISPR 효소가 NmCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNNNGATT-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1241] PMP22 유전자의 핵산서열 내의

[1242] a''') 5'-NNNNGATT-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1243] b''') 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1244] c''') 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1245] d''') 상기 a''') 내지 c''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1246] 에 의한 것인 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1247]

[1248] 예를 들어, CRISPR 효소가 SaCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNGRR(T)-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, (T)는 임의로 포함가능한 서열을 의미함)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1249] PMP22 유전자의 핵산서열 내의

[1250] a'''') 5'-NNGRR(T)-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1251] b'''') 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1252] c'''') 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1253] d'''') 상기 a'''') 내지 c'''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1254] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1255]

[1256] 예를 들어, CRISPR 효소가 Cpf1 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-TTN-3'(N은 A, T, C 또는 G임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp, 17bp 내지 30bp, 또는 17bp 내지 26bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1257] 상기 Cpf1 단백질은 *Parcubacteria* bacterium (GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio* proteoclasiicus, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas* macacae, *Lachnospiraceae* bacterium (ND2006), *Porphyromonas* crevioricanis, *Prevotella* disiens, *Moraxella* bovoculi(237), *Smiihella* sp. (SC_KO8D17), *Leptospira* inadai, *Lachnospiraceae* bacterium (MA2020), *Francisella* novicida (U112), *Candidatus* Methanoplasma termitum, *Eubacterium* eligens 등의 미생물 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, *Parcubacteria* bacterium (GWC2011_GWC2_44_17), *Peregrinibacteria* bacterium (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas* macacae, *Lachnospiraceae* bacterium(ND2006), *Porphyromonas* crevioricanis, *Prevotella* disiens, *Moraxella* bovoculi(237), *Leptospira* inadai, *Lachnospiraceae* bacterium (MA2020), *Francisella* novicida (U112), *Candidatus* Methanoplasma termitum, 또는 *Eubacterium* eligens 유래의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1258] PMP22 유전자의 핵산서열 내의

[1259] a'''') 5'-TTN-3'(N은 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1260] b'''') 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로 의 치환,

[1261] c'''') 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1262] d'''') 상기 a'''') 내지 c'''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1263] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 PMP22 유전자를 제공할 수 있다.

[1264]

[1265] 다른 구체예로서, PMP22가 단백질인 경우,

[1266] 인위적으로 조작된 단백질은 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 직간접 작용에 의해 형성되는 새로운 또는 변경된 모든 단백질을 포함한다.

[1267] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 인위적으로 조작된 PMP22

유전자에 의해 발현된 단백질 또는 이러한 단백질 활성에 의해 영향을 받아 증가되거나 감소된 타 단백질일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[1268] 상기 인위적으로 조작된 PMP22 단백질은 상기 인위적으로 조작된 PMP22 유전자의 구성과 상응하는 아미노산 구성 및 활성을 가질 수 있다, 일 구체예로서:

[1269] (i) 발현 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1270] 예를 들어, PMP22 유전자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1271] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 따른 발현량 감소 또는 증가;

[1272] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 따른 발현량 감소 또는 증가;

[1273] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 따른 발현량 감소 또는 증가, 또는 융합 단백질의 발현 또는 특정 단백질의 독립적인 발현;

[1274] 상기 설명한 단백질들의 발현 특성에 영향을 받는 제3의 단백질의 발현량 감소 또는 증가;

[1275] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1276] (ii) 구조 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1277] 예를 들어, PMP22 유전자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1278] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경, 및 3차원 구조의 변경;

[1279] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경, 이에 따른 3차원 구조의 변경;

[1280] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경 및 3차원 구조의 변경, 또는 특정 단백질과의 융합 구조 또는 특정 단백질이 분리되는 독립적 구조;

[1281] 상기 설명한 구조특성이 변화된 단백질의 영향을 받는 제3의 단백질의 코돈 변경, 아미노산의 변경, 및 3차원 구조의 변경;

[1282] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1283] (iii) 기능 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1284] 예를 들어, PMP22 유전자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1285] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 기인하는 단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 기능의 도입;

[1286] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 기인하는

단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 기능의 도입;

[1287] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 기인하는 단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 기능의 도입, 특히 특정 단백질의 융합 발현 또는 독립적 발현으로 기존 기능에 제3의 기능을 도입할 수 있음;

[1288] 상기 설명한 기능 특성이 변화된 단백질의 영향을 받는 제3의 단백질의 기능 변경;

[1289] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1290]

[1291] 또한, PMP22 유전자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형에 의한 인위적으로 조작된 단백질을 포함할 수 있다.

[1292] 예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 글리코실화에 의한 단백질의 발현 특성, 구조 특성 및 기능 특성 중 1 이상의 특성이 변경될 수 있다.

[1293] 예를 들어, 뉴클레오타이드의 화학적 변형에 의해 제3의 단백질이 유전자의 핵산 서열 내 결합함으로써 제3의 구조 및 기능을 부여할 수 있다.

[1294]

[1295] **5. 기타 추가 구성물**

[1296] 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 증가 또는 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 추가 구성물을 포함할 수 있다.

[1297] 추가 구성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 이용될 수 있다.

[1298] **액티베이터(activator)**

[1299] 추가 구성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 높이기 위한 액티베이터(activator)로 이용될 수 있다.

[1300] 상기 "액티베이터(activator)"는 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합을 안정화 시키거나, 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 더 잘 접근시킬 수 있도록 역할하는 핵산을 의미한다.

[1301] 상기 액티베이터는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1302] 상기 액티베이터는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1303] 상기 액티베이터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합을 안정화시키는 "헬퍼(helper)"와 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 더 잘 접근시킬 수 있도록 역할하는 "에스코터(escortor)"로 나눌 수 있다.

[1304] 상기 헬퍼는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 증가시킬 수 있다.

[1305] 예를 들어, 상기 헬퍼는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하여 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 결합할 때, 상기 헬퍼에 포함된 상동성을 가지는 핵산서열이 표적 핵산, 유전자 또는 염색체와 추가적인 상보적인 결합을 이루어 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합이 안정화될 수 있도록 할 수 있다.

[1306] 상기 에스코터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 증가시킬 수 있다.

[1307] 예를 들어, 상기 에스코터는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하고, 이때, 상기 에스코터에 포함된 상동성을 가지는 핵산서열이 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 가이드핵산과 일부 상보적 결합을 할 수 있다. 이를 통해, 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 일부 상보적인 결합을 한 에스코터는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체와 일부 상보적인 결합을 할 수 있고, 그 결과 에스코터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 정확한 표적 핵산, 유전자 또는 염색체 위치에 접근하도록 할 수 있다.

[1308] 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1309]

[1310] 또한, 추가 구성물은 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 이용될 수 있다.

[1311] **어시스터(Assistor)**

[1312] 추가 구성물은 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위한 어시스터(assistor)로 이용될 수 있다.

[1313] 상기 "어시스터(assistor)"는 손상된 유전자 또는 핵산, 예를 들어, 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 절단된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 높이는 역할을 하는 핵산을 의미한다.

[1314] 상기 어시스터는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1315] 상기 어시스터는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1316] 상기 어시스터는 수복 방법에 따라 NHEJ를 이용한 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시키는 "NHEJ 어시스터"와 HDR을 이용한 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시키는 "HDR 어시스터"로 나눌 수 있다.

[1317] 상기 NHEJ 어시스터는 NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시킬 수 있다.

[1318] 예를 들어, 상기 NHEJ 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 일 말단(예를 들어 3' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하며, 또한 손상된 핵산서열의 다른 말단(예를 들어 5' 말단) 핵산서열과

상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 또는 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 두 부분이 근접한 위치에 존재할 수 있도록 도와줌으로써 NHEJ에 의해 손상된 핵산의 수복 효율을 높일 수 있다.

[1319] 상기 HDR 어시스터는 HDR을 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시킬 수 있다.

[1320] 예를 들어, 상기 HDR 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 일 말단(예를 들어 3' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하며, 또한 손상된 핵산서열의 다른 말단(예를 들어 5' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 또는 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 주형으로 역할하여 HDR에 의한 손상된 핵산의 수복 효율을 높일 수 있다.

[1321] 다른 예로, 상기 HDR 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열 및 특정핵산, 예를 들면 삽입하고자 하는 핵산 또는 유전자를 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 상기 특정 핵산은 손상된 핵산의 오른쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열과 손상된 핵산의 왼쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열 사이에 위치할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열 및 특정 핵산은 손상된 핵산에 특정 핵산을 삽입할 수 있는 도너로 역할하여 넉인을 위한 HDR의 효율을 높일 수 있다.

[1322] 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1323]

[1324] **6. 대상**

[1325] "대상"은 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입되는 유기체, 또는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 작동하는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료를 의미한다.

[1326] 상기 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체일 수 있다.

[1327] 상기 유기체는 세포, 조직, 식물, 동물 또는 인간일 수 있다.

[1328] 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포일 수 있다.

[1329] 상기 진핵세포는 식물세포, 동물세포, 인간세포일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[1330] 상기 조직은 신경, 피부, 간, 신장, 심장, 폐, 뇌, 근육 등의 동물 또는 인간의 신체 조직일 수 있다.

[1331] 상기 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 검체 또는 시료일 수 있다.

[1332] 상기 검체 또는 시료는 침, 혈액, 피부조직, 신경세포, 슈반세포, 암세포 또는 줄기세포 등 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체에서 획득한 것 일 수 있다.

[1333]

[1334] 본 발명에서 대상의 일 구체예로서, 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 유전자 또는 핵산을 포함하는 것일 수 있다.

[1335] 이때, 표적 유전자는 SC 기능 조절 인자일 수 있다.

[1336] 상기 SC 기능 조절 인자는 PMP22 유전자일 수 있다.

[1337] 상기 표적 유전자는 야생형이거나, 또는 야생형에서 변형된 형태일 수 있다.

[1338]

[1339] 본 발명의 일 구체예로서, 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체로 인해 조작된 유전자 또는 핵산을 포함할 수 있다.

[1340] 이때, 조작된 유전자는 SC 기능 조절 인자일 수 있다.

[1341] 상기 SC 기능 조절 인자는 PMP22 유전자일 수 있다.

[1342] 이때, 가이드핵산은 PMP22 유전자를 표적할 수 있다.

[1343] 상기 가이드핵산은 PMP22 유전자의 표적 서열에 상보성 핵산서열일 수 있다.

[1344] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 유전자를 표적할 수 있다.

[1345] 상기 가이드핵산은 둘 이상의 유전자를 동시에 표적할 수 있다. 이때, 둘 이상의 유전자는 동종 유전자이거나 이종 유전자 일 수 있다.

[1346] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 표적 서열을 표적할 수 있다.

[1347] 상기 가이드핵산은 표적 서열의 개수와 위치에 따라 다양하게 설계할 수 있다.

[1348] 본 발명이 일 구현예로, 가이드핵산은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5, 표 6 및 표 7에 기재된 서열 중 하나 이상의 표적 서열에 상보성 핵산서열일 수 있다.

[1349] 임의의 구체예에서, PMP22 유전자의 인위적인 조작을 위해 상기 서열번호 1 내지 66번의 타겟서열에 상응하는 가이드 핵산 서열이 제공된다.

[1350] 임의의 구체예에서, PMP22 유전자의 인위적인 조작을 위해 상기 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41번 내지 53번의 타겟서열에 상응하는 가이드 핵산 서열과 상호작용하는, 예를 들어 복합체를 형성하는 에디터단백질이 제공된다.

[1351] 임의의 구체예에서, 상기 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41번 내지 53번의 타겟서열 부위에서 인위적인 조작이 일어난 각 유전자의 핵산 변형 산물 및 이의 발현 산물이 제공된다.

[1352]

[1353] **7. 전달**

[1354] 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 다양한 전달 방법과 다양한 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1355] 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1356] 상기 에디터단백질은 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA, DNA/RNA 혼합, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1357] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 각 구성성분, 즉, 가이드핵산 및 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1358] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태를 가지는 가이드핵산과 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태를 가지는 에디터단백질의 복합체로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1359] 또한, 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 증가 또는 저해할 수 있는 추가 구성물은 다양한 전달 방법과 다양한 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1360] 상기 추가 구성물은 DNA, RNA, DNA/RNA 혼합, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1361]

[1362] **i) DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 전달**

[1363] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1364] 또는, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 벡터, 비벡터 또는 이들의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1365] 상기 벡터는 바이러스 또는 비바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드)일 수 있다.

[1366] 상기 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체 또는 mRNA일 수 있다.

[1367]

[1368] *벡터 기반 도입*

[1369] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 벡터에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1370] 벡터는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1371] 예를 들어, 상기 벡터는 가이드핵산과 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 동시에 포함할 수 있다.

[1372] 예를 들어, 상기 벡터는 가이드핵산 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1373] 일 예로, 상기 가이드핵산이 포함하는 도메인은 하나의 벡터에 모두 포함되거나 또는 각각의 도메인을 나누어 각각의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1374] 예를 들어, 상기 벡터는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1375] 일 예로, 상기 에디터단백질의 경우, 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 하나의 벡터에 포함하거나 또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 분할하여 여러 개의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1376] 상기 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다.

[1377] 이때, 상기 조절/제어 구성요소는 포로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 스플라이스 억셉터 및/또는 2A 서열을 포함할 수 있다.

[1378] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 II에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1379] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 III에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1380] 상기 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다.

[1381] 상기 프로모터는 대상 특이적 프로모터일 수 있다.

[1382] 상기 프로모터는 바이러스 또는 비바이러스 프로모터일 수 있다.

[1383] 상기 프로모터는 제어 영역(즉, 가이드핵산 또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열)에 따라 적합한 프로모터를 이용할 수 있다.

[1384] 예를 들어, 가이드핵산을 위해 유용한 프로모터는 H1, EF-1a, tRNA 또는 U6 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 에디터단백질을 위해 유용한 프로모터는 CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK 또는 CAG 프로모터일 수 있다.

[1385]

[1386] 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1387] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다.

[1388] 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA) 바이러스 일 수 있다.

[1389] 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.

[1390] 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1391] 일반적으로 바이러스는 숙주(예를 들면, 세포)를 감염시켜, 숙주 내에 바이러스의 유전정보를 암호화하는 핵산을 도입시키거나 숙주의 게놈 내로 유전정보를 암호화하는 핵산을 삽입시킬 수 있다. 이러한 특징을 가지는 바이러스를 이용하여 대상 내로 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 도입시킬 수 있다. 바이러스를 이용하여 도입된 가이드핵산 및/또는 에디터단백질은 대상(예를 들면, 세포)에서 일시적으로 발현될 수 있다. 또는 바이러스를 이용하여 도입된 가이드핵산 및/또는 에디터단백질은 대상(예를 들면, 세포)에서

장기간(예를 들면, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년 또는 영구적) 지속적으로 발현될 수 있다.

[1392] 바이러스의 패키징 능력은 적어도 2kb 내지 50kb로 바이러스 종류에 따라 다를 수 있다. 이러한 패키징 능력에 따라 가이드핵산 또는 에디터단백질을 단독으로 포함하는 바이러스 벡터를 설계하거나 가이드핵산 및 에디터단백질을 모두 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다. 또는 가이드핵산, 에디터단백질 및 추가 구성요소를 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다.

[1393] 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 렌티바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1394] 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 아데노바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1395] 또 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 AAV에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1396] 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 혼성 바이러스, 예를 들어 본 명세서에 기재한 바이러스 중 하나 이상의 혼성체에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1397]

[1398] *비벡터 기반 도입*

[1399] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 비벡터로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1400] 비벡터는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1401] 상기 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA 또는 이의 혼합일 수 있다.

[1402] 상기 비벡터는 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 덴드리머, 나노입자, 인산칼슘, 실리카, 실리케이트(오르모실) 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1403] 일 예로, 전기천공법을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳 내에서 세포와 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 혼합하고, 정해진 지속시간 및 진폭의 전기적 자극을 적용에 의해 수행될 수 있다.

[1404] 다른 일 예로, 나노입자를 이용하여 비벡터를 전달할 수 있다. 상기 나노입자는 무기 나노입자(예를 들면, 자기 나노입자, 실리카 등) 또는 유기 나노입자(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 코팅된 지질 등)일 수 있다. 상기 나노입자의 외면은 부착을 가능하게 하는 양 전하로 하전된 중합체(예를 들면, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리세린 등)와 컨쥬케이팅될 수 있다.

[1405] 임의의 구체예로, 지질 외피를 이용하여 전달할 수 있다.

[1406] 임의의 구체예로, 엑소좀을 이용하여 전달할 수 있다. 엑소좀은 뇌 및 다른 표적

기관에 RNA를 전달할 수 있는, 단백질 및 RNA를 수송하는 내인성 나노-소낭이다.

[1407] 임의의 구체예로, 리포좀을 이용하여 전달할 수 있다. 리포좀은 내부 수성 구획을 둘러싸는 단일 또는 다중 라멜라 지질 이중층 및 상대적으로 불투과성인 외측 친지성 인지질 이중층으로 구성된 구체 소낭 구조이다. 리포좀은 몇몇 상이한 유형의 지질로부터 만들어질 수 있지만; 약물 담체로서 리포좀을 생성하는데 인지질이 가장 통상적으로 사용된다.

[1408] 기타 몇몇 다른 첨가제를 포함할 수 있다.

[1409]

[1410] **ii) 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 전달**

[1411] 에디터단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태는 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1412] 상기 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태는 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1413] 상기 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 전달은 가이드핵산을 암호화하는 핵산서열과 함께 전달될 수 있다.

[1414] 일 예로, 전기천공법을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳 내에서 가이드핵산와 함께 또는 가이드핵산 없이 에디터단백질을 도입시킬 세포와 혼합하고, 정해진 지속시간 및 진폭의 전기적 자극을 적용에 의해 수행될 수 있다.

[1415]

[1416] **iii) 핵산-단백질 혼합의 형태로 전달**

[1417] 가이드핵산 및 에디터단백질은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1418] 예를 들어, 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 상기 에디터단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태일 수 있다.

[1419] 일 예로, 가이드핵산 및 에디터단백질은 RNA 형태의 가이드핵산과 단백질 형태의 에디터단백질이 가이드핵산-에디터단백질 복합체, 즉 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1420]

[1421] 본 발명에서 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 대상으로 전달하는 방법의 일 구체예로서, gRNA, CRISPR 효소 또는 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 전달에 대해 하단에 기재하였다.

[1422] 본 발명의 일 구현예로서, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 벡터에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1423] 벡터는 gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1424] 예를 들어, 상기 벡터는 gRNA 및 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 동시에 포함할 수 있다.

[1425] 예를 들어, 상기 벡터는 gRNA 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1426] 일 예로, 상기 gRNA가 포함하는 도메인은 하나의 벡터에 모두 포함되거나 또는 각각의 도메인을 나누어 각각의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1427] 예를 들어, 상기 벡터는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1428] 일 예로, 상기 CRISPR 효소의 경우, CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 하나의 벡터에 포함하거나 또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 분할하여 여러 개의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1429] 상기 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다.

[1430] 이때, 상기 조절/제어 구성요소는 포로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 스플라이스 억셉터 및/또는 2A 서열을 포함할 수 있다.

[1431] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 II에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1432] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 III에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1433] 상기 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다.

[1434] 상기 프로모터는 대상 특이적 프로모터일 수 있다.

[1435] 상기 프로모터는 바이러스 또는 비바이러스 프로모터일 수 있다.

[1436] 상기 프로모터는 제어 영역(즉, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열)에 따라 적합한 프로모터를 이용할 수 있다.

[1437] 예를 들어, gRNA를 위해 유용한 프로모터는 H1, EF-1a, tRNA 또는 U6 프로모터일 수 있다. 예를 들어, CRISPR 효소를 위해 유용한 프로모터는 CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK 또는 CAG 프로모터일 수 있다.

[1438] 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1439] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다.

[1440] 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA) 바이러스 일 수 있다.

[1441] 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.

[1442] 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1443] 일반적으로 바이러스는 숙주(예를 들면, 세포)를 감염시켜, 숙주 내에 바이러스의 유전정보를 암호화하는 핵산을 도입시키거나 숙주의 게놈 내로 유전정보를 암호화하는 핵산을 삽입시킬 수 있다. 이러한 특징을 가지는 바이러스를 이용하여 대상 내로 gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 도입시킬 수 있다. 바이러스를 이용하여 도입된 gRNA 및/또는 CRISPR 효소는 대상(예를 들면, 세포)에서 일시적으로 발현될 수 있다. 또는 바이러스를 이용하여 도입된

gRNA 및/또는 CRISPR 효소는 대상(예를 들면, 세포)에서 장기간(예를 들면, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년 또는 영구적) 지속적으로 발현될 수 있다.

[1444] 바이러스의 패키징 능력은 적어도 2kb 내지 50kb로 바이러스 종류에 따라 다를 수 있다. 이러한 패키징 능력에 따라 gRNA 또는 CRISPR 효소를 단독으로 포함하는 바이러스 벡터를 설계하거나 gRNA 및 CRISPR 효소를 모두 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다. 또는 gRNA, CRISPR 효소 및 추가 구성요소를 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다.

[1445] 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 렌티바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1446] 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 아데노바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1447] 또 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 AAV에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1448] 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 혼성 바이러스, 예를 들어 본 명세서에 기재한 바이러스 중 하나 이상의 혼성체에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1449]

[1450] 본 발명의 일 구현예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1451] 예를 들어, 상기 gRNA는 DNA, RNA 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 상기 CRISPR 효소는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태일 수 있다.

[1452] 일 예로, gRNA 및 CRISPR 효소는 RNA 형태의 gRNA와 단백질 형태의 CRISPR gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1453] 상기 CRISPR gRNA-CRISPR 효소 복합체는 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1454]

[1455] **8. 형질전환체**

[1456] "형질전환체"는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입된 유기체, 또는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 발현되는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료를 의미한다.

[1457] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1458] 예를 들어, 상기 형질전환체는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을

암호화하는 핵산서열 포함하는 벡터가 도입된 유기체일 수 있다. 이때, 벡터는 비바이러스 벡터, 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1459] 다른 예로, 상기 형질전환체는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함하는 비벡터 형태로 도입된 유기체일 수 있다. 이때, 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA 또는 이의 혼합일 수 있다.

[1460] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1461] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 DNA, RNA, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질 또는 이의 혼합의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1462] 예를 들어, 상기 형질전환체는 RNA 형태의 가이드핵산과 단백질 형태의 에디터단백질이 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 이루어 도입된 유기체일 수 있다.

[1463] 상기 형질전환체는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체일 수 있다.

[1464] 상기 유기체는 세포, 조직, 식물, 동물 또는 인간일 수 있다.

[1465] 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포일 수 있다.

[1466] 상기 진핵세포는 식물세포, 동물세포, 인간세포일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[1467] 상기 조직은 신경, 피부, 간, 신장, 심장, 폐, 뇌, 근육 등의 동물 또는 인간의 신체 조직일 수 있다.

[1468] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입되거나 발현되는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료일 수 있다.

[1469] 상기 검체 또는 시료는 침, 혈액, 피부조직, 신경세포, 슈반세포, 암세포 또는 줄기세포 일 수 있다.

[1470]

[1471] **[용도]**

[1472] 본 발명의 일 구체예는 대상에 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22를 인위적으로 조작하기 위한 조성물 또는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 인위적으로 조작된 PMP22를 이용하는 슈반세포 기능장애 관련 질환 치료 용도이다.

[1473] 치료 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[1474]

[1475] *치료 대상 질환*

[1476] 구현예에서, 치료 대상 질환은 SC 기능장애 관련 질환일 수 있다.

[1477] "SC 기능장애 관련 질환"은 슈반세포의 비정상적인 기능에 의해 발생하는 모든 상태를 의미한다. 슈반세포의 성장, 분화, 사멸에 이르기까지의 전체적인 발달 및 생장 과정에서 발생할 수 있는 슈반세포의 비정상화 또는 결함에 의한 질환을 포함하며, 또한 슈반세포의 말초신경세포의 생존, 유지 및 축삭(axon)에서 수초 형성(myelination) 등의 기능 비정상화 또는 결함에 의한 질환을 모두 포함한다.

[1478] 또한, SC 기능장애 관련 질환은 섬유아세포(fibroblasts) 및/또는 신경교세포(glial cells)의 비정상적인 기능에 의해 발생하는 모든 상태도 포함한다. 섬유아세포(fibroblasts) 및/또는 신경교세포(glial cells)의 성장, 분화, 사멸에 이르기까지의 전체적인 발달 및 생장 과정에서 발생할 수 있는 세포의 비정상화 또는 결함에 의한 질환을 포함한다.

[1479] SC 기능장애 관련 질환으로는, 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT), 길랭-바레 증후군(Guillain-Barree syndrome, GBS), 급성 염증성 탈수초성 다발성 신경근병증(acute inflammatory demyelinating polyradiculopathy type), 신경초종증(schwannomatosis), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)을 포함하나, 이로 제한되지 않는다.

[1480] 일 실시예에서 SC 기능장애 관련 질환은 탈수초성 질환(demyelinating disease)일 수 있다.

[1481] 이때, 탈수초성 질환은 수초의 손상, 결함, 불안정화, 퇴화 및 재수초화(remyelination)에 의해 발생하는 모든 질환을 포함한다.

[1482]

[1483] 또한, 상기 SC 기능장애 관련 질환은 SC 기능 조절 인자 관련 질환을 포함한다.

[1484] "SC 기능 조절 인자 관련 질환"은 SC 기능 조절 인자의 돌연변이, SC 기능 조절 유전자 중복(duplication), 및 SC 기능 조절 인자의 비정상적 발현 등에 의해 발생하는 모든 상태를 의미한다.

[1485] SC 기능 조절 인자 관련 질환으로는, 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT), 데제린-솟타병(Dejerine-Sottas disease), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN), 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS) 및 압박마비유전신경병(Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies, HNPP)를 포함하나, 이로 제한되지 않는다.

[1486] 일 실시예에서 SC 기능 조절 인자 관련 질환은 PMP22 관련 질환일 수 있다.

[1487] 이때, PMP22 관련 질환은 PMP22의 돌연변이, PMP22 유전자 중복(duplication) 및 PMP22의 비정상적 발현 등에 의해 발생하는 모든 질환을 포함한다.

[1488] 일 구현예에서, SC 기능 조절 인자 관련 질환은 PMP22 유전자 중복에 의해 발생하는 질환일 수 있다.

[1489] 바람직하게는 SC 기능 조절 인자 관련 질환은 샤르코-마리-투스 질환 형태

1A(Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A),
데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSS), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN) 또는 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS)일 수 있다.

[1490] - 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)

[1491] CMT 질환은 인간의 염색체에서 일어난 유전자 중복으로 인해 생기는 유전성 질환으로, 손과 발의 말초신경 발달에 관여하는 유전자가 돌연변이로 인해 중복되어 샴페인 병을 거꾸로 세운 것과 같은 모습의 기형을 유발한다. CMT 질환은 미국에서는 10만명 중 36명 꼴로 발생하는 비교적 흔한 신경계 유전질환으로, 환자수는 전 세계 280만명이며, 국내에서도 1만 7000명 정도로 추산되고 있다. CMT 질환은 유전되는 양상에 따라 크게 CMT1, CMT2, CMT3, CMT4 및 CMTX 총 5가지로 분류하며, CMT1, CMT2, CMT3는 우성으로 자녀에게 50%의 확률로 유전되고, CMT4는 열성으로 25%의 확률로 유전된다. 국내 환자의 대부분은 CMT1(80%)과 CMT2(20-40%)으로 우성유전이고, CMT3와 CMT4는 극히 드물다. CMTX는 X 염색체를 따라 모계로 유전되는데 빈도는 10-20%이다.

[1492] CMT1은 신경 축삭돌기를 둘러싸는 신경 수초(myelin sheath)의 단백질 형성에 관여하는 유전자 중복으로 인해 정상적인 유전자 발현 과정을 수행하지 못하기 때문에 일어나는 질환으로, 3가지 타입이 있다. CMT1A는 상염색체 우성질환으로 17번 염색체 17p11.2-p12에 위치한 PMP22 유전자의 중복에 의한 것으로, 수초의 중요한 구성요소인 PMP22의 과발현으로 인한 수초의 구조와 기능 이상이 초래된다.

[1493] CMT2는 축삭돌기 이상과 관련이 있고, 신경전도 속도는 정상에 가까우면서 운동감각 신경의 활동전위가 많이 저하된 신경병이며, CMT3은 극히 드물게 발생하는 상염색체 열성유전병으로 어린 나이에 발병하며 임상증상 및 신경전도 속도의 저하가 매우 심한 유형이다. CMT4도 상염색체 열성유전으로 발병 연령이 빠르고 임상 증상이 심한 유형이고, CMTX는 X 염색체와 연관되어 발병하며 여자보다 남자의 증상이 심하다.

[1494] - 데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSD)

[1495] DSS는 어린 연령에서 발병하는 탈수초성 운동감각신경병증으로 주로 상염색체 우성으로 유전하지만 상염색체 열성으로도 유전되는 질환으로, 심한 탈수초성 신경병증을 보이고, 영아기 때부터 운동신경의 이상을 보이며, 매우 느린 신경전도와 뇌척수액에서의 특정 단백질의 증가를 보이는 특징을 가진다. 데제린-소타스병은 진행속도가 매우 빠르고 보행장애는 어린 나이에서부터 시작되며, 유전되기도 하지만, 산발적으로 발생하기도 하는 특징을 가진다. CMT1A와 유사하게 일부 DSS 환자 중 PMP22 중복이 발견되며, 더불어 해당 유전자의 미스센스 돌연변이가 존재함이 확인되었다.

[1496] - 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN)

[1497] CHN은 출생 즉시 증상이 나타나는 신경계 질환으로, 주요 증상으로 호흡기계 부전, 근육 약화, 근육 운동 부조화증, 근육 긴장성 저하, 무반사(Areflexia), 조화운동불능증(운동실조증; Ataxia), 마비나 감각 장애가 나타나며 남녀 동일한 비율로 영향을 미친다. CHN은 유전질환으로, 운동신경 및 감각신경에서 수초형성에 장애가 발생한 것으로 수초의 손실(demyelination)과 재생(remyelination)이 반복되면서 수초형성(Myelination)이 저하되는 특징을 보인다.

[1498] - 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS)

[1499] RLS는 드문 유전운동감각신경병의 일종으로 1926년에 Roussy와 Levy 등에 의해 처음으로 기술되었으며, 수족의 떨림 및 보행 실족 등이 다른 유전 운동감각 신경병증에 비해 심한 경우이지만 후에 여러 유전 운동신경병증 아형들에서도 같은 증상들이 발견되어서 현재는 유전 감각신경병증에서 나타나는 하나의 증상으로 여겨지고 있다. RLS는 RLS로 처음 보고된 환자들의 유전자 검사에서 마이엘린 단백질 제로 유전자인 MPZ 유전자의 돌연변이가 발견되었고, 또 다른 환자들에서 말초 신경의 마이엘린 단백질 22의 유전자인 PMP22 유전자 중복이 있는 사례가 보고된 바 있다.

[1500]

[1501] 다른 구현예에서, 본 발명은 인위적으로 기능을 변형시킨 특정 인자(예를 들어, SC 기능 조절 인자)의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템의 용도를 제공할 수 있다.

[1502] 예를 들어, 인위적으로 변형시킨 특정 인자는 PMP22 유전자일 수 있다.

[1503] 제3의 메커니즘은 상기 유전자가 관여하는, 슈반세포의 기능 외의 체내 메커니즘일 수 있다.

[1504]

[1505] *치료용 또는 약학적 조성물*

[1506] 본 발명의 일 구체예는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자를 이용하여 질환 치료에 이용하고자 하는 조성물이다.

[1507] SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조작용 조성물을 함유하는 조성물일 수 있다. 치료용 조성물 또는 약학적 조성물로 칭할 수 있다.

[1508] 구현예에서, 조성물은 SC 기능 조절 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조작용 조성물을 포함할 수 있다.

[1509] 상기 조작용 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[1510] 상기 조작용 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 포함할 수 있다.

[1511] 상기 조작용 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

[1512] 상기 조작용 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스를 포함할 수 있다.

[1513] 다른 구현예에서, 상기 조성물은 부가적 요소를 추가로 더 포함할 수 있다.

[1514] 상기 부가적 요소는 대상의 체내에 전달하기 위한 적절한 담체를 포함할 수 있다.

[1515]

[1516] 일 구체예로서, 다음의 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[1517] PMP22 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1518] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1519] 을 포함하는 SC 기능장애 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환 치료용 조성물;

[1520]

[1521] PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1522] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1523] 을 포함하는 SC 기능장애 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환 치료용 조성물;

[1524]

[1525] PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및 에디터단백질로 형성된 복합체

[1526] 를 포함하는 SC 기능장애 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환 치료용 조성물.

[1527]

[1528] 이때, 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 1이상의 벡터의 형태로 존재할 수 있다. 동종 또는 이종의 벡터의 형태로 존재할 수 있다.

[1529]

[1530] *치료 방법*

[1531] 본 발명의 다른 구현예는, 상기 설명한 조성물의 생산 및 유효량의 상기 조성물을 이를 필요로 하는 환자에 투여를 포함하는 환자에서 질환의 치료 방법이다.

[1532]

[1533] *유전자 조작 치료*

[1534] 생체의 유전자를 조작하여 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22의 발현을 조절하는 치료방법을 이용할 수 있다. 이러한 치료방법은 생체의 유전자를 조작하기 위한 유전자 조작용 조성물을 체내에 직접 주입하여 이루어질 수 있다.

[1535] 유전자 조작용 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[1536] 유전자 조작용 조성물은 특정 신체 위치에 주입될 수 있다.

[1537] 이때, 특정 신체 위치는 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22의 발현 및/또는 기능이 비정상적인 조직 또는 이와 근접한 위치일 수 있다. 예를 들어,

말초신경조직일 수 있다.

[1538]

[1539] 조성물의 투여 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[1540] 조성물의 투여는 주사(injection), 수혈(transfusion), 삽입(implantation) 또는 이식(transplantation)과 같은, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 투여 경로는 신경내(intraneural), 피하(subcutaneously), 피내(intradermaliy), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitreally) 종양내(intratumorally), 절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous), 림프액내(intralymphatic), 복막내(intraperitoneally) 등에서 선택될 수 있다.

[1541] 조성물의 1회 투여량(소정의 소망하는 효과를 얻기 위한 약학적 유효량)은 투여 대상의 체중 kg 당 104-109 세포, 예컨대, 105 내지 106 세포/kg(체중) 정도로 상기 수치 범위들 내의 모든 정수값들 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 투여 대상의 연령, 건강 및 체중, 동시에 받는 치료의 종류, 만약 있다면 치료의 빈도, 원하는 효과의 특성 등을 고려하여 적절히 처방될 수 있다.

[1542]

[1543] 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법을 제공하며, 이것은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 이루어질 수 있다.

[1544] 일부 실시형태에서, 방법은 인간 또는 비인간 동물로부터 세포 또는 세포 집단을 시료추출하는 단계, 및 세포 또는 세포들을 변형하는 단계를 포함한다. 배양은 생체외에서 임의의 단계에서 일어날 수 있다. 세포 또는 세포들은 심지어 비인간 동물 또는 식물에 재도입될 수 있다. 재도입된 세포의 경우, 세포가 줄기 세포인 것이 특히 바람직하다.

[1545]

[1546] 또한, 다른 구현예에서, 본 발명은 세포에

[1547] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 8번, 14 내지 29번 또는 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1548] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1549] 을 도입시키는 단계를 포함하는, 세포를 인위적으로 조작하는 방법을 제공할 수 있다.

[1550] 상기 가이드 핵산 및 에디터 단백질은, 각각 핵산 서열의 형태로 1 이상의 벡터에 존재하거나, 또는 가이드 핵산과 에디터 단백질의 결합으로 복합체를 형성하여 존재할 수 있다.

[1551] 상기 도입 단계는 생체 내 또는 생체 외에서 수행될 수 있다.

[1552] 상기 도입 단계는 앞서 설명한 "7. 전달" 부분의 기술을 참조할 수 있다.

[1553] 예를 들어, 도입 단계는 전기천공법 (electroporation), 리포좀, 플라스미드, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles) 및 PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 중 선택되는 1이상의 방법으로 수행될 수 있다.

[1554] 예를 들어, 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

[1555]

[1556] 본 발명 몇몇 구현예들의 방법, 조성물에 의해 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22를 인위적으로 조작할 경우, PMP22의 비정상적 발현 및/또는 기능의 조절이 가능하게 되고, 이를 통해 비정상적인 PMP22 발현 및/또는 기능을 정상적으로 개선하여 PMP22 비정상적 발현에 따른 슈반세포(Schwann cells)의 비정상적 기능을 회복시키거나 개선시키는 등의 효과를 얻을 수 있다.

[1557]

[1558] *부가적 용도*

[1559] 임의의 구체예에서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, SC 기능장애 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환 치료용 조성물의 제조를 위한 키트를 제공할 수 있다.

[1560] 상기 키트는 당업계에 알려져 있는 통상의 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[1561] 상기 키트는 검출가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 용어 "검출가능한 표지"는 표지가 없는 동일한 종류의 분자들 중에서 표지를 포함하는 분자를 특이적으로 검출하도록 하는 원자 또는 분자를 의미한다. 상기 검출가능한 표지는 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자, 또는 압타머에 부착된 것일 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 방사종(radionuclide), 형광원(fluorophore), 효소(enzyme)를 포함할 수 있다.

[1562]

[1563] 임의의 구체예에서, 본 발명은 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22 유전자의 발현 수준을 조절할 수 있는 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[1564]

[1565] 임의의 구체예에서, 본 발명은 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22 유전자를 서열분석함으로써 대상체에서 인위적으로 조작 가능한 표적 위치의 서열에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[1566] 또한, 이러한 방법으로 제공받은 정보를 이용하여 라이브러리를 구축하는 방법을 제공한다.

[1567] 이때, 공지의 데이터 베이스를 이용할 수 있다.

[1568]

[1569] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법을 이용하여 연구 용도에 이용할 수 있는 동물 또는 세포를 제공할 수 있다.

[1570] 본 발명의 방법을 이용하여 질병과 연관된 하나 이상의 핵산 서열 중 염색체 편집을 포함하는 동물 또는 세포를 제작할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 질병 관련된 단백질 서열을 인코드할 수 있거나 또는 질병 관련된 기준 서열일 수 있다.

[1571] 한 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제작된 동물 또는 세포를 이용하여 질병 연구에 통상적으로 이용되는 측정을 이용하여 동물 또는 세포에서 돌연변이의 효과 및 질병의 발생 및/또는 진행을 연구할 수 있다. 대안으로, 이러한 동물 또는 세포을 이용하여 질병에서 활성 화합물의 약제학적 효과를 연구할 수 있다.

[1572] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제작된 동물 또는 세포를 이용하여 가능한 유전자 치료 전략의 효과를 평가할 수 있다. 즉, 질병과 관련된 단백질을 인코드하는 염색체 서열을 변형시켜, 해당 질병 발달 및/또는 진행을 억제하거나 감소시킬 수 있다. 특히, 이 방법은 질병과 관련된 단백질을 인코드하는 염색체 서열을 편집하여, 변경된 단백질이 만들어지는 것을 포함하고, 그 결과 동물 또는 세포는 변경된 반응을 한다. 따라서, 일부 구체예들에서, 유전학적으로 변형된 동물은 해당 질병의 발달에 취약한 동물과 비교하여, 유전자 치료 과정의 효과를 평가할 수 있다.

[1573] 이러한 용도는 질병 모델, 약리학 모델, 발생 모델, 세포 기능 모델, 및 인간화된 모델을 포함할 수 있다. 예를 들어, PMP22에 의한 슈반세포의 비정상적 기능 관련의 질병 모델, 약리학 모델, 발생 모델, 세포 기능 모델, 및 인간화된 모델을 포함할 수 있다.

[1574]

[1575] 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22 및 이에 의한 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템)에 의해서, 효과적인 SC 기능장애 및/또는 SC 기능 조절 인자 관련 질환, 예를 들어, PMP22 과발현 또는 PMP22 유전자 중복(duplication) 관련 질환의 치료적 용도로 이용할 수 있다. 또한, SC 기능 조절 인자, 바람직하게는 PMP22가 관여하는 다양한 체내 메커니즘의 조절을 통해 SC 기능 조절 시스템(SC 기능 조절 인자 변형 시스템 포함)의 효능을 개선시킬 수 있다.

[1576]

발명의 실시를 위한 형태

[1577] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[1578] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 자명할 것이다.

[1579]

[1580] **실험방법**

[1581] **1.** gRNA 설계

[1582] CRISPR RGEN Tools (www.rgenome.net)을 사용하여 인간의 PMP22 유전자의 CRISPR/Cas9 표적 부위를 선별하였다. PMP22 유전자의 표적 부위는 CRISPR 효소의 종류에 따라 달라질 수 있으며, SpCas9을 위한 PMP22 유전자의 암호화 부위(Coding sequence, CDS), TATA-box 부위 및 인핸서 부위(예를 들어, EGR2-, SOX10- 또는 TEAD1-결합 부위; 또는 원거리 인핸서 부위(distal Enhancer region) B 또는 C)의 표적 서열은 앞서 기재한 표 1, 3, 5 및 7에 정리하였고, CjCas9을 위한 PMP22 유전자의 암호화 부위(Coding sequence, CDS), TATA-box 부위 및 인핸서 부위(예를 들어, EGR2- 또는 SOX10-결합 부위)의 표적 서열은 표 2, 4 및 6에 정리하였다.

[1583] 모든 gRNA는 키메릭 단일가닥 RNA(chimeric single stranded RNA, sgRNA) 형태로 생성하였다. 표적 서열을 제외한 Cj- 및 Sp-특이적 sgRNA의 백본서열은 각
5'-GUUUUAGUCCCUGAAAAGGGACUAAAAUAAAGAGUUUGCGGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' 및
5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'이다.

[1584]

[1585] **2.** gRNA의 구축 및 합성

[1586] sgRNA는 AAV 벡터에 패키징하거나 또는 RNA로 합성하였다. 바이러스 벡터로 sgRNA를 삽입하기위해, sgRNA의 20 내지 22개의 염기서열에 상응하는 DNA 올리고뉴클레오타이드를 설계하여 어닐링하고, BsmBI 사이트를 이용해 pRGEN-Cas9(자체 개발한) 벡터내에 연결시켰다. Cas9과 5' 말단에 가변적인 표적 서열을 포함하는 sgRNA는 각각 CMV와 U6 프로모터를 통해 발현시켰다.

[1587] 또한, RNP에 의한 전달 시스템을 위해, sgRNA는 Phusion Taq 매개 중합에 의해 생성된 두 개의 부분적 상보성 올리고뉴클레오타이드의 어닐링에 의한 주형의 생성 후 T7 RNA 중합효소에 의해 전사시켰다. 전사된 sgRNA는 분광분석(spectrometry)을 이용해 정제 및 정량하였다.

[1588]

[1589] **3.** Cas9 단백질 정제

[1590] NLS 및 HA 에피토프를 포함하는 코돈-최적화된 Cas9 DNA 서열은 pET28 벡터로 서브 클로닝시키고, 최적의 배양 조건에서 IPTG를 이용해 BL21(DE3)에서 발현시켰다. 발현된 Cas9 단백질은 Ni-NTA 아가로스 비드를

이용해 정제하고, 적절한 버퍼로 투석시켰다. Cas9의 활성은 잘 알려진 효과적인 sgRNA를 이용한 *in vitro* 절단 시험을 통해 확인하였다.

[1591]

[1592] **4. 세포 배양**

[1593] 인간 슈반 유사 세포주(Human Schwann-like cell line)(ATCC) 및 인간 슈반세포(Human primary Schwann cell)(ScienCell)은 제조사의 매뉴얼에 따라 배양하였다. 인간 슈반 유사 세포는 1×페니실린/스트렙토마이신(WelGene) 및 10% 태아 송아지 혈청(WelGene)를 추가한 고농도 글루코스 포함 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(WelGene)에서 배양하였다.

[1594] 인간 슈반세포는 판매사에서 제공하는 슈반세포 배양액(ScienCell)에서 유지시켰다. 분화를 위해, 세포를 1% 태아 송아지 혈청(WelGene)과 수초형성(myelination) 신호를 위한 100 ng/mL Nrg1(Peprotech) 및 100μM dbcAMP(Sigma-Aldrich)를 첨가한 저농도 글루코스 포함 DMEM(WleGene)에서 7일 동안 배양하였다.

[1595]

[1596] **5. 형질도입**(Transfection)

[1597] 형질도입(transfection)을 위해, 4㎍ Cas9 단백질(ToolGen)과 1㎍ sgRNA를 포함한 RNP 복합체를 실온에서 15분동안 인큐베이션하였다. 그 후, 2×10^5 세포에 상기 RNP 복합체를 10㎕ 전기천공용 팁과 Neon electroporator(ThermoFisher)를 이용해 전기천공하여 전달하였다. 표적 딥 시퀀싱을 위해, 형질도입 72시간 후에 형질도입된 세포에서 게놈 DNA(gDNA)를 수집하였다.

[1598]

[1599] **6.** *In vitro* Real time PCR(qRT-PCR)

[1600] RNeasy mini kit(Qiagen)을 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 인간 슈반세포로부터 mRNA를 추출하였다. 그 후, 100ng mRNA는 High-capacity cDNA reverse transcription kit(ThermoFisher)를 이용하여 역 전사시켰다. qRT-PCR은 QuantStudio 3(ThermoFisher)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 Taqman Gene expression master mix 100ng으로 수행하였다. PMP22 발현 수준은 C_T 값을 이용해 계산하였고, GAPDH로 내인성 대조군(endogenous control)으로 사용하였다. 본 연구에서 사용한 Taqman 프로브(ThermoFisher)는 하단의 표 8에 정리하였다.

[1601] [표8]

Target Gene	Taqman Gene Experssion Assay	Accession number
PMP22	Hs00165556_m1	NM_000304.3
GAPDH	HS02786624_g1	NM_001256799.2

[1602]

[1603] **7. 표적 딥 시퀀싱(Targeted deep sequencing)**

[1604] 온-타겟 부위는 Phusion polymerase taq(New England BioLabs)을 이용하여 형질도입된 세포에서 추출한 gDNA로부터 PCR로 증폭하였다. 그 후, 상기 PCR 증폭물로 Mi-Seq(Illumina)을 이용하여 paired-end 딥 시퀀싱하였다. 딥 시퀀싱 결과는 온라인 Cas-Analyzer tool (www.rgenome.net)을 이용하여 분석하였다. PAM 서열로부터 3bp 업스트림에 인델이 Cas9에 의한 결과로 돌연변이가 발생하였는지 확인하였다. 본 연구에서 사용한 프라이머는 하단의 표 9에 정리하였다.

[1605] [표 9]

[1606]

	Target site	Primer-F (5' to 3')	Primer-R (5' to 3')
On-Target	hPMP22-TATA	CACAGGGCAGTCAGAGACCC (서열 번호 67)	GCAAACAAAGTTGGACACTG (서열 번호 68)
	mRosa26	AGACTCCCGCCCATCTTCTAGAAA (서열 번호 69)	AAGTCGCTCTGAGTTGTTATCAGT (서열 번호 70)
	AAVS1	CAGTGAAACGCACCAGACG (서열 번호 71)	AATCTGCCTAACAGGAGGTG (서열 번호 72)
Off-target (In silico, in vitro)	hPMP22-TATA Off1	GAGGGAATGGGGACCAAAGGCATT (서열 번호 73)	TCATGTGGGGTGATGTTCAGGAAG (서열 번호 74)
	hPMP22-TATA Off2	AGAGCAGCTGACCTGAGGTCCAA (서열 번호 75)	CCCAAGGGTAGAGTGCAAGTAAAC (서열 번호 76)
	hPMP22-TATA Off3	GCATCCTAGCTCATTTGGTCTGCT (서열 번호 77)	GAGAGGATTCCTCATGAATGGGAT (서열 번호 78)
	hPMP22-TATA Off4	ACCAAACACTACACTTGGTTACTG (서열 번호 79)	CTCCCACTAGCAATTTTAAAGTCT (서열 번호 80)
	hPMP22-TATA Off5	GAATGTTCAGCACAGGTTTCCTTG (서열 번호 81)	GGTCAAAAGGAGCTCCATATTTGA (서열 번호 82)
	hPMP22-TATA Off6	CAGGACACCCATGGCCAAATCCAG (서열 번호 83)	CAGAGCCTCCTGCAGGGATGTCAA (서열 번호 84)
	hPMP22-TATA Off7	GCCTGCCAAGGTGACTCTCATCTA (서열 번호 85)	TGCCCAGGCTGATCTTGAACTCCT (서열 번호 86)
	hPMP22-TATA Off8	CCCAGAGTTAAGAGGTTCTTTCCT (서열 번호 87)	GAAGCTACTCCAGTGCAACTAGCT (서열 번호 88)
	hPMP22-TATA Off9	ACGCAGTCTGTTCTGTGCAGTGT (서열 번호 89)	AGGCCTTCCCAAGGAAGACCCTGA (서열 번호 90)
	hPMP22-TATA Off10	GCTGATCACTGGCCAAATCCAGCT (서열 번호 91)	GGGAAACAATGGGATCAAGCTGCA (서열 번호 92)
	hPMP22-TATA Off11	GCCCCTTTGTAAGTTGAGGAGCAT (서열 번호 93)	CCCTCTACCTCTCTCAATGGGCTT (서열 번호 94)
	hPMP22-TATA Off12	CAGACAAGCAAATGCTGAGAGATT (서열 번호 95)	CCTGTCATTATGATGTTCGCTAGT (서열 번호 96)
	hPMP22-TATA Off13	CCAGAGTTGGCCTCCTACAGAGAT (서열 번호 97)	GTGGATGCCCCACTACTGTTCATT (서열 번호 98)
	hPMP22-TATA Off14	TACCCAATTTGCCAGTCTGTGTCT (서열 번호 99)	ACCACCAGGCCTGCCCTACAAGA (서열 번호 100)
	hPMP22-TATA Off15	TGTGAATTTGATCCTGGCATTATG (서열 번호 101)	TACAGACAAGCAGATGCTGAGAGA (서열 번호 102)
	hPMP22-TATA Off16	CAGTCAACAGAGCTCTAACCTCCT (서열 번호 103)	AGCACCTGGTTGCACATCAACTT (서열 번호 104)
	hPMP22-TATA Off17	CATGTGGTCCCTGAACGTGAATGA (서열 번호 105)	GTCTGTCGCTTGCCCTCTTCTCT (서열 번호 106)
	hPMP22-TATA Off18	ATGCAGGGCCTCTAGACCATTTCA (서열 번호 107)	CTCAGCCCTTTGTGCACTCACCT (서열 번호 108)

[1607]

Off-target (Digenome-seq, in vitro)	hPMP22-TATA Off1	TGCACATCGCAAACATTTCG (서열 번호 109)	TGGGTATCGCACTGTGTCAG (서열 번호 110)
	hPMP22-TATA Off2	AGGTTCACATGGCTTGTGGT (서열 번호 111)	ATATCTGAAATGCCCGCAGG (서열 번호 112)
	hPMP22-TATA Off3	TGCACATCGCAAACATTTCG (서열 번호 113)	TGGGTATCGCACTGTGTCAG (서열 번호 114)
	hPMP22-TATA Off4	TCTTTAAAGGCCTTATCTCC (서열 번호 115)	TTCTGCTTGAGAATTCATCC (서열 번호 116)
	hPMP22-TATA Off5	CTCCTAATCTTTCACTTAGG (서열 번호 117)	CAAAGCCTGGTATAACATAG (서열 번호 118)
	hPMP22-TATA Off6	TCACTTCGAGCATCTGTGG (서열 번호 119)	CCAAATGACAGGCTGAGCT (서열 번호 120)
	hPMP22-TATA Off7	AGCAGGAAGTGAAGGCTAAG (서열 번호 121)	ATGTAACGTGGCAACTCTGG (서열 번호 122)
	hPMP22-TATA Off8	GTGTTGCTCTCGTCAATTAG (서열 번호 123)	AGGTGTTGTACATGGAGAAG (서열 번호 124)
	hPMP22-TATA Off9	TGTGAGCCACCATACCCAGC (서열 번호 125)	CCTGCAGTCCTTTGCGGATC (서열 번호 126)
Off-target (In silico, In vivo)	hPMP22-TATA Off1	TCGCTGCCAGTATAACATGC (서열 번호 127)	AACTCCAGTCTCTAGACTCG (서열 번호 128)
	hPMP22-TATA Off2	AATAGTTTGACGTTGGAGCC (서열 번호 129)	ACTCCCAACATGTTCTCCTG (서열 번호 130)
	hPMP22-TATA Off3	ATCATCGCTCACAGAGTCC (서열 번호 131)	ACGACTGCAGGATCTTAATG (서열 번호 132)
	hPMP22-TATA Off4	TGGATGGAGGTTGGGAATCC (서열 번호 133)	TTGAGGCAGCAGCACTCTCC (서열 번호 134)
	hPMP22-TATA Off5	AGTCTATCCTAGCAGCTCC (서열 번호 135)	ACTGAGACCAGATAATGCAG (서열 번호 136)
	hPMP22-TATA Off6	AAGAGATGCGAGTTGTTCC (서열 번호 137)	CCTCTTCTACTCTGAGTGG (서열 번호 138)
	hPMP22-TATA Off7	ACCTGGTTTATCACAAGCTA (서열 번호 139)	AACGTGAACAGAAGGATTTC (서열 번호 140)
	hPMP22-TATA Off8	ATCACTCCATCAGAGTCAGG (서열 번호 141)	TGGCTCCTTCTATTCTCTCC (서열 번호 142)

[1608] **8. In** silico 오프-타겟 부위 설계

[1609] 오프-타겟 가능성 부위를 온라인 툴(www.rgenome.net)을 이용하여 in silico로 설계하였다. 최대 3bp의 미스매치를 오프-타겟 부위로 고려하였다.

[1610]

[1611] **9.** Digenome-seq

[1612] HeLa 세포의 게놈 DNA를 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)를 이용하여

판매사의 프로토콜에 따라 정제하였다. 미리 인큐베이션한 Cas9 단백질(100nM)과 sgRNA(300nM)를 게놈 DNA(10㎍)와 1mL 반응액(100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 100 μg/ml BSA, pH 7.9)에 37℃에서 8시간동안 혼합시켰다. 잘린 게놈 DNA에 RNase A(50㎍/mL)을 처리하고, DNeasy Tissue Kit (Qiagen)를 이용해 다시 정제하였다. 잘린 게놈 DNA의 1㎍을 Covaris system을 이용하여 조각으로 쪼개고, 조각 DNA에 라이브러리를 생성하기 위한 어댑터를 연결하였다. 그 후, 상기 라이브러리는 30-40×(Macrogen)의 시퀀싱 깊이(depth)에서 HiSeq X Ten Sequencer (Illumina)을 이용하여 전체 게놈 시퀀싱(WGS)을 수행하였다. In vitro 절단 스코어는 DNA 절단 스코어링 시스템에 의해 게놈에서 절단된 각각 염기서열 위치에서 계산되었다.

[1613]

[1614] **10. 마우스 및** 신경내 주입(intraneural injection)

[1615] 본 연구에 사용된 C22 마우스 주(B6;CBACa-Tg(PMP22)C22Clh/H)는 MRC Harwell(Oxfordshire, UK)에서 구입하였다. C22 마우스(수컷 4마리, 암컷 7마리)에 PMP22-TATA RNP를 처리하였다. 신경내 주입은 이전 연구(Daisuke Ino., J Vis Exp., (2016) 115)와 같은 방법으로 수행하였다. 6일령 마우스를 마취시키고, 수술로 마우스의 좌골신경을 노출시켰다. 신경 손상을 최소화하기 위해, 미량주입기(microinjector)에 부착된 인발 유리 마이크로피펫(pulled glass micropipettes)을 이용하여 좌골절흔(sciatic notch) 말단에 즉시 신경내 주입하였다. 마우스당 11㎍ Cas9 단백질과 2.75㎍ sgRNA의 RNP 복합체를 lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 함께 마우스에 주입시켰다. 본 연구에서 사용되는 모든 동물의 관리, 사용 및 치료는 실험 동물 관리 협회 평가 및 인증 협회에 따라 삼성 동물 관리 및 사용 위원회가 마련한 지침을 준수하여 수행되었다(SMC-20170206001).

[1616]

[1617] **11.** 로타로드 실험(Rotarod test)

[1618] 운동 협응력(Motor coordination)을 로타로드(rotarod) 장치(B.S. Technolab INC., Korea)를 이용하여 평가하였다. 이 실험은 마우스의 균형 및 운동 협응력를 평가하기 위해 수행하였다. 실험 전에, 마우스는 3일간의 훈련 기간을 거쳤다. 실험에서, 로타로드 실험을 위해 수평 회전 로드(21rpm)를 사용하였다. 회전하는 로드에서 마우스의 유지 시간을 측정하였고, 로드에서 최대 300초 동안 머무르도록 하였다.

[1619]

[1620] **12. 전기생리학**(Electrophysiological) 검사

[1621] 전기 생리학적 상태를 평가하기 위해, 신경 전도 검사(nerve conduction study, NCS)를 이전 연구(Jinho Lee., J biomed Sci., (2015) 22, 43)와 같은 방법으로 수행하였다. 간단히 요약하면, 마우스를 이산화탄소 가스로 마취시키고, 실험

수행 동안에 노즈 콘(nose cone)을 이용하여 1.5% 이소플루란(isoflurane)을 공급하여 마취를 유지하였다. 말단부터 뒷다리까지 털을 완전히 제거하였다. NCS는 Nicolet VikingQuest 장치(Natus Medical)를 이용하여 수행하였다. 좌골 신경의 운동 신경 전도 검사를 위해, 활성 기록 니들 전극을 힘줄에 기준 전극이 있는 비복근 근육(gastrocnemius muscle) 위에 놓고, 자극을 주는 음극을 둔두 안쪽에 몸 중심부 쪽으로 6mm 및 안후부 허벅 다리의 중간 선에서 기록 전극에 근접 위치에 배치하여 각각 원위부와 근위부의 반응을 측정하였다. 말단 지연속도(Distal latency, DL), 운동 신경 전도 속도(motor nerve conduction velocity, MNCV) 및 복합 근육 활동 전위(compound muscle action potential, CMAP)의 진폭을 측정하였다. CMAP는 최대 초과 자극에서 측정하였다.

[1622]

[1623] **13. 신경 조직학(Nerve histology) 및 이미지**

[1624] 좌골 신경을 마우스에서 생검하고 영향을 받은 검체의 병리학적 검사를 현미경으로 분석하였다. 검체들은 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 포함하는 25mM 카코딜산염(cacodylate) 버퍼를 이용하여 각각 고정시켰다. 세미-틴 섹션(Semi-thin sections)은 톨루이딘블루(toluidine blue)로 염색하였다. 1% OsO_4에서 한 시간동안 인큐베이션한 후에, 검체들은 에탄올 시리즈에서 탈수시킨 다음 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)를 통과시키고 에폭시 수지(Epon 812, Oken, Nagano, Japan)에 묻었다. 세포는 Leica ultra-microtome (Leica Microsystems)을 이용해 어느정도 얇게(1㎛) 잘라내고, 30 - 45초간 톨루이딘블루로 염색하였다. g-ratio(axon 직경/fiber 직경)은 Zeiss Zen2 program (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 마이엘린(myelin)의 내부 직경과 외부 직경을 측정하여 산출하였다.

[1625]

[1626] **14. 통계학적 분석**

[1627] mRNA 발현량 관련 데이터의 통계학적 유의성은 post-hoc Tukey의 다중 비교를 이용한 one-way ANOVA으로 평가되었다. 그 밖의 제시된 데이터는 Mann-Whitney U test (http://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/Default2.aspx)를 이용해 계산되었다. 본 연구에서 생성된 데이터 및 그래프는 GraphPad Prism을 사용하여 분석되었다. 유의 수준은 0.05로 설정되었다.

[1628]

[1629] 실시예 1. sgRNA 스크리닝

[1630] 인간 PMP22 발현을 정상범위로 줄일 수 있는 치료학적으로 효과적인 sgRNA 서열을 스크리닝하기 위해, PMP22 유전자의 암호화 서열(coding sequences, CDS), TATA- 및 인트로닉 인핸서 결합 부위를 표적기 위해 설계된 다양한 sgRNA와 Cas9을 인간 세포주로 형질도입하였다. 간단히, SpCas9 스크리닝을 위해 Jurkat 인간 T 세포를 사용하였고, CjCas9 스크리닝을 위해 HEK293T 세포를

사용하였다. gDNA를 상기 세포로부터 수집하고 표적 딥 시퀀싱을 수행하였다. NHEJ-매개 인델로 sgRNA 서열에 의해 유도된 다양한 패턴의 돌연변이를 확인하였다. 몇몇의 SpCas9-sgRNA은 CDS 및 두 조절 부위 모두에서 강하게 인델을 유도하였다(도 1). 특정 CjCas9-sgRNA에서 30 - 40% 인델이 유도됨을 확인하였다(도 2).

[1631]

[1632] 실시예 2. 슈반 유사 세포(Schwann-like cells)의 유전자 조작

[1633] 비록 인간 세포에서 sgRNA로 인한 효과적인 인델 돌연변이를 확인하였지만, 이러한 효과가 슈반세포(Schwann cells)에서도 가능한지는 불확실하다. 이에 슈반세포에서 PMP22의 발현저해 및 유전자 조작 효과를 조사하기 위해, 슈반 유사 세포인 sNF02.0 세포를 이용하여 SpCas9-sgRNA 효과를 확인하였다. Jurkat 세포에서 확인한 효과적인 SpCas9-sgRNA를 sNF02.0 세포에서 반복 실험하였다. 형질도입 후 딥 시퀀싱 분석을 통해 동일한 sgRNA에 의한 동일하게 높은 인델 빈도를 확인하였다. 특히, 인델의 거의 70 - 80%는 CDS를 표적하는 sgRNA에 의해 PMP22의 프래임 시프트가 일어남이 확인되었다(도 4).
프로모터(TATA-box) 부위 및 인핸서-결합 위치를 표적하는 단일 sgRNA의 형질도입은 각각 31%, 59%의 인델을 유도하였다(도 3). 흥미롭게, 마이엘린 유전자의 주요 조절인자(예를 들면, EGR 또는 SOX10-결합 위치) 또는 중요한 TATA-box가 포함된 40 - 50bp의 작은 삭제는 이중 sgRNA를 처리한 세포의 매우 많은 세포에서 발견되었다(도 5).

[1634]

[1635] 실시예 3. 유전자 조작에 의한 PMP22의 발현 조절

[1636] 효과적인 sgRNA에 의한 PMP22 발현의 변화를 평가하기 위해, 슈반 유사 세포를 분화시키고, qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과, PMP22를 표적하는 대부분의 sgRNA가 효과적으로 PMP22의 발현을 저해하였다(도 6). 단일 sgRNA를 이용한 경우 Cas9만 처리한 대조군에 비해 PMP22의 발현이 30% 정도 감소하였고, 이중 sgRNA를 이용한 경우 PMP22의 발현이 50% 정도 감소하였다.

[1637]

[1638] 실시예 4. 슈반세포(Schwann cells)의 유전자 조작

[1639] 앞서 슈반 유사 세포에서 PMP22의 발현저해 및 유전자 조작 효과를 확인한 후, 인간 슈반세포(human primary schwann cells)에서 앞선 결과가 유사한 효과를 나타내는지 확인하였다. 인간 슈반세포에 인간 PMP22 유전자의 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA을 이용하여 표적 부위에 따른 인델 빈도를 관찰하였다. 그 결과, PMP22 유전자의 TATA-box, 인핸서 및 암호화 서열을 표적하는 대부분의 sgRNA에서 표적 부위에 인델 빈도가 높게 확인되었다(도 7a). 또한, TATA-box, 인핸서를 각각 표적하는 이중 sgRNA를 이용한 경우에도 높은 인델 빈도를 보였다. 추가적으로 원거리 인핸서 부위 B 및 C를 암호화 하는 서열을 표적하는 sgRNA를 이용해 표적 부위가 인델이 발생함은 확인하였고(도 7c), 이때,

대조군으로 APOC3를 표적하는 sgRNA을 사용하였다.

[1640] 이와 더불어, 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA가 PMP22 유전자의 발현 감소를 야기하는지 확인하기 위해, qRT-PCR 분석을 수행하였다. PMP22는 슈반세포의 분화 마지막 단계에서 전사되기 때문에, 인간 슈반세포에 Nrg1(Neuregulin-1)과 dbcAMP(dibutryral cyclic AMP)를 포함하는 잘 알려진 분화 신호인자를 7일 동안 처리하였다. 그 결과, Nrg1 및 dbcAMP를 처리하지 않은 세포에 비해 처리한 세포에서 9 배 증가된 PMP22의 발현을 확인하였다. 반면에, 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA를 처리한 경우에는 4 ~ 6배로 유도된 PMP22의 발현을 확인하였다. 이는 각 표적 부위별 SpCas9-sgRNA에 의한 PMP22의 각 표적 부위 변형에 따른 PMP22의 발현 저해로 인한 것으로 판단된다(도 7b).

[1641]

[1642] 실시예 5. 인간 PMP22 유전자의 TATA-box 부위를 표적하는 CRISPR/Cas9을 이용한 PMP22의 효과적 및 특이적 발현감소 효과(in vitro)

[1643] 앞서 스크리닝한 TATA-box 부위를 표적하는 sgRNA 중 높은 인델 효율을 보이며 TATA-box를 표적할 수 있는 sgRNA_TATA_Sp#1(이후 PMP22-TATA sgRNA로 기재함)를 선택하여 인간 슈반세포(human primary schwann cells)에서 실험하였다. 인간 슈반세포에 sgRNA와 Cas9 단백질을 포함하는 RNP 복합체를 형질도입하여 인델을 유도하였고(도 8b), 표적 딥 시퀀싱 분석을 통해 전체 인델 중 89.54±1.39%가 인간 PMP22의 TATA-box 부위에서 발생하였음을 확인하였다(도 8c).

[1644] 또한, PMP22의 TATA-box에 형성된 돌연변이가 PMP22 유전자의 발현 감소를 야기하는지 확인하기 위해, qRT-PCR 분석을 수행하였다. PMP22는 슈반세포의 분화 마지막 단계에서 전사되기 때문에, 인간 슈반세포에 Nrg1(Neuregulin-1)과 dbcAMP(dibutryral cyclic AMP)를 포함하는 잘 알려진 분화 신호인자를 7일 동안 처리하였다. 그 결과, Nrg1 및 dbcAMP를 처리하지 않은 세포에 비해 처리한 세포에서 9 배 증가된 PMP22의 발현을 확인하였다. 반면에, PMP22-TATA RNP를 같이 처리한 경우, 6배 유도된 PMP22의 발현을 확인하였다. 이는 CRISPR/Cas9에 의한 PMP22의 TATA 변형에 따른 PMP22의 발현 저해로 인한 것으로 판단된다(도 8d). 분화 신호인자와 AAVS1 표적 RNP를 함께 처리한 대조군에서는 PMP22 유전자의 발현의 차이를 확인할 수 없었다.

[1645] PMP22-TATA RNP의 특이성을 확인하기 위해, in silico 기반 오프-타겟 분석을 수행하였다. 표적 딥 시퀀싱을 통해 in silico 분석에 의해 확인된 오프-타겟 위치에서 시퀀싱 에러 비율(평균적으로 0.1%)을 넘는 인델 돌연변이는 확인되지 않았다(도 9). In silico 기반 오프-타겟 분석이 편향된 접근일 수 있기 때문에, 더불어 Digenome-seq(편향되지 않은 전체 게놈 시퀀싱 기반 오프-타겟 분석)을 수행하였다. 그 결과, in vitro에서 PMP22-TATA RNP에 의해 절단된 9개의 오프-타겟 위치를 확인할 수 있었다(도 10a, 도 10b). 하지만 표적 딥 시퀀싱을 통한 재분석 결과, 상기 오프-타겟 위치에서 비정상적 인델 돌연변이는 발견되지

않았다(도 10c).

[1646] 이러한 결과는 PMP22-TATA RNP에 의한 PMP22의 TATA-box의 효과적 및 특이적 변형이 인간 슈반세포에서 PMP22의 전사수준을 조절할 수 있음을 보여준다.

[1647]

[1648] 실시예 6. CMT1A 마우스에서 CRISPR/Cas9-매개 PMP22의 발현저해에 의한 질병 표현형 개선 효과

[1649] In vivo에서 PMP22-TATA RNP에 의한 PMP22 전사조절을 시험하기 위해, C22 마우스의 좌골 신경으로 리포좀으로 둘러싸인 PMP22-TATA RNP를 직접 주입하였다(도 11). 이때, 대조군으로 Rosa26(mRosa26)를 표적하는 RNP 복합체로 사용하였다. mRosa26 RNP 또는 PMP22-TATA RNP는 6일령(p6) 마우스의 왼쪽 좌골 신경(ipsilateral)으로 신경내 주입하여 전달하였고, 오른쪽 좌골 신경은 내부 대조군(contralateral)으로 사용하였다. 주입 4주 후에 좌골 신경으로부터 게놈 DNA를 수집하여 표적 딥 시퀀싱을 통해 RNP 복합체의 신경내 전달 효율을 확인하였다. 그 결과, mRosa26 RNP 및 PMP22-TATA RNP를 각각 처리한 좌골 신경 모두 11% 정도의 인델 효율을 나타났다(도 12a). 또한, in vitro 결과와 일치하게 전체 인델 시퀀싱 리드 중 98.48±0.15%의 TATA-box 돌연변이가 확인되었다(도 12b).

[1650] 이와 더불어, in vivo에서 TATA-box 돌연변이에 의한 PMP22의 발현저해를 확인하기 위해, RNP를 처리한 좌골 신경에서 전체 좌골 신경으로부터 추출한 mRNA의 qRT-PCR 분석을 수행하였다. In vitro 결과와 유사하게, PMP22 유전자 발현이 대조군에 비해 38% 감소함을 확인하였다(도 12c).

[1651] PMP22-TATA RNP에 의해 좌골 신경에서 오프-타겟 돌연변이가 발생하였는지 확인하기 위해, in silico 기반 오프-타겟 분석을 수행하였다. 그 결과, 마우스 게놈에서 3bp 미스매치 이상을 포함하는 오프-타겟이 8개 확인되었고(도 13a), 표적 딥 시퀀싱을 수행한 결과, PMP22-TATA RNP를 처리한 신경(ipsilateral)에서 시퀀싱 에러 비율을 넘는 인델 돌연변이는 확인되지 않았다(도 13b).

[1652] PMP22-TATA RNP에 의한 PMP22 전사의 감소가 demyelination을 막을 수 있는지 시험하기 위해, PMP22-TATA RNP 또는 mRosa26 RNP를 처리한 C22 마우스의 좌골 신경을 수득하여 semi-thin cross sections하여 toluidine-blue(myelin 염색)로 염색하였다. 또한, g-ratio를 측정하기 위해, axon 직경과 fiber(myelin을 포함하는 axon) 직경을 측정하였다. 그 결과, PMP22-TATA RNP를 처리한 실험군에서 더 두꺼운 myelin 시트가 형성됨을 확인할 수 있었다(도 14a, 도 14b). 더불어, mRosa26 RNP를 처리한 대조군에 비해 PMP22-TATA RNP를 처리한 경우 큰 직경을 가지는 axon의 수가 많아짐을 발견하였다(도 14a, 도 14b). 대조군(2.6%, $p<0.01$)에 비해 PMP22-TATA RNP를 처리한 실험군(16.5%)에서 직경이 6㎛ 이상인 큰 myelinated fiber의 수를 측정한 결과가 더욱 명확한 치료적 효과를 보여준다.

[1653] Myelination의 조직학 분석에서 상당히 개선되었다는 것을 감안하여, 두 그룹의 전기 생리학적 프로파일을 조사하였다. 그 결과, mRosa26 RNP를 처리한 대조군에 비해 PMP22-TATA RNP를 처리한 실험군의 좌골 신경에서 감소된 말단 지연속도(distal latency, DL) 및 증가한 운동 신경 전도 속도(motor nerve conduction velocity, NCV)를 확인하였고(도 15a, 도 15b), 이러한 결과는 PMP22-TATA RNP 처리한 신경에서 myelin 두께 및 axon의 직경의 증가에 상응되는 결과이다. 또한, PMP22-TATA RNP를 처리한 신경에서 복합 근육 활동 전위(compound muscle action potential, CMAP)의 진폭이 상당히 증가하는 것을 확인하였으며(도 15c), 이는 앞선 결과와 상응된다.

[1654] PMP22-TATA RNP에 의한 조직학적 및 전기 생리학적 향상된 효과를 감안하여, 로타로드 실험으로 마우스의 이주 행동(locomotor behaviour)을 분석하였다. 그 결과, PMP22-TATA RNP를 처리한 마우스(11 - 16주령)가 mRosa26 RNP를 처리한 마우스(11 - 16주령)에 비해 더 오래 남아있는 것을 확인하였다(도 16a). 또한, MP22-TATA RNP를 처리한 마우스가 mRosa26 RNP를 처리한 마우스에 비해 근육이 증가됨을 확인하였다(도 16b).

[1655] 이러한 결과들은 CMT1A와 같은 PMP22의 과발현에 의한 demyelination를 개선 또는 치료하기 위한 PMP22-TATA RNP의 치료적 효과를 보여준다.

[1656]

[1657] 따라서, 상기의 결과들은 통해 PMP22의 프로모터 부위를 표적으로 하는 CRISPR/Cas9을 이용한 PMP22의 발현저해 효과를 보여준다. 또한, C22 마우스의 좌골 신경으로의 직접적인 PMP22-TATA RNP의 비바이러스 전달이 PMP22 과발현에 의해 야기되는 demyelination과 관련된 임상 및 신경병리학적 표현형을 개선시킬 수 있음을 보여준다. 그러므로, PMP22의 조절인자 부위의 CRISPR/Cas9 매개 변형은 CMT1A 및 demyelinating neuropathies를 보이는 다른 질병의 치료를 위해 좋은 전략이 될 수 있다고 사료된다.

[1658]

산업상 이용가능성

[1659] 인위적으로 조작한 SC 기능 조절 인자 및 이에 의해 인위적으로 기능 변형시킨 SC 기능 조절 시스템에 의해서, 효과적인 SC 기능장애 질환, 예를 들어, 샤르코-마리-투스 질환 형태 1A(Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A), 데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSS), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN), 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS) 등의 SC 기능 조절 인자 관련 질환의 치료적 용도로 이용할 수 있다. SC 기능 조절 인자들이 관여하는 다양한 체내 메커니즘을 조절을 통해 SC 기능 조절 시스템의 효능을 개선시킬 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 핵산서열 내 변형이 일어난 PMP22 유전자의 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 핵산서열 내 변형은 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 일어난 것을 특징으로 하는, 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
PMP22 유전자는 이의 핵산서열 중 조절 영역(regulatory region), 비 암호 영역 및 암호 영역으로 구성된 군에서 선택되는 1이상의 영역에 인위적 변형이 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 유전자는 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자로서,
상기 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내
PAM(proto-spacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp의 염기 서열 부위 내의
하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;
야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;
외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입
중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는
상기 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형
을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 프로모터 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 엑손 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 인핸서 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 인트론 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site, Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box로 구성된 군에서 선택되는 서열 내 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 10] 제4항에 있어서,
상기 PAM 서열은 예를 들어, 하기의 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자(5'에서 3'방향으로 기재함).
NGG(N은 A, T, C 또는 G임);
NNNNRYAC(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C또는 T임);
NNAGAAW(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임);
NNNNGATT(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임);
NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임); 및
TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[청구항 11] 제2항에 있어서,
상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 SC 기능 조절 인자.

[청구항 12] PMP22 유전자의 핵산 서열 중,
Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site, Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 서열을 포함하는 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
이하의 군으로부터 선택되는 1 이상의 가이드 핵산:
서열 번호 1 내지 8번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;

서열 번호 14 내지 29번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;
서열 번호 41 내지 53번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
서열번호 1, 3, 25, 27, 28, 41, 44, 45 및 53의 표적 서열 중 1 이상에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 가이드 핵산은 18 내지 23 bp의 뉴클레오타이드인, gRNA 분자.

[청구항 17] PMP22 유전자의 핵산 서열 중, Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site, Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 서열을 포함하는 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 19] 제17항에 있어서,
상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 유전자 조작은
SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내 PAM(proto-spacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp의 염기 서열 부위 내의
하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;
야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;
외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입
중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는

상기 SC 기능 조절 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형
을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 PAM 서열은 예를 들어, 하기의 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물(5'에서 3'방향으로 기재함).
NGG(N은 A, T, C 또는 G임);
NNNNRYAC(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C또는 T임);
NNAGAAW(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임);
NNNNGATT(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임);
NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임); 및
TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[청구항 22] 제17항에 있어서,
상기 유전자 조작용 조성물은 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 23] 제17항에 있어서,
상기 유전자 조작용 조성물은 바이러스 벡터 시스템으로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 24] 제23항에 있어서,
상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 25] (a) PMP22 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 66번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
(b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 유전자 조작용 키트.

[청구항 26] PMP22 유전자의 핵산 서열 중, Promoter, TATA Box, CAAT Box, Initiation Site, Termination Site, Donor Splice Site, Acceptor Splice Site, Poly A Site,

Enhancer, 3′ UTR(Untranslated Region), 5′ UTR, Attenuator 및 GC Box로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 서열을 포함하는 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물.

[청구항 27] 제26항에 있어서,
PMP22 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물.

[청구항 28] 제26항에 있어서, 상기 표적 서열은 서열번호 1 내지 66번의 표적 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물.

[청구항 29] 제26항에 있어서, 상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질인 것을 특징으로 하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물.

[청구항 30] 제26항에 있어서, 상기 SC 기능장애 질환은 PMP22 중복(duplication)으로 인한 PMP22의 발현증가에 의한 슈반세포 기능 장애를 나타내는 질환인 것을 특징으로 하는 SC 기능장애 질환 치료용 조성물.

[청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 SC 기능 조절 인자 관련 질환은 샤르코-마리-투스 질환 형태 1A(Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A), 데제린-소타스병(Dejerine-Sottas disease, DSS), 선천성 저수초형성 신경병(Congenital Hypomyelination Neuropathy, CHN) 또는 루시-레비 증후군(Roussy-Levy syndrome, RLS)인 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.