명세서

발명의 명칭: 인위적으로 조작된 신생혈관형성 조절 시스템

기술분야

[1] 본 발명은 신생혈관형성 조절을 위한, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 및 이의 이용에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 신생혈관형성을 조절하기 위한 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 및/또는 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조성물을 포함하는, 인위적으로 신생혈관형성을 조절할 수 있는 시스템에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 많은 중증 질환 상태에서 과도한 신생혈관형성은 암, 황반 변성(macular degeneration), 당뇨병성 망막증, 관절염 및 건선과 같은 질환에서 발생한다. 이러한 상태에서, 새로운 혈관이 질병에 걸린 조직에 공급되어, 정상 조직을 파괴시키며, 암의 경우, 새로운 혈관은 종양 세포를 순환계로 유입시켜 다른 장기에 정착가능하게 한다(종양 전이).

[4] 특히, 암세포는 신생혈관형성을 통해 영양분을 공급받고 다른 장기로 전이하기 때문에, 신생혈관형성은 암의 성장과 전이에 필수적이다. 실제 여러 종류의 암에서, 암조직에 형성된 모세혈관의 밀도와 암의 전이 가능성 간에는 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 염증성 질환의 대표적인 질환인 류마티스성 관절염은 자가면역 이상이 원인이지만, 병이 진행되면서 관절 사이의 활액강에 생긴 만성 염증이 신생혈관형성을 유도하여 연골이 파괴된다. 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환도 신생혈관형성이 원인이 되고 있다. 대표적인 예인 당뇨병성 실명증은 당뇨병의 합병증으로, 망막에 있는 모세혈관이 신생혈관형성을 통해 초자체를 침습하여 결국 눈이 멀게 된다. 따라서, 신생혈관형성 억제물질은 신생혈관형성이 지속적으로 일어나는 암, 류마티스성 관절염 및 당뇨병성 실명증등의 여러 질병의 치료제 및 예방제로 유용하게 사용될 수 있다.

[5] 한편, 종래에는 신생혈관형성을 억제하기 위해서 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 신호전달의 억제에 관한 연구가 활발하였다. 그러나 종래기술에서는 초기에는 신생혈관형성이 억제되는듯한 양상을 보이다가, 이후에 암세포로 항암제가 전달되는 경로까지 억제하여 결국은 암세포가 더욱 공격적으로 변하는 부작용이 존재하였다.

[6] 이와 같이, 신생혈관형성에 의해 유도되는 질환들의 치료를 위한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 아직 이를 위한 근본적인 치료 방법은 거의 없는 상황이다.

[7] 특히, 신생혈관형성에 의한 암 또는 암의 전이, 망막 또는 각막 변성에 의한

실명 등의 중증 질환의 치료를 위한 치료법은 전무한 상태로, 따라서, 이러한 신생혈관형성 관련 질환의 근본적인 치료법의 개발 요구가 매우 큰 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 개선된 신생혈관형성 효과를 갖는, 인위적으로 조작한 신생혈관형성 시스템에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 인위적으로 조작한 신생혈관형성 관련 인자 및 이에 의한, 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 시스템에 관한 것이다.

[10]

[11] 본 발명은 특정 목적을 위해 유전적으로 조작된 또는 변형된 신생혈관형성 관련 인자를 제공한다.

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

[13] 본 발명은 일 구체예로서 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 및 이의 발현 산물을 제공하고자 한다.

[14] 본 발명은 일 구체예로서 신생혈관형성 관련 인자의 조작을 위한 유전자 조작용 조성물 및 이를 이용하는 방법 제공하고자 한다.

[15] 본 방법은 일 구체예로서 신생혈관형성을 조절하는 방법을 제공하고자 한다.

[16] 본 발명은 일 구체예로서 신생혈관형성 관련 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물 및 이의 다양한 용도를 제공하고자 한다.

[17] 본 발명의 일 구체예로서 인위적으로 조작된 VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, ANGPTL4 등의 신생혈관형성 관련 인자 및/또는 이의 발현 산물을 제공하고자 한다.

[18] 본 발명의 일 구체예로서 VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, ANGPTL4 등의 신생혈관형성 관련 인자의 인위적 조작을 위한 유전자 조작용 조성물을 제공하고자 한다.

[19] 본 발명의 일 구체예로서 인위적으로 조작된 VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, ANGPTL4 등의 신생혈관형성 관련 인자들 및/또는 상기 인위적 조작을 위한 유전자 조작용 조성물의 치료적 용도를 제공하고자 한다.

[20] 본 발명의 일 구체예로서 인위적으로 조작된 VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, ANGPTL4 등의 신생혈관형성 관련 인자들 및/또는 상기 인위적 조작을 위한 유전자 조작용 조성물의 부가적 용도를 제공하고자 한다.

[21]

과제 해결 수단

[22] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 신생혈관형성을 조절하기 위한 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 및/또는 신생혈관형성 관련 인자를

인위적으로 조작할 수 있는 조성물을 포함하는, 인위적으로 신생혈관형성을 조절할 수 있는 시스템에 관한 것이다.

[23]

[24] 본 발명은 특정 목적을 위해 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자를 제공한다.

[25] "신생혈관형성 관련 인자(neovascularization-associated factor)"는 신생혈관형성에 직접적으로 참여하거나 또는 간접적으로 영향을 미치는 모든 물질로, 비자연적인, 즉, 인위적으로 조작된, 신생혈관형성 조절 기능을 가질 수 있는 다양한 물질을 모두 포함한다. DNA, RNA, 유전자, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다. 예를 들어, 유전적으로 조작된 또는 변형된 세포에서 발현되는 유전자 또는 단백질일 수 있다.

[26] 상기 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 촉진시키거나 증가시킬 수 있으며, 반대로 신생혈관형성을 저해하거나 억제시킬 수 있다.

[27] 또한 신생혈관형성 환경 또는 신생혈관형성 억제환경을 유도하거나 활성 또는 비활성화시킬 수 있다.

[28]

[29] 본 발명의 일 구현예에서 신생혈관형성 관련 인자로서, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 또는 ANGPTL4 유전자일 수 있다.

[30] 본 발명의 일 구현예에서 신생혈관형성 관련 인자로서 인위적으로 조작된 2 개 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 2 이상의 유전자를 인위적으로 조작할 수 있다.

[31]

[32] 그러므로, 본 발명의 일 구현예에서는 핵산서열 내 변형이 일어난 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자를 제공한다.

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

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

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

[36]

[37] 예를 들어, 상기 유전자는 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자로서,

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

[39] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;

[40] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;

[41] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입

[42] 중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는

[43] 상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자일 수 있다.

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

[45] 상기 핵산의 변형은 유전자의 엑손 영역에서 일어날 수 있다. 일 실시예에서는 유전자의 암호화 영역 중 상위 50% 내의 영역에서 변형이 일어날 수 있다.

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

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

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

[49] NGG(N은 A, T, C 또는 G임);

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

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

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

[53] NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임); 및

[54] TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[55] 상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 노카르디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 알리사이클로바클루스 아시도칼다리우스(AlicyclobacHlus acidocaldarius), 바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides), 바실러스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens), 엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum), 락토바실러스 델브루에키이(Lactobacillus

delbrueckii), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 미크로스 킬라 마리나(Microscilla marina), 부르크홀데리아레스 박테리움(Burkholderiales bacterium), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans), 폴라로모나스 속(Polaromonas sp.), 크로코스파에라 와트소니이(Crocosphaera watsonii), 시아노테세 속(Cyanothece sp.), 마이크로시스티스 아에루기노사(Microcystis aeruginosa), 시네코코커스 속(Synechococcus sp.), 아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum), 암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii), 칼디셀룰로시럽토 베시이(Caldicelulosiruptor bescii), 칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 나트라나에로비우스 써모필러스 (Natranaerobius thermophilus), 펠로토마쿨럼 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum), 아시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus), 아시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans), 알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum), 마리노박터 속(Marinobacter sp.), 니트로소코커스 할로필러스(Nitrosococcus halophilus), 니트로소코커스 와트소니(Nitrosococcus watsoni), 슈도알테로 모나스 할로플란크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis), 크테도노박테르 라세미페르(Ktedonobacter racemifer), 메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum), 아나베나 바리아빌리스(Anabaena variabilis), 노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena), 노스톡 속(Nostoc sp.), 아르트로스피라 맥시마(Arthrospira maxima), 아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis), 아르트로스피라 속(Arthrospira sp.), 링비아속(Lyngbya sp.), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes), 오실라토리아 속(Oscillatoria sp.), 페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis), 써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus) 또는 아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina)로부터 유래될 수 있다.

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

[57]

[58] 또한, 다른 구현예에서, 본 발명은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나

이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산을 제공한다.

[59] 상기 가이드 핵산은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 일부와 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있다. 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 3, 0 내지 2개의 미스매치(mismatching)를 포함할 수 있다. 바람직한 예로서, 상기 가이드 핵산은 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 타겟 서열 중 1 이상에 각각 상보적인 결합을 형성하는 뉴클레오타이드일 수 있다.

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

[61] VEGFA 유전자 핵산 서열 중 서열번호 3, 4, 7, 9, 10 및 11의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;

[62] HIF1A 유전자 핵산 서열 중 서열번호 14, 18, 19, 20, 26, 29 및 31의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;

[63] ANGPT2 유전자 핵산 서열 중 서열번호 33, 34, 37, 38, 39 및 43의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;

[64] EPAS1 유전자 핵산 서열 중 서열번호 47, 48, 49, 50, 53, 54 및 55의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산; 및

[65] ANGPTL4 유전자 핵산 서열 중 서열번호 64, 66, 67, 73, 76 및 79의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산.

[66] 상기 가이드 핵산은 비제한적으로, 18 내지 25 bp, 18 내지 24 bp, 18 내지 23 bp, 19 내지 23 bp, 19 내지 23 bp, 또는 20 내지 23 bp의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[67]

[68] 또한, 본 발명은 특정 목적을 위해 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 유전자 조작용 조성물을 제공한다.

[69] 유전자 조작용 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체 또는 이들을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[70] 유전자 조작용 조성물은

[71] (a) VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[72] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서

선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[73] 을 포함할 수 있다.

[74] 일 구현예에서, 상기 가이드핵산은 서열번호 3, 4, 7, 9, 10 및 11 (VEGFA), 서열번호 14, 18, 19, 20, 26, 29 및 31 (HIF1A), 서열번호 33, 34, 37, 38, 39 및 43 (ANGPT2), 서열번호 47, 48, 49, 50, 53, 54 및 55 (EPAS1) 및 서열번호 64, 66, 67, 73, 76 및 79 (ANGPTL4)의 표적 서열 중 1 이상에 각각 상보적인 결합을 형성하는 핵산서열일 수 있다.

[75] 일 구현예에서, 상기 유전자 조작용 조성물은 바이러스 벡터 시스템일 수 있다.

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

[77]

[78] 구현예에서, 본 발명은 세포에

[79] (a) VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

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

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

[82] 상기 가이드 핵산 및 에디터 단백질은, 각각 핵산 서열의 형태로 1 이상의 벡터에 존재하거나, 또는 가이드 핵산과 에디터 단백질의 결합으로 복합체를 형성하여 존재할 수 있다.

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

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

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

[86]

[87] 또한, 구현예에서 본 발명은 신생혈관형성 관련 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[88] 약학적 조성물은 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 유전자 조작용 조성물을 포함할 수 있다.

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

[90]

[91] 구현예에서, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자를 서열분석함으로써 대상체에서 인위적으로 조작 가능한 표적 위치의 서열에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

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

[93]

[94] 구현예에서, 다음을 포함하는 유전자 조작용 키트를 제공한다:

[95] (a) VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

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

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

[98]

[99] 구현예에서, 본 발명은

[100] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[101] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[102] 을 포함하는 혈관신생성 장애 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[103] 상기 표적 서열은 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열 중 1 이상일 수 있다.

[104] 일 실시예에서, 상기 에디터단백질은 캄필로박터 제주니 (Campylobacter jejuni) 유래의 Cas9 단백질을 사용하였다.

[105] 일 실시예에서, 상기 혈관신생성 장애는 허혈성 망막병증 또는 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)일 수 있다.

[106]

[107] 구현예에서, 본 발명은 대상체에 대한 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 또는 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작하는 유전자 조작용 조성물을 이용한 질환 치료 용도의 모든 양태를 제공한다.

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

[109]

발명의 효과

[110] 인위적으로 조작한 신생혈관형성 관련 인자 및 이에 의해 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 시스템에 의해서, 효과적인 신생혈관 관련 질환, 예를 들어 신생혈관 관련 안구질환의 치료적 용도를 이용할 수 있다. 다양한 신생혈관형성 관련 인자들이 관여하는 다양한 체내 메커니즘을 조절을 통해 신생혈관형성 시스템의 효능을 개선시킬 수 있다.

[111] 예를 들어, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자 중 1이상의 유전자를 이용할 수 있다.

[112]

도면의 간단한 설명

[113] 도 1은 노인성 황반변성(age-related macular degeneration (AMD))의 마우스 모델에서 Vegfa 또는 Hif1a를 표적하는 CjCas9에 의한 레이저에 의해 유도된 맥락막 신생혈관 형성(choroidal neovascularization, CNV) 부위의 감소 효과에 관한 것으로, (A) Vegfa 및 Hif1a / HIF1A 유전자 내의 CjCas9 표적 서열(PAM 서열 및 sgRNA의 표적 서열을 각 점선, 실선으로 표시), (B) CjCas9을 암호화하는 올인원 AAV 벡터 및 in vivo 실험 일정, (C) RPE 세포에서 Rosa26, Vegfa, 및 Hif1a 표적 위치의 인델 빈도를 나타낸 그래프(Error bars=s.e.m.(AAV 주입하지않은 대조군 n=4, AAV-CjCa9 주입한 실험군 n=5), Student's t-tests, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), (D) ELISA를 이용한 RPE 세포에서 Vegfa 발현양 측정 그래프(Error bars=s.e.m.(AAV 주입하지않은 대조군 n=4, AAV-CjCa9 주입한 실험군 n=5), One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), (E) 오프-타겟 위치(미스매치 되는 염기서열은 실선, PAM 서열은 점선으로 표시)의 인델 빈도를 나타낸 그래프, (F) Rosa26, Vegfa, 또는 Hif1a를 표적하는 AAV9-CjCa9을 주입한 마우스 안구에서 isolectin B4로 염색된 레이저에 의해 유도된 CNV 부위(Scale bar=200 μm), (G) 레이저에 의해 유도된 CNV 부위(%)(Error bars=s.e.m.(n=17-18), One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant)를 나타낸 그래프이다.

[114] 도 2는 마우스 RPE에서 CjCas9과 함께 eGFP의 *in* vivo 발현을 확인한

이미지이다(n=6, anti-GFP 항체(녹색) 및 DAPI(파란색), Scale bar=20 μm).

[115] 도 3은 AAV/CjCas9을 주입한 마우스의 망막에서 opsin 양성 부위에 관한 것으로, (A) Rosa26-, Vegfa-, 또는 Hif1a-특이적 CjCas9을 주입한 마우스에서 HA 태그된 CjCas9을 발현하는 RPE 세포에 상응하는 opsin 양성 부위의 이미지(Opsin: 빨간색, HA: 녹색, 및 DAPI: 파란색, Scale bar=20 μm, ONL: outer nuclear layer, IS: inner segment of photoreceptor cells, OS: outer segment of photoreceptor cells), (B) 상대적인 opsin 양성 부위(%)(Error bars=s.e.m.(n=4), One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests, * $p < 0.05$)를 나타낸 그래프이다.

[116] 도 4는 망막 조직에서 Vegfa 또는 Hif1a를 표적하는 CjCas9에 의한 VEGF의 발현감소에 관한 것으로, (A) 망막 세포에서 Rosa26, Vegfa 및 Hif1a의 표적 위치에 인델 빈도를 나타낸 그래프(Error bars=s.e.m.(AAV 주입하지 않은 대조군 n=4, AAV-CjCa9 주입한 실험군 n=5), Student's t-tests, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), (B) ELISA를 이용한 망막 세포에서 Vegfa 발현양 측정 그래프(Error bars=s.e.m.(n=6-7), One-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)를 나타낸다.

[117] 도 5는 당뇨병성 망막증 마우스 모델에서 Vegfa를 표적하는 CjCas9에 의한 망막의 혈관 파열 및 혈액 누출 감소 효과에 관한 것으로, (a) in vivo 실험 일정, (b) Vegfa를 표적하는 AAV2-CjCa9을 주입한 마우스 망막에서 혈관 파열 및 혈액 누출 감소 효과에 대한 이미지를 보여준다.

[118] 도 6은 당뇨병성 망막증 마우스 모델에서 Vegfa를 표적하는 CjCas9에 의한 망막의 혈관 파열 및 혈액 누출 감소 효과에 관한 것으로, 도 6a는 in vivo 실험 일정(a), Vegfa를 표적하는 AAV2-CjCa9을 주입한 마우스 망막에서 혈관 파열 및 혈액 누출 감소 효과에 대한 이미지(b), 도 6b는 Rosa26 또는 Vegfa를 표적하는 CjCas9에 의한 혈관 파열(%) 비교 그래프를 나타낸다.

[119] 도 7는 유전자 조작을 위한 인간 VEGFA의 CjCas9 표적 위치 스크리닝 결과 및 인델 빈도를 나타낸다.

[120] 도 8는 유전자 조작을 위한 인간 HIF1A의 CjCas9 표적 위치 스크리닝에 관한 것으로, (A) 인간 HIF1A의 CjCas9 표적 위치 스크리닝 결과 및 인델 빈도, (B) HIF1A의 다양한 포유동물간의 보존된 표적 위치

[121] 도 9은 유전자 조작을 위한 인간 ANGPT2의 CjCas9 표적 위치 스크리닝 결과 및 인델 빈도를 나타낸다.

[122] 도 10은 유전자 조작을 위한 인간 EPAS1의 CjCas9 표적 위치 스크리닝 결과 및 인델 빈도를 나타낸다.

[123] 도 11는 유전자 조작을 위한 인간 ANGPTL4의 CjCas9 표적 위치 스크리닝 결과 및 인델 빈도를 나타낸다.

[124]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[125] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 이하에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 다른 참고문헌은 전체가 참고로 포함된다. 추가로, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[126]

[127] 본 발명의 일 태양은

[128] 조절된 신생혈관형성 효과를 가지는, 인위적으로 조작한 신생혈관형성 시스템에 관한 것이다.

[129] 구체적으로, 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작함으로써 신생혈관형성을 조절하거나 또는 신생혈관형성 관련 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 다양한 양태의 구성에 관한 것이다. 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 관련 인자 및 이의 제조방법, 이들을 포함하는 조성물, 및 이의 치료적 용도 등을 포함한다.

[130]

[131] 본 발명의 다른 태양은

[132] 인위적으로 기능을 변형시킨 특정 인자(예를 들어, 신생혈관형성 관련 인자로 알려져 있는 유전자 등)의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템에 관한 것이다.

[133] 구체적으로, 인위적으로 조작한 특정 인자들이 관여하는 신생혈관형성 기능뿐만 아니라, 체내의 제3의 기능을 표적화하여 해당 메커니즘을 조절할 수 있다. 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 관련 인자 및 이의 제조방법, 이들을 포함하는 조성물, 및 제3의 기능과 관련된 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 이들의 치료적 용도 등을 포함한다.

[134]

[135] **[신생혈관형성]**

[136] 본 발명의 일 구현예는 신생혈관형성 관련 시스템의 개선 및 변형에 관한 것이다.

[137] "신생혈관형성"은 새로운 혈관의 생성, 발생 및/또는 분화가 포함된 조직 혈관화(vascularization) 과정을 의미하며, 여기서는 혈관신생(Angiogenesis) 및 혈관형성(neovascularization)을 모두 포함하는 것으로 한다. 신생혈관형성은 여러 인자들이 서로 밀접하게 연관되어 혈관내피세포의 증식을 촉진하거나 억제하면서 일어날 수 있다.

[138] 신생혈관형성은 기존 혈관으로부터 혈관이 뻗어나거나, 전구 세포로부터 혈관이 새로 생겨나거나, 및/또는 기존의 소형 혈관의 직경이 커지는 메커니즘을 모두 포함한다.

[139] 또한, 신생혈관형성은 혈관의 파열 또는 파열된 혈관의 수복에 관한 혈관형성 관련 메커니즘을 모두 포함한다.

[140] 혈관 형성은, 많은 중증 질환 상태에서의 과도한 및/또는 비정상적인 신생혈관형성을 수반하는 메커니즘을 포함한다.

[141] 예를 들어, 암, 황반 변성(macular degeneration), 당뇨병성 망막증, 관절염 및 건선과 같은 질환에서 과도한 신생혈관형성이 발생한다. 이러한 질환 상태에서, 새로운 혈관이 질병이 걸린 조직에 공급되어 정상 조직을 파괴시키고, 암의 경우, 새로운 혈관은 종양 세포를 순환계로 유입시켜 다른 장기에 정착 가능(종양 전이)할 수 있게 한다.

[142] 일 구체예에서, 신생혈관형성은 눈에서의 신생혈관 형성일 수 있다.

[143] 예를 들어, 노인성 황반 변성(AMD) 및 당뇨병성 망막증 등의 안 질환에서 나타날 수 있다. 특히 AMD는 미국, 캐나다, 잉글랜드, 웨일즈, 스코틀랜드 및 호주에서 65세 이상의 노년층의 법적 비가역성 실명에 가장 공통적인 원인으로, 환자의 약 10% 내지 15%에서는 삼출(습성)형 질환이 나타난다. 삼출형 AMD는 신생혈관형성 및 병인성 혈관신생을 특징으로 한다.

[144] 예를 들어, 눈에서의 신생혈관 형성은 맥락막 신생혈관 형성(choroidal neovascularization, CNV), 각막 신생혈관 형성(corneal neovascularization) 및/또는 홍채 혈증(Rubeosis iridis)을 포함할 수 있다.

[145] 맥락막 신생혈관 형성(choroidal neovascularization, CNV)은 맥락막 층에 신생혈관이 생성되는 것으로, CNV는 맥락막의 가장 안쪽층인 Bruch의 막(Bruch's membrane)에 결함이 있는 사람에게서 빠르게 발생한다. 또한, CNV는 과도한 양의 혈관 내피 성장 인자(VEGF)와 관련이 있다. CNV는 극심한 근시, 악성근시 변성 또는 신생혈관성 퇴행성 황반 변증(예를 들면, 습식 황반 변성증)를 유발할 수 있다.

[146] 각막 신생혈관 형성(corneal neovascularization)은 산소 결핍에 의한 각막주변 혈관총(pericorneal plexus)에서 무혈관성 각막조직(avascular corneal)으로 신생혈관이 생성되는 것으로, 주로 선천적이거나 또는 염증성(예를 들면, 각막 이식술 후 이식 거부, 이식 조직 또는 숙주 질환, 아토피성 결막염, 주사제, 안구 천포창, 라이엘 증후군 및 스티븐 존슨 증후군), 감염성(예를 들면, 박테리아 (클라미디아, 매독, pseduomonas), 바이러스(단순 포진 및 포진 대상 포진 바이러스), 곰팡이(칸디다균 ,aspergillus, fusarium) 및 기생충 (onchocerca volvolus)), 퇴행성, 외상성 및 의원성(예를 들면, 콘택트 렌즈 마모) 질병에 의해 발생할 수 있다.

[147] 홍채 혈증(Rubeosis iridis)은 홍채의 표면에 신생혈관이 생성되는 것으로, 당뇨 망막 병증과 관련있으며, 이외에도 망막 중심 정맥 폐쇄, 안구 허혈 증후군, 만성 망막 박리 등에 의해 홍채 혈증이 유발된다고 알려져 있다.

[148]

[149] 임의의 구체예에서, 신생혈관 형성은 혈관내피세포의 생존(survival),

증식(proliferation), 지속(persistency), 세포독성(cytotoxicity), 사이토카인 분비(cytokine-release) 기능과 관련이 있을 수 있다.

[150] 임의의 구체예에서, 신생혈관 형성은 혈관 신생 사이토카인의 발현 증가와 관련이 있을 수 있다.

[151] 임의의 구체예에서, 신생혈관 형성은 혈관내피세포의 수용체 기능과 관련이 있을 수 있다.

[152] 임의의 구체예에서, 신생혈관 형성은 혈관내피세포의 이동능과 관련이 있을 수 있다.

[153] 임의의 구체예에서, 신생혈관 형성은 혈관내피세포의 부착능과 관련이 있을 수 있다.

[154]

[155] **[신생혈관형성 관련 인자]**

[156]

[157] 신생혈관형성 관련 인자(neovascularization-associated factor)

[158] 본 발명의 일 구현예는 인위적으로 조작된 또는 변형된 신생혈관형성 관련 인자이다.

[159] "신생혈관형성 관련 인자"는 혈관형성 또는 혈관신생에 직접적으로 참여하거나 또는 간접적으로 영향을 미치는 모든 요소를 의미한다. 이때, 요소는 DNA, RNA, 유전자, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[160] 구현예에서, 비자연적인, 즉, 인위적으로 조작된, 신생혈관형성 조절 기능을 가질 수 있는 다양한 물질을 모두 포함한다. 예를 들어, 유전적으로 조작된 또는 변형된 유전자 또는 단백질일 수 있다.

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

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

[163] 바람직한 예로서, 본 발명은 특정 목적을 위해 유전적으로 조작된 또는 변형된 신생혈관형성 관련 인자를 제공한다.

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

[165] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 촉진하거나 증가시킬 수 있다

[166] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 저해하거나 억제시킬 수 있다.

[167] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 환경을 유도하거나 활성화시킬 수 있다.

[168] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 억제환경을 유도하거나

신생혈관형성 환경을 비활성화시킬 수 있다.

[169] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 조절(촉진, 증가, 저해 및/또는 억제 등)할 수 있다.

[170] 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 관련 질환의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[171]

[172] 구현예에서,

[173] 신생혈관형성 관련 인자는 ABCA1, ACAT, ACC2, ADAMTS12, ADCY2, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB2, AGPAT5, AIP4, AKAP2, AKR1C2, AMPK, ANG2, ANGPT2, ANGPTL4, ANK1, ANXA1, APOA1, ARHGAP17, ATP10A, AUH, AUTOTAXIN, BAI3, BCAR1, BIN1, BMP3A, CA10, CAMK1D, CAMKK2, CD36, CD44, CDC42, CDH13, CHAT, CNTFR, COL4A2, CPT, CSH1, CTNN, CUBN, CYP7B1, CYSLTR1, CYSLTR2, DGKB, DGKH, DGKZ, DHCR7, DHFR, DRD2, DRD5, EDG1, EDG2, EDG3, EDG4, EDG5, EDG6, EDG7, EDG8, EDNRA, EHHADH, ENPP6, EPAS1, ERBB4, ERK1, ERK2, ESRRG, ETFA, F2, FDPS, FGF2, FLNA, FLT4, FOXO1, FOXO3A, FTO, GABBR2, GATA3, GH1, GNA12, GNA13, GRK2, GRK5, GRM5, HAPLN1, HAS1, HAS2, HAS3, HCRTR2, HIF1A, HSD11B1, HYAL1, HYAL2, HYAL3, IL20RA, IL20RB, IL6ST, IL8, ITGA6, ITGB1, KDR, LAMA1, LDLR, LEPR, LEPTIN, LIFR, LIPL2, LKB1, LRP, LTBP2, MAT2B, ME1, MEGALIN, MERLIN, MET, MGST2, MMP2, MMP9, MTOR, MTR, NCK2, NEDD9, NFKB1, NFKBIB, NOS2A, NOS3, NR1I2, NR3C2, NRG1, NRP1, NRP2, OPRS1, OSBPL10, OSBPL3, OSTEOPONTIN, P2RY1, P2RY12, PAI1, PAI2, PAK1, PAK6, PALLD, PAP1, PAR1, PAXILLIN, PC, PCTP, PDE11A, PDE1A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PI3K, PITPNC1, PKA, PKCD, PLA1A, PLA2, PLAT, PLAU, PLCB1, PLD1, PLD2, PLG, PLXDC2, PPARA, PPARG, PPARGC1B, PRKG1, PRL, PTGS2, PTN, PTPN11, PYK2, RAC1, RAS, RHEB, RHOA, ROCK1, ROCK2, RPS6KA1, RPS6KB2, SCARB1, SCHIP1, SGPP2, SLC25A21, SMAD3, SMAD4, SNCA, SORBS2, SPLA2, SPOCK1, SRD5A1, SREBF1, SREBF2, STAT3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, THBS1, THBS2, THEM2, THRB, TIAM1, TIMP2, TLL2, TSC1, TSC2, TSPO, VEGFA, VEGFR1, 및 YES1 등으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[174] 본 발명의 바람직한 예로서, 신생혈관형성 관련 인자는 VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, 및 ANGPTL4으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[175] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자는 VEGFA일 수 있다.

[176] VEGFA(Vascular endothelial growth factor A) 유전자는 MVCD1, VEGF 또는 VPF로도 칭해지는 단백질 VEGFA를 암호화하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, VEGFA 유전자는 다음으로 이루어진 군에서

선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 VEGFA(e.g., NCBI Accession No. NP_001020537.2, NP_001020538.2 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001025366.2, NM_001025367.2, NM_003376, NG_008732.1 등으로 표현되는 VEGFA 유전자.

[177] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자는 HIF1A일 수 있다.

[178] HIF1A(Hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1-alpha) 유전자는 HIF1, MOP1, PASD8 또는 bHLHe78로도 칭해지는 단백질 HIF1A를 암호화하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, HIF1A 유전자는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 HIF1A(e.g., NCBI Accession No. NP_001230013.1, NP_001521.1 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001243084.1, NM_001530.3, NM_181054.2, NG_029606.1 등으로 표현되는 HIF1A 유전자.

[179] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자는 ANGPT2일 수 있다.

[180] ANGPT2(Angiopoietin-2) 유전자는 AGPT2 또는 ANG2로도 칭해지는 단백질 ANGPT2를 암호화하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, ANGPT2 유전자는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 ANGPT2(e.g., NCBI Accession No. NP_001112359.1, NP_001112360.1, NP_001138.1 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001118887.1, NM_001118888.1, NM_001147.2, NG_029483.1 등으로 표현되는 ANGPT2 유전자.

[181] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자는 EPAS1일 수 있다.

[182] EPAS1(Endothelial PAS domain-containing protein 1) 유전자는 ECYT4, HIF2A, HLF, MOP2, PASD2 또는 bHLHe73로도 칭해지는 단백질 EPAS1을 암호화하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, EPAS1 유전자는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 EPAS1(e.g., NCBI Accession No. NP_001421.2 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001430.4, NG_016000.1 등으로 표현되는 EPAS1 유전자.

[183] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자는 ANGPTL4일 수 있다.

[184] ANGPTL4(Angiopoietin-like 4) 유전자는 ARP4, FIAF, HARP, HFARP, NL2, PGAR, TGQTL 또는 UNQ171로도 칭해지는 단백질 ANGPTL4를 암호화 하는 유전자(전장 DNA, cDNA 또는 mRNA)를 의미한다. 일 예에서, ANGPTL4 유전자는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 인간 ANGPTL4(e.g., NCBI Accession No. NP_001034756.1, NP_647475.1 등)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001039667.2, NM_139314.2, NG_012169.1 등으로 표현되는 ANGPTL4 유전자.

[185] 상기 신생혈관형성 관련 인자는 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의

설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있다.

[186] 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있다.

[187]

[188] 본 발명의 일 구현예로서 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, VEGFA, HIF1A, ANGPT2, EPAS1, 또는 ANGPTL4는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자일 수 있다.

[189] 임의의 구체예에서, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 유전적으로 조작된 것일 수 있다.

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

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

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

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

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

[195] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 촉진하거나 증가시킬 수 있다.

[196] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 저해하거나 억제시킬 수 있다.

[197] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 환경을 유도하거나 활성화시킬 수 있다.

[198] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 억제환경을 유도하거나 신생혈관형성 환경을 비활성화시킬 수 있다.

[199] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성을 조절(촉진, 증가, 저해 및/또는 억제 등)할 수 있다.

[200] 상기 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 신생혈관형성 관련 질환의 개선 및 치료에 이용될 수 있다.

[201]

[202] 상기 조작은 신생혈관형성 관련 인자의 구조적 또는 기능적 변형을 모두 포함한다.

[203] 상기 신생혈관형성 관련 인자의 구조적 변형은 자연상태의 존재하는 야생형(wildtype)과 동일하지 않는 모든 변형을 포함한다.

[204] 예를 들면, 신생혈관형성 관련 인자가 DNA, RNA 또는 유전자인 경우,

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

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

[207] 이때, 삽입된 뉴클레오타이드는 신생혈관형성 관련 인자를 포함하는 대상 또는 대상 외부에서 유입된 뉴클레오타이드를 모두를 포함한다.

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

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

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

[211] 또 다른 예로, 신생혈관형성 관련 인자가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질인 경우,

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

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

[214] 이때, 삽입된 아미노산은 신생혈관형성 관련 인자를 포함하는 대상 또는 대상 외부에서 유입된 아미노산을 모두를 포함한다.

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

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

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

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

[219] 이때, 다른 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 신생혈관형성 관련 인자일 수 있고, 또는 다른 기능을 하는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[220]

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

[222] 예를 들면, 신생혈관형성 관련 인자가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질인 경우,

[223] 상기 기능적 변형은 신생혈관형성 관련 인자의 돌연변이일 수 있다.

[224] 이때, 돌연변이는 신생혈관형성 관련 인자의 기능이 향상되거나, 또는 저해되는 돌연변이일 수 있다.

[225] 상기 기능적 변형은 신생혈관형성 관련 인자의 기능이 추가된 것 있다.

[226] 이때, 추가된 기능은 동일한 기능이거나 다른 기능일 수 있다. 또한, 기능이 추가된 신생혈관형성 관련 인자는 다른 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질과 융합된 것일 수 있다.

[227] 상기 기능적 변형은 신생혈관형성 관련 인자 발현 증가로 인한 기능 증가일 수 있다.

[228] 상기 기능적 변형은 신생혈관형성 관련 인자 발현 감소로 인한 기능 저하일 수 있다.

[229]

[230] 일 구체예로, 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 다음 중 하나 이상에 의하여 유도된 것일 수 있다:

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

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

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

[234] 상기 표적 유전자의 변형되는 일부('표적 부위')는 상기 유전자 중의 1bp 이상, 3bp 이상, 5bp 이상, 7bp 이상, 10bp 이상, 12bp 이상, 15bp 이상,17bp 이상, 20bp 이상, 예컨대, 1bp 내지 30bp, 3bp 내지 30bp, 5bp 내지 30bp,7bp 내지 30bp, 10bp 내지 30bp, 12bp 내지 30bp, 15bp 내지 30bp, 17bp 내지 30bp, 20bp 내지 30bp, 1bp 내지 27bp, 3bp 내지 27bp, 5bp 내지 27bp, 7bp 내지 27bp, 10bp 내지 27bp, 12bp 내지 27bp, 15bp 내지 27bp, 17bp 내지 27bp, 20bp 내지 27bp, 1bp 내지 25bp, 3bp 내지 25bp, 5bp 내지 25bp, 7bp 내지 25bp, 10bp 내지 25bp, 12bp 내지 25bp, 15bp 내지 25bp, 17bp 내지 25bp, 20bp 내지 25bp, 1bp 내지 23bp, 3bp 내지 23bp, 5bp 내지 23bp, 7bp 내지 23bp, 10bp 내지 23bp, 12bp 내지 23bp, 15bp 내지 23bp, 17bp 내지 23bp, 20bp 내지 23bp, 1bp 내지 20bp, 3bp 내지 20bp, 5bp 내지 20bp, 7bp 내지 20bp, 10bp 내지 20bp, 12bp 내지 20bp, 15bp 내지 20bp, 17bp 내지 20bp, 21bp 내지 25bp, 18bp 내지 22bp, 또는 21bp 내지 23bp의 연속하는 염기서열 부위일 수

있다.

[235]

[236] 한편, 본 발명의 다른 구현예는

[237] 상기 설명한 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 관련 인자들의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템에 관한 것이다.

[238] 일 구체예로서, VEGF의 제3의 체내 메커니즘의 조절에 관여할 수 있다.

[239] VEGF에 의한 혈관 투과성(vascular permeability)의 증가는 종양 성장(tumor growth)과 더불어 부종(edema)의 원인이 될 수 있으므로, 인위적으로 조작된 VEGF는, 예를 들어, VEGF의 불활성화 조작으로 각종 종양(예를 들어, 뇌종양, 자궁암, vestibular Schwannomas 등)에서 생존율을 증가시키거나, 청력상실(hearing loss)를 회복시킬 수 있다. 또한 인위적으로 조작된 VEGF에 의한 혈관 투과성 감소는 신장부전증(renal failure), 관절염(arthritis) 건선(psoriasis), 관상동맥성 심장질환(coronary disease) 등 치료 효과를 제공할 수 있다.

[240] 또한, 인위적으로 조작된 VEGF는 자가면역 질환의 치료 효과를 제공할 수 있다. 예를 들어, VEGF에 의한 염증유도 활성을 인위적으로 조절함으로써, 포도막염(Uveitis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease), 건선(psoriasis), 전신성 경화증(systemic sclerosis), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 등의 치료 효과를 제공할 수 있다.

[241] 또한, 인위적으로 조작된 VEGF는 정신질환의 치료 효과를 제공할 수 있다. 예를 들어, VEGF에 의한 신경전달관련인자의 발현을 인위적으로 조절함으로써, 우울증을 위한 치료 효과를 제공할 수 있다.

[242]

[243] 다른 구체예에서, HIF의 제3의 체내 메커니즘의 조절에 관여할 수 있다. 상기 HIF는 HIF1 또는 HIF2일 수 있다.

[244] 인위적으로 조작된 HIF는 염증유도 활성을 조절함으로써 포도막염(Uveitis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease), 건선(psoriasis), 전신성 경화증(systemic sclerosis), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 등의 치료 효과를 제공할 수 있다.

[245] 또한, 인위적으로 조작된 HIF는 자가면역 질환의 치료 효과를 제공할 수 있다.

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

[247]

[248] [신생혈관형성 시스템]

[249]

[250] 신생혈관형성 조절 시스템

[251] 본 발명의 일 양태는 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작하여 신생혈관형성을 조절하는 신생혈관형성조절 시스템이다.

[252] 본 발명의 "신생혈관형성 조절 시스템(system)"은 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자의 기능변경에 의해 신생혈관형성 촉진, 증가, 저해 및/또는 억제에 영향을 끼치는 모든 현상을 포함하는 용어로, 이러한 신생혈관형성 조절 시스템에 직접적으로 또는 간접적으로 관여하는 모든 물질, 조성물, 방법 및 용도를 포함한다.

[253] 이러한 신생혈관형성 조절 시스템을 구성하는 각 요소들을 통칭하여 "신생혈관형성 조절 요소(neovascularization controlling factor)"로 말하기도 한다.

[254]

[255] 본 발명의 시스템은 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자가 관련되는, 변형된 체내 메커니즘을 포함한다. 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자에 의해서,

[256] 임의의 구체예에서, CD34, CD117, CD133 등과 같은 조혈모세포 표면 항원과 Flk-1/KDR, Tie-2 등과 같은 혈관내피세포 항원의 발현이 조절될 수 있다.

[257] 임의의 구체예에서, 혈관을 구성하는 세포가 발아(sprouting)되고 증식하여 새로운 맥관(vessel)을 형성하는 혈관신생(Angiogenesis)이 조절될 수 있다.

[258] 임의의 구체예에서, 내피세포를 직접 자극하는 직접혈관신생인자(direct angiogenic factor : DAF)의 활성이 조절될 수 있다. 내피세포의 증식 및/또는 이동을 촉진 또는 억제시킬 수 있다.

[259] 예를 들어, 직접혈관신생인자는 VEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth Factor), EGF (epidermal growth factor), PD-ECGF(thymidine phosphorylase), PlGF (placental growth factor), TGF (transforming growth factor), proliferin(프롤리페린), interleukin-8(사이토카인의 인터루킨-8), angiogenin(혈관신생 유도단백질), fibrin(피브린), nicotinamide(니코틴산아미드 : 비타민B 복합체), angiopoietin(안지오포이에틴: 혈관신생 촉진단백질), PAF (platelet activating factor : 혈소판촉진인자), 12-HETE(12-hydroxy eicosatetraenoate : 아리키돈산의 독성 분해물. 상피세포의 혈관신생을 촉진인자), MMPs(기질분해 단백질효소), S1P (sphingosine 1-phosphate), leptin(렙틴)을 포함할 수 있다.

[260] 임의의 구체예에서, 혈관 세포에서 작동하는 두 가지 상이한 세포간 통신 신호전달 경로, 즉 PDGF 및 VEGF 신호전달 경로를 이용할 수 있다.

[261] 임의의 구체예에서, 혈관주위세포를 자극하여 DAF의 생성을 통하여 혈관신생을 유발하는 간접혈관신생인자(indirect angiogenic factor : IAF)의 활성이 조절될 수 있다.

[262] 임의의 구체예에서, 혈관 내피전구세포(endothelial progenitor cell, EPC)로부터 혈관내피세포(vascular endothelial cell)가 분화되어 혈관 망상구조(primary vascular plexus)를 형성하는 메커니즘이 조절될 수 있다.

[263] 임의의 구체예에서, 내피세포의 이동을 위한 세포외기질 성분의 분해능을 조절될 수 있다.

[264] 임의의 구체예에서, 세포이동관련 신호전달경로가 조절될 수 있다.

[265] 임의의 구체예에서, 혈관내피성장인자의 수용체 VEGFR-1 (flt-1; fmslike-tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR), VEGFR-3, PDGF(platelet derived growth factor)수용체, NP-1 (neuropilin-1)의 활성이 조절될 수 있다.

[266]

[267] 구현예에서, 상기 시스템은 본 발명의 신생혈관형성 조절 시스템은 신생혈관형성 관련 인자 조작용 조성물을 포함한다.

[268] 상기 조작용 조성물은 인위적으로 신생혈관형성 관련 인자를 조작할 수 있는 조성물로, 바람직하게는 유전자 조작을 위한 조성물일 수 있다.

[269] 이하, 상기 유전자 조작을 위한 조성물에 대해 기술한다.

[270]

[271] [신생혈관형성 관련 인자 조작용 조성물]

[272]

[273] 본 발명의 신생혈관형성 관련 인자 및 신생혈관형성 시스템에 관여하는 물질의 조작 또는 변형은, 바람직하게는 유전적 조작을 통해 이루어질 수 있다.

[274]

[275] 일 양태에서, 신생혈관형성 관련 인자의 비 암호 또는 암호 영역의 일부 또는 전부를 타겟팅하여 유전자 조작하는 조성물 및 방법을 제공할 수 있다.

[276]

[277] 상기 조성물 및 방법은

[278] 구현예에서, 목적하는 신생혈관형성 시스템의 형성을 위해, 이에 관여하는 신생혈관형성 조절 유전자 중 하나 이상을 조작하거나 변형시킬 수 있다. 이는 유전자를 구성하는 핵산의 변형을 통해 이루어질 수 있다. 조작 결과로서, 넉다운(knock down), 넉아웃(knock out), 넉인(knock in) 형태를 모두 포함한다.

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

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

[281] 구현예에서, 신생혈관형성 관련 유전자 중 하나 이상을 넉아웃하기 위해, 또는 하나 이상의 발현을 제거하기 위해, 또는 하나 이상의 1 개 또는 2 개의

대립유전자를 넉아웃하기 위해, 신생혈관형성 관련 유전자 중 하나 이상에서의 결실 또는 돌연변이를 포함하도록 표적화될 수 있다.

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

[283] 구현예에서, 프로모터, 인핸서, 인트론, 3'UTR, 및/또는 폴리아데닐화 신호의 비암호 서열을 표적화함으로써 신생혈관형성 기능에 영향을 미치는 신생혈관형성 관련 유전자를 변경하기 위해 사용될 수 있다.

[284] 구현예에서, 상기 유전자 핵산 변경을 통해 신생혈관형성 관련 유전자의 활성 조절, 예컨대, 활성화 또는 불활성화를 야기할 수 있다.

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

[286] 구현예에서, 핵산 가닥 손상(breaks)은 상동(homologous) 재조합(recombination) 또는 비상동 말단 연결 (nonhomologous end joining; NHEJ) 등의 메커니즘들을 통하여 수선될 수 있다.

[287] 이 경우, NHEJ 메커니즘이 일어나면, 절단 위치(cleavage site)에서 DNA 서열에 변화가 유발되고, 이에 의하여 유전자가 불활성화될 수 있다. NHEJ을 통한 수선은 짧은 유전자 단편의 치환들, 삽입들 또는 결실을 야기하고, 해당 유전자 넉아웃(knockouts)의 유도에 사용될 수 있다.

[288]

[289] 다른 양태에서, 본 발명은 신생혈관형성 관련 인자 조작용 조성물을 제공한다.

[290] 상기 조작용 조성물은 인위적으로 신생혈관형성 관련 인자를 조작할 수 있는 조성물로, 바람직하게는 유전자 조작을 위한 조성물일 수 있다.

[291] 상기 조성물은 목적하는 신생혈관형성 조절 시스템의 형성을 위해, 이에 관여하는 신생혈관형성 관련 인자 중 하나 이상을 유전자 조작할 수 있다.

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

[293]

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

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

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

[297] 임의의 구체예에서, 핵산 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드, 예컨대, 1 내지

30bp, 1 내지 27bp, 1 내지 25bp, 1 내지 23bp, 1 내지 20bp, 1 내지 15bp, 1 내지 10bp, 1 내지 5bp, 1 내지 3bp, 또는 1bp의 뉴클레오타이드의 치환, 결실, 및/또는 삽입일 수 있다.

[298] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자 중 하나 이상을 넉아웃하기 위해, 또는 하나 이상의 발현을 제거하기 위해, 또는 하나 이상의 1 개 또는 2 개의 대립유전자를 넉아웃하기 위해, 신생혈관형성 관련 인자 중 하나 이상에서의 결실 또는 돌연변이를 포함하도록 조작할 수 있다.

[299] 임의의 구체예에서, 신생혈관형성 관련 인자의 넉다운은 원치 않는 대립유전자 또는 전사체의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

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

[301]

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

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

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

[305] 이 경우, NHEJ 메커니즘이 일어나면, 절단 위치(cleavage site)에서 DNA 서열에 변화가 유발되고, 이에 의하여 유전자가 불활성화될 수 있다. NHEJ을 통한 수선은 짧은 유전자 단편의 치환들, 삽입들 또는 결실을 야기하고, 해당 유전자 넉아웃(knockout)의 유도에 사용될 수 있다.

[306]

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

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

[309] 예를 들어,

[310] 초기 암호 영역에 있을 수 있다.

[311] 프로모터 서열에 있을 수 있다.

[312] 인핸서 서열에 있을 수 있다.

[313] 특정 인트론 서열에 있을 수 있다

[314] 특정 엑손 서열에 있을 수 있다.

[315]

[316] 일 구체예로서, 신생혈관형성 관련 인자 조작용 조성물은

[317] 그 조작 대상으로서, 신생혈관형성 조절에 영향을 미치는 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자를 대상으로 할 수 있다.

[318] 상기 유전자들의 표적 부위, 즉, 유전자 조작이 발생하거나 유전자 조작을 위해 인지되는 부위에 대한 표적 서열의 일 예들을 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 정리하였다.

[319] 표적 서열은 하나 이상의 유전자를 표적할 수 있다.

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

[321] 유전자는 하나 이상의 표적 서열을 포함할 수 있다.

[322] 유전자는 둘 이상의 표적 서열로 동시에 표적할 수 있다.

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

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

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

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

[327]

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

[329] 표 1 VEGFA 유전자의 표적 서열(Target sequences of VEGFA gene)

[330] 표 2 HIF1A 유전자의 표적 서열(Target sequences of HIF1A gene)

[331] 표 3 ANGPT2 유전자의 표적 서열(Target sequences of ANGPT2 gene)

[332] 표 4 EPAS1 유전자의 표적 서열(Target sequences of EPAS1 gene)

[333] 표 5 ANGPTL4 유전자의 표적 서열(Target sequences of ANGPTL4 gene).

[334] [표1]

Gene	No.	Target sequence
VEGFA	1	GTAGAGCAGCAAGGCAAGGCTC (서열번호 1)
VEGFA	2	CTTTCTGTCCTCAGTGGTCCCA (서열번호 2)
VEGFA	3	GAGACCCTGGTGGACATCTTCC (서열번호 3)
VEGFA	4	TTCCAGGAGTACCCTGATGAGA (서열번호 4)
VEGFA	5	TTGAAGATGTACTCGATCTCAT (서열번호 5)
VEGFA	6	AGGGGCACACAGGATGGCTTGA (서열번호 6)
VEGFA	7	AGCAGCCCCCGCATCGCATCAG (서열번호 7)
VEGFA	8	GCAGCAGCCCCCGCATCGCATC (서열번호 8)
VEGFA	9	GTGATGTTGGACTCCTCAGTGG (서열번호 9)
VEGFA	10	TGGTGATGTTGGACTCCTCAGT (서열번호 10)
VEGFA	11	CATGGTGATGTTGGACTCCTCA (서열번호 11)
VEGFA	12	ATGCGGATCAAACCTCACCAAG (서열번호 12)
VEGFA	13	CACATAGGAGAGATGAGCTTCC (서열번호 13)

[335]

[336] [표2]

Gene	No.	Target sequence
HIF1A	1	ACTCACCAGCATCCAGAAGTTT (서열번호 14)
HIF1A	2	ATTTGGATATTGAAGATGACAT (서열번호 15)
HIF1A	3	ATTTACATTTCTGATAATGTGA (서열번호 16)
HIF1A	4	ATGTGTTTACAGTTTGAACTAA (서열번호 17)
HIF1A	5	CTGTGTCCAGTTAGTTCAAACT (서열번호 18)
HIF1A	6	ATGGTCACATGGATGAGTAAAA (서열번호 19)
HIF1A	7	CATGAGGAAATGAGAGAAATGC (서열번호 20)
HIF1A	8	CCCAGTGAGAAAAGGGAAAGAA (서열번호 21)
HIF1A	9	TTGTGAAAAAGGGTAAAGAACA (서열번호 22)
HIF1A	10	ATAGTTCTTCCTCGGCTAGTTA (서열번호 23)
HIF1A	11	TCATAGTTCTTCCTCGGCTAGT (서열번호 24)
HIF1A	12	TGTTCTTCATACACAGGTATTG (서열번호 25)
HIF1A	13	TACGTGAATGTGGCCTGTGCAG (서열번호 26)
HIF1A	14	CTGCACAGGCCACATTCACGTA (서열번호 27)
HIF1A	15	CTGAGGTTGGTTACTGTTGGTA (서열번호 28)
HIF1A	16	CAGGTCATAGGTGGTTTCTTAT (서열번호 29)
HIF1A	17	ACCAAGCAGGTCATAGGTGGTT (서열번호 30)
HIF1A	18	TTAGATAGCAAGACTTTCCTCA (서열번호 31)

[337]

[338] [표3]

Gene	No.	Target sequence
ANGPT2	1	TCAGGTCCAGCATGGGTCCTGC (서열번호 32)
ANGPT2	2	CGGCGCGTCCCTCTGCACAGCA (서열번호 33)
ANGPT2	3	GCTGTGCAGAGGGACGCGCCGC (서열번호 34)
ANGPT2	4	ATCGTATTCGAGCGGCGCGTCC (서열번호 35)
ANGPT2	5	GATGTTCTCCAGCACTTGCAGC (서열번호 36)
ANGPT2	6	AGTGCTGGAGAACATCATGGAA (서열번호 37)
ANGPT2	7	ACAACATGAAGAAAGAAATGGT (서열번호 38)
ANGPT2	8	AAATGGTAGAGATACAGCAGAA (서열번호 39)
ANGPT2	9	TTCTATCATCACAGCCGTCTGG (서열번호 40)
ANGPT2	10	AAGTTCAAGTCTCGTGGTCTGA (서열번호 41)
ANGPT2	11	ACGAGACTTGAACTTCAGCTCT (서열번호 42)
ANGPT2	12	AAGAAGGTGCTAGCTATGGAAG (서열번호 43)
ANGPT2	13	GATGATGTGCTTGTCTTCCATA (서열번호 44)

[339]

[340] [표4]

Gene	No.	Target sequence
EPAS1	1	AACACCTCCGTCTCCTTGCTCC (서열번호 45)
EPAS1	2	GAAGCTGACCAGCAGATGGACA (서열번호 46)
EPAS1	3	GCAATGAAACCCTCCAAGGCTT (서열번호 47)
EPAS1	4	AAAACATCAGCAAGTTCATGGG (서열번호 48)
EPAS1	5	GCAAGTTCATGGGACTTACACA (서열번호 49)
EPAS1	6	GGTCGCAGGGATGAGTGAAGTC (서열번호 50)
EPAS1	7	GCGGGACTTCTTCATGAGGATG (서열번호 51)
EPAS1	8	GAAGTGCACGGTCACCAACAGA (서열번호 52)
EPAS1	9	ACAGTACGGCCTCTGTTGGTGA (서열번호 53)
EPAS1	10	TCCAGGTGGCTGACTTGAGGTT (서열번호 54)
EPAS1	11	CAGGACAGCAGGGGCTCCTTGT (서열번호 55)
EPAS1	12	TAGCCCCCATGCTTTGCGAGCA (서열번호 56)

[341]

[342] [표5]

Gene	No.	Target sequence
ANGPTL4	1	GCATCAGGGCTGCCCCGGCCGT (서열번호 57)
ANGPTL4	2	CACGGGTCCGCCCTGAGCGCTC (서열번호 58)
ANGPTL4	3	GGACGCAAAGCGCGGCGACTTG (서열번호 59)
ANGPTL4	4	TCCTGGGACGAGATGAATGTCC (서열번호 60)
ANGPTL4	5	CTGCAGCTCGGCCAGGGGCTGC (서열번호 61)
ANGPTL4	6	CCAGGGGCTGCGCGAACACGCG (서열번호 62)
ANGPTL4	7	CCCTCGGTTCCCTGACAGGCGG (서열번호 63)
ANGPTL4	8	ACCCTGAGGTCCTTCACAGCCT (서열번호 64)
ANGPTL4	9	TTCCACAAGGTGGCCCAGCAGC (서열번호 65)
ANGPTL4	10	CAGCAGCAGCGGCACCTGGAGA (서열번호 66)
ANGPTL4	11	TCCTAGTTTGGCCTCCTGGACC (서열번호 67)
ANGPTL4	12	GACCCGGCTCACAATGTCAGCC (서열번호 68)
ANGPTL4	13	GCTGTTGCGGTCCCCCGTGATG (서열번호 69)
ANGPTL4	14	GGCGTTGCCATCCCAGTCCCGC (서열번호 70)
ANGPTL4	15	AACGCCGAGTTGCTGCAGTTCT (서열번호 71)
ANGPTL4	16	ATAGGCCGTGTCCTCGCCACCC (서열번호 72)
ANGPTL4	17	GTTCTCCGTGCACCTGGGTGGC (서열번호 73)
ANGPTL4	18	ACACGGCCTATAGCCTGCAGCT (서열번호 74)
ANGPTL4	19	CCACCGTCCCACCCAGCGGCCT (서열번호 75)
ANGPTL4	20	GTGATCCTGGTCCCAAGTGGAG (서열번호 76)
ANGPTL4	21	GACCCCGGCAGGAGGCTGGTGG (서열번호 77)
ANGPTL4	22	TGCAGCCATTCCAACCTCAACG (서열번호 78)
ANGPTL4	23	TGCCGCTGCTGTGGGATGGAGC (서열번호 79)

[343]

[344] <u>조작용 조성물-유전자 가위 시스템</u>

[345] 본 발명의 신생혈관형성 조절 시스템은 신생혈관형성 관련 인자 조작용 조성물로서, 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[346]

[347] **가이드핵산**-에디터단백질 복합체

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

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

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

[351] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다.

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

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

[354] 상기 가이드핵산은 하나의 연속된 핵산서열일 수 있다.

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

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

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

[358]

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

[360] 상기 에디터단백질은 효소일 수 있다.

[361] 상기 에디터단백질은 융합 단백질일 수 있다.

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

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

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

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

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

[367]

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

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

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

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

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

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

[374]

[375] **1.** 가이드핵산

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

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

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

[379] 상기 가이드핵산은 선형 또는 원형일 수 있다.

[380] 상기 가이드핵산은 하나의 연속된 핵산서열일 수 있다.

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

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

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

[384] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다.

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

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

[387] 상기 도메인에 대한 설명은 하단에 기술한다.

[388]

[389] **i) 가이드 도메인**

[390] "가이드 도메인"은 표적 유전자 또는 핵산 상에서 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 상보적인 가이드 서열이 포함된 도메인으로, 표적 유전자

또는 핵산과의 특이적인 상호작용을 위해 역할한다.

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

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

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

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

[395] 상기 가이드 도메인은 가이드 서열을 포함할 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[406] 다른 일 예로, 상기 추가 염기서열은 1 내지 5개의 염기서열, 5 내지 10개의 염기서열, 10 내지 15개의 염기서열, 15 내지 20개의 염기서열, 20 내지 25개의

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

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

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

[409]

[410] **ii)** 제 1 상보적 도메인

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

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

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

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

[415]

[416] **iii) 연결 도메인**

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

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

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

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

[421]

[422] **iv)** 제 2 상보적 도메인

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

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

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

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

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

[428]

[429] **v)** 근위 도메인(proximal domain)

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

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

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

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

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

[435]

[436] **vi) 꼬리 도메인**

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

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

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

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

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

[442]

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

[444] 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는

2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[445]

[446] 가이드핵산은 하나 이상의 도메인을 포함한다.

[447] 상기 가이드핵산은 가이드 도메인을 포함할 수 있다.

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

[449] 상기 가이드핵산은 연결 도메인을 포함할 수 있다.

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

[451] 상기 가이드핵산은 근위 도메인을 포함할 수 있다.

[452] 상기 가이드핵산은 꼬리 도메인을 포함할 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

[460]

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

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

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

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

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

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

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

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

[469] 예를 들면, 가이드핵산은 [가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[가이드 도메인]-[제 1 상보적

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

[470]

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

[472] **gRNA**

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

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

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

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

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

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

[479] 또 다른 일 구체예로서, 단일가닥 gRNA는 3'으로부터 5' 방향으로 가이드

도메인, 즉 표적 유전자 또는 핵산에 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드 서열(guide sequence)를 포함하는 도메인; 제 1 상보적 도메인; 및 제 2 상보적 도메인, 상기 제 1 상보적 도메인 서열에 상보적인 서열을 가지므로 제 1 상보적 도메인과 이중가닥 핵산을 형성할 수 있는 도메인을 포함할 수 있다.

[480]

[481] i) 가이드 도메인

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

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

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

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

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

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

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

[489] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

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

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

[492] 구현예로서, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의

염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열을 포함할 수 있다.

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

[494] 일 구체예로서, 가이드 서열은 HIF1A 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[495] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPT2 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[496] 일 구체예로서, 가이드 서열은 EPAS1 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[497] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있다.

[498] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

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

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

[501] 일 구체예로서, 상기 추가 염기서열은 1개의 염기서열, 2개의 염기서열, 3개의 염기서열, 4개의 염기서열, 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열 또는 10개의 염기서열일 수 있다.

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

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

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

[505]

[506] 선택적으로 상기 가이드 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation,

phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl 3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[507]

[508] ii) 제 1 상보적 도메인

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

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

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

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

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

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

[515] 예를 들어, 상기 제 1 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 1 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 1 상보적 도메인인 경우, 상기 제 1 상보적 도메인은 5'-GUUUUAGAGCUA-3'일 수 있고, 또는 5'-GUUUUAGAGCUA-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 제 1 상보적 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉,

5'-GUUUUAGAGCUA$(X)_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 5 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, $(X)_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

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

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

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

[519]

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

[521]

[522] iii) 연결 도메인

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[532]

[533] 선택적으로 상기 연결 도메인의 염기서열의 일부 또는 전부는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 화학적 변형은 methylation, acetylation, phosphorylation, phosphorothioate linkage, locked nucleic acid(LNA), 2'-O-methyl

3'phosphorothioate(MS) 또는 2'-O-methyl 3'thioPACE(MSP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[534]

[535] iv) 제 2 상보적 도메인

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

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

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

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

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

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

[542] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 2 상보적 도메인인

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

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

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

50%이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

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

[546]

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

[548]

[549] v) 근위 도메인(proximal domain)

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

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

[552] 다른 구체예로서, 상기 근위 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열 14개의 염기서열 또는 15개의 염기서열을 포함할 수 있다.

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

수 있다.

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

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

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

[557]

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

[559]

[560] vi) 꼬리 도메인

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

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

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

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

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

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

[567] 또 다른 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 캄필로박터 제주니의 꼬리 도메인 또는 캄필로박터 제주니 유래 꼬리 도메인인 경우, 상기 꼬리 도메인은 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'일 수 있고, 또는 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3'와 일부, 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 이때, 상기 꼬리 도메인은 추가로 $(X)_n$을 포함, 즉,

5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU(X)$_n$-3', 할 수 있다. 상기 X는 염기 A, T, U 및 G로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 n은 염기서열의 개수로, 1 내지 15의 정수일 수 있다. 이때, (X)$_n$은 동일한 염기서열의 정수 n개 만큼의 반복일 수 있고, 또는 염기 A, T, U 및 G가 혼합된 정수 n개의 염기서열일 수 있다.

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

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

[570]

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

[572]

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

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

[575]

[576] <u>이중 gRNA</u>

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

[578] 이때, 상기 제 1 가닥은

[579] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-3'으로 구성될 수 있고,

[580] 상기 제 2 가닥은

[581] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-3' 또는

[582] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

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

[584]

[585] *제 1 가닥*

[586] *가이드 도메인*

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

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

[589]

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

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

[592] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

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

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

[595] 일 구체예로서, 가이드 서열은 HIF1A 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의

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

[596] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPT2 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[597] 일 구체예로서, 가이드 서열은 EPAS1 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[598] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[599] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

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

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

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

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

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

[605]

[606] ***제 1 상보적 도메인***

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

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

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

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

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

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

[613]

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

[615]

[616] 따라서, 제 1 가닥은 상기 기재와 같이 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적

도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

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

[618] 일 예로서, 상기 제 1 가닥은

[619] 5'-(N_{target})-$(Q)_m$-3'; 또는

[620] 5'-$(X)_a$-(N_{target})-$(X)_b$-$(Q)_m$-$(X)_c$-3'일 수 있다.

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

[622] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

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

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

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

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

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

[628]

[629] *제 2 가닥*

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

[631] *제 2 상보적 도메인*

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

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

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

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

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

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

[638]

[639] *근위 도메인*

[640] 상기 제 2 가닥에서 근위 도메인은 1 내지 20개의 염기서열로, 제 2 상보적

도메인의 3' 방향에 위치하는 도메인이다. 예를 들어, 상기 근위 도메인은 5개의 염기서열, 6개의 염기서열, 7개의 염기서열, 8개의 염기서열, 8개의 염기서열, 9개의 염기서열, 10개의 염기서열, 11개의 염기서열, 12개의 염기서열, 13개의 염기서열 14개의 염기서열 또는 15개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

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

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

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

[644]

[645] ***꼬리 도메인***

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

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

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

[649] 일 구체예로서, 상기 꼬리 도메인은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus*

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

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

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

[652]

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

[654]

[655] 따라서, 제 2 가닥은 상기 기재와 같이 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인]-3' 또는 5'-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

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

[657] 일 구체예로서, 상기 제 2 가닥은

[658] 5'-$(Z)_h$-$(P)_k$-3'; 또는

[659] 5'-$(X)_d$-$(Z)_h$-$(X)_e$-$(P)_k$-$(X)_f$-3' 일 수 있다.

[660] 다른 일 구체예로서, 상기 제 2 가닥은

[661] 5'-$(Z)_h$-$(P)_k$-$(F)_i$-3'; 또는

[662] 5'-$(X)_d$-$(Z)_h$-$(X)_e$-$(P)_k$-$(X)_f$-$(F)_i$-3' 일 수 있다.

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

[664] 예를 들어, 상기 제 2 상보적 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 제 2 상보적 도메인 또는 스트렙토코커스 피요게네스 유래 제 2 상보적 도메인과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 경우에, 상기 $(Z)_h$은

5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'일 수 있고, 또는 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3'와 적어도 50% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

[672] 예를 들어, 상기 꼬리 도메인이 스트렙토코커스 피요게네스의 꼬리 도메인

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

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

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

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

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

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

[678]

[679] *단일가닥 gRNA*

[680] 단일가닥 gRNA는 두 가지로 종류로 나뉠 수 있다.

[681] ***i) 단일가닥 gRNA***

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

[683] 구체적으로, 상기 단일가닥 gRNA는

[684] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-3' 또는

[685] 5'-[가이드 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 2 상보적 도메인]-[근위 도메인(proximal domain)]-[꼬리 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[686]

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

[688]

[689] ***연결 도메인***

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

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

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

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

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

[695]

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

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

[698] 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[699] 5'-(N_{target})-($Q)_m$-($L)_j$-($Z)_h$-($P)_k$-3'; 또는

[700] 5'-(N_{target})-($Q)_m$-($L)_j$-($Z)_h$-($P)_k$-($F)_i$-3'일 수 있다.

[701] 다른 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[702] 5'-($X)_a$-(N_{target})-($X)_b$-($Q)_m$-($X)_c$-($L)_j$-($X)_d$-($Z)_h$-($X)_e$-($P)_k$-($X)_f$-3'; 또는

[703] 5'-($X)_a$-(N_{target})-($X)_b$-($Q)_m$-($X)_c$-($L)_j$-($X)_d$-($Z)_h$-($X)_e$-($P)_k$-($X)_f$-($F)_i$-3'일 수 있다.

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

[705] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[726]

[727] ***ii)*** *단일가닥 gRNA*

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

[729] 이때, 상기 단일가닥 gRNA는

[730] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3'; 또는

[731] 5'-[제 2 상보적 도메인]-[연결 도메인]-[제 1 상보적 도메인]-[가이드 도메인]-3'으로 구성될 수 있다.

[732]

[733] *가이드 도메인*

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

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

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

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

[738] 일 구체예로서, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보성인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

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

[740] 일 구체예로서, 가이드 서열은 VEGFA 유전자의 표적 서열에 상보적인

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

[741] 일 구체예로서, 가이드 서열은 HIF1A 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[742] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPT2 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[743] 일 구체예로서, 가이드 서열은 EPAS1 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[744] 일 구체예로서, 가이드 서열은 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보적인 핵산서열로, 5 내지 50개의 염기서열일 수 있으며, 또는 5 내지 50개의 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 서열은 16개의 염기서열, 17개의 염기서열, 18개의 염기서열, 19개의 염기서열, 20개의 염기서열, 21개의 염기서열, 22개의 염기서열, 23개의 염기서열, 24개의 염기서열 또는 25개의 염기서열일 수 있으며, 또는 이를 포함할 수 있다.

[745] 이때, 가이드 서열은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 기재하였으나, 이에 제한하지 않는다.

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

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

9개의 염기서열 또는 10개의 염기서열일 수 있다.

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

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

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

[751]

[752] ***제 1 상보적 도메인***

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

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

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

[756] 일 구체예로서, 상기 제 1 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae), 라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella* disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(

Candidatus Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium* eligens)의 제 1 상보적 도메인 또는 유래된 제 1 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

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

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

[759]

[760] ***제 2 상보적 도메인***

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

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

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

[764] 일 구체예로서, 상기 제 2 상보적 도메인은 팔쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17)), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium* (MC2017)), 부티리비브리오 프로테오클라시커스(*Butyrivibrio* proteoclasiicus), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10)), 액시다미노코커스 에스피(*Acidaminococcus* sp. (BV3L6)), 포르피로모나스 마카캐(*Porphyromonas* macacae), 라츠노피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (ND2006)), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas* crevioricanis), 프레보텔라 디이엔스(*Prevotella*

disiens), 모라셀라 보보쿨리(*Moraxella* bovoculi (237)), 스미이헬라 에스피(*Smiihella* sp. (SC_KO8D17)), 렙포스피라 이나다이(*Leptospira* inadai), 라츠노스피라세애 박테리움(*Lachnospiraceae* bacterium (MA2020)), 프란시셀라 노비시다(*Francisella* novicida (U112)), 캔디다투스 메타노플라즈마 털미툼(*Candidatus* Methanoplasma termitum) 또는 에유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium* eligens)의 제 2 상보적 도메인 또는 유래된 제 2 상보적 도메인과 일부, 최소 50% 이상, 또는 완전한 상동성을 가질 수 있다.

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

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

[767]

[768] ***연결 도메인***

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

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

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

[772]

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

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

[775] 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[776] $5'\text{-}(Z)_h\text{-}(Q)_m\text{-}(N_{target})\text{-}3'$; 또는

[777] $5'\text{-}(X)_a\text{-}(Z)_h\text{-}(X)_b\text{-}(Q)_m\text{-}(X)_c\text{-}(N_{target})\text{-}3'$일 수 있다.

[778] 다른 일 구체예로서, 상기 단일가닥 gRNA는

[779] 5'-$(Z)_h$-$(L)_j$-$(Q)_m$-(N_{target})-3'; 또는

[780] 5'-$(X)_a$-$(Z)_h$-$(L)_j$-$(Q)_m$-$(X)_c$-(N_{target})-3'일 수 있다.

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

[782] 일 구체예로서, N_{target}은 표적 유전자, 즉, 신생혈관형성 관련 인자인 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 염기서열일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

[789]

[790] **2.** 에디터단백질

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

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

[793] 상기 핵산은 가이드핵산일 수 있다.

[794] 상기 에디터단백질은 효소일 수 있다.

[795] 상기 에디터단백질은 융합 단백질일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

단백질을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

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

[806] 상기 NLS는 아미노산 서열 PKKKRKV를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin)으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKKAGQAKKKK를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD 또는 RQRRNELKRSP를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY를 갖는 hRNPA1 M9 NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 마이오마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP 및 PPKKARED; 인간 p53의 서열 POPKKKPL; 마우스 c-abl IV의 서열 SALIKKKKKMAP; 인플루엔자 바이러스 NS1의 서열 DRLRR 및 PKQKKRK; 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL; 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR; 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK; 또는 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNLEARKTKK로부터 유래된 NLS 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[807]

[808] 상기 에디터단백질은 완전 활성 효소를 포함할 수 있다.

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

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

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

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

[813] 상기 에디터단백질은 불활성 효소를 포함할 수 있다.

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

[815]

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

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

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

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

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

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

[822]

[823] 본 발명의 에디터단백질의 일 구체예로서, CRISPR 효소에 대해 하단에 기술하였다.

[824] **CRISPR 효소**

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

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

[827] 상기 Type II CRISPR 효소으로는 Cas9이 있으며, 상기 Cas9은 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 노카르디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 알리사이클로바클루스 아시도칼다리우스(AlicyclobacHlus acidocaldarius), 바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides), 바실러스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens), 엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum), 락토바실러스 델브루에키이(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 미크로스 킬라 마리나(Microscilla marina), 부르크홀데리아레스 박테리움(Burkholderiales bacterium), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans), 폴라로모나스 속(Polaromonas sp.), 크로코스파에라 와트소니이(Crocosphaera

watsonii), 시아노테세 속(Cyanothece sp.), 마이크로시스티스 아에루기노사(Microcystis aeruginosa), 시네코코커스 속(Synechococcus sp.), 아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum), 암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii), 칼디셀룰로시럽토 베시이(Caldicelulosiruptor bescii), 칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis), 클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 피네골디아 마그나(Finegoldia magna), 나트라나에로비우스 써모필러스 (Natranaerobius thermophilus), 펠로토마쿨럼 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum), 아시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus), 아시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans), 알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum), 마리노박터 속(Marinobacter sp.), 니트로소코커스 할로필러스(Nitrosococcus halophilus), 니트로소코커스 와트소니(Nitrosococcus watsoni), 슈도알테로 모나스 할로플란크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis), 크테도노박테르 라세미페르(Ktedonobacter racemifer), 메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum), 아나베나 바리아빌리스(Anabaena variabilis), 노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena), 노스톡 속(Nostoc sp.), 아르트로스피라 맥시마(Arthrospira maxima), 아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis), 아르트로스피라 속(Arthrospira sp.), 링비아속(Lyngbya sp.), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes), 오실라토리아 속(Oscillatoria sp.), 페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis), 써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus) 또는 아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina) 등 다양한 미생물 유래의 Cas9일 수 있다.

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

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

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

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

[832]

[833] ***Type II*** *CRISPR 효소*

[834] Type II CRISPR 효소의 결정 구조는 2종 이상의 자연유래 미생물 Type II CRISPR 효소 분자에 대한 연구(Jinek et al., Science, 343(6176):1247997, 2014) 및 gRNA와 함께 복합체를 이루는 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9(SpCas9)에 대한 연구(Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014; 및 Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579)를 통해 결정되었다.

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

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

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

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

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

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

908에 위치한다.

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

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

[843]

[844] ***Type V** CRISPR 효소*

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

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

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

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

[849]

[850] **CRISPR 효소 활성**

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

[852] CRISPR 효소의 상기와 같은 뉴클레아제 활성을 변형 또는 변경하기 위해서,

CRISPR 효소는 조작 또는 변형될 수 있으며, 이러한 조작 또는 변형된 CRISPR 효소는 불완전 또는 부분 활성 효소 또는 불활성 효소로 변형될 수 있다.

[853]

[854] *불완전 또는 부분 활성 효소*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[864] 다른 일 구체예로서, CjCas9의 경우, CjCas9의 아미노산 서열 8번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, RuvC 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 HNH 도메인에 의한 뉴클레아제 활성을 가지므로, 표적 유전자 또는 핵산의

상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 있다.

[865]

[866] *불활성 효소*

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

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

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

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

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

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

[873]

[874] *그 밖의 활성*

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

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

[877]

[878] **CRISPR** 효소의 표적화

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

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

서열이 존재한다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[892]

[893] **CRISPR 효소 변이체**

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

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

[896] 이때, 상기 gRNA와 일부 상보적 결합을 하는 비표적 유전자 또는 핵산 및 상보적 결합을 하지 않는 비표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥이 절단되는 효과를 오프-타겟(off-target) 효과로 지칭되며, 상기 gRNA와 일부

상보적 결합을 하는 비표적 유전자 또는 핵산 및 상보적 결합을 하지 않는 비표적 유전자 또는 핵산의 위치 또는 염기서열은 오프-타겟으로 지칭되고, 이때, 오프-타겟의 개수는 하나 이상일 수 있다. 이와 반대로, 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥의 절단 효과는 온-타겟(on-target) 효과라 지칭되면, 표적 유전자 또는 핵산의 위치 또는 표적서열은 온-타겟으로 지칭된다.

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

[898] CRISPR 효소 변이체에서,

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

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

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

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

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

[904] 또한, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는

소수성(hydrophobic) 잔기를 가지는 아미노산 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

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

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

[907] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 리신(Lysine, K), 아르기닌(Arginine, R), 히스티딘(histidine, H), 아스파르트산(Aspartic aicd, D) 및 글루탐산(Glutamic acid, E) 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

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

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

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

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

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

[913] 예를 들어, 상기 변형은 자연적으로 발생하는 CRISPR 효소 내에 존재하는 세린(Serine, S), 트레오닌(Threonine, T), 아스파라긴(Asparagine, N), 글루타민(Glutamine, Q), 시스테인(Cysteine, C), 프롤린(Proline, P), 글라이신(Glysin, G), 알라닌(Alanine, A), 발린(Valine, V), 이소류신(Isoleucine, I),

류신(Leucine, L), 메티오닌(Methionine, M), 페닐알라닌(Phenylalanine, F), 타이로신(Tyrosine, Y) 및 트립토판(Tryptophan, W)으로 구성된 아미노산들 중 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 치환일 수 있다.

[914]

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

[916]

[917] 또한, CRISPR 효소 변이체에서,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[930] 일 구체예로서, SpCas9 변이체에서, 상기 변형은 SpCas9의 REC, RuvC 및 HNH

도메인에 포함된 A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965 및 F1038 아미노산 중 적어도 셋 이상의 아미노산의 변형일 수 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

[939]

[940] 또한, CRISPR 효소 변이체에서,

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

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

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

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

[945] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 10번 아스파르트산을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, D10A로 변이시키면, RuvC 도메인의

뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 비상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하지 않는 가닥을 절단할 수 없다.

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

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

[948] 일 구체예로, SpCas9의 경우, SpCas9의 아미노산 서열 840번 히스티딘을 알라닌으로 변이(mutation)시키면, 즉, H840A로 변이시키면, HNH 도메인의 뉴클레아제 활성이 불활성화되므로 니카아제로 사용할 수 있으며, 이때 생성된 니카아제는 표적 유전자 또는 핵산의 상보성 가닥, 즉, gRNA와 상보적인 결합을 하는 가닥을 절단할 수 없다.

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

[950]

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

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

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

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

[955]

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

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

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

[959] 예를 들어, 불완전 또는 부분 CRISPR 효소에 시티딘 디아미네이즈(cytidine deaminase)를 기능적 도메인으로 추가로 포함할 수 있다. 일 구체예로, SpCas9 니카아제에 시티딘 디아미네이즈, 예를 들면, APOBEC1(apolipoprotein B editing complex 1)를 추가하여 융합 단백질을 생성할 수 있다. 이렇게 형성된 [SpCas9 니카아제]-[APOBEC1]은 염기 C를 T 또는 U로 염기 교정 또는 편집에 이용되거나, 또는 염기 G를 A로 염기 교정 또는 편집에 이용될 수 있다.

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

[961] 또한, 상기 기능적 도메인은 NLS(nuclear localization sequence or signal) 또는 NES(nuclear export sequence or signal)일 수 있다.

[962] 일 예로, CRISPR 효소는 하나 이상의 NLS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 NLS는 CRISPR 효소의 아미노 말단 또는 그 근처; 카르복시 말단 또는 그 근처; 또는 이들의 조합에 하나 이상의 NLS를 포함할 수 있다. 상기 NLS는 하기로부터 유래된 NLS 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: 아미노산 서열 PKKKRKV를 갖는 SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS; 뉴클레오플라스민(nucleoplasmin)으로부터의 NLS(예를 들어, 서열 KRPAATKKAGQAKKKK를 갖는 뉴클레오플라스민 이분(bipartite) NLS); 아미노산 서열 PAAKRVKLD 또는 RQRRNELKRSP를 갖는 c-myc NLS; 서열 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY를 갖는 hRNPA1 M9

NLS; 임포틴-알파로부터의 IBB 도메인의 서열 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV; 마이오마(myoma) T 단백질의 서열 VSRKRPRP 및 PPKKARED; 인간 p53의 서열 POPKKKPL; 마우스 c-abl IV의 서열 SALIKKKKKMAP; 인플루엔자 바이러스 NS1의 서열 DRLRR 및 PKQKKRK; 간염 바이러스 델타 항원의 서열 RKLKKKIKKL; 마우스 Mx1 단백질의 서열 REKKKFLKRR; 인간 폴리(ADP-리보스) 중합효소의 서열 KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK; 및 스테로이드 호르몬 수용체(인간) 글루코코르티코이드의 서열 RKCLQAGMNLEARKTKK.

[963]

[964] 또한, CRISPR 효소 변이체는 CRISPR 효소를 분할하여 두 개 이상의 부분으로 나눈 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소를 포함할 수 있다. "스플릿(split)"은 단백질을 기능적으로 또는 구조적으로 또는 임의로 두 개 이상으로 분할하는 것을 의미한다.

[965] 이때, 상기 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소는 완전 활성 효소, 불완전 또는 부분 활성 효소 또는 불활성 효소일 수 있다.

[966] 예를 들어, SpCas9의 경우, 656번 타이로신과 657번 트레오닌 사이를 분할하여 두 개의 부분으로 나눈 스플릿 SpCas9을 생성할 수 있다.

[967] 또한, 상기 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소는 선택적으로 재구성(reconstitution)을 위한 추가 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.

[968] 이때, 상기 "재구성"은 스플릿(split) 형태의 CRISPR 효소가 구조적으로 야생형 CRISPR 효소와 동일하거나 유사하도록 하는 것을 의미한다.

[969] 상기 재구성(reconstitution)을 위한 추가 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 FRB 및 FKBP dimerization domains; 인테인(intein); ERT 및 VPR domains 또는 특정 조건에서 이량이질체(heterodimer)를 형성하는 도메인일 수 있다.

[970] 예를 들어, SpCas9의 경우, 713번 세린과 714번 글라이신 사이를 분할하여 두 개의 부분으로 나눈 스플릿 SpCas9에 두 부분 중 하나에 FRB 도메인을 연결하고, 나머지 하나에 FKBP 도메인을 연결할 수 있다. 이렇게 생성된 스플릿 SpCas9은 라파마이신이 존재하는 환경에서 FRB 도메인과 FKBP 도메인이 다이머를 형성하여 재구성된 CRISPR 효소를 생성할 수 있다.

[971]

[972] 본 발명에서 기재한 CRISPR 효소 또는 CRISPR 효소 변이체는 폴리펩타이드, 단백질 또는 이를 암호화하는 서열을 가지는 핵산일 수 있으며, 상기 CRISPR 효소 또는 CRISPR 효소 변이체를 도입하고자 하는 대상에 맞추어 코돈 최적화(codon optimization)된 것일 수 있다.

[973] "코돈 최적화"는 고유 서열의 적어도 하나의 코돈을 숙주 세포의 유전자에

더욱 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체하면서, 고유 아미노상 서열을 유지함으로써 관심 숙주 세포에서의 발현의 증진을 위해 핵산서열을 변형시키는 과정을 의미한다. 다양한 종은 특정 아미노산의 특정 코돈에 대한 특정 편향을 가지며, 코돈 편향(유기체 간의 코돈 사용의 차이)은 종종 mRNA의 번역의 효율과 상호관련 되며, 이는 번역되는 코돈의 특성 및 특정 tRNA 분자의 이용가능성에 의해 좌우되는 것을 여겨진다. 세포에서 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩타이드 합성에 가장 빈번하게 사용되는 코돈을 반영한 것이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화에 기초하여 주어진 유기체에서 최적의 유전자 발현을 위해 맞춤화될 수 있다.

[974]

[975] **3. 표적 서열**

[976] "표적 서열"은 표적 유전자 또는 핵산 내에 존재하는 염기서열로, 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보성을 가진다. 표적 서열은 표적 유전자 또는 핵산에 따라, 즉 유전자 조작 또는 교정하고자 하는 대상에 따라 달라질 수 있는 염기서열로, 표적 유전자 또는 핵산에 따라 다양하게 설계될 수 있다.

[977] 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열과 상보적인 결합을 할 수 있으며, 상기 표적 서열의 길이는 가이드 서열의 길이와 동일할 수 있다.

[978] 상기 표적 서열은 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

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

[980] 상기 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적인 핵산 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 핵산 서열일 수 있다.

[981] 일 예로, 상기 표적 서열은 가이드핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적이지 않은 1 내지 8개의 염기서열을 가지거나 또는 포함할 수 있다.

[982] 또한, 상기 표적 서열은 에디터단백질이 인식할 수 있는 핵산서열에 근접한 위치에 위치한 염기서열일 수 있다.

[983] 일 예로, 상기 표적 서열은 에디터단백질이 인식할 수 있는 핵산서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[984]

[985] 본 발명의 표적 서열의 일 구체예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 대한 표적 서열을 하단에 기술하였다.

[986] gRNA-CRISPR 효소 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 표적하는

경우,

[987] 표적 서열은 gRNA의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보성을 가진다. 표적 서열은 표적 유전자 또는 핵산에 따라, 즉 유전자 조작 또는 교정하고자 하는 대상에 따라 달라질 수 있는 염기서열로, 표적 유전자 또는 핵산에 따라 다양하게 설계될 수 있다.

[988] 또한, 표적 서열은 CRISPR 효소, 즉 Cas9 또는 Cpf1이 인식할 수 있는 PAM 서열에 근접한 위치에 위치한 염기서열일 수 있다.

[989] 일 예로, 상기 표적 서열은 CRISPR 효소가 인식할 수 있는 PAM 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 염기서열일 수 있다.

[990] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SpCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' 또는/및 5'-NGA-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[991] 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 StCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGGNG-3' 또는/및 5'-NNAGAAW-3' (W = A 또는 T이며, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[992] 또 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 NmCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNNNGATT-3' 또는/및 5'-NNNGCTT-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[993] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 CjCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNNVRYAC-3' (V = G, C 또는 A; R = A 또는 G 이며, Y = C 또는 T 이고, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[994] 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SmCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NGG-3' 및/또는 5'-NAAR-3'(R = A 또는 G이며, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[995] 또 다른 일 구체예로서, CRISPR 효소가 SaCas9인 경우, 상기 표적 서열은 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' 또는/및 5'-NNGRRV-3' (R = A 또는 G이며, V = G, C 또는 A이고, N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[996] 일 구체예로서, CRISPR 효소가 Cpf1인 경우, 상기 표적 서열은 5'-TTN-3' (N= A, T, G 또는 C; 또는 A, U, G 또는 C) 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 16 내지 25개의 염기서열일 수 있다.

[997]

[998] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[999] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1000] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1001] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1002] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1003] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자에 포함된 핵산 서열일 수 있다.

[1004] 또는

[1005] 상기 표적서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1006] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1007] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1008] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1009] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1010] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 일부 핵산 서열일 수 있다.

[1011] 또는

[1012] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1013] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1014] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1015] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1016] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1017] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 암호화, 비암호화 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1018] 또는

[1019] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1020] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1021] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1022] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1023] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1024] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 프로모터, 인핸서, 3'UTR, 폴리아데닐(polyA) 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1025] 또는

[1026] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1027] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1028] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1029] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1030] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1031] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 엑손, 인트론 또는 이의 혼합 부분의 핵산 서열일 수 있다.

[1032] 또는

[1033] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 돌연변이 부분(예를 들면, 야생형 유전자와 다른 부분)을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1034] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 돌연변이 부분을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1035] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 돌연변이 부분을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1036] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 돌연변이 부분을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1037] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 돌연변이 부분을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1038] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 돌연변이 부분을 포함하거나 또는 근접한 핵산 서열일 수 있다.

[1039] 또는

[1040] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1041] 상기 표적 서열은 VEGFA 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1042] 상기 표적 서열은 HIF1A 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1043] 상기 표적 서열은 ANGPT2 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1044] 상기 표적 서열은 EPAS1 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1045] 상기 표적 서열은 ANGPTL4 유전자의 연속하는 5 내지 50개의 핵산 서열일 수 있다.

[1046]

[1047] 본 발명의 일 구체예로서, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및 ANGPTL4 유전자의 표적 서열은 앞서 각각 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 정리하였다.

[1048]

[1049] <u>신생혈관형성 관련 인자 조작 생성물</u>

[1050]

[1051] **4.** 가이드핵산-에디터단백질 복합체 및 이의 이용

[1052] 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 대상을 변형시킬 수 있다.

[1053] 상기 대상은 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질일 수 있다.

[1054] 예를 들어, 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 최종적으로 대상하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 할 수 있도록 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 새로운 단백질을 발현할 수 있도록 한다.

[1055] 이때, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 DNA, RNA, 유전자 또는 염색체 수준에서 작용할 수 있다.

[1056] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 DNA를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1057] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 RNA를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1058] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자를 조작 또는

변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1059] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 염색체를 조작 또는 변형하여 표적 DNA가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 하거나, 또는 단백질을 제거, 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진) 또는 변형된 단백질을 발현할 수 있다.

[1060] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 유전자의 전사와 번역의 단계에서 작용할 수 있다.

[1061] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자의 전사를 촉진 또는 저해하여 표적 유전자가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1062] 다른 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 유전자의 번역을 촉진 또는 저해하여 표적 유전자가 암호화하는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1063] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 단백질 수준에서 작용할 수 있다.

[1064] 일 예로, 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 표적 단백질을 조작 또는 변형하여 표적 단백질 제거 또는 단백질 활성 조절(예를 들어, 억제, 저해, 감소, 증가 또는 촉진)할 수 있다.

[1065]

[1066] 일 구체예로서, 본 발명은 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들면, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 조작하기 위해 사용되는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 제공한다. 바람직하게는 gRNA-CRISPR 효소 복합체를 제공한다.

[1067] 특히, 유전자로부터의 표적 서열과 상보적 결합을 할 수 있는 가이드 도메인을 포함하는 gRNA, 예를 들어 단리된 또는 비천연 유래 gRNA 및 이를 암호화하는 DNA를 제공할 수 있다. 상기 gRNA 및 이를 암호화하는 DNA 서열은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4 및 표 5의 표적 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 설계될 수 있다.

[1068] 또한, gRNA의 표적 부위는 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자에서 핵산 변형, 예를 들어 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손; 또는 표적 위치에 특정 기능을 가지는 제 3의 유전자를 제공하도록 구성된다.

[1069] 또한, 2 개 이상의 gRNA가 표적 유전자에서 2 개 이상의 절단 사건, 예를 들어 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 위치시키기 위해 사용될 때, 2 개 이상의 절단 사건이 동일 또는 상이한 Cas9 단백질에 의해 생성될 수 있다.

[1070] 상기 gRNA 는 예를 들어,

[1071] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자에서 2이상의 유전자를 표적으로 할 수 있고,

[1072] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 각각 유전자 내에서 2 이상의 부위를 표적으로 할 수 있고,

[1073] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 이중 가닥 및/또는 단일 가닥 절단을 독립적으로 유도할 수 있고,

[1074] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 절단 부위에 하나 외부 유래 뉴클레오타이드의 삽입을 유도할 수도 있다.

[1075]

[1076] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 구성하는 핵산은

[1077] (a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보성인 가이드 도메인을 포함하는 가이드핵산을 암호화하는 서열; 및

[1078] (b) 에디터단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다.

[1079] 이때, 상기 (a)는 표적 부위에 따라 2 이상 존재할 수 있고, (b)는 동종 또는 2종 이상의 에디터단백질을 사용할 수 있다.

[1080] 구현예에서, 핵산은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 발현을 감소시키거나, 줄이거나 또는 억제하기 위해 넉다운 표적 위치에 충분히 가깝도록 효소적으로 불활성인 에디터단백질 또는 이의 융합단백질(예를 들어, 전사 리프레서 도메인 융합)을 표적화하도록 구성한다.

[1081]

[1082] 이 밖에도, 앞서 설명한 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 구조, 기능, 활용의 모든 양태를 적용하여, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 조작에 사용할 수 있음은 자명할 것이다.

[1083]

[1084] **가이드핵산**-에디터단백질 복합체의 이용

[1085] 본 발명의 가이드핵산-에디터단백질 복합체 이용의 일 구체예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체를 이용한 표적 DNA, RNA, 유전자 또는 염색체의 조작 또는 변형에 대해 하단에 기술하였다.

[1086]

[1087] *유전자 조작*

[1088] 앞서 기재한 gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정할 수 있다. 이때, 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정은 i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상과 ii) 손상된 표적 유전자 또는 핵산의 수선 또는 수복하는 단계를 모두 포함한다.

[1089]

[1090] *i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상*

[1091] i) 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상일 수 있으며, 구체적으로는 표적 유전자 또는 핵산 내의 표적 서열의 절단 손상일 수 있다.

[1092] 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 표적 서열의 이중가닥이 모두 절단 또는 손상되는 것일 수 있다.

[1093] 일 구체예로서, 야생형의 SpCas9을 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 모두 절단될 수 있다.

[1094] 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단될 수 있고, 각각의 절단은 순차적으로 또는 동시에 발생할 수 있다.

[1095] 또 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)와 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNS와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단될 수 있고, 각각의 절단은 순차적으로 또는 동시에 발생할 수 있다.

[1096]

[1097] 다른 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 표적 서열 중 단일가닥만 절단 또는 손상되는 것일 수 있다. 이때, 단일가닥은 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥일 수 있고, 또는 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥일 수 있다.

[1098] 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(D10A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 절단되지 않을 수 있다.

[1099] 다른 일 구체예로서, SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되고, gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 절단되지 않을 수 있다.

[1100]

[1101] 또 다른 일 예로, 상기 CRISPR 복합체를 이용한 표적 유전자 또는 핵산의 절단 또는 손상은 일부 핵산 조각(fragment)를 제거하는 것일 수 있다.

[1102] 일 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 야생형 SpCas9을 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의

이중가닥을 절단하고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥을 절단하여 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 SpCas9에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1103] 다른 일 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 야생형 SpCas9 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 야생형 SpCas9에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 야생형 SpCas9, SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1104] 또 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 두 개의 gRNA와 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해, 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA와 제 2 gRNA 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1105] 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 세 개의 gRNA와 야생형 SpCas9 및 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 이중가닥은 야생형 SpCas9에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되며, 제 3 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA, 제 2 gRNA 및 제 3 gRNA와 야생형 SpCas9, SpCas9 니카아제(D10A) 및 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1106] 또 다른 구체예로서, 서로 다른 표적 서열을 가지는 네 개의 gRNA와 SpCas9 니카아제(D10A)와 SpCas9 니카아제(H840A)를 이용하는 경우, 제 1 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 2 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되며, 제 3 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(D10A)에 의해 절단되고, 제 4 gRNA와 상보적 결합을 하는 표적 서열의 비상보성 단일가닥은 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 절단되어 제 1 gRNA, 제 2 gRNA, 제 3 gRNA 및 제 4 gRNA와 SpCas9 니카아제(D10A)및 SpCas9 니카아제(H840A)에 의해 핵산 조각을 제거할 수 있다.

[1107]

[1108] ***ii) 손상된 표적 유전자 또는 핵산의 수선 또는 수복***

[1109] 상기 CRISPR 복합체에 의해 절단 또는 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 비-상동성 말단-결합 (NHEJ) 및 상동 재조합 수리(HDR)을 통해 수선 또는 수복될 수 있다.

[1110]

[1111] *비-상동성 말단-결합 (Non-homologous end joining, NHEJ)*

[1112] NHEJ는 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 양 말단이 함께 결합함으로써 DNA 내 이중가닥 파손을 수복 또는 수선하는 방법으로, 일반적으로, 이중가닥의 파손(예를 들어, 절단)에 의해 형성된 2 개의 적합성 말단이 빈번한 접촉을 반복하여 2개의 말단이 완전히 결합되는 경우 파손된 이중가닥이 복구된다. NHEJ는 모든 세포주기에서 가능한 수복 방식으로, 주로 G1 시기와 같이 세포 내에 주형으로 쓸 상동유전체가 없을 때 발생한다.

[1113] NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에서 NHEJ 수선 부위에 핵산 서열의 일부 삽입 및/또는 결실(삽입결실)을 초래하며, 이러한 삽입 및/또는 결실은 리딩 프레임을 변경시키고, 프레임쉬프트 된 전사체 mRNA를 만들어내고, 결과적으로 넌센스-매개 붕괴(nonsense mediated decay)를 겪거나 정상적인 단백질을 합성하는데 실패함으로써 본래의 기능을 상실하게 된다. 또는 추가적으로, 리딩 프레임을 유지하지만, 상당한 양의 서열을 삽입 또는 결실시키는 돌연변이를 초래해 단백질의 기능성을 파괴할 수 있다. 이는 중요한 기능적 도메인의 돌연변이가 단백질의 비중요 영역에서의 돌연변이보다 덜 용인될 가능성이 있기 때문에 좌위 의존적이다.

[1114] NHEJ에 의해 생성된 삽입결실 돌연변이는 자연 상태에서 예측 불가능하지만, 주어진 파손 부위에서 특정 삽입 결실 서열이 선호되며, 이는 마이크로상동성의 작은 영역에 기인할 가능성이 있다. 통상적으로 결실 길이는 1 bp 내지 50 bp 범위이며, 삽입은 더 짧게 되는 경향이 있고, 종종 파손 부위를 바로 둘러싸는 짧은 중복 서열을 포함한다.

[1115] 또한, NHEJ는 돌연변이를 유발하는 과정으로, 특이적 최종 서열의 생성이 필요하지 않은 경우, 작은 서열의 모티프를 결실시키는데 사용될 수 있다.

[1116] 이러한 NHEJ를 이용하면, CRISPR 복합체에 의해 표적되는 유전자의 특이적 넉아웃(knockout)할 수 있다. CRISPR 효소, 예를 들어, Cas9 또는 Cpf1을 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 두 개의 단일가닥의 절단하고, 파손된 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 두 개의 단일가닥은 NHEJ에 의해 삽입결실이 생성되며, 이를 통해 표적 유전자 또는 핵산의 특이적 넉아웃을 유도할 수 있다. 이때, 상기 CRISPR 효소에 의해 절단되는 표적 유전자 또는 핵산의 위치는 비암호 영역 또는 암호 영역일 수 있으며, 더불어 NHEJ에 의해 수복되는 표적 유전자 또는 핵산의 위치는 비암호 영역 또는 암호 영역일 수 있다.

[1117]

[1118] ***상동 재조합 수리(homology directed repairing, HDR)***

[1119] HDR은 손상된 유전자 또는 핵산을 수선 또는 수복하기 위해 상동성을 가진 서열을 주형으로 이용하는 방식으로 오류 없이 교정할 수 있는 방법으로, 일반적으로, 파손된 DNA을 수선 또는 수복하기 위해, 즉 세포가 가지고 있는 원래의 정보를 복원하기 위해, 변형이 이루어지지 않은 상보적인 염기서열의 정보를 이용하거나 자매 염색분체의 정보를 이용하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복한다. HDR의 가장 일반적인 형태는 상동성 재조합(homologous recombination, HR)이다. HDR은 통상적으로 활발하게 분열하는 세포의 S나 G2/M 시기에 주로 발생하는 수선 또는 수복 방식이다.

[1120] HDR을 이용한 손상된 DNA 수선 또는 수복을 위해, 세포가 본래 가지는 상보적인 염기서열 또는 자매 염색분체를 이용하는 대신에, 상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열 정보를 이용한 인공적으로 합성한 DNA 주형, 즉, 상보적인 염기서열 또는 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복할 수 있다. 이때, 상기 핵산 주형에 추가로 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함시켜 파손된 DNA를 수선 또는 수복 할 때, 파손된 DNA에 추가로 포함시킨 핵산 서열 또는 핵산 조작을 삽입(Knock-In)할 수 있다. 추가로 포함시킨 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1121] 일 예로, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하고, 절단 위치와 근접한 염기서열과 상보적인 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 염기서열을 HDR 방법으로 수선 또는 수복할 수 있다.

[1122] 이때, 상기 상보적인 염기서열을 포함하는 핵산 주형은 파손된 DNA, 즉 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 상보적인 염기서열을 가지며, 추가로 파손된 DNA에 삽입하기 원하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함할 수 있다. 이와 같이 상보적인 염기서열과 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함하는 핵산 주형을 이용하여 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 위치에 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각을 삽입할 수 있다. 이때, 상기 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각 및 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있다. 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 오른쪽 및 왼쪽의 염기서열과 상보적인 결합을 하는 염기서열일 수 있다. 또는 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 3' 및 5' 말단과 상보적인 결합을 하는 염기서열일 수 있다. 상기

상보적인 염기서열은 15 내지 3000개의 염기서열일 수 있으며, 핵산 주형의 크기 또는 표적 유전자 또는 핵산에 따라 적절하게 상기 상보적인 염기서열의 길이 또는 크기를 설계할 수 있다. 이때, 핵산 주형을 이중가닥 또는 단일가닥의 핵산일 수 있으며, 선형 또는 원형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1123] 다른 일 예로, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산의 이중가닥 또는 단일가닥을 절단하고, 절단 위치와 근접한 염기서열과 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형을 세포에 제공하여 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 염기서열을 HDR 방법으로 수선 또는 수복할 수 있다.

[1124] 이때, 상기 상동성 염기서열을 포함하는 핵산 주형은 파손된 DNA, 즉 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 상동성 염기서열을 가지며, 추가로 파손된 DNA에 삽입하기 원하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함할 수 있다. 이와 같이 상동성 염기서열과 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각을 포함하는 핵산 주형을 이용하여 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 위치에 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각을 삽입할 수 있다. 이때, 상기 삽입하고자 하는 핵산 서열 또는 핵산 조각 및 추가적인 핵산 서열 또는 핵산 조각은 돌연변이의 변형된 표적 유전자 또는 핵산을 정상 유전자 또는 핵산으로 교정하기 위한 핵산 서열 또는 핵산 조각이거나 세포 내에서 발현을 원하는 유전자 또는 핵산일 수 있다. 상기 상동성 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 오른쪽 및 왼쪽의 염기서열과 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 또는 상기 상보적인 염기서열은 파손된 DNA, 즉 표적 유전자 또는 핵산의 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 3' 및 5' 말단과 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다. 상기 상동성 염기서열은 15 내지 3000개의 염기서열일 수 있으며, 핵산 주형의 크기 또는 표적 유전자 또는 핵산에 따라 적절하게 상기 상동성 염기서열의 길이 또는 크기를 설계할 수 있다. 이때, 핵산 주형을 이중가닥 또는 단일가닥의 핵산일 수 있으며, 선형 또는 원형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1125]

[1126] 상기의 NHEJ와 HDR 외에도 파손된 DNA를 수선 또는 수복하는 방법이 존재한다.

[1127] *단일가닥 어닐링(Single-strand annealing, SSA)*

[1128] SSA는 표적 핵산 중에 존재하는 2개의 반복부 서열 사이의 이중가닥 파손을 수선하는 방법으로, 일반적으로 30개 초과의 염기서열의 반복부 서열을 이용한다. 파손 말단에서 표적 핵산의 이중가닥에 대해 반복부 서열을 각각의 단일가닥이 가지도록 절단(Sticky end가 되도록)되며, 절단 후 반복부 서열을 함유하는 단일가닥 돌출부는 반복체 서열이 자체적으로 부적절하게 어닐링되는 것을 방지하기 위해 RPA 단백질로 코팅된다. RAD52는 돌출부 상의 각각의 반복부 서열에 결합하고, 상보성 반복부 서열의 어닐링을 가능하게 하는 서열을 정렬한다. 어닐링 후에, 돌출부의 단일가닥 플랩(flap)은 절단되고, 새로운 DNA

합성이 임의의 갭을 채우면서 DNA 이중가닥을 복원한다. 이러한 수복 또는 수선의 결과로, 2개의 반복체 사이의 DNA 서열이 결실되며, 결실 길이는 이용되는 2개의 반복체의 위치를 포함하는 다수의 인자 및 절단 경로 또는 진행도에 의존될 수 있다.

[1129] SSA는 HDR 방식과 유사하게는 상보성 서열, 즉 상보성 반복부 서열을 이용하고, 대조적으로는 표적 핵산 서열을 변경 또는 수정하기 위한 핵산 주형을 필요로 하지 않는다.

[1130]

[1131] *단일가닥 파손 수선(Single-strand break repair, SSBA)*

[1132] 게놈 내 단일가닥 파손은 상기 논의된 수선 메커니즘과는 별도의 메커니즘인 SSBR을 통해 수선 또는 수복된다. DNA 파손의 형태가 단일가닥 파손일 때, PARP1 및/또는 PARP2는 파손을 인식하고 수선 기작을 동원한다. DAN 파손에서 PARP1의 결합 및 활성을 일시적이며, 손상부에 SSBR 단백질 복합체의 안정성을 촉진함으로써 SSBR을 촉진시킨다. SSBR 복합체에서 가장 중요한 단백질은 XRCC1으로, 이는 DNA의 3' 및 5' 말단 가공을 촉진하는 단백질과 상호작용하며, 안정화시킨다. 말단 가공은 일반적을 손상된 3' 말단을 하이드록실화 된 상태 및/또는 5' 말단을 인산염 모이어티로 복구하는 것을 수반하며, 말단이 가공되면, DNA 갭 채우기가 일어난다. DNA 갭 채우기에는 2가지 방법, 즉, 짧은 패치 수선 및 긴 패치 수선이 있으며, 이때 짧은 패치 수선은 빠져있는 단일 염기의 삽입을 수반한다. DNA 갭 채우기 후, DNA 리가아제는 말단의 결합을 촉진한다.

[1133]

[1134] *미스매치 수선(Mismatch repair, MMR)*

[1135] MMR은 잘못 짝지어진 DNA 염기상에서 작용한다. MSH2/6 또는 MSH2/3 복합체는 둘 다 미스매치 인식 및 수선의 개시에서 중요한 역할을 하는 ATP 분해효소 활성을 가지며, MSH2/6는 염기-염기 미스매치를 우선적으로 인식하고, 1개 또는 2개의 염기의 미스매치를 동정하는 반면, MSH2/3는 더 큰 미스매치를 우선적으로 인식한다.

[1136]

[1137] ***염기 절단 수선(Base excision repair, BER)***

[1138] BER은 세포주기 전체에서 활성이며, 게놈으로부터 작은 비-나선-뒤틀림 염기 손상부를 제거하는데 이용되는 수선 방식이다. 손상된 DNA는 당 인산화 백본에 염기를 연결하는 N-글리코사이드 결합을 절단하여 손상된 염기를 절단하고, 이어서 포스포디에스테르 백본을 절단하여 DNA 단일가닥 파손을 생성한다. 이렇게 형성된 파손된 단일가닥 말단을 제거하고, 제거된 단일가닥에 의해 발생된 갭을 새로운 상보성 염기로 채운 후, DNA 리가아제로 새로 채워진 상보성 염기 말단과 백본을 결합시켜 손상된 DNA를 수선 또는 수복한다.

[1139]

[1140] *뉴클레오타이드 절단 수선(Nucleotide excision repair, NER)*

[1141] NER은 DNA로부터 큰 나선-뒤틀림 손상을 제거하는 중요한 절단 메커니즘으로, 손상이 인식되면, 손상부를 함유하는 짧은 단일가닥 DNA 세그먼트를 제거하여, 22개 내지 30개 염기의 단일가닥 갭을 생성한다. 생성된 갭은 새로운 상보성 염기로 채운 후, DNA 리가아제로 새로 채워진 상보성 염기 말단과 백본을 결합시켜 손상된 DNA를 수선 또는 수복한다.

[1142]

[1143] *유전자 조작 효과*

[1144] 표적 유전자 또는 핵산을 조작 또는 교정은 크게 넉아웃(knockout), 넉다운(knockdown), 넉인(knockin)의 효과를 초래할 수 있다.

[1145]

[1146] ***넉아웃(Knockout)***

[1147] "넉아웃(knockout)"은 표적 유전자 또는 핵산을 불활성화시키는 것을 의미하며, "표적 유전자 또는 핵산의 불활성화"는 표적 유전자 또는 핵산의 전사 및/또는 번역이 되지 못하는 상태를 의미한다. 넉아웃을 통해 질병을 유발하는 유전자 또는 비정상적 기능을 가지는 유전자의 전사 및 번역을 억제하여 단백질의 발현을 막을 수 있다.

[1148] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 절단할 수 있다. CRISPR 복합체를 이용하여 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 NHEJ를 통해 손상된 유전자 또는 핵산이 수복될 수 있다. 파손된 표적 유전자 또는 핵산은 NHEJ에 의해 삽입결실이 생성되며, 이를 통해 표적 유전자 또는 핵산의 특이적 넉아웃을 유도할 수 있다.

[1149]

[1150] ***넉다운(Knockdown)***

[1151] "넉다운(knockdown)"은 표적 유전자 또는 핵산의 전사 및/또는 번역을 감소시키거나 표적 단백질의 발현이 감소하는 것을 의미한다. 넉다운을 통해 과발현되는 유전자 또는 단백질의 발현을 조절하여 질병의 발생을 막거나 질병을 치료할 수 있다.

[1152] 예를 들어, gRNA- CRISPR 불활성 효소-전사 저해 활성 도메인 복합체, 즉, 전사 저해 활성 도메인을 포함하는 CRISPR 불활성 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, 상기 CRISPR 불활성 복합체가 표적 유전자 또는 핵산에 특이적으로 결합하고, CRISPR 불활성 복합체에 포함된 전사 저해 활성 도메인에 의해 표적 유전자 또는 핵산의 전사가 저해되어 해당 유전자 또는 핵산의 발현이 저해되는 넉다운을 유도할 수 있다.

[1153]

[1154] *넉인(Knockin)*

[1155] "넉인(knockin)"은 표적 유전자 또는 핵산에 특정 핵산 또는 유전자를 삽입하는

것을 의미하며, 이때, "특정 핵산"은 삽입하고자 하는 또는 발현시키기 원하는 유전자 또는 핵산을 의미한다. 넉인을 통해 질병을 유발하는 돌연변이 유전자를 올바르게 교정하거나, 정상 유전자를 삽입하여 정상 유전자의 발현을 유도하여 질병 치료에 이용할 수 있다.

[1156] 더불어, 넉인은 추가적으로 도너(donor)를 필요로 할 수 있다.

[1157] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 편집 또는 교정하는 경우, CRISPR 복합체를 이용하여 표적 유전자 또는 핵산을 절단할 수 있다. CRISPR 복합체를 이용하여 손상된 표적 유전자 또는 핵산은 HDR를 통해 손상된 유전자 또는 핵산이 수복될 수 있다. 이때, 도너를 이용하여 손상된 유전자 또는 핵산에 특정 핵산을 삽입할 수 있다.

[1158] 상기 "도너(donor)"는 손상된 유전자 또는 핵산의 HDR을 통한 수복을 돕는 핵산서열을 의미하며, 이때, 도너는 특정 핵산을 포함할 수 있다.

[1159] 상기 도너는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1160] 상기 도너는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1161] 상기 도너는 표적 유전자 또는 핵산에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1162] 예를 들어, 도너는 특정 핵산을 삽입하고자 하는 위치, 예를 들어, 손상된 핵산의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이때, 삽입하고자 하는 특정 핵산은 손상된 핵산의 오른쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열과 손상된 핵산의 왼쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열 사이에 위치할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1163] 상기 도너는 선택적으로 부수적인 핵산서열을 포함할 수 있다. 이때, 부수적인 핵산서열은 도너의 안정성, 넉인 효율 또는 HDR 효율을 높이는 역할을 하는 것일 수 있다.

[1164] 예를 들어, 상기 부수적인 핵산서열은 염기 A, T가 풍부한 핵산서열, 즉, A-T 풍부 도메인(A-T rich domain)일 수 있다. 또는 상기 부수적인 핵산서열은 SMAR(scaffold/matrix attachment region)일 수 있다.

[1165]

[1166] 본 발명의 유전자 조작 효과에 관한 일 구체예로서, gRNA-CRISPR효소 복합체를 이용하여 수득한 조작된 표적 유전자, 즉, 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 하기와 같은 구성을 가질 수 있다.

[1167] 일 구체예로서, 신생혈관형성 관련 인자가 유전자인 경우,

[1168] gRNA-CRISPR효소 복합체에 의해 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자의 구성은,

[1169] 상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지

40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1170] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;

[1171] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;

[1172] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입

[1173] 중 하나 이상의 핵산의 변형을 포함할 수 있다.

[1174] 또한, 상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[1175] 이때, "외부 유래 뉴클레오타이드"는 신생혈관형성 관련 인자가 본래 가지고 있는 뉴클레오타이드가 아니라, 외부로부터 생성된, 예를 들어, 이종 생물 유래 또는 인위적으로 합성한 뉴클레오타이드를 모두 포함하는 개념이다. 50bp 이하의 작은 크기의 올리고뉴클레오타이드뿐만 아니라, 특정 기능을 가지는 단백질의 발현을 위한 큰 크기의 수백, 수천, 또는 수만 bp의 뉴클레오타이드도 포함한다. 이러한 외부 유래 뉴클레오타이드는 도너(donor)일 수 있다.

[1176] 상기 화학적 변형은 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 글리코실화 등을 포함하고, 예를 들어, 뉴클레오티드가 가지고 있는 작용기의 일부가 수소원자, 불소원자, -O-알킬기, -O-아실기, 및 아미노기 중 어느 하나로 치환되거나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 핵산 분자의 전달능을 높이기 위해 -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N3 및 -CN (R= alkyl, aryl, alkylene) 중 어느 하나로도 치환될 수 있다. 또한, 적어도 1개의 뉴클레오티드의 포스페이트 백본이 alkylphosphonate form, phosphoroamidate form 및 boranophosphate form 중 어느 하나로 치환될 수 있다. 또한, 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오티드가 LNA (locked nucleic acid), UNA(unlocked nucleic acid), Morpholino, PNA (peptide nucleic acid) 중 어느 하나로 치환된 것임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 화학적 변형은 상기 핵산 분자가 지질, 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide) 및 세포 표적 리간드로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상과 결합 되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[1177]

[1178] 목적하는 신생혈관형성 조절 시스템을 형성하기 위하여 gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 인위적으로 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산에 변형을 가할 수 있다.

[1179] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산 변형을 포함하는 부위는 표적 부위 또는 표적 서열일 수 있다.

[1180] 이러한 표적 서열은 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 타겟이 될 수 있고, 상기 표적 서열은 CRISPR 효소가 인식하는 PAM 서열을 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 이러한 표적 서열은 실시자에게 gRNA 설계 단계에서 중요한 기준을 제공할 수 있다.

[1181] 이러한 핵산 변형은 핵산의 "절단(cleavage)"를 포함한다.

[1182] 표적 부위의 "절단(cleavage)"은 폴리뉴클레오타이드의 공유결합(covalent

backbone)의 파손(breakage)을 의미한다. 절단은 포스포다이에스터(phosphodiester) 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 이외의 다양한 여러 가지 방법들에 의하여 수행될 수 있다. 단일가닥의 절단 및 이중가닥의 절단 모두 가능하며, 이중가닥의 절단은 두 개의 구별되는(distinct) 단일-가닥의 절단의 결과로서 발생할 수 있다. 이중 가닥의 절단은 blunt ends 또는 staggered end를 생성할 수 있다.

[1183] 불활성화된 CRISPR 효소를 사용하는 경우, 상기 절단 프로세스 없이, 특정 기능을 보유하는 인자를 표적 부위 또는 신생혈관형성 관련 인자의 임의의 부위에 가깝게 위치할 수 있도록 유도할 수 있다. 이러한 특정 기능에 따라 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[1184] 일 예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 형성되는 핵산의 절단을 통해, 표적 및 비표적 활성에 의해 다양한 인델 (indel; insertion and deletion)이 발생할 수 있다.

[1185] "인델(indel)"은 DNA의 염기 배열에서 일부 염기가 중간에 삽입(insertion)되거나 결실 (deletion) 된 변이를 총칭한다. 인델은 상술한 바와 같이 gRNA-CRISPR 효소 복합체가 신생혈관형성 관련 인자의 핵산(DNA, RNA)을 절단하는 경우, HDR 또는 NHEJ 기작에 의해 수선되는 과정에서 표적 서열에 도입되는 것일 수 있다.

[1186] 본 발명의 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자란, 이러한 핵산의 절단 및 인델, 도너를 이용한 삽입 등으로 본래 유전자의 핵산서열에 변형이 이루어진 것으로서, 목적하는 신생혈관형성 조절 시스템, 예를 들어 신생혈관형성 촉진 또는 억제 등의 효과를 발휘하는 데 기여한다.

[1187] 예를 들어,

[1188] 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자에 의해 특정 단백질의 발현 및 활성을 촉진시킬 수 있다.

[1189] 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자에 의해 특정 단백질을 불활성화시킬 수 있다.

[1190] 일 예로, 유전체(genome) 중 신생혈관형성 관련 인자들 예컨대, 역 조절 유전자들 예컨대, VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 특정 타겟 부위를 절단하여 상기 유전자를 넉다운 또는 넉아웃시킬 수 있다.

[1191] 다른 예로, 표적화된 넉다운은 전사를 변경하기 위해, 예를 들어 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 전사를 차단하거나, 저감시키거나 또는 감소시키기 위해 전사 리프레서 도메인 또는 염색질 변형 단백질에 융합된 효소적으로 불활성인 CRISPR 효소를 이용함으로써 매개될 수 있다.

[1192] 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자에 의해 신생혈관형성을 조절할 수 있다.

[1193] 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자에 의해 신생혈관형성 관련 질환을 개선 또는 치료할 수 있다.

[1194]

[1195] 본 발명의 일 구체예로서, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자는 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 구성적 특징(예를 들면, 신생혈관형성 관련 인자의 표적 부위에 포함 또는 근접한 주요 PAM 서열의 상이함)에 따라 다양한 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자를 제공할 수 있다.

[1196] 이하, 대표적인 CRISPR 효소 예들 및 신생혈관형성 조절 유전자를 중심으로 기술하지만, 이는 특정 예시에 지나지 않고 이러한 내용으로 본 발명이 제한되지는 않는다.

[1197] 예를 들어, CRISPR 효소가 SpCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NGG-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 표적 유전자 내의 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1198] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1199] a) 5'-NGG-3' (N은 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1200] b) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1201] c) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1202] d) 상기 a) 내지 c) 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1203] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1204]

[1205] 예를 들어, CRISPR 효소가 CjCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNNNRYAC-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C 또는 T임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNNNRYAC-3' 서열의5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1206] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1207] a') 5'-NNNNRYAC-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C 또는 T임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1208] b') 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1209] c') 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1210] d') 상기 a') 내지 c') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1211] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1212]

[1213] 예를 들어, CRISPR 효소가 StCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNAGAAW-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1214] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1215] a") 5'-NNAGAAW-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임)서열의 5' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1216] b") 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1217] c") 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1218] d") 상기 a") 내지 c") 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1219] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1220]

[1221] 예를 들어, CRISPR 효소가 NmCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은

5'-NNNNGATT-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1222] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1223] a''') 5'-NNNNGATT-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1224] b''') 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1225] c''') 5'-NNNNGATT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1226] d''') 상기 a''') 내지 c''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1227] 에 의한 것인 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1228]

[1229] 예를 들어, CRISPR 효소가 SaCas9 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNGRR(T)-3'(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, (T)는 임의로 포함가능한 서열을 의미함)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp 또는 21bp 내지 23bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1230] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1231] a'''') 5'-NNGRR(T)-3' (N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1232] b'''') 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

[1233] c'''') 5'-NNGRR(T)-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 25bp, 예컨대 17bp 내지 23bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1234] d'''') 상기 a'''') 내지 c'''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1235] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어,

인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1236]

[1237] 예를 들어, CRISPR 효소가 Cpf1 단백질인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-TTN-3'(N은 A, T, C 또는 G임)이고, 상기 절단되는 염기서열 부위(표적 부위)는 타겟 유전자 내의 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp, 17bp 내지 30bp, 또는 17bp 내지 26bp의 염기서열 부위일 수 있다.

[1238] 상기 Cpf1 단백질은 *Parcubacteria* bacterium (GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio* proteoclasiicus, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas* macacae, *Lachnospiraceae* bacterium (ND2006), *Porphyromonas* crevioricanis, *Prevotella* disiens, *Moraxella* bovoculi(237), *Smiihella* sp. (SC_KO8D17), *Leptospira* inadai, *Lachnospiraceae* bacterium (MA2020), *Francisella* novicida (U112), *Candidatus* Methanoplasma termitum, *Eubacterium* eligens 등의 미생물 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, *Parcubacteria* bacterium (GWC2011_GWC2_44_17), *Peregrinibacteria* bacterium (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus* sp. (BV3L6), *Porphyromonas* macacae, *Lachnospiraceae* bacterium(ND2006), *Porphyromonas* crevioricanis, *Prevotella* disiens, *Moraxella* bovoculi(237), *Leptospira* inadai, *Lachnospiraceae* bacterium (MA2020), *Francisella* novicida (U112), *Candidatus* Methanoplasma termitum, 또는 *Eubacterium* eligens 유래의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1239] 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내의

[1240] a'''') 5'-TTN-3'(N은 A, T, C 또는 G임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

[1241] b'''') 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로 의 치환,

[1242] c'''') 5'-TTN-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 10bp 내지 30bp, 예컨대, 15bp 내지 26bp의 염기 서열 부위 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 또는

[1243] d'''') 상기 a'''') 내지 c'''') 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합

[1244] 에 의한 것인, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어, 인위적으로 조작된 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 제공할 수 있다.

[1245]

[1246] 다른 구체예로서, 신생혈관형성 관련 인자가 단백질인 경우,

[1247] 인위적으로 조작된 단백질은 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 직간접 작용에 의해 형성되는 새로운 또는 변경된 혈관혈성에 관여하는 모든 단백질을 포함한다.

[1248] 예를 들어, gRNA-CRISPR 효소 복합체에 의해 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자(유잔자)에 의해 발현된 단백질 또는 이러한 단백질 활성에 의해 영향을 받아 증가되거나 감소된 타 단백질일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[1249] 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자(단백질)는 상기 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자(유잔자)의 구성과 상응하는 아미노산 구성 및 활성을 가질 수 있다, 일 구체예로서:

[1250] (i) 발현 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1251] 예를 들어, 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1252] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 따른 발현량 감소 또는 증가;

[1253] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 따른 발현량 감소 또는 증가;

[1254] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 따른 발현량 감소 또는 증가, 또는 융합 단백질의 발현 또는 특정 단백질의 독립적인 발현;

[1255] 상기 설명한 단백질들의 발현 특성에 영향을 받는 제3의 단백질의 발현량 감소 또는 증가;

[1256] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1257] (ii) 구조 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1258] 예를 들어, 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1259] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경, 및 3차원 구조의 변경;

[1260] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경, 이에 따른 3차원 구조의 변경;

[1261] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 따른 코돈 변경, 아미노산의 변경 및 3차원 구조의 변경, 또는 특정 단백질과의 융합 구조 또는 특정 단백질이 분리되는 독립적 구조;

[1262] 상기 설명한 구조특성이 변화된 단백질의 영향을 받는 제3의 단백질의 코돈 변경, 아미노산의 변경, 및 3차원 구조의 변경;

[1263] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1264] (iii) 기능 특성이 변화된, 인위적으로 조작된 단백질을 제공할 수 있다.

[1265] 예를 들어, 신생혈관형성 관련 인자의 핵산서열 내 PAM 서열 중 또는 이의 5'

말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp, 1bp 내지 40bp, 1bp 내지 30bp, 바람직하게는 3bp 내지 25bp의 염기 서열 부위 내의

[1266] 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입에 기인하는 단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 신생혈관형성 기능의 도입;

[1267] 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환에 기인하는 단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 기능의 도입;

[1268] 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입에 기인하는 단백질 변형에 의해 특정 기능의 활성화 또는 불활성화 또는 새로운 기능의 도입, 특히 특정 단백질의 융합 발현 또는 독립적 발현으로 기존 기능에 제3의 기능을 도입할 수 있음;

[1269] 상기 설명한 기능 특성이 변화된 단백질의 영향을 받는 제3의 단백질의 기능 변경;

[1270] 중 하나 이상의 특징을 가지는 단백질의 변형을 포함할 수 있다.

[1271]

[1272] 또한, 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형에 의한 인위적으로 조작된 단백질을 포함할 수 있다.

[1273] 예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화, 및 글리코실화에 의한 단백질의 발현 특성, 구조 특성 및 기능 특성 중 1 이상의 특성이 변경될 수 있다.

[1274] 예를 들어, 뉴클레오타이드의 화학적 변형에 의해 제3의 단백질이 유전자의 핵산 서열 내 결합함으로써 제3의 구조 및 기능을 부여할 수 있다.

[1275]

[1276] **5. 기타 추가 구성물**

[1277] 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 증가 또는 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 추가 구성물을 포함할 수 있다.

[1278] 추가 구성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 이용될 수 있다.

[1279] **액티베이터**(activator)

[1280] 추가 구성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 높이기 위한 액티베이터(activator)로 이용될 수 있다.

[1281] 상기 "액티베이터(activator)"는 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합을 안정화 시키거나, 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 더 잘 접근시킬 수 있도록 역할하는 핵산을 의미한다.

[1282] 상기 액티베이터는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1283] 상기 액티베이터는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1284] 상기 액티베이터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합을 안정화시키는 "헬퍼(helper)"와 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 더 잘 접근시킬 수 있도록 역할하는 "에스코터(escortor)"로 나눌 수 있다.

[1285] 상기 헬퍼는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 증가시킬 수 있다.

[1286] 예를 들어, 상기 헬퍼는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하여 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 결합할 때, 상기 헬퍼에 포함된 상동성을 가지는 핵산서열이 표적 핵산, 유전자 또는 염색체와 추가적인 상보적인 결합을 이루어 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 결합이 안정화될 수 있도록 할 수 있다.

[1287] 상기 에스코터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자 또는 염색체의 절단 효율을 증가시킬 수 있다.

[1288] 예를 들어, 상기 에스코터는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체에 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하고, 이때, 상기 에스코터에 포함된 상동성을 가지는 핵산서열이 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 가이드핵산과 일부 상보적 결합을 할 수 있다. 이를 통해, 가이드핵산-에디터단백질 복합체와 일부 상보적인 결합을 한 에스코터는 표적 핵산, 유전자 또는 염색체와 일부 상보적인 결합을 할 수 있고, 그 결과 에스코터는 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 정확한 표적 핵산, 유전자 또는 염색체 위치에 접근하도록 할 수 있다.

[1289] 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1290]

[1291] 또한, 추가 구성물은 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위해 선택적으로 이용될 수 있다.

[1292] **어시스터**(Assistor)

[1293] 추가 구성물은 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 효율을 향상시키기 위한 어시스터(assistor)로 이용될 수 있다.

[1294] 상기 "어시스터(assistor)"는 손상된 유전자 또는 핵산, 예를 들어, 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 절단된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 높이는 역할을 하는 핵산을 의미한다.

[1295] 상기 어시스터는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다.

[1296] 상기 어시스터는 선형 또는 원형일 수 있다.

[1297] 상기 어시스터는 수복 방법에 따라 NHEJ를 이용한 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시키는 "NHEJ 어시스터"와 HDR을 이용한 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시키는 "HDR 어시스터"로 나눌 수 있다.

[1298] 상기 NHEJ 어시스터는 NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시킬 수 있다.

[1299] 예를 들어, 상기 NHEJ 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 일 말단(예를 들어 3' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하며, 또한 손상된 핵산서열의 다른 말단(예를 들어 5' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 또는 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 두 부분이 근접한 위치에 존재할 수 있도록 도와줌으로써 NHEJ에 의해 손상된 핵산의 수복 효율을 높일 수 있다.

[1300] 상기 HDR 어시스터는 HDR을 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에 참여하거나 수복 효율을 향상시킬 수 있다.

[1301] 예를 들어, 상기 HDR 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 일 말단(예를 들어 3' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함하며, 또한 손상된 핵산서열의 다른 말단(예를 들어 5' 말단) 핵산서열과 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 또는 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 주형으로 역할하여 HDR에 의한 손상된 핵산의 수복 효율을 높일 수 있다.

[1302] 다른 예로, 상기 HDR 어시스터는 손상된 핵산서열의 일부와 상동성을 가지는 핵산 서열 및 특정핵산, 예를 들면 삽입하고자 하는 핵산 또는 유전자를 포함할 수 있다. 이때, 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 손상된 핵산서열의 왼쪽(upstream)및 오른쪽(downstream)의 염기서열과 각각 상동성을 가지는 핵산서열을 포함할 수 있다. 상기 특정 핵산은 손상된 핵산의 오른쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열과 손상된 핵산의 왼쪽 염기서열과 상동성을 가지는 핵산서열 사이에 위치할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 핵산서열 및 특정 핵산은 손상된 핵산에 특정 핵산을 삽입할 수 있는 도너로 역할하여 넉인을 위한 HDR의 효율을 높일 수 있다.

[1303] 상기 상동성을 가지는 핵산서열은 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 갖거나 또는 완전하게 상동성을 가질 수 있다.

[1304]

[1305] **6. 대상**

[1306] "대상"은 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입되는 유기체, 또는 가이드핵산, 에디터단백질 또는

가이드핵산-에디터단백질 복합체가 작동하는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료를 의미한다.

[1307] 상기 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체일 수 있다.

[1308] 상기 유기체는 세포, 조직, 식물, 동물 또는 인간일 수 있다.

[1309] 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포일 수 있다.

[1310] 상기 진핵세포는 식물세포, 동물세포, 인간세포일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[1311] 상기 조직은 피부, 간, 신장, 심장, 폐, 뇌, 근육 등의 동물 또는 인간의 신체 조직일 수 있다.

[1312] 상기 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 검체 또는 시료일 수 있다.

[1313] 상기 검체 또는 시료는 침, 혈액, 피부조직, 암세포 또는 줄기세포 등 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체에서 획득한 것 일 수 있다.

[1314]

[1315] 본 발명에서 대상의 일 구체예로서, 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 유전자 또는 핵산을 포함하는 것일 수 있다.

[1316] 이때, 표적 유전자는 신생혈관형성 관련 인자로, 예를 들어 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자일 수 있다.

[1317] 상기 표적 유전자는 야생형이거나, 또는 야생형에서 변형된 형태일 수 있다.

[1318]

[1319] 본 발명의 일 구체예로서, 대상은 가이드핵산-에디터단백질 복합체로 인해 조작된 유전자 또는 핵산을 포함할 수 있다.

[1320] 이때, 조작된 유전자는 신생혈관형성 관련 인자로, 예를 들어 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자일 수 있다.

[1321] 이때, 가이드핵산은 신생혈관형성 관련 인자, 예를 들어 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자를 표적할 수 있다.

[1322] 상기 가이드핵산은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자, 및/또는 ANGPTL4 유전자의 표적 서열에 상보성 핵산서열일 수 있다.

[1323] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 유전자를 표적할 수 있다.

[1324] 상기 가이드핵산은 둘 이상의 유전자를 동시에 표적할 수 있다. 이때, 둘 이상의 유전자는 동종 유전자이거나 이종 유전자 일 수 있다.

[1325] 상기 가이드핵산은 하나 이상의 표적 서열을 표적할 수 있다.

[1326] 상기 가이드핵산은 표적 서열의 개수와 위치에 따라 다양하게 설계할 수 있다.

[1327] 본 발명이 일 구현예로, 가이드핵산은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4, 표 5에 기재된 서열

중 하나 이상의 표적 서열에 상보성 핵산서열일 수 있다.

[1328] 임의의 구체예에서, 각 유전자의 인위적인 조작을 위해 상기 서열번호 1 내지 79번의 타겟서열에 상응하는 가이드 핵산 서열이 제공된다.

[1329] 임의의 구체예에서, 각 유전자의 인위적인 조작을 위해 상기 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 타겟서열에 상응하는 가이드 핵산 서열과 상호작용하는, 예를 들어 복합체를 형성하는 에디터 단백질이 제공된다.

[1330] 임의의 구체예에서, 상기 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 타겟서열 부위에서 인위적인 조작이 일어난 각 유전자의 핵산 변형 산물 및 이의 발현 산물이 제공된다.

[1331]

[1332] **7. 전달**

[1333] 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 다양한 전달 방법과 다양한 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1334] 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1335] 상기 에디터단백질은 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA, DNA/RNA 혼합, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1336] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 각 구성성분, 즉, 가이드핵산 및 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1337] 상기 가이드핵산-에디터단백질 복합체는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태를 가지는 가이드핵산과 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태를 가지는 에디터단백질의 복합체로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1338] 또한, 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 효율을 증가 또는 저해할 수 있는 추가 구성물은 다양한 전달 방법과 다양한 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1339] 상기 추가 구성물은 DNA, RNA, DNA/RNA 혼합, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 대상 내에 전달 또는 도입될 수 있다.

[1340]

[1341] **i) DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 전달**

[1342] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1343] 또는, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 벡터, 비벡터 또는 이들의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1344] 상기 벡터는 바이러스 또는 비바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드)일 수 있다.

[1345] 상기 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체 또는 mRNA일 수 있다.

[1346]

[1347] *벡터 기반 도입*

[1348] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 벡터에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1349] 벡터는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1350] 예를 들어, 상기 벡터는 가이드핵산과 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 동시에 포함할 수 있다.

[1351] 예를 들어, 상기 벡터는 가이드핵산 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1352] 일 예로, 상기 가이드핵산이 포함하는 도메인은 하나의 벡터에 모두 포함되거나 또는 각각의 도메인을 나누어 각각의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1353] 예를 들어, 상기 벡터는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1354] 일 예로, 상기 에디터단백질의 경우, 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 하나의 벡터에 포함하거나 또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 분할하여 여러 개의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1355] 상기 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다.

[1356] 이때, 상기 조절/제어 구성요소는 포로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 스플라이스 억셉터 및/또는 2A 서열을 포함할 수 있다.

[1357] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 II에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1358] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 III에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1359] 상기 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다.

[1360] 상기 프로모터는 대상 특이적 프로모터일 수 있다.

[1361] 상기 프로모터는 바이러스 또는 비바이러스 프로모터일 수 있다.

[1362] 상기 프로모터는 제어 영역(즉, 가이드핵산 또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열)에 따라 적합한 프로모터를 이용할 수 있다.

[1363] 예를 들어, 가이드핵산을 위해 유용한 프로모터는 H1, EF-1a, tRNA 또는 U6 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 에디터단백질을 위해 유용한 프로모터는 CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK 또는 CAG 프로모터일 수 있다.

[1364]

[1365] 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1366] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다.

[1367] 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA) 바이러스 일 수 있다.

[1368] 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.

[1369] 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스,

아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1370] 일반적으로 바이러스는 숙주(예를 들면, 세포)를 감염시켜, 숙주 내에 바이러스의 유전정보를 암호화하는 핵산을 도입시키거나 숙주의 게놈 내로 유전정보를 암호화하는 핵산을 삽입시킬 수 있다. 이러한 특징을 가지는 바이러스를 이용하여 대상 내로 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 도입시킬 수 있다. 바이러스를 이용하여 도입된 가이드핵산 및/또는 에디터단백질은 대상(예를 들면, 세포)에서 일시적으로 발현될 수 있다. 또는 바이러스를 이용하여 도입된 가이드핵산 및/또는 에디터단백질은 대상(예를 들면, 세포)에서 장기간(예를 들면, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년 또는 영구적) 지속적으로 발현될 수 있다.

[1371] 바이러스의 패키징 능력은 적어도 2kb 내지 50kb로 바이러스 종류에 따라 다를 수 있다. 이러한 패키징 능력에 따라 가이드핵산 또는 에디터단백질을 단독으로 포함하는 바이러스 벡터를 설계하거나 가이드핵산 및 에디터단백질을 모두 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다. 또는 가이드핵산, 에디터단백질 및 추가 구성요소를 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다.

[1372] 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 렌티바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1373] 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 아데노바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1374] 또 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 재조합 AAV에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1375] 다른 일 예로, 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 혼성 바이러스, 예를 들어 본 명세서에 기재한 바이러스 중 하나 이상의 혼성체에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1376]

[1377] *비벡터 기반 도입*

[1378] 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 비벡터로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1379] 비벡터는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1380] 상기 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA 또는 이의 혼합일 수 있다.

[1381] 상기 비벡터는 전기천공법, 유전자총, 초음파천공법, 자기주입법(magnetofection), 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 덴드리머, 나노입자, 인산칼슘, 실리카, 실리케이트(오르모실) 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1382] 일 예로, 전기천공법을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳 내에서 세포와

가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 혼합하고, 정해진 지속시간 및 진폭의 전기적 자극을 적용에 의해 수행될 수 있다.

[1383] 다른 일 예로, 나노입자를 이용하여 비벡터를 전달할 수 있다. 상기 나노입자는 무기 나노입자(예를 들면, 자기 나노입자, 실리카 등) 또는 유기 나노입자(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 코팅된 지질 등)일 수 있다. 상기 나노입자의 외면은 부착을 가능하게 하는 양 전하로 하전된 중합체(예를 들면, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리세린 등)와 컨쥬케이팅될 수 있다.

[1384] 임의의 구체예로, 지질 외피를 이용하여 전달할 수 있다.

[1385] 임의의 구체예로, 엑소좀을 이용하여 전달할 수 있다. 엑소좀은 뇌 및 다른 표적 기관에 RNA를 전달할 수 있는, 단백질 및 RNA를 수송하는 내인성 나노-소낭이다.

[1386] 임의의 구체예로, 리포좀을 이용하여 전달할 수 있다. 리포좀은 내부 수성 구획을 둘러싸는 단일 또는 다중 라멜라 지질 이중층 및 상대적으로 불투과성인 외측 친지성 인지질 이중층으로 구성된 구체 소낭 구조이다. 리포좀은 몇몇 상이한 유형의 지질로부터 만들어질 수 있지만; 약물 담체로서 리포좀을 생성하는데 인지질이 가장 통상적으로 사용된다.

[1387] 기타 몇몇 다른 첨가제를 포함할 수 있다.

[1388]

[1389] **ii)** 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 전달

[1390] 에디터단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태는 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1391] 상기 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태는 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1392] 상기 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 전달은 가이드핵산을 암호화하는 핵산서열과 함께 전달될 수 있다.

[1393] 일 예로, 전기천공법을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳 내에서 가이드핵산와 함께 또는 가이드핵산 없이 에디터단백질을 도입시킬 세포와 혼합하고, 정해진 지속시간 및 진폭의 전기적 자극을 적용에 의해 수행될 수 있다.

[1394]

[1395] **iii) 핵산-단백질 혼합의 형태로 전달**

[1396] 가이드핵산 및 에디터단백질은 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1397] 예를 들어, 상기 가이드핵산은 DNA, RNA 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 상기 에디터단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태일 수 있다.

[1398] 일 예로, 가이드핵산 및 에디터단백질은 RNA 형태의 가이드핵산과 단백질

형태의 에디터단백질이 가이드핵산-에디터단백질 복합체, 즉 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1399]

[1400] 본 발명에서 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 대상으로 전달하는 방법의 일 구체예로서, gRNA, CRISPR 효소 또는 gRNA-CRISPR 효소 복합체의 전달에 대해 하단에 기재하였다.

[1401] 본 발명의 일 구현예로서, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 벡터에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1402] 벡터는 gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1403] 예를 들어, 상기 벡터는 gRNA 및 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 동시에 포함할 수 있다.

[1404] 예를 들어, 상기 벡터는 gRNA 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1405] 일 예로, 상기 gRNA가 포함하는 도메인은 하나의 벡터에 모두 포함되거나 또는 각각의 도메인을 나누어 각각의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1406] 예를 들어, 상기 벡터는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[1407] 일 예로, 상기 CRISPR 효소의 경우, CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 하나의 벡터에 포함하거나 또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열을 분할하여 여러 개의 벡터에 포함시킬 수 있다.

[1408] 상기 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있다.

[1409] 이때, 상기 조절/제어 구성요소는 포로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus) 서열, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 스플라이스 억셉터 및/또는 2A 서열을 포함할 수 있다.

[1410] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 II에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1411] 상기 프로모터는 RNA 중합효소 III에 의해 인식되는 프로모터일 수 있다.

[1412] 상기 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다.

[1413] 상기 프로모터는 대상 특이적 프로모터일 수 있다.

[1414] 상기 프로모터는 바이러스 또는 비바이러스 프로모터일 수 있다.

[1415] 상기 프로모터는 제어 영역(즉, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열)에 따라 적합한 프로모터를 이용할 수 있다.

[1416] 예를 들어, gRNA를 위해 유용한 프로모터는 H1, EF-1a, tRNA 또는 U6 프로모터일 수 있다. 예를 들어, CRISPR 효소를 위해 유용한 프로모터는 CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK 또는 CAG 프로모터일 수 있다.

[1417] 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1418] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다.

[1419] 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA) 바이러스 일 수 있다.

[1420] 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.

[1421] 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[1422] 일반적으로 바이러스는 숙주(예를 들면, 세포)를 감염시켜, 숙주 내에 바이러스의 유전정보를 암호화하는 핵산을 도입시키거나 숙주의 게놈 내로 유전정보를 암호화하는 핵산을 삽입시킬 수 있다. 이러한 특징을 가지는 바이러스를 이용하여 대상 내로 gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 도입시킬 수 있다. 바이러스를 이용하여 도입된 gRNA 및/또는 CRISPR 효소는 대상(예를 들면, 세포)에서 일시적으로 발현될 수 있다. 또는 바이러스를 이용하여 도입된 gRNA 및/또는 CRISPR 효소는 대상(예를 들면, 세포)에서 장기간(예를 들면, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년 또는 영구적) 지속적으로 발현될 수 있다.

[1423] 바이러스의 패키징 능력은 적어도 2kb 내지 50kb로 바이러스 종류에 따라 다를 수 있다. 이러한 패키징 능력에 따라 gRNA 또는 CRISPR 효소를 단독으로 포함하는 바이러스 벡터를 설계하거나 gRNA 및 CRISPR 효소를 모두 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다. 또는 gRNA, CRISPR 효소 및 추가 구성요소를 포함하는 바이러스 벡터를 설계할 수 있다.

[1424] 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 렌티바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1425] 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 아데노바이러스에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1426] 또 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 재조합 AAV에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1427] 다른 일 예로, gRNA 및/또는 CRISPR 효소를 암호화하는 핵산서열은 혼성 바이러스, 예를 들어 본 명세서에 기재한 바이러스 중 하나 이상의 혼성체에 의해 전달 또는 도입될 수 있다.

[1428]

[1429] 본 발명의 일 구현예로서, gRNA-CRISPR 효소 복합체의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1430] 예를 들어, 상기 gRNA는 DNA, RNA 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 상기 CRISPR 효소는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태일 수 있다.

[1431] 일 예로, gRNA 및 CRISPR 효소는 RNA 형태의 gRNA와 단백질 형태의 CRISPR gRNA-CRISPR 효소 복합체, 즉 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1432] 상기 CRISPR gRNA-CRISPR 효소 복합체는 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.

[1433]

[1434] **8. 형질전환체**

[1435] "형질전환체"는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입된 유기체, 또는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 발현되는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료를 의미한다.

[1436] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1437] 예를 들어, 상기 형질전환체는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열 포함하는 벡터가 도입된 유기체일 수 있다. 이때, 벡터는 비바이러스 벡터, 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다.

[1438] 다른 예로, 상기 형질전환체는 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열을 포함하는 비벡터 형태로 도입된 유기체일 수 있다. 이때, 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체, mRNA 또는 이의 혼합일 수 있다.

[1439] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1440] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 DNA, RNA, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질 또는 이의 혼합의 형태로 도입된 유기체일 수 있다.

[1441] 예를 들어, 상기 형질전환체는 RNA 형태의 가이드핵산과 단백질 형태의 에디터단백질이 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 이루어 도입된 유기체일 수 있다.

[1442] 상기 형질전환체는 가이드핵산-에디터단백질 복합체의 표적 핵산, 유전자, 염색체 또는 단백질을 포함하는 유기체일 수 있다.

[1443] 상기 유기체는 세포, 조직, 식물, 동물 또는 인간일 수 있다.

[1444] 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포일 수 있다.

[1445] 상기 진핵세포는 식물세포, 동물세포, 인간세포일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[1446] 상기 조직은 피부, 간, 신장, 심장, 폐, 뇌, 근육 등의 동물 또는 인간의 신체 조직일 수 있다.

[1447] 상기 형질전환체는 가이드핵산, 에디터단백질 또는 가이드핵산-에디터단백질 복합체가 도입되거나 발현되는 유기체 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료일 수 있다.

[1448] 상기 검체 또는 시료는 침, 혈액, 피부조직, 암세포 또는 줄기세포 일 수 있다.

[1449]

[1450] [<u>용도</u>]

[1451] 본 발명의 일 구체예는 대상에 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작하기

위한 조성물 또는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자의 투여를 포함하는 방법을 이용하는 신생혈관형성 관련 질환 치료 용도이다.

[1452] 치료 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[1453]

[1454] *치료 대상 질환*

[1455] 구현예에서, 치료 대상 질환은 신생혈관형성 관련 질환일 수 있다.

[1456] "신생혈관형성 관련 질환"은 과도한 및/또는 비정상적인 신생혈관형성을 포함하는 모든 상태를 의미한다. 종양발생 또는 신생물 형질전환, 즉 암을 수반하는 것 이외의 변화되거나 조절되지 않는 혈관형성을 특징으로 하는 장애를 의미한다. 신생혈관형성 관련 질환은 안구 신생혈관형성 질환을 포함한다.

[1457] 신생혈관형성 질환으로는, 신생혈관형성 의존성 암, 예를 들면, 고형 종양, 백혈병과 같은 혈액성 종양 및 종양 전이; 양성 종양, 예를 들면, 혈관종(hemangiomas), 청신경종(acoustic neuromas), 신경섬유종, 트라코마스(trachomas) 및 화종성 육아종; 류마티스 관절염; 건선; 안구 신생혈관형성 질환, 예를 들면, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity), 건식 노인성 황반 변성 및 습식 노인성 황반 변성을 포함한 황반 변성, 각막 이식 거부 반응, 신혈관 녹내장(neovascular glaucoma), 후수정체 섬유증식증(retrolental fibroplasia), 피부 조홍(rubeosis); 오슬러-베버 증후군(Osler-Webber Syndrome); 심근 신생혈관형성 실명(myocardial angiogenesis blindness); 경화반내 신생혈관증식(plaque neovascularization); 말초혈관 확장증(telangiectasia); 혈우병성 관절증(hemophiliac joint); 맥관섬유종; 및 상처 과립화(wound granulation)를 포함하나, 이로 제한되지 않는다.

[1458] 임의의 구체예로, 신생혈관형성 관련 질환은 류마티스 관절염, 건선, 오슬러-베버 증후군(Osler-Webber Syndrome), 심근 신생혈관형성 실명(myocardial angiogenesis blindness), 경화반내 신생혈관증식(plaque neovascularization), 말초혈관 확장증(telangiectasia), 혈우병성 관절증(hemophiliac joint), 맥관섬유종, 및 상처 과립화(wound granulation)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있다.

[1459]

[1460] 구현예에서, 신생혈관형성 관련 질환은 과도한 및/또는 비정상적인 신생혈관형성을 포함하는 질환일 수 있다.

[1461] 구체예로, 신생혈관형성 관련 질환은 신생혈관형성 의존성 암일 수 있다.

[1462] 이때, 신생혈관형성 의존성 암은 고형 종양, 백혈병과 같은 혈액성 종양 및 종양 전이 등을 포함한다.

[1463] 신생혈관형성 의존성 암, 예를 들면, 고형 종양, 백혈병과 같은 혈액성 종양 및 종양 전이; 양성 종양, 예를 들면, 혈관종(hemangiomas), 청신경종(acoustic

neuromas), 신경섬유종, 트라코마스(trachomas) 및 화종성 육아종일 수 있다.

[1464]

[1465] 임의의 구체예로, 신생혈관형성 관련 질환은 양성 종양일 수 있다.

[1466] 양성 종양은 혈관종(hemangiomas), 청신경종(acoustic neuromas), 신경섬유종, 트라코마스(trachomas) 및 화종성 육아종 등을 포함한다.

[1467]

[1468] 임의의 구체예로, 신생혈관형성 관련 질환은 안구 신생혈관형성 질환일 수 있다.

[1469] "안구 신생혈관형성 질환"은 과도한 및/또는 비정상적인 신생혈관 형성을 포함하는 모든 안구질환을 의미한다. 눈에서 변화되거나 조절되지 않는 혈관형성을 특징으로 하는 장애를 포함한다.

[1470] 구체예로서 안구 신생혈관형성 질환은 다음을 포함할 수 있다:

[1471] 허혈성 망막병증, 시신경유두 혈관신생, 홍채 혈관신생, 망막 혈관신생, 맥락막 혈관신생, 각막 혈관신생, 유리체 혈관신생, 녹내장, 판누스, 익상편, 황반 부종, 당뇨병성 망막병증, 증식성 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 혈관 망막병증, 망막 변성, 포도막염, 망막의 염증성 질환, 및 증식성 유리체망막병증을 들 수 있다.

[1472] 일 실시예에서, 안구 신생혈관형성 질환은 당뇨병성 망막증 또는 황반 변성일 수 있다.

[1473] - 당뇨병성 망막증

[1474] 당뇨병성 망막증은 1형 또는 2형 당뇨병 중 어느 하나로 진단받은 환자의 약 40 내지 45%에서 발생하는 당뇨병 합병증이다.

[1475] 당뇨병성 망막증은 통상적으로 양쪽 눈에 영향을 주며, 일반적으로 4 단계로 진행된다. 제 1 단계인 경증 비증식성 망막증(mild nonproliferative retinopathy)은 눈의 미세동맥류가 특징이다. 망막의 모세관과 소혈관에서 소규모의 부종(swelling)이 이루어진다. 제 2 단계인 중간 수준의 비증식성 망막증에서는, 망막에 제공되는 혈관이 차단되기 시작한다. 중증 비증식성 망막증인 제 3 단계에서는, 혈관 폐색이 망막으로의 혈액 공급 감소로 이어져, 망막은 망막에 혈액 공급을 제공하기 위해 눈에 새로운 혈관을 만드는(신생혈관형성) 신호를 보내게 된다. 제 4 단계이고 가장 진전된 단계인 증식성 망막증에서는, 혈관 신생이 이루어지지만 신생 혈관은 비정상적이고, 허약하며, 망막과 눈에 채워진 유리질 젤 표면을 따라 생장한다.

[1476] 당뇨병성 망막증은 인슐린 의존성 당뇨병, 인슐린 비의존성 당뇨병, 망막박리, 당뇨망막병증, 초자체 출혈을 포함한다.

[1477] - 황반 변성(Macular Degeneration)

[1478] 황반 변성은 눈의 황반에 변성이 일어나 시력장애를 일으키는 질환으로, 노인성 황반 변성(Age-related Macular Degeneration, AMD)이라고도 불린다.

[1479] AMD는 초기, 중간, 및 진행된 AMD를 포함하며, 건성 AMD, 예를 들어,

지도모양 위축, 및 신생혈관 또는 삼출 AMD로도 공지된 습성 AMD 모두를 포함한다.

[1480] 건성 황반 변성은 망막에 드루젠(노폐물들이 황반부에 축적되는 상태)이나 망막색소상피의 위축과 같은 병변이 생기는 경우, AMD의 약 90%를 차지하는 흔한 형태이다. 습성 황반 변성은 망막 아래에 맥락막 신생혈관이 생성되는 특징을 가진다.

[1481] 면역조절성 보체 인자 H(CFH) 유전자 내에 존재하는 미스센스 돌연변이에 의한 황반변성을 포함한다.

[1482]

[1483] 다른 구현예에서, 본 발명은 인위적으로 기능을 변형시킨 특정 인자(예를 들어, 신생혈관형성 관련 인자로 알려져 있는 유전자 등)의 다양한 기능에 수반되는, 부가적인 제3의 체내 메커니즘의 조절 시스템의 용도를 제공할 수 있다.

[1484] 예를 들어, 인위적으로 기능을 변형시킨 특정 인자는 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자 중 1이상의 유전자일 수 있다.

[1485] 제3의 메커니즘은 상기 유전자들이 관여하는, 신생혈관형성 외의 체내 메커니즘일 수 있다.

[1486]

[1487] *약학적 조성물*

[1488] 본 발명의 일 구체예는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자를 이용하여 질환 치료에 이용하고자 하는 조성물이다.

[1489] 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자 또는 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조작 조성물을 함유하는 조성물일 수 있다. 치료용 조성물 또는 약학적 조성물로 칭할 수 있다.

[1490] 구현예에서, 조성물은 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자, 즉, 유전자 및/또는 단백질을 포함할 수 있다.

[1491] 구현예에서, 조성물은 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 수 있는 조작 조성물을 포함할 수 있다.

[1492] 상기 조작 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[1493] 상기 조작 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 포함할 수 있다.

[1494] 상기 조작 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

[1495] 상기 조작 조성물은 가이드핵산 및/또는 에디터단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스를 포함할 수 있다.

[1496] 다른 구현예에서, 상기 조성물은 부가적 요소를 추가로 더 포함할 수 있다.

[1497] 상기 부가적 요소는 대상의 체내에 전달하기 위한 적절한 담체를 포함할 수 있다.

[1498] 구현예에서, 조성물은 혈관신생성 장애을 억제하는데 충분한 양으로 조작된

신생혈관형성 관련 인자의 발현산물을 포함할 수 있다.

[1499] "혈관신생성 장애을 억제하는데 충분한 양"은 혈관신생성 장애 또는 그의 증상을 치료하거나 또는 예방하는데 필요한 유효량을 의미한다.

[1500]

[1501] 일 구체예로서, 다음의 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[1502] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1503] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1504] 을 포함하는 혈관신생성 장애 치료용 조성물;

[1505]

[1506] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1507] 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1508] 을 포함하는 혈관신생성 장애 치료용 조성물;

[1509]

[1510] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질로 형성된 복합체

[1511] 를 포함하는 혈관신생성 장애 치료용 조성물.

[1512]

[1513] 이 때, 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및 에디터단백질을 암호화하는 핵산서열은 1이상의 벡터의 형태로 존재할 수 있다. 동종 또는 이종의 벡터의 형태로 존재할 수 있다.

[1514]

[1515] *치료 방법*

[1516] 본 발명의 다른 구현예는, 상기 설명한 조성물의 생산 및 유효량의 상기 조성물을 이를 필요로 하는 환자에 투여를 포함하는 환자에서 질환의 치료 방법이다.

[1517]

[1518] *유전자 조작 치료*

[1519] 생체의 유전자를 조작하여 신생혈관형성을 조절하는 치료방법을 이용할 수 있다. 이러한 치료방법은 생체의 유전자를 조작하기 위한 유전자 조작용

조성물을 체내에 직접 주입하여 이루어질 수 있다.

[1520] 유전자 조작용 조성물은 가이드핵산-에디터단백질 복합체를 포함할 수 있다.

[1521] 유전자 조작용 조성물은 특정 신체 위치에 주입될 수 있다.

[1522] 이때, 특정 신체 위치는 신생혈관형성이 과도한 및/또는 비정상적인 조직 또는 이와 근접한 위치일 수 있다. 예를 들어, 안구일 수 있다.

[1523]

[1524] 조성물의 투여 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[1525] 조성물의 투여는 주사(injection), 수혈(transfusion), 삽입(implantation) 또는 이식(transplantation)과 같은, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 투여 경로는 피하(subcutaneously), 피내(intradermaliy), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitreally) 종양내(intratumorally), 절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous), 림프액내(intralymphatic), 복막내(intraperitoneally) 등에서 선택될 수 있다.

[1526] 조성물의 1회 투여량(소정의 소망하는 효과를 얻기 위한 약학적 유효량)은 투여 대상의 체중 kg 당 104-109 세포, 예컨대, 105 내지 106 세포/kg(체중) 정도로 상기 수치 범위들 내의 모든 정수값들 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 투여 대상의 연령, 건강 및 체중, 동시에 받는 치료의 종류, 만약 있다면 치료의 빈도, 원하는 효과의 특성 등을 고려하여 적절히 처방될 수 있다.

[1527]

[1528] 일 양태에서, 본 발명은 진핵 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하는 방법을 제공하며, 이것은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 이루어질 수 있다.

[1529] 일부 실시형태에서, 방법은 인간 또는 비인간 동물로부터 세포 또는 세포 집단을 시료추출하는 단계, 및 세포 또는 세포들을 변형하는 단계를 포함한다. 배양은 생체외에서 임의의 단계에서 일어날 수 있다. 세포 또는 세포들은 심지어 비인간 동물 또는 식물에 재도입될 수 있다. 재도입된 세포의 경우, 세포가 줄기 세포인 것이 특히 바람직하다.

[1530]

[1531] 또한, 다른 구현예에서, 본 발명은 세포에

[1532] (a) VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 1522번, 예를 들어, 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및

[1533] (b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서

선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열

[1534] 을 도입시키는 단계를 포함하는, 세포를 인위적으로 조작하는 방법을 제공할 수 있다.

[1535] 상기 가이드 핵산 및 에디터 단백질은, 각각 핵산 서열의 형태로 1 이상의 벡터에 존재하거나, 또는 가이드 핵산과 에디터 단백질의 결합으로 복합체를 형성하여 존재할 수 있다.

[1536] 상기 도입 단계는 생체 내 또는 생체 외에서 수행될 수 있다.

[1537] 상기 도입 단계는 앞서 설명한 "7. 전달" 부분의 기술을 참조할 수 있다.

[1538] 예를 들어, 도입 단계는 전기천공법 (electroporation), 리포좀, 플라스미드, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles) 및 PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 중 선택되는 1이상의 방법으로 수행될 수 있다.

[1539] 예를 들어, 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1이상일 수 있다.

[1540]

[1541] 본 발명 몇몇 구현예들의 방법, 조성물에 의해 신생혈관형성 관련 인자를 인위적으로 조작할 경우, 신생혈관형성의 저해, 억제, 촉진 및/또는 증가 등의 신생혈관형성의 조절이 가능하게 되고, 이를 통해 과도한 및/또는 비정상적인 신생혈관형성을 억제시키거나 개선시키는 등의 효과를 얻을 수 있다.

[1542]

[1543] *부가적 용도*

[1544] 임의의 구체예에서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 나이관련 황반변성 또는 당뇨망막병증 치료용 조성물의 제조를 위한 키트를 제공할 수 있다.

[1545] 상기 키트는 당업계에 알려져 있는 통상의 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[1546] 상기 키트는 검출가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 용어 "검출가능한 표지"는 표지가 없는 동일한 종류의 분자들 중에서 표지를 포함하는 분자를 특이적으로 검출하도록 하는 원자 또는 분자를 의미한다. 상기 검출가능한 표지는 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자, 또는 압타머에 부착된 것일 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 방사종(radionuclide), 형광원(fluorophore), 효소(enzyme)를 포함할 수 있다.

[1547]

[1548] 임의의 구체예에서, 본 발명은 인위적으로 조작한 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자 중 1이상의 유전자의 발현 수준을 조절할 수 있는 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[1549]

[1550] 임의의 구체예에서, 본 발명은 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의

유전자를 서열분석함으로써 대상체에서 인위적으로 조작 가능한 표적 위치의 서열에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[1551] 또한, 이러한 방법으로 제공받은 정보를 이용하여 라이브러리를 구축하는 방법을 제공한다.

[1552] 이 때, 공지의 데이터 베이스를 이용할 수 있다.

[1553]

[1554] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법을 이용하여 연구 용도에 이용할 수 있는 동물 또는 세포를 제공할 수 있다.

[1555] 본 발명의 방법을 이용하여 질병과 연관된 하나 이상의 핵산 서열중 염색체 편집을 포함하는 동물 또는 세포를 제작할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 질병 관련된 단백질 서열을 인코드할 수 있거나 또는 질병 관련된 기준 서열일 수 있다.

[1556] 한 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제작된 동물 또는 세포를 이용하여 질병 연구에 통상적으로 이용되는 측정을 이용하여 동물 또는 세포에서 돌연변이의 효과 및 질병의 발생 및/또는 진행을 연구할 수 있다. 대안으로, 이러한 동물 또는 세포을 이용하여 질병에서 활성 화합물의 약제학적 효과를 연구할 수 있다.

[1557] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제작된 동물 또는 세포를 이용하여 가능한 유전자 치료 전략의 효과를 평가할 수 있다. 즉, 질병과 관련된 단백질을 인코드하는 염색체 서열을 변형시켜, 해당 질병 발달 및/또는 진행을 억제하거나 감소시킬 수 있다. 특히, 이 방법은 질병과 관련된 단백질을 인코드하는 염색체 서열을 편집하여, 변경된 단백질이 만들어지는 것을 포함하고, 그 결과 동물 또는 세포는 변경된 반응을 한다. 따라서, 일부 구체예들에서, 유전학적으로 변형된 동물은 해당 질병의 발달에 취약한 동물과 비교하여, 유전자 치료 과정의 효과를 평가할 수 있다.

[1558] 이러한 용도는 질병 모델, 약리학 모델, 발생 모델, 세포 기능 모델, 및 인간화된 모델을 포함할 수 있다. 예를 들어, 신생혈관형성 관련의 질병 모델, 약리학 모델, 발생 모델, 세포 기능 모델, 및 인간화된 모델을 포함할 수 있다.

[1559]

[1560] 인위적으로 조작한 신생혈관형성 관련 인자 및 이에 의해 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 시스템에 의해서, 효과적인 신생혈관 관련 질환, 예를 들어 신생혈관 관련 안구질환의 치료적 용도를 이용할 수 있다. 다양한 신생혈관형성 관련 인자들이 관여하는 다양한 체내 메커니즘을 조절을 통해 신생혈관형성 시스템의 효능을 개선시킬 수 있다.

[1561]

발명의 실시를 위한 형태

[1562] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[1563] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본

발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 자명할 것이다.

[1564]

[1565] **실험방법**

[1566] **1.** sgRNA 설계

[1567] CRISPR RGEN Tools (Institute for Basic Science, Korea)을 사용하여 인간의 VEGFA 유전자(NCBI Accession No. NM_001025366.2), HIF1A 유전자(NCBI Accession No. NM_001243084.1), ANGPT2 유전자(NCBI Accession No. NM_001118887.1), EPAS1 유전자(NCBI Accession No. NM_001430.4) 및 ANGPTL4 유전자(NCBI Accession No. NM_001039667.2)의 CRISPR/Cas9 표적 부위 선별하였다. 각각의 유전자의 표적 부위는 CRISPR 효소의 종류에 따라 달라질 수 있으며, CjCas9를 위한 각각 유전자의 표적 서열은 앞서 기재한 표 1 - 5 및 표 6 - 9에 정리하였고, SpCas9을 위한 각각 유전자의 표적 서열은 표 10 - 14에 정리하였다.

[1568]

[1569] [표 6]

[1570] VEGFA 유전자의 표적 서열(Target sequences of VEGFA gene)

[1571]

Gene	No.	Target sequence
VEGFA	1	AAATCCCGGTATAAGTCCTGGA (서열번호 80)
VEGFA	2	GCACCAACGTACACGCTCCAGG (서열번호 81)
VEGFA	3	CATTAGACAGCAGCGGGCACCA (서열번호 82)
VEGFA	4	GGCATTAGACAGCAGCGGGCAC (서열번호 83)
VEGFA	5	GGCTCCAGGGCATTAGACAGCA (서열번호 84)
VEGFA	6	GCTCAGAGCGGAGAAAGCATTT (서열번호 85)
VEGFA	7	GGAACATTTACACGTCTGCGGA (서열번호 86)
VEGFA	8	GCAGACGTGTAAATGTTCCTGC (서열번호 87)
VEGFA	9	GAGTCTGTGTTTTTGCAGGAAC (서열번호 88)
VEGFA	10	GGCGAGGCAGCTTGAGTTAAAC (서열번호 89)

[1572]

[1573] [표 7]

[1574] HIF1A 유전자의 표적 서열(Target sequences of HIF1A gene)

[1575]

Gene	No.	Target sequence
HIF1A	1	ACTAAAGGACAAGTCACCACAG (서열번호 90)
HIF1A	2	TATCCACCTCTTTTGGCAAGCA (서열번호 91)
HIF1A	3	TGAAACTCAAGCAACTGTCATA (서열번호 92)
HIF1A	4	CTCACAACGTAATTCACACATA (서열번호 93)
HIF1A	5	TACTTACCTCACAACGTAATTC (서열번호 94)
HIF1A	6	AACTTACTTACCTCACAACGTA (서열번호 95)
HIF1A	7	TCTTGTTTTGACAGTGGTATTA (서열번호 96)
HIF1A	8	GGGAGAAAATCAAGTCGTGCTG (서열번호 97)
HIF1A	9	TATCTGAAGATTCAACCGGTTT (서열번호 98)
HIF1A	10	GCTATTCACCAAAGTTGAATCA (서열번호 99)
HIF1A	11	AACTTTGCTGGCCCCAGCCGCT (서열번호 100)
HIF1A	12	AAACTGATGACCAGCAACTTGA (서열번호 101)
HIF1A	13	GGGGAGCATTACATCATTATAT (서열번호 102)
HIF1A	14	AGCCACTTCGAAGTAGTGCTGA (서열번호 103)
HIF1A	15	CAACTTCTTGATTGAGTGCAGG (서열번호 104)
HIF1A	16	TTACCATGCCCCAGATTCAGGA (서열번호 105)
HIF1A	17	TCAGACACCTAGTCCTTCCGAT (서열번호 106)
HIF1A	18	ATTGGTAGAAAAACTTTTTGCT (서열번호 107)
HIF1A	19	AACTCATGTATTTGCTGTTTTA (서열번호 108)
HIF1A	20	AAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCT (서열번호 109)
HIF1A	21	CAGTTACAGTATTCCAGCAGAC (서열번호 110)
HIF1A	22	AGGTTCTTGTATTTGAGTCTGC (서열번호 111)
HIF1A	23	ATGCAATCAATATTTTAATGTC (서열번호 112)
HIF1A	24	TGATTGCATCTCCATCTCCTAC (서열번호 113)
HIF1A	25	TAGTGCCACATCATCACCATAT (서열번호 114)
HIF1A	26	GAGTATCTCTATATGGTGATGA (서열번호 115)
HIF1A	27	ATACCTTTGACTCAAAGCGACA (서열번호 116)
HIF1A	28	TTCCTGAGGAAGAACTAAATCC (서열번호 117)
HIF1A	29	TCTGTTCACTAGATTTGCATCC (서열번호 118)
HIF1A	30	GAATGGAGCAAAAGACAATTAT (서열번호 119)
HIF1A	31	GTTATGATTGTGAAGTTAATGC (서열번호 120)

[1576]

[1577] [표 8]

[1578] EPAS1 유전자의 표적 서열(Target sequences of EPAS1 gene)

[1579]

Gene	No.	Target sequence
EPAS1	1	AACACCTCCGTCTCCTTGCTCC (서열번호 121)
EPAS1	2	TGGAGGCCTTGTCCAGATGGGA (서열번호 122)
EPAS1	3	TGCGACTGGCAATCAGCTTCCT (서열번호 123)
EPAS1	4	CGACTGGCAATCAGCTTCCTGC (서열번호 124)
EPAS1	5	GAAGCTGACCAGCAGATGGACA (서열번호 125)
EPAS1	6	GCAATGAAACCCTCCAAGGCTT (서열번호 126)
EPAS1	7	AAAACATCAGCAAGTTCATGGG (서열번호 127)
EPAS1	8	GCAAGTTCATGGGACTTACACA (서열번호 128)
EPAS1	9	GGTCGCAGGGATGAGTGAAGTC (서열번호 129)
EPAS1	10	GCGGGACTTCTTCATGAGGATG (서열번호 130)
EPAS1	11	GAAGTGCACGGTCACCAACAGA (서열번호 131)
EPAS1	12	ACAGTACGGCCTCTGTTGGTGA (서열번호 132)
EPAS1	13	TCCAGGTGGCTGACTTGAGGTT (서열번호 133)
EPAS1	14	TCCACGCCTGTCTCAGGTCTTG (서열번호 134)
EPAS1	15	CAGGACAGCAGGGGCTCCTTGT (서열번호 135)
EPAS1	16	CTCATCATCATGTGTGAACCAA (서열번호 136)
EPAS1	17	ATGTGGGATGGGTGCTGGATTG (서열번호 137)
EPAS1	18	GCCACTTACTACCTGACCCTTG (서열번호 138)
EPAS1	19	TGGCCACTTACTACCTGACCCT (서열번호 139)
EPAS1	20	ACCAAGGGTCAGGTAGTAAGTG (서열번호 140)
EPAS1	21	TAGCCCCCATGCTTTGCGAGCA (서열번호 141)
EPAS1	22	GATGACCGTCCCCTGGGTCTCC (서열번호 142)
EPAS1	23	CTCAGGACGTAGTTGACACACA (서열번호 143)
EPAS1	24	CATGCTTACCTCAGGACGTAGT (서열번호 144)
EPAS1	25	CACATGCTTACCTCAGGACGTA (서열번호 145)
EPAS1	26	CAGGGATTCAGTCTGGTCCATG (서열번호 146)
EPAS1	27	GGTGAATAGGAAGTTACTCTTC (서열번호 147)
EPAS1	28	ATGGGCCACGGAGTTGAGGAGC (서열번호 148)
EPAS1	29	CTAGCCCAATAGCCCTGAAGAC (서열번호 149)
EPAS1	30	AGTGATTGAGAAGCTCTTCGCC (서열번호 150)
EPAS1	31	GGACACAGAGGCCAAGGACCAA (서열번호 151)
EPAS1	32	CCTGATCTCCACAGCCATCTAC (서열번호 152)
EPAS1	33	CGGATTTCAATGAGCTGGACTT (서열번호 153)
EPAS1	34	TCAATGAGCTGGACTTGGAGAC (서열번호 154)

[1580]

EPAS1	35	GCGGAGAACCCACAGTCCACCC (서열번호 155)
EPAS1	36	CCAGTGGCTGGAAGATGTTTGT (서열번호 156)
EPAS1	37	TTCCAGCCACTGGCCCCTGTAG (서열번호 157)
EPAS1	38	CTGGAGAGCAAGAAGACAGAGC (서열번호 158)
EPAS1	39	GAGAGAGGGGTGCTGGCCTGGC (서열번호 159)
EPAS1	40	CCTGCCACCGTGCTGTGGCCAG (서열번호 160)
EPAS1	41	TCTCTCTTCCATGGGGGGCAGA (서열번호 161)
EPAS1	42	CACAAAGTGGGCCGTCGGGGAT (서열번호 162)
EPAS1	43	GGAGAGGGCTACCATGGCCGGA (서열번호 163)
EPAS1	44	CTCAGGTCCTGGAAGGCTTGCT (서열번호 164)
EPAS1	45	CTCCCAGGGGGACCCACCTGGT (서열번호 165)
EPAS1	46	TGCCGGACAAGCCACTGAGCGC (서열번호 166)
EPAS1	47	TTCCCCCCACAGTGCTACGCCA (서열번호 167)
EPAS1	48	CTGTAGTCCTGGTACTGGGTGG (서열번호 168)
EPAS1	49	TGGGCTGACGACAGGCTGTAGT (서열번호 169)
EPAS1	50	TCCTTGCAGGAGCGTGGAGCTT (서열번호 170)

[1581]

[1582] [표 9]

[1583] ANGPT2 유전자의 표적 서열(Target sequences of ANGPT2 gene)

[1584]

Gene	No.	Target sequence
ANGPT2	1	GACTGTGCTGAAGTATTCAAAT (서열번호 171)
ANGPT2	2	CTGTGCTGAAGTATTCAAATCA (서열번호 172)
ANGPT2	3	TGGTGTGTCCTGATTTGAATAC (서열번호 173)
ANGPT2	4	GCCATTCGTGGTGTGTCCTGAT (서열번호 174)
ANGPT2	5	ATCAGGACACACCACGAATGGC (서열번호 175)
ANGPT2	6	CTAATCAGCAACGCTATGTGCT (서열번호 176)
ANGPT2	7	AATCAGCAACGCTATGTGCTTA (서열번호 177)
ANGPT2	8	TTCCCAGTCTTTAAGGTGTATT (서열번호 178)
ANGPT2	9	TCTTCACTTGAGAGATAGAAAT (서열번호 179)
ANGPT2	10	CATCAGCCAACCAGGAAATGAT (서열번호 180)
ANGPT2	11	CTGTTAGCATTTGTGAACATTT (서열번호 181)
ANGPT2	12	TGTGGTCCTTCCAACTTGAACG (서열번호 182)
ANGPT2	13	CGGAATGTACTATCCACAGAGG (서열번호 183)
ANGPT2	14	TTATTTGTGTTCTGCCTCTGTG (서열번호 184)
ANGPT2	15	ACAAATAAGTTCAACGGCATTA (서열번호 185)
ANGPT2	16	AGCGAATAGCCTGAGCCTTTCC (서열번호 186)

[1585]

[1586] [표 10]

[1587] SpCas9을 위한 VEGFA 유전자의 표적 서열(Target sequences of VEGFA gene for SpCas9)

[1588]

Gene	Target sequence
VEGFA-Sp1	CAGCTGACCAGTCGCGCTGA (서열번호 187)
VEGFA-Sp2	GTGGTAGCTGGGGCTGGGGG (서열번호 188)
VEGFA-Sp3	GAGGTGGTAGCTGGGGCTGG (서열번호 189)
VEGFA-Sp4	GGAGGTGGTAGCTGGGGCTG (서열번호 190)
VEGFA-Sp5	AGGAGGTGGTAGCTGGGGCT (서열번호 191)
VEGFA-Sp6	GAGGAGGTGGTAGCTGGGGC (서열번호 192)
VEGFA-Sp7	CGGGGAGGAGGTGGTAGCTG (서열번호 193)
VEGFA-Sp8	CCCAGCTACCACCTCCTCCC (서열번호 194)
VEGFA-Sp9	CCGGGGAGGAGGTGGTAGCT (서열번호 195)
VEGFA-Sp10	GCCGGGGAGGAGGTGGTAGC (서열번호 196)
VEGFA-Sp11	GCTACCACCTCCTCCCCGGC (서열번호 197)
VEGFA-Sp12	ACCACCTCCTCCCCGGCCGG (서열번호 198)
VEGFA-Sp13	GCCGCCGGCCGGGGAGGAGG (서열번호 199)
VEGFA-Sp14	ACCTCCTCCCCGGCCGGCGG (서열번호 200)
VEGFA-Sp15	TCCGCCGCCGGCCGGGGAGG (서열번호 201)
VEGFA-Sp16	CTGTCCGCCGCCGGCCGGGG (서열번호 202)
VEGFA-Sp17	CCCCGGCCGGCGGCGGACAG (서열번호 203)
VEGFA-Sp18	CCACTGTCCGCCGCCGGCCG (서열번호 204)
VEGFA-Sp19	TCCACTGTCCGCCGCCGGCC (서열번호 205)
VEGFA-Sp20	GTCCACTGTCCGCCGCCGGC (서열번호 206)
VEGFA-Sp21	CCGGCGGCGGACAGTGGACG (서열번호 207)
VEGFA-Sp22	CCGCGTCCACTGTCCGCCGC (서열번호 208)
VEGFA-Sp23	GCGGCGGACAGTGGACGCGG (서열번호 209)
VEGFA-Sp24	GTGGACGCGGCGGCGAGCCG (서열번호 210)
VEGFA-Sp25	TGGACGCGGCGGCGAGCCGC (서열번호 211)
VEGFA-Sp26	CGCGGCGGCGAGCCGCGGGC (서열번호 212)
VEGFA-Sp27	GCGGCGGCGAGCCGCGGGCA (서열번호 213)
VEGFA-Sp28	CGGCGGCGAGCCGCGGGCAG (서열번호 214)
VEGFA-Sp29	GGCGAGCCGCGGGCAGGGGC (서열번호 215)
VEGFA-Sp30	CGGGCTCCGGCCCCTGCCCG (서열번호 216)
VEGFA-Sp31	CAGGGGCCGGAGCCCGCGCC (서열번호 217)
VEGFA-Sp32	GGGCCGGAGCCCGCGCCCGG (서열번호 218)
VEGFA-Sp33	CCGGAGCCCGCGCCCGGAGG (서열번호 219)
VEGFA-Sp34	CCGCCTCCGGGCGCGGGCTC (서열번호 220)
VEGFA-Sp35	CGGAGCCCGCGCCCGGAGGC (서열번호 221)

[1589]

VEGFA-Sp36	GGAGCCCGCGCCCGGAGGCG (서열번호 222)
VEGFA-Sp37	GCCCGCGCCCGGAGGCGGGG (서열번호 223)
VEGFA-Sp38	TCCACCCCGCCTCCGGGCGC (서열번호 224)
VEGFA-Sp39	CTCCACCCCGCCTCCGGGCG (서열번호 225)
VEGFA-Sp40	CGCGCCCGGAGGCGGGGTGG (서열번호 226)
VEGFA-Sp41	GCGCCCGGAGGCGGGGTGGA (서열번호 227)
VEGFA-Sp42	CGCCCGGAGGCGGGGTGGAG (서열번호 228)
VEGFA-Sp43	GCCCGGAGGCGGGGTGGAGG (서열번호 229)
VEGFA-Sp44	ACCCCCTCCACCCCGCCTCC (서열번호 230)
VEGFA-Sp45	GACCCCCTCCACCCCGCCTC (서열번호 231)
VEGFA-Sp46	GGAGGCGGGGTGGAGGGGGT (서열번호 232)
VEGFA-Sp47	GAGGCGGGGTGGAGGGGGTC (서열번호 233)
VEGFA-Sp48	AGGCGGGGTGGAGGGGGTCG (서열번호 234)
VEGFA-Sp49	GTGGAGGGGGTCGGGGCTCG (서열번호 235)
VEGFA-Sp50	GAAACTTTTCGTCCAACTTC (서열번호 236)
VEGFA-Sp51	AAACTTTTCGTCCAACTTCT (서열번호 237)
VEGFA-Sp52	AGCGAGAACAGCCCAGAAGT (서열번호 238)
VEGFA-Sp53	CTTCTGGGCTGTTCTCGCTT (서열번호 239)
VEGFA-Sp54	CTGGGCTGTTCTCGCTTCGG (서열번호 240)
VEGFA-Sp55	TTCTCGCTTCGGAGGAGCCG (서열번호 241)
VEGFA-Sp56	CGGAGGAGCCGTGGTCCGCG (서열번호 242)
VEGFA-Sp57	GGAGGAGCCGTGGTCCGCGC (서열번호 243)
VEGFA-Sp58	GAGGAGCCGTGGTCCGCGCG (서열번호 244)
VEGFA-Sp59	AGGAGCCGTGGTCCGCGCGG (서열번호 245)
VEGFA-Sp60	GGCTTCCCCCGCGCGGACCA (서열번호 246)
VEGFA-Sp61	TCGGCTCGGCTTCCCCCGCG (서열번호 247)
VEGFA-Sp62	GCGGGGGAAGCCGAGCCGAG (서열번호 248)
VEGFA-Sp63	TCTCGCGGCTCCGCTCGGCT (서열번호 249)
VEGFA-Sp64	GCACTTCTCGCGGCTCCGCT (서열번호 250)
VEGFA-Sp65	AGCCGCGAGAAGTGCTAGCT (서열번호 251)
VEGFA-Sp66	GCCGCGAGAAGTGCTAGCTC (서열번호 252)
VEGFA-Sp67	GCCCGAGCTAGCACTTCTCG (서열번호 253)
VEGFA-Sp68	CGAGAAGTGCTAGCTCGGGC (서열번호 254)
VEGFA-Sp69	GAGAAGTGCTAGCTCGGGCC (서열번호 255)
VEGFA-Sp70	AAGTGCTAGCTCGGGCCGGG (서열번호 256)
VEGFA-Sp71	GGGCCGGGAGGAGCCGCAGC (서열번호 257)

[1590]

VEGFA-Sp72	CCGGGAGGAGCCGCAGCCGG (서열번호 258)
VEGFA-Sp73	CCTCCGGCTGCGGCTCCTCC (서열번호 259)
VEGFA-Sp74	GGAGGAGCCGCAGCCGGAGG (서열번호 260)
VEGFA-Sp75	GAGGAGCCGCAGCCGGAGGA (서열번호 261)
VEGFA-Sp76	AGGAGCCGCAGCCGGAGGAG (서열번호 262)
VEGFA-Sp77	GGAGCCGCAGCCGGAGGAGG (서열번호 263)
VEGFA-Sp78	GCCGCAGCCGGAGGAGGGGG (서열번호 264)
VEGFA-Sp79	TCCTCCCCCTCCTCCGGCTG (서열번호 265)
VEGFA-Sp80	GCAGCCGGAGGAGGGGGAGG (서열번호 266)
VEGFA-Sp81	TCTTCCTCCTCCCCCTCCTC (서열번호 267)
VEGFA-Sp82	GAAGAGAAGGAAGAGGAGAG (서열번호 268)
VEGFA-Sp83	AAGAGAAGGAAGAGGAGAGG (서열번호 269)
VEGFA-Sp84	AAGAGGAGAGGGGGCCGCAG (서열번호 270)
VEGFA-Sp85	AGGGGGCCGCAGTGGCGACT (서열번호 271)
VEGFA-Sp86	CGAGCGCCGAGTCGCCACTG (서열번호 272)
VEGFA-Sp87	CGCAGTGGCGACTCGGCGCT (서열번호 273)
VEGFA-Sp88	GCGACTCGGCGCTCGGAAGC (서열번호 274)
VEGFA-Sp89	CGACTCGGCGCTCGGAAGCC (서열번호 275)
VEGFA-Sp90	GCGCTCGGAAGCCGGGCTCA (서열번호 276)
VEGFA-Sp91	TCGGAAGCCGGGCTCATGGA (서열번호 277)
VEGFA-Sp92	CGGAAGCCGGGCTCATGGAC (서열번호 278)
VEGFA-Sp93	GCCGGGCTCATGGACGGGTG (서열번호 279)
VEGFA-Sp94	GCCTCACCCGTCCATGAGCC (서열번호 280)
VEGFA-Sp95	GGGCTCATGGACGGGTGAGG (서열번호 281)
VEGFA-Sp96	CTCATGGACGGGTGAGGCGG (서열번호 282)
VEGFA-Sp97	TCCAGCCGCGCGCGCTCCCC (서열번호 283)
VEGFA-Sp98	GCCTGGGGAGCGCGCGCGGC (서열번호 284)
VEGFA-Sp99	CAGGGCCTGGGGAGCGCGCG (서열번호 285)
VEGFA-Sp100	CGCGCGCGCTCCCCAGGCCC (서열번호 286)
VEGFA-Sp101	GCGCTCCCCAGGCCCTGGCC (서열번호 287)
VEGFA-Sp102	CGCTCCCCAGGCCCTGGCCC (서열번호 288)
VEGFA-Sp103	GAGGCCCGGGCCAGGGCCTG (서열번호 289)
VEGFA-Sp104	CGAGGCCCGGGCCAGGGCCT (서열번호 290)
VEGFA-Sp105	CCAGGCCCTGGCCCGGGCCT (서열번호 291)
VEGFA-Sp106	CCGAGGCCCGGGCCAGGGCC (서열번호 292)
VEGFA-Sp107	CAGGCCCTGGCCCGGGCCTC (서열번호 293)

[1591]

VEGFA-Sp108	CCCTGGCCCGGGCCTCGGGC (서열번호 294)
VEGFA-Sp109	CCGGCCCGAGGCCCGGGCCA (서열번호 295)
VEGFA-Sp110	CCTGGCCCGGGCCTCGGGCC (서열번호 296)
VEGFA-Sp111	CCCGGCCCGAGGCCCGGGCC (서열번호 297)
VEGFA-Sp112	CTGGCCCGGGCCTCGGGCCG (서열번호 298)
VEGFA-Sp113	GCCCGGGCCTCGGGCCGGGG (서열번호 299)
VEGFA-Sp114	TCCTCCCCGGCCCGAGGCCC (서열번호 300)
VEGFA-Sp115	TTCCTCCCCGGCCCGAGGCC (서열번호 301)
VEGFA-Sp116	TACTCTTCCTCCCCGGCCCG (서열번호 302)
VEGFA-Sp117	GGCGAGCTACTCTTCCTCCC (서열번호 303)
VEGFA-Sp118	GGAGGAAGAGTAGCTCGCCG (서열번호 304)
VEGFA-Sp119	AGTAGCTCGCCGAGGCGCCG (서열번호 305)
VEGFA-Sp120	CGCCGAGGCGCCGAGGAGAG (서열번호 306)
VEGFA-Sp121	GCCGAGGCGCCGAGGAGAGC (서열번호 307)
VEGFA-Sp122	GCCCGCTCTCCTCGGCGCCT (서열번호 308)
VEGFA-Sp123	GTGGGGCGGCCCGCTCTCCT (서열번호 309)
VEGFA-Sp124	GGCCGCCCCACAGCCCGAGC (서열번호 310)
VEGFA-Sp125	CTCCGGCTCGGGCTGTGGGG (서열번호 311)
VEGFA-Sp126	CCCCACAGCCCGAGCCGGAG (서열번호 312)
VEGFA-Sp127	CCTCTCCGGCTCGGGCTGTG (서열번호 313)
VEGFA-Sp128	CCCACAGCCCGAGCCGGAGA (서열번호 314)
VEGFA-Sp129	CCCTCTCCGGCTCGGGCTGT (서열번호 315)
VEGFA-Sp130	TCCCTCTCCGGCTCGGGCTG (서열번호 316)
VEGFA-Sp131	TCGCGCTCCCTCTCCGGCTC (서열번호 317)
VEGFA-Sp132	CTCGCGCTCCCTCTCCGGCT (서열번호 318)
VEGFA-Sp133	CGCGGCTCGCGCTCCCTCTC (서열번호 319)
VEGFA-Sp134	AGAGGGAGCGCGAGCCGCGC (서열번호 320)
VEGFA-Sp135	CGAGCCGCGCCGGCCCCGGT (서열번호 321)
VEGFA-Sp136	GAGCCGCGCCGGCCCCGGTC (서열번호 322)
VEGFA-Sp137	AGGCCCGACCGGGGCCGGCG (서열번호 323)
VEGFA-Sp138	TTCGGAGGCCCGACCGGGGC (서열번호 324)
VEGFA-Sp139	TGGTTTCGGAGGCCCGACCG (서열번호 325)
VEGFA-Sp140	ATGGTTTCGGAGGCCCGACC (서열번호 326)
VEGFA-Sp141	CATGGTTTCGGAGGCCCGAC (서열번호 327)
VEGFA-Sp142	CAGAAAGTTCATGGTTTCGG (서열번호 328)
VEGFA-Sp143	CAGCAGAAAGTTCATGGTTT (서열번호 329)

[1592]

VEGFA-Sp144	CCATGAACTTTCTGCTGTCT (서열번호 330)
VEGFA-Sp145	CCAAGACAGCAGAAAGTTCA (서열번호 331)
VEGFA-Sp146	CATGAACTTTCTGCTGTCTT (서열번호 332)
VEGFA-Sp147	TTCTGCTGTCTTGGGTGCAT (서열번호 333)
VEGFA-Sp148	GGAGGTAGAGCAGCAAGGCA (서열번호 334)
VEGFA-Sp149	ATGGTGGAGGTAGAGCAGCA (서열번호 335)
VEGFA-Sp150	GCTCTACCTCCACCATGCCA (서열번호 336)
VEGFA-Sp151	CGCTTACCTTGGCATGGTGG (서열번호 337)
VEGFA-Sp152	GACCGCTTACCTTGGCATGG (서열번호 338)
VEGFA-Sp153	CACGACCGCTTACCTTGGCA (서열번호 339)
VEGFA-Sp154	TTTCTGTCCTCAGTGGTCCC (서열번호 340)
VEGFA-Sp155	GGTGCAGCCTGGGACCACTG (서열번호 341)
VEGFA-Sp156	GTGGTCCCAGGCTGCACCCA (서열번호 342)
VEGFA-Sp157	TTCTGCCATGGGTGCAGCCT (서열번호 343)
VEGFA-Sp158	CTTCTGCCATGGGTGCAGCC (서열번호 344)
VEGFA-Sp159	CAGGCTGCACCCATGGCAGA (서열번호 345)
VEGFA-Sp160	GCTGCACCCATGGCAGAAGG (서열번호 346)
VEGFA-Sp161	GCACCCATGGCAGAAGGAGG (서열번호 347)
VEGFA-Sp162	CACCCATGGCAGAAGGAGGA (서열번호 348)
VEGFA-Sp163	TGCCCTCCTCCTTCTGCCAT (서열번호 349)
VEGFA-Sp164	CTGCCCTCCTCCTTCTGCCA (서열번호 350)
VEGFA-Sp165	GGAGGGCAGAATCATCACGA (서열번호 351)
VEGFA-Sp166	TCATGCAGTGGTGAAGTTCA (서열번호 352)
VEGFA-Sp167	CTGCCATCCAATCGAGACCC (서열번호 353)
VEGFA-Sp168	CCATCCAATCGAGACCCTGG (서열번호 354)
VEGFA-Sp169	CCACCAGGGTCTCGATTGGA (서열번호 355)
VEGFA-Sp170	ATGTCCACCAGGGTCTCGAT (서열번호 356)
VEGFA-Sp171	GACCCTGGTGGACATCTTCC (서열번호 357)
VEGFA-Sp172	CTCCTGGAAGATGTCCACCA (서열번호 358)
VEGFA-Sp173	ACTCCTGGAAGATGTCCACC (서열번호 359)
VEGFA-Sp174	CGATCTCATCAGGGTACTCC (서열번호 360)
VEGFA-Sp175	AGATGTACTCGATCTCATCA (서열번호 361)
VEGFA-Sp176	AAGATGTACTCGATCTCATC (서열번호 362)
VEGFA-Sp177	CGCATCAGGGGCACACAGGA (서열번호 363)
VEGFA-Sp178	GCATCGCATCAGGGGCACAC (서열번호 364)
VEGFA-Sp179	TGTGTGCCCCTGATGCGATG (서열번호 365)

[1593]

VEGFA-Sp180	GTGTGCCCCTGATGCGATGC (서열번호 366)
VEGFA-Sp181	TGTGCCCCTGATGCGATGCG (서열번호 367)
VEGFA-Sp182	GTGCCCCTGATGCGATGCGG (서열번호 368)
VEGFA-Sp183	CAGCCCCCGCATCGCATCAG (서열번호 369)
VEGFA-Sp184	GCAGCCCCCGCATCGCATCA (서열번호 370)
VEGFA-Sp185	AGCAGCCCCCGCATCGCATC (서열번호 371)
VEGFA-Sp186	CGGGGGCTGCTGCAATGACG (서열번호 372)
VEGFA-Sp187	GGGGGCTGCTGCAATGACGA (서열번호 373)
VEGFA-Sp188	CTGCTGCAATGACGAGGGCC (서열번호 374)
VEGFA-Sp189	CCTGGAGTGTGTGCCCACTG (서열번호 375)
VEGFA-Sp190	CCTCAGTGGGCACACACTCC (서열번호 376)
VEGFA-Sp191	GTGATGTTGGACTCCTCAGT (서열번호 377)
VEGFA-Sp192	GGTGATGTTGGACTCCTCAG (서열번호 378)
VEGFA-Sp193	GGAGTCCAACATCACCATGC (서열번호 379)
VEGFA-Sp194	GTCCAACATCACCATGCAGG (서열번호 380)
VEGFA-Sp195	TCCAACATCACCATGCAGGT (서열번호 381)
VEGFA-Sp196	GCCCACCTGCATGGTGATGT (서열번호 382)
VEGFA-Sp197	CCCAAAGATGCCCACCTGCA (서열번호 383)
VEGFA-Sp198	TCCTTCCTTTCCAGATTATG (서열번호 384)
VEGFA-Sp199	GAGGTTTGATCCGCATAATC (서열번호 385)
VEGFA-Sp200	ATGCGGATCAAACCTCACCA (서열번호 386)
VEGFA-Sp201	CCTCACCAAGGCCAGCACAT (서열번호 387)
VEGFA-Sp202	CCTATGTGCTGGCCTTGGTG (서열번호 388)
VEGFA-Sp203	TCTCTCCTATGTGCTGGCCT (서열번호 389)
VEGFA-Sp204	AGCTCATCTCTCCTATGTGC (서열번호 390)
VEGFA-Sp205	ATTCACATTTGTTGTGCTGT (서열번호 391)
VEGFA-Sp206	AGCACAACAAATGTGAATGC (서열번호 392)
VEGFA-Sp207	AACAAATGTGAATGCAGGTG (서열번호 393)
VEGFA-Sp208	TGTCTTGCTCTATCTTTCTT (서열번호 394)
VEGFA-Sp209	TTTTCCAGAAAATCAGTTCG (서열번호 395)
VEGFA-Sp210	CTTTCCTCGAACTGATTTTC (서열번호 396)
VEGFA-Sp211	CAGAAAATCAGTTCGAGGAA (서열번호 397)
VEGFA-Sp212	AGAAAATCAGTTCGAGGAAA (서열번호 398)
VEGFA-Sp213	ATCAGTTCGAGGAAAGGGAA (서열번호 399)
VEGFA-Sp214	TCAGTTCGAGGAAAGGGAAA (서열번호 400)
VEGFA-Sp215	CAGTTCGAGGAAAGGGAAAG (서열번호 401)

[1594]

VEGFA-Sp216	AACGAAAGCGCAAGAAATCC (서열번호 402)
VEGFA-Sp217	AGAAATCCCGGTATAAGTCC (서열번호 403)
VEGFA-Sp218	CACGCTCCAGGACTTATACC (서열번호 404)
VEGFA-Sp219	ACACGCTCCAGGACTTATAC (서열번호 405)
VEGFA-Sp220	AAGTCCTGGAGCGTGTACGT (서열번호 406)
VEGFA-Sp221	GGCACCAACGTACACGCTCC (서열번호 407)
VEGFA-Sp222	CCCGCTGCTGTCTAATGCCC (서열번호 408)
VEGFA-Sp223	CCAGGGCATTAGACAGCAGC (서열번호 409)
VEGFA-Sp224	TCCAGGGCATTAGACAGCAG (서열번호 410)
VEGFA-Sp225	CTAATGCCCTGGAGCCTCCC (서열번호 411)
VEGFA-Sp226	TGGGGGCCAGGGAGGCTCCA (서열번호 412)
VEGFA-Sp227	CTGGGGGCCAGGGAGGCTCC (서열번호 413)
VEGFA-Sp228	GGTTGTACTGGGGGCCAGGG (서열번호 414)
VEGFA-Sp229	GGAGGTTGTACTGGGGGCCA (서열번호 415)
VEGFA-Sp230	CGGAGGTTGTACTGGGGGCC (서열번호 416)
VEGFA-Sp231	GCAGGCGGAGGTTGTACTGG (서열번호 417)
VEGFA-Sp232	TTGCCTTTTTGCAGTCCCTG (서열번호 418)
VEGFA-Sp233	TGCCTTTTTGCAGTCCCTGT (서열번호 419)
VEGFA-Sp234	CGCTCTGAGCAAGGCCCACA (서열번호 420)
VEGFA-Sp235	CCTGTGGGCCTTGCTCAGAG (서열번호 421)
VEGFA-Sp236	CCGCTCTGAGCAAGGCCCAC (서열번호 422)
VEGFA-Sp237	TGCTTTCTCCGCTCTGAGCA (서열번호 423)
VEGFA-Sp238	CAGGAACATTTACACGTCTG (서열번호 424)
VEGFA-Sp239	ACGCGAGTCTGTGTTTTTGC (서열번호 425)
VEGFA-Sp240	AAACACAGACTCGCGTTGCA (서열번호 426)
VEGFA-Sp241	CAGACTCGCGTTGCAAGGCG (서열번호 427)
VEGFA-Sp242	AGTTAAACGAACGTACTTGC (서열번호 428)
VEGFA-Sp243	AAACGAACGTACTTGCAGGT (서열번호 429)
VEGFA-Sp244	CCCTCAGATGTGACAAGCCG (서열번호 430)
VEGFA-Sp245	GCCTCGGCTTGTCACATCTG (서열번호 431)
VEGFA-Sp246	TCAGATGTGACAAGCCGAGG (서열번호 432)
VEGFA-Sp247	ACAAGCCGAGGCGGTGAGCC (서열번호 433)
VEGFA-Sp248	GCCGAGGCGGTGAGCCGGGC (서열번호 434)
VEGFA-Sp249	TCCTGCCCGGCTCACCGCCT (서열번호 435)

[1595]

[1596] [표 11]

[1597] SpCas9을 HIF1A 유전자의 표적 서열(Target sequences of HIF1A gene for SpCas9)

[1598]

Gene	Target sequence
HIF1A-Sp1	TTTAAATGAGCTCCCAATGT (서열번호 436)
HIF1A-Sp2	GAGCTCCCAATGTCGGAGTT (서열번호 437)
HIF1A-Sp3	GTTTTCCAAACTCCGACATT (서열번호 438)
HIF1A-Sp4	TGTTTTCCAAACTCCGACAT (서열번호 439)
HIF1A-Sp5	AAATTTGTCTTTTTAAAAGA (서열번호 440)
HIF1A-Sp6	GTCTTTTTAAAAGAAGGTCT (서열번호 441)
HIF1A-Sp7	AAACTCAAAACCTGAAGAAT (서열번호 442)
HIF1A-Sp8	CTGATTTCTTCCAATTCTTC (서열번호 443)
HIF1A-Sp9	GAAGAAATCAGAATAGAAAA (서열번호 444)
HIF1A-Sp10	AAGAAATCAGAATAGAAAAT (서열번호 445)
HIF1A-Sp11	ATCAGAATAGAAAATGGGTA (서열번호 446)
HIF1A-Sp12	CTCGAGATGCAGCCAGATCT (서열번호 447)
HIF1A-Sp13	TTCTTTACTTCGCCGAGATC (서열번호 448)
HIF1A-Sp14	GAACTCACATTATGTGGAAG (서열번호 449)
HIF1A-Sp15	AGATGCGAACTCACATTATG (서열번호 450)
HIF1A-Sp16	TGTGAGTTCGCATCTTGATA (서열번호 451)
HIF1A-Sp17	TTGATAAGGCCTCTGTGATG (서열번호 452)
HIF1A-Sp18	GATGGTAAGCCTCATCACAG (서열번호 453)
HIF1A-Sp19	CCATCAGCTATTTGCGTGTG (서열번호 454)
HIF1A-Sp20	CCTCACACGCAAATAGCTGA (서열번호 455)
HIF1A-Sp21	TTTGCGTGTGAGGAAACTTC (서열번호 456)
HIF1A-Sp22	GTGAGGAAACTTCTGGATGC (서열번호 457)
HIF1A-Sp23	TGTGCCCTTTTTAGGTGATT (서열번호 458)
HIF1A-Sp24	TTGCTTTTATTTGAAAGCCT (서열번호 459)
HIF1A-Sp25	TTTTATTTGAAAGCCTTGGA (서열번호 460)
HIF1A-Sp26	AGCCTTGGATGGTTTTGTTA (서열번호 461)
HIF1A-Sp27	AACCATAACAAAACCATCCA (서열번호 462)
HIF1A-Sp28	GTTATGGTTCTCACAGATGA (서열번호 463)
HIF1A-Sp29	TGATAATGTGAACAAATACA (서열번호 464)
HIF1A-Sp30	GATAATGTGAACAAATACAT (서열번호 465)
HIF1A-Sp31	CAAATACATGGGATTAACTC (서열번호 466)
HIF1A-Sp32	TGTTTACAGTTTGAACTAAC (서열번호 467)
HIF1A-Sp33	TACTCATCCATGTGACCATG (서열번호 468)
HIF1A-Sp34	CTCATTTCCTCATGGTCACA (서열번호 469)
HIF1A-Sp35	GCATTTCTCTCATTTCCTCA (서열번호 470)

[1599]

HIF1A-Sp36	GAAATGCTTACACACAGAAA (서열번호 471)
HIF1A-Sp37	TTCATTAGGCCTTGTGAAAA (서열번호 472)
HIF1A-Sp38	TCATTAGGCCTTGTGAAAAA (서열번호 473)
HIF1A-Sp39	GTTCTTTACCCTTTTTCACA (서열번호 474)
HIF1A-Sp40	AAGTGTACCCTAACTAGCCG (서열번호 475)
HIF1A-Sp41	AGTTCTTCCTCGGCTAGTTA (서열번호 476)
HIF1A-Sp42	TAGTTCTTCCTCGGCTAGTT (서열번호 477)
HIF1A-Sp43	TTATGTTCATAGTTCTTCCT (서열번호 478)
HIF1A-Sp44	TGAACATAAAGTCTGCAACA (서열번호 479)
HIF1A-Sp45	CATAAAGTCTGCAACATGGA (서열번호 480)
HIF1A-Sp46	ACACAGGTATTGCACTGCAC (서열번호 481)
HIF1A-Sp47	TGGTATCATATACGTGAATG (서열번호 482)
HIF1A-Sp48	ACACTGAGGTTGGTTACTGT (서열번호 483)
HIF1A-Sp49	AACAGTAACCAACCTCAGTG (서열번호 484)
HIF1A-Sp50	ACAGTAACCAACCTCAGTGT (서열번호 485)
HIF1A-Sp51	TCTTATACCCACACTGAGGT (서열번호 486)
HIF1A-Sp52	GGTTTCTTATACCCACACTG (서열번호 487)
HIF1A-Sp53	GAAACCACCTATGACCTGCT (서열번호 488)
HIF1A-Sp54	AGCACCAAGCAGGTCATAGG (서열번호 489)
HIF1A-Sp55	ATCAGCACCAAGCAGGTCAT (서열번호 490)
HIF1A-Sp56	TTCACAAATCAGCACCAAGC (서열번호 491)
HIF1A-Sp57	ATATTTGATGGGTGAGGAAT (서열번호 492)
HIF1A-Sp58	AATATTTGATGGGTGAGGAA (서열번호 493)
HIF1A-Sp59	ATTTCAATATTTGATGGGTG (서열번호 494)
HIF1A-Sp60	AAGGAATTTCAATATTTGAT (서열번호 495)
HIF1A-Sp61	AAAGGAATTTCAATATTTGA (서열번호 496)
HIF1A-Sp62	AGGAAAGTCTTGCTATCTAA (서열번호 497)
HIF1A-Sp63	TTTCCTCAGTCGACACAGCC (서열번호 498)
HIF1A-Sp64	TATCCAGGCTGTGTCGACTG (서열번호 499)
HIF1A-Sp65	AATAAGAAAATTTCATATCC (서열번호 500)
HIF1A-Sp66	AATTTTCTTATTGTGATGAA (서열번호 501)
HIF1A-Sp67	TAACAGAATTACCGAATTGA (서열번호 502)
HIF1A-Sp68	AACAGAATTACCGAATTGAT (서열번호 503)
HIF1A-Sp69	TGGCTCATATCCCATCAATT (서열번호 504)
HIF1A-Sp70	TATGAGCCAGAAGAACTTTT (서열번호 505)
HIF1A-Sp71	GAGCGGCCTAAAAGTTCTTC (서열번호 506)

[1600]

HIF1A-Sp72	GATAATATTCATAAATTGAG (서열번호 507)
HIF1A-Sp73	TTATGAATATTATCATGCTT (서열번호 508)
HIF1A-Sp74	CTTACTATCATGATGAGTTT (서열번호 509)
HIF1A-Sp75	TCCCCCCTAGTGTTTACTAA (서열번호 510)
HIF1A-Sp76	TTGTCCTTTAGTAAACACTA (서열번호 511)
HIF1A-Sp77	CTTGTCCTTTAGTAAACACT (서열번호 512)
HIF1A-Sp78	ACTAAAGGACAAGTCACCAC (서열번호 513)
HIF1A-Sp79	AAGTCACCACAGGACAGTAC (서열번호 514)
HIF1A-Sp80	AAGCATCCTGTACTGTCCTG (서열번호 515)
HIF1A-Sp81	TACAGGATGCTTGCCAAAAG (서열번호 516)
HIF1A-Sp82	AGGATGCTTGCCAAAAGAGG (서열번호 517)
HIF1A-Sp83	CCAAAAGAGGTGGATATGTC (서열번호 518)
HIF1A-Sp84	CCAGACATATCCACCTCTTT (서열번호 519)
HIF1A-Sp85	CAAAAGAGGTGGATATGTCT (서열번호 520)
HIF1A-Sp86	GCACTGTGGTTGAGAATTCT (서열번호 521)
HIF1A-Sp87	TTCACACATACAATGCACTG (서열번호 522)
HIF1A-Sp88	TATGTGTGAATTACGTTGTG (서열번호 523)
HIF1A-Sp89	GACACATTCTGTTTGTTGAA (서열번호 524)
HIF1A-Sp90	GGACACATTCTGTTTGTTGA (서열번호 525)
HIF1A-Sp91	AACAGAATGTGTCCTTAAAC (서열번호 526)
HIF1A-Sp92	CTGAAGATTCAACCGGTTTA (서열번호 527)
HIF1A-Sp93	TTCATATCTGAAGATTCAAC (서열번호 528)
HIF1A-Sp94	TGTATCTTCTGATTCAACTT (서열번호 529)
HIF1A-Sp95	CCTCTTTGACAAACTTAAGA (서열번호 530)
HIF1A-Sp96	CCTTCTTAAGTTTGTCAAAG (서열번호 531)
HIF1A-Sp97	ACCTGATGCTTTAACTTTGC (서열번호 532)
HIF1A-Sp98	GCCAGCAAAGTTAAAGCATC (서열번호 533)
HIF1A-Sp99	ACTTTGCTGGCCCCAGCCGC (서열번호 534)
HIF1A-Sp100	GATTGTGTCTCCAGCGGCTG (서열번호 535)
HIF1A-Sp101	TGATTGTGTCTCCAGCGGCT (서열번호 536)
HIF1A-Sp102	ATGATTGTGTCTCCAGCGGC (서열번호 537)
HIF1A-Sp103	AGATATGATTGTGTCTCCAG (서열번호 538)
HIF1A-Sp104	ACAATCATATCTTTAGATTT (서열번호 539)
HIF1A-Sp105	TCTTTAGATTTTGGCAGCAA (서열번호 540)
HIF1A-Sp106	GTCATCAGTTTCTGTGTCTG (서열번호 541)
HIF1A-Sp107	AACTGATGACCAGCAACTTG (서열번호 542)

[1601]

HIF1A-Sp108	ATGGTACTTCCTCAAGTTGC (서열번호 543)
HIF1A-Sp109	AGCATTACATCATTATATAA (서열번호 544)
HIF1A-Sp110	GTAATTTTTCGTTGGGTGAG (서열번호 545)
HIF1A-Sp111	TGTAATTTTTCGTTGGGTGA (서열번호 546)
HIF1A-Sp112	CTGTAATTTTTCGTTGGGTG (서열번호 547)
HIF1A-Sp113	ATATTCTGTAATTTTTCGTT (서열번호 548)
HIF1A-Sp114	TATATTCTGTAATTTTTCGT (서열번호 549)
HIF1A-Sp115	AAAATTACAGAATATAAATT (서열번호 550)
HIF1A-Sp116	GGCGTTTCAGCGGTGGGTAA (서열번호 551)
HIF1A-Sp117	GGCTTTGGCGTTTCAGCGGT (서열번호 552)
HIF1A-Sp118	TGGCTTTGGCGTTTCAGCGG (서열번호 553)
HIF1A-Sp119	AAGTGGCTTTGGCGTTTCAG (서열번호 554)
HIF1A-Sp120	GCACTACTTCGAAGTGGCTT (서열번호 555)
HIF1A-Sp121	GGGTCAGCACTACTTCGAAG (서열번호 556)
HIF1A-Sp122	CAACTTCTTGATTGAGTGCA (서열번호 557)
HIF1A-Sp123	GCAACTTCTTGATTGAGTGC (서열번호 558)
HIF1A-Sp124	AGAACCAAATCCAGAGTCAC (서열번호 559)
HIF1A-Sp125	AGTTCCAGTGACTCTGGATT (서열번호 560)
HIF1A-Sp126	AAAGAAAGTTCCAGTGACTC (서열번호 561)
HIF1A-Sp127	TTTTACCATGCCCCAGATTC (서열번호 562)
HIF1A-Sp128	CTGATCCTGAATCTGGGGCA (서열번호 563)
HIF1A-Sp129	GGTGTCTGATCCTGAATCTG (서열번호 564)
HIF1A-Sp130	AGGTGTCTGATCCTGAATCT (서열번호 565)
HIF1A-Sp131	TAGGTGTCTGATCCTGAATC (서열번호 566)
HIF1A-Sp132	CAGACACCTAGTCCTTCCGA (서열번호 567)
HIF1A-Sp133	GTGCTTCCATCGGAAGGACT (서열번호 568)
HIF1A-Sp134	TGTCTAGTGCTTCCATCGGA (서열번호 569)
HIF1A-Sp135	ACTTTGTCTAGTGCTTCCAT (서열번호 570)
HIF1A-Sp136	CACTAGACAAAGTTCACCTG (서열번호 571)
HIF1A-Sp137	AGACAAAGTTCACCTGAGGT (서열번호 572)
HIF1A-Sp138	TATATCATGACACCTACCTC (서열번호 573)
HIF1A-Sp139	CAATATTCACTGGGACTATT (서열번호 574)
HIF1A-Sp140	ACATAAAAACAATATTCACT (서열번호 575)
HIF1A-Sp141	CACATAAAAACAATATTCAC (서열번호 576)
HIF1A-Sp142	CAGTGAATATTGTTTTTATG (서열번호 577)
HIF1A-Sp143	TTTTTATGTGGATAGTGATA (서열번호 578)

[1602]

HIF1A-Sp144	TATGGTCAATGAATTCAAGT (서열번호 579)
HIF1A-Sp145	CAATGAATTCAAGTTGGAAT (서열번호 580)
HIF1A-Sp146	AAAGAACCCATTTTCTACTC (서열번호 581)
HIF1A-Sp147	CATATACCTGAGTAGAAAAT (서열번호 582)
HIF1A-Sp148	TCATATACCTGAGTAGAAAA (서열번호 583)
HIF1A-Sp149	AAAGGACACAGATTTAGACT (서열번호 584)
HIF1A-Sp150	GTTAGCTCCCTATATCCCAA (서열번호 585)
HIF1A-Sp151	TCATCATCCATTGGGATATA (서열번호 586)
HIF1A-Sp152	GTCATCATCCATTGGGATAT (서열번호 587)
HIF1A-Sp153	ACTGGAAGTCATCATCCATT (서열번호 588)
HIF1A-Sp154	AACTGGAAGTCATCATCCAT (서열번호 589)
HIF1A-Sp155	ACTGATCGAAGGAACGTAAC (서열번호 590)
HIF1A-Sp156	TAATGGTGACAACTGATCGA (서열번호 591)
HIF1A-Sp157	CTTGCGGAACTGCTTTCTAA (서열번호 592)
HIF1A-Sp158	ACTTGCGCTTTCAGGGCTTG (서열번호 593)
HIF1A-Sp159	TTTGAGGACTTGCGCTTTCA (서열번호 594)
HIF1A-Sp160	CTTTGAGGACTTGCGCTTTC (서열번호 595)
HIF1A-Sp161	AATACTGTAACTGTGCTTTG (서열번호 596)
HIF1A-Sp162	GTTCTTGTATTTGAGTCTGC (서열번호 597)
HIF1A-Sp163	GTAGTGGTGGCATTAGCAGT (서열번호 598)
HIF1A-Sp164	AGTGGTGGCAGTGGTAGTGG (서열번호 599)
HIF1A-Sp165	ATCAGTGGTGGCAGTGGTAG (서열번호 600)
HIF1A-Sp166	TAATTCATCAGTGGTGGCAG (서열번호 601)
HIF1A-Sp167	TGTTTTTAATTCATCAGTGG (서열번호 602)
HIF1A-Sp168	CACTGTTTTTAATTCATCAG (서열번호 603)
HIF1A-Sp169	AACAGTGACAAAAGACCGTA (서열번호 604)
HIF1A-Sp170	ATATTTTAATGTCTTCCATA (서열번호 605)
HIF1A-Sp171	TTATGTATGTGGGTAGGAGA (서열번호 606)
HIF1A-Sp172	GTTTCTTTATGTATGTGGGT (서열번호 607)
HIF1A-Sp173	AGTAGTTTCTTTATGTATGT (서열번호 608)
HIF1A-Sp174	TAGTAGTTTCTTTATGTATG (서열번호 609)
HIF1A-Sp175	ATCTCTATATGGTGATGATG (서열번호 610)
HIF1A-Sp176	CGACTTTGAGTATCTCTATA (서열번호 611)
HIF1A-Sp177	CATATAGAGATACTCAAAGT (서열번호 612)
HIF1A-Sp178	ACAGCCTCACCAAACAGAGC (서열번호 613)
HIF1A-Sp179	TTTTCCTGCTCTGTTTGGTG (서열번호 614)

[1603]

HIF1A-Sp180	TCACCAAACAGAGCAGGAAA (서열번호 615)
HIF1A-Sp181	ACTCCTTTTCCTGCTCTGTT (서열번호 616)
HIF1A-Sp182	GATAACACGTTAGGGCTTCT (서열번호 617)
HIF1A-Sp183	AAGCGACAGATAACACGTTA (서열번호 618)
HIF1A-Sp184	AAAGCGACAGATAACACGTT (서열번호 619)
HIF1A-Sp185	TATCTGTCGCTTTGAGTCAA (서열번호 620)
HIF1A-Sp186	TTTCAGAACTACAGTTCCTG (서열번호 621)
HIF1A-Sp187	TTTGGATTTAGTTCTTCCTC (서열번호 622)
HIF1A-Sp188	TTCTGCAAAGCTAGTATCTT (서열번호 623)
HIF1A-Sp189	TGCTCAGAGAAAGCGAAAAA (서열번호 624)
HIF1A-Sp190	AAGCGAAAAATGGAACATGA (서열번호 625)
HIF1A-Sp191	GTAGTAGCTGCATGATCGTC (서열번호 626)
HIF1A-Sp192	CAGCTACTACATCACTTTCT (서열번호 627)
HIF1A-Sp193	CTTTCTTGGAAACGTGTAAA (서열번호 628)
HIF1A-Sp194	ACAATTATTTTAATACCCTC (서열번호 629)
HIF1A-Sp195	AAAAGAATAAACTAACCAGA (서열번호 630)
HIF1A-Sp196	AAAAAGAATAAACTAACCAG (서열번호 631)
HIF1A-Sp197	AGATTTAGCATGTAGACTGC (서열번호 632)
HIF1A-Sp198	GATTTAGCATGTAGACTGCT (서열번호 633)
HIF1A-Sp199	ATTTAGCATGTAGACTGCTG (서열번호 634)
HIF1A-Sp200	TAGACTGCTGGGGCAATCAA (서열번호 635)
HIF1A-Sp201	GGGCAATCAATGGATGAAAG (서열번호 636)
HIF1A-Sp202	CAATCATAACTGGTCAGCTG (서열번호 637)
HIF1A-Sp203	ATTAACTTCACAATCATAAC (서열번호 638)
HIF1A-Sp204	GAAGTTAATGCTCCTATACA (서열번호 639)
HIF1A-Sp205	AGGTTTCTGCTGCCTTGTAT (서열번호 640)
HIF1A-Sp206	AGGCAGCAGAAACCTACTGC (서열번호 641)
HIF1A-Sp207	GGCAGCAGAAACCTACTGCA (서열번호 642)
HIF1A-Sp208	GTAATTCTTCACCCTGCAGT (서열번호 643)
HIF1A-Sp209	TGAAGAATTACTCAGAGCTT (서열번호 644)

[1604]

[1605] [표 12]

[1606] SpCas9을 EPAS1 유전자의 표적 서열(Target sequences of EPAS1 gene for SpCas9)

[1607]

Gene	Target sequence
EPAS1-Sp1	AGCGACAATGACAGCTGACA (서열번호 645)
EPAS1-Sp2	CAGCTGACAAGGAGAAGAAA (서열번호 646)
EPAS1-Sp3	TTCTCCACTTAGGAGTAGCT (서열번호 647)
EPAS1-Sp4	CACTTAGGAGTAGCTCGGAG (서열번호 648)
EPAS1-Sp5	TTAGGAGTAGCTCGGAGAGG (서열번호 649)
EPAS1-Sp6	GAGTAGCTCGGAGAGGAGGA (서열번호 650)
EPAS1-Sp7	AGAGGAGGAAGGAGAAGTCC (서열번호 651)
EPAS1-Sp8	GAGGAGGAAGGAGAAGTCCC (서열번호 652)
EPAS1-Sp9	AGAAGTCCCGGGATGCTGCG (서열번호 653)
EPAS1-Sp10	CCCGGGATGCTGCGCGGTGC (서열번호 654)
EPAS1-Sp11	CCGGCACCGCGCAGCATCCC (서열번호 655)
EPAS1-Sp12	GCCGGCACCGCGCAGCATCC (서열번호 656)
EPAS1-Sp13	GGGATGCTGCGCGGTGCCGG (서열번호 657)
EPAS1-Sp14	TGCGCGGTGCCGGCGGAGCA (서열번호 658)
EPAS1-Sp15	GTGCCGGCGGAGCAAGGAGA (서열번호 659)
EPAS1-Sp16	CCGGCGGAGCAAGGAGACGG (서열번호 660)
EPAS1-Sp17	CCTCCGTCTCCTTGCTCCGC (서열번호 661)
EPAS1-Sp18	GACGGAGGTGTTCTATGAGC (서열번호 662)
EPAS1-Sp19	GTGGGGCAGAGGCAGCTCAT (서열번호 663)
EPAS1-Sp20	TGTGGGGCAGAGGCAGCTCA (서열번호 664)
EPAS1-Sp21	GAGCTCACACTGTGGGGCAG (서열번호 665)
EPAS1-Sp22	AGATGGGAGCTCACACTGTG (서열번호 666)
EPAS1-Sp23	CAGATGGGAGCTCACACTGT (서열번호 667)
EPAS1-Sp24	CCACAGTGTGAGCTCCCATC (서열번호 668)
EPAS1-Sp25	CCAGATGGGAGCTCACACTG (서열번호 669)
EPAS1-Sp26	TGTGAGCTCCCATCTGGACA (서열번호 670)
EPAS1-Sp27	GATGGAGGCCTTGTCCAGAT (서열번호 671)
EPAS1-Sp28	TGATGGAGGCCTTGTCCAGA (서열번호 672)
EPAS1-Sp29	CAAGGCCTCCATCATGCGAC (서열번호 673)
EPAS1-Sp30	GATTGCCAGTCGCATGATGG (서열번호 674)
EPAS1-Sp31	GCTGATTGCCAGTCGCATGA (서열번호 675)
EPAS1-Sp32	AGAGGAGCTTGTGTGTTCGC (서열번호 676)
EPAS1-Sp33	ACACACAAGCTCCTCTCCTC (서열번호 677)
EPAS1-Sp34	CAAGCTCCTCTCCTCAGGTA (서열번호 678)
EPAS1-Sp35	TGCTGGCCTTACCTGAGGAG (서열번호 679)

[1608]

EPAS1-Sp36	GAGCCTGCTGGCCTTACCTG (서열번호 680)
EPAS1-Sp37	GACTCGTTTTCAGAGCAAAC (서열번호 681)
EPAS1-Sp38	CTGCTGGTCAGCTTCGGCTT (서열번호 682)
EPAS1-Sp39	AGCCGAAGCTGACCAGCAGA (서열번호 683)
EPAS1-Sp40	GTCCATCTGCTGGTCAGCTT (서열번호 684)
EPAS1-Sp41	GGTACAAGTTGTCCATCTGC (서열번호 685)
EPAS1-Sp42	CAACTTGTACCTGAAAGCCT (서열번호 686)
EPAS1-Sp43	CTTGTACCTGAAAGCCTTGG (서열번호 687)
EPAS1-Sp44	TTGTACCTGAAAGCCTTGGA (서열번호 688)
EPAS1-Sp45	TGAAACCCTCCAAGGCTTTC (서열번호 689)
EPAS1-Sp46	CACGGCAATGAAACCCTCCA (서열번호 690)
EPAS1-Sp47	CTTGGAGGGTTTCATTGCCG (서열번호 691)
EPAS1-Sp48	ATTGCCGTGGTGACCCAAGA (서열번호 692)
EPAS1-Sp49	GTCGCCATCTTGGGTCACCA (서열번호 693)
EPAS1-Sp50	AAAGATCATGTCGCCATCTT (서열번호 694)
EPAS1-Sp51	GAAAGATCATGTCGCCATCT (서열번호 695)
EPAS1-Sp52	AGAAAACATCAGCAAGTTCA (서열번호 696)
EPAS1-Sp53	GAAAACATCAGCAAGTTCAT (서열번호 697)
EPAS1-Sp54	CAAGTTCATGGGACTTACAC (서열번호 698)
EPAS1-Sp55	TTGAAACAGGTGGAGCTAAC (서열번호 699)
EPAS1-Sp56	CACTCATCCCTGCGACCATG (서열번호 700)
EPAS1-Sp57	CGAATCTCCTCATGGTCGCA (서열번호 701)
EPAS1-Sp58	ACGAATCTCCTCATGGTCGC (서열번호 702)
EPAS1-Sp59	GGTTCTCACGAATCTCCTCA (서열번호 703)
EPAS1-Sp60	GAGAACCTGAGTCTCAAAAA (서열번호 704)
EPAS1-Sp61	GGATACCATTTTTGAGACTC (서열번호 705)
EPAS1-Sp62	ATCCTTCCACATCCAGGCTC (서열번호 706)
EPAS1-Sp63	CCACATCCAGGCTCTGGTTT (서열번호 707)
EPAS1-Sp64	CACATCCAGGCTCTGGTTTT (서열번호 708)
EPAS1-Sp65	TTTTTCCCAAAACCAGAGCC (서열번호 709)
EPAS1-Sp66	GCAAAGACATGTCCACAGAG (서열번호 710)
EPAS1-Sp67	CAAAGACATGTCCACAGAGC (서열번호 711)
EPAS1-Sp68	CATGAAGAAGTCCCGCTCTG (서열번호 712)
EPAS1-Sp69	CAGAGCGGGACTTCTTCATG (서열번호 713)
EPAS1-Sp70	CTTCATGAGGATGAAGTGCA (서열번호 714)
EPAS1-Sp71	AAGTGCACGGTCACCAACAG (서열번호 715)

[1609]

EPAS1-Sp72	GTTGACAGTACGGCCTCTGT (서열번호 716)
EPAS1-Sp73	CTGACTTGAGGTTGACAGTA (서열번호 717)
EPAS1-Sp74	TCAACCTCAAGTCAGCCACC (서열번호 718)
EPAS1-Sp75	CCTCAAGTCAGCCACCTGGA (서열번호 719)
EPAS1-Sp76	CCTTCCAGGTGGCTGACTTG (서열번호 720)
EPAS1-Sp77	AAGTCAGCCACCTGGAAGGT (서열번호 721)
EPAS1-Sp78	AGTCAGCCACCTGGAAGGTA (서열번호 722)
EPAS1-Sp79	ATGTTGCCCTACCTTCCAGG (서열번호 723)
EPAS1-Sp80	CTGATGTTGCCCTACCTTCC (서열번호 724)
EPAS1-Sp81	GTCTCAGGTCTTGCACTGCA (서열번호 725)
EPAS1-Sp82	TCTCAGGTCTTGCACTGCAC (서열번호 726)
EPAS1-Sp83	GGTCTTGCACTGCACGGGCC (서열번호 727)
EPAS1-Sp84	AGTTGTTGTAGACTTTCACC (서열번호 728)
EPAS1-Sp85	CACACAGACTATTGTGAGGA (서열번호 729)
EPAS1-Sp86	CCTCCTCACAATAGTCTGTG (서열번호 730)
EPAS1-Sp87	CCACACAGACTATTGTGAGG (서열번호 731)
EPAS1-Sp88	TAGCCACACAGACTATTGTG (서열번호 732)
EPAS1-Sp89	CAATAGTCTGTGTGGCTACA (서열번호 733)
EPAS1-Sp90	ATGATGAGGCAGGACAGCAG (서열번호 734)
EPAS1-Sp91	GATGATGAGGCAGGACAGCA (서열번호 735)
EPAS1-Sp92	TGATGATGAGGCAGGACAGC (서열번호 736)
EPAS1-Sp93	TTCACACATGATGATGAGGC (서열번호 737)
EPAS1-Sp94	TTGGTTCACACATGATGATG (서열번호 738)
EPAS1-Sp95	ATGTGGGATGGGTGCTGGAT (서열번호 739)
EPAS1-Sp96	AATCCAGCACCCATCCCACA (서열번호 740)
EPAS1-Sp97	TGTCCATGTGGGATGGGTGC (서열번호 741)
EPAS1-Sp98	GGGGGATGTCCATGTGGGAT (서열번호 742)
EPAS1-Sp99	AGGGGGATGTCCATGTGGGA (서열번호 743)
EPAS1-Sp100	ATCCCACATGGACATCCCCC (서열번호 744)
EPAS1-Sp101	ATCCAGGGGGATGTCCATGT (서열번호 745)
EPAS1-Sp102	TATCCAGGGGGATGTCCATG (서열번호 746)
EPAS1-Sp103	GGAAGGTCTTGCTATCCAGG (서열번호 747)
EPAS1-Sp104	AGGAAGGTCTTGCTATCCAG (서열번호 748)
EPAS1-Sp105	CAGGAAGGTCTTGCTATCCA (서열번호 749)
EPAS1-Sp106	TCAGGAAGGTCTTGCTATCC (서열번호 750)
EPAS1-Sp107	CATGCTGTGGCGGCTCAGGA (서열번호 751)

[1610]

EPAS1-Sp108	CTTCCTGAGCCGCCACAGCA (서열번호 752)
EPAS1-Sp109	TGTCCATGCTGTGGCGGCTC (서열번호 753)
EPAS1-Sp110	ACTTCATGTCCATGCTGTGG (서열번호 754)
EPAS1-Sp111	TGAACTTCATGTCCATGCTG (서열번호 755)
EPAS1-Sp112	AGTTCACCTACTGTGATGAC (서열번호 756)
EPAS1-Sp113	CACCTACTGTGATGACAGGT (서열번호 757)
EPAS1-Sp114	ACCTACTGTGATGACAGGTA (서열번호 758)
EPAS1-Sp115	CCCCTACCTGTCATCACAGT (서열번호 759)
EPAS1-Sp116	CTCAGAATCACAGAACTGAT (서열번호 760)
EPAS1-Sp117	ACTGATTGGTTACCACCCTG (서열번호 761)
EPAS1-Sp118	TACCACCCTGAGGAGCTGCT (서열번호 762)
EPAS1-Sp119	GGCCAAGCAGCTCCTCAGGG (서열번호 763)
EPAS1-Sp120	AGCGGCCAAGCAGCTCCTCA (서열번호 764)
EPAS1-Sp121	GAGCGGCCAAGCAGCTCCTC (서열번호 765)
EPAS1-Sp122	GGTAGAATTCATAGGCTGAG (서열번호 766)
EPAS1-Sp123	TAGCGCATGGTAGAATTCAT (서열번호 767)
EPAS1-Sp124	TGTTCTCGGAGTCTAGCGCA (서열번호 768)
EPAS1-Sp125	GTGACTCTTGGTCATGTTCT (서열번호 769)
EPAS1-Sp126	CTCACAGTTCTGGTGACTCT (서열번호 770)
EPAS1-Sp127	ACTCCTGGAACTCACAGTTC (서열번호 771)
EPAS1-Sp128	TCCTCCCCTAGTGTGCACCA (서열번호 772)
EPAS1-Sp129	CCTCCCCTAGTGTGCACCAA (서열번호 773)
EPAS1-Sp130	CTGACCCTTGGTGCACACTA (서열번호 774)
EPAS1-Sp131	CCTAGTGTGCACCAAGGGTC (서열번호 775)
EPAS1-Sp132	CCTGACCCTTGGTGCACACT (서열번호 776)
EPAS1-Sp133	ACCAAGGGTCAGGTAGTAAG (서열번호 777)
EPAS1-Sp134	GCCACTTACTACCTGACCCT (서열번호 778)
EPAS1-Sp135	AGGTAGTAAGTGGCCAGTAC (서열번호 779)
EPAS1-Sp136	GCTTTGCGAGCATCCGGTAC (서열번호 780)
EPAS1-Sp137	TACCGGATGCTCGCAAAGCA (서열번호 781)
EPAS1-Sp138	ACCGGATGCTCGCAAAGCAT (서열번호 782)
EPAS1-Sp139	CCGGATGCTCGCAAAGCATG (서열번호 783)
EPAS1-Sp140	CCCCATGCTTTGCGAGCATC (서열번호 784)
EPAS1-Sp141	CGGATGCTCGCAAAGCATGG (서열번호 785)
EPAS1-Sp142	CAAAGCATGGGGGCTACGTG (서열번호 786)
EPAS1-Sp143	GCATGGGGGCTACGTGTGGC (서열번호 787)

[1611]

EPAS1-Sp144	CTACGTGTGGCTGGAGACCC (서열번호 788)
EPAS1-Sp145	TACGTGTGGCTGGAGACCCA (서열번호 789)
EPAS1-Sp146	ACGTGTGGCTGGAGACCCAG (서열번호 790)
EPAS1-Sp147	GTGGCTGGAGACCCAGGGGA (서열번호 791)
EPAS1-Sp148	GTTGTAGATGACCGTCCCCT (서열번호 792)
EPAS1-Sp149	GGTTGTAGATGACCGTCCCC (서열번호 793)
EPAS1-Sp150	ACTGGGGCTGCAGGTTGCGA (서열번호 794)
EPAS1-Sp151	CACTGGGGCTGCAGGTTGCG (서열번호 795)
EPAS1-Sp152	ACATGATGCACTGGGGCTGC (서열번호 796)
EPAS1-Sp153	TTGACACACATGATGCACTG (서열번호 797)
EPAS1-Sp154	GTTGACACACATGATGCACT (서열번호 798)
EPAS1-Sp155	AGTTGACACACATGATGCAC (서열번호 799)
EPAS1-Sp156	TGTGTGTCAACTACGTCCTG (서열번호 800)
EPAS1-Sp157	AGCCCTCACATGCTTACCTC (서열번호 801)
EPAS1-Sp158	TGAGATTGAGAAGAATGACG (서열번호 802)
EPAS1-Sp159	GAATGACGTGGTGTTCTCCA (서열번호 803)
EPAS1-Sp160	CAGGGATTCAGTCTGGTCCA (서열번호 804)
EPAS1-Sp161	GCTTGAACAGGGATTCAGTC (서열번호 805)
EPAS1-Sp162	CATCAGGTGGGGCTTGAACA (서열번호 806)
EPAS1-Sp163	CCTGTTCAAGCCCCACCTGA (서열번호 807)
EPAS1-Sp164	CCATCAGGTGGGGCTTGAAC (서열번호 808)
EPAS1-Sp165	CTGTTCATGGCCATCAGGTG (서열번호 809)
EPAS1-Sp166	GCTGTTCATGGCCATCAGGT (서열번호 810)
EPAS1-Sp167	TGCTGTTCATGGCCATCAGG (서열번호 811)
EPAS1-Sp168	AGATGCTGTTCATGGCCATC (서열번호 812)
EPAS1-Sp169	GCTATCAAAGATGCTGTTCA (서열번호 813)
EPAS1-Sp170	AACAGCATCTTTGATAGCAG (서열번호 814)
EPAS1-Sp171	CATCTTTGATAGCAGTGGCA (서열번호 815)
EPAS1-Sp172	ATCTTTGATAGCAGTGGCAA (서열번호 816)
EPAS1-Sp173	TCTTTGATAGCAGTGGCAAG (서열번호 817)
EPAS1-Sp174	CTTTGATAGCAGTGGCAAGG (서열번호 818)
EPAS1-Sp175	CTTCCTATTCACCAAGCTAA (서열번호 819)
EPAS1-Sp176	CCTATTCACCAAGCTAAAGG (서열번호 820)
EPAS1-Sp177	CCTCCTTTAGCTTGGTGAAT (서열번호 821)
EPAS1-Sp178	CTCGGGCTCCTCCTTTAGCT (서열번호 822)
EPAS1-Sp179	CAAGCTAAAGGAGGAGCCCG (서열번호 823)

[1612]

EPAS1-Sp180	AAAGGAGGAGCCCGAGGAGC (서열번호 824)
EPAS1-Sp181	GCCCGAGGAGCTGGCCCAGC (서열번호 825)
EPAS1-Sp182	GCCAGCTGGGCCAGCTCCTC (서열번호 826)
EPAS1-Sp183	AGCCAGCTGGGCCAGCTCCT (서열번호 827)
EPAS1-Sp184	GCCCAGCTGGCTCCCACCCC (서열번호 828)
EPAS1-Sp185	TCCTGGGGTGGGAGCCAGCT (서열번호 829)
EPAS1-Sp186	CTCCTGGGGTGGGAGCCAGC (서열번호 830)
EPAS1-Sp187	ATGATGGCGTCTCCTGGGGT (서열번호 831)
EPAS1-Sp188	GATGATGGCGTCTCCTGGGG (서열번호 832)
EPAS1-Sp189	AGAGATGATGGCGTCTCCTG (서열번호 833)
EPAS1-Sp190	GAGAGATGATGGCGTCTCCT (서열번호 834)
EPAS1-Sp191	AGAGAGATGATGGCGTCTCC (서열번호 835)
EPAS1-Sp192	AGGAGACGCCATCATCTCTC (서열번호 836)
EPAS1-Sp193	GCCATCATCTCTCTGGATTT (서열번호 837)
EPAS1-Sp194	ACCGAAATCCAGAGAGATGA (서열번호 838)
EPAS1-Sp195	ATCATCTCTCTGGATTTCGG (서열번호 839)
EPAS1-Sp196	TCATCTCTCTGGATTTCGGT (서열번호 840)
EPAS1-Sp197	CTCGAAGTTCTGATTCCCTG (서열번호 841)
EPAS1-Sp198	CACAGGGAATCAGAACTTCG (서열번호 842)
EPAS1-Sp199	TTCGAGGAGTCCTCAGCCTA (서열번호 843)
EPAS1-Sp200	GGAGTCCTCAGCCTATGGCA (서열번호 844)
EPAS1-Sp201	GATGGCCTTGCCATAGGCTG (서열번호 845)
EPAS1-Sp202	GGGCAGGATGGCCTTGCCAT (서열번호 846)
EPAS1-Sp203	TGGCTGGCTCGGGGGCAGGA (서열번호 847)
EPAS1-Sp204	TCCTGCCCCCGAGCCAGCCA (서열번호 848)
EPAS1-Sp205	CCTGCCCCCGAGCCAGCCAT (서열번호 849)
EPAS1-Sp206	CCCATGGCTGGCTCGGGGGC (서열번호 850)
EPAS1-Sp207	GTGGCCCATGGCTGGCTCGG (서열번호 851)
EPAS1-Sp208	CGTGGCCCATGGCTGGCTCG (서열번호 852)
EPAS1-Sp209	CCCGAGCCAGCCATGGGCCA (서열번호 853)
EPAS1-Sp210	CCGTGGCCCATGGCTGGCTC (서열번호 854)
EPAS1-Sp211	TCCGTGGCCCATGGCTGGCT (서열번호 855)
EPAS1-Sp212	TCAACTCCGTGGCCCATGGC (서열번호 856)
EPAS1-Sp213	AGCCATGGGCCACGGAGTTG (서열번호 857)
EPAS1-Sp214	CTCCTCAACTCCGTGGCCCA (서열번호 858)
EPAS1-Sp215	GCTGTGGCTCCTCAACTCCG (서열번호 859)

[1613]

EPAS1-Sp216	GAGCCACAGCACCCAGAGCG (서열번호 860)
EPAS1-Sp217	CAGCCTCGCTCTGGGTGCTG (서열번호 861)
EPAS1-Sp218	CACAGCACCCAGAGCGAGGC (서열번호 862)
EPAS1-Sp219	ACAGCACCCAGAGCGAGGCT (서열번호 863)
EPAS1-Sp220	CAGGCTCCCAGCCTCGCTCT (서열번호 864)
EPAS1-Sp221	GCAGGCTCCCAGCCTCGCTC (서열번호 865)
EPAS1-Sp222	GGGGCACGGTGAAGGCAGGC (서열번호 866)
EPAS1-Sp223	GCCTGCCTTCACCGTGCCCC (서열번호 867)
EPAS1-Sp224	GCCTGGGGCACGGTGAAGGC (서열번호 868)
EPAS1-Sp225	AGCTGCCTGGGGCACGGTGA (서열번호 869)
EPAS1-Sp226	CGGGGCAGCTGCCTGGGGCA (서열번호 870)
EPAS1-Sp227	CGTGCCCCAGGCAGCTGCCC (서열번호 871)
EPAS1-Sp228	GTGCCCCAGGCAGCTGCCCC (서열번호 872)
EPAS1-Sp229	CTGCCCGGGGCAGCTGCCTG (서열번호 873)
EPAS1-Sp230	GCTGCCCGGGGCAGCTGCCT (서열번호 874)
EPAS1-Sp231	TGCTGCCCGGGGCAGCTGCC (서열번호 875)
EPAS1-Sp232	ACTGGGGGTGGTGCTGCCCG (서열번호 876)
EPAS1-Sp233	CACTGGGGGTGGTGCTGCCC (서열번호 877)
EPAS1-Sp234	GCACTGGGGGTGGTGCTGCC (서열번호 878)
EPAS1-Sp235	GCTGCTGGTGGCACTGGGGG (서열번호 879)
EPAS1-Sp236	GCTGCTGCTGGTGGCACTGG (서열번호 880)
EPAS1-Sp237	TGCTGCTGCTGGTGGCACTG (서열번호 881)
EPAS1-Sp238	CTGCTGCTGCTGGTGGCACT (서열번호 882)
EPAS1-Sp239	GCTGCTGCTGCTGGTGGCAC (서열번호 883)
EPAS1-Sp240	GCAGCTGCTGCTGCTGCTGG (서열번호 884)
EPAS1-Sp241	CAGCAGCAGCAGCTGCTCCA (서열번호 885)
EPAS1-Sp242	TCTTCAGGGCTATTGGGCTA (서열번호 886)
EPAS1-Sp243	GTCTTCAGGGCTATTGGGCT (서열번호 887)
EPAS1-Sp244	TAATAGTCTTCAGGGCTATT (서열번호 888)
EPAS1-Sp245	GTAATAGTCTTCAGGGCTAT (서열번호 889)
EPAS1-Sp246	AAGATGTGTAATAGTCTTCA (서열번호 890)
EPAS1-Sp247	AAAGATGTGTAATAGTCTTC (서열번호 891)
EPAS1-Sp248	TGAAGACTATTACACATCTT (서열번호 892)
EPAS1-Sp249	TCTCAATCACTTCAATCTTC (서열번호 893)
EPAS1-Sp250	GATTGAGAAGCTCTTCGCCA (서열번호 894)
EPAS1-Sp251	GCTCTTCGCCATGGACACAG (서열번호 895)

[1614]

EPAS1-Sp252	CGCCATGGACACAGAGGCCA (서열번호 896)
EPAS1-Sp253	GTCCTTGGCCTCTGTGTCCA (서열번호 897)
EPAS1-Sp254	CTGGGTACTGCATTGGTCCT (서열번호 898)
EPAS1-Sp255	CAAGGACCAATGCAGTACCC (서열번호 899)
EPAS1-Sp256	CATCTACCTGGGTACTGCAT (서열번호 900)
EPAS1-Sp257	AGCTCATTGAAATCCGTCTG (서열번호 901)
EPAS1-Sp258	TCAGACGGATTTCAATGAGC (서열번호 902)
EPAS1-Sp259	GGATTTCAATGAGCTGGACT (서열번호 903)
EPAS1-Sp260	TGAGCTGGACTTGGAGACAC (서열번호 904)
EPAS1-Sp261	ACTGGCACCCTATATCCCCA (서열번호 905)
EPAS1-Sp262	GCACCCTATATCCCCATGGA (서열번호 906)
EPAS1-Sp263	CACCCTATATCCCCATGGAC (서열번호 907)
EPAS1-Sp264	ACCCTATATCCCCATGGACG (서열번호 908)
EPAS1-Sp265	TCCCCGTCCATGGGGATATA (서열번호 909)
EPAS1-Sp266	TTCCCCGTCCATGGGGATAT (서열번호 910)
EPAS1-Sp267	GGAAGTCTTCCCCGTCCATG (서열번호 911)
EPAS1-Sp268	TGGAAGTCTTCCCCGTCCAT (서열번호 912)
EPAS1-Sp269	CTGGAAGTCTTCCCCGTCCA (서열번호 913)
EPAS1-Sp270	CGGGGCAGATGGGGCTTAGC (서열번호 914)
EPAS1-Sp271	GCTAAGCCCCATCTGCCCCG (서열번호 915)
EPAS1-Sp272	GCCCCATCTGCCCCGAGGAG (서열번호 916)
EPAS1-Sp273	GCCGCTCCTCGGGGCAGATG (서열번호 917)
EPAS1-Sp274	AGCCGCTCCTCGGGGCAGAT (서열번호 918)
EPAS1-Sp275	GAGCCGCTCCTCGGGGCAGA (서열번호 919)
EPAS1-Sp276	CTGCCCCGAGGAGCGGCTCT (서열번호 920)
EPAS1-Sp277	CCCCGAGGAGCGGCTCTTGG (서열번호 921)
EPAS1-Sp278	CCGCCAAGAGCCGCTCCTCG (서열번호 922)
EPAS1-Sp279	TCCGCCAAGAGCCGCTCCTC (서열번호 923)
EPAS1-Sp280	CTCCGCCAAGAGCCGCTCCT (서열번호 924)
EPAS1-Sp281	AGTGCTGGGGGGTGGACTGT (서열번호 925)
EPAS1-Sp282	CAGTGCTGGGGGGTGGACTG (서열번호 926)
EPAS1-Sp283	ACTGAAGCAGTGCTGGGGGG (서열번호 927)
EPAS1-Sp284	GGCACTGAAGCAGTGCTGGG (서열번호 928)
EPAS1-Sp285	TGGCACTGAAGCAGTGCTGG (서열번호 929)
EPAS1-Sp286	ATGGCACTGAAGCAGTGCTG (서열번호 930)
EPAS1-Sp287	CATGGCACTGAAGCAGTGCT (서열번호 931)

[1615]

EPAS1-Sp288	TCATGGCACTGAAGCAGTGC (서열번호 932)
EPAS1-Sp289	TGGCTGGAAGATGTTTGTCA (서열번호 933)
EPAS1-Sp290	GACAAACATCTTCCAGCCAC (서열번호 934)
EPAS1-Sp291	GGGCTACAGGGGCCAGTGGC (서열번호 935)
EPAS1-Sp292	TGCGGGGCTACAGGGGCCAG (서열번호 936)
EPAS1-Sp293	GGGACTGTGCGGGGCTACAG (서열번호 937)
EPAS1-Sp294	AGGGACTGTGCGGGGCTACA (서열번호 938)
EPAS1-Sp295	AAGGGACTGTGCGGGGCTAC (서열번호 939)
EPAS1-Sp296	CAGGAGGAAGGGACTGTGCG (서열번호 940)
EPAS1-Sp297	CCCGCACAGTCCCTTCCTCC (서열번호 941)
EPAS1-Sp298	CCAGGAGGAAGGGACTGTGC (서열번호 942)
EPAS1-Sp299	TCCAGGAGGAAGGGACTGTG (서열번호 943)
EPAS1-Sp300	TGAAACTTGTCCAGGAGGAA (서열번호 944)
EPAS1-Sp301	CTGAAACTTGTCCAGGAGGA (서열번호 945)
EPAS1-Sp302	GCTGCTGAAACTTGTCCAGG (서열번호 946)
EPAS1-Sp303	GCTGCTGCTGAAACTTGTCC (서열번호 947)
EPAS1-Sp304	GGACAAGTTTCAGCAGCAGC (서열번호 948)
EPAS1-Sp305	AGAAGACAGAGCCCGAGCAC (서열번호 949)
EPAS1-Sp306	GAGGACATGGGCCGGTGCTC (서열번호 950)
EPAS1-Sp307	GGAGGACATGGGCCGGTGCT (서열번호 951)
EPAS1-Sp308	AGAAGATGGAGGACATGGGC (서열번호 952)
EPAS1-Sp309	TCAAAGAAGATGGAGGACAT (서열번호 953)
EPAS1-Sp310	ATCAAAGAAGATGGAGGACA (서열번호 954)
EPAS1-Sp311	TCCTCCATCTTCTTTGATGC (서열번호 955)
EPAS1-Sp312	TCCGGCATCAAAGAAGATGG (서열번호 956)
EPAS1-Sp313	GCTTCCGGCATCAAAGAAGA (서열번호 957)
EPAS1-Sp314	TGGCAGGGATGCTTTGCTTC (서열번호 958)
EPAS1-Sp315	GCATCCCTGCCACCGTGCTG (서열번호 959)
EPAS1-Sp316	CTGGCCACAGCACGGTGGCA (서열번호 960)
EPAS1-Sp317	CCTGCCACCGTGCTGTGGCC (서열번호 961)
EPAS1-Sp318	CCTGGCCACAGCACGGTGGC (서열번호 962)
EPAS1-Sp319	CTGGCCTGGCCACAGCACGG (서열번호 963)
EPAS1-Sp320	GTGCTGGCCTGGCCACAGCA (서열번호 964)
EPAS1-Sp321	AAGAGAGAGGGGTGCTGGCC (서열번호 965)
EPAS1-Sp322	CATGGAAGAGAGAGGGGTGC (서열번호 966)
EPAS1-Sp323	CAGCACCCCTCTCTCTTCCA (서열번호 967)

[1616]

EPAS1-Sp324	AGCACCCCTCTCTCTTCCAT (서열번호 968)
EPAS1-Sp325	GCACCCCTCTCTCTTCCATG (서열번호 969)
EPAS1-Sp326	CACCCCTCTCTCTTCCATGG (서열번호 970)
EPAS1-Sp327	ACCCCTCTCTCTTCCATGGG (서열번호 971)
EPAS1-Sp328	GCCCCCCATGGAAGAGAGAG (서열번호 972)
EPAS1-Sp329	TGCCCCCCATGGAAGAGAGA (서열번호 973)
EPAS1-Sp330	CTGCCCCCCATGGAAGAGAG (서열번호 974)
EPAS1-Sp331	GGTATTGGATCTGCCCCCCA (서열번호 975)
EPAS1-Sp332	GGGGCAGATCCAATACCCAG (서열번호 976)
EPAS1-Sp333	ATCTGGGGGCCACTGGGTAT (서열번호 977)
EPAS1-Sp334	TGGTGGATCTGGGGGCCACT (서열번호 978)
EPAS1-Sp335	ATGGTGGATCTGGGGGCCAC (서열번호 979)
EPAS1-Sp336	AAATGTAATGGTGGATCTGG (서열번호 980)
EPAS1-Sp337	AAAATGTAATGGTGGATCTG (서열번호 981)
EPAS1-Sp338	CAAAATGTAATGGTGGATCT (서열번호 982)
EPAS1-Sp339	CCAGATCCACCATTACATTT (서열번호 983)
EPAS1-Sp340	CCAAAATGTAATGGTGGATC (서열번호 984)
EPAS1-Sp341	CAGATCCACCATTACATTTT (서열번호 985)
EPAS1-Sp342	GTGGGCCCAAAATGTAATGG (서열번호 986)
EPAS1-Sp343	TTTGTGGGCCCAAAATGTAA (서열번호 987)
EPAS1-Sp344	TACATTTTGGGCCCACAAAG (서열번호 988)
EPAS1-Sp345	ACATTTTGGGCCCACAAAGT (서열번호 989)
EPAS1-Sp346	GGGCCCACAAAGTGGGCCGT (서열번호 990)
EPAS1-Sp347	GGCCCACAAAGTGGGCCGTC (서열번호 991)
EPAS1-Sp348	GCCCACAAAGTGGGCCGTCG (서열번호 992)
EPAS1-Sp349	TCCCCGACGGCCCACTTTGT (서열번호 993)
EPAS1-Sp350	ATCCCCGACGGCCCACTTTG (서열번호 994)
EPAS1-Sp351	CTCTGTGCGCTGATCCCCGA (서열번호 995)
EPAS1-Sp352	GGATCAGCGCACAGAGTTCT (서열번호 996)
EPAS1-Sp353	GATCAGCGCACAGAGTTCTT (서열번호 997)
EPAS1-Sp354	GTTCTTGGGAGCAGCGCCGT (서열번호 998)
EPAS1-Sp355	TTCTTGGGAGCAGCGCCGTT (서열번호 999)
EPAS1-Sp356	TCTTGGGAGCAGCGCCGTTG (서열번호 1000)
EPAS1-Sp357	GGAGAGACAGGGGGCCCCAA (서열번호 1001)
EPAS1-Sp358	ACATGGGGTGGAGAGACAGG (서열번호 1002)
EPAS1-Sp359	GACATGGGGTGGAGAGACAG (서열번호 1003)

[1617]

EPAS1-Sp360	AGACATGGGGTGGAGAGACA (서열번호 1004)
EPAS1-Sp361	GAGACATGGGGTGGAGAGAC (서열번호 1005)
EPAS1-Sp362	TTGAAGGTGGAGACATGGGG (서열번호 1006)
EPAS1-Sp363	GTCTTGAAGGTGGAGACATG (서열번호 1007)
EPAS1-Sp364	TGTCTTGAAGGTGGAGACAT (서열번호 1008)
EPAS1-Sp365	TTGTCTTGAAGGTGGAGACA (서열번호 1009)
EPAS1-Sp366	ATGTCTCCACCTTCAAGACA (서열번호 1010)
EPAS1-Sp367	TGCCACTTACCTTGTCTTGA (서열번호 1011)
EPAS1-Sp368	CGGGCTTGGCAGGTCTGCAA (서열번호 1012)
EPAS1-Sp369	GGGCTTGGCAGGTCTGCAAA (서열번호 1013)
EPAS1-Sp370	GGCAGGTCTGCAAAGGGTTT (서열번호 1014)
EPAS1-Sp371	GCAGGTCTGCAAAGGGTTTT (서열번호 1015)
EPAS1-Sp372	CAGGTCTGCAAAGGGTTTTG (서열번호 1016)
EPAS1-Sp373	GCAAAGGGTTTTGGGGCTCG (서열번호 1017)
EPAS1-Sp374	AGGCCCAGACGTGCTGAGTC (서열번호 1018)
EPAS1-Sp375	TGGCCGGACTCAGCACGTCT (서열번호 1019)
EPAS1-Sp376	ATGGCCGGACTCAGCACGTC (서열번호 1020)
EPAS1-Sp377	AGACGTGCTGAGTCCGGCCA (서열번호 1021)
EPAS1-Sp378	TTGGAGAGGGCTACCATGGC (서열번호 1022)
EPAS1-Sp379	CTTGTTGGAGAGGGCTACCA (서열번호 1023)
EPAS1-Sp380	CAGCTTCAGCTTGTTGGAGA (서열번호 1024)
EPAS1-Sp381	TCAGCTTCAGCTTGTTGGAG (서열번호 1025)
EPAS1-Sp382	TCGCTTCAGCTTCAGCTTGT (서열번호 1026)
EPAS1-Sp383	GCTGAAGCTGAAGCGACAGC (서열번호 1027)
EPAS1-Sp384	GTATGAAGAGCAAGCCTTCC (서열번호 1028)
EPAS1-Sp385	CAAGCCTTCCAGGACCTGAG (서열번호 1029)
EPAS1-Sp386	AAGCCTTCCAGGACCTGAGC (서열번호 1030)
EPAS1-Sp387	AGCCTTCCAGGACCTGAGCG (서열번호 1031)
EPAS1-Sp388	CACCCCGCTCAGGTCCTGGA (서열번호 1032)
EPAS1-Sp389	GACTCACCCCGCTCAGGTCC (서열번호 1033)
EPAS1-Sp390	GGGGATGACTCACCCCGCTC (서열번호 1034)
EPAS1-Sp391	TACTCCCAGGGGGACCCACC (서열번호 1035)
EPAS1-Sp392	TCCCAGGGGGACCCACCTGG (서열번호 1036)
EPAS1-Sp393	GCCACCAGGTGGGTCCCCCT (서열번호 1037)
EPAS1-Sp394	TGCCACCAGGTGGGTCCCCC (서열번호 1038)
EPAS1-Sp395	GTGAGGTGCTGCCACCAGGT (서열번호 1039)

[1618]

EPAS1-Sp396	TGTGAGGTGCTGCCACCAGG (서열번호 1040)
EPAS1-Sp397	AAATGTGAGGTGCTGCCACC (서열번호 1041)
EPAS1-Sp398	GCAGCACCTCACATTTGATG (서열번호 1042)
EPAS1-Sp399	CCTCACATTTGATGTGGAAA (서열번호 1043)
EPAS1-Sp400	CCGTTTCCACATCAAATGTG (서열번호 1044)
EPAS1-Sp401	GGAAACGGATGAAGAACCTC (서열번호 1045)
EPAS1-Sp402	GAAACGGATGAAGAACCTCA (서열번호 1046)
EPAS1-Sp403	AAACGGATGAAGAACCTCAG (서열번호 1047)
EPAS1-Sp404	CGGATGAAGAACCTCAGGGG (서열번호 1048)
EPAS1-Sp405	GGATGAAGAACCTCAGGGGT (서열번호 1049)
EPAS1-Sp406	AAGGGCAGCTCCCACCCCTG (서열번호 1050)
EPAS1-Sp407	TGGGAGCTGCCCTTTGATGC (서열번호 1051)
EPAS1-Sp408	GTGGCTTGTCCGGCATCAAA (서열번호 1052)
EPAS1-Sp409	AGTGGCTTGTCCGGCATCAA (서열번호 1053)
EPAS1-Sp410	TTTGCGCTCAGTGGCTTGTC (서열번호 1054)
EPAS1-Sp411	TTGGGTACATTTGCGCTCAG (서열번호 1055)
EPAS1-Sp412	CTGAGCGCAAATGTACCCAA (서열번호 1056)
EPAS1-Sp413	TGTGGCCGCTGCTCACCATT (서열번호 1057)
EPAS1-Sp414	CTGTGGCCGCTGCTCACCAT (서열번호 1058)
EPAS1-Sp415	AGTTCACCCAAAACCCCATG (서열번호 1059)
EPAS1-Sp416	GTTCACCCAAAACCCCATGA (서열번호 1060)
EPAS1-Sp417	TTCACCCAAAACCCCATGAG (서열번호 1061)
EPAS1-Sp418	CAGGCCCCTCATGGGGTTTT (서열번호 1062)
EPAS1-Sp419	CCAAAACCCCATGAGGGGCC (서열번호 1063)
EPAS1-Sp420	CCAGGCCCCTCATGGGGTTT (서열번호 1064)
EPAS1-Sp421	CAAAACCCCATGAGGGGCCT (서열번호 1065)
EPAS1-Sp422	GATGGCCCAGGCCCCTCATG (서열번호 1066)
EPAS1-Sp423	GGATGGCCCAGGCCCCTCAT (서열번호 1067)
EPAS1-Sp424	GGGATGGCCCAGGCCCCTCA (서열번호 1068)
EPAS1-Sp425	GATGTCTCAGGGGATGGCCC (서열번호 1069)
EPAS1-Sp426	GCGGCAGATGTCTCAGGGGA (서열번호 1070)
EPAS1-Sp427	GGCAGCGGCAGATGTCTCAG (서열번호 1071)
EPAS1-Sp428	TGGCAGCGGCAGATGTCTCA (서열번호 1072)
EPAS1-Sp429	GTGGCAGCGGCAGATGTCTC (서열번호 1073)
EPAS1-Sp430	GCAGATGGAGGCTGTGGCAG (서열번호 1074)
EPAS1-Sp431	CTGATGGCAGATGGAGGCTG (서열번호 1075)

[1619]

EPAS1-Sp432	CCTCCATCTGCCATCAGTCC (서열번호 1076)
EPAS1-Sp433	CCGGGACTGATGGCAGATGG (서열번호 1077)
EPAS1-Sp434	CTCCATCTGCCATCAGTCCC (서열번호 1078)
EPAS1-Sp435	TCCATCTGCCATCAGTCCCG (서열번호 1079)
EPAS1-Sp436	TCCCCGGGACTGATGGCAGA (서열번호 1080)
EPAS1-Sp437	GCTGTTCTCCCCGGGACTGA (서열번호 1081)
EPAS1-Sp438	CTGCTCTTGCTGTTCTCCCC (서열번호 1082)
EPAS1-Sp439	CCGGGGAGAACAGCAAGAGC (서열번호 1083)
EPAS1-Sp440	CCTGCTCTTGCTGTTCTCCC (서열번호 1084)
EPAS1-Sp441	GGGTGGCGTAGCACTGTGGG (서열번호 1085)
EPAS1-Sp442	TGGGTGGCGTAGCACTGTGG (서열번호 1086)
EPAS1-Sp443	CTGGGTGGCGTAGCACTGTG (서열번호 1087)
EPAS1-Sp444	ACTGGGTGGCGTAGCACTGT (서열번호 1088)
EPAS1-Sp445	TACTGGGTGGCGTAGCACTG (서열번호 1089)
EPAS1-Sp446	GTGCTACGCCACCCAGTACC (서열번호 1090)
EPAS1-Sp447	GCTGTAGTCCTGGTACTGGG (서열번호 1091)
EPAS1-Sp448	CAGGCTGTAGTCCTGGTACT (서열번호 1092)
EPAS1-Sp449	ACAGGCTGTAGTCCTGGTAC (서열번호 1093)
EPAS1-Sp450	CTGACGACAGGCTGTAGTCC (서열번호 1094)
EPAS1-Sp451	CAGCCTGTCGTCAGCCCACA (서열번호 1095)
EPAS1-Sp452	ACACCTTGTGGGCTGACGAC (서열번호 1096)
EPAS1-Sp453	TCGTCAGCCCACAAGGTGTC (서열번호 1097)
EPAS1-Sp454	TCAGCCCACAAGGTGTCAGG (서열번호 1098)
EPAS1-Sp455	CAGCCCACAAGGTGTCAGGT (서열번호 1099)
EPAS1-Sp456	ACACCCACCTGACACCTTGT (서열번호 1100)
EPAS1-Sp457	CACACCCACCTGACACCTTG (서열번호 1101)
EPAS1-Sp458	ACCAACCCTTCTTTCAGGCA (서열번호 1102)
EPAS1-Sp459	TTCTTTCAGGCATGGCAAGC (서열번호 1103)
EPAS1-Sp460	GGCATGGCAAGCCGGCTGCT (서열번호 1104)
EPAS1-Sp461	GCATGGCAAGCCGGCTGCTC (서열번호 1105)
EPAS1-Sp462	CAAATGAGGGCCCGAGCAGC (서열번호 1106)
EPAS1-Sp463	AGCAGGTAGGACTCAAATGA (서열번호 1107)
EPAS1-Sp464	CAGCAGGTAGGACTCAAATG (서열번호 1108)
EPAS1-Sp465	GGTCAGTTCGGGCAGCAGGT (서열번호 1109)
EPAS1-Sp466	ATCTGGTCAGTTCGGGCAGC (서열번호 1110)
EPAS1-Sp467	CAGTCATATCTGGTCAGTTC (서열번호 1111)

[1620]

EPAS1-Sp468	ACAGTCATATCTGGTCAGTT (서열번호 1112)
EPAS1-Sp469	ACTGACCAGATATGACTGTG (서열번호 1113)
EPAS1-Sp470	GTTCACCTCACAGTCATATC (서열번호 1114)
EPAS1-Sp471	TGAGGTGAACGTGCCCGTGC (서열번호 1115)
EPAS1-Sp472	GAGGTGAACGTGCCCGTGCT (서열번호 1116)
EPAS1-Sp473	AGCGTGGAGCTTCCCAGCAC (서열번호 1117)
EPAS1-Sp474	GAGCGTGGAGCTTCCCAGCA (서열번호 1118)
EPAS1-Sp475	GGAAGCTCCACGCTCCTGCA (서열번호 1119)
EPAS1-Sp476	AGCTCCACGCTCCTGCAAGG (서열번호 1120)
EPAS1-Sp477	GCTCCACGCTCCTGCAAGGA (서열번호 1121)
EPAS1-Sp478	CTCCACGCTCCTGCAAGGAG (서열번호 1122)
EPAS1-Sp479	GTCCCCTCCTTGCAGGAGCG (서열번호 1123)
EPAS1-Sp480	TGAGGAGGTCCCCTCCTTGC (서열번호 1124)
EPAS1-Sp481	AGGGGACCTCCTCAGAGCCC (서열번호 1125)
EPAS1-Sp482	CCTCCTCAGAGCCCTGGACC (서열번호 1126)
EPAS1-Sp483	CCTGGTCCAGGGCTCTGAGG (서열번호 1127)
EPAS1-Sp484	TGGCCTGGTCCAGGGCTCTG (서열번호 1128)
EPAS1-Sp485	GGCTCAGGTGGCCTGGTCCA (서열번호 1129)
EPAS1-Sp486	TGGCTCAGGTGGCCTGGTCC (서열번호 1130)
EPAS1-Sp487	TGGACCAGGCCACCTGAGCC (서열번호 1131)
EPAS1-Sp488	AAGGCCTGGCTCAGGTGGCC (서열번호 1132)
EPAS1-Sp489	GGTAGAAGGCCTGGCTCAGG (서열번호 1133)

[1621]

[1622] [표 13]

[1623] SpCas9을 ANGPT2 유전자의 표적 서열(Target sequences of ANGPT2 gene for SpCas9)

[1624]

Gene	Target sequence
ANGPT2-Sp1	TCTGAGCTGTGATCTTGTCT (서열번호 1134)
ANGPT2-Sp2	CCGCAGCCTATAACAACTTT (서열번호 1135)
ANGPT2-Sp3	CCGAAAGTTGTTATAGGCTG (서열번호 1136)
ANGPT2-Sp4	GCTCTTCCGAAAGTTGTTAT (서열번호 1137)
ANGPT2-Sp5	TAACAACTTTCGGAAGAGCA (서열번호 1138)
ANGPT2-Sp6	CGGAAGAGCATGGACAGCAT (서열번호 1139)
ANGPT2-Sp7	CATAGGAAAGAAGCAATATC (서열번호 1140)
ANGPT2-Sp8	AAGCAATATCAGGTCCAGCA (서열번호 1141)
ANGPT2-Sp9	AGCAATATCAGGTCCAGCAT (서열번호 1142)
ANGPT2-Sp10	TGTAGCTGCAGGACCCATGC (서열번호 1143)
ANGPT2-Sp11	CAGGAGGAAAGTGTAGCTGC (서열번호 1144)
ANGPT2-Sp12	CACTTTCCTCCTGCCAGAGA (서열번호 1145)
ANGPT2-Sp13	AGTTGTCCATCTCTGGCAGG (서열번호 1146)
ANGPT2-Sp14	GGCAGTTGTCCATCTCTGGC (서열번호 1147)
ANGPT2-Sp15	GAGCGGCAGTTGTCCATCTC (서열번호 1148)
ANGPT2-Sp16	CGTAGGGGCTGGAGGAAGAG (서열번호 1149)
ANGPT2-Sp17	ATTGGACACGTAGGGGCTGG (서열번호 1150)
ANGPT2-Sp18	AGCATTGGACACGTAGGGGC (서열번호 1151)
ANGPT2-Sp19	GCACAGCATTGGACACGTAG (서열번호 1152)
ANGPT2-Sp20	TGCACAGCATTGGACACGTA (서열번호 1153)
ANGPT2-Sp21	CTGCACAGCATTGGACACGT (서열번호 1154)
ANGPT2-Sp22	ACGTGTCCAATGCTGTGCAG (서열번호 1155)
ANGPT2-Sp23	CGTGTCCAATGCTGTGCAGA (서열번호 1156)
ANGPT2-Sp24	CGCGTCCCTCTGCACAGCAT (서열번호 1157)
ANGPT2-Sp25	GCCGCTCGAATACGATGACT (서열번호 1158)
ANGPT2-Sp26	ACCGAGTCATCGTATTCGAG (서열번호 1159)
ANGPT2-Sp27	AATACGATGACTCGGTGCAG (서열번호 1160)
ANGPT2-Sp28	GGTGCAGAGGCTGCAAGTGC (서열번호 1161)
ANGPT2-Sp29	GCAAGTGCTGGAGAACATCA (서열번호 1162)
ANGPT2-Sp30	TCATGGAAAACAACACTCAG (서열번호 1163)
ANGPT2-Sp31	CAACACTCAGTGGCTAATGA (서열번호 1164)
ANGPT2-Sp32	ACTCAGTGGCTAATGAAGGT (서열번호 1165)
ANGPT2-Sp33	CTAGCTTGAGAATTATATCC (서열번호 1166)
ANGPT2-Sp34	TTTCTTTCTTCATGTTGTCC (서열번호 1167)
ANGPT2-Sp35	GGACAACATGAAGAAAGAAA (서열번호 1168)

[1625]

ANGPT2-Sp36	GAATGCAGTACAGAACCAGA (서열번호 1169)
ANGPT2-Sp37	TTTCTATCATCACAGCCGTC (서열번호 1170)
ANGPT2-Sp38	ACGGCTGTGATGATAGAAAT (서열번호 1171)
ANGPT2-Sp39	CGGCTGTGATGATAGAAATA (서열번호 1172)
ANGPT2-Sp40	AAACCTGTTGAACCAAACAG (서열번호 1173)
ANGPT2-Sp41	GCTCCGCTGTTTGGTTCAAC (서열번호 1174)
ANGPT2-Sp42	ACCAAACAGCGGAGCAAACG (서열번호 1175)
ANGPT2-Sp43	TCCGCGTTTGCTCCGCTGTT (서열번호 1176)
ANGPT2-Sp44	AACGCGGAAGTTAACTGATG (서열번호 1177)
ANGPT2-Sp45	CTAGCTTGAGAATTATATCC (서열번호 1178)
ANGPT2-Sp46	TTTCTTTCTTCATGTTGTCC (서열번호 1179)
ANGPT2-Sp47	GGACAACATGAAGAAAGAAA (서열번호 1180)
ANGPT2-Sp48	GAATGCAGTACAGAACCAGA (서열번호 1181)
ANGPT2-Sp49	TTTCTATCATCACAGCCGTC (서열번호 1182)
ANGPT2-Sp50	ACGGCTGTGATGATAGAAAT (서열번호 1183)
ANGPT2-Sp51	CGGCTGTGATGATAGAAATA (서열번호 1184)
ANGPT2-Sp52	AAACCTGTTGAACCAAACAG (서열번호 1185)
ANGPT2-Sp53	GCTCCGCTGTTTGGTTCAAC (서열번호 1186)
ANGPT2-Sp54	ACCAAACAGCGGAGCAAACG (서열번호 1187)
ANGPT2-Sp55	TCCGCGTTTGCTCCGCTGTT (서열번호 1188)
ANGPT2-Sp56	AACGCGGAAGTTAACTGATG (서열번호 1189)
ANGPT2-Sp57	TACAAGTTTCCTAGAAAAGA (서열번호 1190)
ANGPT2-Sp58	TAGCTAGCACCTTCTTTTCT (서열번호 1191)
ANGPT2-Sp59	AGAAAAGAAGGTGCTAGCTA (서열번호 1192)
ANGPT2-Sp60	CTTCTTTTATTGACTGTAGT (서열번호 1193)
ANGPT2-Sp61	AGAAGAGAAAGATCAGCTAC (서열번호 1194)
ANGPT2-Sp62	TTCAATGATGGAATTTTGCT (서열번호 1195)
ANGPT2-Sp63	TTTTTCTAGTTCTTCAATGA (서열번호 1196)
ANGPT2-Sp64	AAAAAAAATAGTGACTGCCA (서열번호 1197)
ANGPT2-Sp65	AAGAACTGAATTATTCACCG (서열번호 1198)
ANGPT2-Sp66	GAAGCAGCAACATGATCTCA (서열번호 1199)
ANGPT2-Sp67	TGTAAACTTACAGTTTGATG (서열번호 1200)
ANGPT2-Sp68	CTATTTTTTAAAAGCAGCTA (서열번호 1201)
ANGPT2-Sp69	GTTCTTCTTTAGCAACAGTG (서열번호 1202)
ANGPT2-Sp70	TGTTCTTCTTTAGCAACAGT (서열번호 1203)
ANGPT2-Sp71	TTGTTCTTCTTTAGCAACAG (서열번호 1204)

[1626]

ANGPT2-Sp72	TGTGCTGAAGTATTCAAATC (서열번호 1205)
ANGPT2-Sp73	AAATCAGGACACACCACGAA (서열번호 1206)
ANGPT2-Sp74	TAACGTGTAGATGCCATTCG (서열번호 1207)
ANGPT2-Sp75	TGATCTCTTCTGTAGAATTA (서열번호 1208)
ANGPT2-Sp76	TTGATCTCTTCTGTAGAATT (서열번호 1209)
ANGPT2-Sp77	TAATTCTACAGAAGAGATCA (서열번호 1210)
ANGPT2-Sp78	CTACAGAAGAGATCAAGGTG (서열번호 1211)
ANGPT2-Sp79	TTTGCAGGCCTACTGTGACA (서열번호 1212)
ANGPT2-Sp80	GCCTACTGTGACATGGAAGC (서열번호 1213)
ANGPT2-Sp81	TCCAGCTTCCATGTCACAGT (서열번호 1214)
ANGPT2-Sp82	TACTGTGACATGGAAGCTGG (서열번호 1215)
ANGPT2-Sp83	TGTGACATGGAAGCTGGAGG (서열번호 1216)
ANGPT2-Sp84	GACATGGAAGCTGGAGGAGG (서열번호 1217)
ANGPT2-Sp85	ACATGGAAGCTGGAGGAGGC (서열번호 1218)
ANGPT2-Sp86	TGGAAGCTGGAGGAGGCGGG (서열번호 1219)
ANGPT2-Sp87	GACAATTATTCAGCGACGTG (서열번호 1220)
ANGPT2-Sp88	ATTATTCAGCGACGTGAGGA (서열번호 1221)
ANGPT2-Sp89	ATGGCAGCGTTGATTTTCAG (서열번호 1222)
ANGPT2-Sp90	GCGTTGATTTTCAGAGGACT (서열번호 1223)
ANGPT2-Sp91	GACTTGGAAAGAATATAAAG (서열번호 1224)
ANGPT2-Sp92	GGAAAGAATATAAAGTGGTA (서열번호 1225)
ANGPT2-Sp93	CAGGGATTTGGTAACCCTTC (서열번호 1226)
ANGPT2-Sp94	GTAACCCTTCAGGAGAATAT (서열번호 1227)
ANGPT2-Sp95	CCCTTCAGGAGAATATTGGC (서열번호 1228)
ANGPT2-Sp96	CCAGCCAATATTCTCCTGAA (서열번호 1229)
ANGPT2-Sp97	CCTTCAGGAGAATATTGGCT (서열번호 1230)
ANGPT2-Sp98	CCCAGCCAATATTCTCCTGA (서열번호 1231)
ANGPT2-Sp99	TTAAAATACACCTTAAAGAC (서열번호 1232)
ANGPT2-Sp100	TAAAATACACCTTAAAGACT (서열번호 1233)
ANGPT2-Sp101	ATACACCTTAAAGACTGGGA (서열번호 1234)
ANGPT2-Sp102	TACACCTTAAAGACTGGGAA (서열번호 1235)
ANGPT2-Sp103	CATTCCCTTCCCAGTCTTTA (서열번호 1236)
ANGPT2-Sp104	TAAAGACTGGGAAGGGAATG (서열번호 1237)
ANGPT2-Sp105	CAAGTGAAGAACTCAATTAT (서열번호 1238)
ANGPT2-Sp106	GCTTACAGGATTCACCTTAA (서열번호 1239)
ANGPT2-Sp107	ATTCACCTTAAAGGACTTAC (서열번호 1240)

[1627]

ANGPT2-Sp108	TTCACCTTAAAGGACTTACA (서열번호 1241)
ANGPT2-Sp109	CTGTCCCTGTAAGTCCTTTA (서열번호 1242)
ANGPT2-Sp110	AAAGGACTTACAGGGACAGC (서열번호 1243)
ANGPT2-Sp111	GCTGATGCTGCTTATTTTGC (서열번호 1244)
ANGPT2-Sp112	ATAAGCAGCATCAGCCAACC (서열번호 1245)
ANGPT2-Sp113	TGCTAAAATCATTTCCTGGT (서열번호 1246)
ANGPT2-Sp114	TTTGTGCTAAAATCATTTCC (서열번호 1247)
ANGPT2-Sp115	AGGAAATGATTTTAGCACAA (서열번호 1248)
ANGPT2-Sp116	AATGATTTTAGCACAAAGGA (서열번호 1249)
ANGPT2-Sp117	AAATGTTCACAAATGCTAAC (서열번호 1250)
ANGPT2-Sp118	TGTTCACAAATGCTAACAGG (서열번호 1251)
ANGPT2-Sp119	CACAAATGCTAACAGGAGGT (서열번호 1252)
ANGPT2-Sp120	ACAAATGCTAACAGGAGGTA (서열번호 1253)
ANGPT2-Sp121	GGCTGGTGGTTTGATGCATG (서열번호 1254)
ANGPT2-Sp122	TGTGGTCCTTCCAACTTGAA (서열번호 1255)
ANGPT2-Sp123	TACATTCCGTTCAAGTTGGA (서열번호 1256)
ANGPT2-Sp124	ATAGTACATTCCGTTCAAGT (서열번호 1257)
ANGPT2-Sp125	ACGGAATGTACTATCCACAG (서열번호 1258)
ANGPT2-Sp126	TTATTTGTGTTCTGCCTCTG (서열번호 1259)
ANGPT2-Sp127	CAGAACACAAATAAGTTCAA (서열번호 1260)
ANGPT2-Sp128	ATAAGTTCAACGGCATTAAA (서열번호 1261)
ANGPT2-Sp129	ACGGCATTAAATGGTACTAC (서열번호 1262)
ANGPT2-Sp130	ATTAAATGGTACTACTGGAA (서열번호 1263)
ANGPT2-Sp131	TGGTACTACTGGAAAGGCTC (서열번호 1264)
ANGPT2-Sp132	AGGCTCAGGCTATTCGCTCA (서열번호 1265)
ANGPT2-Sp133	TGGTCGGATCATCATGGTTG (서열번호 1266)
ANGPT2-Sp134	ATCTGCTGGTCGGATCATCA (서열번호 1267)
ANGPT2-Sp135	ATGTTTAGAAATCTGCTGGT (서열번호 1268)
ANGPT2-Sp136	TGGGATGTTTAGAAATCTGC (서열번호 1269)

[1628]

[1629] [표 14]

[1630] SpCas9을 ANGPTL4 유전자의 표적 서열(Target sequences of ANGPTL4 gene for SpCas9)

[1631]

Gene	Target sequence
ANGPTL4-Sp1	AGGCTACCTAAGAGGATGAG (서열번호 1270)
ANGPTL4-Sp2	GAGGATGAGCGGTGCTCCGA (서열번호 1271)
ANGPTL4-Sp3	ATGAGCGGTGCTCCGACGGC (서열번호 1272)
ANGPTL4-Sp4	TGAGCGGTGCTCCGACGGCC (서열번호 1273)
ANGPTL4-Sp5	GAGCGGTGCTCCGACGGCCG (서열번호 1274)
ANGPTL4-Sp6	ATCAGGGCTGCCCCGGCCGT (서열번호 1275)
ANGPTL4-Sp7	GCAGAGCATCAGGGCTGCCC (서열번호 1276)
ANGPTL4-Sp8	GGTGGCGGCGCAGAGCATCA (서열번호 1277)
ANGPTL4-Sp9	CGGTGGCGGCGCAGAGCATC (서열번호 1278)
ANGPTL4-Sp10	GCTCAGTAGCACGGCGGTGG (서열번호 1279)
ANGPTL4-Sp11	AGCGCTCAGTAGCACGGCGG (서열번호 1280)
ANGPTL4-Sp12	CTGAGCGCTCAGTAGCACGG (서열번호 1281)
ANGPTL4-Sp13	CGCCGTGCTACTGAGCGCTC (서열번호 1282)
ANGPTL4-Sp14	GCCGTGCTACTGAGCGCTCA (서열번호 1283)
ANGPTL4-Sp15	GCCCTGAGCGCTCAGTAGCA (서열번호 1284)
ANGPTL4-Sp16	GTGCTACTGAGCGCTCAGGG (서열번호 1285)
ANGPTL4-Sp17	CGCGGCGACTTGGACTGCAC (서열번호 1286)
ANGPTL4-Sp18	GCGCGGCGACTTGGACTGCA (서열번호 1287)
ANGPTL4-Sp19	GGACGCAAAGCGCGGCGACT (서열번호 1288)
ANGPTL4-Sp20	AGTCGCCGCGCTTTGCGTCC (서열번호 1289)
ANGPTL4-Sp21	GTCGCCGCGCTTTGCGTCCT (서열번호 1290)
ANGPTL4-Sp22	TCGTCCCAGGACGCAAAGCG (서열번호 1291)
ANGPTL4-Sp23	CAGGACATTCATCTCGTCCC (서열번호 1292)
ANGPTL4-Sp24	CTGGGACGAGATGAATGTCC (서열번호 1293)
ANGPTL4-Sp25	GAGATGAATGTCCTGGCGCA (서열번호 1294)
ANGPTL4-Sp26	GCTGCAGGAGTCCGTGCGCC (서열번호 1295)
ANGPTL4-Sp27	GCGCACGGACTCCTGCAGCT (서열번호 1296)
ANGPTL4-Sp28	CGGACTCCTGCAGCTCGGCC (서열번호 1297)
ANGPTL4-Sp29	GGACTCCTGCAGCTCGGCCA (서열번호 1298)
ANGPTL4-Sp30	GACTCCTGCAGCTCGGCCAG (서열번호 1299)
ANGPTL4-Sp31	GCAGCCCCTGGCCGAGCTGC (서열번호 1300)
ANGPTL4-Sp32	CCAGGGGCTGCGCGAACACG (서열번호 1301)
ANGPTL4-Sp33	CCGCGTGTTCGCGCAGCCCC (서열번호 1302)
ANGPTL4-Sp34	CAGCGCGCTCAGCTGACTGC (서열번호 1303)
ANGPTL4-Sp35	CCGCAGTCAGCTGAGCGCGC (서열번호 1304)

[1632]

ANGPTL4-Sp36	CCAGCGCGCTCAGCTGACTG (서열번호 1305)
ANGPTL4-Sp37	GTCAGCTGAGCGCGCTGGAG (서열번호 1306)
ANGPTL4-Sp38	GAGCGGCGCCTGAGCGCGTG (서열번호 1307)
ANGPTL4-Sp39	AGCGGCGCCTGAGCGCGTGC (서열번호 1308)
ANGPTL4-Sp40	AGGCGGACCCGCACGCGCTC (서열번호 1309)
ANGPTL4-Sp41	CGCGTGCGGGTCCGCCTGTC (서열번호 1310)
ANGPTL4-Sp42	GCGTGCGGGTCCGCCTGTCA (서열번호 1311)
ANGPTL4-Sp43	GTCCGCCTGTCAGGGAACCG (서열번호 1312)
ANGPTL4-Sp44	TCCGCCTGTCAGGGAACCGA (서열번호 1313)
ANGPTL4-Sp45	CCGCCTGTCAGGGAACCGAG (서열번호 1314)
ANGPTL4-Sp46	CCCCTCGGTTCCCTGACAGG (서열번호 1315)
ANGPTL4-Sp47	GGACCCCTCGGTTCCCTGAC (서열번호 1316)
ANGPTL4-Sp48	CGGGAGGTCGGTGGACCCCT (서열번호 1317)
ANGPTL4-Sp49	AGGGGCTAACGGGAGGTCGG (서열번호 1318)
ANGPTL4-Sp50	CTCAGGGGCTAACGGGAGGT (서열번호 1319)
ANGPTL4-Sp51	GGCTCTCAGGGGCTAACGGG (서열번호 1320)
ANGPTL4-Sp52	TCCCGTTAGCCCCTGAGAGC (서열번호 1321)
ANGPTL4-Sp53	CCCGTTAGCCCCTGAGAGCC (서열번호 1322)
ANGPTL4-Sp54	CCCGGCTCTCAGGGGCTAAC (서열번호 1323)
ANGPTL4-Sp55	ACCCGGCTCTCAGGGGCTAA (서열번호 1324)
ANGPTL4-Sp56	GTTAGCCCCTGAGAGCCGGG (서열번호 1325)
ANGPTL4-Sp57	AGGGTCCACCCGGCTCTCAG (서열번호 1326)
ANGPTL4-Sp58	CAGGGTCCACCCGGCTCTCA (서열번호 1327)
ANGPTL4-Sp59	TCAGGGTCCACCCGGCTCTC (서열번호 1328)
ANGPTL4-Sp60	TGAGAGCCGGGTGGACCCTG (서열번호 1329)
ANGPTL4-Sp61	GAAGGACCTCAGGGTCCACC (서열번호 1330)
ANGPTL4-Sp62	GCAGGCTGTGAAGGACCTCA (서열번호 1331)
ANGPTL4-Sp63	TGCAGGCTGTGAAGGACCTC (서열번호 1332)
ANGPTL4-Sp64	TGAGGTCCTTCACAGCCTGC (서열번호 1333)
ANGPTL4-Sp65	CACGTACCTGCAGGCTGTGA (서열번호 1334)
ANGPTL4-Sp66	CCCTGGGGACACGTACCTGC (서열번호 1335)
ANGPTL4-Sp67	CCCTCCCCAGACACAACTCA (서열번호 1336)
ANGPTL4-Sp68	TGAGCCTTGAGTTGTGTCTG (서열번호 1337)
ANGPTL4-Sp69	CTGAGCCTTGAGTTGTGTCT (서열번호 1338)
ANGPTL4-Sp70	TCTGAGCCTTGAGTTGTGTC (서열번호 1339)
ANGPTL4-Sp71	AACTCAAGGCTCAGAACAGC (서열번호 1340)

[1633]

ANGPTL4-Sp72	GATCCAGCAACTCTTCCACA (서열번호 1341)
ANGPTL4-Sp73	CCAGCAACTCTTCCACAAGG (서열번호 1342)
ANGPTL4-Sp74	CCACCTTGTGGAAGAGTTGC (서열번호 1343)
ANGPTL4-Sp75	GCTGCTGCTGGGCCACCTTG (서열번호 1344)
ANGPTL4-Sp76	ACAAGGTGGCCCAGCAGCAG (서열번호 1345)
ANGPTL4-Sp77	GGCCCAGCAGCAGCGGCACC (서열번호 1346)
ANGPTL4-Sp78	CTCCAGGTGCCGCTGCTGCT (서열번호 1347)
ANGPTL4-Sp79	TCTCCAGGTGCCGCTGCTGC (서열번호 1348)
ANGPTL4-Sp80	TTCGCAGGTGCTGCTTCTCC (서열번호 1349)
ANGPTL4-Sp81	TTTGCAGATGCTGAATTCGC (서열번호 1350)
ANGPTL4-Sp82	AATTCAGCATCTGCAAAGCC (서열번호 1351)
ANGPTL4-Sp83	CCCTTGATCCTAGGGTTACC (서열번호 1352)
ANGPTL4-Sp84	CCCATCCTAGTTTGGCCTCC (서열번호 1353)
ANGPTL4-Sp85	GTGGTCCAGGAGGCCAAACT (서열번호 1354)
ANGPTL4-Sp86	CTAGGTGCTTGTGGTCCAGG (서열번호 1355)
ANGPTL4-Sp87	GGTCTAGGTGCTTGTGGTCC (서열번호 1356)
ANGPTL4-Sp88	CCACAAGCACCTAGACCATG (서열번호 1357)
ANGPTL4-Sp89	CCTCATGGTCTAGGTGCTTG (서열번호 1358)
ANGPTL4-Sp90	CAAGCACCTAGACCATGAGG (서열번호 1359)
ANGPTL4-Sp91	GCTTGGCCACCTCATGGTCT (서열번호 1360)
ANGPTL4-Sp92	GGGCAGGCTTGGCCACCTCA (서열번호 1361)
ANGPTL4-Sp93	CCAAGCCTGCCCGAAGAAAG (서열번호 1362)
ANGPTL4-Sp94	CCTCTTTCTTCGGGCAGGCT (서열번호 1363)
ANGPTL4-Sp95	GGCAGCCTCTTTCTTCGGGC (서열번호 1364)
ANGPTL4-Sp96	CTCGGGCAGCCTCTTTCTTC (서열번호 1365)
ANGPTL4-Sp97	TCTCGGGCAGCCTCTTTCTT (서열번호 1366)
ANGPTL4-Sp98	AAGAAAGAGGCTGCCCGAGA (서열번호 1367)
ANGPTL4-Sp99	TCAACTGGCTGGGCCATCTC (서열번호 1368)
ANGPTL4-Sp100	GTCAACTGGCTGGGCCATCT (서열번호 1369)
ANGPTL4-Sp101	GATGGCCCAGCCAGTTGACC (서열번호 1370)
ANGPTL4-Sp102	GTGAGCCGGGTCAACTGGCT (서열번호 1371)
ANGPTL4-Sp103	TGTGAGCCGGGTCAACTGGC (서열번호 1372)
ANGPTL4-Sp104	ACATTGTGAGCCGGGTCAAC (서열번호 1373)
ANGPTL4-Sp105	GGCGGCTGACATTGTGAGCC (서열번호 1374)
ANGPTL4-Sp106	AGGCGGCTGACATTGTGAGC (서열번호 1375)
ANGPTL4-Sp107	GCAGACACTCACGGTGCAGG (서열번호 1376)

[1634]

ANGPTL4-Sp108	GGGGCAGACACTCACGGTGC (서열번호 1377)
ANGPTL4-Sp109	ATCTCCCTTCAGGGCTGCCC (서열번호 1378)
ANGPTL4-Sp110	TCTCCCTTCAGGGCTGCCCA (서열번호 1379)
ANGPTL4-Sp111	AGGGCTGCCCAGGGATTGCC (서열번호 1380)
ANGPTL4-Sp112	AACAGCTCCTGGCAATCCCT (서열번호 1381)
ANGPTL4-Sp113	GAACAGCTCCTGGCAATCCC (서열번호 1382)
ANGPTL4-Sp114	GGATTGCCAGGAGCTGTTCC (서열번호 1383)
ANGPTL4-Sp115	TGCCAGGAGCTGTTCCAGGT (서열번호 1384)
ANGPTL4-Sp116	CCAGGAGCTGTTCCAGGTTG (서열번호 1385)
ANGPTL4-Sp117	CCCCAACCTGGAACAGCTCC (서열번호 1386)
ANGPTL4-Sp118	AGCTGTTCCAGGTTGGGGAG (서열번호 1387)
ANGPTL4-Sp119	CACTCTGCCTCTCCCCAACC (서열번호 1388)
ANGPTL4-Sp120	CAGGTTGGGGAGAGGCAGAG (서열번호 1389)
ANGPTL4-Sp121	ACTATTTGAAATCCAGCCTC (서열번호 1390)
ANGPTL4-Sp122	CTATTTGAAATCCAGCCTCA (서열번호 1391)
ANGPTL4-Sp123	TATTTGAAATCCAGCCTCAG (서열번호 1392)
ANGPTL4-Sp124	ATGGCGGAGACCCCTGAGGC (서열번호 1393)
ANGPTL4-Sp125	AAAAATGGCGGAGACCCCTG (서열번호 1394)
ANGPTL4-Sp126	TCAGGGGTCTCCGCCATTTT (서열번호 1395)
ANGPTL4-Sp127	TTGCAGTTCACCAAAAATGG (서열번호 1396)
ANGPTL4-Sp128	ATCTTGCAGTTCACCAAAAA (서열번호 1397)
ANGPTL4-Sp129	GTGAACTGCAAGATGACCTC (서열번호 1398)
ANGPTL4-Sp130	ACTGCAAGATGACCTCAGGT (서열번호 1399)
ANGPTL4-Sp131	CTGCAAGATGACCTCAGGTA (서열번호 1400)
ANGPTL4-Sp132	GGACTAACACACCCTACCTG (서열번호 1401)
ANGPTL4-Sp133	GTACCTTTCTGGGCAGATGG (서열번호 1402)
ANGPTL4-Sp134	CTTTCTGGGCAGATGGAGGC (서열번호 1403)
ANGPTL4-Sp135	GAGGCTGGACAGTAATTCAG (서열번호 1404)
ANGPTL4-Sp136	GTAATTCAGAGGCGCCACGA (서열번호 1405)
ANGPTL4-Sp137	GAGGCGCCACGATGGCTCAG (서열번호 1406)
ANGPTL4-Sp138	TGAAGTCCACTGAGCCATCG (서열번호 1407)
ANGPTL4-Sp139	ATGGCTCAGTGGACTTCAAC (서열번호 1408)
ANGPTL4-Sp140	CAGTGGACTTCAACCGGCCC (서열번호 1409)
ANGPTL4-Sp141	AGTGGACTTCAACCGGCCCT (서열번호 1410)
ANGPTL4-Sp142	CCGGCCCTGGGAAGCCTACA (서열번호 1411)
ANGPTL4-Sp143	CCTTGTAGGCTTCCCAGGGC (서열번호 1412)

[1635]

ANGPTL4-Sp144	GCCCTGGGAAGCCTACAAGG (서열번호 1413)
ANGPTL4-Sp145	CCCTGGGAAGCCTACAAGGC (서열번호 1414)
ANGPTL4-Sp146	CCCGCCTTGTAGGCTTCCCA (서열번호 1415)
ANGPTL4-Sp147	CCTGGGAAGCCTACAAGGCG (서열번호 1416)
ANGPTL4-Sp148	CCCCGCCTTGTAGGCTTCCC (서열번호 1417)
ANGPTL4-Sp149	GAAGCCTACAAGGCGGGGTT (서열번호 1418)
ANGPTL4-Sp150	AAGCCTACAAGGCGGGGTTT (서열번호 1419)
ANGPTL4-Sp151	AGCCTACAAGGCGGGGTTTG (서열번호 1420)
ANGPTL4-Sp152	ATCCCCAAACCCCGCCTTGT (서열번호 1421)
ANGPTL4-Sp153	GCGGGGTTTGGGGATCCCCA (서열번호 1422)
ANGPTL4-Sp154	GGTTTGGGGATCCCCACGGT (서열번호 1423)
ANGPTL4-Sp155	CACTAGAAACACCTACCGTG (서열번호 1424)
ANGPTL4-Sp156	CCACTAGAAACACCTACCGT (서열번호 1425)
ANGPTL4-Sp157	CTCCCACTCCAGGCGAGTTC (서열번호 1426)
ANGPTL4-Sp158	CACTCCAGGCGAGTTCTGGC (서열번호 1427)
ANGPTL4-Sp159	ACTCCAGGCGAGTTCTGGCT (서열번호 1428)
ANGPTL4-Sp160	AGACCCAGCCAGAACTCGCC (서열번호 1429)
ANGPTL4-Sp161	AGGCGAGTTCTGGCTGGGTC (서열번호 1430)
ANGPTL4-Sp162	GTTCTGGCTGGGTCTGGAGA (서열번호 1431)
ANGPTL4-Sp163	GGAGAAGGTGCATAGCATCA (서열번호 1432)
ANGPTL4-Sp164	GAGAAGGTGCATAGCATCAC (서열번호 1433)
ANGPTL4-Sp165	AGAAGGTGCATAGCATCACG (서열번호 1434)
ANGPTL4-Sp166	GAAGGTGCATAGCATCACGG (서열번호 1435)
ANGPTL4-Sp167	GGGGGACCGCAACAGCCGCC (서열번호 1436)
ANGPTL4-Sp168	GCACGGCCAGGCGGCTGTTG (서열번호 1437)
ANGPTL4-Sp169	GCCGCCTGGCCGTGCAGCTG (서열번호 1438)
ANGPTL4-Sp170	CCGCCTGGCCGTGCAGCTGC (서열번호 1439)
ANGPTL4-Sp171	CCCGCAGCTGCACGGCCAGG (서열번호 1440)
ANGPTL4-Sp172	AGTCCCGCAGCTGCACGGCC (서열번호 1441)
ANGPTL4-Sp173	TGGCCGTGCAGCTGCGGGAC (서열번호 1442)
ANGPTL4-Sp174	GGCCGTGCAGCTGCGGGACT (서열번호 1443)
ANGPTL4-Sp175	ATCCCAGTCCCGCAGCTGCA (서열번호 1444)
ANGPTL4-Sp176	GTGCAGCTGCGGGACTGGGA (서열번호 1445)
ANGPTL4-Sp177	CACGGAGAACTGCAGCAACT (서열번호 1446)
ANGPTL4-Sp178	GCTGCAGTTCTCCGTGCACC (서열번호 1447)
ANGPTL4-Sp179	CTGCAGTTCTCCGTGCACCT (서열번호 1448)

[1636]

ANGPTL4-Sp180	CAGTTCTCCGTGCACCTGGG (서열번호 1449)
ANGPTL4-Sp181	CTCCGTGCACCTGGGTGGCG (서열번호 1450)
ANGPTL4-Sp182	GTCCTCGCCACCCAGGTGCA (서열번호 1451)
ANGPTL4-Sp183	GCACCTGGGTGGCGAGGACA (서열번호 1452)
ANGPTL4-Sp184	AGGCCGTGTCCTCGCCACCC (서열번호 1453)
ANGPTL4-Sp185	TGCAGTGAGCTGCAGGCTAT (서열번호 1454)
ANGPTL4-Sp186	CCTGCAGCTCACTGCACCCG (서열번호 1455)
ANGPTL4-Sp187	CCACGGGTGCAGTGAGCTGC (서열번호 1456)
ANGPTL4-Sp188	CAGCTCACTGCACCCGTGGC (서열번호 1457)
ANGPTL4-Sp189	TGCACCCGTGGCCGGCCAGC (서열번호 1458)
ANGPTL4-Sp190	GCACCCGTGGCCGGCCAGCT (서열번호 1459)
ANGPTL4-Sp191	GCGCCCAGCTGGCCGGCCAC (서열번호 1460)
ANGPTL4-Sp192	GGCGCCCAGCTGGCCGGCCA (서열번호 1461)
ANGPTL4-Sp193	GGTGGTGGCGCCCAGCTGGC (서열번호 1462)
ANGPTL4-Sp194	GGACGGTGGTGGCGCCCAGC (서열번호 1463)
ANGPTL4-Sp195	GCCACCACCGTCCCACCCAG (서열번호 1464)
ANGPTL4-Sp196	GCCGCTGGGTGGGACGGTGG (서열번호 1465)
ANGPTL4-Sp197	GAGGCCGCTGGGTGGGACGG (서열번호 1466)
ANGPTL4-Sp198	GGAGAGGCCGCTGGGTGGGA (서열번호 1467)
ANGPTL4-Sp199	GTACGGAGAGGCCGCTGGGT (서열번호 1468)
ANGPTL4-Sp200	GGTACGGAGAGGCCGCTGGG (서열번호 1469)
ANGPTL4-Sp201	AAGGGTACGGAGAGGCCGCT (서열번호 1470)
ANGPTL4-Sp202	GAAGGGTACGGAGAGGCCGC (서열번호 1471)
ANGPTL4-Sp203	AAGTGGAGAAGGGTACGGAG (서열번호 1472)
ANGPTL4-Sp204	TCTCCGTACCCTTCTCCACT (서열번호 1473)
ANGPTL4-Sp205	CTCCGTACCCTTCTCCACTT (서열번호 1474)
ANGPTL4-Sp206	GTCCCAAGTGGAGAAGGGTA (서열번호 1475)
ANGPTL4-Sp207	ACCCTTCTCCACTTGGGACC (서열번호 1476)
ANGPTL4-Sp208	TCCTGGTCCCAAGTGGAGAA (서열번호 1477)
ANGPTL4-Sp209	ATCCTGGTCCCAAGTGGAGA (서열번호 1478)
ANGPTL4-Sp210	GTCGTGATCCTGGTCCCAAG (서열번호 1479)
ANGPTL4-Sp211	ACCAGGATCACGACCTCCGC (서열번호 1480)
ANGPTL4-Sp212	CCAGGATCACGACCTCCGCA (서열번호 1481)
ANGPTL4-Sp213	CCCTGCGGAGGTCGTGATCC (서열번호 1482)
ANGPTL4-Sp214	CGCAGTTCTTGTCCCTGCGG (서열번호 1483)
ANGPTL4-Sp215	TGGCGCAGTTCTTGTCCCTG (서열번호 1484)

[1637]

ANGPTL4-Sp216	AACTGCGCCAAGAGCCTCTC (서열번호 1485)
ANGPTL4-Sp217	CTGCTCACCAGAGAGGCTCT (서열번호 1486)
ANGPTL4-Sp218	GCAGGGCCTGCTCACCAGAG (서열번호 1487)
ANGPTL4-Sp219	CCCTGACCCCGGCAGGAGGC (서열번호 1488)
ANGPTL4-Sp220	TGACCCCGGCAGGAGGCTGG (서열번호 1489)
ANGPTL4-Sp221	CCGGCAGGAGGCTGGTGGTT (서열번호 1490)
ANGPTL4-Sp222	GTTGAGGTTGGAATGGCTGC (서열번호 1491)
ANGPTL4-Sp223	TGCAGCCATTCCAACCTCAA (서열번호 1492)
ANGPTL4-Sp224	ACTGGCCGTTGAGGTTGGAA (서열번호 1493)
ANGPTL4-Sp225	GAAGTACTGGCCGTTGAGGT (서열번호 1494)
ANGPTL4-Sp226	AGCGGAAGTACTGGCCGTTG (서열번호 1495)
ANGPTL4-Sp227	GTGGGATGGAGCGGAAGTAC (서열번호 1496)
ANGPTL4-Sp228	TCCGCTCCATCCCACAGCAG (서열번호 1497)
ANGPTL4-Sp229	GCCGCTGCTGTGGGATGGAG (서열번호 1498)
ANGPTL4-Sp230	CTTCTGCCGCTGCTGTGGGA (서열번호 1499)
ANGPTL4-Sp231	TAAGCTTCTGCCGCTGCTGT (서열번호 1500)
ANGPTL4-Sp232	TTAAGCTTCTGCCGCTGCTG (서열번호 1501)
ANGPTL4-Sp233	GCAGCGGCAGAAGCTTAAGA (서열번호 1502)
ANGPTL4-Sp234	CAGCGGCAGAAGCTTAAGAA (서열번호 1503)
ANGPTL4-Sp235	AGCTTAAGAAGGGAATCTTC (서열번호 1504)
ANGPTL4-Sp236	AGGGAATCTTCTGGAAGACC (서열번호 1505)
ANGPTL4-Sp237	GAATCTTCTGGAAGACCTGG (서열번호 1506)
ANGPTL4-Sp238	AATCTTCTGGAAGACCTGGC (서열번호 1507)
ANGPTL4-Sp239	ATCTTCTGGAAGACCTGGCG (서열번호 1508)
ANGPTL4-Sp240	CGGGTAGTAGCGGCCCCGCC (서열번호 1509)
ANGPTL4-Sp241	GGGCCGCTACTACCCGCTGC (서열번호 1510)
ANGPTL4-Sp242	TGGCCTGCAGCGGGTAGTAG (서열번호 1511)
ANGPTL4-Sp243	ACATGGTGGTGGCCTGCAGC (서열번호 1512)
ANGPTL4-Sp244	AACATGGTGGTGGCCTGCAG (서열번호 1513)
ANGPTL4-Sp245	GGGCTGGATCAACATGGTGG (서열번호 1514)
ANGPTL4-Sp246	CATGGGCTGGATCAACATGG (서열번호 1515)
ANGPTL4-Sp247	CACCATGTTGATCCAGCCCA (서열번호 1516)
ANGPTL4-Sp248	TGCCATGGGCTGGATCAACA (서열번호 1517)
ANGPTL4-Sp249	GATCCAGCCCATGGCAGCAG (서열번호 1518)
ANGPTL4-Sp250	CTGCCTCTGCTGCCATGGGC (서열번호 1519)
ANGPTL4-Sp251	GAGGCTGCCTCTGCTGCCAT (서열번호 1520)

[1638]

ANGPTL4-Sp252	GGAGGCTGCCTCTGCTGCCA (서열번호 1521)
ANGPTL4-Sp253	GGCCCAGCCAGGACGCTAGG (서열번호 1522)

[1639]

[1640] **2.** CjCas9 및 sgRNA 플라스미드 제작

[1641] 인간 코돈 최적화된 CjCas9(Campylobacter jejuni subsp. Jejuni NCTC 11168 유래)을 암호하는 서열은 그 C-말단에 NLS(nuclear localization signal) 및 HA 에피토프를 가지도록 합성하였고(GeneArtTM Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific), 합성한 핵산서열을 이전 연구(Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M. & Kim,

J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nature biotechnology 31, 230-232 (2013))에서 기재된 p3s 플라스미드로 복제하였다.

[1642] tracrRNA(transactivating crRNA) 서열과 pre-crRNA(precursor CRISPR RNA) 서열은 GAAA 또는 TGAA 링커를 이용하여 연결하여 sgRNA를 생성하였다. sgRNA는 U6 프로모터로 전사를 조절하였다.

[1643]

[1644] **3. 세포 기반 리포터 분석법을 이용한 PAM 특성화**

[1645] X 위치에 무작위 서열을 포함하는 가변성 PAM 서열(5'-NNNNXCAC-3', 5'-NNNNAXAC-3', 5'-NNNNACXC-3', and 5'-NNNNACAX-3')을 가지는 AAVS1 타겟 위치(AAVS1-TS1)를 합성하고(Macrogen, Inc.), 합성한 핵산서열을 RFP와 GFP가 암호화되어있는 서로게이트 리포터 플라스미드(surrogate reporter plasmid)로 복제하였다.

[1646] 적합한 PAM 서열을 결정하기 위해, 상기 제작한 리포터 플라스미드(100 ng), CjCas9을 암호화하는 플라스미드(225 ng) 및 sgRNA(675 ng)를 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, Invitrogen)을 이용하여 HEK293 세포($1x10^5$)로 공동-형질감염시켰다. 형질감염 2일 후, GFP와 RFP가 모두 양성인 세포의 분획물을 flow cytometry (BD Accuri™ C6, BD)으로 측정하였다.

[1647]

[1648] **4. 세포 배양 및 돌연변이 분석**

[1649] HEK293 (ATCC, CRL-1573) 세포 및 마우스 NIH 3T3 (ATCC, CRL-1658) 세포는 100 units/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신, 및 10% 태아 소 혈청(FBS)이 추가된 (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다.

[1650] sgRNA 플라스미드(750 ng) 및 CjCas9 플라스미드(250 ng)을 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, Invitrogen)을 이용하여 세포($0.5\sim1x10^5$)로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 게놈 DNA를 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)를 이용하여 분리하였고, 타겟 딥 시퀀싱(targeted deep sequencing)을 위해 온-타겟 또는 오프-타겟 위치를 증폭하였다. 딥 시퀀싱 라이브러리는 PCR에 의해 생성되었다. TruSeq HT 이중 지표 프라이머(TruSeq HT Dual Index primers)를 각각의 샘플에 라벨링하기 위해 사용하였다. 혼합 라이브러리를 페어드 엔드 시퀀싱(paired-end sequencing, LAS, Inc.) 하였고, 인델 빈도를 계산하였다.

[1651]

[1652] **5.** CjCas9 및 sgRNA 서열을 암호화하는 AAV 벡터 제작

[1653] sgRNA 서열과 C-말단에 NLS와 HA 태그를 가지는 CjCas9 유전자를 포함하는 AAV 역위 말단 반복(inverted terminal repeat, ITR)-기반 벡터 플라스미드를 제작하였다. sgRNA 전사는 U6 프로모터에 의해 유도되고, CjCas9 발현은 C2C12 근육아세포에서는 EFS 프로모터에 의해, 또는 C57BL/6 마우스의 TA

근육에서는 Spc512 프로모터에 의해 조절된다.

[1654] 망막 전달을 위해, Vegfa 유전자와 Hif1a 유전자에 특이적인 U6 프로모터-유도 sgRNA 및 EFS 프로모터 제어하에 CjCas9을 암호화하는 AAV 벡터를 제작하였고, 이때, CjCas9은 C-말단에 자가절단하는 T2A 펩타이드를 이용해 eGFP가 연결되어 있다.

[1655]

[1656] **6.** AAV 벡터의 생산, 정제 및 특성 규명

[1657] AAV 벡터를 생산하기 위하여, AAVDJ 또는 AAV9 capsids의 위형(pseudotype)을 이용하였다. HEK293T 세포에 pAAV-ITR-CjCas9-sgRNA, pAAVED2/9, 및 헬퍼(helper) 플라스미드를 형질감염하였다. HEK293T 세포는 2% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. HEK293T 세포에서 PEIpro (Polyplus-transfection), triple-transfection 및 플라스미드를 1:1:1의 몰농도로 섞어 PEI coprecipitation을 이용하여 재조합 AAV 벡터 스톡(stocks) 생산하였다. 배양 72시간 후, 세포를 용해하고 파티클들은 iodixanol (Sigma-Aldrich)을 이용해 단계-기울기 초원분리기(step-gradient ultracentrifugation)로 분리정제하였다. 벡터 게놈의 수는 정량적 PCR로 정량하였다.

[1658]

[1659] **7. 마우스** 근아세포(myoblast)에 AAV 형질 도입

[1660] 마우스 근아세포에 다양한 바이러스의 양(multiplicity of infection (MOI): 1, 5, 10, 50, 및 100 (정량 PCR에 의해 결정))의 AAVDJ-CjCas9를 감염시키고 2% FBS를 포함하는 DMEM에서 배양하였다. 표적 딥 시퀀싱을 위해 다른 시간 포인트에서 세포를 수득하였다. MOI 1은 정량 PCR에 의해 결정된 전체 100개의 바이러스 파티클 중에 한 개의 바이러스 파티클이 감염되는 것으로 추정된다.

[1661]

[1662] **8. 동물**

[1663] 본 연구에서 사용되는 모든 동물의 관리, 사용 및 치료는 서울대학교 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 마련된 지침과 안과 및 안보 연구 및 수의대에서 동물 사용을 관한 ARVO 선언문에 엄격한 동의하에 수행하였다. 본 연구는 성인 남성의 특정 항원이 없는(specific pathogen free, SPF) 6주령 된 C57BL/6J 마우스를 사용하였다. 마우스는 12시간 주기의 암명주기하에서 유지시켰다.

[1664] 당뇨병 모델 마우스는 streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 단일 복강 내 주입하여 유도하였다. 대조군으로 구연산염(citrate) 버퍼를 주입하였다. STZ 주입 4일 후, 마우스의 혈액 내 글루코스 레벨이 300 mg/dl 이상인 경우 당뇨병이 유도되었다고 간주하였다.

[1665]

[1666] **9.** AAV의 유리체내 주입

[1667] 6주령 마우스를 1:1(각 2.25 mg/kg 체중) 비율의 틸레타민(tiletamine)과 졸라제팜(zolazepam) 및 자일라진 하이드로클로라이드(xylazine hydrochloride)

0.7 mg/kg 체중를 혼합한 혼합물을 유리체내 주입하여 마취시켰다. 수술용 현미경(Leica Microsystems Ltd.) 하에서 33G 블런트 니들을 가지는 Nanofil 주사기(World Precision Instruments Inc.)를 사용하여 AAV9-CjCas9 2 ㎕(2 x 10^{10} 바이러스 게놈)를 유리체내 주입하였다.

[1668] 당뇨병 마우스 모델의 경우, STZ로 당뇨병을 유도하고 1 또는 7 주 후에 마우스를 마취하고, CjCas9: Vegfa 또는 Rosa26을 0.8x10^{8} vg/㎕ 또는 1.5x10^{9} vg/㎕ 포함하는 2 ㎕를 유리체내 주입하였다.

[1669]

[1670] **10. 망막 조직의 면역 형광 염색 및** 이미징

[1671] 주입 후 42일째, 샘플을 포르말린으로 고정하고 파라핀에 내장시켰다(n=4). 샘플이 내장된 파라핀을 크로스 섹션(cross-section)하여 얻은 샘플을 anti-HA 항체 (Roche, 3F10, 1:1000), anti-opsin 항체 (Millipore, AB5405, 1:1000), 및 Alexa Fluor 488 또는 594 항체 (Thermo Fisher Scientific, 1:500)로 면역 염색하였다. HA 태그된 CjCas9을 발현하는 RPE 세포에서 opsin 양성 부위를 Image J software (1.47v, NIH)를 이용하여 측정하였다. RPE flat-mounts에서 CjCas9 및 eGFP의 분포는 confocal microscope (LSM 710, Carl Zeiss)을 이용하여 이미지를 얻었다.

[1672]

[1673] **11. 게놈 DNA 추출**

[1674] RPE 및 retina으로부터 DNA를 추출하기 위하여, RPE와 retina flat-mounts의 이미징 획득 후, 조직 샘플을 PBS로 세척하였다. RPE 세포는 용해 버퍼(NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel)에서 30초간 볼텍싱하여 choroid/sclera로부터 분리하였다. 잔여 choroid/sclera 조직으로부터 게놈 DNA를 분석하여 RPE 세포의 완전한 단리를 확인하였다. 게놈 DNA는 표적 딥 시퀀싱에 의해 분석되었다.

[1675]

[1676] **12. 마우스** Vegfa ELISA

[1677] 주입 후 42일째에, 전체 RPE 혼합물을 neural retina 조직으로부터 분리하였고, 두 조직은 차후 분석을 위해 냉동시켰다. 샘플조직은 120 ㎕ 세포 용해 버퍼(CST #9803)에서 용해시켰고, Vegfa 단백질의 양은 마우스 VEGF Quantikine ELISA kit(MMV00, R&D systems)를 이용하여 측정하였다.

[1678]

[1679] **13. 레이저 유도** CNV 모델

[1680] 마우스를 마취한 후, 눈동자에 0.5% phenylephrine 및 0.5% tropicamide를 포함하는 점안액을 넣어주어 동공을 확장시켰다. 레이제 광응고화(Laser photocoagulation)는 간접 헤드 세트 전달 시스템(indirect head set delivery system, Iridex) 및 레이저 시스템(Ilooda)을 이용하여 수행되었다. 레이저 매개 변수는 532 nm 파장, 200 ㎛ 스팟 크기, 800 mW 출력 및 70 ms 노출 시간이다. 레이저 화상을 시신경 주변에서 3 ~ 4번 유도하였다. 유리체의 출혈없이 버블을 생성하는

화상만이 연구에 이용되었다. 7일 후, 안구는 한 시간동안 실온에서 4% paraformaldehyde로 고정시켰다. RPE 혼합물(RPE/choroid/sclera)은 isolectin-B4 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. I21413, 1:100) 및 anti-GFP 항체(Abcam, ab6556, 1:100)를 이용해 4 ℃에서 밤새도록 면역 염색시켰다. RPE 혼합물은 flat-mount 시켰고, fluorescent microscope (Eclipse 90i, Nikon) 또는 confocal microscope (LSM 710, Carl Zeiss)을 이용하여 100배의 배율에서 이미지를 얻었다. CNV 부위는 Image J software (1.47v, NIH)를 사용하여 측정하였다. 안구 당 3 ~ 4개 CNV 부위의 평균을 분석하였다. 각 그룹은 17 ~ 18개의 안구로 구성된다.

[1681]

[1682] **14. 망막 혈관 파열의 정량 및 정성 분석**

[1683] 혈관 파열을 측정하기 위해, STZ-유도 당뇨병 마우스 모델을 사용하였다. 마취한 마우스에 PBS에 녹인 Evans blue dye (20 mg/ml) 200 ㎕를 정맥주사하였다. 관류 2시간 후, 안구를 적출하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 1시간 동안 고정하였다. 망막은 2X PBS에서 절개하여 flat-mount 시켰고, fluorescent microscope (Eclipse 90i, Nikon)을 이용한 40배 및 100배의 배율로 이미지를 얻었다.

[1684] 혈관 파열을 정량적으로 분석하기 위해, 각 마우스의 중간-주변 망막(mid-peripheral retina, 0.5 ㎛ × 0.5 ㎛) 에 혈관 파열의 대표적인 4 부위를 선택하였다. 중간-주변 망막은 시신경 유두(optic nerve head)부터 모양체(ciliary body)까지 망막의 중간 1/3로 지정하였고, Image J software (1.47v, NIH)를 사용하여 자동 아이소데이터 알고리즘(automatic isodata algorithm)를 기반으로 색상 임계값에 맞게 이미지를 조정하고, Evans blue dye를 포함하는 관심 영역을 빨간색으로 표시하였다. 그 후, 빨간색으로 표시한 영역을 측정하였다. 상기 데이터는 대조군 마우스의 데이터로 표준화하여 혈관 파열(%)로 나타내었다.

[1685]

[1686] **15. 데이터 분석**

[1687] *In vitro* 또는 *in* vivo에서 샘플의 크기를 미리 결정을 위해 통계적 방법은 사용하지 않았다. 통계 분석을 위하여, one-way ANOVA 및 Tukey post-hoc tests를 사용하였다.

[1688]

[1689] <u>실시예 1. 마우스 망막 조직에서 AAV를 통한 CjCas9 발현 확인</u>

[1690] 984 아미노산으로 구성된 CjCas9은 SpCas9에 비해 상당히 작은 크기(2.95kbp)로, CjCas9 유전자와 sgRNA가 함께 하나의 AAV 벡터에 패키징이 가능하다. 이에 본 실시예에서 노인성 황반변성(AMD)의 치료를 위한 CjCas9을 이용한 유전자 조작의 치료법의 가능성을 확인하고자 CjCas9을 발현하는 AAV를 이용하였다.

[1691] 마우스에서 망막과 같은 조직에서 AAV를 통해 CjCas9이 발현하는지를 확인하기위해, 맥락막 신생혈관 형성(choroidal neovascularization, CNV)과

관련있는 Vegfa 유전자와 Hif1a 유전자에 특이적인 U6 프로모터-유도 sgRNA 및 EFS 프로모터 제어하에 CjCas9을 암호화하는 AAV9 벡터를 제작하였고, 이때, CjCas9은 C-말단에 자가절단하는 T2A 펩타이드를 이용해 eGFP가 연결되어 있도록 제작하였다(도 1A, 1B). 제작한 바이러스를 유리체내 주입을 통해 안구로 주입하고 6주 후, 안구에서 CjCas9의 발현을 확인하였고, 표적 딥 시퀀싱을 이용하여 인델 빈도를 측정하였으며, Vegfa 단백질의 양도 ELISA를 이용해 측정하였다(도 1D).

[1692] CjCas9에 연결된 eGFP는 망막 색소 상피세포(retinal pigment epithelial(RPE) cells)에서 발현이 확인되었다(도 2).

[1693] 또한, CjCas9에 의해 유도된 인델은 RPE 세포의 Rosa26, Vegfa, 및 Hif1a 타겟 위치에서 관찰되었고, 각각 14 ± 5%, 22 ± 3%, 및 31 ± 2%의 인델 빈도를 확인하였다(도 1C). 또한, 상기 세포에서 Vegfa 또는 Hif1a 특이적 sgRNA에 의해 주목할 정도로 오프-타겟 인델이 유도되지 않았다(도 1E).

[1694] 예상대로, Vegfa 단백질의 발현양은 Vegfa-특이적 CjCas9 (AAV-CjCas9: Vegfa)을 암호화하는 AAV를 처리한 RPE 세포에서 감소하였으나, Hif1a- 또는 Rosa26-특이적 CjCas9 (AAV-CjCas9: Hif1a 또는 Rosa26)을 암호화하는 AAV를 처리한 경우에는 그렇지 않았다(도 1D). 특히 Hif1a 단백질의 경우, 산소 정상 상태(normoxia condition)에서 분해되기 때문에 단백질의 발현양을 측정할 수 없었다.

[1695]

[1696] <u>실시예 2. 맥락막 신생혈관 형성(CNV) 유도 마우스를 이용한 Vegfa 또는 Hif1a 특이적 AAV-CjCas9의 효과</u>

[1697] CNV를 유도하기 위하여, 안구에 AAV를 주입한 후 6주째에 안구에 레이저를 처리하였고, 레이저 처리 일주일 후 CNV의 부위를 측정하였다(도 1F). AAV-CjCas9: Vegfa 및 AAV-CjCas9: Hif1a를 각각 주입한 경우, AAV를 주입하지 않은 음성 대조군에 비해 CNV 부위가 각각 24 ± 4% 및 20 ± 4% 감소하는 것을 확인하였다(도 1F, 1G). 또 다른 음성 대조군인 Rosa26-특이적 CjCas9의 경우 어떠한 치료적 효과도 확인하지 못했다.

[1698]

[1699] <u>실시예 3. 노인성 황반변성(AMD) 치료를 위한 AAV-CjCas9의 효과</u>

[1700] 마우스 RPE 세포에서 Vegfa 유전자의 조건적 넉아웃이 원뿔세포 기능장애(cone dysfunction)를 야기하기 때문에, RPE 세포에서 AAV를 이용한 유전자 넉아웃이 부작용을 야기하는지 조사하였다. 이를 위해 망막에서 원뿔세포(cone) 기능관련된 opsin 양성 부위의 크기를 측정하였다. 그 결과, Vegfa-특이적 CjCas9은 AAV를 주입하지 않은 대조군에 비해 30 ± 10% 정도 크기가 감소하였다(도 3). 그러나, 예상대로, Hif1a- 또는 Rosa26-특이적 CjCas9은 원뿔세포 기능장애(cone dysfunction)를 유발하지 않았다. 이러한 결과는 신생신생혈관형성을 저해하면서 원뿔세포 기능장애(cone dysfunction)를

야기하지 않는 Hif1a의 불활성화를 AMD의 치료를 위하여 제시할 수 있다.

[1701] HIF1A는 hypoxia-inducible transcription factor로, VEGFA의 전사를 활성화시키는 역할을 한다. AMD 치료를 위한 1차 치료 표적이며, 분비 단백질인 VEGFA와 달리, HIF1A는 약물 타겟으로 고려되지 않으며, 또한 HIF1A 같은 전사인자는 일반적으로 항체나 앱타머 또는 작은 분자들에 의해 직접적으로 표적할 수 없다. 본 연구에서, 마우스의 안구에서 Hif1a 유전자를 표적하는 CjCas9을 이용해 RPE 세포에서 Hif1a 유전자를 효과적으로 불활성시켰고, 그 결과 AMD 마우스 모델에서 CNV의 부위가 감소하는 것을 확인하였다(도 3).

[1702]

[1703] 실시예 4. 망막 질환 치료를 위한 AAV-CjCas9의 효과

[1704] 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy, DR), 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity) 등과 같은 망막 질환으로 확장 적용하기 위해, 제작한 바이러스를 유리체내 주입을 통해 안구로 주입하고 6주 후, 망막 조직에서 인델 빈도에 의한 *in* vivo 게놈 교정의 효과를 표적 딥 시퀀싱으로 관찰하였고, Vegfa 단백질의 발현양을 ELISA로 확인하였다(도 1B). 망막 조직에서, CjCas9에 의해 유도된 인델은 망막 세포에 Rosa26, Vegfa, 및 Hif1a 타겟 위치에서 관찰되었고, 각각 44 ± 8%, 20 ± 2%, 및 58 ± 5%의 인델 빈도를 확인하였다(도 4A, 4B, 4C). 예상대로, Vegfa 단백질의 발현양은 Vegfa- 또는 Hif1a-특이적 CjCas9 (AAV-CjCas9: Vegfa 또는 Hif1a)을 암호화하는 AAV를 처리한 망막 세포에서 감소하였으나, Rosa26-특이적 CjCas9 (AAV-CjCas9: Rosa26)을 암호화하는 AAV를 처리한 경우에는 그렇지 않았다(도 4D).

[1705]

[1706] 실시예 5. 당뇨병성 망막증 치료를 위한 AAV-CjCas9의 효과

[1707] 당뇨병성 망막증은 혈관 파열 및 혈액 누출 증상을 보이는 것이 특징이다. 이에 본 실시예에서 STZ를 이용하여 당뇨병을 유도한 마우스를 이용하여 혈관 파열 또는 혈액 누출 증상을 확인하였고, CjCas9에 의한 개선 또는 치료 효과를 확인하였다. 그 결과, Vegfa 특이적 CjCas9(AAV-CjCas9: Vegfa)을 주입한 망막에서 혈관 파열 및 파열로 인한 혈액 누출이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Rosa26 특이적 CjCas9(AAV-CjCas9: Rosa26)를 주입한 마우스에 비교했을 때, Vegfa 특이적 CjCas9(AAV-CjCas9: Vegfa)을 주입한 경우 동일한 나이의 정상 마우스와 유사한 정도로 혈관 파열 및 혈액 누출이 감소하며 회복되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 STZ를 주입하고 7 주 후에 AAV-CjCas9을 주입하고 6 주 후에 관찰한 실험(도 5)과, STZ를 주입하고 14 주 후에 AAV-CjCas9을 주입하고 7 주 후에 관찰한 실험(도 6) 모두에서 유사하게 나타났다. 상기 결과를 통해, Vegfa 특이적 CjCas9(AAV-CjCas9: Vegfa)이 혈관 파열 및 혈액 누출을 감소시키는 효과를 가지는 것을 확인하였고, 이를 이용하여 당뇨병성 망막증을 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 예측할 수 있다.

[1708]

[1709] 실시예 6. 인간 신생혈관형성 관련 인자의 표적 위치 스크리닝

[1710] 앞선 실시예의 적용을 확장하고자, 인간 VEGFA(도 7), 인간 HIF1A(도 8A)와 더불어 AMD 및 DR 치료를 위한 게놈 교정의 잠재적 표적으로서 인간 ANGPT2(도 9), 인간 EPAS1(도 10) 및 인간 ANGPTL4(도 11)를 선택하여, 인간세포에서 CjCas9 시스템을 이용해 효과적으로 교정할 수 있는 각 유전자의 표적 위치를 스크리닝하였다. 특히, 마우스 Hif1a 유전자의 CjCas9 표적 위치는 인간 및 다른 포유동물에서 완벽하게 보존된다(도 8B). 추가적으로, 보존된 표적 위치의 높은 교정 효율은 인간세포에서 관찰되었다(도 8A, sgRNA #7). 따라서, 본 연구에서 제시한 Hif1a를 위한 AAV 또는 그의 변이체는 향후 인간 환자의 치료를 위해 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[1711]

산업상 이용가능성

[1712] 인위적으로 조작한 신생혈관형성 관련 인자 및 이에 의해 인위적으로 기능을 변형시킨 신생혈관형성 시스템에 의해서, 효과적인 신생혈관 관련 질환, 예를 들어 신생혈관 관련 안구질환의 치료적 용도를 이용할 수 있다.

[1713] 다양한 신생혈관형성 관련 인자들의 생존(survival), 증식(proliferation), 지속(persistency), 세포독성(cytotoxicity), 사이토카인 분비(cytokine-release) 등의 특성을 조절함으로써 신생혈관형성 시스템의 효능을 개선시킬 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 핵산서열 내 변형이 일어난 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 핵산서열 내 변형은 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 일어난 것을 특징으로 하는, 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 신생혈관형성 관련 인자는 VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택되는 1이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 유전자는 가이드핵산-에디터단백질 복합체에 의해 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자로서,
상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 PAM(proto-spacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp의 염기 서열 부위 내의
하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;
야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;
외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입
중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는
상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형
을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 프로모터 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 엑손 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 인트론 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 핵산의 변형은 유전자의 인핸서 영역에서 일어난 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 9] 제4항에 있어서,
상기 PAM 서열은 예를 들어, 하기의 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자(5'에서 3'방향으로 기재함).
NGG(N은 A, T, C 또는 G임);
NNNNRYAC(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C또는 T임);
NNAGAAW(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임);
NNNNGATT(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임);
NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임); 및
TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[청구항 10] 제2항에 있어서,
상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 신생혈관형성 관련 인자.

[청구항 11] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
이하의 군으로부터 선택되는 1 이상의 가이드 핵산:
VEGFA 유전자 핵산 서열 중 서열번호 3, 4, 7, 9, 10 및 11의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;
HIF1A 유전자 핵산 서열 중 서열번호 14, 18, 19, 20, 26, 29 및 31의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;
ANGPT2 유전자 핵산 서열 중 서열번호 33, 34, 37, 38, 39 및 43의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산;
EPAS1 유전자 핵산 서열 중 서열번호 47, 48, 49, 50, 53, 54 및 55의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산; 및

ANGPTL4 유전자 핵산 서열 중 서열번호 64, 66, 67, 73, 76 및 79의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 할 수 있는 가이드핵산.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 가이드 핵산은 18 내지 23 bp의 뉴클레오타이드인, gRNA 분자.

[청구항 14] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 에디터단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 유전자 조작은
신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내
PAM(proto-spacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 1bp 내지 50bp의 염기 서열 부위 내의
하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입;
야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환;
외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입
중 하나 이상의 핵산의 변형, 또는
상기 신생혈관형성 관련 인자를 구성하는 핵산서열 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 화학적 변형
을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 PAM 서열은 예를 들어, 하기의 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물(5'에서 3'방향으로 기재함).
NGG(N은 A, T, C 또는 G임);
NNNNRYAC(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A또는 G이고, Y는 C또는 T임);
NNAGAAW(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, W는 A 또는 T임);
NNNNGATT(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G임);

NNGRR(T)(N은 각각 독립적으로 A, T, C 또는 G이고, R은 A 또는 G이고, Y는 C 또는 T임); 및
TTN(N은 A, T, C 또는 G임).

[청구항 18] 제14항에 있어서,
상기 유전자 조작용 조성물은 바이러스 벡터 시스템으로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 조작용 조성물.

[청구항 20] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자를 서열분석함으로써 대상체에서 인위적으로 조작 가능한 표적 위치의 서열에 대한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 21] 제20항의 방법을 통해 제공받은 정보를 이용하여 라이브러리를 구축하는 방법.

[청구항 22] (a) VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 중 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
(b) 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus* pyogenes) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter* jejuni) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus* thermophilus) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 아우레우스 (*Streptocuccus* aureus) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria* meningitidis)유래의 Cas9 단백질, 및 Cpf1 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 유전자 조작용 키트.

[청구항 23] VEGFA 유전자, HIF1A 유전자, ANGPT2 유전자, EPAS1 유전자 및 ANGPTL4 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 핵산 서열 내 1 이상의 표적 서열에 각각 상보적인 결합을 형성할 수 있는 가이드핵산 또는 이를 암호화하는 핵산서열; 및
에디터단백질 또는 이를 암호화하는 핵산서열
을 포함하는 혈관신생성 장애 치료용 조성물.

[청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 표적 서열은 서열번호 1 내지 79번의 표적 서열 중 1 이상인 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.

[청구항 25] 제23항에 있어서, 상기 에디터단백질은 캄필로박터 제주니 (

Campylobacter jejuni) 유래의 Cas9 단백질인 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.

[청구항 26] 제23항에 있어서, 상기 혈관신생성 장애는 허혈성 망막병증 또는 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity)인 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.