



유전자치료제 전문자료집

유전자 가위기술 연구개발 동향 보고서

2017. 5.

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

목 차

1. 서론	1
2. 유전자 가위기술의 개요	5
2.1. 1세대 유전자 가위기술	8
2.2. 2세대 유전자 가위기술	9
2.3. 3세대 유전자 가위기술	9
3. 유전자 가위기술의 개발 현황	13
3.1. 국내외 유전자 가위기술의 특허 현황	17
3.2. 국내외 유전자 가위기술의 비임상연구 현황	22
3.3. 국내외 유전자 가위기술의 임상연구 및 주요 파이프라인 현황	33
4. 유전자 가위기술 관련 국가별 규제 현황	39
4.1. 유럽의 유전자 가위기술 관련 규제 현황	42
4.2. 미국의 유전자 가위기술 관련 규제 현황	44
4.3. 일본 및 중국의 유전자 가위기술의 관련 규제 현황	47
4.4. 우리나라의 유전자 가위기술 관련 규제 현황	49
5. 맺음말	51
6. 참고문헌	55

이 「유전자 가위기술 연구개발 동향 보고서」는 식품의약품안전처에서 수행한 바이오의약품 안전관리 연구사업인 「유전자 가위기술을 이용한 치료제 평가 기반 마련 조사 연구」(서울대학교 오유경 2016)의 연구를 수행하며 획득한 정보를 관련 분야 연구자와 심사관련 종사자에게 제공하기 위한 목적으로 작성되었다. 여기에 제시된 정보는 앞으로 관련 분야의 과학기술 발전에 따라 변경될 수 있으며, 식약처의 정책이나 심사 방향과는 다를 수 있음을 밝힌다.

1 서론

유전자 가위기술은 기존의 의학적 방법으로 치료가 어려운 다양한 난치성 질환에 대하여 문제가 되는 유전자를 제거하거나 정상적인 기능을 하도록 유전자를 편집 또는 삽입해 근원적인 치료를 할 수 있는 기술이다. 유전자 가위기술은 유전질환 뿐만 아니라 암, 감염증, 대사이상 질환, 자가면역 질환 등의 치료에도 활용이 가능할 것으로 기대되고 있다.

이러한 유전자 가위기술은 1세대 ZFN (zinc finger nuclease), 2세대 TALEN (Transcriptor Activator-Like Effector Nuclease)을 거쳐 3세대 CRISPR (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9으로 발전해왔다. 이 CRISPR 기술은 미국 사이언스지에서 2015년도 최고 혁신기술로 선정되었고, 또한 한국생명공학연구원에서 발표한 2017년 바이오 미래유망기술 중의 하나로 꼽히기도 하였다.

현재, 1세대 ZFN은 미국의 Sangamo Therapeutics 사에 의해 상용화되어 HIV, 혈우병 등에 대한 치료제가 임상시험 중이고, 2세대 기술인 TALEN은 돌연변이를 유도하여 질병모델 세포주를 만드는 데에 활용되기도 한다.

1세대 ZFN이나 2세대 TALEN에서는 단백질이 유전자 염기서열을 인식하는데 비하여 3세대인 CRISPR/Cas9은 Cas9과 복합체를 형성하고 있는 small guide RNA (sgRNA)가 표적 염기서열을 인식하고 자르기 때문에 이전 세대 기술보다 제작이 간편하고 비용이 적게 드는 장점이 있다 (Popular Science (2015); How DNA Scissors can perform Surgery Directly On Your Genes).

유전자 가위기술은 질병 치료외에도 동·식물을 개량하거나 해충 박멸을 위한 유전자 조작 등에도 활용될 수 있을 것으로 전망되고 있다 (그림 1, 표 1).

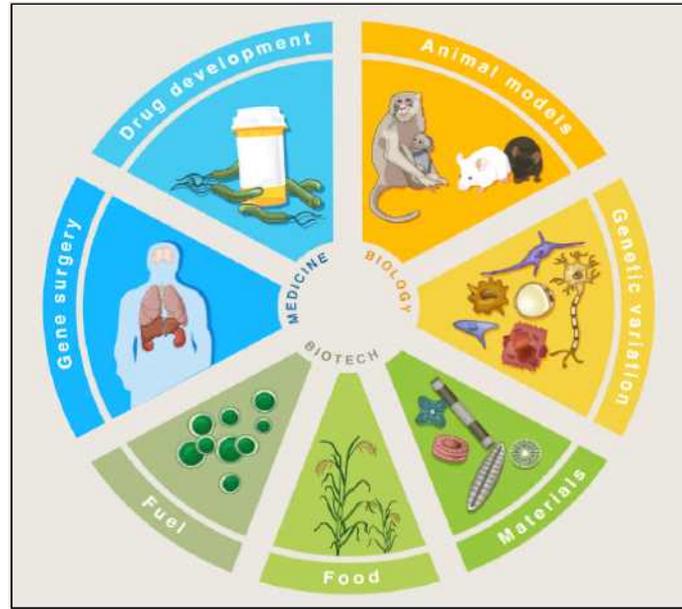


그림 1. 유전자 가위기술의 적용 범위

(출처 : Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Cell (2014))

표 1. CRISPR-Cas9 의 응용 현황

Industry sector	Product/application	Company
Food	Yogurt, cheese	Danisco (DuPont)
	Crops	Dow Agrosciences
	Livestock Crops	Recombinetics Collectis Plant Sciences
Laboratory	Research tools	System Biosciences
	Expression systems	Sigma-Aldrich
	Research tools	GE Healthcare
	Animal models	Sage
	Research tools Animal models	ThermoFisher Taconic
Sublicensing	Ag, Industrial, Bio	Caribou
Medical	Pharmaceuticals	Novartis
	<i>In vitro</i> applications only	Collectis
	Target validation	AstraZeneca
	Therapeutics	Crispr Therapeutics
	Monogenic diseases	Sangamo Biosciences
	Therapeutics Therapeutics	Intellia Editas

(출처 : History and market impact on CRISPR RNA-guided nucleases, ScienceDirect (2015))

Market and Market사의 시장 분석 보고서에 의하면 유전자 가위기술의 생명공학 및 제약 응용분야의 전체 세계 시장은 2014년 \$1,845 (USD million)에서 2019년 \$3,514 (USD million)으로 그 규모가 연평균 13.75%의 성장률을 보일 것으로 예상되고 있다 (출처:Market and Market 시장 분석 보고서-“Genome Editing/Genome Engineering Market by Application (Cell Line Engineering, Animal & Plant Genetic Engineering), Technology (CRISPR, Antisense, TALEN, Zinc Finger Nuclease), & End User (Biotechnology & Pharmaceutical, CRO)-Global Forecast to 2019”, 2015). 또한, Transparency Market Research사는 2014년도의 유전자 가위기술의 전체 세계 시장 규모를 \$2202.2 (USD million)으로 분석하였다 (그림 2).

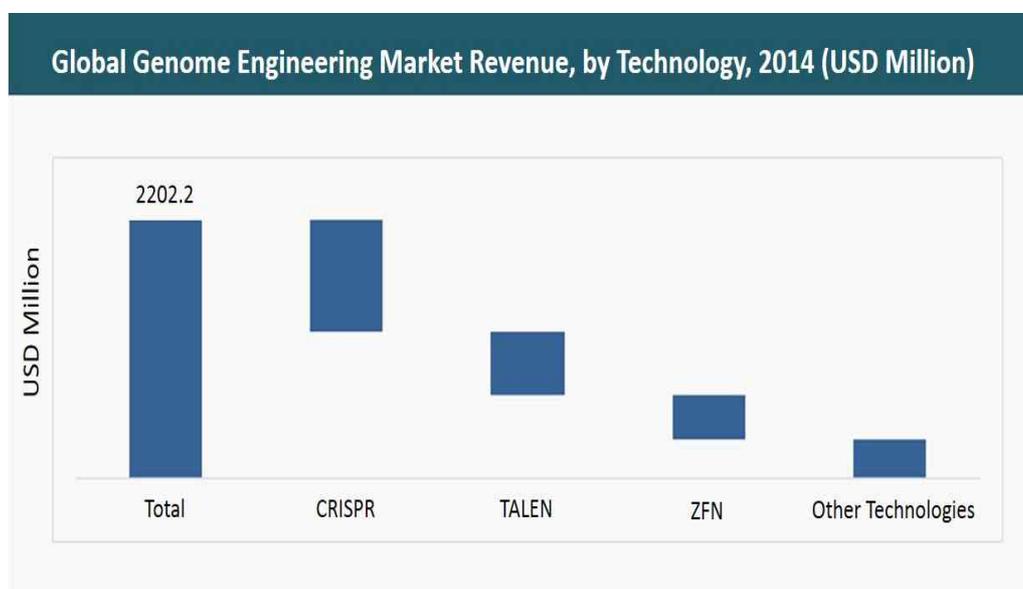


그림 2. 유전자 가위기술 시장 규모 (2014년도)

(출처: Transparency Market Research사가 KOL opinions, Company Annual Report 등을 재가공)

이전 세대보다 정교하고 효율적이라 평가되는 3세대 유전자 가위기술인 CRISPR/Cas9에 대해 다국적 제약사들의 대규모 연구 투자가 집중되고 있으며 미국의 GenScript USA Inc., 영국의 Horizon Discovery Group plc, 스위스의 Lonza Group Ltd. 등이 대표적인 회사들이다. 특히, 3세대 유전자 가위기술 시장은 글로벌 제약 회사가 벤처 기업에 투자하는 형태로도 형성되는데, 선두 기업으로는 미국의 Editas Medicine 120만불(약 14억원)을 투자 받은바 있으며, Intellia Therapeutics사가 스위스 제약사인 Novartis에서 1500만불(약 170억원), 스위스의 CRISPR Therapeutics사가 독일 제약기업인 Bayer에서 3억 유로 (약 3800억원)를 투자 받은바 있다. 이들 회사들은 모두 유전자 가위기술을 이용한 치료제 개발에 중점을 두고 있다. 이렇게

유전자 가위기술 적용 치료제를 포함하는 유전자치료제의 시장은 연평균 64.7%의 성장률을 기록하여 그 성장속도가 폭발적일 것으로 전망되고 있다(그림 3).

국내에는 유전자 가위기술 개발 분야에 툴젠, 엠젠플러스 등 벤처기업이 선두기업으로 자리하고 있으나, 아직 치료제 분야의 구체적인 시장이 형성되지는 않은 것으로 보여진다.

연도	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	연평균 성장률(%)
매출액 (백만달러)	8.9	11.9	16.7	25.8	46.6	88.2	173.4	315.9	523.3	794.3	64.7

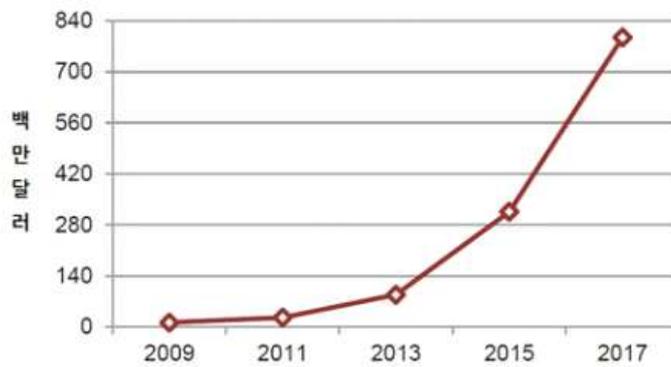


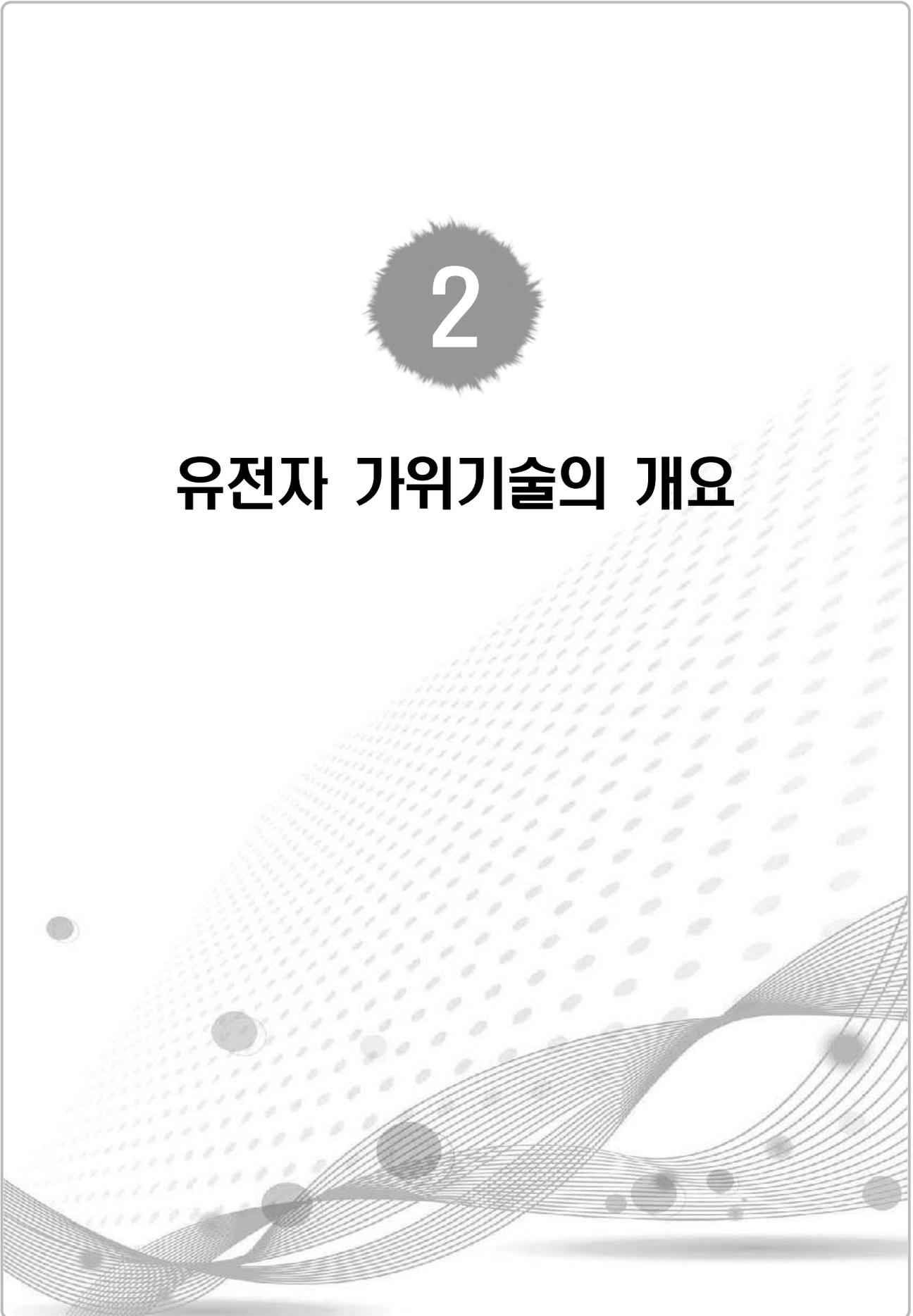
그림 3. 글로벌 유전자치료제 시장현황 및 전망

(출처 : Global industry Analysts, Gene Therapy (2012))

이에, 식약처에서는 연구개발자 및 심사자 등 관련 분야 종사자들이 유전자 가위기술을 적용한 치료제 개발 및 제품화에 선제적으로 대응할 수 있도록 관련 연구개발 현황 및 국외 규제 동향 정보를 본 보고서에 담아 제공하고자 한다.

2

유전자 가위기술의 개요



2 유전자 가위기술의 개요

유전자 가위라는 현상은 양서류 또는 미생물이 본래 가지고 있는 기작에서 유래하였으며 발전 순서에 따라 1세대 징크 핑거 뉴클레아제(ZFNs, Zinc Finger Nucleases), 2세대 탈렌(TALENs, Transcription Activator-Like Effector Nucleases)를 포함하여 3세대 크리스퍼(CRISPR/Cas9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)를 들 수 있다 (Kim et al., 1996; Reyon et al., 2012; Chung et al., 2013; Ran et al., 2013; Liang et al., 2015).

가위 역할을 하는 단백질과 재단자의 역할을 하는 폴리뉴클레오타이드가 특정 유전자에 대하여, 일부나 전체의 염기서열을 제거(Deletion)하거나 삽입(Insertion)하여, 궁극적으로는 타겟이 되는 유전자의 활성을 없애거나, 원하는 유전자를 추가하여 유전자를 교정하게 된다. 이러한 유전자 가위기술은 DNA repair 원리를 이용한 비상동 말단 접합법(NHEJ, Non-homologous end-joining) 또는 상동 재조합(Homologous recombination) 원리를 이용한 HDR법(Homology-directed repair)이 있다 (그림 4). 아직까지는 Gene correction이나 Gene addition을 위하여, repair DNA나 특정 유전자를 넣는 HDR 보다는 NHEJ를 통하여 타겟 유전자를 불활화 시키는 방법에 대하여 더 많은 연구가 진행되고 있다.

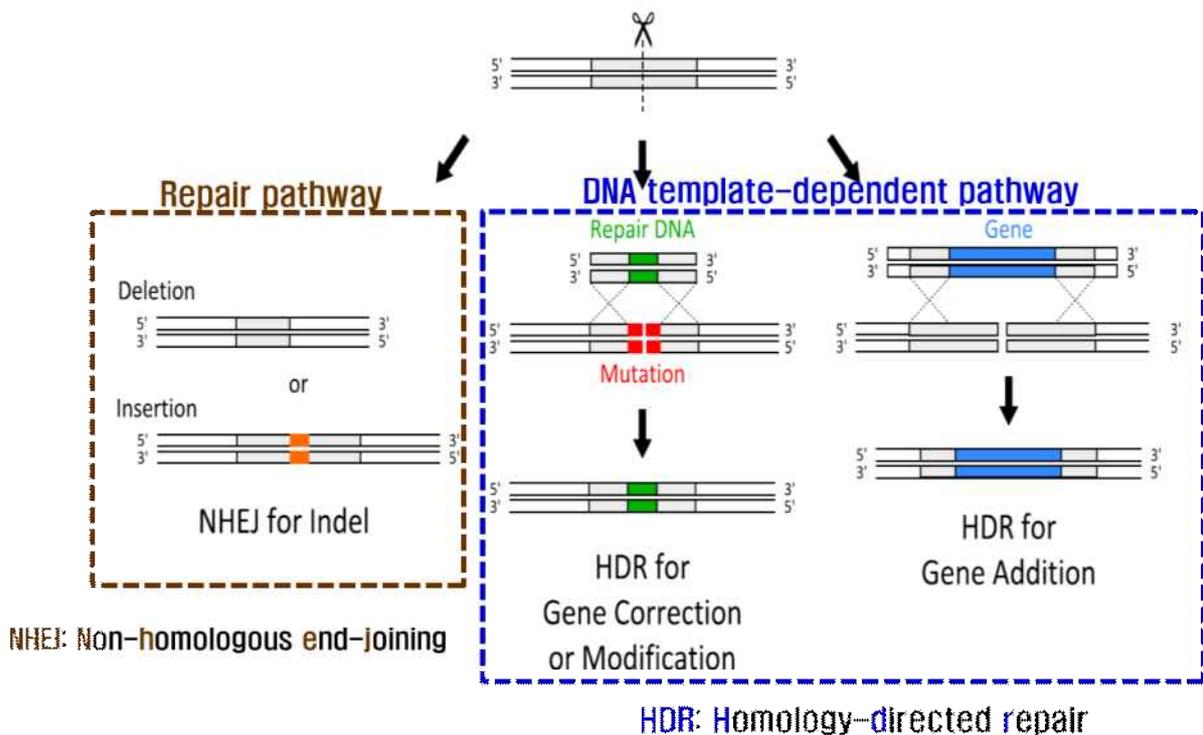


그림 4. 유전자 가위기술 적용 치료제의 작용 기전

2.1. 1세대 유전자 가위기술

Zinc-finger nuclease (ZFN)은 DNA의 특정서열에 결합하는 부위가 zinc-finger 형태의 구조를 가지는데서 유래한 명칭이다. ZFN의 핵심 기능 부위인 zinc-finger domain은 진핵생물에서 발견된 것으로 Cys2-His2구조를 가지고 30개의 아미노산으로 구성되며 $\beta\beta\alpha$ 입체 배열을 가진다. 이들 아미노산 중, α -helix 표면에 위치하는 아미노산들이 DNA 상의 3개의 뉴클레오타이드와 선택적인 결합을 함으로써 zinc-finger domain은 DNA서열을 인식하게 된다. 이러한 zinc-finger domain의 특성을 이용하여, 임의의 3개의 뉴클레오타이드 서열을 인식하는 zinc-finger를 설계하고, 타겟 DNA 서열과 상보적 결합을 이루는 특정 zinc-finger들을 연결하는 ‘modular assembly’를 통하여, DNA 서열 중 18 base pair를 특이적으로 인지할 수 있는 선택성을 가지도록 제작할 수 있다. 그러나, zinc-finger domain 자체로는 유전자에 결합은 할 수 있으나 절단하는 기능은 가지고 있지 않다.

ZFN은 일반적으로 3개 또는 4개의 zinc-finger domain으로 구성되어 있으며, 3개의 DNA 핵산서열 (DNA triplet)을 인지할 수 있는 각각의 zinc-finger domain들에 DNA를 자를 수 있는 FokI 제한효소를 유전적으로 융합 (fusion)시켜 제작한 서열 선택적 유전자 절단 효소이다. ZFN에 의해 유전자가 절단되기 위해서는 아래 그림과 같이 FokI은 dimer 형태를 이루고, 양쪽으로 zinc finger domain이 DNA의 특정 서열을 인지하여 결합하고 있는 구조를 형성한다 (그림 5). Zinc-finger 단백질에 의해 인지되는 서열들 가운데에 위치하는 5-7bp에 해당하는 spacer 서열이 FokI에 의해 절단된다. 제1세대 유전자 가위기술로 명명되는 ZFN을 이용한 특정 유전자 서열 절단 기술은 목적하는 서열의 DNA를 인지하는 zinc-finger domain의 아미노산 배열을 직접 설계하고 제작한다는 점에서 고비용이 필요하며 제작 기간이 긴 단점이 있다. 또한, zinc-finger domain은 5'-GNN-3', 형태의 서열을 인지하므로 타겟 유전자 선정의 유연성이 제한되는 한계점이 있다.

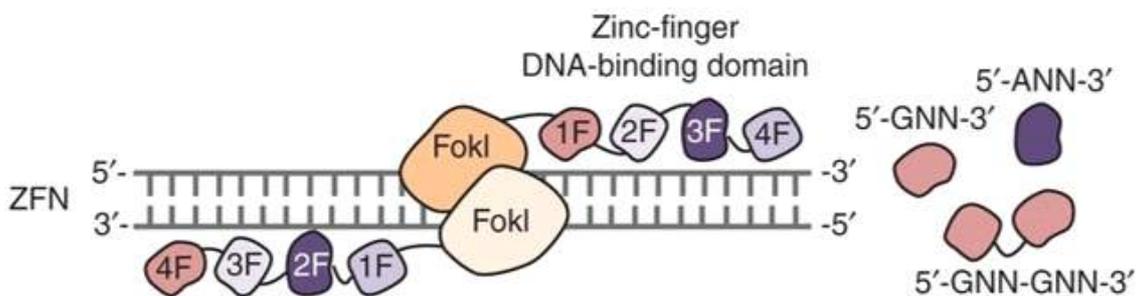


그림 5. Zinc-finger nuclease의 구조

(출처: Gaj et al., 2016)

2.2. 2세대 유전자 가위기술

Transcription activator-like effector(TALE)는 식물 병원성 박테리아에서 발견된 DNA 결합 단백질로, 33-35개 아미노산이 반복되는 domain의 연속으로 이루어져있다. DNA와의 결합은, 각 domain상의 repeat variable di-residues(RVD)라고 불리는 각각의 repeat가 한 개의 뉴클레오타이드와 선택성을 가진다. Zinc finger 단백질과 유사하게, TALE 단백질도 연속적으로 연결되어 DNA상의 다양한 서열을 인지할 수 있게 제작이 가능하다. 또한 TALE 자체로는 DNA 절단 능력이 없으므로, FokI 제한효소와 유전적으로 융합 (fusion) 된 TALE nuclease (TALEN) 형태가 DNA를 선택적으로 자를 수 있다 (그림 6). DNA 절단시 FokI는 dimer형태를 이루고, TALE에 의해 인지되는 DNA 서열 양쪽 가운데 12-19개의 spacer 서열을 자른다. 1세대 유전자 가위기술인 ZFN과 비교하여 2세대 유전자가위 TALEN은 단위 구조인 RVD가 1개의 서열을 인지하므로 제조 비용과 시간이 비교적 절감되는 장점을 가진다. 또한, 타겟 선정이 자유롭고, DNA 선택성이 높은 장점이 있다. 반면 TALEN은 ZFN에 비하여 훨씬 크고 반복되는 구조를 가진 단백질이므로 바이러스 전달체를 이용하는 경우에도 세포 내 전달이 어려운 단점을 가진다.

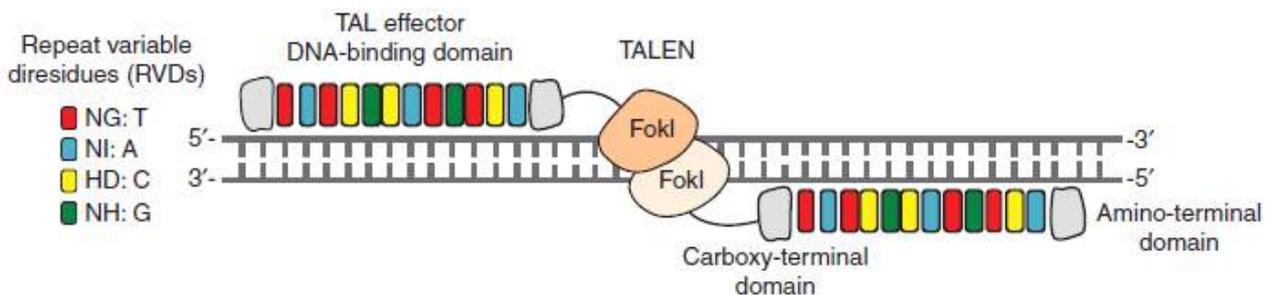


그림 6. TALE nuclease의 구조

(출처: Gaj et al., 2016)

2.3. 3세대 유전자 가위기술

CRISPR/Cas9 system은 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)와 CRISPR associated protein-9(Cas9) nuclease를 의미한다. CRISPR/Cas9은 세균의 면역반응에 관여하는 단백질에서 유래한 것으로 외부에서 침입한 바이러스 유전자를 절단함으로써 박테리아를 보호하는 기능을 가진다. 제1세대의 zinc finger domain이나 2세대의 TALE이 그 자체로는 유전자 절단 효소의 기능이 없어서 유전자 절단 효소를 fusion하여서 제작하는 어려움이 있는 반면, 3세대인 CRISPR/Cas9은 그 자체가 유전자 절단 효소의 기능이 있어 별도의 제한 효소와의 fusion 과정이 필요 없는 큰 차이점이 있다. 유전자 서열을 인지하는

선택성의 측면에서도 별도의 zinc-finger domain이나 TALE의 repeat 단위구조를 제작하지 않고도 single guide RNA (sgRNA)의 상보적인 서열을 이용하는 점에서도 차이를 보인다.

따라서 3세대 기술에서는 유전자 절단 기능을 가지는 CRISPR/Cas9 과 서열 선택성을 부여하는 sgRNA가 동시에 작동하는 것이 필요하다. 유전자를 절단할 수 있는 Cas9 단백질은 single guide RNA(sgRNA)와 complex를 이루고 있는 형태로서, sgRNA는 5'-NGG-3'로 이루어진 protospacer-adjacent motif(PAM) 서열을 포함하는 상보적 서열을 가지는 DNA에 결합함으로써, Cas9가 선택적 서열을 자를 수 있게 유도한다 (그림 7). 1세대 및 2세대 유전자 가위기술과 달리, 3세대 기술에서는 유전자 서열의 특정 부위를 단백질 domain이 아닌 22개의 서열로 이루어진 sgRNA에 의해 이루어지므로 여러 장점을 가진다. 3세대 기술은 유전자 선정에 있어 가장 유연성이 높아 적용할 수 있는 표적 유전자의 범위가 현저히 확장되는 장점이 있다. 또한, 선택성을 주기 위하여 각각의 유전자 서열에 따라 맞춤형의 zinc-finger domain이나 TALE을 제조하는 단백질 설계 및 복잡한 제조 공정이 sgRNA로 대체됨으로서 일반 실험실이나 연구자들 수준에서도 목적에 따라 다양한 sgRNA를 간편하게 제작할 수 있으므로 매우 간편하여 유전자 가위기술의 응용범위를 신약개발 뿐 아니라, 수의학, 농수산 분야 등으로 확장하는데 많이 활용되고 있다.

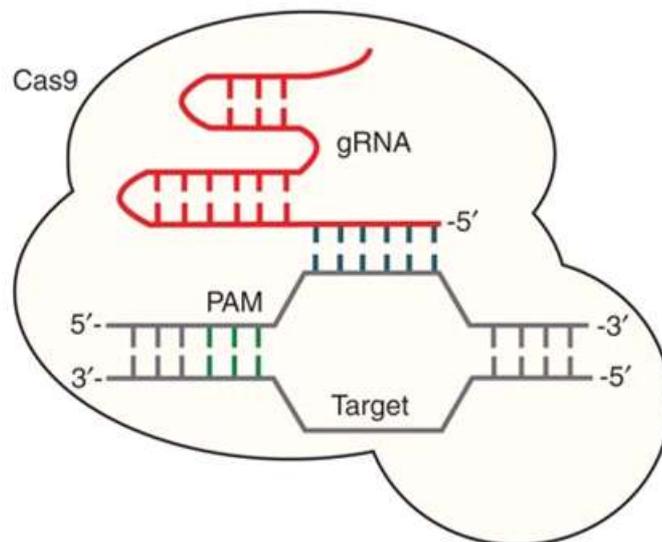


그림 7. CRISPR/Cas9의 구조

(출처: Gaj et al., 2016)

세대별 유전자 가위기술의 특징 및 장단점은 아래의 표와 같다. (표 1).

표 2. 세대별 유전자 가위기술 비교

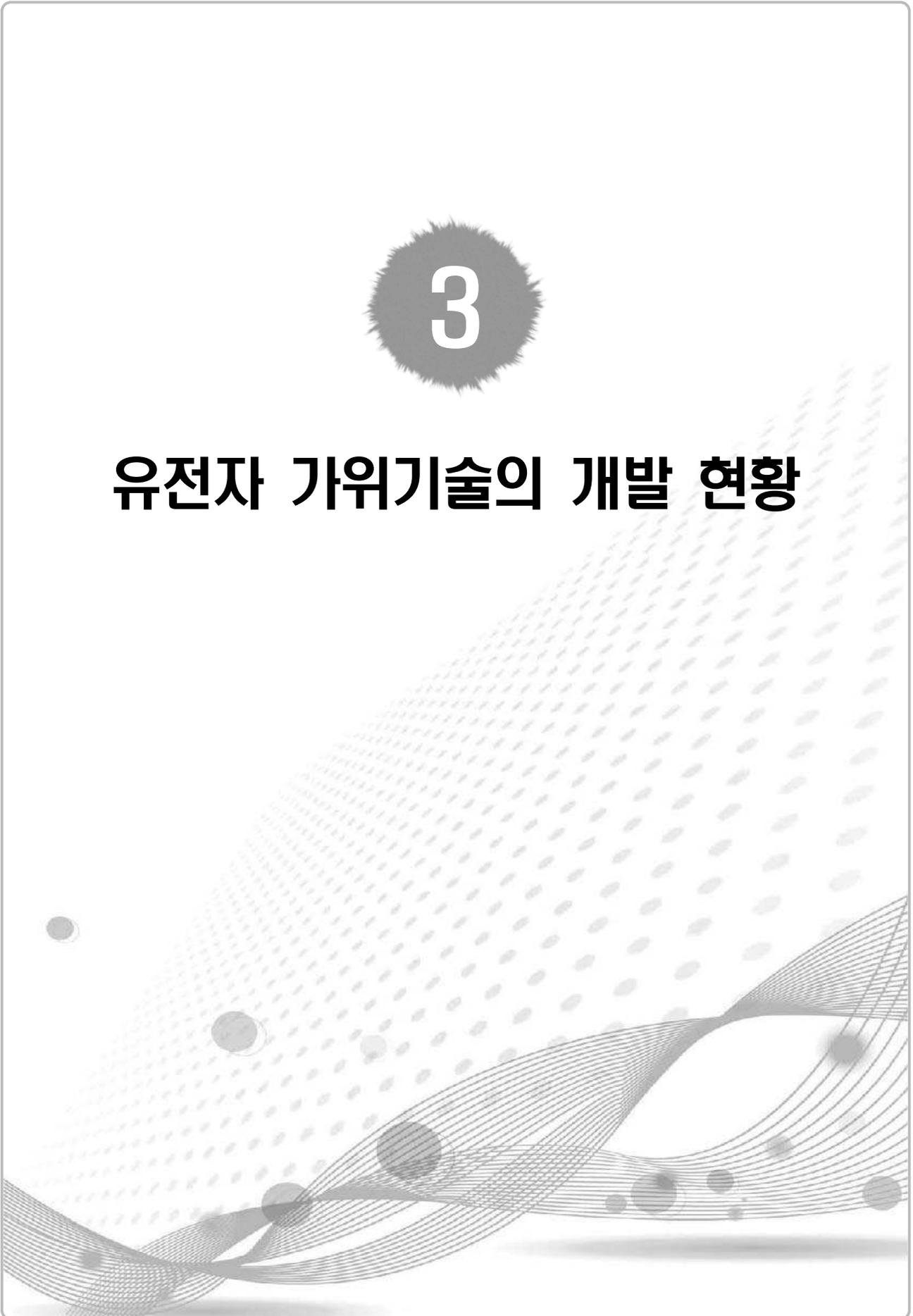
유전자 가위기술 종류	1세대	2세대	3세대
	ZFN	TALEN	CRISPR
DNA인지 및 결합 도메인	Zinc finger 단백질	TALE 단백질	가이드 RNA
DNA절단 도메인	FokI	FokI	Cas9
DNA 인지 범위	18~36bp (3bp/ Zinc finger모듈)	30~40bp (1bp/TALE 모듈)	22bp (DNA-RNA base pair)
인지 서열의 조건	G염기를 포함하는 5'-GNNGNNGNN-3' 형태의 서열	5'-T 염기로 시작하여 A-3' 염기로 끝나는 서열	인지서열 바로 뒤에 5'-NCC-3' (PAM) 염기서열이 요구됨
장점	<ul style="list-style-type: none"> 표적 서열에 맞춰, 블록식으로 제작가능 단백질크기(1kb)가 작음 	<ul style="list-style-type: none"> 높은 특이성 1bp 단위로 정교한 인식 인지서열 선정이 비교적 자유로움 	<ul style="list-style-type: none"> 인지 서열의 선정이 유연하고 용이함 한번에 여러 유전자를 표적 가능함 대량생산 가능
한계점	<ul style="list-style-type: none"> 낮은 특이성 표적 서열 선정에 한계 단백질 설계 및 제조 복잡 고비용 	<ul style="list-style-type: none"> 메틸화 C에는 적용 불가 단백질 설계 및 제조 복잡 고비용 단백질 크기(3kb)가 커서 세포 내 전달이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> 경우에 따라 Off target effect 발생확률이 높음 단백질 크기(3kb)가 커서 세포 내 전달이 어려움

(표 1)에 기재한 것과 같이 1세대, 2세대와 3세대 유전자 가위기술은 표적 서열을 인지하는 물질이 단백질인지 가이드 RNA인지에 따라서 크게 차이가 있다. 1세대 및 2세대에서는 유전자 가위기술이 표적 유전자 서열에 결합하는 유전자 가위를 단백질의 형태로 사용하므로 제작 기간이 길고 고비용이 요구되나, 3세대 유전자 가위기술의 경우 CRISPR 유전자 가위 단백질은 한 종류의 단백질을 사용하고 표적 유전자의 서열에 따라서 가이드 RNA만 제작하면 되므로 제작 기간이 짧으며 많은 유전자 질환에 단시간에 적용될 수 있는 장점이 있다 (미국 한림원의 인체 유전자 교정에 관한 보고서(Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance))

72쪽, 2017년 2월). 최근 CRISPR class의 유전자 가위 단백질로서 Cas9 외에 Cpf1이라는 새로운 단백질이 *Acidaminococcus* 및 *Lachnospiraceae* 균주에서 발견되었다 (Zetsche et al., 2015). 이 단백질은 Cas 9과 유사하게 sgRNA를 사용하여 표적 유전체 서열을 인지하는 점에서 유사하나 Cas 9이 동일한 위치에서 이중 나선 구조를 절단하는 (blunt cutting) 특징을 보이는 반면, Cpf1은 이중 나선 구조를 서로 다른 위치에서 절단하는 (staggered cutting) 특징을 보이는 면에서 차이가 있으며, 이는 유전자인식 정확도를 높여 치료제 개발시 안전성 문제를 개선할 것으로 기대되는 기술이다.

3

유전자 가위기술의 개발 현황



3 유전자 가위기술의 개발 현황

F1000 Research (Glaser et al., 2015)에 의하면 2012년부터 유전자 가위기술 관련 연구가 활발히 진행 중이며, 이중 특히 3세대 유전자 가위기술인 CRISPR를 기반으로 한 연구는 해마다 100 % 이상의 성장률을 보이고 있는 것으로 나타난다 (그림 8).

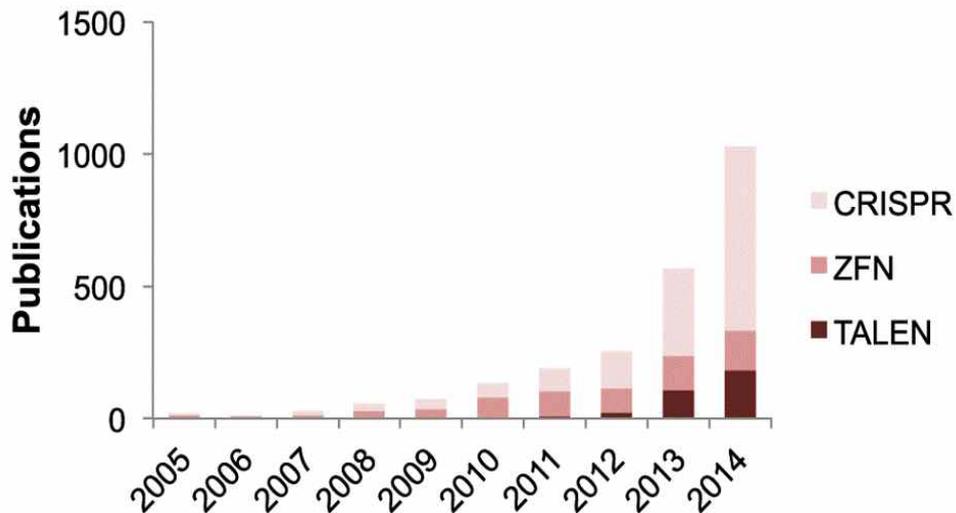


그림 8. 세대별 유전자 가위기술 연구 추세

(출처: Glaser A et al., F1000Research 2015)

미국은 캘리포니아의 Sangamo Therapeutics사가 HIV, hemophilia B, Hurler Syndrome (MPS 1)에 대해 세계 최초 유전자 가위기술 기반 임상시험을 진행 중이고, hemophilia A, sickle cell disease 등 다양한 유전질환에 대해 치료제를 개발 중이다.

특히, Sangamo Therapeutics사에서 HIV 치료를 목적으로 개발된 SB-728은 현재 임상 2상이 진행 중이며, 이는 ZFN을 통한 mRNA 전달 (SB-728-mR-1401), cyclophosphamide (Cytosan) 도입을 통한 고효능 항 레트로바이러스성 치료 및 면역 비반응자에 대한 치료제 개발 등으로 이어져 유전자 가위기술의 응용 범위가 광범위함을 시사하고 있다.

미국의 Editas사는 세계적으로 10 만 명 중 2-3 명에 발병하는 희귀 안구 질환 LCA10에 대한 치료제를 개발하여 2017년 임상 진입을 목표로 하고 있으며, CRISPR 기술 분야 전문가들이 설립한 회사이므로 유전자 가위기술 기반 치료제 개발이 임박할 것으로 예상되고 있다.

이러한 질병 치료의 목적 외에도, 미국(UC San Diego)에서는 CRISPR 기법을 이용하여 모기가 말라리아를 퍼뜨리는 것을 억제하는 기술을 고안하는 등 다양한 방법으로 인간 질병

치료에 적용하고자 하는 연구를 진행 중에 있다.

국내에서는 바이오벤처회사인 툴젠이 유전자 가위기술에 대한 다수의 특허를 보유하고, 제3세대 유전자 가위기술인 aRGEN (CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein)를 이용하여 혈우병 치료제 등에 대한 연구개발을 진행하고 있으며, 임상 진입을 계획하고 있다.

또 다른 국내 회사인 엠젠플러스는 돼지의 발암억제 유전자 중 하나인 RUNX3를 CRISPR 기법으로 제거한 복제돼지 4 마리를 생산하여 향후 본 복제돼지 체내에서 암이 유발되는지를 볼 예정이며, 엠젠플러스는 동물 모델에의 형질전환 및 장기이식을 중점으로 연구해온 회사로써 향후 유전자 가위기술을 이용하여 동물-인간 간 장기이식이 가능하도록 연구를 진행 중인 것으로 알려졌다.

국내 유전자 가위기술을 이용한 연구는 학술 연구를 위주로 2012년부터 활발히 진행하고 있으며, 국내 선두기업인 바이오벤처 업체 툴젠 및 엠젠플러스 등은 국내외 대학 및 연구소와 공동연구를 함으로써 유전자 가위기술을 이용한 치료제 개발 및 관련 시장 확립을 가속화 할 것으로 기대되고 있다.

3.1. 국내외 유전자 가위기술의 특허 현황

2015년도에 발간된 Boston Consulting Group의 보고서 (제목: Rewriting The Book Of Life: A New Era in Precision Gene Editing) 에 따르면 2010년도부터 2014년도까지 최근 5년간 유전자 가위기술의 평균연간성장률은 41%이며 3세대 기술의 경우 136%로 가장 높은 것으로 보고되었다 (그림 9).

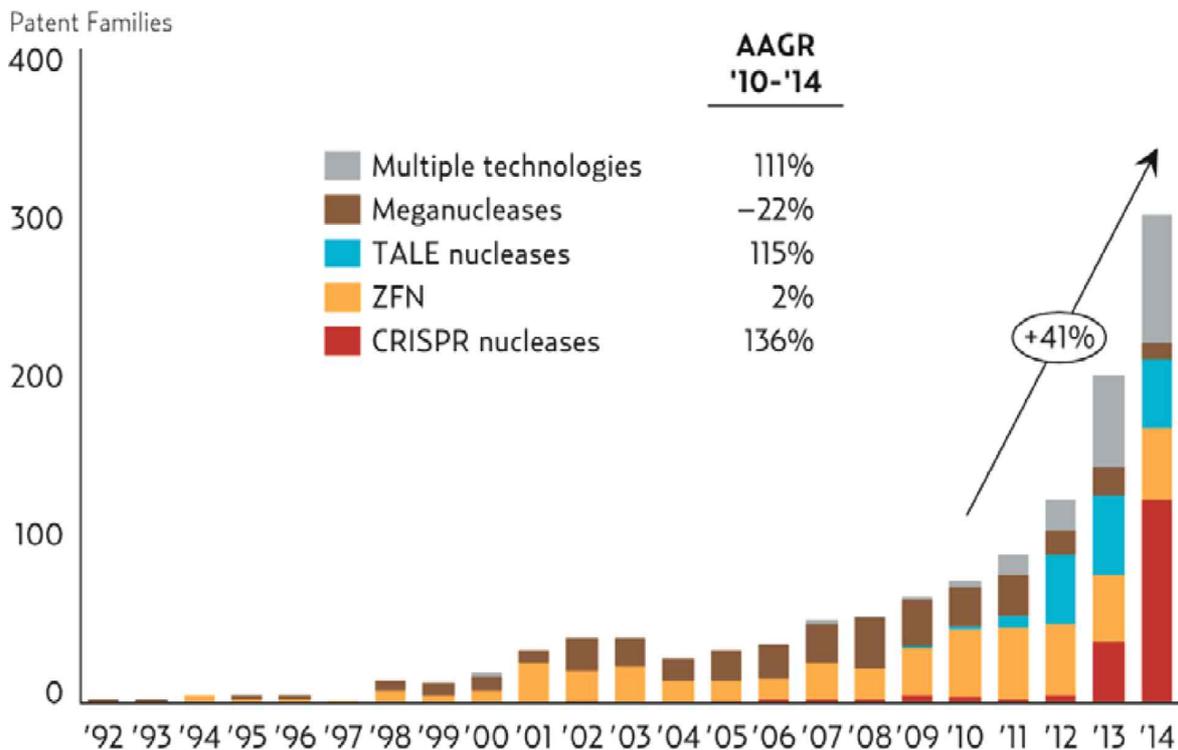


그림 9. 유전자 가위 특허출원 현황

(출처: Boglioli E and Richard M, Rewriting The Book Of Life: A New Era in Precision Gene Editing, Boston Consulting Group, 2015)

Patenting activity in gene editing using TALE nucleases

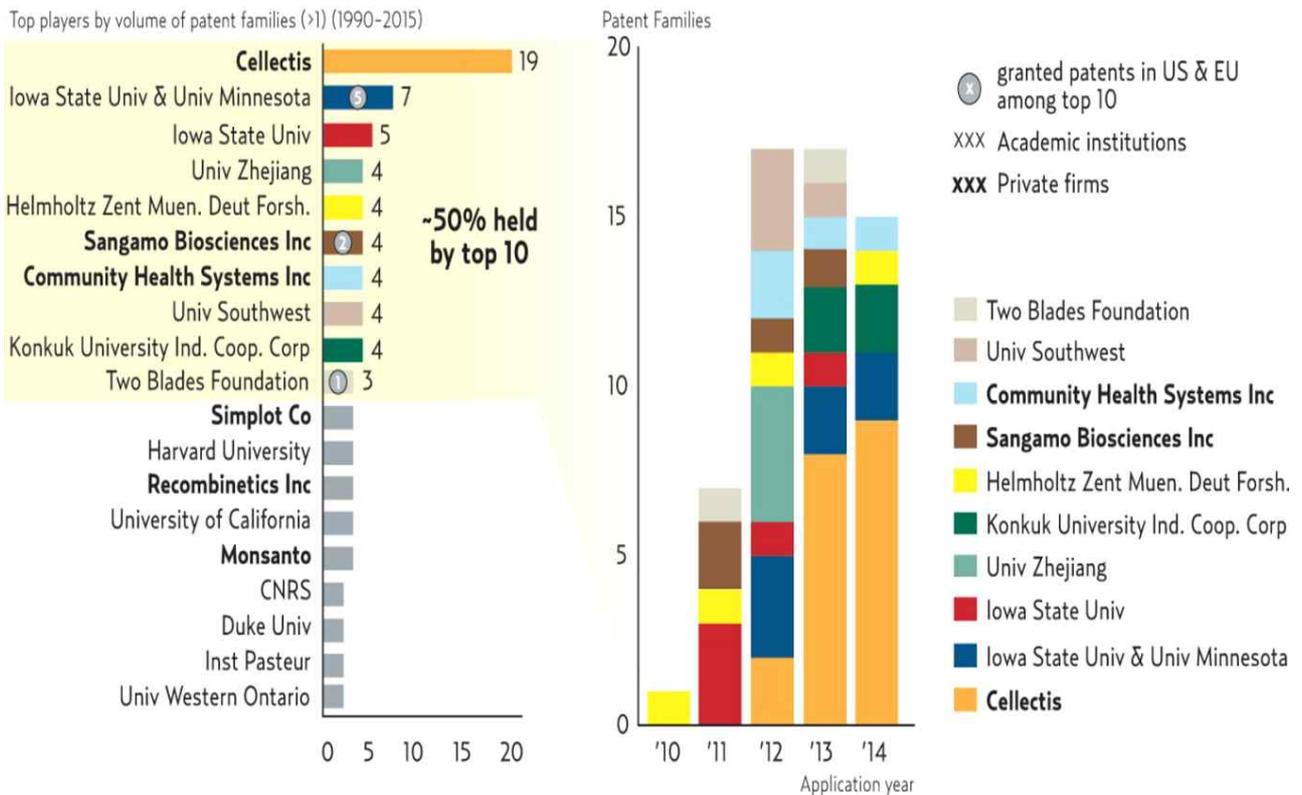


그림 10. 3세대 유전자 가위기술 특허출원 현황

(출처: Boglioli E and Richard M, Rewriting The Book Of Life: A New Era in Precision Gene Editing, Boston Consulting Group, 2015)

특히, 3세대 크리스퍼 기술에 대한 특허 출원 현황을 살펴보면 교육기관으로는 하버드대, MIT, UC버클리 순으로 특허출원 비율이 높았으며 산업체의 경우 Community Health System, Collectis, Agilent Tech 등에서 활발한 출원을 하고 있는 것을 볼 수 있다 (Rewriting The Book Of Life, 2015, 그림 10).

크리스퍼 유전자 가위기술의 관련 특허정보(93개의 특허 등록 건수 및 1363건의 특허 출원 건수)를 분석한 2016년도 보고서에 의하면, 크리스퍼 유전자 가위기술 관련 특허는 2004년 최근 DuPont사와 합병한 Danisco사의 Barrangou와 Horvath의 발명으로 시작되었으며 2012년 5월, UC Berkeley의 Jennifer Doudna와 University of Vienna의 Emmanuelle Charpentier가 원핵생물에서의 크리스퍼 유전자 교정시스템과 유전체 교정 도구로서의 응용에 대한 특허를 출원하였다(Egelie et al., 2016).

뒤이어, 2013년 Broad Institute and the Massachusetts Institute of Technology (MIT)의 Feng Zhang이 CRISPR 유전자 가위기술을 진핵생물, 특히 포유동물세포의 유전체 교정에 대해 특허를 출원하였다. 이후, 2014년 4월 조기심사 (accelerated prosecution)의 결과로 Feng Zhang이 미국 최초 크리스퍼 유전자 가위기술 특허권을 갖게 되었으나 2016년 UC Berkeley에서 선발명의 항변¹⁾(Interference proceedings)을 US Patent and Trademark Office (USPTO)에 제출하였고 특허권에 대한 최종 결정은 몇 년 더 걸릴 것으로 예상되고 있다.

패밀리특허²⁾기준으로 한 크리스퍼 유전자 가위기술 관련 특허의 수와 발명자는 MIT, Harvard College, Broad Institute에 속한 연구자들이 가장 많은 발명 건수를 가지고 있으며 Pioneer Overseas Corp.가 50개 이상, Univ. California 의 Jennifer A. Doudna가 5개의 특허 출원건을 가지고 있다(Egelie et al., 2016) (표 3).

표 3. 패밀리특허 기준 크리스퍼 유전자 가위기술 특허의 개수와 발명자

Inventors	Organization	Total inventions
Feng Zhang	Massachusetts Institute of Technology, Harvard College and Broad Institute	56
Fei Ran	Massachusetts Institute of Technology, Harvard College and Broad Institute	23
Le Cong	Massachusetts Institute of Technology, Harvard College and Broad Institute	18
David R. Liu	Harvard College	16
Guihua Lu	Pioneer Overseas Corp., Qingdao Livestock Veterinarian Res. Inst.	12
Guanfan Mao	Pioneer Overseas Corp.	12
Yang Gao	Pioneer Overseas Corp.	11
Wei Wang	Pioneer Overseas Corp.	11
Xiping Wang	Pioneer Overseas Corp.	11
Steven R. Webb	Dow AgroSciences LLC, Sangamo Biosciences Inc.	11
Jennifer A. Doudna	Univ. California, Caribou Biosciences Inc.	5
Emmanuelle Charpentier	Univ. California and Univ. Vienna	2

(출처: Egelie et al., 2016)

(표 3)에 제시된 것과 같이 크리스퍼 유전자 가위기술 관련 국제적 특허는 현재 Feng Zhang이 이끄는 MIT, The Board Institute, Harvard 와 Jennifer Doudna가 속한 Univ. California at Berkeley 그룹에서 주도하고 있는 것을 확인할 수 있다.

1) 등록된 특허와 동일한 발명이 이미 타인에 의해 이뤄졌다는 항변

2) 특정의 특허 출원과 관련된 모든 특허 및 특허 출원, 자국출원을 기초로 하여 해외 여러 나라에 출원하는 경우, 원 출원과 관련된 모든 특허 및 출원을 의미함

크리스퍼 유전자 가위기술 관련 특허는 유전자 가위기술의 구성요소 (components), 활성화 기술 (activity), 전달체 (vectors), 전달방법 (delivery), 용도 (application) 등으로 세분화 할 수 있으며, 이들 기술에 대하여 세분화하여 주요 발명자 그룹에서의 기술별 특허 현황을 정리하면 다음 표와 같다 (표 4). 이 표와 같이 MIT와 같은 선두 그룹에서 대부분의 각 주요기술 당 한 건 이상씩의 특허를 보유하고 있는 것을 볼 수 있다.

표 4. 크리스퍼 유전자 가위기술 관련 특허 기술 분야 분석

Technical categories	Detailed technical categories	Total inventions	MIT/Harvard/Broad/Zhang group	Doudna/Charpentier/UC Berkeley-Vienna group	Dow/DuPont
CRISPR-Cas9 components	CRISPR RNA	139	14	4	6
	tracrRNA	63	11	0	0
	gRNA	212	38	7	3
	PAM	56	8	2	0
	Cas9 enzyme	121	25	0	0
Total		591			
CRISPR-Cas9 activity	RNA-Cas complex	54	6	0	4
	Spacer integration	10	1	0	3
	Cas cleavage	31	3	1	5
Total		95			
Vectors	Expression vectors	94	7	4	0
	Bacterial	12	0	0	2
	Viral	97	28	1	2
	Plasmid	132	27	2	7
Total		335			
Delivery	Liposome	30	10	0	1
	Nanoparticle	33	16	0	0
	Exosome	16	12	0	0
	Microvesicle	16	11	0	1
Total		95			
Application	Gene editing	78	19	2	1
	Gene therapy	105	23	3	1
	Drug discovery	10	4	0	0
	Diagnosis	79	11	0	0
	Regulating	70	6	3	3
	Targeting	167	24	3	5
Total		509			

(출처: Egelie et al., 2016)

가장 최신의 3세대 유전자가위기술 관련 특허 출원은 2012년부터 폭발적으로 증가하였으며, 2014년 당해연구에만 미국 170건, 중국 55건으로 미국과 중국이 대부분을 차지하고 있다. 한국은 2014년 처음으로 6건의 특허를 출원하였다.

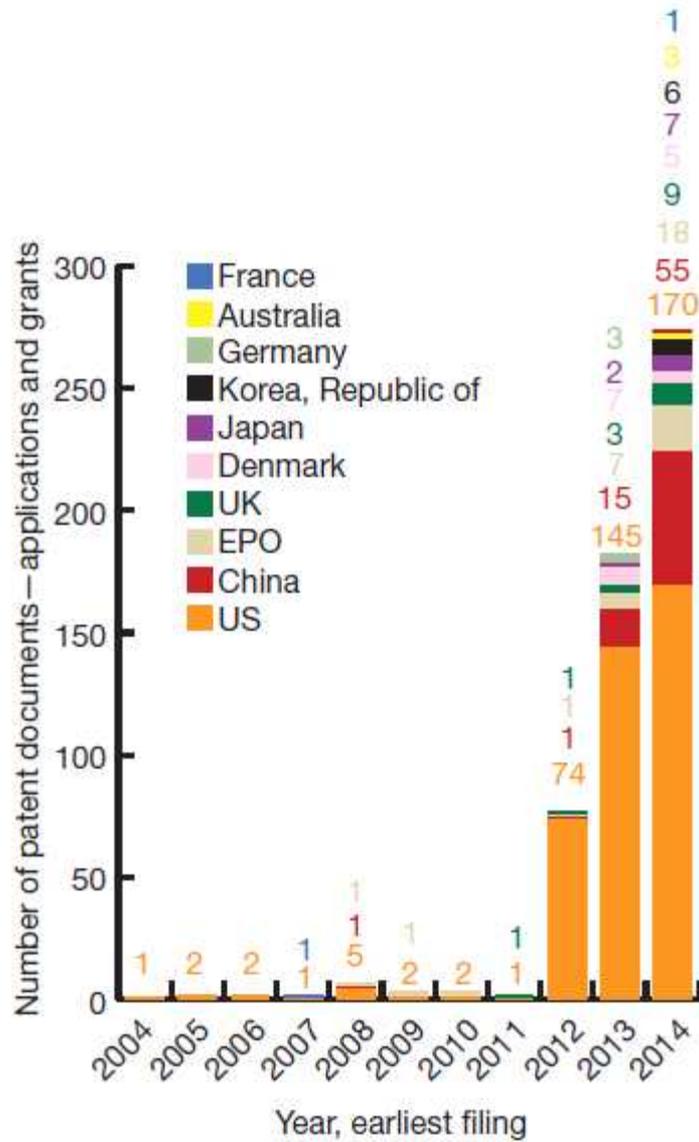


그림 11. 크리스퍼 유전자 가위기술 관련 국가별 특허 출원 현황

(출처: Egelie et al., 2016)

3.2. 국내외 유전자 가위기술의 비임상연구 현황

국내외 유전자 가위기술에 대한 비임상 연구현황을 조사하기 위하여, 유전자 가위기술을 핵심 개발 기술로 설립된 벤처회사들 중 대기업의 투자를 받는 주요 선두 벤처회사들의 주력 제품 및 기술들을 중심으로, 비임상연구의 진행 현황을 조사하였다. 이를 통하여 비임상 단계의 제품들 중 향후 임상 진입이 가능한 제품을 예상할 수 있다.

유전자 가위기술의 기초 및 비임상 연구 현황을 조사하기 위하여 pubmed 논문 검색엔진을 이용하여 2016년도 11월까지 발표된 연구 논문을 분석하였다. 1세대 기술의 경우 “ZFN”으로 검색시 454건, “ZFN and gene editing”으로 검색시 147건이 조사되었고, 2세대의 경우 “TALEN”으로 검색시 654건, “TALEN and gene editing”으로 검색시 288건이었으며, 3세대의 경우 “CRISPR”로 검색시 4,579 건이었고, “CRISPR and gene editing”으로 검색시 1,437 건이었다.

1차 선별된 1,872건의 연구들은 연구 목적 및 방법을 집중적으로 그 연구 내용이 심층적으로 검토되었으며, 인간의 질병 치료를 위해 수행된 총 84건의 연구(1, 2, 3 세대 각각 18 건, 16건, 46건 및 병용 4건)를 최종 분석대상으로 선별하여 조사하였다. 이들 논문들에 대하여, 유전자 가위기술 개발을 전달체 면에서는 바이러스 전달체, 비바이러스 전달체, 전기천공법 등의 물리적 전달체 등의 전달 방법으로 세분화하여, 또 유전자 가위기술의 세대별 기술, 표적 유전자, 대상 동물/세포, 세포내 도입방법, 적용된 가위기술, 적용 질환 등을 대상으로 조사하였다.

표 5. 1세대 ZFN 유전자 가위기술 적용 치료제 연구동향

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정 형태	도입 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
1	Duchenne muscular dystrophy	CCR5	Lentivirus	HDR	Virus	Human myoblasts from patient NSG mice	Canada	Benabdallah et al. (2013)
2	HIV	CXCR4	Adenovirus	NHEJ	Virus	Human T cell lymphoma SupT1, PM1 cells Human CD4+Tcells NSG mice	USA	Yuan et al. (2012)
3	HIV	CCR5	Adenovirus	NHEJ	Virus	Human HSPCs from patients NSGmice	USA	Li et al. (2013)
4	Hemophilia B	F9	AAV	HDR	Virus	hF9mut/HB male mice	USA	Anguela et al. (2013)
5	Glycogen Storage Disease Type IA	G6Pase	AAV	HDR	Virus	GSD Ia mice	USA	Landau et al. (2016)

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정 형태	도입 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
6	Chronic granulomatous disease	AAVS1 locus	Electroporation (mRNA)	HDR	Donor plasmid DNA, ZFN mRNA	Human iPSCs from patients NSGmice	USA	Merling et al. (2015)
7	Sickle cell disease	HBB	Electroporation	HDR	Donor DNA, ZFN mRNA	Human HSPCs from patients NSGmice	USA	Hoban et al. (2015)
8	HIV	CCR5	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human HSPCs from patients NSGmice	USA	Holt et al. (2010)
9	Sickle cell disease	HBB	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	USA	Sebastiano et al. (2012)
10	HIV	CCR5	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human MSCs from patients	Thailand	Manotham et al. (2015)
11	Duchenne muscular dystrophy	DMD	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human immortalized myoblasts NSGmice	USA	Ousterout et al. (2015)
12	HIV	CCR5	Electroporation	NHEJ	mRNA	Human HSPCs from patients	USA	DiGiusto et al. (2016)
13	HIV	CCR5	Polymer	NHEJ	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients Human ESCs from patients	China	Yao et al. (2012)
14	Cervical Cancer	E7	Polymer	NHEJ	Plasmid DNA	Human cervical cancer HeLa, C33A and CaSki cells Balb/c-nunudemice	China	Ding et al. (2014)
15	HBV	HBV genome	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human hepatoma Huh7 cells	USA	Cradick et al. (2010)
16	HIV	CCR5	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human cervical cancer TZM-bl cells	Spain	Badia et al. (2014)
17	Cystic Fibrosis	CFTR	Liposome	HDR	Plasmid DNA	Human bronchial epithelial cells Cystic fibrosis tracheal epithelial cells	Ireland	Lee et al. (2012)
18	N/A	EGFP	Hypothermia	NHEJ	Protein	Human embryonic kidney HEK293 cells Human monocytic THP1 cells Human dermal fibroblast Chinese hamster ovary cells PBMCs from human	USA	Gaj et al. (2012)

※iPSCs : Induced pluripotent stem cells, HSPCs: Hematopoietic stem and progenitor cells

※ESCs : Embryonic stem cells

1세대 기술을 이용하여 수행된 18건의 연구는, 바이러스성 전달체를 이용한 5건과 비바이러스성 전달체를 이용한 13건으로 분류할 수 있었다 (표 5). 연구에 사용된 바이러스성 전달체는 아데노바이러스부속바이러스(AAV) 및 렌티바이러스 유래였으며, 플라스미드 형태로 세포내에 도입되어 특정 유전자를 삽입/제거하여 HIV, 혈우병 B, 듀켄씨근이영양증 등에 치료효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 비바이러스성 전달체를 이용한 경우에는 전기천공법, 세포내 유전자도입물질 등과 함께 처리하여 비정상세포 내로 플라스미드를 전달하였으며, HIV, 겸상적혈구빈혈증, 낭포성 섬유증 등의 원인 유전자를 제거하여 질병 치료제로서의 가능성을 시사하였다.

표 6. 2세대 유전자 가위기술 적용 TALEN 치료제 연구동향

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정 형태	도입 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
1	Duchenne muscular dystrophy	DMD	Lentivirus and adenovirus	NHEJ	Virus	Human embryonic kidney 293T cells Human cervix carcinoma HeLa cells Human myoblasts from patients	Netherlands	Maggio et al. (2016)
2	HIV	p17	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human T lymphoma Jurkat cells	Japan	Kishida et al. (2016)
3	β-Thalassemia	HBB	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	China	Ma et al. (2013)
4	Prostate cancer	AR	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human prostate cancer LNCaP cells	USA	Nyquist et al. (2013)
5	Recessive dystrophic epidermolysis bullosa	COL7A1	Electroporation	HDR	TALEN DNA or mRNA	Human skin fibroblast from patients	USA	Osborn et al. (2013)
6	Haemophilia A	F8	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	Korea	Park et al. (2014)
7	Pyruvate kinase deficiency	PKLR	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	Spain	Garate (2015)
8	HIV	CCR5	Electroporation	NHEJ	mRNA	Human T lymphoma PM1 cells	Germany	Mock et al. (2015)
9	X-linked chronic granulomatous disease	NOX2	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	Germany	Dreyer et al. (2015)

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정 형태	도입 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
10	Cervical cancer	E6, E7	Polymer	NHEJ	Plasmid DNA	Human cervical cancer cell : HeLa, SiHa, and C33A K14-HPV16 transgenic mice	China	Hu et al. (2015)
11	Sickle cell anemia	HBB	Polymer	HDR	Plasmid DNA	Human cervical cancer HeLa cells	USA	Sun et al. (2012)
12	HBV	HBV genome	Polymer	HDR	Plasmid DNA	Human liver carcinoma Huh7 and HepG2.2.15 cells	South Africa	Dreyer et al. (2016)
13	Bladder Urothelial Carcinoma	HMGB1	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human urethra epithelial SV-HUC-1 cells Human bladder urothelial carcinoma EJ, 5637, T24, and BIU-87 cells	China	Liao et al. (2015)
14	Myotonic Dystrophy Type 1	DMPK	Liposome	HDR	Protein, Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	USA	Gao et al. (2016)
15	HIV	CCR5	Cell penetrating peptide	NHEJ	Protein	Human cervical cancer HeLa cells Human embryonic kidney HEK293T cells	USA	Liu et al. (2014)
16	HIV	PSIP1	Electroporation and polymer	NHEJ	Plasmid DNA	Human T lymphoma Jurkat E6 cells	USA	Fadel et al. (2014)

2세대 기술을 이용하여 수행된 비임상 연구는 총 16건이며 비바이러스성 전달체를 이용한 15건의 연구는 전기천공법, 폴리머, 지질 등을 이용하였고, 나머지 1건은 바이러스유래 전달체를 사용하였고 그 종류는 렌티바이러스와 아데노바이러스였다.

표 7. 3세대 유전자 가위기술 적용 CRISPR 치료제 연구동향

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정 형태	전달 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
1	HIV	CXCR4	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human T lymphoma Jurkat cells Human primary CD4+ T cells Human osteosarcoma Ghost-CXCR4 cells	China	Hou et al. (2015)
2	HBV	HBV S and X	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human hepatoma HepG2.2.15 cells and HepG2-H1.3 cells	Germany	Karimova et al. (2015)
3	HIV	MSRBI	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human lymphoma Jurkat cells Human CD4+ T cells	USA	Kaminski et al. (2016)
4	HSV	ICP0	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human oligodendroglioma TC620 cells	USA	Roehm et al. (2016)

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정형태	전달 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
5	Osteosarcoma	RUNX2	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human MSCs from patients Human osteosarcoma U2OS,SAOS2 and HOS-MNNG cells	USA	Shin et al. (2016)
6	HIV	HIV long terminal repeats	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human embryonic kidney HEK293T cells	USA	Yin et al. (2016a)
7	Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)	JCPyV genome	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human brain SVG-A cells	USA	Chou et al. (2016)
8	Ocular neovascular disease	VEGF-A	Lentivirus	HDR	Virus	Human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells	USA	Yiu et al. (2016)
9	MDR cancers (papilloma,colo rectalcancer)	ABCB1	Lentivirus	NHEJ	Virus	Human papilloma KB(v200) cells Human colorectal adenocarcinoma HCT-8/V cells	China	Yang et al. (2016)
10	HSV-1 infection	HSV-1 genome	Lentivirus	HDR	Virus	Human Osteosarcoma U-2 OS cells	China	Lin et al. (2016)
11	HIV	CCR5	Adenovirus	NHEJ	Virus	Human cervical carcinoma TZM-bl cells Human T-lymphocyte C8166-CCR5 cells Human CD4+ T cells	China	Li et al. (2015)
12	Sickle cell disease	HBB	Adenovirus	HDR	Virus	Human iPSCs from patients	USA	Li et al. (2016a)
13	Duchenne muscular dystrophy	DMD	Adenovirus	HDR	Virus	Human myoblast	Netherlands	Maggio et al. (2016)
14	Neurological disorders	MIR137	AAV	NHEJ	Virus	Balb/c, C57/Bl6 mice	USA	Murlidharan et al. (2016)
15	Duchenne muscular dystrophy	DMD	AAV	HDR	Virus	mdx:Ai9 mice	USA	Tabebordbar et al. (2016)
16	Hyperammone mia	OTC	AAV	HDR	Virus	Mouse fibrosarcoma MC57G cells Spt ^{ash} mice	USA	Yang et al. (2016)
17	PRKAG2 cardiac syndrome	PRKAG2	AAV	HDR	Virus	H530R PRKAG2 transgenic and knock-in C57BL/6 mice	China	Xie et al. (2016)
18	HIV	HIV-1 genome	AAV	NHEJ	Virus	Mouse embryo fibroblasts HIV-1Tg26 transgenic C57BL/6L mice	USA	Kaminski et al. (2016a)
19	Cystic fibrosis	CFTR	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	USA	Firth et al. (2015)
20	Chronic myeloid leukemia	ASXL1	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human leukemia KBM5 and K562 cells Human megakaryoblastic SET2 cells	UK	Valletta et al. (2015)
21	Retinitis pigmentosa	Rho	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	MSCs derived from adult rats S334ter-3rats	USA	Bakondi et al. (2016)

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정형태	전달 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
22	Acute humoral xenograft rejection	GGTA1, and CMAH	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human PBMCs from patients	USA	Butler et al. (2016)
23	Fibrodysplasia ossificans progressiva syndrome	ACVR1	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	Korea	Kim et al. (2016)
24	Fragile X syndrome	FMR1 gene	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human ESC line HI cells Human iPSCs from patients	USA	Li et al. (2016b)
25	Gastric cancer, melanoma	PD-1	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human PBMCs from patients	China	Su et al. (2016)
26	Colorectal cancer	EPHA1	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human colorectal adenocarcinoma HRT18 cells	UK	Wu et al. (2016)
27	Duchenne muscular dystrophy	DMD	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Mouse myoblast C2C12 cells C57BL/10ScSn and C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J mice(mdxmice)	USA	Xu et al. (2016)
28	Duchenne muscular dystrophy	DMD	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSC-Derived Muscle Cells NSG mice	USA	Young et al.(2016)
29	β -Thalassemia	HBB	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients Immunodeficient mice	China	Niu et al. (2016)
30	HIV	CCR5	Electroporation	HDR	Protein	Human bone marrow K562 cells Human fibroblast BJ cells Human embryonic stem cells	Korea	Kim et al. (2014)
31	β -haemoglobinopathies	HBB	Electroporation	HDR	mRNA	Human HSPCs from patients	USA	Dever et al. (2016)
32	Fanconi anemia	Fanconi anemia I (FANCI)	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients	USA	Osborn et al. (2016)
33	Retinitis pigmentosa	Rhodopsin (RHO) gene	Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human cervical cancer HeLa cells P23H(RHO transgenic) mice	Italy	Latella et al. (2016)
34	Phenylketonuria	phenylalanine hydroxylase (PAH)gene	Electroporation	HDR	Plasmid DNA	Monkey kidney fibroblast COS-7 cells	Germany	Pan et al. (2016)
35	HBV	HBV genome	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human hepatoma Huh7 and HepG2.2.15 cells Balb/cmice	China	Dong et al. (2015)
36	HBV	HBV genome	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human hepatoma cell lines Huh7 and HepG2 M-Tg HBV mice(C57BL/6Jmice)	China	Zhu et al. (2016)
37	N/A	EGFP	Liposome	NHEJ	Protein	Human cervical cancer HeLa-DsRed cells	USA	Wang et al.(2016)
38	Osteosarcoma	ABCBI	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human osteosarcoma U-2OSR2 and KHOSR2 MDR cells	USA	Liu et al. (2016)

연번	질환	표적 유전자	도입 방법	교정형태	전달 물질	대상 세포/동물	국가	참고문헌
39	HBV	HBV genome	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human liver carcinoma HepG2 cells	Japan	Sakuma et al. (2016)
40	HBV	HBV genome	Liposome	NHEJ	Plasmid DNA	Human liver carcinoma HepG2.A64 cells C57BL/6 mice	China	Li et al. (2016)
41	HIV	CCR5	Cell penetrating peptide	NHEJ	Protein	Human embryonic kidney HEK293T cells Human cervical cancer HeLa cells Human embryonal carcinoma NCCIT cells Human dermal fibroblast cells Human embryonic H9 stem cells	Korea	Ramakrishna et al. (2016)
42	Age-related hearing loss	Cdh23	Microinjection	HDR	mRNA	C57BL/6NTac zygotes C57BL/6NTac mice	UK	Mianne et al. (2016)
43	Haemophilia A	Factor VIII	Electroporation, Lipofectamine 2000	HDR	Plasmid DNA	Human iPSCs from patients B6:129S4-F8tm1Kaz/J mice	Korea	Park et al. (2015)
44	Cervical cancer	E7	Polymer	NHEJ	Plasmid DNA	Human cervical cancer SiHa, Caski and C33A cells	China	Hu et al. (2014)
45	Fanconi Anemia	FANCC	Lipofectamine2000 /Electroporation	NHEJ	Plasmid DNA	Human fibroblast from patients	USA	Osborn et al. (2015)
46	Tyrosinemia	Fah	Liposome and AAV	HDR	mRNA	Mice hepatocytes Fah ^{mut/mut} mice	USA	Yin et al. (2016)
47	β -Thalassemia	HBB	Electroporation	HDR	Plasmid DNA (TALEN or CRISPR)	Human iPSCs from patients	China	Xu et al. (2015)
48	N/A	EGFP	Liposome	NHEJ	Protein (TALEN or CRISPR)	Human cervical cancer HeLa cells Human embryonic kidney HEK 293T cells Human osteosarcoma U2OS-EGFP cells Mouse embryonic stem cell lineTau-GFP P2Atoh1-GFP mice	USA	Zuris et al. (2015)
49	Sickle cell disease	HBB	Microinjection	HDR	Plasmid DNA (TALEN or CRISPR)	Human leukemia K562 cells	USA	Cottle et al. (2015)
50	Sickle cell disease	HBB	Electroporation	HDR	Plasmid DNA (TALEN or CRISPR)	Human leukemia K562 cells HumanCD34+Cellfrompatients	USA	Hoban et al. (2016)

3세대 크리스퍼를 이용한 비임상 연구는 총 46건이었으며 이 중 18건의 연구는 바이러스 유래 전달체를 이용하였는데, 그 빈도는 렌티바이러스(10건), 아데노바이러스부속바이러스(5건), 아데노바이러스(3건) 순이었다.

그 외 28 건의 비바이러스성 전달체 사용 연구는 세포내 도입을 위해 전기천공법(16건), 세포내유전자도입물질(8건), 미세주입법(1건), 병용(3건)을 사용하였다.

1세대~3세대에 이르는 유전자 가위기술의 비임상 연구 논문을 다양한 항목에 따라 종합적으로 분석한 결과는 다음과 같다 (그림 12). 비임상 연구를 가장 활발히 수행한 나라는 역시 미국(52%)이었고, 뒤이어 중국, 우리나라 순이었다. 질환별로는 감염성질환이 32%, 혈액관련 질환, 암·종양등의 신생물 질환, 근·신경계 질환 등 다양한 질환에 대하여 비임상 연구를 진행해 왔음을 확인할 수 있다.

(그림 12)에 분석된 바와 같이, 비임상 연구 사례의 52%는 유전체 특정 부위를 절단하여 특정 유전자의 발현을 억제하는 NHEJ(nonhomologous end joining) 교정방식을 이용하고 있으며 48%는 절단된 부위에 새로운 유전자를 삽입하는 HDR(homology-directed repair) 방식을 이용하고 있는 것을 확인할 수 있다.

또한 투여 방법에서도 60%는 ex vivo 형태로 교정하려는 세포를 체외에서 분리한 다음 바이러스 벡터, 물리적 천공 등의 방법으로 유전자 가위 단백질을 발현하는 유전자, mRNA, 단백질 자체를 도입하는 방법이 사용되었다. 40%는 생체내로 유전자 가위 단백질을 발현하는 유전자, mRNA, 단백질 자체를 직접 투여하는 in vivo 방법이 사용되었다. 도입방법은 약 70%가 비바이러스성 벡터를 사용하고 있었고, 그 중 전기천공법이 절반 가까이(53%)를 차지했다. 전기천공법을 제외하고는 지질을 이용하거나 여러 방법을 병용해서 사용한 것으로 확인되었다.

바이러스성 벡터를 사용한 경우에는 렌티바이러스를 가장 많이(42%) 사용하였고, 이외에 아데노바이러스부속바이러스(AAV)나 아데노바이러스를 사용한 것으로 조사되었다. 이들 바이러스 전달체의 특징, 장점, 단점, 및 적용 분야는 다음(표 8)에 요약되어 있다 (표 출처: 미국한림원 인체 유전자 교정에 관한 보고서 198쪽 (Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance), 2017년 2월). 렌티 바이러스의 경우, 바이러스 벡터 자체에 돌연변이 유발 가능성이 있는 단점이 있어 바이러스 자체의 유전독성 고려시, 가장 신중히 검토되어야 할 벡터로 사료된다. 아데노바이러스의 경우 대부분의 사람들이 아데노바이러스에 이미 노출된 바 있으므로 기존에 존재하는 항체로 인하여 표적 세포에 도달하기 전에 항체에 인지되어서 세포 내로의 전달율이 저하될 가능성이 높다.

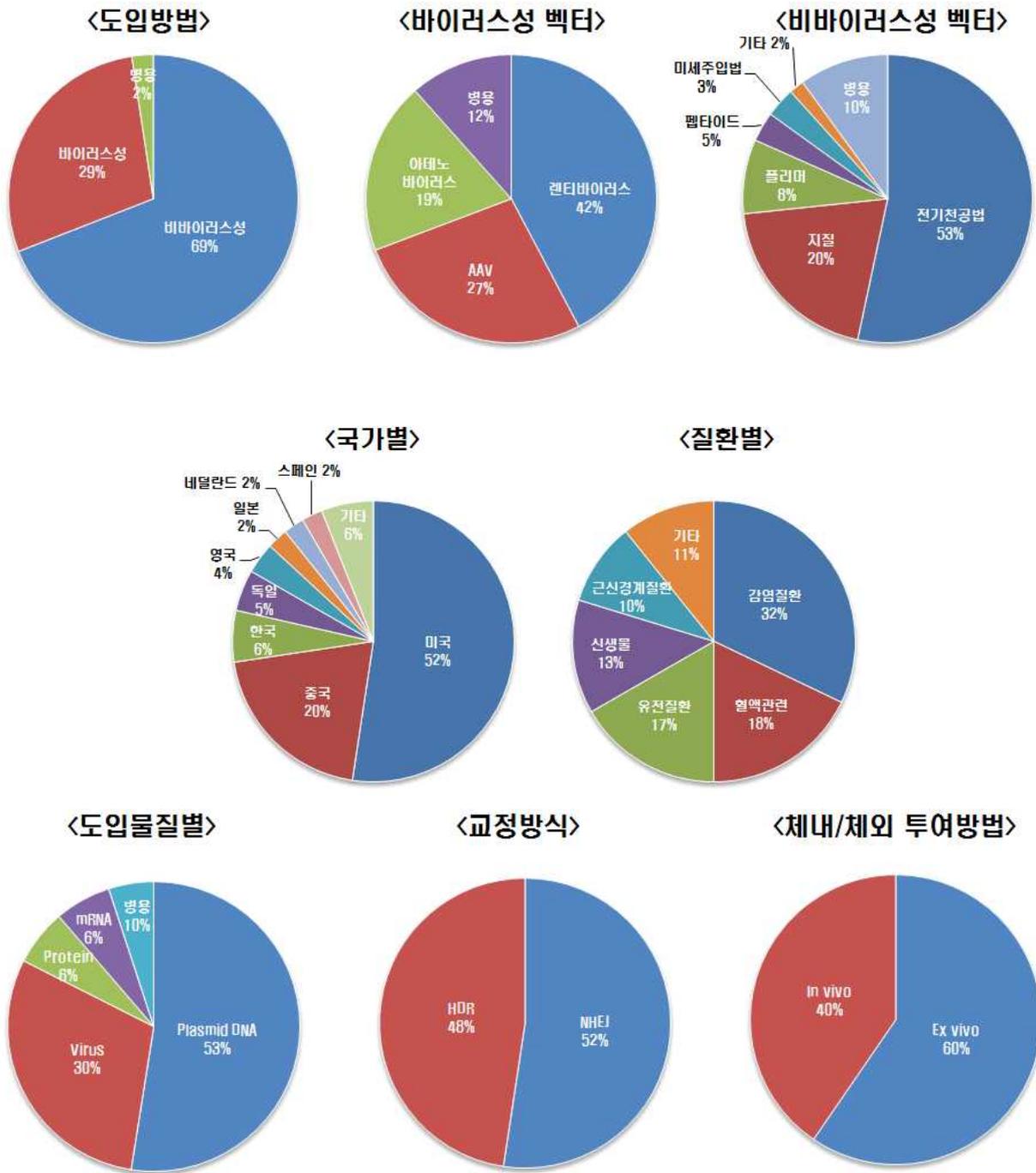


그림 12. 유전자 가위기술 비임상 연구 현황 분석

표 8. 유전자 가위기술 바이러스 전달체별 특징 비교

세포내 도입방법	도입물질	설명	장점	단점	적합한 적용분야
렌티바이러스 (LV)		8kb 크기의 유전자를 전달; 비복제성이며 세포의 유전체에 유전자를 삽입하여 안정적으로 발현, 후대에도 전달; Integrase-defective lentiviral vector (IDLV)의 경우 세포 유전체에 삽입되지 않아 빠르게 소실됨	Ex vivo에서 가장 널리 사용됨; LV의 경우 안정적, IDLV의 경우 일시적 발현; 대상 세포에 따라 발현 조절이 가능함; IDLV의 경우 발현이 일시적이므로 독성; 면역원성이 낮아 주형 DNA에 적합	세포독성, 면역원성, 돌연변이 유발 가능성; 생산 공정이 복잡하고 비용이 높음	세포주 및 일차 세포 (ex vivo)
아데노바이러스 부속바이러스 (AAV)	1) 유전자 절단 효소와 guide RNA 발현 바이러스 유전체 2) 주형 (template) DNA	4.7kb 크기의 유전자를 전달; 비복제성이며 대상 세포에 따라 다양한 형태의 DNA 전달 가능	In vivo에서 가장 널리 사용됨; Episome 형태로 대상 세포에 존재; 다양한 세포에서 발현이 잘됨; 분열하는 세포에서 발현이 일시적이며 유전자 절단 효소와 주형 delivery에 적합	전달 유전자 용량이 한정적; 분열하지 않는 세포에서 발현이 지속되어 독성, 면역원성 가능성 있음; 환자가 AAV에 대한 기존 면역이 있을 수 있음	일차 세포 (ex vivo), 조직 및 전신 투여 (In vivo)
아데노바이러스		20kb 크기의 유전자를 전달; In vivo와 ex vivo에서 다양한 세포를 대상으로 전달 가능	큰 조각의 DNA를 전달할 수 있음; In vivo, ex vivo에서 모두 이용 가능하며 분열하는 세포에서 발현이 일시적임	임상시험에서 심각한 급성 독성을 유발한 적이 있음; 많은 사람이 아데노바이러스에 대한 기존 면역 반응을 가짐; 일반적으로 더 이상 유전자 치료 벡터로 사용되지 않음	일차 세포 (ex vivo)

(출처: 미국한림원 인체 유전자 교정에 관한 보고서, 2017년)

유전자 교정에 사용되는 비바이러스 전달체로는 고분자 복합체, 나노 입자가 있으며, 물리적 방법으로는 전기 천공법, 압착 천공법이 있다. 비바이러스성 전달체 및 물리적 도입방법의 특징, 장점, 단점, 및 적용 분야는 아래의 표 8에 요약되어 있다 (표 출처: 미국한림원 인체 유전자 교정에 관한 보고서 197쪽(Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance), 2017년 2월).

표 9. 유전자 가위기술 비바이러스 전달체 및 물리적 도입 기술별 특징 비교

세포내 도입방법	도입물질	설명	장점	단점	적합한 적용분야
고분자 복합체 형질전환 (transfection)	1) 유전자 절단 효소: 플라스미드DNA, RNA, 단백질, 2) 가이드RNA: 플라스미드DNA, 올리고핵산 (유전자 절단 효소와 복합체 (Ribonucleoprotein : RNP) 형태로 이용 가능)	도입물질을 glyco/lipo-polymer와 복합체 형성하여 세포내 전달; 복합체는 ex vivo에서 세포로 직접 투여, 또는 in vivo 국소, 전신 투여함	비교적 간단함; 모든 구성요소를 한 번에 전달 가능함; 일시적인 지속효과 (유전자 절단 효소의 독성 및 면역원성 감소)	세포내 핵 전달율의 한계성; 세포독성 및 생체 내 염증 유발; 생체 적용을 위해서 RNA modification 필요함; 특정 조직 표적화가 어려움; 제제에 대한 소유권 문제	세포주 및 일차세포 (ex vivo)
나노입자	3) 주형: 플라스미드DNA 또는 올리고핵산 (RNP와 복합체 형태로 이용가능)	나노입자와 복합체 형성, 전달 방법은 상동	세포내 전달율 향상; 특정 조직 표적화 가능; 일시적인 지속효과 (유전자 절단 효소의 독성 및 면역원성 감소)	거의 없음	국소 또는 전신 투여
전기천공법	4) 기타: 유전자 절단 효소를 mRNA, 단백질 혹은 RNP 형태로 전달하며 (비바이러스성) 그 전이나 후에 주형 DNA의 경우 따로 바이러스 벡터로 전달 됨	유전자 가위효소와 주형이 포함/불포함된 세포용액에 전기 자극을 통과시킴.	다양한 세포 종류에서 높은 효율을 보임; 일시적인 지속효과 (유전자 절단 효소의 독성 및 면역원성 감소)	독성 유발 가능성 (단백질 <mRNA<DNA) 이 있지만 형질 전환법보다는 낮음; 생체 적용 한계성	세포주 및 일차세포 (ex vivo)
압착(squeeze) 천공법		세포보다 작은 채널에 세포들을 통과시켜 세포막에 작은 구멍을 생성시켜 도입물질을 전달시킴.	입증되지 않은 새로운 전략	in vivo에서는 사용 불가능	

(출처: 미국한림원 인체 유전자 교정에 관한 보고서, 2017년)

3.3. 국내외 유전자 가위기술의 임상연구 및 주요 파이프라인 현황

현재 유전자 가위기술을 기반으로 개발된 치료제들의 종류 및 임상 시험 진입을 위한 연구 범위 등을 고려하여 치료제 개발을 목적으로 하는 연구개발 초기 단계의 연구 및 환자에 대해 진행 중인 임상 연구 현황에 대하여, 임상연구 정보 제공 웹 사이트 (예, www.clinicaltrials.gov) 등을 통해 현재 임상 중인 유전자 가위기술 기반 치료제를 조사하였다.

임상연구 현황은 미국 NIH에서 운영하는 임상시험 정보사이트 [ClinicalTrials.gov] 에서 조사하였고 (2017년 2월 기준). 세대별 유전자 가위기술의 명칭 혹은 제약사 파이프라인 개별 검색을 통해 자료를 수집하였으며 자세한 검색방법은 다음과 같다 (표 10).

표 10. 임상시험 조사 검색어

	1세대 ZFN	2세대 TALEN	3세대 CRISPR
검색어	Zinc finger protein (5건)	TALEN (0건)	CRISPR (4건)
	Zinc finger nuclease(9건)	TALE nuclease (0건)	Cas9 (4건)
	Sangamo Therapeutics (14건)	UCART (3건)	
중복 제외	10건	3건	4건

유전자 가위기술을 이용한 임상 연구는 전 세계적으로 현재 17건이 진행되고 있는 것으로 확인되었다. 그 중 1세대 기술은 모두 10건 진행 중이며, 미국의 Sangamo Therapeutics사에서 총 6건이 진행 중이다. 국가별로는 9건이 미국에서 진행 중이고 1건이 중국에서 진행 중이다 (표 11). 1세대 기술은 현재 임상 1상인 것이 8건, 1/2상으로 진행되는 것이 2건으로 파악된다.

표 11. 1세대 유전자 가위기술 적용 치료제 임상 현황

연번	적용 질환	도입 물질	실시 기관 (개발제품명)	국가	임상 단계	임상등록번호	환자수	비고
1	Intermittent claudication	Plasmid DNA	National Heart, Lung, and Blood Institute	USA	I	NCT00080392	10	Completed
2	HIV	Virus	University of Pennsylvania	USA	I	NCT00842634	12	Completed
3	HIV	Virus	Sangamo Therapeutics (SB-728-T)	USA	I/II	NCT01252641	21	Completed
4	HIV	mRNA	Sangamo Therapeutics (SB-728mR-T)	USA	I/II	NCT02225665	12	Active, not recruiting

연번	적용 질환	도입 물질	실시 기관 (개발제품명)	국가	임상 단계	임상등록번호	환자수	비고
5	HIV	mRNA	University of Pennsylvania	USA	I	NCT02388594	15	Recruiting
6	HIV	mRNA	Sangamo Therapeutics (SB-728mR-HSPC)	USA	I	NCT02500849	12	Recruiting
7	Hemophilia B	Virus	Sangamo Therapeutics (SB-FIX)	USA	I	NCT02695160	9	Recruiting
8	MPS I	Virus	Sangamo Therapeutics (SB-318)	USA	I	NCT02702115	9	Not yet recruiting
9	MPS II	Virus	Sangamo Therapeutics (SB-913)	USA	I	NCT03041324	9	Recruiting
10	HPV-related Malignant Neoplasm	N/A	Huazhong University of Science and Technology	China	I	NCT02800369	20	Not yet recruiting

2세대 기술의 경우 Collectis사의 기술을 도입한 Servier 사에서 3건의 임상시험이 UCART19에 대하여 각각의 적응증에 대하여 진행되고 있다(표 12). UCART19 (Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells)는 TALEN을 mRNA 형태로 도입한 T 세포에 CD19의 키메라 항원 수용체를 발현하도록 제조된 것이다. NCT02735083은 UCART19를 투여받은 악성 림프종 (Advanced Lymphoid Malignancies) 환자의 장기 안전성 (long-term safety)을 평가하는 임상시험이다. NCT02746952는 급성 및 만성 백혈병 환자 (Acute Lymphoblastic Leukaemia, Chronic Lymphocytic Leukaemia)에서 UCART19의 투여 용량에 대한 안전성을 평가하는 임상 시험이다. NCT02808442는 재발성 및 난치성 급성 백혈병 (Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia) 소아 환자를 대상으로 진행되는 임상 시험이다.

표 12. 2세대 유전자 가위기술 적용 치료제 임상 현황

연번	적용 질환	도입물질	개발사 (개발제품명)	국가	임상 단계	임상등록번호	환자수	비고
1	Advanced Lymphoid Malignancies	mRNA	Servier (UCART19)	United Kingdom	N/A	NCT02735083	200	Recruiting
2	Acute Lymphoblastic Leukaemia, Chronic Lymphocytic Leukaemia	mRNA	Servier (UCART19)	United Kingdom	I	NCT02746952	12	Recruiting
3	Relapsed/ Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia	mRNA	Servier (UCAR19)	United Kingdom	I	NCT02808442	10	Recruiting

현재 전세계적으로 뿐만 아니라 우리나라에서도 가장 활발히 연구·개발되고 있는 CRISPR/Cas9을 활용한 3세대 기술의 경우 중국에서 4건 진행 중인 것으로 파악되었다(표 13).

표 13. 3세대 유전자 가위기술 적용 치료제 임상 현황

연번	적용 질환	도입물질	실시 기관	국가	임상 단계	임상등록번호	환자수	비고
1	Metastatic Non-small Cell Lung Cancer	N/A	Sichuan University	China	I	NCT02793856	15	Recruiting
2	Invasive Bladder Cancer Stage IV	N/A	Peking University	China	I	NCT02863913	20	Not yet recruiting
3	Metastatic Renal Cell Carcinoma	N/A	Peking University	China	I	NCT02867332	20	Not yet recruiting
4	Hormone Refractory Prostate Cancer	N/A	Peking University	China	I	NCT02867345	20	Not yet recruiting

임상 연구 동향을 세대별, 질환별, 단계별, 국가별, 도입방법, 도입물질, 투여 방법 등으로 구분하여 분석한 결과는 다음과 같다 (그림 13). 최초 개발된 1세대 유전자 가위기술이 절반이상을 차지하고 있으며, 질환은 암과 같은 신생물 질환(44%)와 감염성 질환(39%, 주로 HIV)가 차지하는 것을 확인할 수 있다. 임상 단계는 80% 가까이가 1상이며, 임상시험 진행 국가는 미국과 중국이 대부분을 차지하고 있다. 인체 투여 방법은 ex vivo 방법을 사용하는 것이 64%이며, 유전자교정을 위하여 유전자교정 물질을 도입하는 방법은 바이러스성 벡터가 절반 정도 차지하고 있다. 도입되는 물질로 mRNA를 사용하는 경우도 있어 이 경우에는 전기천공법 등을 사용하여 도입시키는 것으로 예상된다.

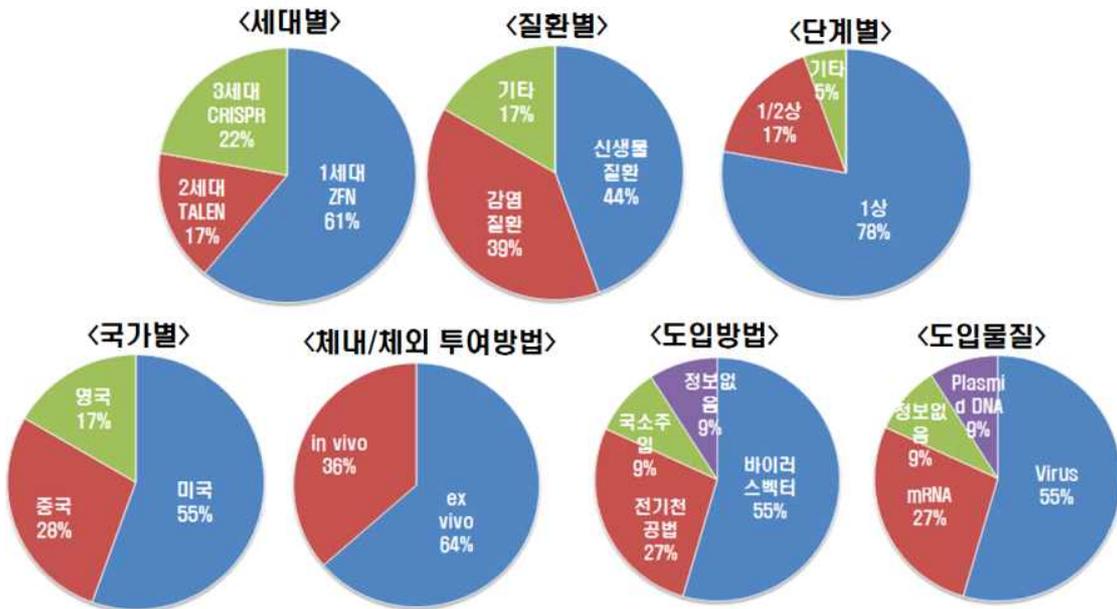


그림 13. 유전자 가위기술 적용 치료제의 임상 연구 현황 분석

유전자 가위기술 기반 치료제를 개발하는 주요 회사의 파이프라인 현황을 분석한 결과, 이 기술에 주력하고 있는 제약사는 Sangamo Therapeutics, Bluebirdbio, Intellia, Editas 등으로 대부분 미국의 회사들이 주를 이루고 있는 것으로 보여진다.

현재 1세대 기술을 이용하여 임상단계에 진입한 회사는 Sangamo Therapeutics사가 유일하며, 특히 ZFN에 기반한 SB-728-T는 HIV infection에 대한 치료제로 현재 임상 2상 진행 중으로 세계적으로 임상 단계에서 가장 앞서가고 있는 파이프라인을 보유하고 있다 (그림 14). 13개의 파이프라인을 보유하고 이중 8개는 유전자 삽입의 교정형태를, 5개는 제거하는 형태의 교정 방식을 취하고 있다. 적응증은 감염성 질환인 AIDS에서부터 유전질환인 Huntington's disease까지 다양하다. 이들 중 임상에 진입한 것은 6개 이다.

개발제품명	적응증	임상1상	임상2상	교정형태
SB-728-T	HIV/AIDS			제거
SB-728mR-T	HIV/AIDS			제거
SB-728mR-HSPC	HIV/AIDS			제거
SB-FIX	Hemophilia B			삽입
SB-318	Mucopolysaccharidosis I			삽입
SB-913	Mucopolysaccharidosis II			삽입

그림 14. 미국 Sangamo Therapeutics사의 임상 파이프라인 현황

영국 Servier사는 Collectis사로부터 2세대 TALEN 기술을 이용한 T 세포인 UCART19를 이전하여 현재 3건이 임상 진행 중이다 (그림 15). 이들 파이프라인에 대해서는 상세하게 교정형태를 확인할 수 있는 자료가 없었다.

개발제품명	적응증	임상1상	임상2상	비고
UCART19	Advanced Lymphoid Malignancies			장기 안전성 (long-term safety) 임상 시험
UCART19	Acute Lymphoblastic Leukaemia, Chronic Lymphocytic Leukaemia			
UCART19	Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia			

그림 15. 영국 Servier사의 임상 파이프라인 현황

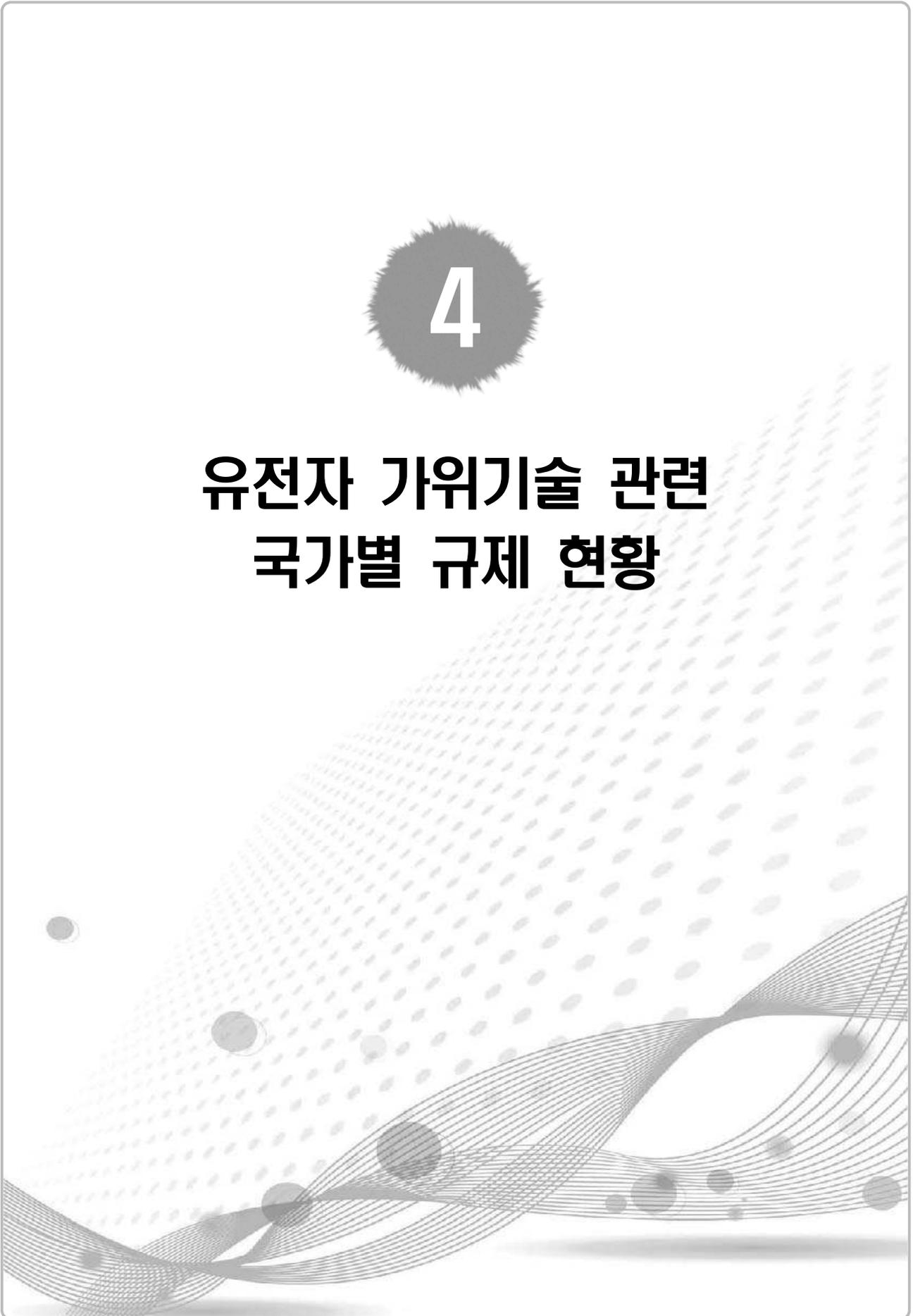
3세대 유전자 가위기술의 경우 Editas사, Juno사, Intellia 사 등에서 비임상 단계의 파이프라인을 보유하고 있는 것으로 파악되지만 아직 임상에 진입한 회사는 없는 상황이다 (그림 16). 국내 회사인 툴젠 등의 경우 파이프라인은 있으나, 상세한 기술 내용은 아직 공개하고 있지 않다.

회사	비임상	임상 1상	임상 2상	교정형태
Intellia THERAPEUTICS	간표적 지질나노입자(ATTR)			제거
	간표적 지질나노입자(AATD)			제거/삽입
	간표적 지질나노입자(HBV)			제거
	간표적 지질나노입자(IEMs)			제거/삽입
editas MEDICINE	AAV(Leber congenital amaurosis 10)			제거
	AAV(Usher syndrome 2a, HSV-1)			제거
	ex vivo(Beta-thalassemia, Sickle cell disease)			제거/삽입
	(Duchenne muscular dystrophy)			제거
	Multiple(Cystic fibrosis)			제거/삽입
	Multiple(Alpha-1 antitrypsin deficiency)			제거/삽입
Juno	ex vivo(cancer immunotherapy)			제거
CRISPR THERAPEUTICS	ex vivo(beta-thalassemia, sickle cell disease)			N/A
	AAV/간표적 지질나노입자(Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis)			N/A
CARIBOU BIOSCIENCES	N/A			N/A
horizon	N/A			N/A
ToolGen	N/A			N/A

그림 16. 3세대 CRISPR 주요회사의 파이프라인 현황

4

유전자 가위기술 관련 국가별 규제 현황



4 유전자 가위기술 관련 국가별 규제 현황

새로운 개념의 치료제인 유전자 가위기술에 대하여, 아직까지 국내는 물론이고, 국제적으로도 규제나 가이드라인이 미비한 실정이다. 그러나 우리보다 먼저 이미 임상에 진입한 유전자 가위기술 적용 치료제에 대해서 국외 규제 기관이 적용한 가이드라인을 중심으로 살펴보았다.

그에 앞서, 유전자 가위기술을 이용한 치료제의 정의에 대하여 각 국가별로 규제기관에서 적용하고 있는 개념을 정리해보면 아래의 표(표 14)와 같다.

표 14. 국가별 규제기관의 유전자치료제 정의

국가	규제기관	정의	출처
한국	MFDS	“유전자치료제”란 질병치료 등을 목적으로 인체에 투입하는 유전물질 또는 유전 물질을 포함하고 있는 의약품을 말한다	생물학적 제제 등의 품목허가, 심사규정 (식약처고시 제 2016-73호 (2016.07.28.)) 제 2조 ³⁾
미국	FDA	Gene therapy products are defined for the purpose of this statement as products containing genetic material administered to modify or manipulate the expression of genetic material or to alter the biological properties of living cells	Federal Register / Vol. 58, No 197 (1993) / Notice
유럽	EMA	Gene therapy medicinal product means a biological medicinal product which has the following characteristics: (a) it contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used in or administered to human beings with a view to regulating, repairing, replacing, adding or deleting a genetic sequence; (b) its therapeutic, prophylactic or diagnostic effect relates directly to the recombinant nucleic acid sequence it contains, or to the product of genetic expression of this sequence.	<Reg1394/2007 and Dir.2009/120/EC>
일본	PMDA	사람 또는 동물의 질병 치료에 사용될 목적의 것 중 “사람 또는 동물의 세포에 도입되고 이들 체내에서 발현되는 유전자”를 함유시킨 것.	<의약품, 의료기기 등의 품질, 유효성 및 안전성의 확보 등에 관한 법률>
중국	CFDA	A medical intervention based on modification of the genetic material of living cells	Points to consider for Human gene therapy and product quality control (by State food and drug administration of China)

3) 유전자 가위기술 적용 치료제가 유전자치료제로서 명확히 규정되도록 개정안이 행정 예고 중임(2017.4.3.)

4.1. 유럽의 유전자 가위기술 관련 규제 현황

European Medicines Agency (EMA)의 규제 현황에서는 유전자 가위기술은 주로 아데노바이러스 혹은 아데노바이러스부속바이러스(AAV)를 이용하고 있다. 따라서, 바이러스 백터를 기반으로 유전자 가위기술 치료제를 고안한 경우에 대하여, 별도의 가이드라인이 있는 관련되는 비임상 평가 내용을 집중적으로 조사하였다.

유전자치료제의 품질 관련 가이드라인 7개, 비임상 관련 가이드라인 8개, 임상 연구 단계 5개 등으로 비임상 관련한 유전자치료제 관련 guideline들이 다수 발간되어 있는 상황이다(그림 17). 특히 유럽의 가이드라인은 아데노바이러스부속바이러스 백터를 이용한 품질관리, 비임상, 임상에 대한 구체적인 가이드라인이 존재하며, 렌티바이러스 백터의 제조에 관한 가이드라인 등 특정 바이러스 백터에 대한 가이드라인이 별도로 발간된 것이 주목된다.

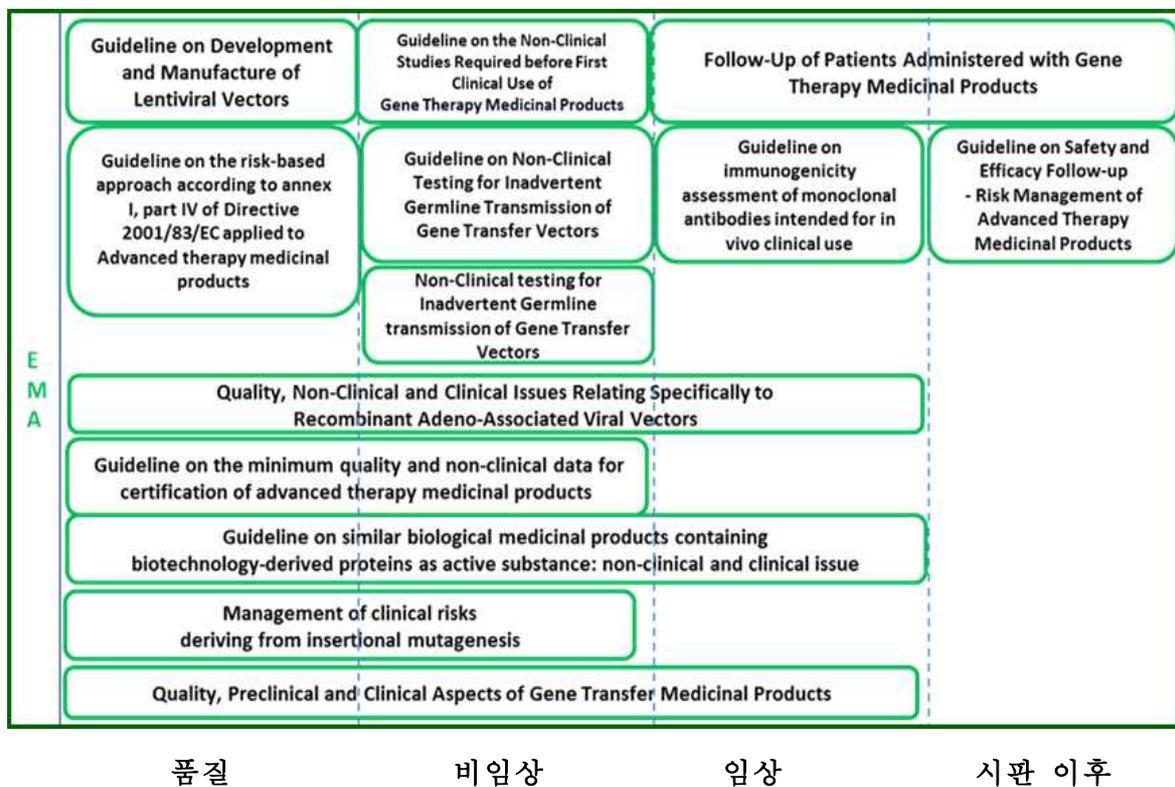


그림 17. 유럽 EMA 유전자치료제 guideline map

유럽 EMA는 “Guideline on the minimum quality and non-clinical data for certification of advanced therapy medicinal products“ 가이드라인을 통해 첨단바이오의약품 중 유전자 혹은 세포/유전자치료제의 인증을 위해 특이적으로 요구되는 제출 서류요건을 제시하였으며 이 요건은 유전자 가위기술 적용 치료제에도 적용될 것으로 보인다 (표 15).

표 15. 유전자치료제 및 세포치료제에 적용되는 자료 요건

구분	유전자치료제	세포치료제
일반 정보	유전물질모식도, 친화성(tropism) 정보(바이러스성 벡터)	
제조	<p>세포/균주(seed) 유통시스템, 불순물 목록, 세포 및 바이러스 균주은행의 정보,</p> <p>①세포은행에 대한 최소요건 : 제조용세포주 확인, 세포수 및 생존율, 순도, 무균성(세균 및 진균), 마이코플라스마, 우연히 혼입될 수 있는 바이러스 및 성장특성</p> <p>②바이러스 균주은행에 대한 최소요건 : 바이러스농도, 이입되는 핵산염기서열, 유전체/표현형 특성, 생물학적 활성, 무균성(세균 및 진균), 마이코플라스마 부재, 우연히 혼입될 수 있는 바이러스 및 복제가능 바이러스(제품이 복제기능결핍인 경우)</p> <p>③세균세포은행에 대한 최소요건 : 생존율, 세균균주 특성, 유전형/표현형, 플라스미드 구조 확인 (예, 제한효소를 이용한 분석), 우연히 혼입될 수 있는 물질 및 내인성바이러스에 관한 시험</p>	<p>불순물 목록(유래세포주의 유럽 인간배아 줄기세포 레지스트리 등록 여부 확인), 얻어지는 세포군과 관련한 각 공정이 기여하는 바에 대해 설명</p>
특성 규명	대상 유전자 및 벡터에 대한 확인	세포성 요소 (생존율, 세포군의 적절성, 원치않는 세포 종류, 비생존세포 비율), 비세포성요소 (비세포유래 불순물 관련 산물, 불순물 관련 공정)
원료물질 관리	복제가능 바이러스 검출 시험 (바이러스 벡터)	
의약품 관리	복제가능 바이러스(RCV, replication competent viruses) 검출 시험	

4.2. 미국의 유전자 가위기술 관련 규제 현황

미국 역시, 현재 유전자 가위기술에 대한 별도의 가이드라인은 확립되지 않은 실정이다. Sangamo Therapeutics사 등 선두기업은 미국 식품의약국(FDA)의 생물학적 제제 평가연구센터(CBER : Center for Biologics and Research)에서 규정한 유전자치료제 규제 가이드라인들에 의거하여 임상에 진입한 것으로 조사되었다. 특히 미국의 Sangamo Therapeutics사에서 임상시험 중인 SB-728에 대한 조사로 임상 연구로 진입하기 위하여 참고한 가이드라인은 아래의 표(표 16)와 같다.

유전체를 유전자 가위기술을 이용한 치료제의 경우, 이에 따른 안전성 평가 기법이 중요할 것으로 보인다. 따라서, 비임상 및 임상 연구를 위한 안전성에 대해 분석 및 평가 사항을FDA에서 유전자치료제에 대해 발간된 guidance 등을 참고하여 조사하였으며, 2013년 11월 발간된 세포 및 유전자 기반 치료제의 비임상 평가에 대해 발간된 guidance의 발간 배경 및 비임상 단계 평가 사항을 참고하여 유전자 가위기술 기반 치료제의 비임상 단계에서 고려해야할 평가 항목의 내용을 참고하였다.

표 16. 미국 Sangamo Therapeutics사에서 유전자 가위기술 적용 치료제 승인시 참고한 가이드라인

연번	가이드라인 제목	발행연도
1	Design and analysis of shedding studies for virus or bacteria-based gene therapy and oncolytic products	2015
2	Considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products	2015
3	Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products	2015
4	Determining the need for and content of environmental assessments for gene therapies, vectored vaccines, and related recombinant viral or microbial products	2013
5	Potency tests for cellular and gene therapy products	2011
6	Content and review of chemistry, manufacturing, and control(CMC) information for human gene therapy INDs	2008
7	Gene therapy clinical trials-observing subjects for delayed adverse events	2006
8	Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors	2006
9	Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy	1998

현재 미국 FDA에서 유전자치료제 관련 guideline은 품질 제조 관련된 것이 3개, 비임상 관련한 것이 7개, 임상 관련된 것이 6개 등으로 유전자 가위기술 적용 치료제에 구체적인 가이드라인은 없으나 품질관리, 비임상, 임상, 시판후 단계에서 참고할 수 있는 가이드라인들이 발간된 상황이다 (그림 18).

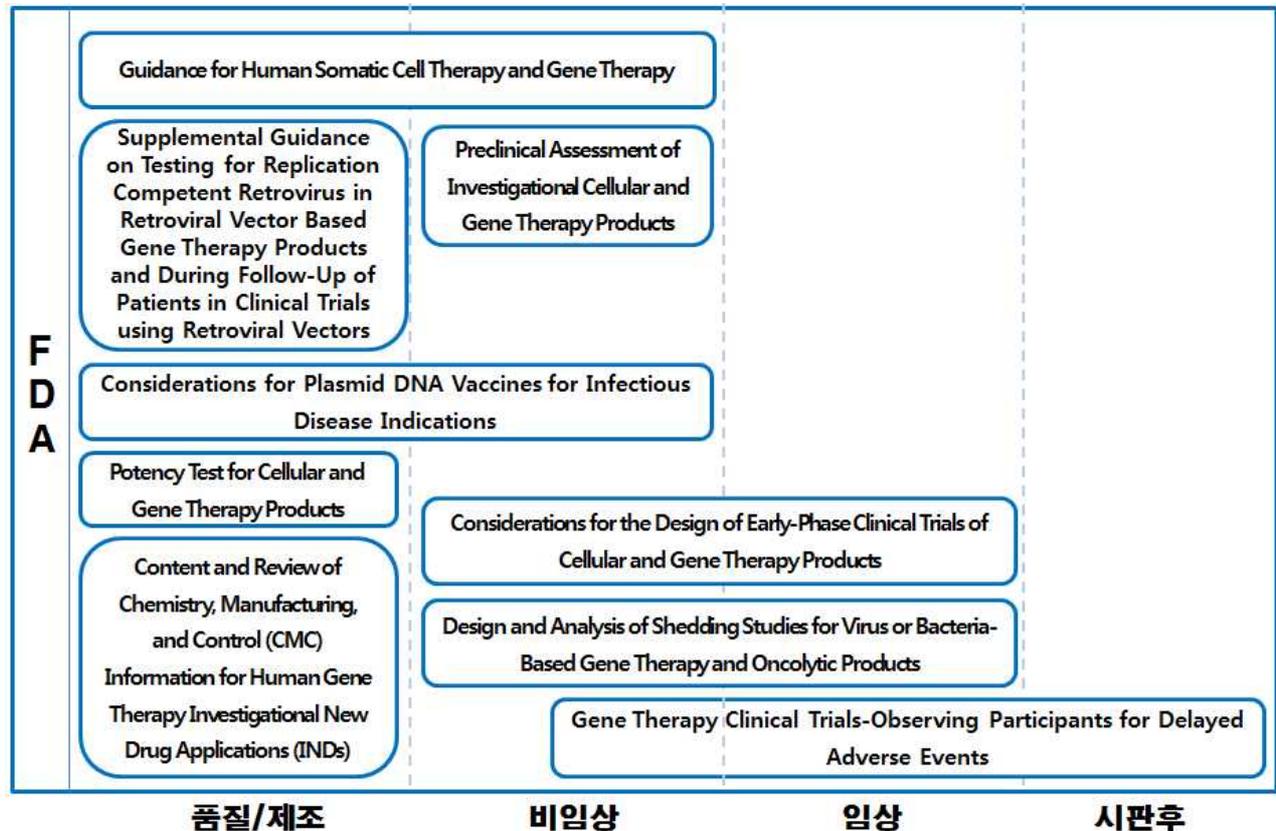


그림 18. 미국 FDA 유전자치료제 guideline map

현재 임상시험 및 비임상 연구 중인 유전자 가위기술 치료제의 경우 유전자 가위를 전달하기 위한 유전물질이 기존 유전자치료제와 크게 다르지 않기 때문에 품질관리 및 유효성 평가는 기존 유전자치료제의 현행 가이드라인의 맥락에서 고려될 수 있다. 미국 FDA 및 유럽 EMA에서 발행한 유전자치료제 관련 가이드라인은 (표 17)에 요약되어 있다. 유전자 가위기술 적용 치료제가 유전자의 이중 나선 구조를 절단하는 특징을 고려할 때, 안전성에 대한 고려는 향후 유전자 가위기술 적용 치료제의 임상 진입시 가장 중요하게 고려되어야 하는 항목이나 기존의 가이드라인들은 정상조직에서의 유전 독성 (off-target genotoxicity) 에 대해서는 별도의 지침이 없으며, 이 부분은 향후 규제과학적인 접근이 필요한 부분이라고 사료된다.

표 17. 미국 및 유럽의 유전자치료제 관련 가이드라인

연번	가이드라인 제목	규제기관	연도
1	Guidance for industry: FDA guidance for human somatic cell therapy and gene therapy	FDA	1998
2	Quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products	EMA	2001
3	Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors	EMA	2005
4	Guidance for industry: gene therapy clinical trials—observing participants for delayed adverse events	FDA	2006
5	Guidance for industry: supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors	FDA	2006
6	Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors	EMA	2007
7	Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer	EMA	2007
8	Guidance for FDA reviewers and sponsors: content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs)	FDA	2008
9	Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products	EMA	2008
10	Guideline on human cell-based medicinal products	EMA	2008
11	Guideline on safety and efficacy follow-up—risk management of advanced therapy medicinal products	EMA	2008
12	ICH consideration oncolytic viruses	EMA	2009
13	Follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products	EMA	2009
14	Quality, non-clinical and clinical issues relating specifically to recombinant adeno-associated viral vectors	EMA	2010
15	Guideline on the minimum quality and non-clinical data for certification of advanced therapy medicinal products	EMA	2010
16	Guidance for industry: potency test for cellular and gene therapy products	FDA	2011
17	Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells	EMA	2012
18	Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products	FDA	2013
19	Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products	EMA	2013
20	Management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis	EMA	2013
21	Guidance of industry: considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products	FDA	2015

4.3. 일본 및 중국의 유전자 가위기술의 관련 규제 현황

일본은 후생 노동성 산하 과학위원회의 「유전자 치료 임상연구에 관한 지침」과 「유전자치료제의 품질 및 안전성 확보에 관한 지침」 등을 참고하고, 일본에서 수행되는 유전자 가위기술 기반 치료제 관련 규제적 고려 사항에 대하여 조사하였다.

중국은 규제기관인 국가식품약품관리감독관리총국(China Food and Drug Administration)에서 발간된 인간 유전자 치료연구와 제제 품질관리기술 가이드라인 (人基因治療研究和制劑質量控制技術指導原則) 등을 참고하여 중국의 유전자치료제 관련 규제 현황 및 유전자 가위기술과 관련된 규제적 고려 사항들을 파악하였다.

유전자 가위기술 치료제는 유전자 교정의 형태, 전달체의 종류, 교정하는 세포등 다양한 인자들에 따라 위해성의 정도가 결정되므로, 유전자 가위기술 치료제의 위해성에 따라서 심사 자료의 제출 범위를 결정하는 것도 고려할 사항이라고 볼 수 있다. 일본의 경우 의약품의 위해도에 따라서 규제의 정도에 차이를 두는 것을 기본 정책으로 하고 있는 것으로 사료되며, 유전자 가위기술 기반 치료제에 대한 구체적인 가이드라인은 아직 발간되어 있지 않은 상황이다.

중국 CFDA에서는 바이러스성 벡터를 이용한 예방용 백신 제형화 기술의 가이드라인, 예방용 DNA 백신의 비임상 연구기술의 가이드라인, 인간 재조합 DNA 제품의 품질관리기술 가이드라인, 인간 유전자 치료 연구와 제품의 품질관리기술의 가이드라인, 인간 세포치료제 연구와 제품의 품질관리기술의 가이드라인 등의 품질관리, 안전성, 유효성에 대하여 필수적으로 수행되어야 할 실험을 제시하고 있다 (표 18).

표 18. 중국 CFDA의 유전자/세포치료제 관련 가이드라인

연번	제목	품질관리	안전성	유효성
1	預防用以病毒爲載體的活疫苗制劑的技術指導原則(Viral vector를 이용한 예방용 백신제형화기술의 가이드라인)	육안검사, 제품식별검사, 무균시험, 발열시험	약리학, 이상독성시험, 면역학 테스트	Viral vector 검출분석 - 역가, 형질도입유전자활성, 외인성 인자의 검출결과, 생물학적효능, 시험관내 효능시험
2	預防用DNA疫苗臨床前研究技術指導原則(예방용DNA 백신의 비임상연구기술의 가이드라인)	DNA벡터및숙주박테리아, 목적유전자분석 DNA백신의제조방법, 무균시험, 발열시험, 보안실험	약리학, 독성학 및 생체 분포	생물학적및면역원성효능 시험관내효능시험
3	人用重組DNA制品質量控制技術指導原則(Human recombinant DNA제품의 품질관리기술 가이드라인)	마스터 세포은행, 물리화학적 식별	불순물 시험, 발열원시험, 무균시험, 이상독성시험	

연번	제목	품질관리	안전성	유효성
4	人基因治療研究和制劑質量控制技術指導原則(Human gene therapy 연구와 제품의 품질관리기술의 가이드라인)	유전자 전달시스템 식별방법, 세포은행,	멸균시험, 이상독성시험, 독소검출, 면역학적 평가, 발암성연구, 독성평가	바이러스역가
5	人体細胞治療研究和制劑質量控制技術指導原則(Human cell therapy 연구와 제품의 품질관리기술의 가이드라인)	분석배지	체세포제제안 정성,독성시험, 발암성시험,	생물학적 효과

4.4. 우리나라의 유전자 가위기술의 관련 규제 현황

앞서 소개한 바와 같이, 미국 등의 국외 규제기관에서도 유전자 가위기술 적용 치료제에만 특별하게 적용이 가능한 규제나 가이드라인은 아직 제정되지 않은 것으로 확인된다(표 17). 대신, 기존의 세포치료제 또는 유전자치료제에 대한 가이드라인을 준용하여 비임상, 임상 연구가 진행되고 있는 것으로 조사되었다.

우리나라도, 유전자 가위기술 치료제에 맞춤형인 세부적인 가이드라인은 아직 마련 전이나, 기존의 유전자치료제에 준하여 유전자 가위기술 치료제에 대한 연구개발이 진행될 수 있으리라 사료된다. 현재 우리나라의 유전자치료제 개발에 적용 가능한 대표적인 가이드라인은 (그림 19)과 같다. 현재 국내는 일반적인 유전자치료제 자체에 대한 가이드라인들의 경우 대부분이 품질 관리의 영역에 집중되어 있으며, 구체적인 비임상, 임상 시험에 대한 가이드라인은 적은 것으로 파악된다(식약처 홈페이지(mfds.go.kr), [분야별정보→바이오(한약/화장품/의약외품)→바이오정부→바이오의약품정보→완료된 가이드라인] 참조).

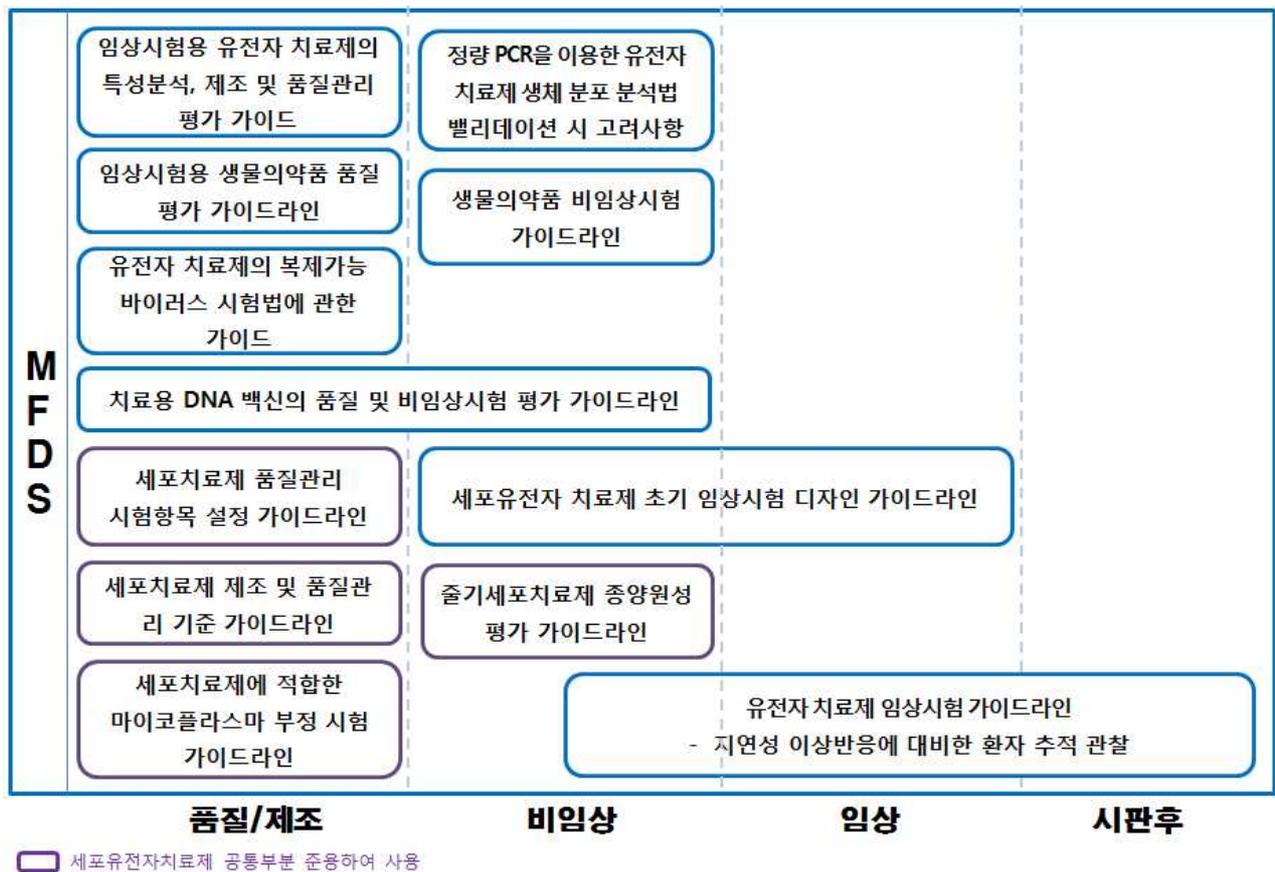
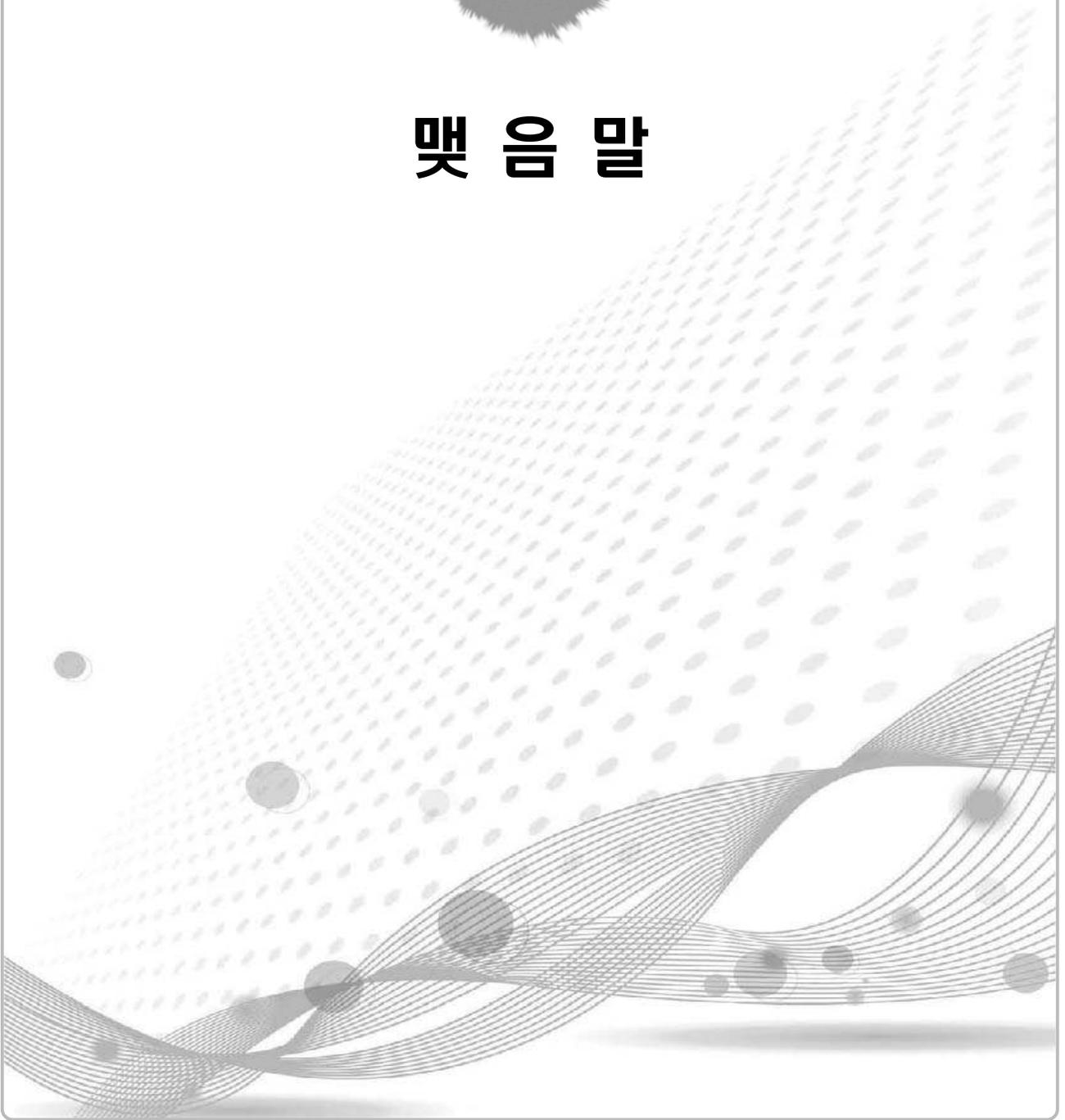


그림 19. 국내 유전자/세포치료제 관련 가이드라인

5

맺음말



5 맺음말

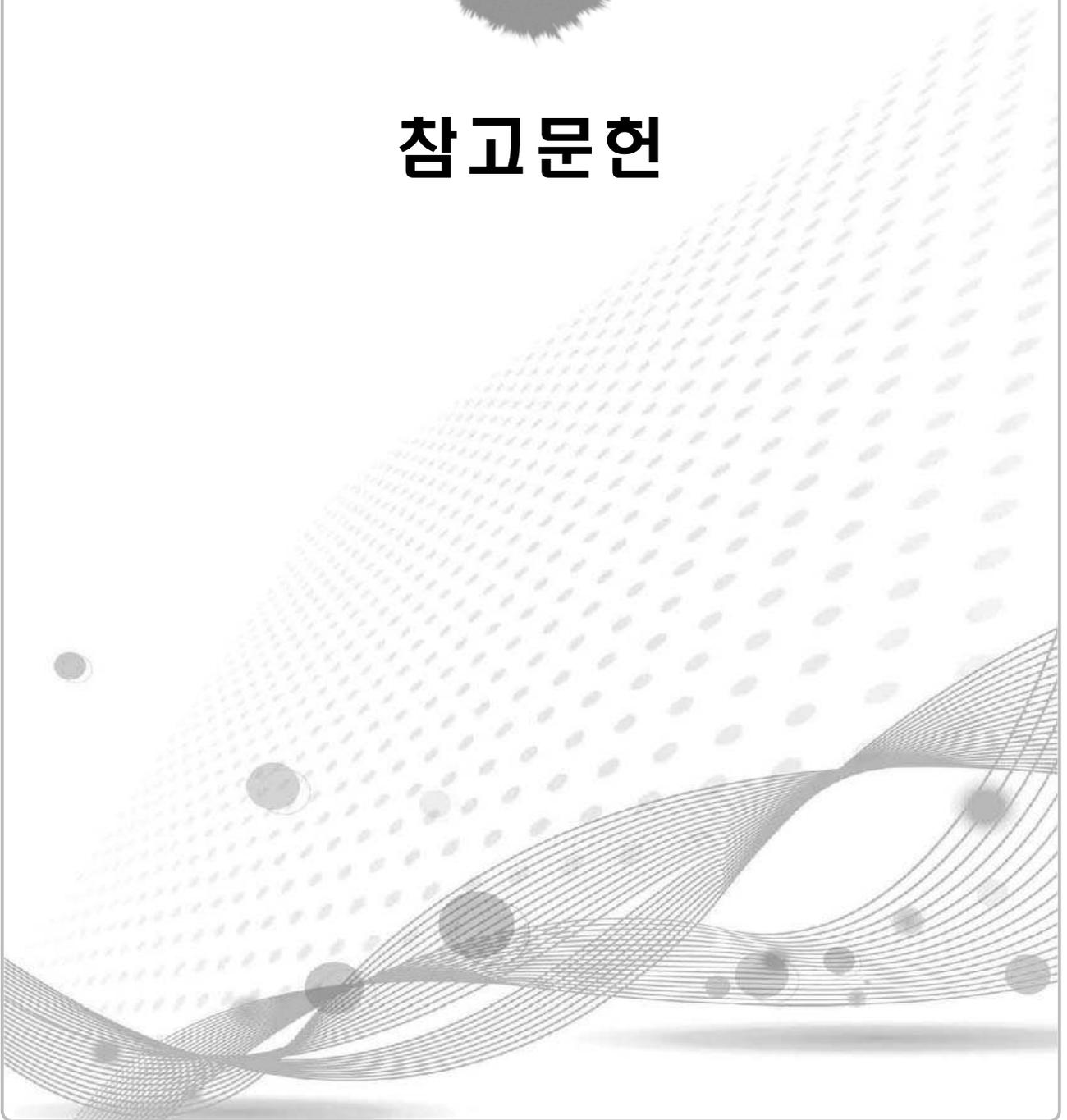
2012년 유럽 연합에서 유전자치료제가 승인된 이후, 국내 제약사들의 유전자치료제에 대한 관심도는 계속적으로 증가하고 있으며, 최첨단 유전자 가위기술을 이용한 관심도 지속적으로 확대될 것으로 예상하고 있다. 유전자 가위기술은 2017년 바이오 미래유망기술 중 6번째로 선정되었으며 근본적인 해결 방법이 없는 희귀 유전질환 등 치료 효율이 낮은 난치 질환에 대해 효과적인 치료법을 제공할 수 있으리라 기대되고 있다. 한국생명공학연구원의 보고서에 의하면, 2018년에는 해당 기술을 이용하여 감염성 질환에 대해 최초 유전자 가위기술 기반 치료제의 FDA 승인이 예상되며, 2023년까지는 감염성 질환 뿐만 아니라 암 등의 희귀난치성 질환 치료제로의 실용화가 가시화 될 것으로 예상되고 있다.

그러나 위와 같은 전망이 실현되기 위해서는 유전자편집 효율 개선 기술뿐만 아니라, Viral 벡터를 이용한 gene delivery 기술, 타겟을 인식하도록 하는 guide 물질(guide-RNA, -DNA 혹은 단백질)의 Off-target 조절기술, 교정된 세포의 선별 및 농축 기술 등 관련 기술의 발전도 필요할 것으로 사료된다. 다른 한편 세포치료제와 유전자치료제의 결합을 통한 ex vivo형 유전자세포치료제 개발 연구, 유전자 가위기술의 off-target 정도를 측정, 개선하여 치료제의 안전성을 확보하려는 연구도 활발히 진행되고 있다.

끝으로 국내에서도 관련 기술에 대한 국내·외 특허권을 확보한 연구그룹이 존재하는 만큼 이들의 연구를 뒷받침할 규제 기반 연구가 지속적으로 추진되어야 할 것으로 사료되며 유전자 가위기술에 대한 특허를 포함한 연구개발 현황, 각 국의 유전자 가위기술 적용 치료제에 대한 규제 동향 등의 정보를 담고 있는 본 보고서가 국내 관련 분야 연구자들에게 유용하게 활용되기를 기대한다.

6

참고문헌



6 참고문헌

1. Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, Miller JC, Li H, Haurigot V, et al. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* 2013;122:3283-7.
2. Araki M, Ishii T. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:1.
3. Araki M, Ishii T. Providing appropriate risk information on genome editing for patients. *Trends Biotechnol* 2016;34:86-90.
4. Badia R, Riveira-Muñoz E, Clotet B, Esté JA, Ballana E. Gene editing using a zinc-finger nuclease mimicking the CCR5Δ32 mutation induces resistance to CCR5-using HIV-1. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1755-9.
5. Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, et al. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334TER-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2016;24:556-63.
6. Benabdallah BF, Duval A, Rousseau J, Chapdelaine P, Holmes MC, Haddad E, et al. Targeted gene addition of microdystrophin in mice skeletal muscle via human myoblast transplantation. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;2:e68.
7. Boglioli E and Richard M, *Rewriting The Book Of Life: A New Era in Precision Gene Editing*, Boston Consulting Group, 2015.
8. Butler JR, Wang Z-Y, Martens GR, Ladowski JM, Li P, Tector M, et al. Modified glycan models of pig-to-human xenotransplantation do not enhance the human-anti-pig T cell response. *Transpl Immunol* 2016;35:47-51.
9. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae SB et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 2014;24:132 - 41.
10. Chou YY, Krupp A, Kaynor C, Gaudin R, Ma M, Cahir-McFarland E, et al. Inhibition of JCPyV infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 2016;6. (In press)
11. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. *Nat Med* 2015;21:121-31.

12. Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010;18:947-54.
13. Dai WJ, Zhu LY, Yan ZY, Xu Y, Wang QL, Lu XJ. CRISPR-Cas9 for in vivo gene therapy: promise and hurdles. *Mol Ther Nucleic Acid* 2016;5:349.
14. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* 2016;539(7629):384-389.
15. DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, Li L, Rao A, Wang J, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther. Methods & Clinical Development* 2016;3:16067.
16. Ding W, Hu Z, Zhu D, Jiang X, Yu L, Wang X, et al. Zinc finger nucleases targeting the human papillomavirus E7 oncogene induce E7 disruption and a transformed phenotype in HPV16/18-positive cervical cancer cells. *Clin Cancer Res* 2014;20:6495-503.
17. Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res* 2015;118:110-7.
18. Dreyer A-K, Hoffmann D, Lachmann N, Ackermann M, Steinemann D, Timm B, et al. TALEN-mediated functional correction of X-linked chronic granulomatous disease in patient-derived induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2015;69:191-200.
19. Dreyer T, Nicholson S, Ely A, Arbuthnot P, & Bloom K. Improved antiviral efficacy using TALEN-mediated homology directed recombination to introduce artificial primary miRNAs into DNA of hepatitis B virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016;478(4):1563-1568.
20. Egelie KJ, Graff GD, Strand SP, Johansen B. The emerging patent landscape of CRISPR-Cas gene editing technology. *Nat Biotechnol* 2016;34(10):1025-1031.
21. Fadel HJ, Morrison JH, Saenz DT, Fuchs JR, Kvaratskhelia M, Ekker SC, et al. TALEN knockout of the *psip1* gene in human cells: Analyses of HIV-1 replication and allosteric integrase inhibitor mechanism. *J Virol* 2014;88:9704-17.
22. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell reports* 2015;12:1385-90.

23. Gaj T, Guo J, Kato Y, Sirk SJ, Barbas III CF. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat Methods* 2012;9:805 - 7.
24. Gao Y, Guo X, Santostefano K, Wang Y, Reid T, Zeng D, et al. Genome therapy of myotonic dystrophy type 1 iPS cells for development of autologous stem cell therapy. *Mol Ther* 2016;24:1378-87.
25. Garate Z, Quintana-Bustamante O, Crane AM, Olivier E, Poirot L, Galetto R, et al. Generation of a high number of healthy erythroid cells from gene-edited pyruvate kinase deficiency patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2015;5:1053-66.
26. Glaser A, McColl B and Vadolas J. The therapeutic potential of genome editing for β -thalassemia. *F1000Research* 2015, 1431.
27. Hareendran S, Balakrishnan B, Sen D, Kumar S, Srivastava A, Jayandharan GR. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev Med Virol* 2013;23:399-413.
28. Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *BioMed research international* 2014;2014:612823
29. Hu Z, Ding W, Zhu D, Yu L, Jiang X, Wang X, et al. TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. *J Clin Invest* 2015;125:425-36.
30. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 2015;125:2597-604.
31. Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, et al. Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* 2010;28:839-47.
32. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/Cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep* 2015;5:15577.
33. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, et al. Elimination of HIV-1 genomes from human t-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci Rep* 2016;6
34. Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman HE, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene ther* 2016; (In press)

35. Karimova M, Beschorner N, Dammermann W, Chemnitz J, Indenbirken D, Bockmann J-H, et al. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep* 2015;5:13734.
36. Kim, D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods* 2015;12:237 - 43.
37. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 2014;24:1012 - 19.
38. Kim, D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods* 2015;12:237 - 43.
39. Kim B-Y, Jeong S, Lee S-Y, Lee SM, Gweon EJ, Ahn H, et al. Concurrent progress of reprogramming and gene correction to overcome therapeutic limitation of mutant ALK2-iPSC. *Exp Mol Med* 2016;48:e237.
40. Kishida T, Ejima A, Mazda O. Specific destruction of HIV proviral p17 gene in T lymphoid cells achieved by the genome editing technology. *Front Microbiol* 2016;7:1001.
41. Landau DJ, Brooks ED, Perez-Pinera P, Amarasekara H, Mefferd A, Li S, et al. In vivo zinc finger nuclease-mediated targeted integration of a glucose-6-phosphatase transgene promotes survival in mice with glycogen storage disease type IA. *Mol Ther* 2016;24:697-706.
42. Latella MC, Di Salvo MT, Cocchiarella F, Benati D, Grisendi G, Comitato A, et al. In vivo Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-based CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2016;5(11):e389.
43. Lee CM, Flynn R, Hollywood JA, Scallan MF, Harrison PT. Correction of the $\delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by zinc-finger nuclease homology-directed repair. *Biores Open Access* 2012;1:99-108.
44. Li L, Krymskaya L, Wang J, Henley J, Rao A, Cao L-F, et al. Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases. *Mol Ther* 2013;21:1259-69.
45. Li C, Guan X, Du T, Jin W, Wu B, Liu Y, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J Gen Virol* 2015;96:2381-93.

46. Li C, Ding L, Sun C-W, Wu L-C, Zhou D, Pawlik KM, et al. Novel HDAD/EBV reprogramming vector and highly efficient ad/CRISPR-Cas sickle cell disease gene correction. *Sci Rep* 2016;6:30422.
47. Li M, Zhao H, Ananiev GE, Musser MT, Ness KH, Maglaque DL, et al. Establishment of reporter lines for detecting fragile X mental retardation (FMR1) gene reactivation in human neural cells. *Stem Cells* 2016. doi: 10.1002/stem.2463.
48. Li H, Sheng C, Liu H, Liu G, Du X, Du J, et al. An Effective Molecular Target Site in Hepatitis B Virus S Gene for Cas9 Cleavage and Mutational Inactivation. *Int J Biol Sci* 2016;12(9):1104.
49. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes *Protein Cell* 2015;6(5):363-372.ll.
50. Liao H, Xiao Y, Hu Y, Xiao Y, Yin Z, Liu L. Suppression of cellular proliferation and invasion by HMGB1 knockdown in bladder urothelial carcinoma cells. *Oncol Res* 2015;22:235-45.
51. Lin C, Li H, Hao M, Xiong D, Luo Y, Huang C, et al. Increasing the Efficiency of CRISPR/Cas9-mediated Precise Genome Editing of HSV-1 Virus in Human Cells. *Sci Rep* 2016;6. (In press)
52. Liu J, Gaj T, Patterson JT, Sirk SJ, Barbas Iii CF. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS ONE* 2014; 9:e85755.
53. Liu T, Li Z, Zhang Q, De Amorim BK, Lozano-Calderon S, Choy E, et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* 2016 (In press)
54. Ma N, Liao B, Zhang H, Wang L, Shan Y, Xue Y, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free β -thalassemia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2013;288:34671-9.
55. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu J, Chen X, Mouly V, et al. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: Rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res* 2016;44:1449-70.
56. Maggio I, Liu J, Janssen JM, Chen X & Gonçalves MA. Adenoviral vectors encoding CRISPR/Cas9 multiplexes rescue dystrophin synthesis in unselected populations of DMD muscle cells. *Sci Rep* 2016;6 (In press)

57. Manotham K, Chattong S, Setpakdee A. Generation of CCR5-defective CD34 cells from ZFN-driven stop codon-integrated mesenchymal stem cell clones. *J Biomed Sci* 2015;22:1.
58. Market and Market research report, Genome Editing/Genome Engineering Market by Application (Cell Line Engineering, Animal & Plant Genetic Engineering), Technology (CRISPR, Antisense, TALEN, Zinc Finger Nuclease), & End User (Biotechnology & Pharmaceutical, CRO)–Global Forecast to 2019”, 2015.
59. Merling RK, Sweeney CL, Chu J, Bodansky A, Choi U, Priel DL, et al. An AAVS1-targeted minigene platform for correction of iPSCs from all five types of chronic granulomatous disease. *Mol Ther* 2015;23:147–57.
60. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 2011;11:321–30.
61. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122:23 - 36.
62. Mianné J, Chessum L, Kumar S, Aguilar C, Codner G, Hutchison M, et al. Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair. *Genome Med* 2016;8:16.
63. Mock U, Machowicz R, Hauber I, Horn S, Abramowski P, Berdien B, et al. MRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucleic Acids Res* 2015:gkv469.
64. Murlidharan G, Sakamoto K, Rao L, Corriher T, Wang D, Gao G, et al. CNS-restricted transduction and CRISPR/Cas9-mediated gene deletion with an engineered AAV vector. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016;5:e338.
65. Niu X, He W, Song B, Ou Z, Fan D, Chen Y, et al. Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in beta-thalassemia-induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.719237.
66. Nyquist MD, Li Y, Hwang TH, Manlove LS, Vessella RL, Silverstein KA, et al. TALEN-engineered AR gene rearrangements reveal endocrine uncoupling of androgen receptor in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17492–7.
67. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, et al. Correction of dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther* 2015;23:523–32.

68. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther* 2013;21:1151-9.
69. Osborn MJ, Gabriel R, Webber BR, DeFeo AP, McElroy AN, Jarjour J, et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. *Hum Gene Ther* 2014;26:114-26.
70. Osborn MJ, Lonetree CL, Webber BR, Patel D, Dunmire S, DeFeo AP, et al. CRISPR/Cas9 Targeted Gene Editing and Cellular Engineering in Fanconi Anemia. *Stem cells dev* 2016;25(20):1591-1603.
71. Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, Betzen C, Hoffmann GF, Hoheisel JD, et al. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. *Sci Rep* 2016;6 (In press)
72. Park C-Y, Kim J, Kweon J, Son JS, Lee JS, Yoo J-E, et al. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:9253-8.
73. Park C-Y, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional correction of large factor viii gene chromosomal inversions in hemophilia a patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2015;17:213-20.
74. Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Bloor J, Gopalappa R, Lee S-K, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res* 2014;24:1020 - 7.
75. Roehm PC, Shekarabi M, Wollebo HS, Bellizzi A, He L, Salkind J, et al. Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy. *Sci Rep* 2016;6:23146.
76. Sakuma T, Masaki K, Abe Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. Highly multiplexed CRISPR Cas9 nuclease and Cas9 nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells* 2016;21(11):1253-1262.
77. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 2011;29:1717-26.
78. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* 2014;11:399 - 402.
79. Shin MH, He Y, Marrogi E, Piperdi S, Ren L, Khanna C, et al. A RUNX2-mediated epigenetic regulation of the survival of p53 defective cancer cells. *PLoS Genet* 2016;12:e1005884.

80. Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep* 2016;6:20070.
81. Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst* 2012;8:1255-63.
82. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 2016;351:407-11.
83. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-58.
84. Tsai, SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 2015;33:187 - 97.
85. Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, Yip BH, Bello E, Gordon S, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* 2015;6:44061.
86. Wang M, Zuris JA, Meng F, Rees H, Sun S, Deng P, et al. Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:2868-73.
87. Wu B, Jiang WG, Zhou D, Cui Y-X. Knockdown of EPHA1 by CRISPR/Cas9 promotes adhesion and motility of HRT18 colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res* 2016;36:1211-9.
88. Xie C, Zhang YP, Song L, Luo J, Qi W, Hu J, et al. Genome editing with CRISPR/Cas9 in postnatal mice corrects PRKAG2 cardiac syndrome. *Cell Res* 2016; (in press)
89. Xu L, Park KH, Zhao L, Xu J, El Refaey M, Gao Y, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in MDX mice. *Mol Ther* 2016;24:564-9.
90. Xue H-Y, Zhang X, Wang Y, Xiaojie L, Dai W-J, Xu Y. In vivo gene therapy potentials of CRISPR-Cas9. *Gene Ther* 2016;23:557-9.
91. Yang Y, Wang L, Bell P, McMenemy D, He Z, White J, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol* 2016;34:334-338.
92. Yang Y, Qiu JG, Li Y, Di JM, Zhang WJ, Jiang QW, et al. Targeting ABCB1-mediated tumor multidrug resistance by CRISPR/Cas9-based genome editing. *Am. J. Transl. Res* 2016;8(9):3986.

93. Yao Y, Nashun B, Zhou T, Qin L, Qin L, Zhao S, et al. Generation of CD34⁺ cells from CCR5-disrupted human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Gene Ther* 2011;23:238-42.
94. Yin H, Song C-Q, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol* 2016;34:328-33.
95. Yin C, Zhang T, Li F, Yang F, Putatunda R, Young W-B, et al. Functional screening of guide RNAs targeting the regulatory and structural HIV-1 viral genome for a cure of AIDS. *AIDS* 2016;30:1163-74.
96. Yiu G, Tieu E, Nguyen AT, Wong B, Smit-McBride Z. Genomic Disruption of VEGF-A Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using CRISPR-Cas9 Endonuclease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., IOVS* 2016;57(13):5490-5497.
97. Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, Nakano H, Jan M, Younesi S, et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell* 2016;18:533-40.
98. Yuan J, Wang J, Crain K, Fearn C, Kim KA, Hua KL, et al. Zinc-finger nuclease editing of human CXCR4 promotes HIV-1 CD4⁺T cell resistance and enrichment. *Mol Ther* 2012;20:849-59.
99. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759-71.
100. Zhu W, Xie K, Xu Y, Wang L, Chen K, Zhang L, et al. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res* 2016;217:125-32.
101. Gaj T, Sirk SJ, Shui SL, Liu J. *Genome-Editing Technologies: Principles and Applications*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Dec 1;8(12).

유전자 가위기술 연구개발 동향 보고서

발행 일 : 2017년 5월 24일

발행 인 : 식품의약품안전평가원장 손여원

편집위원장 : 의료제품연구부장 서경원

편집위원 : 첨단바이오제품과

안치영, 엄준호, 박기대, 백정희, 김호, 허지연

서울대학교 약학대학

오유경, 김동윤

자문위원 : 세포유전자치료제과

정지원, 김지현, 최경숙, 박송희, 이소영

충북보건과학대학교

박기량

발행부서 : 식품의약품안전평가원 첨단바이오제품과

연락처 : 식품의약품안전평가원 첨단바이오제품과

전화번호 : 043) 719-4751~7

팩스번호 : 043) 719-4750