

명세서

발명의 명칭: 슈반 세포 특이적 프로모터

기술분야

- [1] 본 발명은 슈반 세포 특이적 프로모터 및 이의 이용에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 슈반 세포에서 특이적으로 작동하는 인위적으로 조작된 최소형 프로모터에 관한 것으로, 상기 인위적으로 조작된 최소형 프로모터는 MPZ(Myelin Protein Zero 또는 P0)의 프로모터 유래인 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명은 슈반 세포 특이적 프로모터를 이용한 벡터 및 이를 이용한 슈반 세포와 관련된 질병 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 슈반 세포(Schwann cell, 이하 SC로 약칭하기도 함) 혹은 신경초세포(neurolemmocyte)는 말초신경계의 기본적인 신경교세포이다. 신경교세포는 뉴런을 지지하는 기능을 한다. 수초(myelin)가 있는 축삭(axon)에서 슈반 세포는 수초를 형성한다. 척추동물의 신경계는 수초로 절연되어 있어 축삭의 막 전기용량을 유지한다.
- [3] 유전병인 샤르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환은 말초신경계에서 수초를 형성하는 슈반 세포의 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 하나이다.
- [4] 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.
- [5] 이러한 CMT1A와 같은 슈반 세포 기능 이상에 따른 질환에 대해 최근 유전자 치료 기술을 적용하고 있다. 슈반 세포를 표적으로 하는 유전자 치료 기술은 CMT 외에도 슈반 세포와 관련된 많은 다른 질병, 예를 들어, 운동 뉴런 질환(motor neuron disease; MND)에 적용될 수 있으며, 또한 유전적 요인이 아닌 다른 원인에 의해 유발되는 질병도 포함한다. 이러한 질병의 대부분은 원인이 다양하고 잘 알려져 있지 않으므로 바이러스 벡터를 사용하여 이러한 질병을 표적하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 상황을 고려하여 더 나은 치료 효과를 달성하기 위해 CMT와 같은 탈수초화 신경병증을 포함하여 슈반 세포와 관련된 질병을 표적하는 개선된 방법에 대한 요구가 남아 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 일 목적은 슈반 세포 특이적 프로모터를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 이용한 슈반 세포와 관련된 질병의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 슈반 세포 특이적 프로모터를 제공한다.
- [10] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 다음 중 선택된 하나의 서열을 가질 수 있다:
 - [11] SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 및 14 중 선택된 하나의 서열에 적어도 70% 서열 유사성을 가지는 서열.
- [12]
- [13] 본 발명은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- [14] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터; 및 목적 유전자를 포함할 수 있다.
- [15] 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [16] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 및 14 중 선택된 하나의 서열에 적어도 70% 서열 유사성을 가지는 서열로 구성된 군에서 선택된 하나의 서열을 가질 수 있다.
- [17] 상기 목적 유전자는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 유전자 또는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, 징크핑거 뉴클레이즈(Zinc Finger Nucleases; ZFN) 또는 탈렌(TALEN; Transcription Activator-Like Effector Nucleases)일 수 있다. 이 때, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있다. 예를 들어, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질(SpCas9), 스태필로코커스 아우레스(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질(SaCas9), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) Cas9 단백질(CjCas9) 또는 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*) Cas9 단백질(SauriCas9)일 수 있다. 이때, 상기 유전자 조작용 단백질은 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자를 편집하기 위하여 발현되는 것일 수 있다. 이를 이용하여 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자를 녹아웃(Knock-out)시키는 효과를 발휘할 수 있다.
- [18] 또는, 필요에 따라, 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된

유전자로서, 슈만 세포에서 상기 목적 유전자를 과발현시키기 위해 본 출원의 프로모터를 사용할 수 있다.

- [19] 일 예로, 상기 슈만 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32(connexin 32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자, MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자, GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자, NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자일 수 있다. 질병 치료 효과를 위해, 필요에 따라, 상기 유전자들을 녹아웃(Knock-out) 또는 과발현시킬 수 있다.
- [20] 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral(retrovirus) vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral(lentivirus) vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral(adenovirus vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral (adenovirus-associated virus; AAV) vector), 백신시아바이러스 벡터(vaccinia viral(vaccinia virus) vector), 포스바이러스 벡터(poxviral(poxvirus) vector) 및 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral(herpes simplex virus) vector)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [21] 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조절/제어 구성요소는 인핸서, 인공적 인트론(artificial intron), 폴리아데닐화 신호 및/또는 WPRE일 수 있다. 일 예로, 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 인공적 인트론 및 WPRE를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론이고, 상기 WPRE는 WPRE3일 수 있다. 또 다른 일 예로, 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 인공적 인트론, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론이고, 상기 WPRE는 WPRE3이며, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다.
- [22]
- [23] 본 발명은 슈만 세포 특이적 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [24] 상기 조성물은 앞서 설명한 슈만 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다.
- [25]
- [26] 본 발명은 슈만 세포와 관련된 질병의 치료 방법을 제공한다.
- [27] 상기 치료 방법은 조성물을 대상체에 도입(또는 전달)하는 단계를 포함할 수 있다.
- [28] 상기 조성물은 슈만 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 슈만 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 바와 같다.
- [29] 상기 대상체는 슈만 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 또는 비인간 동물일 수

있다.

발명의 효과

- [30] 본 발명은 슈반 세포 특이적 프로모터 및 이의 이용에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 기술을 통해, 슈반 세포 특이적 프로모터를 포함한 벡터 및 이의 용도를 제공할 수 있다. 또한, 슈반 세포 특이적 프로모터를 포함한 벡터를 이용한 슈반 세포와 관련된 질병의 치료를 위한 약학적 조성물 및 치료 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 Rat schwann cell line에서 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현을 확인한 그래프이다.
- [32] 도 2는 Rat schwann cell line에서 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [33] 도 3은 Human schwann cell line에서 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현을 확인한 그래프이다.
- [34] 도 4는 S16 cell에서 최적화된 sgRNA 벡터 및 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [35] 도 5는 RT4 cell에서 최적화된 sgRNA 벡터 및 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [36] 도 6은 S16 cell에서 다른 polyA 벡터 및 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [37] 도 7은 RT4 cell에서 single AAV packaging이 가능한 small SauriCas9 및 최적화 요소 (Intron, WPRE)와 engineered MPZ promoter의 조합에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [38] 도 8은 RT4-D6P2T 세포주에서 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 그래프이다.
- [39] 도 9는 RT4-D6P2T 세포주에서 engineered MPZ promoter를 이용한 Cas9의 발현에 의한 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 확인한 것으로, 서로 다른 서열을 가지는 sgRNA (표 1)를 사용한 그래프이다.
- [40] 도 10은 RT4-D6P2T 세포주에서 engineered MPZ promoter를 이용한 tdTomato의 발현율을 확인한 그래프이다.
- [41] 도 11은 RT4-D6P2T 세포주에서 pAAV-tdTomato관련 벡터가 세포에 transformation된 수준을 확인한 그래프이다.
- [42] 도 12 및 도 13은 래트의 꼬리 정맥에 EFS promoter 및 IE200 promoter에 대해 SpCas9을 발현하는 벡터를 pmp22-TATA region을 타겟하는 sgRNA (표 1)를

발현하는 벡터와 같이 실험 동물인 rat에 co-transfection한 후, Sciatic nerve, Lumbar nerver, 및 Liver에서의 유전자 교정 효율(인텔)을 확인한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[43] 용어 정의

[44] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[45]

[46] 약

[47] 본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[48]

[49] 벡터(Vector)

[50] "벡터(vector)"는 달리 특정되지 않는 한, 유전 물질을 세포 내로 운반할 수 있는 모든 물질을 통틀어 일컫는다. 예를 들어, 벡터는 유전 물질, 즉, 세포 내에서 발현시키고자 하는 목적 유전자 또는 목적 핵산, 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 또는 슈반 세포의 기능에 관여하는 단백질을 암호화하는 핵산 등을 포함하는 비바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[51]

[52] 가이드 RNA

[53] "가이드 RNA"는 CRISPR/Cas9 복합체에서, 표적 핵산에 포함된 특정 서열을 인식하도록 CRISPR/Cas9 복합체를 유도하는 기능을 가지는 RNA를 의미한다. 상기 가이드 RNA의 구성을 기능적으로 나누어 크게, 1) 스캐폴드 부분, 및 2) 가이드 도메인 부분으로 나눌 수도 있다. 상기 스캐폴드 부분은 Cas9 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas9 단백질과 결합하여 복합체를 이룰 수 있도록 하는 부분이다. 상기 스캐폴드 부분은 어떤 Cas9 단백질의 유래 미생물의 종류에 의해 결정된다. 상기 가이드 도메인 부분은, 표적 핵산 내 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열 부분과 상보적으로 결합할 수 있는 부분이다. 상기 가이드 도메인 부분은 인위적으로 변형할 수 있는 서열로서, 관심 있는 표적 뉴클레오타이드 서열에 의해 결정된다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[54]

[55] 작동 가능하게 연결된(Operably linked)

- [56] "작동 가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어는 특정 구성이 다른 구성과 기능적 관계로 배치되어, 상기 특정 구성이 의도된 방식으로 기능할 수 있도록 다른 구성에 연결되어 있는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 서열이 A 단백질을 암호화하는 서열과 작동 가능하게 연결되었다고 할 때, 상기 프로모터가 세포 내에서 상기 A 단백질을 암호화하는 서열을 전사 및/또는 발현하도록 A 단백질을 암호화하는 서열에 연결된 것을 의미한다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.
- [57]
- [58] **엔지니어링 된(Engineered)**
- [59] "엔지니어링 된(engineered)" 또는 "인위적으로 조작된(artificially engineered)"이란 용어는 자연계에 이미 존재하는 구성을 가진 물질, 분자 등과 구분하기 위해 사용하는 용어로, 상기 물질, 분자 등에 인위적인 변형이 가해진 것을 의미한다. 예를 들어, "인위적으로 조작된 MPZ 프로모터(artificially engineered MPZ promoter)"의 경우, 자연계에 존재하는 MPZ 프로모터를 인위적으로 조작하여 변형시킨 MPZ 프로모터를 의미하며, 이 경우, 자연계에 존재하는 MPZ 프로모터의 일부 서열이 삭제(deletion) 및/또는 다른 서열로 치환(substitution)된 것일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.
- [60]
- [61] 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 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 기타 다른 참고문헌은 전체가 참고로 포함된다. 추가로, 물질, 방법, 실시예 및 실험에는 단지 예시적이며, 제한되는 것으로 의도되지 않는다.
- [62]
- [63] 이하 본 발명을 설명한다.
- [64]
- [65] 최근 CMT1A와 같은 슈반 세포 기능 이상에 따른 질환 치료를 위해, 유전자 치료 기술을 개발하고 있다. 이러한 유전자 치료를 위해 바이러스 벡터 등의 벡터 시스템을 이용하고 있다. 상기 벡터 시스템은 슈반 세포에서 특이적으로 발현시키는 프로모터를 포함하는 것을 주요 특징으로 한다.
- [66] 현재 다양한 연구자들이 슈반 세포 특이적 프로모터를 개발하고 있다. 특히, 슈반 세포에서 특이적으로 발현시키는 MPZ의 프로모터를 이용하고 있다. Kleopas A. Kleopa et al.(국제 공개 특허 WO2020/245169)은 CMT 질병 질환은

치료하기 위해 MPZ 프로모터 또는 미니 MPZ 프로모터와 작동 가능하게 연결된 GJB1 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 개발하였다. 이때, MPZ 프로모터는 1.2 kb의 전체 길이의 프로모터를 사용하거나, MPZ 유전자의 개시 코돈의 상류에 존재하는 410bp의 일부 서열을 포함하는 미니 MPZ 프로모터를 사용하였다. 이와 같이 MPZ 프로모터를 슈반 세포 특이적 프로모터로 이용하고 있다.

[67] 일반적으로 바이러스 벡터 시스템을 이용한 유전자 치료의 경우, 바이러스 벡터 시스템의 용량이 제한적이다. 상기 용량은 바이러스 패키징 능력에 따라 적어도 2kb 내지 50kb로 바이러스 종류에 따라 다를 수 있다. 따라서, 제한적인 용량을 효과적으로 사용하기 위해, 작은 사이즈의 프로모터를 사용하는 것이 필요하다.

[68] 이에 본 발명자들은 MPZ 프로모터를 이용하여 슈반 세포 특이적으로 좀더 높은 발현 효율을 보이며, 더 작은 사이즈를 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터를 개발하였다.

[69]

[70] 1. 슈반 세포 특이적 프로모터

[71] 본 명세서에 의해 개시되는 일 태양은 슈반 세포 특이적 프로모터에 관한 것이다. 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 슈반 세포에서 특이적으로 작동하는 프로모터이다. 이는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터를 이용하는 경우, 다른 세포에 비해 슈반 세포에서 상기 슈반 세포 특이적 프로모터에 의해 목적 유전자(즉, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결된 유전자 또는 목적 단백질을 암호화하는 핵산)의 발현이 증가하는 것을 의미한다. 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 바와 같이 MPZ 프로모터 유래이다. 특히, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 MPZ 프로모터를 인위적으로 변형시킨 프로모터이다. 이때, MPZ 프로모터는 인간 또는 래트의 MPZ 유전자의 프로모터일 수 있다. 상기 래트 MPZ 유전자의 프로모터(이하에서, 래트 MPZ 프로모터로 기재)는 다음과 같은 핵산 서열을 가진다:

GTTCCAGAAAACACCACTCAGTTCCTTGTCCTCCCGCTCTCTCCACCCACAG
ACGCTCTGGGCC-3' (SEQ ID NO: 1).

[72] 상기 인간 MPZ 유전자의 프로모터(이하에서, 인간 MPZ 프로모터로 기재)는 다음과 같은 핵산 서열을 가진다:

5'-ACTATGCCTGGCATAAACTTCATTTATTAAGTTTATTTTGTCTTTAATCT
CTCATATAACTTAGTCTTCCTGATATTGCAGCTGTGTGTGCCCTCTTTTGT
ACTCCAGCATTTTGTTCATTACTAAAGGAAGTGTCATGGCTTATTATACTT
GATTGTTGATGGGTTTGTCTCTGATCTTCCCATCTCCACCTCCCCAAACCA
AATTTTCAACTCCTTGCTGGAAGGACTTAATTTTATTCCTCTCTCTATTACC
TGCATTCTCATACTTTACATATTGCTGGCACTTAATACAATTTTGTAGCCTT
GAAATAAATTGAAATGGACTTAAACAGCAGCATGAAGCACTGAAGGACTT

CTTGACAAACGGAAAGGTCAGGGGCTTCTTGCCTGGAAATAGTCCAGTGG
 AGAAAAAATTCTGTCTGGGAAGAATCGCACAGGATGAAGGGAGGTGCGGG
 GAAAAAACTCCCATAGGACTTGGTCATCTCAAGAAGTCTGTAATGCAGCC
 CACATTAGAGGAGATAACAGGGGATATCCTATTTTCAGAGTTCTCTGGGGG
 AAACCTCCCTCTAGTTCCTAGGGCTGTGAGGCAGCCTCTCTCAGGCAAGGA
 GGCTGAGGAGAAATCCCTTTTTATGGCCTTTAAATTGAGGTTCCATATCTAT
 CCTCAGAGAAGTGTGTCTGTGTCCCTGTTTTGTCCCTCTCCCTCACCACC
 CCCCACAACATTCCAGCCTGGGGCAGGGGGAGGCCAGTGGACACAAAGCC
 CTCTGTGTATGGGGTGGTATGTGTCCCCCACCCTCCACCCAGACTATAC
 AATGCCCCCTCTGCTCCCTGCACTCTGCCCCCTCCCCACCACCTCTCAACT
 GCACATGCCAGGCTGCAATTGGTTACTGGCTGAGGACAGCCCCCTCATGCT
 GGGGCCCTAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAGGAACCCCCCGTTCAGTTCCT
 GGTCCCCCACTTTCTCAACCCACAG -3'(SEQ ID NO: 2).

- [73] 보다 구체적으로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 MPZ 프로모터일 수 있다.
- [74] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 MPZ 프로모터일 수 있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지 600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 MPZ 프로모터는 100 내지 1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100 내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있다.
- [75] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 MPZ 프로모터의 3' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 MPZ 프로모터일 수 있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 3' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지 600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 MPZ 프로모터는 100 내지 1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100 내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있다.
- [76] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수 있다.
- [77] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함할 수 있다.
- [78] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 5' 말단에 인트로닉 인핸서(Intronic

Enhancer; IE)를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수 있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질 수 있다.

- [79] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 3' 말단에 인트로닉 인핸서(Intronic Enhancer; IE)를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수 있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질 수 있다.

[80]

[81] **1-1. 슈반 세포 특이적 프로모터 예시 (1)**

- [82] 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수 있다.

- [83] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수 있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지 600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 100 내지 1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100 내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 200 내지 300bp의 길이를 가질 수 있다.

- [84] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수 있다.

- [85] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함할 수 있다.

- [86] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 3에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

```
5'-GCCTCACCCACCCCAACATTCCAACCTAGGGTAGGGGGAGGTCAGTAT
ACACAAAGCCCTCTGTGTAAGGGGTGGTATGTGTCCCCCACCCTTACC
CAGAGTATACAATGCCCTTCTGCTCCATGCCCTGCCACCCTCCCCACCAC
CTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCACTGGCTCAGGACAGCCC
```

CCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAGAAAACACCACT
CAGTTCCTTGTCCCCGCTCTCTCCACCCACAGACGCTCTGGGCC-3' (SEQ
ID NO: 3). 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3에 제시된
뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%,
80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열
동일성(sequence identity) 또는 서열 유사성(sequence similarity)을 가지는
뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [87] 다른 일구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는
SEQ ID: 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:
5'-CAGAGTATACAATGCCCCCTTCTGCTCCATGCCCCCTGCCACCCCTCCCCACC
ACCTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCACTGGCTCAGGACAGC
CCCCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAGAAAACACCA
CTCAGTTCCTTGTCCCCGCTCTCTCCACCCACAGACGCTCTGGGCC-3'
(SEQ ID NO: 4). 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 4에 제시된
뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%,
80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는
서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[88]

- [89] 다른 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의
일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일
수 있다.

- [90] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부
뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일 수
있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지
100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지
600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는
뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의
일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드
서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 100 내지
1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100
내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질
수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 200 내지
300bp의 길이를 가질 수 있다.

- [91] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수
있다.

- [92] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site;
TSS)를 포함할 수 있다.

- [93] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ

ID NO: 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-GTCCCTCTCCCTCACCACCCCCACAACATTCCAGCCTGGGGCAGGGGG
AGGCCAGTGGACACAAAGCCCTCTGTGTATGGGGTGGTATGTGTCCCCCA
CCCCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCTTCTGCTCCCTGCACTCTGCCCC
CTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTTACTGGCT
GAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAG
GAACCCCCCGTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTTTCTCAACCCCACAG-3' (SEQ
ID NO: 5). 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5에 제시된
뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%,
80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는
서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[94] 다른 일구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는
SEQ ID: 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-CCCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCTTCTGCTCCCTGCACTCTGCCC
CCCTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTTACTGG
CTGAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGGGGATTTTAAGCAGGTTCC
AGGAACCCCCCGTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTTTCTCAACCCCACAG-3'
(SEQ ID NO: 6). 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 6에 제시된
뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%,
80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는
서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[95]

[96] **1-2. 슈반 세포 특이적 프로모터 예시 (2)**

[97] 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부
뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기
인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함할 수 있다.

[98] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부
뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수
있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지
100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지
600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는
뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의
일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드
서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 100 내지
1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100
내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질
수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 200 내지
300bp의 길이를 가질 수 있다.

- [99] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수 있다.
- [100] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함할 수 있다.
- [101] 상기 IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수 있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 IE는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 IE는 117bp의 길이를 가질 수 있다. 일 구체예로, 상기 IE는 117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다: 5'-
GACAATGAGACTTTGTTTGGTCGCCTCCTCCTAAAGAACAGAAAAGTCTAT
AATTGTTTCCTCCCCAGAGCCAGCCCACACACATAGACTGCCTGGGATGACT
CTCCCTGTGTGGGCG-3' (SEQ ID NO: 7). 또는 상기 IE는 SEQ ID NO: 7에
제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75
내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열
동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [102] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ
ID NO: 3에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 래트 MPZ
프로모터의 5' 말단에 117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된
뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 8에
제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:
5'-GACAATGAGACTTTGTTTGGTCGCCTCCTCCTAAAGAACAGAAAAGTCT
ATAATTGTTTCCTCCCCAGAGCCAGCCCACACACATAGACTGCCTGGGATGA
CTCTCCCTGTGTGGGCGGCCTCACCCCAACATTCCAACCTAGGGTA
GGGGGAGGTCAGTATACACAAAGCCCTCTGTGTAAGGGGTGGTATGTGTCC
CCCCACCCCTACCCAGAGTATACAATGCCCTTCTGCTCCATGCCCTGC
CACCCTCCCCACCACCTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCACT
GGCTCAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGGTT
CCAGAAAACACCACTCAGTTCCTTGTCCCCGCTCTCTCCACCCACAGAC
GCTCTGGGCC-3' (SEQ ID NO: 8). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는
417bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID
NO: 8에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지
75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의
서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [103] 다른 일구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는
SEQ ID NO: 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 래트

MPZ 프로모터의 5' 말단에 117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-GACAATGAGACTTTGTTTGGTCGCCTCCTCCTAAAGAACAGAAAAGTCT
ATAATTGTTTCTCCCCAGAGCCAGCCACACACATAGACTGCCTGGGATGA
CTCTCCCTGTGTGGGCGCAGAGTATACAATGCCCCTTCTGCTCCATGCCCCT
GCCACCCTCCCCACCACCTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCA
CTGGCTCAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGG
TTCCAGAAAACACCACTCAGTTCCTTGTCCCCCGCTCTCTCCACCCCACAGA
CGCTCTGGGCC-3' (SEQ ID NO: 9). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는
317bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID
NO: 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지
75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의
서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[104]

[105] 다른 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함할 수 있다.

[106] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일 수 있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지 600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 100 내지 1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100 내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 200 내지 300bp의 길이를 가질 수 있다.

[107] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수 있다.

[108] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함할 수 있다.

[109] 상기 IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수 있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질

수 있다. 바람직하게는, 상기 IE는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 IE는 123bp의 길이를 가질 수 있다. 일 구체예로, 상기 IE는 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다: 5'-

GACAATGGAACCTTTGTTTGGTTGCCACCTCCCCCTCCTGTAGAACAACAAAAG
GTCTACAGTTGCCCCCTCCCTGGGGCCAGCCCACACACATAGTCTCTCTGGA
ATGACCTTCCTTGTGTGGGTA-3' (SEQ ID NO: 10). 또는 상기 IE는 SEQ ID NO:
10에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%,
75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열
동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [110] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ
ID NO: 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 인간 MPZ
프로모터의 5' 말단에 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된
뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 11에
제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-GACAATGGAACCTTTGTTTGGTTGCCACCTCCCCCTCCTGTAGAACAACAAA
GGTCTACAGTTGCCCCCTCCCTGGGGCCAGCCCACACACATAGTCTCTCTGG
AATGACCTTCCTTGTGTGGGTAGTCCCTCTCCCTCACCACCCCCCACAACAT
TCCAGCCTGGGGCAGGGGGAGGCCAGTGGACACAAAGCCCTCTGTGTATG
GGTGGTATGTGTCCCCCACCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCCCTTCT
GCTCCCTGCACTCTGCCCCCCTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAGG
CTGCAATTGGTTACTGGCTGAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGGG
GATTTTAAGCAGGTTCCAGGAACCCCCCGTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTTT
CTCAACCCACAG -3' (SEQ ID NO: 11). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적
프로모터는 423bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적
프로모터는 SEQ ID NO: 11에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상,
예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95%
또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드
서열을 가질 수 있다.

- [111] 다른 일구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는
SEQ ID NO: 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 인간
MPZ 프로모터의 5' 말단에 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된
뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 12에
제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다: 5'-

GACAATGGAACCTTTGTTTGGTTGCCACCTCCCCCTCCTGTAGAACAACAAAAG
GTCTACAGTTGCCCCCTCCCTGGGGCCAGCCCACACACATAGTCTCTCTGGA
ATGACCTTCCTTGTGTGGGTACCCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCCCTTC
TGCTCCCTGCACTCTGCCCCCCTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAG

GCTGCAATTGGTTACTGGCTGAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGG
GGATTTTAAGCAGGTTCCAGGAACCCCCCGTTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTT
TCTCAACCCACACAG-3' (SEQ ID NO: 12). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적
프로모터는 323bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적
프로모터는 SEQ ID NO: 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상,
예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95%
또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드
서열을 가질 수 있다.

[112]

[113] **1-3. 슈반 세포 특이적 프로모터 예시 (3)**

[114] 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부
뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기
인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함할 수 있다.

[115] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부
뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수
있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지
100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지
600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는
뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의
일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드
서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 100 내지
1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100
내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질
수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터는 200 내지
300bp의 길이를 가질 수 있다.

[116] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수
있다.

[117] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site;
TSS)를 포함할 수 있다.

[118] 상기 IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수
있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합
위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1
내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질
수 있다. 바람직하게는, 상기 IE는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있으며, 보다
바람직하게는, 상기 IE는 117bp의 길이를 가질 수 있다. 일 구체예로, 상기 IE는
117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
또는 상기 IE는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%
이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지

95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [119] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 3에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 3' 말단에 117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 13에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-GCCTCACCCACCCCAACATTCCAACCTAGGGTAGGGGGAGGTCAGTAT
ACACAAAGCCCTCTGTGTAAGGGGTGGTATGTGTCCCCCACCCTACC
CAGAGTATACAATGCCCCCTTCTGCTCCATGCCCCTGCCACCCTCCCCACCAC
CTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCACTGGCTCAGGACAGCCC
CCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAGAAAACACCACT
CAGTTCCTTGTCCTCCACCCACAGACGCTCTGGGCGGACAAT
GAGACTTTGTTTGGTCGCCTCCTCTAAAGAACAGAAAAGTCTATAATTGT
TCCTCCCCAGAGCCAGCCACACACATAGACTGCCTGGGATGACTCTCCCT
GTGTGGGCG-3' (SEQ ID NO: 13). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 417bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [120] 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 3' 말단에 117bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 7에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-CAGAGTATACAATGCCCCCTTCTGCTCCATGCCCCTGCCACCCTCCCCACC
ACCTCTCAATTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTCACTGGCTCAGGACAGC
CCCCCTCATGCTGGGGATCCAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAGAAAACACCA
CTCAGTTCCTTGTCCTCCACCCACAGACGCTCTGGGCGGACA
ATGAGACTTTGTTTGGTCGCCTCCTCTAAAGAACAGAAAAGTCTATAATT
GTTCTCCCCAGAGCCAGCCACACACATAGACTGCCTGGGATGACTCTCC
CTGTGTGGGCG-3' (SEQ ID NO: 14). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 317bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[121]

- [122] 다른 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의

일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함할 수 있다.

- [123] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일 수 있다. 이 때, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp, 300 내지 400bp, 400 내지 500bp, 500 내지 600bp, 600 내지 700bp, 700 내지 800bp 또는 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 바람직하게는, 상기 MPZ 프로모터의 5' 말단의 일부 뉴클레오타이드 서열은 800 내지 900bp의 길이를 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이 때, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 100 내지 1000bp, 100 내지 900bp, 100 내지 800bp, 100 내지 700bp, 100 내지 600bp, 100 내지 500bp, 100 내지 400bp, 100 내지 300bp 또는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터는 200 내지 300bp의 길이를 가질 수 있다.
- [124] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함할 수 있다.
- [125] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함할 수 있다.
- [126] 상기 IE는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함할 수 있다. 상기 IE는 MPZ 유전자의 인트론 1 영역에 존재하는 Egr2 및 Sox10 결합 위치(Egr2 and Sox 10 binding site)를 포함하는 일 영역일 수 있다. 상기 IE는 1 내지 100bp, 100 내지 200bp, 200 내지 300bp 또는 300 내지 400bp의 길이를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 IE는 100 내지 200bp의 길이를 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 IE는 123bp의 길이를 가질 수 있다. 일 구체예로, 상기 IE는 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또는 상기 IE는 SEQ ID NO: 10에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [127] 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 3' 말단에 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 15에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:
- 5'-GTCCCTCTCCCTCACCACCCCCACAACATTCCAGCCTGGGGCAGGGGG
AGGCCAGTGACACAAAGCCCTCTGTGTATGGGGTGGTATGTGTCCCCCA
CCCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCTTCTGCTCCCTGCACTCTGCCCC
CTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTTACTGGCT

GAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGGGGATTTTAAGCAGGTTCCAG
 GAACCCCCCGTTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTTTCTCAACCCCACAGGACAA
 TGGAACCTTTGTTTGGTTGCCACCTCCCCCTCCTGTAGAACAAAAAGGTCTA
 CAGTTGCCCCCTCCCTGGGGCCAGCCCACACACATAGTCTCTCTGGAATGAC
 CTTCCCTTGTGTGGGTA -3' (SEQ ID NO: 15). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적
 프로모터는 423bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적
 프로모터는 SEQ ID NO: 15에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상,
 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95%
 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드
 서열을 가질 수 있다.

- [128] 다른 일구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 200bp의 길이를 가지는
 SEQ ID NO: 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인위적으로 변형된 인간
 MPZ 프로모터의 3' 말단에 123bp의 길이를 가지는 SEQ ID NO: 10에 제시된
 뉴클레오타이드 서열을 가지는 IE가 부가된 형태일 수 있고, SEQ ID NO: 16에
 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다:

5'-CCCCTCCACCCAGACTATACAATGCCCCTTCTGCTCCCTGCACTCTGCCC
 CCCTCCCCACCACCTCTCAACTGCACATGCCAGGCTGCAATTGGTTACTGG
 CTGAGGACAGCCCCCTCATGCTGGGGCCCTAGGGGATTTTAAGCAGGTTCC
 AGGAACCCCCCGTTTCAGTTCCTGGTCCCCCACTTTCTCAACCCCACAGGAC
 AATGGAACCTTTGTTTGGTTGCCACCTCCCCCTCCTGTAGAACAAAAAGGTC
 TACAGTTGCCCCCTCCCTGGGGCCAGCCCACACACATAGTCTCTCTGGAATG
 ACCTTCCTTGTGTGGGTA-3' (SEQ ID NO: 16). 이 때, 상기 슈반 세포 특이적
 프로모터는 323bp의 길이를 가질 수 있다. 또는 상기 슈반 세포 특이적
 프로모터는 SEQ ID NO: 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상,
 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95%
 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드
 서열을 가질 수 있다.

[129]

[130] **1-4. 슈반 세포 특이적 프로모터의 장점 1 - 짧은 길이와 높은 발현율**

[131] 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터의 길이는 공지의 MPZ 프로모터의
 길이보다 짧다는 장점이 있다. 상기 장점은 벡터 내의 유전자를 발현시키기
 위하여, 벡터 내에 프로모터를 위치시키는 경우, 길이가 긴 프로모터보다 길이가
 짧은 프로모터가 크기 관점에서 유리하다는 점에서 찾을 수 있다.

[132] 또한, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 공지의 MPZ 프로모터보다 발현율이
 높다는 장점이 있다. 상기 슈반 세포 특이적 프로모터의 높은 발현율은 실험예
 1의 실험에서 확인한 바 있다. 즉, 본 출원의 슈반 세포 특이적 프로모터는 상기
 공지의 MPZ 프로모터보다 길이가 짧음에도 불구하고, 발현율이 더 높다는
 장점이 있다.

- [133] 일 구현예에서, 사용자는 도입하고자 하는 구성을 모두 하나의 벡터에 탑재하여 이용하는 것이 유용하다. 이때, 일반적으로 발현 카세트(구체적으로 프로모터 서열)에 있어서의 크기 제약이 특히 중요하다. 예를 들어, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 상기 공지의 MPZ 프로모터에 비하여 상대적으로 작은 크기의 프로모터이기 때문에, 벡터의 크기가 제약되는 상황에서 사용될 경우, 더욱 효율적이라는 장점이 있다.
- [134] 일 구체예로, 상기 공지의 MPZ 프로모터는 인간 또는 래트의 MPZ 유전자의 프로모터일 수 있으며, 일반적으로 1000 내지 1200bp의 길이를 가지는 서열이 사용된다.
- [135] 일 구체예로 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 및 16 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터는 200 내지 420bp의 길이를 가진다. 상기 슈반 세포 특이적 프로모터의 길이는 상기 공지의 MPZ 프로모터의 길이의 50% 이하일 수 있다. 구체적으로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터가 200bp, 300bp 또는 317bp일 경우, 상기 공지의 MPZ 프로모터의 길이의 30%이하에 해당하는 길이를 가질 수 있다.
- [136] 일 구체예로, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 및 16 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터는 상기 공지의 MPZ 프로모터보다 길이가 절반이상 짧음에도 불구하고, 상기 공지의 MPZ 프로모터에 비하여 발현율이 높다. 또한, 일 구체예로, 실험예 1-4를 통하여, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 상기 공지의 MPZ프로모터에 비하여 목적 단백질의 발현율이 약 1.5배 내지 2배 높을 수 있다.
- [137] 따라서, 벡터의 크기가 제약되는 경우, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 및 16 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터는 상기 공지의 MPZ 프로모터보다 효율적으로 사용될 수 있다.
- [138]
- [139] **1-5. 슈반 세포 특이적 프로모터의 장점 2 - 슈반 세포에 특이적으로 발현**
- [140] 본 발명의 프로모터는 슈반 세포에서 특이적으로 목적 단백질을 발현시킬 수 있다는 장점(특징)이 있다. 즉, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 슈반 세포에서 유의한 발현을 야기하고, 비(非)슈반 세포에서 낮은 발현을 야기하거나 발현을

야기하지 않는 프로모터이다.

- [141] 일 구현예에서, 체 내에 목적 유전자를 발현시키기 위한 벡터가 전신성 투여방법(systemic administration)에 의해 주입될 수 있다. 이때, 상기 목적 유전자는 특정 종류의 조직 또는 세포를 대상으로 특이적으로 발현될 필요가 있다.
- [142] 만약, 목적 유전자를 특이적으로 발현시키고자 하는 곳 이외의 조직 또는 세포에서 목적 유전자가 발현된다면, 목적 유전자의 발현을 통해 얻으려고 하는 효과와 달리, 예상할 수 없는 부작용이 발생할 확률이 증가할 수 있다. 즉, 특정 조직 또는 세포에서의 목적 유전자의 발현을 선택적으로 더 잘 발현시키는 프로모터를 사용하는 것이 필요하다.
- [143] 예를 들어, 슈반 세포에 특이적으로 목적 유전자를 발현시키기 위하여 프로모터를 사용하는 경우, 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터는 슈반 세포에 비특이적인 프로모터에 비하여 더욱 효과적이다.
- [144] 일 구체예로, 목적 유전자를 발현시키기 위한 벡터를 포함하는 조성물을 유전자 치료제로 사용할 경우가 있다. 생체 내(in vivo)에서 유전자 치료제를 사용하여 치료하는 방법의 일 구체예로, 특정 조직 또는 세포에서 목적 유전자를 발현하는 것을 목적으로 상기 유전자 치료제를 대상체의 몸에 직접 주입하는 것이 있다. 이 때, 벡터는 체 내에서 혈액을 따라 목적 조직 외에도 간 등의 조직 등을 지나간다. 따라서, 상기 유전자 치료제가 효과적으로 이용될 수 있기 위해서는, 간 등의 조직(목적 조직 이외의 조직)에서는 유전자 발현이 적고, 목적 조직에서 가장 효과적으로 발현되는 특징을 가지는 것이 바람직하다. 본 출원의 프로모터는 신경조직에서 목적 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있는, 슈반 세포 특이적 프로모터이다.
- [145] 일 구체예로, 슈반 세포에 특이적으로 목적 유전자를 발현시키기 위하여, 다음에 개시하는 본 출원의 프로모터를 사용하는 경우, 종래의 슈반 세포 특이적 프로모터를 사용하는 경우와 비교하여 목적 단백질의 발현율이 높고, 비슈반세포에서의 발현율이 상대적으로 낮은 장점이 있다:
- [146] SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16로 표시되는 각 서열; 또는 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 및 16 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [147]
- [148] 다만, 상기에 개시된 슈반 세포 특이적 프로모터의 예시는 단순 예시로, 이에 제한되지 않는다.
- [149]
- [150] **2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터**
- [151] 본 명세서에 의해 개시되는 일 태양은 슈반 세포 특이적 발현 벡터에 관한

것이다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터를 포함한다. 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재된 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 각 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포에서 특이적으로 발현하는 벡터를 의미하며, 이는 상기 벡터에 포함된 슈반 세포 특이적 프로모터에 의해 슈반 세포 특이적으로 작동한다.

- [152] 보다 구체적으로, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 목적 유전자를 포함할 수 있다.
- [153] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재된 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 각 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.
- [154] 상기 목적 유전자는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 유전자일 수 있다. 또는 상기 목적 유전자는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 목적 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다.
- [155] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 선택적으로 조절/제어 구성요소를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조절/제어 구성요소는 벡터에 포함된 목적 유전자에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 조절/제어 구성요소는 인핸서, 인공적 인트론(artificial intron), 종결 신호, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(IRES, Internal Ribosome Entry Site), WPRE, 스플라이스 억셉터, 2A 서열 및/또는 복제원점(replication origin)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [156] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral(retrovirus) vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral(lentivirus) vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral(adenovirus) vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral (adenovirus-associated virus; AAV) vector), 백신시아바이러스 벡터(vaccinia viral(vaccinia virus) vector), 포스바이러스 벡터(poxviral(poxvirus) vector) 및 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral(herpes simplex virus) vector)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 비바이러스 벡터는 플라스미드, 파지, 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA(전사물) 또는 PCR 앰플리콘(amplicon)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 플라스미드는 pcDNA 시리즈, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, 및 pUC19으로 이뤄진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [157]
- [158] **2-1. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (1)**
- [159] 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터

및 목적 유전자를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.

- [160] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [161] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [162] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [163] 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32(connexin 32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자, MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자, GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자, NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [164] 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, 징크핑거 뉴클레이즈(Zinc Finger Nucleases; ZFN) 또는 탈렌(TALEN;

Tranion Activator-Like Effector Nucleases)일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이 때, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

- [165] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral(retrovirus) vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral(lentivirus) vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral(adenovirus) vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adeno-associated viral (adeno-associated virus; AAV) vector), 백신시아바이러스 벡터(vaccinia viral(vaccinia virus) vector), 폭스바이러스 벡터(poxviral(poxvirus) vector) 및 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral(herpes simplex virus) vector)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [166] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질(SpCas9), 스태필로코커스 아우레스(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질(SaCas9), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) Cas9 단백질(CjCas9) 또는 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*) Cas9 단백질(SauriCas9)일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [167] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [168] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[169]

[170] **2-2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (2)**

[171] 다른 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 목적 유전자를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[172] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부

뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5 또는 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5 또는 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[173] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부

뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 11 또는 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 11 또는 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[174] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부

뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[175] 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32 유전자, SH3TC2 유전자, MPZ 유전자, EGR2 유전자, GDAP1 유전자, NDRG1 유전자 또는 PMP22 유전자일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[176] 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, ZFN 또는 TALEN일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이 때, 상기

Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

- [177] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 및 단순포진 바이러스 벡터로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [178] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5 또는 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [179] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 11 또는 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [180] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [181]
- [182] **2-3. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (3)**
- [183] 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, 목적 유전자 및 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [184] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 4에

제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [185] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [186] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 래트 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 래트 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [187] 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32 유전자, SH3TC2 유전자, MPZ 유전자, EGR2 유전자, GDAP1 유전자, NDRG1 유전자 또는 PMP22 유전자일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [188] 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, ZFN 또는 TALEN일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이 때, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [189] 상기 조절/제어 구성요소는 폴리아데닐화 신호, WPRE(Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 및/또는 인공적 인트론일 수 있다.
- [190] 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bovine growth hormone polyadenylation signal; BGHA), 합성된 폴리아데닐화 신호(synthetic polyadenylation signal; synpA) 또는 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 신호(simian virus 40 polyadenylation signal; SV40pA)일 수 있으나,

이에 제한된 것은 아니다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다: 5'-

tgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggagatg
tgggaggtttttaaa-3' (SEQ ID NO: 17). 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에
제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다: 5'-
AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAAT
TACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGG-3'(SEQ ID NO:
18).

- [191] 이 때, 상기 WPRE는 감마, 알파 및 베타 요소 중 적어도 하나 이상의 요소를
가질 수 있다. 일 예로, 상기 WPRE는 감마 및 알파 요소를 포함하는 WPRE3일 수
있으며, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수
있다:

5'-AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAA
CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTAT
CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTG
GTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCCGTGGTGT-3' (SEQ ID NO:
19). 다른 일 예로, 상기 WPRE는 감마, 알파 및 베타 요소를 모두 포함할 수 있다.
이 때, 상기 WPRE는 SEQ ID NO: 20에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수
있다:

5'-AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAA
CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTAT
CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTG
GTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT
GGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCAC
CACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACG
GCGGAACATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTG
TTGGGCACTGACAATCCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCA
TGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCT
ACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC
GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATC
TCCCTTTGGGCCCGCCTCCCCGCCTG-3' (SEQ ID NO: 20).

- [192] 이 때, 상기 인공적 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 발현 백터에서 상기 목적
유전자의 발현을 향상시키기 위한 것일 수 있다. 일 예로, 상기 인공적 인트론은
MVM(minute virus of mice) 인트론일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID
NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다: 5'-

AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAAT
TACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGG-3' (SEQ ID NO:

21).

- [193] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 및 단순포진 바이러스 벡터로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [194] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [195] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 WPRE를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [196] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 인공적 인트론을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론 일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반

세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[197] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산과 상기 폴리아데닐화 신호 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[198] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[199] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론 및 WPRE를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적

프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

- [200] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 또는 14에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 WPRE의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[201]

[202] **2-4. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (4)**

- [203] 다른 일 구현예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, 목적 유전자 및 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.

- [204] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5 또는 6에

제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5 또는 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [205] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 5' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 11 또는 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 11 또는 12에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [206] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제된 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터 및 상기 인위적으로 변형된 인간 MPZ 프로모터의 3' 말단에 IE를 포함한 것일 수 있다. 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 구체예로, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 이상, 예를 들어, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 또는 95 내지 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [207] 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32 유전자, SH3TC2 유전자, MPZ 유전자, EGR2 유전자, GDAP1 유전자, NDRG1 유전자 또는 PMP22 유전자일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [208] 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, ZFN 또는 TALEN일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이 때, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [209] 상기 조절/제어 구성요소는 폴리아데닐화 신호, WPRE 및/또는 인공적 인트론일 수 있다.
- [210] 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, 합성된 폴리아데닐화 신호 또는 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 신호일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO:

18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

- [211] 이 때, 상기 WPRE는 감마, 알파 및 베타 요소 중 적어도 하나 이상의 요소를 가질 수 있다. 일 예로, 상기 WPRE는 감마 및 알파 요소를 포함하는 WPRE3일 수 있으며, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 WPRE는 감마, 알파 및 베타 요소를 모두 포함할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 SEQ ID NO: 20에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [212] 이 때, 상기 인공적 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터에서 상기 목적 유전자의 발현을 향상시키기 위한 것일 수 있다. 일 예로, 상기 인공적 인트론은 MVM(minute virus of mice) 인트론일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.
- [213] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 이 때, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 및 단순포진 바이러스 벡터로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [214] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [215] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 WPRE를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다.

이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

- [216] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 인공적 인트론을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론 일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [217] 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산과 상기 폴리아데닐화 신호 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.
- [218] 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO:

17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리아데닐화 신호는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[219] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론 및 WPRE를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[220] 또 다른 일 구체예로서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산, 인공적 인트론, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 5, 6, 11, 12, 15 또는 16에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 SpCas9 단백질, SaCas9 단백질, CjCas9 단백질 또는 SauriCas9 단백질일 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 SEQ ID NO: 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 MVM 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 사이에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 WPRE3 일 수 있다. 이 때, 상기 WPRE3는 SEQ ID NO: 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 WPRE는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA일 수 있다. 일 예로, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 다른 일 예로, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 이 때, 상기 폴리아데닐화

신호는 상기 WPRE의 3' 말단에 위치할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV vector)일 수 있다.

[221] 다만, 상기에 개시된 슈반 세포 특이적 발현 벡터의 예시는 단순 예시로, 이에 제한되지 않는다.

[222]

[223] **3. 슈반 세포에서 특이적으로 목적 단백질을 발현하는 방법**

[224] 본 명세서에 의해 개시되는 일 태양은 슈반 세포에서 목적 단백질을 발현하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 이용한다. 보다 구체적으로, 상기 방법은 목적 단백질을 암호화하는 핵산(또는 목적 유전자)을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 슈반 세포에 도입(또는 전달)하여 슈반 세포에서 목적 단백질을 발현시키는 방법에 관한 것이다. 이 때, 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포 또는 비인간 동물 슈반 세포일 수 있다. 상기 방법은 *in vitro*, *ex vivo* 또는 생체 내(*in vivo*)에서 수행될 수 있다. 이 때, 생체 내는 슈반 세포를 포함하는 인간 생체 내 또는 비인간 동물 생체 내일 수 있다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.

[225]

[226] **3-1. 슈반 세포 특이적으로 목적 단백질을 발현하는 방법 예시(1)**

[227] 일 구현예로서, 상기 방법은 슈반 세포에서 목적 단백질을 발현시키는 방법일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[228] 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 목적 단백질을 암호화하는 핵산(또는 목적 유전자)를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[229] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 또한, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 또한, 상기 목적 유전자는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.

[230] 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포 또는 비인간 동물 슈반 세포일 수 있다.

[231] 상기 슈반 세포는 인간 또는 비인간 동물로부터 수득한 슈반 세포일 수 있다.

[232] 상기 슈반 세포는 인간 또는 비인간 동물 생체 내에 존재하는 슈반 세포일 수 있다.

[233] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 나노파티클 방법 및/또는 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징 방법을 이용한 것일 수 있다. 또는

슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 양이온성 리포좀법, 초산 리튬-DMSO, 지질-매개 형질감염(transfection), 인산칼슘 침전법(precipitation), lipofection, PEI(Polyethyleneimine)-매개 형질감염, DEAE-dextran 매개 형질감염, 및/또는 나노파티클-매개 핵산 전달(Panyam et al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023 참조)을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [234] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 in vitro, ex vivo 또는 in vivo에서 수행될 수 있다.
- [235] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입한 결과, 슈반 세포에서 목적 단백질이 발현될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포는 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리하기 전과 비교하여 목적 단백질의 발현이 현저히 증가할 수 있다.
- [236] 일 구체예에서, 상기 방법은 슈반 세포에서 Cas9 단백질을 발현시키는 방법일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것을 포함할 수 있다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2-1. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시(1)" 및 "2-2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시(2)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 in vitro, ex vivo 또는 in vivo에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 방법은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 슈반 세포에 처리 또는 도입하는 것을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [237]
- [238] **3-2. 슈반 세포 특이적으로 목적 단백질을 발현하는 방법 예시(2)**
- [239] 다른 일 구현예로서, 상기 방법은 슈반 세포에서 목적 단백질을 발현시키는 방법일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [240] 이 때, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, 목적 단백질을 암호화하는 핵산(또는 목적 유전자) 및 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [241] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 또한, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과

동일한 특징 및 구조를 가진다. 또한, 상기 목적 유전자 및 조절/제어 구성요소는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.

- [242] 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포 또는 비인간 동물 슈반 세포일 수 있다.
- [243] 상기 슈반 세포는 인간 또는 비인간 동물로부터 수득한 슈반 세포일 수 있다.
- [244] 상기 슈반 세포는 인간 또는 비인간 동물 생체 내에 존재하는 슈반 세포일 수 있다.
- [245] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 나노파티클 방법 및/또는 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징 방법을 이용한 것일 수 있다. 또는 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 양이온성 리포솜법, 초산 리튬-DMSO, 지질-매개 형질감염(transfection), 인산칼슘 침전법(precipitation), lipofection, PEI(Polyethyleneimine)-매개 형질감염, DEAE-dextran 매개 형질감염, 및/또는 나노파티클-매개 핵산 전달(Panyam et al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023 참조)을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [246] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것은 *in vitro*, *ex vivo* 또는 *in vivo*에서 수행될 수 있다.
- [247] 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입한 결과, 슈반 세포에서 목적 단백질이 발현될 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포는 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리하기 전과 비교하여 목적 단백질의 발현이 현저히 증가할 수 있다.
- [248] 일 구체예에서, 상기 방법은 슈반 세포에서 Cas9 단백질을 발현시키는 방법일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 처리 또는 도입하는 것을 포함할 수 있다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 슈반 세포 특이적 프로모터, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 및 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 상기 슈반 세포 특이적 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2-3. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시(3)" 및 "2-4. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시(4)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나일 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포일 수 있다. 이 때, 상기 방법은 *in vitro*, *ex vivo* 또는 *in vivo*에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 방법은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 슈반 세포에 처리 또는 도입하는 것을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [249]
- [250] 다만, 상기에 개시된 슈반 세포 특이적으로 목적 단백질을 발현하는 방법의 예시는 단순 예시로, 이에 제한되지 않는다.

- [251]
- [252] **4. 슈반 세포와 관련된 질병 치료 용도**
- [253] **4-1. 조성물**
- [254] 본 명세서에 의해 개시되는 일 태양은 슈반 세포와 관련 질병 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함한다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 목적 유전자로 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자 및/또는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자 및/또는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산을 이용해 슈반 세포와 관련된 질병의 치료를 위해 이용될 수 있다.
- [255] 보다 구체적으로 상기 조성물은 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다:
- [256] 슈반 세포 특이적 프로모터; 및
- [257] 목적 유전자.
- [258] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.
- [259] 이때, 일 예로, 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, ZFN 또는 TALEN일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이 때, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1 단백질일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이를 이용하여, 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자를 녹아웃(Knock-out)시키는 효과를 발휘할 수 있다.
- [260] 또는, 필요에 따라, 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자로서, 슈반 세포에서 상기 목적 유전자를 과발현시키기 위해 본 출원의 프로모터를 사용할 수 있다.
- [261] 상기 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자는 Cx32(connexin 32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자, MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자, GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자, NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자일 수 있다. 질병 치료 효과를 위해, 필요에 따라, 상기 유전자들을 녹아웃(Knock-out) 또는 과발현시킬 수 있다.
- [262] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 조절/제어 구성요소를 추가로 더 포함할 수

있다. 이 때, 상기 조절/제어 구성요소는 벡터에 포함된 목적 유전자에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 조절/제어 구성요소는 인핸서, 인공적 인트론, 종결 신호, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(IRES, Internal Ribosome Entry Site), 스플라이스 엑셉터, 2A 서열 및/또는 복제원점(replication origin)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [263] 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터가 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 경우, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 가이드 RNA는 슈반 세포와 관련된 질병을 유발하는 유전자를 표적할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 폴리-T(poly-T) 부분이 제거된 스캐폴드 부분을 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열일 수 있다.
- [264] **4-1-1. 조성물 예시 (1)**
- [265] 일 구현예로서, 상기 조성물은 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다:
- [266] 슈반 세포 특이적 프로모터; 및
- [267] Cas9 단백질을 암호화하는 핵산.
- [268] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.
- [269] 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [270] 일 구체예에서, 상기 조성물은 앞서 설명한 "2-1. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (1)" 및 "2-2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (2)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 폴리-T(poly-T) 부분이 제거된 스캐폴드 부분을 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열일 수 있다.
- [271]
- [272] **4-1-2. 조성물 예시 (2)**
- [273] 다른 일 구현예로서, 상기 조성물은 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다:
- [274] 슈반 세포 특이적 프로모터;
- [275] Cas9 단백질을 암호화하는 핵산; 및
- [276] 조절/제어 구성요소.
- [277] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징

및 구조를 가진다.

- [278] 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [279] 일 구체예에서, 상기 조성물은 앞서 설명한 "2-3. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (3)" 및 "2-4. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (4)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 폴리-T(poly-T) 부분이 제거된 스캐폴드 부분을 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열일 수 있다.
- [280]
- [281] **4-2. 치료 방법**
- [282] 본 명세서에 의해 개시되는 일 태양은 슈반 세포와 관련 질병 치료 방법에 관한 것이다. 상기 치료 방법은 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함하는 조성물을 이용한다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 앞서 설명한 "2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 목적 유전자로 슈반 세포와 관련된 질병과 연관된 유전자 및/또는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 조성물을 이용하여 슈반 세포와 관련된 질병을 치료할 수 있다.
- [283] 상기 치료 방법은 상기 조성물을 대상체에 도입(또는 투여)하는 단계를 포함할 수 있다.
- [284] 이 때, 상기 대상체는 슈반 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다. 상기 조성물은 앞서 설명한 "4-1. 조성물" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다. 예를 들어, 상기 슈반 세포와 관련된 질병은 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환 또는 운동 뉴런 질환(motor neuron disease; MND)일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [285] 이 때, 상기 조성물을 대상체에 도입(또는 투여)하는 단계는 주사(injection), 수혈(transfusion), 삽입(implantation) 또는 이식(transplantation)으로 수행될 수 있다. 이때, 상기 조성물을 대상체에 도입(또는 투여)하는 것은 망막하(subretinal), 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitreally) 종양내(intratumorally), 절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous), 림프액내(intralymphatic) 또는 복막내(intraperitoneally)에서 선택된 투여 경로로 수행될 수 있다.
- [286]
- [287] **4-2-1. 치료 방법 예시 (1)**

- [288] 일 구현예로서, 상기 치료 방법은 대상체에 조성물을 도입 또는 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [289] 이 때, 상기 조성물은 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다:
- [290] 슈반 세포 특이적 프로모터; 및
- [291] Cas9 단백질을 암호화하는 핵산.
- [292] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.
- [293] 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 폴리-T(poly-T) 부분이 제거된 스캐폴드 부분을 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열일 수 있다.
- [294] 상기 대상체는 슈반 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다.
- [295] 일 구체예에서, 상기 치료 방법은 슈반 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 대상체에 조성물을 도입(투여)하는 단계를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 앞서 설명한 "2-1. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (1)" 및 "2-2. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (2)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포와 관련된 질병은 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환일 수 있다.
- [296]
- [297] **4-2-2. 치료 방법 예시 (2)**
- [298] 다른 일 구현예로서, 상기 치료 방법은 대상체에 조성물을 도입 또는 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [299] 이 때, 상기 조성물은 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다:
- [300] 슈반 세포 특이적 프로모터;
- [301] Cas9 단백질을 암호화하는 핵산; 및
- [302] 조절/제어 구성요소.
- [303] 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 앞서 설명한 "1. 슈반 세포 특이적 프로모터" 섹션에 기재한 바와 같으며, 상기 섹션에 설명된 구성과 동일한 특징 및 구조를 가진다.
- [304] 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA는 폴리-T(poly-T) 부분이 제거된 스캐폴드 부분을 포함할 수 있다. 일 구체예로, 상기 가이드 RNA의 가이드

도메인은 pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열일 수 있다.

- [305] 상기 대상체는 슈반 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 또는 비인간 동물일 수 있다.
- [306] 일 구체예에서, 상기 치료 방법은 슈반 세포와 관련된 질병을 가지는 인간 대상체에 조성물을 도입(투여)하는 단계를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 앞서 설명한 "2-3. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (3)" 및 "2-4. 슈반 세포 특이적 발현 벡터 예시 (4)" 섹션에 기재된 여러 구체예 중 선택된 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 슈반 세포와 관련된 질병은 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환일 수 있다.
- [307]
- [308] 다만, 상기에 개시된 조성물 및 치료 방법의 예시는 단순 예시로, 이에 제한되지 않는다.
- [309]
- [310] 이하 본 명세서에서 제공하는 발명의 가능한 실시예들을 나열한다. 본 단락에서 제공하는 이하의 실시예들은 단지 발명의 일 예시에 해당될 뿐이다. 따라서, 본 명세서에서 제공하는 발명을 하기 실시예로 제한하여 해석할 수 없다. 실시예 번호와 함께 기재된 간략한 설명 또한, 각 실시예 간 구분의 편의를 위한 것일 뿐 본 명세서에서 개시하는 발명에 대한 제한으로 해석될 수 없다.
- [311]
- [312] 발명의 가능한 실시예
- [313] 슈반 세포 특이적 프로모터
- [314] 실시예 1, 슈반 세포 특이적 프로모터
- [315] 300 내지 500 bp 크기를 가지는 인공적 프로모터(artificial promoter or engineered promoter)인 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [316] 실시예 2, 프로모터의 길이 한정
- [317] 실시예 1에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 300 내지 350 bp 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [318] 실시예 3, MPZ 프로모터 유래
- [319] 실시예 1 내지 2에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간의 또는 래트의 공지의 MPZ 프로모터가 변형된 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [320] 실시예 4, MPZ 프로모터의 변형 한정
- [321] 실시예 1 내지 3에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간의 또는 래트의 공지의 MPZ 프로모터의 일부 뉴클레오타이드 서열이 삭제되거나 양 말단(5' 및 3') 중 어느 하나에 IE 서열이 부가되어 인위적으로 변형된 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [322] 실시예 5, TATA박스, CAAT박스, 또는 TSS 한정

- [323] 실시예 1 내지 4에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 TATA 박스, CAAT 박스, 또는 전사 시작 위치(transcription start site; TSS)를 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [324] 실시예 6, 프로모터의 서열 한정(short form)
- [325] 실시예 1 내지 5에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 다음 중 선택된 하나의 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터:
- [326] SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 및 6 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열.
- [327] 실시예 7, 300bp의 서열 한정
- [328] 실시예 6에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 3과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [329] 실시예 8, 프로모터에 IE 부가
- [330] 실시예 1 내지 7에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 3'말단 또는 5'말단에 인트로닉 인핸서(Intronic Enhancer; IE)의 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [331] 실시예 9, IE 서열 한정
- [332] 실시예 8에 있어서, 상기 IE의 서열은 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 7과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [333] 실시예 10, 서열 한정(IE added form)
- [334] 실시예 8 내지 9에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 다음 중 선택된 하나의 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터:
- [335] SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; 및 SEQ ID NO: 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 및 16 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열.
- [336] 실시예 11, 417bp 서열 한정1
- [337] 실시예 10에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 8 또는 SEQ ID NO: 8과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [338] 실시예 12, 417bp 서열 한정2
- [339] 실시예 10에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 9과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [340] 실시예 13, 317bp 서열 한정
- [341] 실시예 10에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 13과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터.

- [342] 실시예 14, 길이의 3배차이 강조
- [343] 실시예 7 또는 13에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 프로모터의 크기가 상기 공지의 MPZ 프로모터의 크기의 1/3이하인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 프로모터.
- [344] 슈반 세포 특이적 발현 벡터
- [345] 실시예 15, 슈반 세포 특이적 프로모터 포함
- [346] 실시예 1 내지 14 중 어느 하나의 슈반 세포 특이적 프로모터를 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [347] 실시예 16, 목적 유전자 포함
- [348] 실시예 15에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 목적 유전자를 추가로 포함하며, 상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [349] 실시예 17, 목적 유전자 한정(슈반 세포 관련 질병의 치료)
- [350] 실시예 16에 있어서, 상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병의 치료와 연관된 유전자인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [351] 실시예 18, 슈반 세포 관련 질병 한정
- [352] 실시예 17에 있어서, 상기 슈반 세포와 관련된 질병의 치료와 연관된 유전자는 Cx32(connexin 32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자, MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자, GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자, NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [353] 실시예 19, 목적 유전자 한정(유전자 조작용 단백질)
- [354] 실시예 16에 있어서, 상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자 조작용 단백질을 암호화하는 핵산인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [355] 실시예 20, 유전자 조작용 단백질 한정
- [356] 실시예 19에 있어서, 상기 유전자 조작용 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질, Cas12f1 단백질, 징크핑거 뉴클레이즈(Zinc Finger Nucleases; ZFN) 또는 탈렌(TALEN; Tranion Activator-Like Effector Nucleases)인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [357] 실시예 21, 조절/제어 구성요소 포함
- [358] 실시예 15 내지 20에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 조절/제어 구성요소를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [359] 실시예 22, 조절/제어 구성요소의 예시
- [360] 실시예 21에 있어서, 상기 조절/제어 구성요소는 폴리아데닐화 신호, WPRE(Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 및 인공적 인트론(artificial intron) 중 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반

세포 특이적 발현 벡터.

- [361] 실시예 23, 폴리아데닐화 신호 한정
- [362] 실시예 22에 있어서, 상기 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bovine growth hormone polyadenylation signal; BGHA), 합성된 폴리아데닐화 신호(synthetic polyadenylation signal; synpA) 또는 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 신호(simian virus 40 polyadenylation signal; SV40pA)인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [363] 실시예 24, SV40pA 및 synpA 서열 한정
- [364] 실시예 23에 있어서, 상기 SV40pA는 SEQ ID NO: 17 및 SEQ ID NO: 17과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중 어느 하나를 포함하거나, 상기 synpA는 SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 18과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [365] 실시예 25, WRPE 한정
- [366] 실시예 22에 있어서, 상기 WPPE는 감마, 알파 및 베타 요소 중 적어도 하나 이상의 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [367] 실시예 26, WRPE 서열 한정
- [368] 실시예 25에 있어서, 상기 WPPE는 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20 및 SEQ ID NO: 19 또는 SEQ ID NO: 20과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [369] 실시예 27, 인공적 인트론 한정
- [370] 실시예 22에 있어서, 상기 인공적 인트론은 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터에서 상기 목적 유전자의 발현을 향상시키기 위한 것임을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [371] 실시예 28, 인공적 인트론 서열 한정
- [372] 실시예 27에 있어서, 상기 인공적 인트론은 SEQ ID NO: 21 및 SEQ ID NO: 21과 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [373] 실시예 29, 벡터 한정
- [374] 실시예 15 내지 28에 있어서, 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [375] 실시예 30, 벡터의 종류 한정
- [376] 실시예 29에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral(retrovirus) vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral(lentivirus) vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral(adenovirus) vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adeno-associated viral (adeno-associated virus; AAV) vector), 백신시아바이러스 벡터(vaccinia viral(vaccinia virus) vector), 폭스바이러스

벡터(poxviral(poxvirus) vector) 및 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral(herpes simplex virus) vector)로 구성된 군에서 선택되는 하나의 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.

- [377] 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함하는 조성물
- [378] 실시예 31, 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함하는 조성물
- [379] 실시예 15 내지 30 중 어느 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 포함하는 조성물.
- [380] 실시예 32, 유전자 조작용 조성물
- [381] 실시예 31에 있어서, 상기 목적 유전자 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질, Cas12f1 단백질, 징크핑거 뉴클레아제(Zinc Finger Nucleases; ZFN) 또는 탈렌(TALEN; Transcription Activator-Like Effector Nucleases)을 암호화하는 핵산인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [382] 실시예 33, 가이드 RNA 추가
- [383] 실시예 32에 있어서, 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [384] 실시예 34, 가이드 RNA 특징
- [385] 실시예 33에 있어서, 상기 가이드 RNA는 슈반 세포와 관련된 질병을 유발하는 유전자를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [386] 실시예 35, 표적 유전자 한정
- [387] 실시예 34에 있어서, 상기 슈반 세포와 관련된 질병을 유발하는 유전자는 Cx32(connexin 32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자, MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자, GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자, NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [388] 실시예 36, 담체 추가
- [389] 실시예 31 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용하는 담체로, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유; 감미제; 방향제; 시럽제; 지방유와 같은 액체 담체; 멸균된 수용액; 프로필렌글리콜; 폴리에틸렌글리콜; 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르; 현탁제; 유제; 동결 건조 제제; 외용제; 안정제; 완충제; 동물성 유; 식물성 유; 왁스; 파라핀; 전분; 트라칸트; 셀룰로오스 유도체; 폴리에틸렌 글리콜; 실리카; 벤토나이트; 실리카; 탈크; 산화 아연; 및 이들의 적절한 조합 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [390] 실시예 37, 치료용 조성물

- [391] 실시예 31 내지 36 중 어느 하나의 조성물은 슈반 세포와 관련된 질병을 치료하기 위해 사용되는, 또는 치료하기 위한 용도인 치료용 조성물.
- [392] 슈반 세포 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법
- [393] 실시예 38, 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 이용한 방법
- [394] 실시예 15 내지 30 중 어느 하나의 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 이용하여 슈반 세포에 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법.
- [395] 실시예 39, 벡터를 세포로 전달하는 방법 추가
- [396] 실시예 38에 있어서, 상기 슈반 세포에 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법은 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 슈반 세포에 도입 또는 전달하는 방법을 포함하는 슈반 세포 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법.
- [397] 실시예 40, 전달 방법 한정
- [398] 실시예 39에 있어서, 상기 슈반 세포에 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 도입 또는 전달하는 방법은 양이온성 리포좀법, 초산 리튬-DMSO, 지질-매개 형질감염(transfection), 인산칼슘 침전법(precipitation), lipofection, PEI(Polyethyleneimine)-매개 형질감염, DEAE-dextran 매개 형질감염, 나노파티클-매개 핵산 전달, 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 나노파티클 방법 및/또는 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징 방법을 이용한 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법.
- [399] 실시예 41, 슈반 세포 한정
- [400] 실시예 38 내지 40에 있어서, 상기 슈반 세포는 인간 슈반 세포 또는 비인간 동물 슈반 세포인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법.
- [401] 실시예 42, *in vivo* 등 한정
- [402] 실시예 38 내지 41에 있어서, 상기 슈반 세포에 상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터를 도입 또는 전달하는 것은 *in vitro*, *ex vivo* 또는 *in vivo*에서 수행되는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적으로 목적 유전자 또는 단백질을 발현하는 방법.
- [403] 슈반 세포와 관련된 질병 치료 용도
- [404] 실시예 43, 치료 방법
- [405] 실시예 31 내지 37 중 어느 하나의 조성물을 대상체에 도입(또는 투여)하는 단계를 포함하는 슈반 세포와 관련된 질병 치료 방법.
- [406] 실시예 44, 투여 방법 한정
- [407] 실시예 43에 있어서, 상기 조성물을 대상체에 도입(또는 투여)하는 단계는 주사(injection), 수혈(transfusion), 삽입(implantation) 또는 이식(transplantation)하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포와 관련된 질병 치료 방법.
- [408] 실시예 45, 투여 경로 한정

[409] 실시예 43 내지 44에 있어서, 상기 조성물을 대상체에 투여하는 것은 망막하(subretinal), 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitrally) 종양내(intratumorally), 절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous), 림프액내(intralymphatic) 또는 복막내(intraperitoneally)에서 선택된 투여 경로로 수행하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포와 관련된 질병 치료 방법.

[410] 실시예 46, 질병 한정

[411] 실시예 43 내지 45에 있어서, 상기 슈반 세포와 관련된 질병은 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 질환 또는 운동 뉴런 질환(motor neuron disease; MND)인 것을 특징으로 하는 슈반 세포와 관련된 질병 치료용 조성물 또는 슈반 세포와 관련된 질병 치료 방법.

[412]

발명의 실시를 위한 형태

[413] 이하 실험예를 통해 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.

[414] 이들 실험예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들의 실험예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에서 있어 자명할 것이다.

[415]

[416] 실험예

[417] 실험방법

[418] **1. Plasmid generation**

[419] AAV2 또는 AAV9의 inverted tandem repeat (ITR) 사이에 codon-optimized SpCas9 또는 codon-optimized sauriCas9 서열과 이들 Cas9 upstream에 비교하려는 promoter 서열들을(SEQ ID NO: 3, 7, 8, 13, 및 32) 각각 위치시키는 형태로 pAAV-SpCas9관련 벡터를 Gibson assembly를 이용한 cloning 방법으로 제작하였다. 비교하려는 promoter의 서열들은 300bp small MPZ promoter (sMPZ promoter, SEQ ID NO: 3), 117bp의 egr2/sox10-binding site (Intronic Enhancer (IE), SEQ ID NO: 7)를 sMPZ promoter의 upstream (SEQ ID NO: 8), downstream (SEQ ID NO: 13)에 추가하거나 sMPZ promoter의 5'부분의 일부분을 IE로 대체한 promoter (SEQ ID NO: 9), 또는 기존에 모든 조직에서 발현율이 높은 것으로 알려진(슈반 세포에 비특이적인) EFS promoter를 포함한다.

[420] 제작된 벡터들을 기반으로 BGHA대신 synpA 및 sv40pA가 포함된 벡터를 Gibson assembly를 이용하여 추가 제작하였다. 상기 EPS 프로모터는 다음과 같은 핵산 서열을 가진다:

5'-GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAA

AGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCG
TATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCC
GCCAGAACACAG-3'(SEQ ID NO: 32).

- [421] 비슷하게 ITR사이에 U6 promoter와 sgRNA(unmodified or sf-modified) 서열을 전달하는 pAAV-U6-sgRNA를 제작하였고, pmp22-TATA에 대한 SpCas9 특이적인 guide RNA는 (표 1의 가이드 RNA1 또는 가이드 RNA2) BspQI site를 이용한 oligo cloning을 통해 제작하였다.
- [422] SauriCas9 test를 위해서는 ITR사이 SauriCas9과 sgRNA가 모두 포함된 single 벡터 pAAV-SauriCas9-U6-sgRNA 형태로 제작하였고, 이때 비교하려는 promoter는 SauriCas9의 upstream쪽, mvm intron은 promoter와 SauriCas9 서열사이, WPRE-short은 SauriCas9과 sv40pA사이에 위치시키는 벡터를 각각 제작하였다. 또한 sgRNA backbone은 활성이 검증된 *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9)의 backbone을 사용하였고, pmp22-TATA에 대한 SauriCas9 특이적인 guide RNA는 (표 1) BspQI site를 이용한 oligo cloning을 통해 제작하였다.
- [423] 더불어, AAV9의 inverted tandem repeat (ITR) 사이에 codon-optimized tdTomato 서열과 tdTomato의 upstream에 비교하려는 promoter 서열들을(SEQ ID NOs: 1, 3, 및 9) 각각 위치시키는 형태로 pAAV-tdTomato관련 벡터를 Gibson assembly를 이용한 cloning 방법으로 제작하였다. 비교하려는 promoter의 서열들은 300bp small MPZ promoter (sMPZ promoter, SEQ ID NO: 3), sMPZ promoter의 5'부분의 일부분을 IE로 대체한 promoter (SEQ ID NO: 9), 또는 기존의 공지의 MPZ promoter (SEQ ID NO: 1)를 포함한다. 상기 tdTomato는 다음과 같은 핵산 서열을 가진다:
- TGAACCTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGC
AGGACGGCACGCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCC
CCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCAC
CGAGCGCTGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACCAGG
CCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCT
ACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAACTGCCCCGGCTACTACTACGTGGACACC
AAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTA
CGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACTGTTTCCTGTACGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTAG-3'(SEQ ID NO: 33).

[424] [표1]

사용된 가이드 RNA 서열

Target Sites	Target Sequence with <u>PAM</u> (5'-3')	SEQ ID NO
Sp-PMP22-TATA(가이드 RNA1)	GGACCAGCCCCTGAATAAAC- <u>TG</u> <u>G</u>	22
Sauri-PMP22-TATA	ATTCAGGGGCTGGTCCAATGC- <u>T</u> <u>GGG</u>	23
Sp-PMP22-TATA(가이드 RNA2)	GACCAGCCCCTGAATAAAC- <u>TGG</u>	34

[425]

[426] **2. Cell culture and CRISPR/Cas9(또는 tdTomato) transfection**

[427] Human scwhann-like cell (sNF02.2) (CRL-2885, ATCC), S16 cell (CRL-2941, ATCC) 및 RT4 cell (CRL2768, ATCC)을 10% fetal calf serum (WelGene)과 1Xpenicillin/streptomycin (WelGene)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (WelGene)을 사용하여 2회/1W의 subculture로 maintain 하였다

[428] Human scwhann-like cell (sNF02.2)에 pAAV-SpCas9관련 벡터와 pAAV-U6-sgRNA관련 벡터를 각각 0.1pmol씩 co-transfection 시켰다. Neon transfection (ThermoFisher)을 사용하였으며, 1.5×10^5 cells을 10 μ l tip에 1400V/20ms/2pluses 조건으로 진행하였다. Forskollin을 2.5 μ M로 처리하고 transfection 후 5일 후에 cell pellet을 얻어 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 RNA를 추출하였다.

[429] S16 cell에 pAAV-SpCas9관련 벡터와 pAAV-U6-sgRNA관련 벡터를 각각 0.1pmol씩 co-transfection 시켰다. 1.5×10^5 cells을 10 μ l tip에 1400V/20ms/2pluses 조건으로 진행하였으며, transfection 후 3일 후에 cell pellet을 얻어 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 DNA, RNA를 추출하였다.

[430] RT4-D6P2T cell에 pAAV-SpCas9관련 벡터와 pAAV-U6-sgRNA관련 벡터를 각각 0.1pmol씩 co-transfection 시켰다. 1.5×10^5 cells을 10 μ l tip에 1400V/20ms/2pluses 조건으로 진행하였으며, transfection 후 3일 후에 cell pellet을 얻어 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 DNA, RNA를 추출하였다.

[431] RT4-D6P2T 세포를 5×10^5 cells/well 수준으로 12-well 플레이트에 seeding 한다. AAV stock을 녹인 뒤 세포당 1×10^4 이 되도록 희석한다. 총 100 μ l의 AAV를 세포당 1×10^4 이 되도록 각 플레이트의 Well에 처리하여 3일동안 배양한다. 후 genomic DNA를 추출하고 PCR로 on-target위치를 증폭시킨 후, Next-Generation Sequencing을 위한 sequencing primer에 특이적인 adaptor 및 TruSeq HT 이중 지표 프라이머(TruSeq HT Dual Index primers)를 붙이는 추가적인 PCR을 진행하였다.

이후 paired sequencing을 통하여 나온 read들을 분석하여 on-target 유전체 위치에서의 insertion 또는 deletion (Indels)의 정량적인 확인을 통해 가이드 RNA1(SEQ ID NO: 22) 및 가이드 RNA2(SEQ ID NO: 34)의 활성을 평가하였다.

- [432] RT4-D6P2T 세포 현탁액을 6.25×10^5 세포/ml의 밀도로 만들고 각 웰에 800ul의 세포 현탁액을 접종하였다. 세포를 5×10^5 cells/well (12-well plate)로 분주하여 배양하였다. pAAV-tdTomato관련 벡터를 1×10^6 /cell로 만들었다. 100ul의 pAAV-tdTomato관련 벡터를 1×10^6 gc/세포의 밀도로 세포에 처리하고 배양하였다. 배양한 세포를 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 DNA, RNA를 추출하였다. 또는 배양한 세포를 1.5ml 튜브에 넣고, 이후 4°C에서 2분 동안 9000rpm에서 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 FACS 버퍼 1mL를 추가하여 세포를 세척하였다. 4°C에서 2분 동안 9000rpm에서 원심분리기에서 분리하였다. 상층액을 흡인하고 300ul의 FACS 버퍼에 재현탁 하였다. 이후 FACS기기에서 분석을 진행하였다. RT4 cell에 pAAV-SpCas9관련 벡터와 pAAV-U6-sgRNA관련 벡터를 각각 0.1pmol씩 co-transfection, 또는 pAAV-SauriCas9-U6-sgRNA관련 벡터는 0.2pmol을 transfection하였다. 2×10^5 cells을 10ul tip에 1400V/20ms/2pluses 조건으로 진행하였다. Transfection 후 3일 후에 cell pellet을 얻어 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 DNA, RNA를 추출하였다.

- [433] 마취된 실험 동물(rat)의 꼬리정맥에 pAAV-SpCas9관련 벡터와 pAAV-U6-sgRNA관련 벡터를 1:1로 총 1×10^{14} vg/kg이 되도록 혼합하여 투여하였다. 4주 후 실험 동물(rat)을 Sacrifice한 후 Liver, Sciatic nerve, Lumbar nerve를 채취하여 Quick DNA/RNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)로 DNA, RNA를 추출하였다.

[434]

[435] **3. Real time PCR (qRT-PCR)**

- [436] 추출된 RNA는 총 100-1000ng으로 맞추어 cDNA Reverse-transcription kit(ThermoFisher)를 사용하여 cDNA를 제작하였다. QuantStudio 3에서 제조업체의 프로토콜(Thermo Fisher)에 따라 SYBR Green Master Mix를 사용하여 10-15ng의 cDNA로 qRT-PCR을 수행하였다. CT 값을 사용하여 SpCas9 발현 수준을 계산하고 hGAPDH, rGAPDH를 internal control로 사용하였다. 사용된 primer는 표 2 와 같다.

[437] [표2]

사용된 q-RT primer

Primer name	Sequence (5'-3')	SEQ ID NO
SpCas9_F	GGACTTCTACCCCTTCC TGA	24
SpCas9_R	GTGATGGTCTCCTCGC TCT	25
hGAPDH_F	GTCTCCTCTGACTTCAA CAGCG	26
hGAPDH_R	ACCACCCTGTTGCTGT AGCCAA	27
rGAPDH_F	GAAACCCATCACCATC TTCC	28
rGAPDH_R	GTTACACCCATCACA AACAT	29

[438]

[439] **4. Indel analysis (Targeted deep- sequencing)**

[440] 추출된 genomic DNA와 primer (표 3)를 이용하여 on-target 위치를 증폭시킨 후 illumine TrueSeq adaptor (Illumina)를 사용한 추가 PCR을 통해 샘플당 barcode를 제작하였다. 이후 PCR purification kit (Intronbio)을 사용하여 각 샘플들을 정제하였고, equimolar ratio로 샘플들을 pooling 후 Miseq과 TrueSeq HT dual index system (Illumina)을 통해 paired sequencing을 진행하여 sequencing read들을 생산하였다. 나온 read들을 CRISPR/RGEN Tools (www.rgenome.net)의 Cas9-Analyzer를 통해 분석하여 on-target 유전체 위치에서의 insertion 또는 deletion (Indels) read를 정량적으로 계산하여 벡터에 의한 유전자 편집 효율을 비교, 평가하였다.

[441] [표3]

사용된 targeted deep sequencing primer

Primer name	Sequence (5'-3')	SEQ ID NO
rPMP22_F	TCCAAGTTCATTTCTG CAGG	30
rPMP22_R	CCAGGCTCCCTGAGAT GTTC	31

[442]

[443] **5. Statistics**

[444] 통계 분석을 위하여, student t-test를 사용하였다. significance는 *는 $p<0.05$, **는 $p<0.01$, ***는 $p<0.001$ 을 의미한다.

[445]

[446] 실험결과

[447] 실험예 1. Rat schwann cell line 및 Rat schwann-like cell line에서의 engineered MPZ promoter 효과

[448] 실험예 1-1. Rat schwann cell line - S16 세포에서의 효과

[449] Rat MPZ gene의 Transcription Start Site (TSS) 및 TATA box를 포함한 small MPZ promoter (sMPZ, SEQ ID NO: 3)를 engineering 하기위해 MPZ gene의 첫번째 intron에 위치하면서 주요 egr2/sox10-binding site인 117bp의 intronic enhancer (IE, SEQ ID NO: 7)를 sMPZ의 upstream (IE-sMPZ, SEQ ID NO: 8) 및 downstream (sMPZ-IE, SEQ ID NO: 13)에 추가하거나, sMPZ의 5'쪽 100bp를 IE로 대체한 promoter (IE200, SEQ ID NO: 9)에 대해 SpCas9을 발현하는 벡터를 각각 제작하였다. 이후 pmp22-TATA region을 타겟하는 sgRNA (표 1의 가이드 RNA1)를 발현하는 벡터와 같이 schwann cell 계열인 S16 세포에 co-transfection하여 SpCas9 발현 및 유전자 편집 효율을 테스트하였다.

[450] 그 결과를 도 1 및 도 2에 도시하였다.

[451] 도 1은 S16 cell에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 Cas9 발현을 확인한 결과이다 (N=3-4). 도 2는 S16 cell에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율 (B)을 검증한 결과이다 (N=3-4). 이때, NT는 non-transfection; sMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE는 Intronic Enhancer (SEQ ID NO: 7); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); IE-sMPZ는 engineered promoter (SEQ ID NO: 8); 및 sMPZ-IE는 engineered promoter (SEQ ID NO: 13)를 의미한다. *, $p<0.05$ vs sMPZ; **, $p<0.01$ vs sMPZ.

[452] 도 1에 나타낸 바와 같이, sMPZ promoter, IE200, IE-sMPZ, 및 sMPZ-IE promoter 벡터를 transfection시킨 세포에서 모두 SpCas9이 발현되며, pmp22-TATA 타겟에 대한 indel이 일어나는 것을 확인하였다. 즉 본 발명의 프로모터 모두 목적 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있음을 알 수 있었다. 특히, sMPZ promoter 벡터에 비해 IE200, IE-sMPZ, 및 sMPZ-IE promoter 벡터를 transfection시킨 세포에서 모두 SpCas9 발현이 대략 2 - 4배 정도 증가하는 것을 확인하였다 (도 1).

[453] 또한, 이렇게 발현된 spCas9을 이용한 유전자 편집 효과와 관련하여, pmp22-TATA 타겟에 대한 indel도 대략 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다 (도 2).

[454]

- [455] 실험예 1-2. Rat schwann-like cell line - RT4-D6P2T 세포에서의 효과
- [456] 본 발명자는 실험예 1-1에서 사용한 S16 세포 이외에도, 다른 슈반 유사 세포주(schwann-like cell line) RT4-D6P2T를 이용하여 본 발명의 프로모터 효능을 확인하였다.
- [457] 상기 sMPZ promoter, IE200 promoter, IE-sMPZ promoter, 및 sMPZ-IE promoter에 대해 SpCas9을 발현하는 벡터를 pmp22-TATA region을 타겟으로 하는 sgRNA (표 1의 가이드 RNA1)를 발현하는 벡터와 같이 schwann-like cell 계열인 RT4-D6P2T 세포에 co-transfection하여 유전자 편집 효율을 테스트하였다.
- [458] 그 결과를 도 8에 도시하였다. 도 8은 RT4-D6P2T 세포에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다. 이때, NT는 non-transfection; rMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE는 Intronic Enhancer (SEQ ID NO: 7); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); IE-sMPZ는 engineered promoter (SEQ ID NO: 8); 및 sMPZ-IE는 engineered promoter (SEQ ID NO: 13)를 의미한다. **또는 ***는 sMPz300에서의 유전자 편집 효율이 IE200, IE-sMPz, 및 sMPz-IE에서의 유전자 편집 효율과 유의미하게 차이가 난다는 것을 의미한다.
- [459] 실험 결과, sMPZ promoter, IE200, IE-sMPZ, 및 sMPZ-IE promoter 벡터를 transfection시킨 세포에서 모두 pmp22-TATA 타겟에 대한 indel이 일어나는 것을 확인하였다. 특히, sMPZ promoter 벡터에 비해 IE200, IE-sMPZ, 및 sMPZ-IE promoter 벡터를 transfection시킨 세포에서 모두 pmp22-TATA 타겟에 대한 indel이 대략 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 해당 실험 결과는, 본 발명의 프로모터는 슈반 세포 및 슈반 유사 세포에서, 목적 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.
- [460]
- [461] 실험예 1-3. 서로 다른 길이의 표적 서열을 가지는 가이드 RNA의 사용
- [462] 본 발명자는 상기 IE200 promoter를 이용하여 발현시킨 SpCas9와 가이드 RNA를 사용하여, 서로 다른 길이의 표적 서열에 대한 유전자 편집 효율을 확인하고, 발현된 CRISPR 시스템이 잘 동작하는지 확인하였다.
- [463] 이를 위해, 상기 IE200 promoter로 SpCas9을 발현하는 벡터와, pmp22-TATA region을 타겟하는 sgRNA (표 1의 가이드 RNA1 또는 가이드 RNA2)를 발현하는 벡터를, schwann-like cell 계열인 RT4-D6P2T 세포에 co-transfection하여 유전자 편집 효율을 테스트하였다. 이 때, 가이드 RNA1은 20nt 길이의 가이드 도메인(pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열)을 가지고, 가이드 RNA2는 19nt 길이의 가이드 도메인(pmp22 유전자 일부 서열과 결합하는 서열)을 가진다.
- [464] 그 결과를 도 9에 도시하였다. 도 9는 RT4-D6P2T 세포에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한

- 결과이다. 이때, IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9)를 의미한다.
 IE200+가이드 RNA1은 IE200에 대한 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 가이드 RNA1에 대한 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 경우를 의미한다.
 IE200+가이드RNA2는 IE200에 대한 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 가이드 RNA2에 대한 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 경우를 의미한다.
- [465] 실험 결과, 가이드 RNA1과 가이드 RNA2를 사용하는 경우 비슷한 수준의 유전자 편집 효율이 나오는 것을 확인하고, 발현된 CRISPR 시스템이 잘 동작함을 확인하였다(도 9).
- [466] 해당 실험 결과는, 본 발명의 engineered MPZ promoter에 의하여 발현된 SpCas9이 정상적으로 유전자 편집 기능을 수행한다는 점을 시사한다.
- [467]
- [468] **실험예 1-4. tdTomato(형광 단백질)의 발현율**
- [469] 본 발명자는 목적 단백질로서 형광 단백질의 발현율도 확인하고자 하였다.
- [470] 상기 sMPZ promoter(300bp), IE200 promoter(317bp), 및 공지의 MPZ promoter(1000bp)에 대해 tdTomato를 발현하는 벡터를 schwann-like cell 계열인 RT4-D6P2T 세포에 transfection하여 tdTomato의 발현율(형광의 발현 정도)을 테스트하였다.
- [471] 그 결과를 도 10 및 도 11에 도시하였다. 도 10은 RT4-D6P2T 세포에서 pAAV-tdTomato에 관한 발현벡터를 transfection시킨 후의 형광단백질(tdTomato)의 발현율(형광의 발현 정도)를 확인한 결과이다. 이때, MPZ1000은 MPZ promoter (SEQ ID NO: 1); MPZ300은 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); 및 IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9)를 의미한다. ***는 Mpz1000에서의 발현율이 IE200, Mpz300에서의 유전자 편집 효율과 유의미하게 차이가 난다는 것을 의미한다. 도 11은 RT4-D6P2T 세포에서 pAAV-tdTomato에 관한 발현벡터를 transfection시킨 후, 세포에 균일하게 transformation 됐는지 확인한 결과이다. 이때, MPZ1000은 MPZ promoter (SEQ ID NO: 1); MPZ300은 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); 및 IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9)를 의미한다.
- [472] 도 11을 통해 알 수 있는 바와 같이, 공지의 MPZ promoter와 본 발명의 sMPZ promoter 및 IE200 promoter는 유사한 효율로 세포에 transformation되었다. 이 때, vg는 vector genome을, dg는 diploid genome을 의미한다.
- [473] 그리고, 도 10을 통해 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 sMPZ promoter 및 IE200 promoter는 공지의 MPZ promoter와 비교하여, 더 높은 효율로 형광단백질을 발현시켰다. 통상적으로, 1000bp의 긴 길이를 가지는 공지의 MPZ promoter를 사용하는 경우, 목적단백질의 발현효율이 높을 것으로 예상되지만, 실험 결과, 공지의 MPZ promoter의 약 1/3의 길이를 가지는 본 발명의 프로모터가 훨씬 더 형광단백질을 높은 효율로 발현시킴을 확인할 수 있었다. 특히 IE200 promoter는 공지의 MPZ promoter의 경우와 비교하여 약 2배 이상의 목적단백질 발현율을

나타냈다.

- [474] 해당 실험 결과는, 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터는 공지의 MPZ 프로모터보다 훨씬 짧은 길이를 가짐에도 불구하고, 슈반 세포에서 목적 단백질을 공지의 MPZ 프로모터보다 현저히 높은 효율로 발현시킬 수 있음을 보여준다.
- [475]
- [476] 실험예 2. Human schwann cell line에서의 engineered MPZ promoter 효과
- [477] 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터의 효과에 대하여, 본 발명자는 인간 슈반 세포에서도 확인해보고자 하였다.
- [478] Human schwann cell 계열인 sNF02.2에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 Cas9 발현을 검증하였다.
- [479] 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3은 Human schwann cell인 sNF02.2에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 Cas9 발현 검증한 결과이다. Cas9 발현의 mean value로 표시하였다 (N=3). 이때, NT는 non-transfection; sMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); IE-sMPZ는 engineered promoter (SEQ ID NO: 8); 및 sMPZ-IE는 engineered promoter (SEQ ID NO: 13)를 의미한다.
- [480] 도 3을 통해 알 수 있는 바와 같이, sNF02.2 세포에서 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터에 의하여 SpCas9이 효과적으로 발현됨을 확인하였다. 특히, 본 발명의 engineering된 3가지 promoter 중에서도, IE200 프로모터에 의한 SpCas9 발현율이 가장 높다는 결과를 확인하였다 (도 3).
- [481] 해당 실험 결과는, 인간 슈반 세포에서도 본 발명의 프로모터는 목적단백질을 효과적으로 잘 발현시킬 수 있음을 보여준다. 즉, 본 발명의 슈반 세포 특이적 프로모터는 인간의 유전자 편집, 질병 치료 등의 목적을 위하여 사용될 수도 있다는 것을 시사한다.
- [482]
- [483] 실험예 3. 발현시스템의 추가 변형
- [484] 본 발명자는 engineered MPZ promoter를 이용하여 CRISPR system을 발현시켜 유전자의 편집효과를 확인하는 실험을 중심으로 수행하였다. 이러한 과정에서, Cas9 단백질의 발현효율을 개선시키거나 gRNA의 발현효율을 개선시키기 위한 추가적인 변형 요소들을 함께 고려하였다.
- [485]
- [486] 실험예 3-1. 최적화된 추가 발현 시스템의 구체예 1 : 목적 단백질에 poly A 부가
- [487] 본 발명자는 더 작은 사이즈를 가지는 다른 종류의 벡터에서의 효과도 확인하고자 하였다. AAV 벡터의 packaging capacity를 고려하여 bovine growth hormone poly-A (BGHA, 225bp)보다 size가 더 작은 다른 종류의 polyA인 synthetic polyA (synpA, 49bp) 또는 simian virus 40 polyA (sv40pA, 104bp, SEQ ID NO:

- 17)기반 벡터를 사용하여, 유전자 편집 효율을 확인하였다.
- [488] 그 결과를 도 6에 도시하였다. 도 6은 S16 cell에서 pAAV-SpCas9 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다 (N=3). 이때, NT는 non-transfection; sMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); synpA는 synthetic poly-A (49bp, SEQ ID NO: 18); 및 sv40pA는 simian virus 40 poly-A (104bp, SEQ ID NO: 17)를 의미한다. ***, $p < 0.001$ vs sMPZ_synpA.
- [489] synthetic poly A (synpA, 49bp) 또는 simian virus 40 polyA (sv40pA, 104bp, SEQ ID NO: 17)기반 벡터를 사용하였을 때, IE200 프로모터가 Cas9을 발현시키는 효율이 증가하는 결과를 S16세포에서 확인하였다 (도 6). 해당 실험 결과는, 본 발명의 슈만 세포 특이적 프로모터를 작은 사이즈의 벡터에 사용하기에 적합할 수도 있다는 점을 시사한다.
- [490]
- [491] **실험예 3-2. 최적화된 추가 발현 시스템의 구체예 2 : 목적 단백질에 WPRE(artificial intron) 부가**
- [492] 다음으로는, SpCas9에 비해 size가 작아 single AAV로 제작가능한 SauriCas9 기반 벡터로 IE200의 효과를 RT4 세포에서 추가적으로 테스트하였다.
- [493] 그 결과를 도 7에 도시하였다. 도 7은 RT4 cell에서 single pAAV-Sauri-Cas9-U6-sgRNA 발현벡터를 transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다 (N=3). 이때, NT는 non-transfection; sMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); 및 MW는 mvm intron + WPRE-short를 의미한다. ***, $p < 0.001$ vs sMPZ-MW.
- [494] SauriCas9을 sMPZ를 이용해 발현하는 벡터 (sMPZ)와 비교하여, 최적화 요소인 mvm intron과 WPRE를 추가한 벡터 (sMPZ-MW)를 사용하였을 때 SauriCas9이 타겟하는 pmp22-TATA (표 1)의 유전자 편집 효율이 증가하였다. 해당 결과는, 이러한 최적화요소들과 engineered MPZ promoter가 조합된 벡터에 의한 유전자 편집 효율이 유의미하게 증가하였음을 보여준다 (도 7). 특히, 이것은 다양한 최적화요소와 조합으로 사용하였을 때도 IE200 promoter가 다른 engineered MPZ promoter보다 월등한 효율을 나타내는 것도 보여준다. 또한 Dual AAV 또는 single AAV에 적용할 수 있는 Cas9종류에서 모두 schwann cell에서 engineered MPZ promoter가 Cas9을 발현시킬 수 있다는 점을 보여주고 있다.
- [495]
- [496] **실험예 3-3. 최적화된 추가 발현 시스템의 구체예 3 : poly-T를 제거한 gRNA 발현벡터**
- [497] Engineered promoter중 효율이 높으면서 size가 가장 작아 AAV에 더 compatible한 IE200을 사용하여 추가 검증을 진행하였고, 특히 유전자 편집을 위한 다른 최적화 요소들과의 조합으로 사용하였을 때의 추가적인 개선효과를

확인하는 연구를 진행하였다. sgRNA의 scaffold의 poly-T를 제거하여 U6 promoter에 의한 sgRNA 발현을 증가시킬 수 있는 벡터 (sf-modified)와 같이 S16 세포에 co-transfection하여 테스트하였다.

- [498] 그 결과를 도 4 및 도 5에 도시하였다. 도 4는 S16 cell에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sf-modified-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다 (N=3-6). 도 5는 RT4 cell에서 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sf-modified-sgRNA 발현벡터를 co-transfection시킨 후의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다 (N=3-6). 이때, NT는 non-transfection; sMPZ는 small MPZ core promoter (SEQ ID NO: 3); IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9); 및 Sf-modified는 scaffold modification of sgRNA backbone을 의미한다. *, $p < 0.05$ vs sMPZ (도 4 및 5) or sMPZ+sf-modified (도 4); **, $p < 0.01$ vs sMPZ (도 4 및 5) or sMPZ+sf-modified (도 4); ***, $p < 0.001$ vs sMPZ+sf-modified (도 4).
- [499] 그 결과로 IE200 프로모터를 사용하였을 때의 유전자 편집 효율이, sf-modified 벡터와 같이 사용하면 더욱 증가되는 결과를 다양한 dose 조건에서 확인하였다 (도 4). 이러한 additive effect는 다른 계열의 rat schwann cell인 RT4 세포에서도 비슷하게 확인되었다 (도 5).
- [500]
- [501] **실험 예 4. 실험 동물(rat)에서의 engineered MPZ promoter 효과**
- [502] 나아가, 본 발명자는 본 발명의 프로모터가 슈반 세포에 좀 더 특이적으로 효과를 보이는지 동물 실험을 통해 확인하고자 하였다. 즉, 정맥투여한 CRISPR 조성물이 간 등의 조직을 지나 신경조직에서 더 특이적으로 발현되는지 여부를 확인하고자 하였다.
- [503] 실험동물(SD rat)을 마취제로 마취한 뒤 반사 증상을 확인하여 마취를 확인하였다. 이후, 마취된 동물을 보정틀에 넣어 꼬리정맥을 통해 EFS promoter 및 IE200 promoter에 대해 SpCas9을 발현하는 벡터를 pmp22-TATA region을 타겟하는 sgRNA (표 1의 가이드 RNA1)를 발현하는 벡터와 같이 실험 동물인 rat에 co-transfection하였다.
- [504] 4주 후 동물을 Sacrifice 하여 liver 및 Schwann 세포가 모여 있는 sciatic nerve 및 Lumbar nerve를 채취한 뒤, 채취한 조직 또는 세포의 genomic DNA prep을 하여, 유전자 편집 효율을 테스트하였다.
- [505] 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다. 도 12는 래트의 꼬리 정맥에 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 주입시킨 후, 좌골 신경(Sciatic nerve) 및 요추 신경(Lumbar nerve)에서의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집 효율을 검증한 결과이다. 이때, EFS는 EFS promoter (SEQ ID NO: 32); 및 IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9)를 의미한다. 도 13은 래트의 꼬리 정맥에 pAAV-SpCas9-BHGA 발현벡터와 pAAV-U6-sgRNA 발현벡터를 주입시킨 후, 간(Liver)에서의 pmp22-TATA 타겟에 대한 유전자 편집

효율을 검증한 결과이다. 이때, EFS는 EFS promoter (SEQ ID NO: 32); 및 IE200은 engineered promoter (SEQ ID NO: 9)를 의미한다.

- [506] 본 발명자는 engineered MPZ promoter가 신경세포에서 특이적으로 목적 단백질을 발현함을 확인하고자 하였다. 특히, 신경세포에서의 특이적 발현을 확인하기 위하여, 신경세포가 아닌 세포 중 간세포를 대조군으로 사용하였다. 이는, 정맥 주사를 이용하는 경우, 투여된 물질은 대부분 간 조직을 통과할 수밖에 없는 전신 투여 시스템을 고려하였기 때문이다.
- [507] 따라서, 본, 실험예6의 실험에서도 래트의 꼬리 정맥을 통하여 벡터를 주입하였기 때문에, 주입된 벡터는 대부분 간으로 이동을 할 것으로 예상했고, 그로 인해 신경세포에 특이적인 프로모터를 사용하더라도, 간에서의 Cas9의 발현 및 indel 효율이 충분히 나타날 것으로 예상하였다.
- [508] 그러므로, 본 발명자는 engineered MPZ promoter의 간세포 대비 신경세포에서의 indel 효율이, 다른 promoter에 비하여 높은지를 확인하여, 본 발명의 프로모터가 신경세포에 보다 특이적인지를 확인하고자 하였다. 이때, engineered MPZ promoter와 비교하기 위한 promoter로 기존에 모든 조직에서 발현율이 높은 promoter로 알려진 EFS promoter를 사용하였다.
- [509] 그 결과, EFS promoter는 간 조직에서는 45% 가까운 유전자 편집 효율을 나타냈고(도 13), 신경세포에서는 약 10%의 유전자 편집 효율을 나타냈다(도 12). 즉, 신경세포에서는 간세포와 비교하여 약 1/5 정도의 효과만을 보였다.
- [510] 이에 반하여, 본 발명의 engineered MPZ promoter인 IE200을 사용한 경우는, 간조직에서 약 15%의 유전자 편집 효율을 나타냈고(도 13), 신경세포에서는 약 6~8%의 효율을 나타낸 바(도 12), 즉, 신경세포에서는 간세포와 비교하여 약 1/2의 효과를 보였다. 즉, 본 발명의 engineered MPZ promoter가 신경세포에 보다 더 특이적으로 목적 단백질을 발현시킨다는 것을 의미한다.
- [511] 이러한 결과는, 신경세포에 특이적으로 유전자를 편집할 필요가 있을 때, 다른 프로모터보다 engineered MPZ promoter를 사용하는 것이 더 바람직하다는 것을 시사한다.

산업상 이용가능성

- [512] 본 발명은 슈반 세포에서 특이적으로 작동하는 인위적으로 조작된 최소형 프로모터에 관한 것으로, 상기 인위적으로 조작된 최소형 프로모터는 MPZ(Myelin Protein Zero 또는 P0)의 프로모터 유래인 것을 특징으로 한다.

청구범위

- [청구항 1] 다음 중 선택된 하나의 서열을 가지는 슈반 세포 특이적 프로모터:
SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 및 14 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열.
- [청구항 2] 다음을 포함하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터로:
슈반 세포 특이적 프로모터; 및
목적 유전자,
상기 슈반 세포 특이적 프로모터는 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; 및 SEQ ID NO: 3, 4, 8, 9, 13 및 14 중 선택된 하나의 서열에 적어도 90% 서열 유사성을 가지는 서열로 구성된 군에서 선택된 하나의 서열을 가지며,
상기 목적 유전자는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 유전자 또는 슈반 세포에서 발현시키고자 하는 단백질을 암호화하는 핵산이고,
상기 목적 유전자는 상기 슈반 세포 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral(retrovirus) vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral(lentivirus) vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral(adenovirus vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral (adenovirus-associated virus; AAV) vector), 백시니아바이러스 벡터(vaccinia viral(vaccinia virus) vector), 포스바이러스 벡터(poxviral(poxvirus) vector) 및 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral(herpes simplex virus) vector)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 조절/제어 구성요소는 인핸서, 인공적 인트론(artificial intron), 폴리아데닐화 신호 및/또는 WPRE인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 폴리아데닐화 신호를 포함하며,

- 이 때, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 인공적 인트론 및 WPRE를 포함하며,
이 때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론이고, 상기 WPRE는 WPRE3인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 슈반 세포 특이적 발현 벡터는 인공적 인트론, WPRE 및
폴리아데닐화 신호를 포함하며,
이 때, 상기 인공적 인트론은 MVM 인트론이고, 상기 WPRE는
WPRE3이며, 상기 폴리아데닐화 신호는 synpA 또는 SV40pA인 것을
특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 10] 제2항에 있어서,
상기 목적 유전자는 슈반 세포를 인위적으로 조작하기 위한 유전자
조작용 단백질을 암호화하는 핵산인 것을 특징으로 하는 슈반 세포
특이적 발현 벡터.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 유전자 조작용 단백질은 Cas 단백질, 인 것을 특징으로 하는 슈반
세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질, Cas12a1(Cpf1) 단백질 또는 Cas12f1
단백질인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)
Cas9 단백질(SpCas9), 스타필로코커스 아우레스(*Staphylococcus aureus*)
Cas9 단백질(SaCas9), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) Cas9
단백질(CjCas9) 또는 스타필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus*
auricularis) Cas9 단백질(SauriCas9)인 것을 특징으로 하는 슈반 세포
특이적 발현 벡터.
- [청구항 14] 제2항에 있어서,
상기 목적 유전자는 슈반 세포와 관련된 질병의 치료와 연관된 유전자인
것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 슈반 세포와 관련된 질병의 치료와 연관된 유전자는 Cx32(connexin
32) 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자,
MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자,
GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자,
NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral

myelin protein 22) 유전자인 것을 특징으로 하는 슈반 세포 특이적 발현 벡터.

- [청구항 16] 제10항의 발현벡터를 포함하는 조성물로서,
 상기 발현벡터는 Cas9단백질을 암호화하는 핵산을 포함하며,
 상기 조성물은 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을
 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
 상기 가이드 RNA는 슈반 세포와 관련된 질병을 유발하는 유전자를
 표적으로 하며,
 상기 슈반 세포와 관련된 질병을 유발하는 유전자는 Cx32(connexin 32)
 유전자, SH3TC2(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2) 유전자,
 MPZ(myelin protein zero) 유전자, EGR2(early growth response 2) 유전자,
 GDAP1(ganglioside induced differentiation associated protein 1) 유전자,
 NDRG1(N-Myc downstream regulated 1) 유전자 또는 PMP22(peripheral
 myelin protein 22) 유전자인 것을 특징으로 하는 조성물.