

유전체 편집(Crispr/Cas9) 기술을 이용한 In vivo 치료제 개발 동향

이재영

Genormalizer Team, R&D Center, (주)툴젠

E-mail: jy.lee2@toolgen.com

요약문

생명체의 다양성은 근본적으로 유전자의 다양성에서 유래되고 유전체에서의 질병과 관련된 유전자의 돌연변이는 다양한 질병을 유발한다. 인간의 질병에 대한 병리학과 유전학의 상호관계가 점차 밝혀지면서 안전하고 효율적인 유전자 교정기술은 그 동안 난치성이었던 질환에 대한 새로운 치료법으로 주목 받고 있다. 이러한 점에서 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)와 CRISPR-associated (Cas) 기술의 개발은 어렵게만 느껴졌던 유전자 교정에 대한 새로운 패러다임을 제시하고 있다. 특히 체내로 CRISPR/Cas9을 전달하는 *in vivo* 유전자 교정은 효율적인 전달방식만 확립되면 손쉽게 유전자교정을 할 수 있으므로 획기적인 혁신신약이 될 가능성이 크다. 하지만 이러한 유전자교정은 한 번 이루어지면 영구적이므로 기술적용에 신중을 기해야 한다. 본 동향 리포트에서는 현재까지 이루어졌던 CRISPR/Cas9을 이용한 동물에서의 *in vivo* 유전자 치료 사례와 CRISPR/Cas9을 이용한 *in vivo* 유전자 치료제의 개발 동향을 분석하고 향후 이 기술이 치료제로서 상용화 되기 위해 극복해야 할 과학적 기술적 한계점 및 관련 규제에 대해 논의한다.

Key Words: 유전자교정, Genome editing, Genome, Gene, 유전자, CRISPR/Cas9, 유전자가위, *in vivo* 유전자교정, Viral delivery, Non-viral delivery, Gene therapy, 유전자 치료제

목 차

1. 서론
2. 본론
 - 2.1 CRISPR/Cas9 기술

2.2 CRISPR/Cas9 기술이 *in vivo*에 적용되기 위한 조건

2.3 CRISPR/Cas9 전달벡터

2.3.1 Viral 전달벡터

2.3.1.1 *In vivo* 유전자 교정 사례

2.3.1.2 Viral 전달벡터의 단점 및 미래

2.3.2 Non-viral 전달벡터

2.3.2.1 *In vivo* 유전자 교정 사례 - Physical methods

2.3.2.2 지질 나노입자(Lipid Nanoparticle)

2.3.2.3 *In vivo* 유전자 교정 사례 - Lipid Nanoparticle

2.4 *In vivo* 유전자 치료제의 임상적용을 위한 고려사항

2.4.1 유전자 치료제의 대량생산

2.4.2 유전자 치료제의 규제

3. 결론

4. 참고문헌

1. 서론

현재까지 유전질환을 일으킨다고 알려진 유전자(gene)들이 3,000개 이상이라고 알려져 있다(Orphanet 참조). 지속적인 진단의학 및 유전자 분석, 특히 next-generation sequencing 기술의 발전에 의해 향후 유전질환과 관련된 4,000-7,000개 정도의 유전자들이 새롭게 밝혀질 것으로 예견된다[1]. 이런 진단의학들이 발전함에도 불구하고 아직까지 유전질환에 대한 효율적인 치료제 개발은 요원한 상태이나, 최근 괄목할 만한 발전을 이루고 있는 유전자교정 기술은 그 동안 발전 속도가 더디었던 유전자 치료법의 핵심기술로 대체되면서 이와 관련된 치료법 개발에 많은 조명이 집중되고 있다. 유전자치료란 질병을 유발하는 유전자의 돌연변이에 의한 기전을 정상으로 되돌리기 위해, 돌연변이를 정상형태로 교정하거나, 유전자의 발현량을 억제, 혹은 이 유전자를 대체할 수 있는 유전자의 발현량을 증가시키기 위해 외부에서 유전자를 도입시키는 치료법을 일컫는다. 그 중 *in vivo* 유전자치료란 유전자 치료물질을 국소 혹은 인체 전체(local or systemic)적으로 전달 하는 방식이다. 질병의 근본적인 치료를 위해서는 질병을 유발하는 돌연변이가 일어난 유전자를 교정시키는 기술이 필요한데 그 중 가장 최근에 개발된 CRISPR/Cas9 유전자 교정 기술이 손쉽고 효율적이어서 각광 받고 있다. 이 기술을 응용한 다양한 유전질환 치료에 대한 시도가 이루어지고 있는데, 이 동향 리포트에서는 CRISPR/Cas9 유전자교정 기술을 응용한 질병치료 목적의 동물모델에서의 *in vivo* 유전자 교정사례(proof-of-concept study)와 *in vivo* 치료제 개발상황과 상용화가 되기 위한 조건들을 논의한다.

2. 본론

2.1 CRISPR/Cas9 기술

CRISPR/Cas9 기술은 Cas9이라는 특정한 염기서열을 인식하여 유전자를 자를 수 있는 효소가 그 염기서열을 포함하고 있는 single guide RNA (sgRNA)를 인식하여 특정한 DNA를 자를 수 있는 도구이다(그림 1). sgRNA를 인식한 Cas9은 특정한 protospacer adjacent motif (PAM)에서 5'으로 3 base pair 떨어진 부분에 달라 붙어 DNA의 이중나선의 절단 (double-strand break)을 일으킨다[2, 3]. 이렇게 절단된 DNA는 크게 두 가지 기작으로 복구될 수 있다; 1) 비상동적 말단 결합, Non-homologous end joining (NHEJ), 2) 상동 재조합, Homology-directed repair. 비상동적 말단 결합은 효율적이긴 하나 무작위적으로 DNA가닥이 재배열 된다. 반면에 DNA 공여체(donor)를 이용한 상동 재조합은 현재의 기술로는 비상동적 말단 결합에 비해 비효율적이긴 하나 원하는 DNA 서열로 정확한 유전자 교정이 가능하다(그림 1).

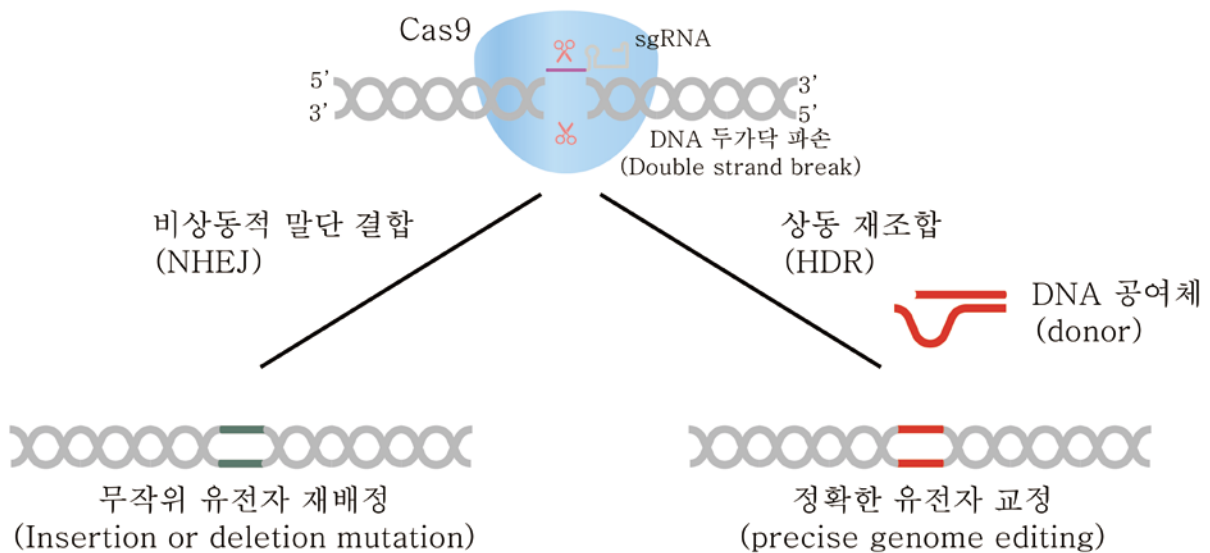


그림 1. 세포 내 DNA 수선시스템을 이용한 CRISPR/Cas9 작용 기작

CRISPR/Cas9은 타겟 DNA를 정확히 인식할 수 있게 디자인된 sgRNA와 이를 토대로 타겟 DNA를 자를 수 있는 Cas9으로 구성 되어 있다. sgRNA를 인식한 Cas9은 DNA 이중나선의 절단을 일으키는데 절단된 DNA는 두 가지 기작으로 수선될 수 있다. 첫째는 비상동적 말단 결합으로 효율적이거나 무작위적으로 유전자가 재배정되어 insertion or deletion 돌연변이가 일어나게 된다. 두번째로는 절단된 DNA부근 서열과 상동하는 서열을 포함한 DNA 공여체가 존재할 때에 일어날 수

있는 비효율적이나 정확한 유전자 교정이 가능한 상동 재조합이 있다.

CRISPR/Cas9은 3세대 유전자 교정 도구로서 1세대인 zinc finger nuclease (ZFN)나 transcription activator-like effector nuclease (TALEN)에 비해 몇 가지 장점을 가지고 있다. 첫째로 CRISPR/Cas9은 sgRNA와 유전자를 자르는 Cas9 효소가 분리되어 있으므로 이를 동시에 디자인해야만 하는 ZFN이나 TALEN에 비해 조합과 합성이 용이하다. 두 번째로, sgRNA를 여러 개를 동시에 사용하면 단일보다 여러 가지의 DNA서열을 동시에 타겟할 수 있어 다중화(multiplexing)가 용이하다[3]. 또한, 효소의 기능이 없는 Cas9 (catalytically inactive Cas9, dead Cas9)에 유전자 전사를 조절하는 VP16과 같은 단백질을 결합하여 유전자 발현량도 조절(transcriptional control)할 수 있다[4, 5].

2.2 CRISPR/Cas9 기술이 *in vivo*에 적용 되기 위한 조건

모든 치료제가 그렇듯이 CRISPR/Cas9 기술이 치료제가 되기 위해서 먼저 정확성과 효율성이 요구된다. 정확성은 안전성과 직접 관련되어 있고, CRISPR/Cas9 기술이 치료제로 적용되기 위해 필수적이다. 특히 CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 DNA서열을 바꾸면 다시 되돌릴 수 없으므로, 이에 대한 신중한 연구가 필요하다. ZFN 그리고 TALEN과 같이 CRISPR/Cas9도 off-target을 일으킬 수 있다. 이를 *in vitro*에서 체계적으로 분석하기 위해 여러 가지 기술들이 개발되어 있다 (Digenome-seq, Guide-seq, Bless 등)[6-8]. 정확성에 비해 효율성 면에서는 처음으로 발견된 *Streptococcus pyogenes*에서 유래된 Cas9 효소(SpCas9)가 다양한 박테리아 종에서 유래된 Cas9보다 더 효율적으로 알려져 있으므로, SpCas9을 이용할 경우 효율성보다는 정확성의 측면에서 더 많은 연구가 진행되어야 한다. 다만, 바이러스를 이용한 전달벡터를 이용한 CRISPR/Cas9을 위해서는 다른 종에서 유래된 Cas9을 사용하게 되는데, 보통 이들은 SpCas9에 비해 효율이 전반적으로 낮아 이들의 효율성을 높이는 연구도 요구된다.

In vitro 상에서는 CRISPR/Cas9 기술을 사용하면 손쉽게 유전자를 조작할 수 있다. 이에 비해 *in vivo*에서는 아직 치료제 전달(delivery)의 기술적 문제로 CRISPR/Cas9 기술을 이용한 유전자의 조작이 어려운 편이므로, 현재 많은 CRISPR/Cas9 기술을 이용한 치료제 개발 연구는 *ex vivo* 형태에서 많이 이루어지고 있다. *ex vivo* 형태의 치료방식은 몸 밖에서 세포의 유전자를 치료목적으로 조작하여 환자에게 투여 하는 방식의 세포치료제 형식으로 *in vitro*의 높은 유전자교정 효율을 극대화 할 수 있는 방법이다(CRISPR/Cas9 기술을 이용한 *ex vivo* 형태의 세포치료제 개발은 툴젠 소속 김윤영 박사의 'CRISPR/Cas9 *ex vivo*' BRIC 동향 리포트 참조). *Ex vivo* 형태의 유전자 교정 방법이 효율적이나 이 세포치료제 방식은 몸 안의 근본적인 유전자치료를 할 수 없어 치료할 수 있는 질병들이 제한적이다. 따라서, 다양한 질환을 치료하기 위해서는 *in vivo*에서의 유전자교정이 필수적이다.

CRISPR/Cas9을 통한 유전자 교정을 위해서는 sgRNA와 Cas9이 세포의 핵(nucleus) 안으로 침투하여 목표한 DNA부위를 잘라야 한다. sgRNA와 Cas9은 플라스미드(plasmid) 형태의 DNA, RNA/mRNA 혹은 단백질 형태로 세포 내로 전달할 수 있는데, 이들은 친수성(hydrophilic) 성질을 띠고 분자량(molecular weight)이 커서 소수성(hydrophobic) 성질의 세포벽(plasma cell membrane)을

효율적으로 통과할 수 없다. 특히 체내의 환경은 핵산(nucleic acid)형태의 CRISPR/Cas9의 효율적인 전달을 방해한다. 예를 들어 혈중에 존재하는 여러 뉴클레아제(endonuclease)는 보호되지 않은(naked) CRISPR/Cas9의 nucleotide를 분해하고, 외래 유입된 물질에 대하여 체내의 면역반응을 일으킬 가능성이 있다. 이러한 이유 때문에 CRISPR/Cas9을 보호하면서 원하는 장기 및 세포로 효율적으로 전달하기 위해 전달벡터(delivery vector) 사용이 필수적이다[9]. *In vivo*로 CRISPR/Cas9 전달벡터는 크게 두 가지가 있는데 바이러스를 이용하는 방식과 바이러스를 이용하지 않는 방식이다(그림 2).

CRISPR/Cas9기반 IN VIVO 유전자 치료

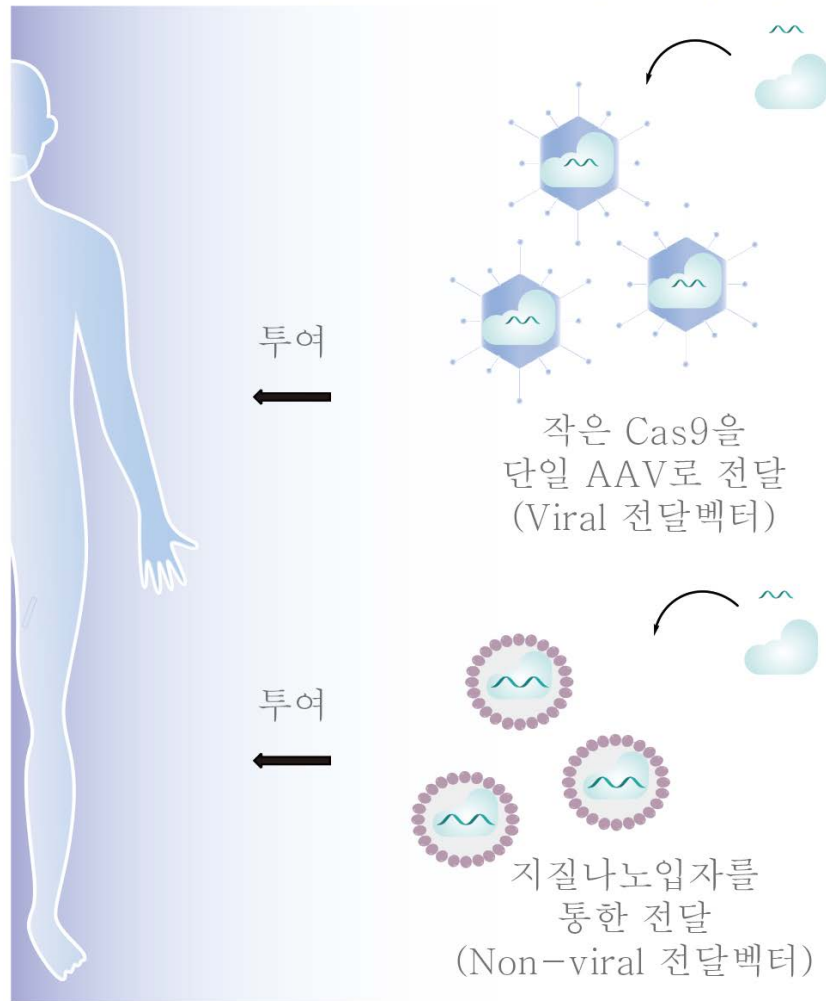


그림 2. CRISPR/Cas9 기반 *in vivo* 유전자 전달/치료 방법

CRISPR/Cas9을 체내에 전달하기에 크게 두 가지 방법이 있다. 첫 번째는 Viral 전달벡터 방식인데, 현재 가장 각광받고 있는 방법은 보통의 SpCas9보다 분자량이 작은 Cas9을 이용하여 sgRNA와 함께 단일 AAV에 package하여 체내로 전달하는 방식이다. 두 번째로는 non-viral 전달벡터 방식인데, 가장 주목 받고 있는 방법은 mRNA형태의 Cas9과 sgRNA를 지질 나노 입자에 package하여 체내로 전달하는 방식이다.

2.3 CRISPR/Cas9 전달벡터

2.3.1 Viral 전달벡터

유전자 정보를 치료목적으로 전달함에 있어서 가장 많은 연구가 되어 있는 바이러스의 종류는 총 3가지이다; 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 그리고 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV)이다[10]. 이 중 다른 바이러스에 비해, 외래유전자를 세포 내로 삽입(genomic integration)할 확률이 매우 낮다는 점과 선행연구를 통해 검증된 낮은 면역반응 등의 이점으로 인해 현재까지 유전자치료제로써 상업화에 성공한 바이러스는 아데노 관련 바이러스이다[11]. 아데노 관련 바이러스의 높은 형질도입(유전물질의 세포 내 도입, transduction) 효율에도 불구하고 이를 이용하여 CRISPR/Cas9을 전달함에 있어 가장 큰 단점은 단일 벡터가 포함할 수 있는 유전자 정보가 다른 바이러스에 비해 작다는 점이다(package limit). 이런 점으로 인해 분자량이 큰 보통의 Cas9 (SpCas9) 그리고 sgRNA를 포함하는 유전물질은 단일 아데노 관련 바이러스 벡터에 package될 수 없다. 이를 극복하기 위해 분자량이 SpCas9보다 작은 Cas9을 다른 박테리아 종류에서 찾는 연구가 되어 왔는데 Massachusetts Institute of Technology의 Feng Zhang 그룹과 Editas Medicine에서 찾은 *Streptococcus aureus*에서 유래한 Cas9 (SaCas9)과 서울대학교의 김진수 교수님 그룹과 ToolGen에서 찾은 *Campylobacter jejuni*에서 유래한 Cas9 (CjCas9)이 한 개의 아데노 관련 바이러스 벡터에 sgRNA와 함께 package될 수 있고, *in vivo* 유전자 교정에 적용되어 효율을 보였다[12-14]. 하지만 이 두 가지 종류의 Cas9은 분자량이 작다는 장점이 있지만, 인식할 수 있는 PAM 서열이 복잡해서(SpCas9; 5'-NGG-3', SaCas9; 5'-NNGRRT-3', CjCas9; 5'-NNNNRYAC-3') target하고자 하는 DNA가 제한적이고 SpCas9에 비해 효율이 전반적으로 낮다는 단점이 있다. 하지만 보통의 SpCas9을 이용하면 두 개의 아데노관련 바이러스 벡터를 사용해야 하므로 SaCas9 혹은 CjCas9을 이용하는 방법이 단일 아데노관련 바이러스 벡터를 이용한 치료용 *in vivo* 유전자치료제로 관심을 받고 있다.

2.3.1.1 *In vivo* 유전자 교정 사례

유전자 정보를 *in vivo*로 전달하기 위해서는 각 타겟 장기로의 전달이 명확해야 하는데 현재까지 모든 장기로의 효율적인 유전자 치료제 전달은 쉽지 않다. 이로 인해 CRISPR/Cas9 관련 *in vivo* 치료제 개발은 비교적 체내 전달이 용이한 장기들 예를 들면, 간, 눈, 근육 피부 관련 질환 등에 대한 연구가 선행되고 있다(표 1).

표 1. CRISPR/Cas9을 이용하여 동물모델에서의 치료효능 입증 사례

타겟유전자/타겟질환	전달방법/유전자교정		동물종	타겟 장기	문헌
	방법	Cas9			
Pcsk9/hypercholesterolemia	AAV8/NHEJ	Sa	Mice	간	[14]
	Dual AAV8/NHEJ	Sp	Mice	간	[15]
	Dual AAV8/NHEJ	Sp	Humanized mice	간	[16]
	지질 나노 입자/NHEJ	Sp	Mice	간	[33]
OTC/OTC 결핍증	AAV8/NHEJ	Sa	Mice	간	[17]
DMD/듀켄씨근이영양증	AAV9/NHEJ	Sa	Mice	간	[18]
	AAV8/NHEJ	Sa	Mice	간	[19]
	Dual AAV9/NHEJ	Sp	Mice	간	[20]
MSTN/악액질	AAV8/NHEJ	Sa	Mice	근육	[24]
Vegfa, Hif1a,	AAV-Dj/NHEJ	Cj	Mice	눈	[25]
Hif2a/노인성황반변상	RNP-Liposome/NHEJ	Sp	Mice	눈	[35]
CEP290/레버 선천성 흑내장 c.2991+1655 A>G	AAV/NHEJ	Sa	Mice	눈	www.edit asmedicin e.com
HIV DNA/AIDS	AAV8/NHEJ	Sa	Mice	Systemic	[26]
	AAV8/NHEJ	Sa	Humanized mice	Systemic	[27]
Fah/유전성 티로신 혈증 I	Hydrodynamic 주사/HDR	Sp	Mice	간	[30]
	AAV + 지질 나노 입자/HDR	Sp	Mice	간	[32]
	Hpd/유전성 티로신 혈증 I	Hydrodynamic 주사/NHEJ	Sp	Mice	간

HBV DNA/B형 간염	지질 나노 입자/NHEJ	Sp	Mice	간	[33]
Col7a1/수포성표피박리증	RNP-Liposome/NHEJ	Sp	Mice	피부	[36]
Hereditary transthyretin amyloidosis	지질 나노 입자/NHEJ	Sp	Mice	간	www.intelliatx.com

심혈관질환(cardiovascular disease)의 주된 원인으로 알려진 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol)의 혈중농도를 조절하는 pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)을 SaCas9을 이용한 NHEJ 형식으로 knockout 시키기 위해 간세포(hepatocyte)에 바이러스 친화성을 띤다고 알려진 아데노관련 바이러스 serotype 8 (AAV8)을 이용한 연구가 마우스에서 진행되었다. 그 결과, >40%의 돌연변이(insertion or deletion, indel)가 *PCSK9* locus에서 일어났고 이는 ~90% 혈중 PCSK9, ~40% 혈중 LDL-cholesterol 수치의 저하로 이어졌다[14]. 비슷한 방식으로 PCSK9을 knockout 시켜주는 연구는 SpCas9을 이용하여 두 가지 AAV 벡터를 이용한 사례가 있었고, 인간화 된(humanized) 마우스를 이용하여 보통 마우스와 비슷한 효과를 얻었기에 유전자교정 치료제 연구에 humanized 마우스의 중요성을 시사하였다[15, 16].

또한 AAV8과 SaCas9을 이용하여 ornithine transcarbamylase (OTC) 결핍증의 마우스모델을 치료한 사례가 있다. 비록 두 개의 벡터로 나뉘었지만 SaCas9과 정확한 유전자 교정을 위해 HDR donor와 sgRNA를 다른 벡터에 실어 정맥주사 하여 10% 정도의 유전자 교정(HDR) 효율을 관찰하였다[17]. 인간의 OTC 결핍증은 고암모니아혈증(hyperammonemia)을 유발하여 암모니아 중독에 의한 지능장애, 반복성구토 등의 증상이 있고 생명에 치명적일 수 있어 치료제 개발이 시급한 상황인데, humanized 동물모델에서의 치료효과 입증과 유전자 교정 효율 등에서 추가적인 개선점이 필요하긴 하지만, CRISPR/Cas9을 이용하여 이러한 대사성질환(metabolic disease)에 대한 근본적인 치료대안이 마련되었다고 여겨진다.

간과 더불어 유전자 물질을 전달하기 좋은 장기 중에 하나라고 여겨지는 근육에도 CRISPR/Cas9이 사용되었고 관련질환의 치료연구에 많은 진전이 있었다. 그 중 한가지 예로, DMD 유전자에서 exon 23에 결함이 생긴 듀켄씨근이영양증(Duchenne muscular dystrophy)이 있다. DMD 단백질 말단부분이 없어도 정상적인 기능을 하여 exon-skipping 전략으로 듀켄씨근이영양증의 마우스 모델에서 효율을 본 사례가 있다. AAV8 이나 AAV9을 이용하고 SpCas9(두 가지 벡터)이나 SaCas9(단일벡터)을 이용하여 DMD exon 23을 skip하여 골격근(skeletal muscle)에서 DMD 단백질 발현을 회복시켰고 골격근의 기능을 향상 시켰다[18-20]. 특히 듀켄씨근이영양증 환자의 치사이유가 심근(cardiac muscle)의 DMD 저하로 인한 심장마비(cardiac arrest)로 알려져 있는데 근육주사뿐만 아니라 동맥주사로 심근의 DMD 단백질 발현 및 기능을 회복함으로써 질병모델의 생존을 늘렸다[19, 20].

DMD 유전자교정 외에 근육세포에서 CRISPR/Cas9을 이용한 사례 중, myostatin (MSTN)의 knockout 관련 연구가 이루어졌다. MSTN은 대부분의 병에서 활성화되는(activated) 사이토카인

(cytokine) 중 한가지로 활성화된 MSTN은 근육의 위축(muscle wasting)을 유발하여 근위축(muscle atrophy)을 유발한다. MSTN이 비활성화된 인간 돌연변이 에서 근육비대(hypertrophy)외에 다른 비정상적인 점이 발견되지 않아[21] MSTN을 억제하는 전략이 근위축에 효율적인 치료가 될 것이라고 여겨진다. 특히, MSTN을 타겟한 단일클론성항체(monoclonal antibody)가 암환자들의 악액질(cachexia)에 대한 잠재적인 치료제로 임상시험 진행 중이다[22, 23]. 하지만 항체는 반복적 투여가 요구되어, 지속적 주사에 대한 부작용 및 비용 부담면에서 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 CRISPR/Cas9으로 MSTN을 타겟하여 한번의 치료로 지속적인 효과를 볼 수 있는 개념으로 한 논문이 발표되었다[24]. SaCas9과 MSTN을 타겟한 sgRNA와 근육세포에 특정한 double muscle creatine kinase (dMCK) promoter를 AAV8에 package하여 마우스의 장딴지근(gastrocnemius muscle)으로 국소주사한 다음 종양세포(tumor)를 이식하였을때 약 25%의 근육기능이 대조군에 비해 향상된 것을 보였다[24]. Sequencing을 통한 돌연변이 분석을 통해 MSTN 유전체에 돌연변이가 형성된 것은 5% 정도인 것에 비해 25%의 근육기능 향상으로 보아[24] 비록 근육세포로의 CRISPR/Cas9 전달은 어려워 보이나 약간의 돌연변이 효율로도 치료효과를 기대할 수 있어 향후 전달기술이 발전함에 따라 근육관련 질환은 많은 이점을 볼 것이라고 생각된다.

간과 근육 외에 CRISPR/Cas9 전달이 비교적 쉬운 장기로는 눈이 있다. 눈은 다른 장기에 비해 외부로 노출되어 있고 면역 격리되어(immune privileged) 있어 유전물질 전달이 용이하다고 생각된다. 안질환 중 노인성황반변성(Age-related macular degeneration)의 진행에 강한 연관성을 가진 신혈관 형성(neovascularization)을 억제하기 위해 ToolGen과 서울대학교 IBS 공동연구진은 아데노관련 바이러스의 일종인, AAV-DJ를 사용하여 효율적으로 망막상피세포(retinal epithelial cell)로 신혈관 형성에 중요한 역할을 하는 *vegfa* (vascular endothelial growth factor alpha)와 *hif1a* (hypoxia inducible factor 1 alpha) 그리고 *hif2a* (hypoxia inducible factor 2 alpha)를 타겟한 sgRNA와 CjCas9을 효율적으로 단일벡터로 전달하였다[12]. VEGFA에 대한 단일클론성 항체가 유일한 신혈관 형성과 관련된 안질환의 치료제였으나 지속적으로 투여해야 한다는 부담과 몇 가지 부작용 등으로 치료 대체제가 시급하였다[25]. 이 연구는 단일벡터로 VEGFA 또는 좀더 특정한 *Vegfa*의 하류 신호(downstream signal)인 *Hif1a*를 타겟하여 치료 대체재개발 가능성으로서의 의미가 크다.

비유전성(non-genetic) 안질환 외에 유전성 안질환 중 가장 많은 연구가 이뤄진 질환으로는 레버 선천성 흑내장(Leber congenital amaurosis, LCA)이 있다. 이 질환 환자 중 20%는 *CEP290* 유전자의 intron 26에 c.2991+1655 A>G 돌연변이가 생겨 CEP290 단백질에 splicing이 일어나게 되는데, Editas Medicine에서 돌연변이 주위의 intron 26에 두 개의 sgRNA와 SaCas9을 AAV에 package하여 치료하는 전략을 세웠고, 환자에서 유래한 섬유아세포(fibroblast)와 영장류에서 치료 효능을 검증 하였다(www.editasmedicine.com).

CRISPR/Cas9을 이용하여 인간에게 치명적인 바이러스의 유전체를 제거할 수도 있다. 그 예로, SaCas9과 5' LTR과 *Gag* gene을 타겟한 sgRNA를 AAV8에 package하여 AIDS를 유발하는 HIV를 효율적으로 마우스와 랫드(rat)에서 제거한 사례가 있다[26]. 같은 그룹은 비슷한 방법으로 골수/간/갑상선을 인간화한(humanized) 마우스를 이용하여 효율적으로 HIV를 제거하였다. 이 그룹은 2-4가지의 sgRNA를 이용하여(duplex-quadruplex sgRNAs) 5', 3' LTR 그리고 HIV 구조에 중요한 부위인 *Gag*과 *Pol*을 타겟하여 HIV를 말끔히 제거하였다[27]. HIV는 스스로 복제하는 단계에서 높은

돌연변이 확률이 존재하므로 multiplexing sgRNA방법이 말끔히 HIV를 제거하는데 효율적이다. 이런 multiplexing sgRNA 방법은 HIV의 escape 확률을 크게 줄일 수 있고[28, 29] 친바이러스적인 돌연변이가 지속됨에도 HIV를 타겟할 확률이 높아 CRISPR/Cas9을 이용한 HIV 치료제로써 유망하다.

2.3.1.2 Viral 전달벡터의 단점 및 미래

이처럼 높은 전달효율의 AAV를 이용한 CRISPR/Cas9 유전자치료제 관련 연구는 활발히 진행되고 있다. 반면에 AAV를 CRISPR/Cas9 유전자치료제로 이용하기에 치명적인 단점이 있는데, 우선 안전성 문제와 dosage 문제가 있다. 아직까지 전임상에서의 동물실험에서는 안전하다고 알려져 있지만, AAV 벡터는 Cas9 뉴클레아제의 지속적인 발현을 야기하여 off-target 효과가 발생할 수 있다. 또한 치료효과를 보려면 비교적 많은 양의 바이러스를 투여해야 하기 때문에 생산단가가 높아 질 수 있고, 많은 양에 인한 세포독성(cytotoxicity)이나 유전독성(genotoxicity) 등이 발생할 수 있다. 바이러스 생산성의 측면에서는 가격뿐만 아니라 세포 배양을 통해 생산되므로 batch-to-batch difference가 심할 수 있어 많은 양을 필요로 하는 AAV의 유전자치료제의 관점에서 large scale의 reactor-based AAV production 시스템이 갖추어져야 한다(그림 3).

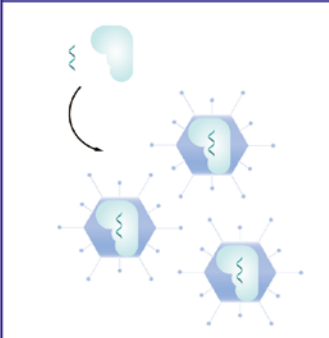
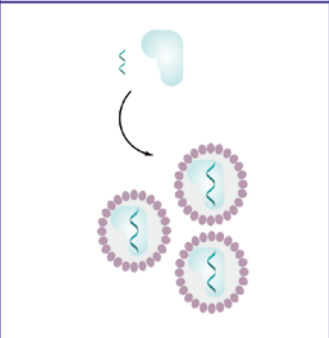
	Viral 전달벡터 (단일 AAV)	Non-viral 전달벡터 (지질 나노 입자; LNP)
		
전달효율	높음 다양한 tissue tropism 관련 AAV serotype 존재	낮음 현재기술로 AAV에 비해 전달 효율 낮음
안정성	낮음 지속적 발현에 의한 off-target 가능성 존재	높음 짧은 발현으로 off-target 최소화
생산단가	높음 cell culture를 통한 비효율적 생산방식	낮음 chemical synthesis를 통한 대량생산 용이
생산성	낮음 batch-to-batch variation 존재	높음 chemical synthesis를 통한 일정한 batch생산 가능

그림 3. Viral 전달벡터와 Non-viral 전달벡터의 장점과 단점

2.3.2 Non-viral 전달벡터

바이러스를 이용하지 않는 non-viral 전달벡터는 바이러스 전달벡터에 비해 독성이 덜하고 면역반응이 작을 수 있다는 강점이 있지만 전달효율이 확실치 않다. 이상적인 non-viral 전달벡터는 생체에 거부 반응을 일으키지 않아야 하고(biocompatible), 면역반응을 일으키지 않아야 하고(non-immunogenic) 핵 안으로 효율적으로 핵산을 전달해야 한다. 바이러스를 이용하지 않는 방법엔 아무런 전달벡터를 이용하지 않는 physical 방법, 지질 나노입자(lipid nanoparticle)를 벡터로 이용하는 방법이 있다.

2.3.2.1 *In vivo* 유전자 교정 사례 - Physical methods

*In vivo*에서 HDR donor를 이용하여 유전자교정을 가장 먼저 한 사례가 SpCas9과 sgRNA를 발현하는 DNA 벡터 (naked DNA vector)와 HDR donor를 single-stranded DNA (ssDNA)형태로 마우스의 간으로 전달한 사례이다 [30]. 이 연구에선 티로신 이화작용(tyrosine catabolism)에 있어 마지막으로 필요한 효소인 fumarylacetoacetate hydrolase를 coding하는 *FAH* 유전자에 돌연변이가 생겨 발생하는 유전성 티로신 혈증 I (hereditary tyrosinemia type I)에 대하여 CRISPR/Cas9를 이용하여 정확히 마우스 모델에서 유전자 교정을 한 연구로 비록 전체 간세포의 0.4%가 유전자 교정되는 낮은 효율을 보였으나, 정상적인 간세포의 자체적인 재생능력과 *Fah* mutated 간세포에 비해 유전자 교정된 간세포의 생존 이점을 통해 치료효과를 성립하였다[30]. HDR에 의한 정확한 유전자 교정은 NHEJ에 의한 유전자 knockout보다 효율이 낮으므로 이를 극복하기 위해 *Fah* 유전자를 직접 교정하는 대신 간세포를 생명에 치명적이지 않은 양성 티로신 혈증 III (benign tyrosinaemia type III)의 표현형을 가지게 하려고 이 표현형(phenotype)과 연관이 있는 *Hpd* (hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)를 knockout 하여 치료효과를 보았다[31]. 위의 두 논문이 치료효과를 보았지만 생체조직에 손상을 입히는 등의 이유로 임상적용이 제한적인 hydrodynamic injection을 이용하였고 DNA vector는 비교적 오랜 기간 동안 세포 내에 머물러 off-target 효과, 유전체 불안정(genome instability) 등의 부작용이 있으므로, 이를 극복하기 위해 지질 나노입자(lipid nanoparticle)를 이용한 CRISPR/Cas9 전달 연구가 많이 진행되고 있다.

2.3.2.2 지질 나노입자(Lipid Nanoparticle)

음이온을 띠는(negatively charged) CRISPR/Cas9을 이루는 DNA 혹은 핵산은 양이온을 띠는(cationic) 물질들과 electrostatic하게 결합(electrostatically complexed)하여 나노입자(nanoparticles)를 형성할 수 있고, 이는 세포로 receptor-mediated endocytosis 혹은 phagocytosis 등으로 침투할 수 있다. 핵산을 전달함에 있어 가장 널리 알려진 양이온 물질에는 천연 폴리머(naturally-occurring polymer), 합성 폴리머(synthetic polymer) 그리고 지질(lipids)이 있다. 합성 폴리머에는 polyethylenimine, cyclodextrin, poly (β -amino esters) 등이 있고 지질은 보통 실험실에서 transfection 실험에 많이 쓰이는 liposome 계열 그리고 합리적으로 설계된 지질 혹은 지질 같은

물질(rationally designed lipids and lipid-like materials) 등이 있다[9].

2.3.2.3 *In vivo* 유전자 교정 사례 – 지질 나노입자

유전성 티로신 혈증 I의 hydrodynamic 주사의 대안으로 지질 나노입자로 Cas9-mRNA 그리고 AAV로 sgRNA와 donor를 전달한 사례가 있다[32]. 이 문헌에서는 앞서 hydrodynamic 주사로 naked 형태의 DNA vector (Cas9+sgRNA)와 ssDNA donor를 전달하여 얻은 낮은 효율에 비해 무려 15배의 효율을 보였고 Cas9 효소는 mRNA형태로 전달하였기 때문에 off-target 효과가 현저히 낮았다[32]. Cas9-mRNA 형태로 세포 내로 전달을 하게 되면 세포의 핵 안으로 침투할 필요 없이 cytoplasm에서 곧바로 단백질로 translate될 수 있으나 이는 세포의 cytoplasm에 전달된 뒤 단백질로 translate될 때까지 지체가 있다. 이에 Jiang et al., 2017은 먼저 Cas9-mRNA를 세포로 전달하였을 때 약 6시간 뒤에 Cas9 단백질 발현이 일어난다는 사실을 밝힌 뒤 동물실험을 통해 지질 나노입자를 이용하여 Cas9-mRNA를 먼저 전달한 뒤 같은 지질 나노입자를 이용하여 sgRNA를 전달하여 효과적으로 B형 간염 바이러스의 DNA (Hepatitis B Virus; HBV) 혹은 *pcsk9* 유전자를 knockout 하였다[33]. 이로 미루어 보았을 때 지질 나노입자를 구성하는 물질뿐만 아니라 세포 내에서의 CRISPR/Cas9의 활성을 극대화하기 위해서는 정확한 sgRNA와 Cas9의 발현시간 (spatiotemporal control)도 중요하다고 여겨진다.

지질 나노입자를 이용하여 CRISPR/Cas9을 전달하고 있는 회사에는 Intellia Therapeutics가 있다. 이들은 Novartis와 협력하여 Novartis가 가지고 있는 지질 나노입자 library를 가지고 CRISPR/Cas9을 전달하기에 유용한 지질 나노입자를 찾은 뒤 현재 아밀로이드성 다발신경병증 중 하나인 Hereditary transthyretin amyloidosis를 치료하고자 노력하고 있다. 이 병은 transthyretin을 coding하는 TTR 유전자에 돌연변이가 생겨 transthyretin 단백질이 독성물질인 amyloid화 되어 혈액에 쌓이는 질환이다. Intellia Therapeutics는 자신들이 찾은 지질 나노입자를 이용하여 간세포에서 TTR 발현을 knockout시켜 병을 치료하려 하고 있다(www.intelliatrix.com).

다른 나노입자를 이용한 전달 방식에는 Cas9 단백질형태와 sgRNA를 투여 전에 ribonucleoprotein (RNP)형태로 만든 후에 liposome과 같은 전달물질을 이용하여 원하는 세포로 전달하는 방법이 있다. RNP 형태는 세포 내로 전달과 동시에 발현하여 앞서 말한 mRNA 형태로 전달하였을 때 단백질로 translate 되기까지의 지체가 없고 발현이 일시적인 장점이 있다[34]. 이 방법을 이용하여 눈[35]과 피부[36]로 전달하여 신 혈관형성, 수포성표피박리증(recessive dystrophic epidermolysis bullosa)의 마우스 모델에서 치료효과를 보았지만 대체적으로 체내에서의 효율이 전반적으로 바이러스나 지질 나노입자에 비해 낮으므로 이를 높이려는 연구가 진행되고 있다. 한가지 예로서 RNP 형태의 sgRNA-Cas9 단백질을 음이온을 띠는 단백질에 electrostatically 결합시켜 세포벽 안으로의 침투를 용이하게 하는 전략으로 마우스의 귀로 효율적으로 CRISPR/Cas9을 전달한 사례가 있다[37].

2.4 In vivo 유전자 치료제의 임상적용을 위한 고려사항

유전자치료제(gene therapy medicinal products, GTMP), 세포치료제(cell therapy medicinal products, CTMP), 그리고 조직 엔지니어링 제품(tissue engineered products)들을 포괄하는 혁신신약 상품(Advanced therapy medicinal products, ATMP)은 유럽에서 가장 진보된 의약품이라고 평가 받는다[38, 39]. 이 ATMPs는 매우 연구중심적이며 혁신적인 공정과정을 거친다. ATMP 개발은 난치성인 질병들; 유전병, 암, 뇌질환, 심혈관 질환 등에 대한 새로운 치료법을 제시한다. 하지만 ATMP의 임상 적용되려면 복잡한 규정, 대량 생산 그리고 생산에 있어 good manufacturing practice (GMP) 공정이 필요하고 임상시험에서의 새로운 종점(clinical endpoint) 성립이 필수적이다[40]. 따라서, 각 분야의 전문연구기관과 임상 규제에 전문적인 산업기관의 전략적 협력이 ATMP의 임상적용을 위해 필요하다. CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 치료제의 경우 GTMP에 포함되므로 임상시험에서 안전성 및 효율 검증과 더불어 GTMP의 대량생산과 규제에 대한 부분을 고려해야 한다.

2.4.1 유전자 치료제의 대량생산

바이러스 혹은 바이러스를 이용하지 않는 전달벡터를 이용한 유전자 치료제는 혁신신약으로서 중요한 의미를 가지고 있다. 하지만 이 두 가지 전달벡터를 이용한 유전자 치료제의 대량생산에는 몇 가지 애로사항들이 있다. 바이러스는 앞서 서술한 바와 같이 세포배양을 통해 얻어지므로 대량생산을 하기에 비용이 많이 들뿐더러 batch-to-batch 다양성이 있을 수 있어 바이러스를 전문적으로 생산하는 회사와의 협력연구가 중요시된다. 바이러스를 이용하지 않는 전달벡터(지질 나노입자)를 이용한 유전자 치료제는 생물이 아니라 화학합성으로 얻어지므로 바이러스에 비해 batch-to-batch 다양성이 바이러스에 비해 낮다고 여겨지나 화학합성에 대한 명확한 조건 성립이 중요하다고 여겨진다. 두 가지 전달벡터를 이용한 유전자 치료제는 반드시 GMP guideline에 의거해서 reproducible한 합성 공식 확보가 되어야 한다.

2.4.2 유전자 치료제의 규제

혁신적인 유전자 치료제는 보통 벤처, 중소기업 혹은 대학기관과 같은 의약품 규제에 대한 경험이 비교적 적은 곳에서 종종 개발되어 의약품 규제 조건을 충족시키는데 있어 애로사항을 많이 겪곤 한다[38]. 또한 화학 합성을 통해 얻어지는 저분자의약품(small molecule-based medicine)에 비해 유전자 치료제는 생산에 있어 정확히 조절하기 힘들기 때문에 불순물 등에 대한 정의(characterization)가 어려워[38] 기존의 의약품과 다른 유전자 치료제에 대한 새로운 규제도입이 필요하다고 여겨진다[41]. 이미 AAV를 이용한 유전자 치료제, Glybera의 허가를 내어준 유럽에서는[42] European Medicines Agency (EMA)와 Committee for Advanced Therapies (CAT)가 유전자 치료제의 개발에 있어 개발자와 규제기관의 조기의 상호 대화와 가이드라인 제공, 더 투명한 정보 제공 등을 검토하고 있고(http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Reprt/2016/

06/WC500208080.pdf) 미국의 Food and Drug Administration (FDA) 그리고 Office of Biotechnology Activities (OBA)에서 유전자 치료제에 대한 규제를 담당하고 있다[43]. 하지만 현재까지 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 치료제에 대한 명확한 규제나 가이드라인은 한국은 물론 유럽이나 미국에서 존재하지 않는다. 따라서, 가까운 미래의 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 치료제의 첫 임상시험의 경험을 토대로 유전독성(genotoxicity)에 관한 분석법과 Cas9의 정확성 및 안전성에 대한 시험을 위한 프로토콜을 포함한 가이드라인이 성립될 것이다.

3. 결론

CRISPR/Cas9은 현존하는 유전자가위/교정 도구에서 가장 사용하기 용이하고 적절히 사용하였을 때 높은 돌연변이/교정 효율을 가지고 있으므로 현재까지 치료하기 힘든 질환, 특히 유전성 질환에 대한 혁신적인 치료제가 될 가능성이 높다. 비록 *In vivo* 유전자 치료제로서의 임상시험 사례는 아직까지 보고된 바 없지만 *Ex vivo*에서 CRISPR/Cas9을 이용하여 유전자 교정한 면역세포를 이용한 임상은 이미 진행 되고 있다[44]. *In vivo* 유전자 치료제로 적용되기 위해서는 가장 먼저 체내로의 전달 방법이 성립되어야 하는데 이를 성립하기 위해서 필수적으로 고려해야 할 사항들은 1) 전달 효율 2) 안전성 3) 생산성 4) 규제 이슈 등이 있다. 지속적인 연구를 통해 원하는 장기에서 원하는 세포 내로 정확히 CRISPR/Cas9을 전달하는 방법이 성립 된다면 효율뿐만 아니라 안정성 적인 측면에서 이점을 기대할 수 있을 것이고 생산성의 측면에서는 모든 공정을 체계적으로 관리할 수 있는 non-viral 방식이(synthetic polymer) 장점이 있지만 바이러스와는 또 다른 면역반응에 대한 부작용에 대하여 고려하여야 한다. 이런 전달 기술들의 발전함에 따라 *in vivo*에서의 정확한 유전자 교정이 가능하게 된다면 많은 난치성 질환들의 새로운 치료법을 제시할 수 있다고 확신한다. 연구기관과 GMP등급의 CMO등의 산업기관과의 전략적인 파트너쉽 구축과 의약품 규제기관과의 지속적인 대화를 통한 유전자 치료제에 대한 합당한 규제성립이 뒷바탕이 된다면 CRISPR/Cas9 기반의 유전자 치료제가 실제 난치성 질환으로 고통 받고 있는 환자들에게 새로운 희망을 줄 것이다.

4. 참고문헌

- [1] Boycott, K.M., et al., Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet*, 2013. 14(10): p. 681-91.
- [2] Mali, P., et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013. 339(6121): p. 823-6.
- [3] Cong, L., et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013. 339(6121): p. 819-23.
- [4] Konermann, S., et al., Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015. 517(7536): p. 583-8.
- [5] Gilbert, L.A., et al., Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 2014. 159(3): p. 647-61.
- [6] Tsai, S.Q., et al., GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases.

Nat Biotechnol, 2015. 33(2): p. 187-97.

[7] Kim, D., et al., Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. Nat Methods, 2015. 12(3): p. 237-43, 1 p following 243.

[8] Crosetto, N., et al., Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. Nat Methods, 2013. 10(4): p. 361-5.

[9] Yin, H., K.J. Kauffman, and D.G. Anderson, Delivery technologies for genome editing. Nat Rev Drug Discov, 2017.

[10] Kay, M.A., State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. Nat Rev Genet, 2011. 12(5): p. 316-28.

[11] Gaj, T., B.E. Epstein, and D.V. Schaffer, Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications. Mol Ther, 2016. 24(3): p. 458-64.

[12] Kim, E., et al., In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. Nat Commun, 2017. 8: p. 14500.

[13] Friedland, A.E., et al., Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. Genome Biol, 2015. 16: p. 257.

[14] Ran, F.A., et al., In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. Nature, 2015. 520(7546): p. 186-91.

[15] Ding, Q., et al., Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. Circ Res, 2014. 115(5): p. 488-92.

[16] Wang, X., et al., CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. 36(5): p. 783-6.

[17] Yang, Y., et al., A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. Nat Biotechnol, 2016. 34(3): p. 334-8.

[18] Tabebordbar, M., et al., In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science, 2016. 351(6271): p. 407-11.

[19] Nelson, C.E., et al., In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science, 2016. 351(6271): p. 403-7.

[20] Long, C., et al., Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. Science, 2016. 351(6271): p. 400-3.

[21] Schuelke, M., et al., Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med, 2004. 350(26): p. 2682-8.

[22] Cohen, S., J.A. Nathan, and A.L. Goldberg, Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. Nat Rev Drug Discov, 2015. 14(1): p. 58-74.

[23] Ebner, N., et al., Highlights from the 7th Cachexia Conference: muscle wasting pathophysiological detection and novel treatment strategies. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2014. 5(1): p. 27-34.

[24] Wei, Y., et al., Prevention of Muscle Wasting by CRISPR/Cas9-mediated Disruption of Myostatin In Vivo. Mol Ther, 2016. 24(11): p. 1889-1891.

[25] Meadows, K.L. and H.I. Hurwitz, Anti-VEGF therapies in the clinic. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(10).

[26] Kaminski, R., et al., Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. Gene Ther, 2016. 23(8-9): p. 696.

[27] Yin, C., et al., In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal

Models. Mol Ther, 2017.

[28] Wang, Z., et al., CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. Cell Rep, 2016. 15(3): p. 481-9.

[29] Wang, G., et al., CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. Mol Ther, 2016. 24(3): p. 522-6.

[30] Yin, H., et al., Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nat Biotechnol, 2014. 32(6): p. 551-3.

[31] Pankowicz, F.P., et al., Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. Nat Commun, 2016. 7: p. 12642.

[32] Yin, H., et al., Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. Nat Biotechnol, 2016. 34(3): p. 328-33.

[33] Jiang, C., et al., A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. Cell Res, 2017. 27(3): p. 440-443.

[34] Kim, S., et al., Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res, 2014. 24(6): p. 1012-9.

[35] Kim, K., et al., Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. Genome Res, 2017. 27(3): p. 419-426.

[36] Wu, W., et al., Efficient in vivo gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. 114(7): p. 1660-1665.

[37] Zuris, J.A., et al., Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nat Biotechnol, 2015. 33(1): p. 73-80.

[38] Flory, E. and J. Reinhardt, European regulatory tools for advanced therapy medicinal products. Transfus Med Hemother, 2013. 40(6): p. 409-12.

[39] de Wilde, S., et al., Clinical development of gene- and cell-based therapies: overview of the European landscape. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. 3: p. 16073.

[40] Belardelli, F., et al., Translational research on advanced therapies. Ann Ist Super Sanita, 2011. 47(1): p. 72-8.

[41] Committee for Advanced, T., et al., Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(3): p. 195-201.

[42] Yla-Herttuala, S., Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. Mol Ther, 2012. 20(10): p. 1831-2.

[43] Husain, S.R., et al., Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. Cancer Gene Ther, 2015. 22(12): p. 554-63.

[44] Reardon, S., CRISPR heavyweights battle in US patent court. Nature, 2016. 540(7633): p. 326-327.

The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information Center.

이재영(2017). 유전체 편집(Crispr/Cas9) 기술을 이용한 In vivo 치료제 개발 동향. BRIC View 2017-T18
Available from <http://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=2739> (May 16, 2017)

Email: member@ibric.org

※ 본 콘텐츠는 invitrogen applied biosystems 의 후원으로 작성되었습니다.