(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0174966
(43) 공개일자 2024년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) *C12N 15/85* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2024.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0074425
(22) 출원일자 2023년06월09일
심사청구일자 2023년06월09일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이주용
서울 서초구 신반포로 267, 340동 702호 (잠원동, 신반포21차 아파트)
김윤전
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 12동 406호(신천동, 장미아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

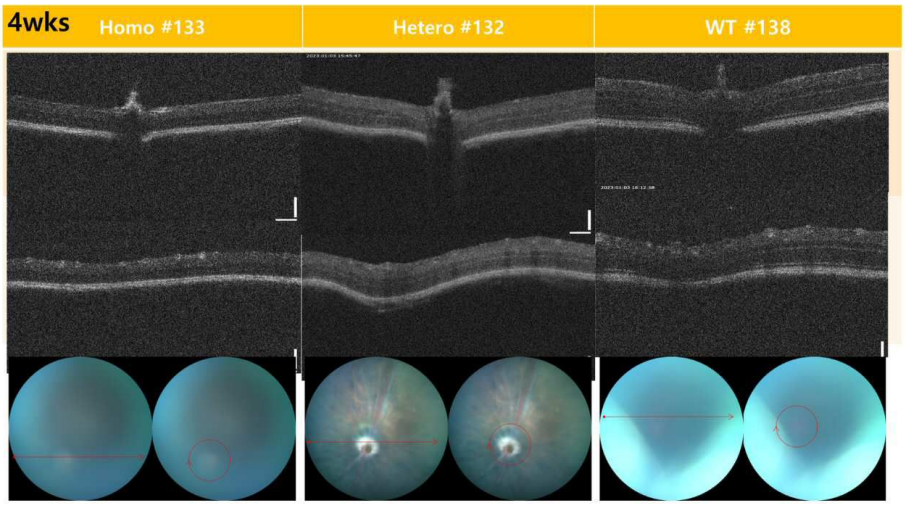
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **IMPDH1 유전자 변이를 갖는 망막 변성 동물 모델 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 IMPDH1 유전자 변이를 갖는 망막 변성 마우스 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRISPR-Cas9 시스템 하에 ssODN를 사용하여 염기 치환을 유도하여 제조된 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 망막 변성 동물 모델 및 이의 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도6a



(52) CPC특허분류
G01N 33/5088 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0306 (2013.01)
C12N 2015/8536 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자
성영훈
서울특별시 강북구 도봉로47길 26, 401호(미아동, 오봉예체뜰안)

백인정
서울특별시 은평구 은평터널로 65, 108동 103호(수색동, 대림한숲타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465038665
과제번호	HI21C1692010023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	공익적 의료기술연구사업
연구과제명	망막색소변성에서 첨단재생바이오 치료제 개발 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제조 방법은:

i) Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA(guide RNA) 및 동물의 게놈의 IMPDH1 유전자에 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위의 염기서열의 녹인(knockin)을 유도하기 위한 단일가닥 올리고 DNA 뉴클레오타이드(single-stranded oligo DNA nucleotide, ssODN)를 동물의 수정란에 주입하는 단계;

ii) 상기 수정란을 대리모에 이식하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 포함하는 생식계열 세포를 포함하는 동물을 수득하는 단계; 및

iii) 상기 ii) 단계에서 수득한 동물을 야생형 동물과 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체로 포함하는 동물을 수득하는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 동물 및 대리모는 인간을 제외한 동물인, 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 i) 단계의 gRNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 gRNA와 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 gRNA를 포함하는, 제조 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 i) 단계의 ssODN는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 안티센스 ssODN인, 제조 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 제조 방법은: iv) 상기 iii) 단계에서 수득한 인간을 제외한 동물을 한배 새끼(littermate)와 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 동형접합체로 포함하는 인간을 제외한 망막 변성 동물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제조 방법은: v) 상기 iii) 단계 또는 iv) 단계에서 수득한 인간을 제외한 동물을, 게놈이 야생형 Crb1 유전자를 포함하는 인간을 제외한 동물과 교배하여, 게놈이 야생형 Crb1 유전자에 대해 동형접합체 또는 이형접합체를 포함하는 인간을 제외한 동물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 인간을 제외한 망막 변성 동물은 설치류인, 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는, 제조 방법.

청구항 9

제1항의 제조 방법으로 제조되는, IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 상기 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체 또는 동형접합체로 포함하는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 설치류인, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타내는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델.

청구항 14

제9항의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델을 이용한, 망막 변성의 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 스크리닝 방법은:

a) 제1항의 제조 방법으로 제조되는, IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된, 인간을 제외한 망막 변성 동물에서 망막 변성이 일어나지 전 또는 후에 후보 약물을 투여하는 단계; 및

b) 상기 후보 약물이 투여되지 않은 대조군과 비교하여, 상기 후보 약물이 망막 변성의 발병을 예방하거나, 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 a) 단계의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타내는, 스크리닝 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 a) 단계의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는, 스크리닝 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 단계 b)의 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계는, 상기 약물이 망막 혈관 형태의 개선, 망막 단층 두께의 증가, 망막 전위도의 증가 및 망막 조직 내 세포수 증가로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내는지 확인함으로써 결정되는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IMPDH1 유전자 변이를 갖는 망막 변성 마우스 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRISPR-Cas9 시스템 하에 ssODN를 사용하여 염기 치환을 유도하여 제조된 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 망막 변성 동물 모델 및 이의 제조방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 망막 변성은 시세포의 변성으로 시력이 저하되어 결국 실명되는 질환으로, 아직 효과적인 치료법이 없다. 유전성 망막 변성, 망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP) 등 망막의 시세포가 손상되어 실명에 이르는 환자들의 치료를 위하여 개발되는 유전자 치료, 줄기세포 치료, 나아가 인공 망막 등 여러 치료법을 적용하기 위해서는 망막 변성 질환을 가진 실험동물의 개발이 필수적이다.

[0003] CRISPR-Cas9 게놈 편집은 다양한 분야에서 가능성을 가지고 있다. 단일가닥 DNA 올리고뉴크레오타이드(single-stranded oligo DNA nucleotide, ssODN)를 사용하는 단일 염기 치환은 약물 발굴 및 질병의 설명을 위한 인간 질병 모델을 생성하기 위해 질병 관련 돌연변이를 도입 및/또는 수정하는 데 사용할 수 있다. CRISPR-Cas9 시스템에 의한 표적 이중가닥 절단(targeted double-stranded break, DSB) 후, 게놈은 일반적으로 NHEJ(non-homologous end-joining)에 의해 복구되어 삽입 및 삭제(Indels)에 의한 유전자 넉아웃(knock-out)을 유도한다. 유전자 넉인(knock-in)과 정확한 돌연변이 도입은 공여자(donor) DNA 주형을 사용하는 HDR(homology-directed repair)에 의해 달성될 수 있지만, 일반적으로 효율성이 매우 낮아 임상 적용을 위한 기술의 개발을 방해한다. 약물 내성 유전자가 포함된 긴 공여자 DNA 주형을 사용하는 긴 DNA 넉인의 경우 HDR 효율이 낮은 경우에도 약물 선택을 통해 올바르게 편집된 세포를 농축할 수 있다. 그러나, ssODN을 공여자 주형으로 사용하는 경우, 올바르게 편집된 세포를 농축할 수 없기 때문에 단일 염기 치환의 도입 효율이 매우 낮은 경향이 있으며, 원하는 돌연변이를 가진 편집된 클론을 얻기가 어려운 면이 있다.

[0004] 이러한 유전자 가위를 이용하여 망막 변성 동물 모델을 제조하는 기술에 대하여 다양한 사례가 보고된 바 있으며, 구체적으로, 특허문헌 1에는 CRISPR-Cpf1 유전자 가위를 이용해 pde6b 유전자의 결손을 유도하여 제조된 망막 변성 랫드(rat) 동물 모델이 개시되어 있다. 그러나, 특허문헌 1에 개시된 망막 변성 랫드 동물 모델은 CRISPR-Cpf1 유전자 가위 기술을 통해 pde6b 유전자 기능을 넉아웃시킨 것으로, CRISPR-Cas9 시스템 하에 ssODN를 사용하여 특정 염기의 치환을 유도하여 제조된 망막 변성 동물 모델은 개시된 바 없다.

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 ssODN을 공여자 주형으로 사용하여 HDR을 통해 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 동물 모델을 제조하고, 상기 동물 모델이 동형접합 돌연변이뿐만 아니라 이형접합 돌연변이에서도 유의적인 망막 변성 소견을 나타내어, 막망 변성에 의한 안과 질환의 동물 모델로서 사용 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0132069호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 IMPDH1 유전자 변형을 통해, 인간 망막 변성 질환 표현형을 보이는 유전자 조작 동물 모델 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 조작 동물 모델을 이용한 망막 변성 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 제조 방법은 다음의 i) 내지 iii) 단계를 포함할 수 있다:

[0011] i) Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA(guide RNA) 및 동물의 게놈의 IMPDH1 유전자에 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위의 염기서열의 녹인(knockin)을 유도하기 위한 단일가닥 올리고 DNA 뉴클레오타이드(single-stranded oligo DNA nucleotide, ssODN)를 동물의 수정란에 주입하는 단계;

[0012] ii) 상기 수정란을 대리모에 이식하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 포함하는 생식계열 세포를 포함하는 동물을 수득하는 단계; 및

[0013] iii) 상기 ii) 단계에서 수득한 동물을 야생형 동물과 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체로 포함하는 동물을 수득하는 단계.

[0014] 이때, 상기 동물 및 대리모는 인간을 제외한 동물일 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계의 gRNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 gRNA와 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 gRNA를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계의 ssODN는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 안티센스 ssODN일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 제조 방법은: iv) 상기 iii) 단계에서 수득한 인간을 제외한 동물을 한배 새끼(littermate)와 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 동형접합체로 포함하는 인간을 제외한 동물을 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 제조 방법은: v) 상기 iii) 단계 또는 iv) 단계에서 수득한 인간을 제외한 동물을, 게놈이 야생형 Crb1 유전자를 포함하는 인간을 제외한 동물과 교배하여, 게놈이 야생형 Crb1 유전자에 대해 동형접합체 또는 이형접합체를 포함하는 인간을 제외한 동물을 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 설치류일 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타낼 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 전술한 제조 방법으로 제조되는, IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델을 제공한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 상기 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체 또는 동형접합체로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 설치류일 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타낼 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타낼 수 있다.

[0026] 추가로, 본 발명은 전술한 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델을 이용한, 망막 변성의 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 다음의 a) 및 b) 단계를 포함할 수 있다:

[0028] a) 전술한 제조 방법으로 제조되는, IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델에 후보 약물을 투여하는 단계; 및

[0029] b) 상기 후보 약물이 투여되지 않은 대조군과 비교하여, 상기 후보 약물이 망막 변성의 발병을 예방하거나, 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타낼 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타낼 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 b) 단계의 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계는, 상기 약물이 망막 혈관 형태의 개선, 망막 단층 두께의 증가, 망막 전위도의 증가 및 망막 조직 내 세포수 증가로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내는지 확인함으로써 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 망막 변성 동물 모델은 인간에서 상염색체 우성 패턴으로 유전되는 망막색소변성 유발 유전자인 IMPDH1에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하여, 인간 환자에서 보이는 망막 변성 질환의 표현형을 동물 모델에 발현시켰는 바, 해당 질환의 병태 생리 연구 및 신약 발굴에 있어서 약물의 효과와 안전성을 확인하는 데 효과적으로 활용될 수 있다. 나아가, 환자에게서 발견되는 IMPDH1 유전자의 돌연변이는 상염색체 우성 패턴으로 유전되나, 아직까지 이를 재현하는 동물모델은 확립되지 않았다. 본 발명에 따른 새로운 IMPDH1-R316P 마우스 모델은 동형접합뿐만 아니라 이형접합에서도 망막 변성 표현형을 나타낼 수 있는 이점이 있으며, 생후 4주령부터 IMPDH1 관련 망막 변성 환자의 임상적 소견을 재현할 수 있다는 점에서 기존의 다른 망막 변성 동물 모델과 차별성을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 인간의 IMPDH1 단백질에서 R316 아미노산이 프롤린(P)으로 변경된 돌연변이(IMPDH1-R316P)를 갖는 인간화 IMPDH1-R316P 마우스 모델 제작을 위한 설계 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 CRISPR-Cas9을 이용하여, 도 1의 C에서 빨간색으로 표시된 염기 변이를 마우스 게놈에 삽입하기 위한 2개의 sgRNA 선정 과정을 나타낸 것이다.

도 3a 및 3b는 CRISPR-Cas9을 이용하여 제조된 IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스의 시퀀싱 결과를 나타낸 것으로, 도 3a는 IMPDH1-R316P 돌연변이 파운더(founder, F_0) 마우스의 시퀀싱 결과, 도 3b는 IMPDH1-R316P 돌연변이 파운더 마우스를 야생형 마우스와 교배하여 제조된 후손(F_1) 마우스의 시퀀싱 결과를 보여준다.

도 4는 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 후손(F_1) 마우스를 야생형 Crb1 유전자를 보유하고 있는 C57BL/6J(B6J) 마우스와 교배하여 제조된 마우스의 Crb1 유전자 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 5a 내지 5c는 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 후손(F_1 또는 F_2) 마우스를 야생형 Crb1 유전자를 보유하고 있는 C57BL/6J(B6J) 마우스와 교배한 후 수득된 마우스 중에서, 야생형 Crb1 유전자에 대해 동형접합체(homozygote) 또는 이형접합체(heterozygote)를 나타내는 것으로 확인된 마우스를 대상으로 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 5a와 5b는 IMPDH1-R316P 돌연변이 유전자의 PCR 산물을 열 변성/재생을 통해 헤테로듀플렉스 형성(heteroduplex formation) 후 폴리아크릴아마이드 겔 전기천공(polyacrylamide gel electroporation, PAGE)을 수행한 결과이며, 이때, 도 5a는 각 마우스에서 얻어진 게놈 DNA만을 사용하였고, 도 5b는 도 5a의 각 마우스에서 얻어진 게놈 DNA에 WT B6J 게놈 DNA를 혼합하여 IMPDH1 유전자의 유전형 분석을 위한 PCR 주형으로 사용하였다. 도 5c는 WT B6J 게놈 DNA를 혼합하지 않고 PCR를 수행한 후 IMPDH1 유전자에 대한 시퀀싱 결과를 나타낸다.

도 6a 내지 6e는 생후 4 주, 8 주, 10 주 및 16 주째에 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이 마우스, IMPDH1-R316P 이형접합 돌연변이 마우스 및 야생형 마우스의 표현형을 확인한 결과로, 도 6a 내지 6d는 각각 순서대로 생후 4주, 8주, 10주 및 16주째에 촬영한 안저 촬영 영상을 나타낸 것이고, 도 6e는 생후 4 주, 8 주, 10 주 및 16 주째에 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이 마우스, IMPDH1-R316P 이형접합 돌연변이 마우스 및 야생형 마우스의 망막 두께를 비교한 것이다.

도 7a 내지 7c는 순서대로 생후 8 주째에 IMPDH1-R316P 이형접합 돌연변이 마우스, IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이 마우스 및 야생형 마우스의 망막 전위도 검사 결과를 나타낸 것이다.

도 8a 내지 8c는 레버 선천성 흑암시(Leber Congenital Amaurosis, LCA)를 진단받은 환자의 표현형을 확인한 결과로, 도 8a는 안저 촬영 영상을 나타낸 것이고, 도 8b 및 8c는 망막 전위도 검사 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.

[0037] 상술한 바와 같이, 유전자 가위를 이용하여 망막 변성 동물 모델을 제조하는 기술에 대하여 다양한 사례가 보고

된 바 있으나, CRISPR-Cas9 시스템 하에 ssODN를 사용하여 특정 염기의 치환을 유도하여 제조된 망막 변성 동물 모델은 개시된 바 없다.

[0038] 이에, 본 발명자들은 ssODN을 공여자 주형으로 사용하여 HDR을 통해 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이를 갖는 동물 모델을 성공적으로 제조하고, 상기 동물 모델이 동형접합 돌연변이뿐만 아니라 이형접합 돌연변이에서도 유의적인 망막 변성 소견을 나타내어, 망막 변성에 의한 안과 질환의 동물 모델로서 사용 가능함을 확인하였다.

[0040] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.

[0041] IMPDH1(inosine monophosphate dehydrogenase 1) 유전자에 의해 암호화된 단백질은 세포 성장을 조절하는 동종사량체(homotetramer) 역할을 한다. 암호화된 단백질은 이노신-5'-모노포스페이트(inosine-5'-monophosphate, IMP)로부터 크산틴 모노포스페이트(xanthine monophosphate, XMP)의 합성을 촉매하는 효소이며, 이는 구아닌 뉴클레오타이드의 de novo 합성에서 속도 제한 단계이다. IMPDH1 유전자의 결함은 망막색소변성 유형 10(retinitis pigmentosa type 10, RP10)의 원인이다.

[0042] 본 발명자들은 인간 망막색소변성 환자의 IMPDH1 단백질에 R316P 돌연변이가 있음을 확인하였는 바, 이에 상응하는 돌연변이를 동물 모델에서 유도하기 위해 인간 및 인간을 제외한 다른 포유류(예를 들어, 개, 말, 고양이, 소, 래트, 마우스, 원숭이 등)의 IMPDH1 유전자 서열을 비교할 수 있다.

[0043] 인간 및 인간을 제외한 다른 동물의 IMPDH1 유전자의 구체적인 염기서열 및 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 아미노산 서열 정보는 공지의 데이터베이스인 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank 등에서 확인할 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서, 인간 IMPDH1 유전자의 mRNA는 NCBI Reference Sequence: NM_000883.3 또는 NM_000883.4의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있으나, 실질적으로 상기 유전자와 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 뉴클레오타이드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 인간 IMPDH1 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000874.2의 아미노사 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 인간 IMPDH1 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서, 마우스 IMPDH1 유전자의 mRNA는 NCBI Reference Sequence: NM_011829.3의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있으나, 실질적으로 상기 유전자와 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 뉴클레오타이드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 마우스 IMPDH1 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_035959.2의 아미노사 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 마우스 IMPDH1 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서, 마우스 이외의 다른 포유동물의 IMPDH1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 마우스 IMPDH1 단백질의 아미노산 서열은 NCBI의 GenBank와 같은 공지된 데이터베이스에서 확인할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하는 단계는 CRISPR-Cas9 시스템 하에 ssODN를 사용하여 HDR(homology-directed repair)에 의해 특정 염기를 정확하게 치환하는 방식으로 이루어질 수 있다.

[0048] 구체적으로, 본 발명의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델 제조 방법은 다음의 i) 내지 iv) 단계를 포함할 수 있다:

[0049] i) Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA(guide RNA) 및 동물의 게놈의 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하기 위한 단일가닥 올리고 DNA 뉴클레오타이드(single-stranded oligo DNA nucleotide, ssODN)를 동물의 수정란에 주입하는 단계;

[0050] ii) 상기 수정란을 대리모에 이식하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 포함하는 생식계열 세포를 포함하는 동물을 수득하는 단계; 및

[0051] iii) 상기 ii) 단계에서 수득한 동물을 야생형 동물과 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체로 포함하는 동물을 수득하는 단계.

[0052] 이때, 상기 동물 및 대리모는 인간을 제외한 동물일 수 있다.

[0053] 본 발명의 용어, "동물 모델"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환 모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환 모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내며, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계의 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질은 야생형 Cas9 단백질뿐만 아니라, 유전자 편집을 위한 핵산분해효소의 기능을 갖는 Cas9 변이체를 모두 포함할 수 있으며, NCBI의 GenBank와 같은 데이터베이스에 공지된 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요제네스(*Streptococcus pyogenes*), 캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptocuccus aureus*) 유래, 네이쎄리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유래, 파스투렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*) 유래 또는 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] Cas9 단백질은 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제 효소로, 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9 단백질이 정확하게 표적 DNA의 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM(Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 DNA의 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

[0056] 상기 PAM 서열은 Cas9 단백질이 인식할 수 있는 뉴클레오타이드 서열이며, Cas9 단백질의 유래마다 PAM 서열은 다를 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계의 Cas9 단백질은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 제조하여 사용하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA(CRISPR RNA) 또는/및 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 각각을 포함하는 듀얼 (dual) 가이드 RNA이거나, 또는 상기 crRNA와 상기 tracrRNA의 특정 부위가 융합된 형태의 sgRNA(sinlge-chain guide RNA)일 수 있다. 예를 들어, 상기 i) 단계의 인간 IMPDH1 유전자의 c.947G를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA(guide RNA)는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 sgRNA와 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 sgRNA를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0059] 본 발명에 있어서, "인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위"는 인간 IMPDH1 유전자의 c.947G>C를 포함하는 부위일 수 있고, 바람직하게는 c.947G>C를 포함하는 25 내지 40bp 길이의 부위일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에 있어서, "인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위"는, 제조하고자 하는 동물 모델의 종류에 따라 달라질 수 있으나, 통상의 기술자라면 NCBI의 GenBank와 같은 데이터베이스에 공지된 서열 정보를 통해 쉽게 결정할 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 동물 모델이 마우스인 경우, 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이는 마우스 IMPDH1 유전자의 R231P 돌연변이에 상응하므로, 마우스 IMPDH1 유전자의 R231에 상응하는 코돈인 AGA를 CCA로 치환하여 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이를 유도할 수 있다. 바람직하게는, 마우스 IMPDH1 유전자의 R231에 상응하는 코돈인 AGA를 CCA로 치환할 뿐만 아니라, CCA 코돈을 포함하는 25 내지 40bp 길이의 부위를 인간 유래의 염기서열로 치환할 수 있다. 예를 들어, NCBI Reference Sequence: NP_035959.2에 개시된 마우스(Mus musculus) IMPDH1 동형 단백질 3(inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1 isoform 3)의 아미노산 서열 및 NCBI Reference Sequence: NM_011829.3에 개시된 마우스 IMPDH1 전사 변이체 3(Mus musculus inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1, transcript variant 3)의 염기서열을 참조하여, 마우스 IMPDH1 유전자의 R231에 상응하는 코돈인 AGA를 포함하는 25 내지 40bp 길이의 부위를 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이에 상응하는 코돈인 CCA를 포함하는 25 내지 40bp 길이의 부위로 치환할 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명에 따른 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델의 제조 방법은 동물의 게놈의 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하기 위해 HDR 기작을 이용한 유전자 편집 기술이 적용된다.

[0063] 세포 내에서 DNA 절단은 때때로 HDR 기작을 통해 복구되기도 하는데, 이를 통해 돌연변이 없이 정확하게 DNA가 복구된다. 따라서, 원하는 염기서열의 DNA 공여자(donor DNA)를 다량으로 넣어주면 HDR을 통해 유전자의 특정 돌연변이를 교정하거나 외래 유전자를 삽입하는 넉인(knock-in)을 유도할 수 있다.

[0064] 이에 따라, 본 발명의 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델의 제조 방법은 동물의 게놈의 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 유도하기 위한 ssODN를 필요로 한다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계의 ssODN는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 안티센스 ssODN일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, gRNA 및 ssODN을 동물의 수정란에 주입하는 단계는, 예를 들어, Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, gRNA 및 ssODN를 혼합하여 수정란의 세포질에 주입시키는 간단한 방법으로 제작될 수 있다.

[0067] Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, gRNA 및 ssODN는 당해 기술분야에 통상적으로 알려진 방법에 의해 동물 배아 내로 주입될 수 있으며, 예를 들어, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 리포좀-매개 전이 방법 및 레트로바이러스-매개 전이방법이 적용될 수 있다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 i) 단계는, 예를 들어 다음과 같은 과정을 통해 수행될 수 있다. 먼저, 암컷 동물에 임신말 혈청성 성선 자극 호르몬(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG 및 인간 융모성 고나도트로핀(human chorionic gonadotropin, hCG)을 주입하여 과배란을 유도한다. 과배란된 암컷 동물을 스터드(stud) 수컷 동물과 교배시키고, 수정 후 6 내지 14시간째에 난관으로부터 1-세포기 배아 (1-cell stage embryo)을 수집할 수 있다.

[0069] 이후, 미세주입기를 이용하여, 예를 들어, Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, gRNA 및 ssODN을 전핵(pronuclear) 단계 배아의 세포질 내로 함께 주입할 수 있다.

[0070] 본 발명에 있어서, ii) 단계는 Cas9 mRNA, gRNA 및 ssODN가 주입된 수정란을 가임신 대리모의 난관에 이식하는 단계로, 예를 들어, Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, gRNA 및 ssODN가 주입된 후 1-세포기 또는 2-세포기 상태로 대리모에 이식될 수 있다.

[0071] 본 발명의 제조 방법은 상기 대리모로부터 수득한 동물을 야생동물과 교배하기 전에, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 발생한 파운더 동물(f_0)을 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 상기 돌연변이의 확인은 유전형분석(genotyping), 서열분석 등에 의해 이뤄질 수 있으나, 그 외 당해 기술분야에 알려진 방법들로도 확인될 수 있다.

[0073] 유전자 가위(engineered nuclease)에 의한 돌연변이는, 예를 들어, 불일치-민감성 T7 엔도뉴클레아제 I (T7E1) 또는 Surveyor 뉴클레아제 어세이, RFLP, 형광 PCR 산물의 모세관 전기영동, 디데옥시 시퀀싱(Dideoxy sequencing) 및 딥 시퀀싱(deep sequencing)을 포함한 다양한 방법에 의해 탐지될 수 있다.

[0074] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 표적 돌연변이(targeted mutation)를 갖는 파운더(F_0) 동물을 PCR 프라이머(IMPDH1-R316P F 프라이머: 서열번호 9 및 IMPDH1-R316P R 프라이머: 서열번호 10)를 이용하여 스크리닝 하였다. 돌연변이 대립유전자를 클로닝된 PCR 산물의 시퀀싱(IMPDH1 시퀀싱 올리고머: 서열번호 11)으로 확인하였다(도 3a).

[0075] 본 발명에 따른 제조 방법은 상기와 같은 과정을 통해 ii) 단계에서 수득한 선별된 파운더 동물(f_0)은 야생형 동물과 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체로 포함하는 동물(F_1)을 수득하는 iii) 단계를 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 파운더 동물 #26 및 #35의 돌연변이를 확인한 후, 이를 야생형 마우스와 교배하여 돌연변이 파운더에서 동정된 IMPDH1-R316P 돌연변이 대립형질(allele)이 후손(F_1)에게 생식전달(germline transmission)되었음을 확인하였다(도 3b). 돌연변이의 생식전달로 인해 후대에도 지속적으로 해당 돌연변이를 나타내는 동물 모델을 안정적으로 생산할 수 있다.

[0077] 본 발명의 방법은 또한, iv) 상기 iii) 단계에서 수득한 인간을 제외한 동물을 한배 새끼(littermate)와 교배하여, 게놈의 IMPDH1 유전자가 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 동형접합체로 포함하는 인간을 제외한

망막 변성 동물(F_2)을 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0078] 본 발명의 제조 방법에 사용된 동물이 C57BL/6N (B6N) 계통의 마우스인 경우, C57BL/6N (B6N) 계통은 망막 손상을 일으키는 Crb1 유전자에 Rd8이라고 알려진 상염색체 열성(autosomal recessive) 돌연변이를 가지고 있어 망막 표현형을 관찰하기에 적합하지 않으므로(Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 May 17;53(6):2921-7), 야생형 Crb1 유전자를 보유하고 있는 다른 계통의 마우스와 교배하는 것이 추가로 필요할 수 있다.

[0079] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 야생형 Crb1 유전자에 대해서 동형접합체(homozygote) 또는 이형접합체(heterozygote)를 갖는 동물을 선별하기 위해 PCR 프라이머(Crb1 F 프라이머: 서열번호 12 및 Crb1 R 프라이머: 서열번호 13)를 이용하여 스크리닝하고, 클로닝된 PCR 산물을 시퀀싱(Crb1 시퀀싱 올리고머: 서열번호 14) 하였다(도 4).

[0080] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는, IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이를 선별하기 위해, 야생형 Crb1 유전자를 갖는 동물의 게놈 DNA를 섞어 PCR을 수행한 다음, PCR 산물을 열 변성/재생을 통해 헤테로듀플렉스 형성(heteroduplex formation) 후 폴리아크릴아마이드 겔 전기천공(polyacrylamide gel electroporation, PAGE)을 수행하여 유전자형을 분석하고, 시퀀싱을 통해 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이를 확인하였다(도 5a 내지 5c).

[0081] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 설치류일 수 있다. 예를 들어, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 마우스, 래트(rat), 햄스터, 기니어피그 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0082] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 망막 변성은 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 망막의 손상 또는 발달 저해로 인해 유발될 수 있는 질병으로서 당업자에 의해 인정되는 범위라면 제한 없이 적용할 수 있다.

[0084] 본 발명에서는 전술한 방법을 통해, 상염색체 우성 패턴으로 유전하는 망막색소변성증 유발 유전자인 IMPDH1 변이를 유도하여, 인간 환자에서 나타나는 질환의 표현형을 동물 모델에서 최초로 발현시켰다.

[0085] 따라서, 본 발명의 제2 측면은 전술한 제조 방법으로 제조되는 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된, 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델에 관한 것이다.

[0086] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 상기 IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이를 이형접합체 또는 동형접합체로 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물은 설치류일 수 있으며, 적절한 설치류의 종류는 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타낼 수 있다.

[0089] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 본 발명의 제조 방법으로 제조된 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델의 임상 표현형을 확인하기 위해 생후 4주, 8주, 10주 및 16주째에 안저 촬영 및 안구광학단층촬영을 시행하였다. 그 결과, 도 6a 내지 6d에서 확인되는 바와 같이, 야생형과 비교하여 돌연변이 마우스에서는 망막 변성이 심하게 진행되고, 혈관이 얇아지며, 시신경이 창백해지는 변화가 관찰되었고, 도 6e에서 확인되는 바와 같이, 돌연변이 마우스에서 망막의 두께가 얇아지고, 광수용체 세포의 변성으로 타원체 영역(ellipsoid zone)의 분열(disruption)이 뚜렷하게 관찰되었다.

[0090] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에서는 본 발명의 제조 방법으로 제조된 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델의 망막 기능을 평가하기 위해, 생후 8 주째에 전기생리검사인 망막 전위도 검사를 시행하였다. 그 결과, 도 7c의 야생형 마우스 결과와 비교하여, 도 7a의 이형접합 돌연변이 마우스 및 도 7b의 동형접합 돌연변이 마우스 결과에서 빛 자극에 대한 망막의 전기 파형이 모든 자극에서 크게 감소한 상태임을 확인할 수 있었다.

[0091] 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은 동형접합자 동형접합자(homozygote, KI/KI)뿐만 아니라 이형접합자(heterozygote, KI/+)에서도 망막 변성 소견을 보이며, 특히 동형접합자에서 심한 망막변성의 소견을 보인다.

[0092] 따라서, 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은 망막의 손상 또는 발달 저해로 인해 유발될 수 있는 질병을 나타낼 수 있으며, 예를 들어, 망막색소변성, 혈관무늬병증, 드루젠 및 황반 변성으로 이루어진 군으로

부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0093] 기존에 보고된 바와 같이 IMPDH1 넉아웃(knock-out, KO) 마우스는 IMPDH1을 전혀 발현하지 못하며, 망막 변성 또한 잘 유도되지 않지만(Hum Mol Genet. 2004 Mar 15;13(6):641-50), 망막색소변성 환자들에서는 이른 나이에 망막 손상과 시기능 저하가 발생한다. 따라서, IMPDH1 KO 마우스는 이른 나이부터 빠르게 손상되는 망막과 시기능 저하 등의 인간에서 보이는 질병의 특성을 보여주지 못하는 단점이 있다. 기존에 보고된 IMPDH1 KO 마우스와 달리, 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은, 도 6a 내지 6e에서 확인되는 바와 같이 4주령부터 망막 소견에서 시신경 창백, 망막 혈관의 가늘어짐, 망막 색소 침착 등의 특징을 나타내고, OCT 검사에서 전반적인 망막 두께의 감소, 광수용체(photoreceptor) 층의 손상 등의 IMPDH1 연관 망막색소변성 환자의 임상적 소견을 잘 보여준다는 것을 알 수 있다.

[0094] 또한, 도 7a 내지 7c에서 확인되는 바와 같이, 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은 빛 자극에 대한 망막의 전기 파형이 모든 자극에서 크게 감소한 상태임 알 수 있다.

[0095] 나아가, 도 8a 및 8b의 레버 선천성 흑암시(Leber Congenital Amaurosis, LCA)를 진단받은 환자는 전체적인 망막의 변성과 위축된 망막변성 소견을 보였으며, 망막 전위도 검사에서도 소실된 ERG (extinguished ERG)가 관찰되어, 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델과 동일한 표현형을 나타냄을 알 수 있다.

[0096] 상기와 같이, 본 발명에 따른 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은 인간 환자의 질환 표현형을 나타내는 바, 해당 질환의 병태 생리 연구, 개발 예정인 신약의 효과와 안전성을 확인하는데 유용하게 활용될 수 있다.

[0097] 따라서, 본 발명의 제3 측면은 전술한 인간을 제외한 망막 변성 동물 모델을 이용한, 망막 변성의 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0098] 유용한 약물에 대한 스크리닝은, 예를 들어, 동물 모델에게 용량 범위에 걸쳐 후보약물을 투여하는 단계, 및 평가되는 질환에서 약물의 효과들에 대해 다양한 시점에서 분석하는 단계를 포함한다.

[0099] 구체적으로, 본 발명의 스크리닝 방법은 다음의 a) 및 b) 단계를 포함할 수 있다:

[0100] a) 전술한 제조 방법으로 제조되는, IMPDH1 유전자에 인간 R316P 돌연변이에 상응하는 돌연변이가 유도된 동물 모델에서 망막 변성이 일어나기 전 또는 후에 후보 약물을 투여하는 단계; 및

[0101] b) 상기 후보 약물이 투여되지 않은 대조군과 비교하여, 상기 후보 약물이 망막 변성의 발병을 예방하거나, 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계.

[0102] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 a) 단계의 인간을 제외한 동물 모델은 야생형의 인간을 제외한 동물과 비교하여 막망 변성에 대해 증가된 감수성을 가지거나, 또는 망막 변성을 나타낼 수 있다.

[0103] 본 발명의 스크리닝 방법이 망막 변성을 예방하는 약물을 스크리닝하는 방법인 경우에는 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0104] a-1) 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이가 유도되어 망막 변성이 일어나기 전 상태의 동물 모델에 후보 약물을 투여하는 단계;

[0105] b-1) 상기 후보 약물이 처리되지 않은 동일한 동물 모델(즉, 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이가 유도되어 망막 변성이 일어나기 전의 상태로 후보 약물이 처리되지 않은 동물 모델)과 비교하여 망막 변성의 발병을 예방하는지 여부를 결정하는 단계.

[0106] 이때, 상기 a-1) 단계의 망막 변성이 일어나기 전 상태의 동물 모델은 야생형과 비교하여 망막 변성에 대한 감수성이 증가한 상태일 수 있다.

[0107] 본 발명의 스크리닝 방법이 망막 변성을 치료하는 약물을 스크리닝하는 방법인 경우에는 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0108] a-2) 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이가 유도되어 망막 변성이 유발된 상태의 동물 모델에 후보 약물을 투여하는 단계;

[0109] b-2) 상기 후보 약물이 처리되지 않은 동일한 동물 모델(즉, 인간 IMPDH1-R316P 돌연변이가 유도되어 망막 변성이 유발된 상태로 후보 약물이 처리되지 않은 동물 모델)과 비교하여 망막 변성의 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계.

[0110] 본 발명에 있어서, 상기 망막 변성으로 나타날 수 있는 증상은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

[0111] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 "후보 약물"은 망막 변성으로 나타날 수 있는 다양한 증상을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는지 확인하고자 하는 미지의 물질을 의미한다. 예를 들어, 상기 "후보 약물"은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 또는 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0112] 본 발명에 따른 동물 모델은 IMPDH1-R316P 돌연변이 뿐만 아니라 주변 인간 유래 염기서열을 함께 도입하여 제조되었기 때문에, 유전자 교정에 사용하기 적합하다. 따라서, 상기 "후보 약물"은 돌연변이 서열을 교정하기 위한 유전자 교정 치료제도 포함할 수 있다.

[0113] 상기 유전자 교정 치료제는 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이를 정상적인 야생형 핵산 서열로 교정하기 위한 것으로서, Cas9 mRNA 또는 Cas9 단백질, 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA (즉, 인간 IMPDH1 유전자의 R316P 돌연변이를 포함하는 부위에 상응하는 동물의 IMPDH1 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 gRNA), 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이를 교정하기 위한 정상적인 야생형 핵산 서열 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0114] 또 다른 예로, 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이는 상염색체 우성(autosomal dominant)이므로, 정상 유전자는 그대로 둔 채로 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이를 특이적으로 불능화 시키는 물질도 유전자 교정 치료제로서 사용될 수 있다.

[0115] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 후보 약물은 모든 투여 경로의 후보 약물을 포함한다. 예를 들어, 안구내 투여 등 비경구 및 경구 투여되는 약물을 스크리닝할 수 있다. 약물의 투여량은 약물의 성질, 투여 대사의 종류, 연령이나 체중 등의 조건을 기초로 종합적으로 판단하여 최적의 양을 적절하게 결정할 수 있다. 투여 시기나 투여 횟수 등의 조건은 약물의 성질, 시험 및 평가 목적 등에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 또한, 이러한 방법을 이용하여 약물의 효과를 수치화하여 정량적으로 파악할 수 있다.

[0116] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 본 발명의 망막 변성 동물과의 비교 대상으로서, 후보 약물을 처리하지 않은 동일한 망막 변성 동물을 무처리 대조군으로 사용할 수 있으며, 인간화 IMPDH1-R316P 돌연변이가 유도되지 않은 정상 대조군을 함께 대조군으로서 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 단계 b)에서 망막 변성의 발병을 예방하거나, 망막 변성 증상을 개선 또는 치료하는지 여부를 결정하는 단계는 상기 후보 약물이 망막 혈관 형태의 개선, 망막 단층 두께의 증가, 망막 전위도의 증가 및 망막 조직 내 세포수 증가로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내는지 확인함으로써 결정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0117] 추가적으로, 본 발명의 인간화 IMPDH1-R316P 동물 모델은 상기 유전자 돌연변이 효과를 연구하는 데 유용할 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 따른 동물 모델을 이용하여 질환의 병태 생리 연구가 가능하다.

[0118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0119] **IMPDH1 유전자 변이를 갖는 망막 변성 마우스 모델을 제조하기 위한 준비**

[0120] 1-1. 표적 선정

[0121] 인간 IMPDH1 단백질(NP_000874.2)과 마우스 Impdh1 단백질(NP_035959.2)을 비교하였을 때, 인간 IMPDH1 단백질의 아르기닌 316(R316)은 마우스 Impdh1 단백질의 아르기닌 231(R231)이다. 본 발명에서는 인간의 IMPDH1 단백질에서 R316 아미노산을 프롤린(P)으로 변경하는 돌연변이(IMPDH1-R316P)에 대한 마우스 모델을 제작하는 것이므로, 상기 마우스 모델을 인간화 IMPDH1-R316P 마우스로 명명하였다.

[0122] 인간 IMPDH1 전사체 mRNA의 염기서열을 나타내는 NM_000883.3에서 c.947G>C 돌연변이를 야생형 마우스의 Impdh1 유전자의 해당 부위에 삽입하기 위해서 두 염기서열을 비교해 보면, 도 1의 A와 같이 인간과 마우스의 야생형 Impdh1 유전자 서열에서 2개의 염기(빨간색)가 다르다는 것을 알 수 있다. 인간 IMPDH1 단백질에서 R316 아미노산이 프롤린(P)으로 변경된 돌연변이(IMPDH1-R316P)를 갖는 IMPDH1 전사체 mRNA 서열은 도 1의 B에 빨간색으로 표시된 것처럼 NM_000883.3: c.947G>C 변이를 포함하므로, 이를 반영하여 도 1의 C와 같이 마우스 모델을 디자인하였다.

[0123] 1-2. sgRNA 및 ssODN 디자인

[0124] CRISPR-Cas9을 이용해 마우스 게놈(genome)에 이들 변이를 삽입하기 위해서 도 2의 A에서 파란색과 빨간색으로 표시된 2개의 sgRNA를 선정하였다. 각각의 sgRNA를 Impdh1-RG1(도 2의 A에서 빨간색)과 Impdh1-RG2(도 2의 A에서 파란색)으로 명명하였고, 표 1에 나타낸 바와 같이 sgRNA의 성능을 평가할 수 있는 벤츨링 소프트웨어(Benchling software, benchling.com)를 통해 sgRNA 선정에 별다른 문제가 없음을 검증하였다.

표 1

[0125]

sgRNA	위치	가닥	서열	서열번호	PAM	특이도	효율
Impdh1-RG1	11179	-1	GGTAGTCTCTGTTCTTCTTC	1	AGG	34.7475599	29.71550509
Impdh1-RG2	11196	1	GAAGAACAGAGACTACCCTC	2	TGG	40.3006321	66.04988112

[0126] sgRNA 시험관 내(*in vitro*) 전사 주형 제작을 위해서 표 2의 올리고머를 주문하였고, pUC57-sgRNA 발현 벡터(Addgene Plasmid #51132)에 클로닝하였다.

표 2

[0127]

올리고머	서열	서열번호
Impdh1-RG1	5'-taggGGTAGTCTCTGTTCTTCTTC-3'	3
	5'-aaacGAAGAAGAACAGAGACTACC-3'	4
Impdh1-RG2	5'-taggGAAGAACAGAGACTACCCTC-3'	5
	5'-aaacGAGGGTAGTCTCTGTTCTTC-3'	6

[0128] 표 3과 같이, 상기 sgRNA들과 함께 사용될 ssODN으로 안티센스 단일 가닥 공여자 DNA(Antisense single strand donor DNA, ssODN)를 디자인하였다. 여기서, 볼드체로 표시된 부분은 상동성 유도 복구(Homology-directed repair, HDR)를 위한 상동성 암(homology arm)이며, 밑줄로 표시된 염기들은 실제 마우스에서 변화될 부분들이다(도 1).

표 3

[0129]

	서열	서열번호
안티센스 ssODN	**CTCACGGGTGCCCACAGCTGCCCCACACAACAGCTGTTTGTGGGA**aTCCTTGGAGGCCAGAGGGTAGTCT**gg**GTTCTTCTTCAGGTCTGTGCGCGCAATGATGGCTACCAGCTCATCTTGATCGTTGACTATGGGCAGCTTC	7

실 시 예 2

[0130] **IMPDH1 유전자 변이를 갖는 망막 변성 마우스 모델의 제조**

[0131] 2-1. 실험동물 및 사육방법

[0132] 모든 동물 실험은 한국식품의약품안전청(Korean Food and Drug Administration, KFDA) 지침에 따라 수행되었다. 서울아산병원 아산생명과학연구원(Asan Institute for Life Sciences, Asan Medical Center) IACUC(Institutional Animal Care and Use Committees)이 프로토콜을 검토하고 승인하였다(Permit Number: 2021-12-339). 모든 마우스를 서울아산병원 질환중심동물자원센터의 SPF(specific pathogen-freefacility) 시설에서 유지시켰다.

[0133] 2-2. 수정란 조작

[0134] CRIPSR-Cas9 및 C57BL/6NTac 마우스 수정란의 조작은 기존에 본 발명자들이 수행한 연구 결과대로 다음과 같이 진행하였으며(Genome Res. 2014 Jan;24(1):125-31), 여기에 ssODN을 추가하였다.

[0135] 구체적으로, C57BL/6NTac(대한바이오링크) 마우스 계통을 배아 공여자로, ICR 마우스(대한바이오링크)를 대리모로 사용하였다. 4주령의 암컷 C57BL/6NTac 마우스는 임신한 암말 혈청 고나도트로핀(PMSG, Sigma-Aldrich) 5

IU와 인간 융모막 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG; Sigma-Aldrich) 5 IU를 48시간 간격으로 복강 주사하여 과배란시켰다. 과배란 암컷 마우스를 C57BL/6NTac 번식용 수컷(stud male)과 교배시키고 난관에서 수정된 배아를 채취하였다.

[0136] Cas9 재조합 단백질(Cas9 Nuclease, S. pyogenes NEB #M0386T), 2개의 Impdh1-sgRNA 및 ssODN의 혼합물을 DEPC 처리된 주입 완충액(injection buffer; 0.25mM EDTA, 10mM Tris, pH 7.4)으로 희석한 다음 조작된 배아는 살아있는 동물을 생산하기 위해 가임신 대리모(pseudopregnant foster mother)의 난관으로 옮겨서 새끼가 태어나도록 하였다.

[0137] 2-3. IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스 라인 확립

[0138] 조작된 마우스 수정란을 대리모에 이식하여 새끼를 생산한 후, 유전형 분석(genotyping)을 통해 돌연변이 파운더(mutant founder)를 선별하였다. 유전형 분석을 위해 다음의 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 정제한 후 표 4의 서열번호 11의 올리고머를 사용하여 시퀀싱(sequencing)을 진행하여 IMPDH1-R316P 돌연변이 파운더(founder, F_0) 마우스의 생산 여부를 확인하였다.

표 4

[0139]

올리고뉴클레오타이드	서열	크기	서열번호
IMPDH1-R316P F 프라이머	5'-TCAGGGGTCTCTCGTTCCAT-3'	373 bp	8
IMPDH1-R316P R 프라이머	5' -CAAAGTGGGGAGGGAGCAAA-3'		9
IMPDH1 시퀀싱 올리고머	5' -CCCTGCTTCTCTCTCCTCCT-3'	-	10

[0140] 도 3a에 나타난 바와 같이 2 마리(#26 및 #35)의 IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스가 생성되었음을 확인하였다. 이들 IMPDH1-R316P 돌연변이 파운더 마우스를 야생형 마우스와 교배하여 돌연변이 파운더에서 동정된 IMPDH1-R316P 돌연변이 대립형질(allele)이 후손(F_1)에게 생식전달(germline transmission)되었음을 도 3b와 같이 확인하였다. 이로써, IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스 라인을 확립하였다.

실 시 예 3

[0141] **야생형 Crb1 유전자를 보유한 망막 변성 마우스 모델의 제조**

[0142] IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스 제작에 사용된 C57BL/6N (B6N) 계통은 망막 손상을 일으키는 Crb1 유전자에 Rd8이라고 알려진 상염색체 열성(autosomal recessive) 돌연변이를 가지고 있어서 망막 표현형을 관찰하기에 적합하지 않다(Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 May 17;53(6):2921-7). 따라서, 야생형 Crb1 유전자를 보유하고 있는 C57BL/6J(B6J) 마우스와 교배하여 새끼를 얻은 후, 표 5의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 표 5의 Crb1 시퀀싱 올리고머를 사용하여 시퀀싱을 수행하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

표 5

[0143]

올리고뉴클레오타이드	서열	크기	서열번호
Crb1 F 프라이머	5'-TCCGAGTGGACTTTGTGCTC-3'	609 bp	11
Crb1 R 프라이머	5'-GTGAACGACCAGACACCCTT-3'		12
Crb1 시퀀싱 올리고머	5'-TCCCTGGTAAGCCTCAGGAA-3'	-	13

[0144] 시퀀싱 결과를 통해, 야생형 Crb1 유전자에 대해서 동형접합체(homozygote) 또는 이형접합체(heterozygote)만을 대상으로 실험을 진행하고, Crb1 Rd8 동형접합체 돌연변이 마우스들은 모두 폐기하였다.

[0145] 도 5a 및 5b는 PCR 산물을 열 변성/재생을 통해 헤테로듀플렉스 형성(heteroduplex formation) 후 15% 폴리아크릴아마이드 겔 전기천공(polyacrylamide gel electroporation, PAGE)을 수행한 결과를 보여준다. 도 5a는 각각의 마우스에서 얻어진 게놈 DNA(genomic DNA)만을 사용한 결과로, 이 경우 WT 마우스(파란색)와 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이 마우스(빨간색)를 구별할 수 없다. 도 5b는 IMPDH1-R316P 동형접합 돌연변이 마우스를 구별하기 위해, 도 5a의 각 마우스 게놈 DNA에 WT B6J 게놈 DNA를 섞어서 IMPDH1 유전자에 대한 유전자형 분석 PCR을 수행한 다음, 폴리아크릴아마이드 겔 전기천공(polyacrylamide gel electroporation, PAGE)을 진행하였다. 그 결과, 야생형 (#64)과 IMPDH1-R316P 동형접한 동물(#68)을 구분할 수 있었고, 이를 도 5c에서와 같이 시퀀싱

을 통해서 검증하였다.

실 시 예 4

[0146] **IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스의 표현형 확인**

[0147] 실시예 3에서 제작된 마우스의 표현형을 확인하기 위해, 각각 4주, 8주, 10주 및 16주째에 동형접합 돌연변이, 이형접합 돌연변이 및 야생형 마우스의 망막 조직을 구조적으로 평가하였다.

[0148] 4-1. 안저 촬영 (Fundus Photograph)

[0149] 4주, 8주, 10주 및 16주째에 안저 촬영을 시행하였다. 마우스의 안구를 점안 마취제로 마취하고, 5 ㎎/㎖ 트로피카마이드(Tropicamide) 및 5 ㎎/㎖ 페닐레프린 HCl(phenylephrine HCl)을 점안하여 동공의 산동을 유도하였다. 안저 촬영 중 각막의 건조를 방지하기 위해 안과용 인공누액 연고를 사용하였다. 망막 촬영은 Micron IV 안저 카메라를 사용하였다(Phoenix Research Labs, Inc., Pleasanton, CA, USA). 촬영한 모든 안저 영상은 Micron IV software(StreamPix; NorPix, Inc. Montreal, Quebec, Canada)를 이용하여 저장하고 데이터 처리하였다.

[0150] 도 6a 내지 6d에서 확인되는 바와 같이, 야생형과 비교하여 돌연변이 마우스에서는 망막 변성이 심하게 진행되고, 혈관이 얇아지며, 시신경이 창백해지는 변화가 관찰되었다.

[0151] 4-2. 안구광학단층촬영(optical coherence tomography, OCT)

[0152] 4주, 8주, 10주 및 16주째에 안구광학단층촬영(Phoenix Research Labs)을 수행하였다. 6회 반복하여 망막 단층을 스캔하고, 그 값을 평균화하여 영상을 획득하였다. 획득된 영상은 tif(tagged image file) 형식으로 출력하여, 망막의 두께 및 망막색소상피(retinal pigment epithelium), 망막의 외핵층(outer nuclear layer), 외망상층(outer plexiform layer), 내핵층(inner nuclear layer) 및 내망막층 (inner plexiform layer) 등의 양상을 비교하였다.

[0153] 도 6e와 표 6은 이형접합 돌연변이, 동형접합 돌연변이 및 야생형의 망막 두께를 비교한 것으로, 세 그룹 간의 차이를 뚜렷하게 보여준다. 특히, 하측의 OCT에서는 돌연변이 마우스에서 망막의 두께가 얇아지고, 광수용체 세포의 변성으로 타원체 영역(ellipsoid zone)의 분열(disruption)이 뚜렷하게 관찰되었다.

표 6

[0154]

	4주	8주	10주	16주
이형접합	197.2	209.9	170.6	158.6
동형접합	**150.1**	**133.8**	**127.3**	**131.2**
야생형	235.2	247.4	227.4	218

[0155] 안저 검사 및 OCT에서 확인되는 이러한 특성은 이형접합 돌연변이보다 동형접합 돌연변이에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었고, 생후 4주령부터 확인되는 것을 알 수 있다.

[0156] 4-3. 망막 전위도 검사(Electroretinogram, ERG)

[0157] 망막의 기능적 평가를 위해, 8 주째에 전기생리검사인 망막 전위도 검사를 시행하였다.

[0158] 구체적으로, 망막 전위도 검사 전 마우스를 12 시간 이상 암순응을 유도하였고, 조도(λ) 600 ㎚ 미만의 어두운 환경에서 망막 전위도 측정을 준비하였 다. 그런 다음, 각 마우스에 Zoletil®(Tiletamine 125 ㎎/㎖ and Zolazepam 125 ㎎/㎖, Virbac, France)을 0.01 ㎖씩 복강내 주사하여 마취하였다. 또한, 미드린-피 점안제®(페닐레프린 염산염 5 ㎎/㎖ 및 트로픽아마이드 5 ㎎/㎖, Santen, Japan)를 점안하여 동공을 산동시켰다. 또한, 안구 마취를 위해 Alcaine®(프로파라카인 염산염 0.5 %, Alcon Laboratories Inc.)을 점안하였다. 마취된 마우스를 실험 동물용 지지대에 안정적으로 고정시켜, 재현성 높은 전기생리학적 검사를 위한 체위를 유지하였다.

[0159] 망막 전위도 검사는 간츠펠트 ERG 시스템(Ganzfeld ERG system; Phoenix Research Labs)을 이용하여 빛 자극 및 전기 신호 측정을 시행하였다. 망막 전위도 신호는 실험동물 마우스의 우안 및 좌안을 모두 활용하였으며, 백색 빛의 강도를 높여가면서 순차적으로 전기 신호를 측정하였다. 빛 노출 시간은 10 msec으로 하였고, 각 빛

의 강도에서 10 회의 평균값을 이용해서 전기 신호를 기록하였다. 순금으로 제작된 각막 전극을 각막 주변에 위치시키고, 기준 전극과 접지 전극을 두피와 꼬리 피하에 위치 시켰다. 또한, 망막의 간세포(rod cell)과 추세포(cone cell) 각각의 기능을 확인하기 위하여, 암순응, 명순응 반응 a, b 파를 확인하여 도 7a 내지 7c에 이형접합 돌연변이 마우스, 동형접합 돌연변이 마우스 및 야생형 마우스의 결과를 순서대로 나타내었다.

[0160] 도 7c의 야생형 마우스 결과와 비교하여, 도 7a의 이형접합 돌연변이 마우스 및 도 7b의 동형접합 돌연변이 마우스 결과에서 빛 자극에 대한 망막의 전기 파형이 모든 자극에서 크게 감소한 상태임을 확인할 수 있다.

실 시 예 5

[0161] **IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스와 환자의 표현형 비교**

[0162] 실시예 3에서 제작된 IMPDH1-R316P 돌연변이 마우스 동물 모델을 환자 표현형과 비교 관찰하였다. 환자는 9세에 시력 저하를 주소로 안과 내원하여 망막색소변성의 심한 형태인 레버 선천성 흑암시(Leber Congenital Amaurosis, LCA)를 진단받았으며, 유전 분석에서 c.947 G>C, p.Arg316Pro 변이를 이형접합 돌연변이 형태를 나타내는 것으로 확인되었다. 9세 처음 내원 당시부터 상당한 망막 변성이 진행된 상태로, 도 8a 및 8b에서 확인되는 바와 같이, 전체적인 망막의 변성과 위축된 망막변성 소견을 보였으며, 망막 전위도 검사에서도 소실된 ERG (extinguished ERG)가 관찰되어, 본 발명에서 제작된 IMPDH1-R316P 이형접합 및 동형접합 돌연변이 마우스와 동일한 표현형을 나타냄을 알 수 있다.

도면

도면1

A. 정상 및 야생형 IMPDH1 유전자

```
                        R316
                         |
            D  L  K  K  N  R  D  Y  P  L  A  S  K  D   (서열번호 14)
Human       GACCTGAAGAAGAACCGAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAT  (서열번호 15)
Mouse       GACCTGAAGAAGAACaGAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAc  (서열번호 16)
```

B. 환자 유래 돌연변이(IMPDH1 NM_000883.3: c.947G>C, p.Arg316Pro)

```
            D  L  K  K  N  P  D  Y  P  L  A  S  K  D   (서열번호 17)
Patient     GACCTGAAGAAGAACCcAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAT  (서열번호 18)
```

C. 인간화 Impdh1-R316P 마우스

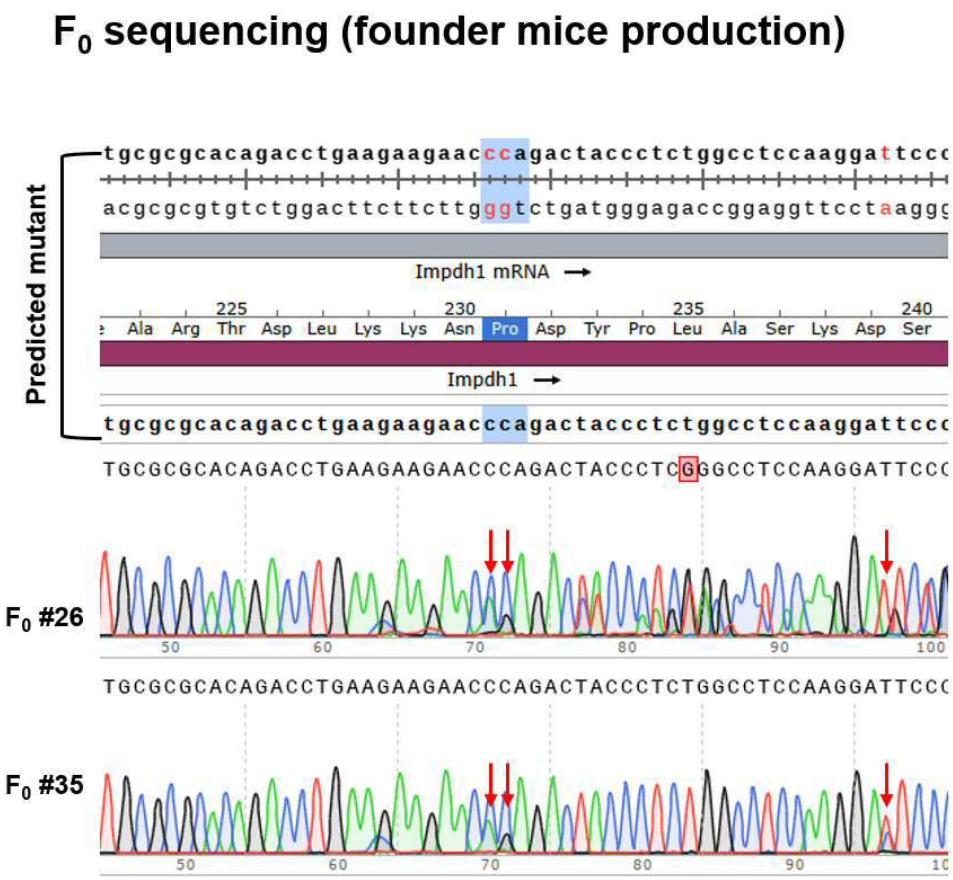
```
                        R231
                         |
            D  L  K  K  N  P  D  Y  P  L  A  S  K  D   (서열번호 17)
Mutant      GACCTGAAGAAGAACCcAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAt  (서열번호 18)
```

도면2

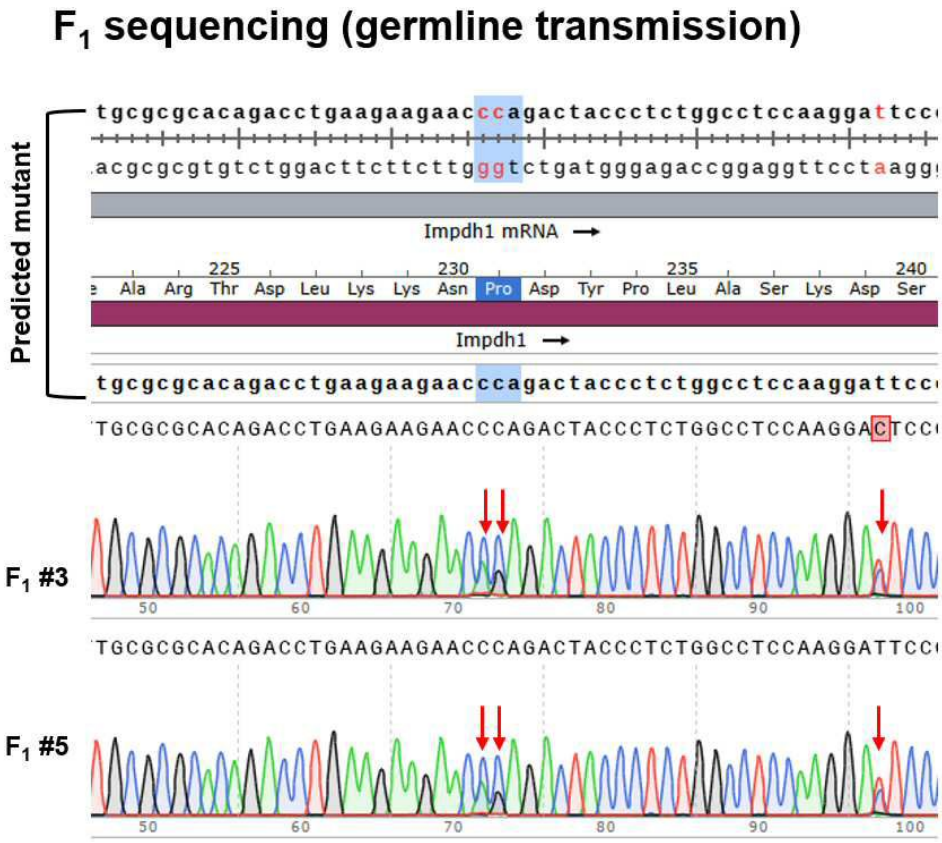
정상 및 야생형 IMPDH1 유전자

```
                        R316
                         |
            D  L  K  K  N  R  D  Y  P  L  A  S  K  D   (서열번호 14)
Human       GACCTGAAGAAGAACCGAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAT  (서열번호 15)
Mouse       GACCTGAAGAAGAACaGAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGAc  (서열번호 16)
```

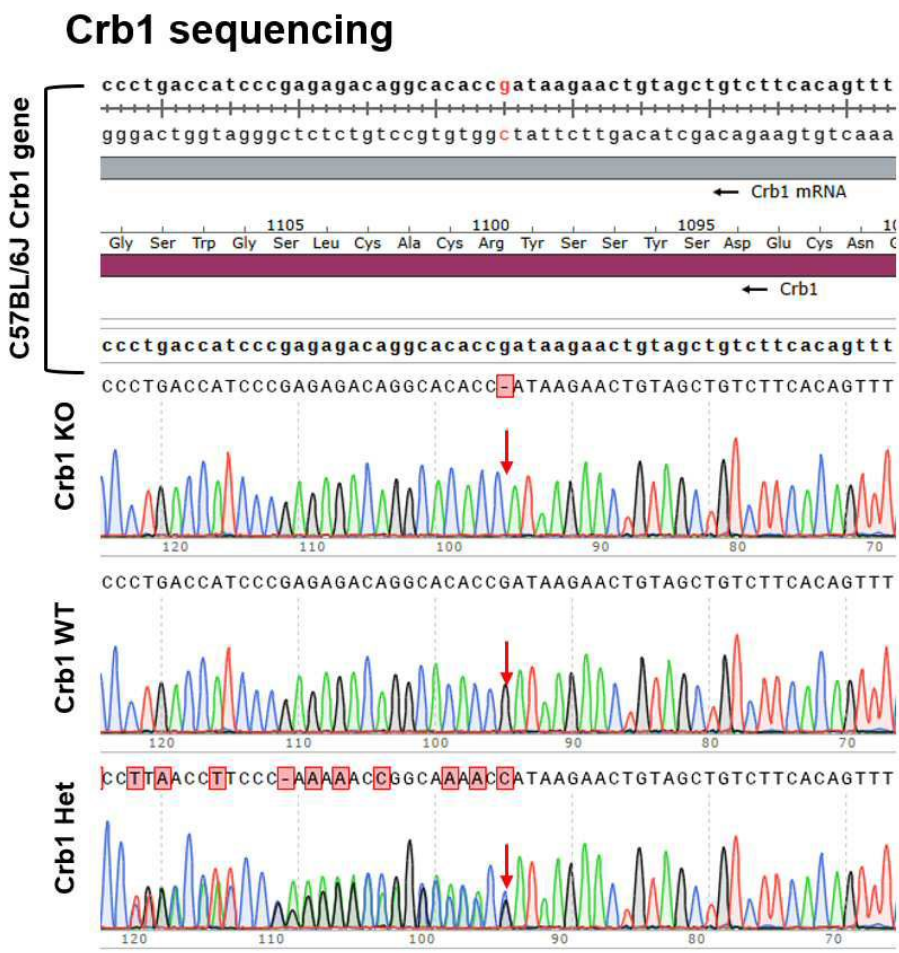
도면3a


F0 sequencing (founder mice production)
Predicted mutant
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattccc
acgcgcgtgtctggacttcttcttgggtctgatgggagaccggaggttcctaaggg
Impdh1 mRNA
225 230 235 240
Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Asp Ser
Impdh1
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattccc
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACCCAGACTACCCTCGGGCCTCCAAGGATTCCC
F0 #26
50 60 70 80 90 100
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACCCAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGATTCCC
F0 #35
50 60 70 80 90

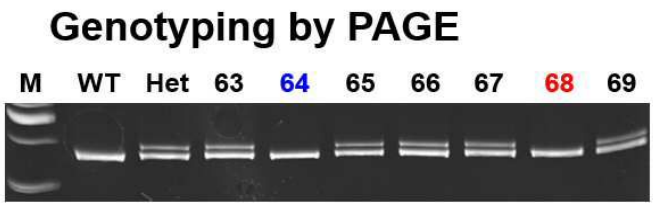
도면3b


F1 sequencing (germline transmission)
Predicted mutant
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattcc
acgcgcgtgtctggacttcttcttgggtctgatgggagaccggaggttcctaagg
Impdh1 mRNA
225
230
235
240
Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Asp Ser
Impdh1
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattcc
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACCCAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGACTCC
F1 #3
50
60
70
80
90
100
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACCCAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGATTCC
F1 #5
50
60
70
80
90
100

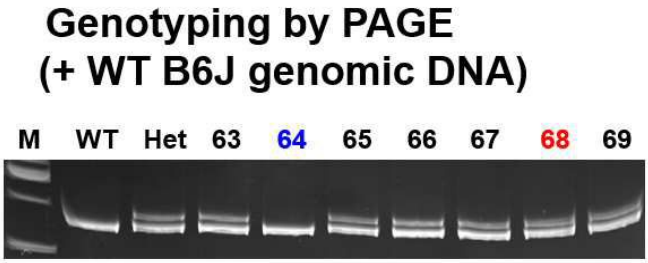
도면4



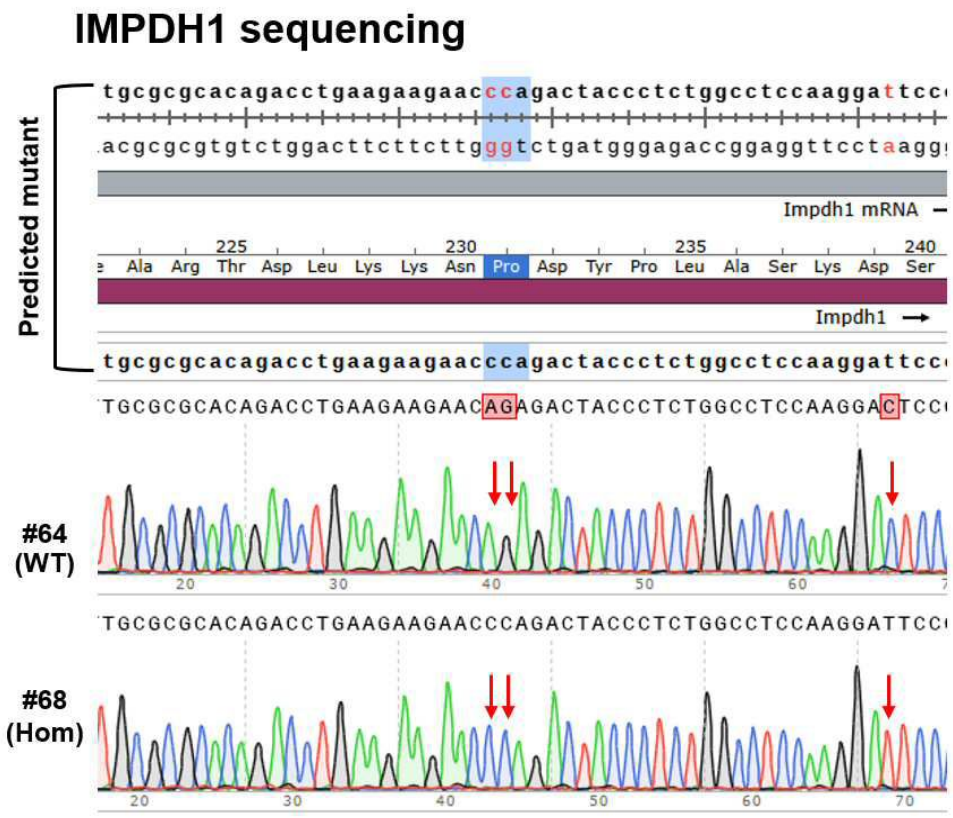
도면5a



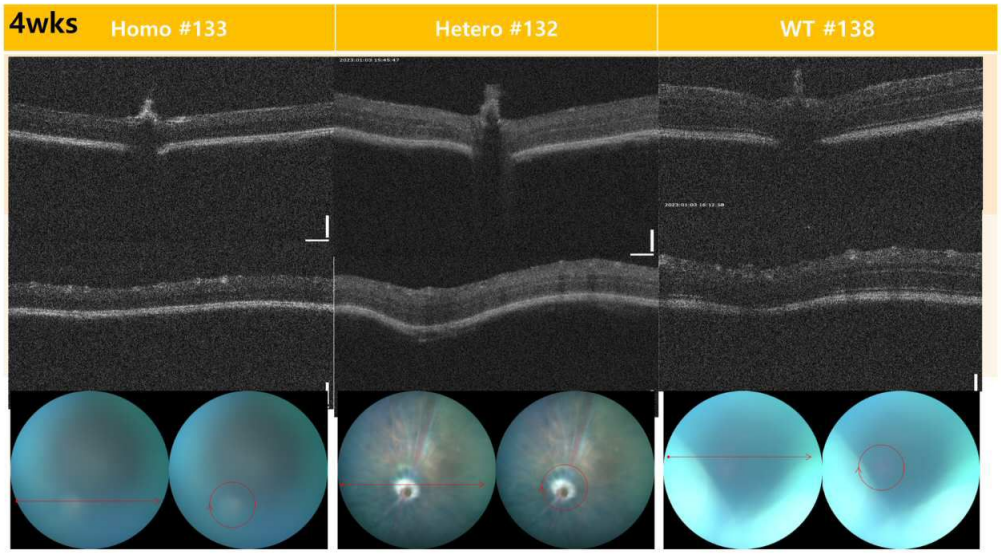
도면5b



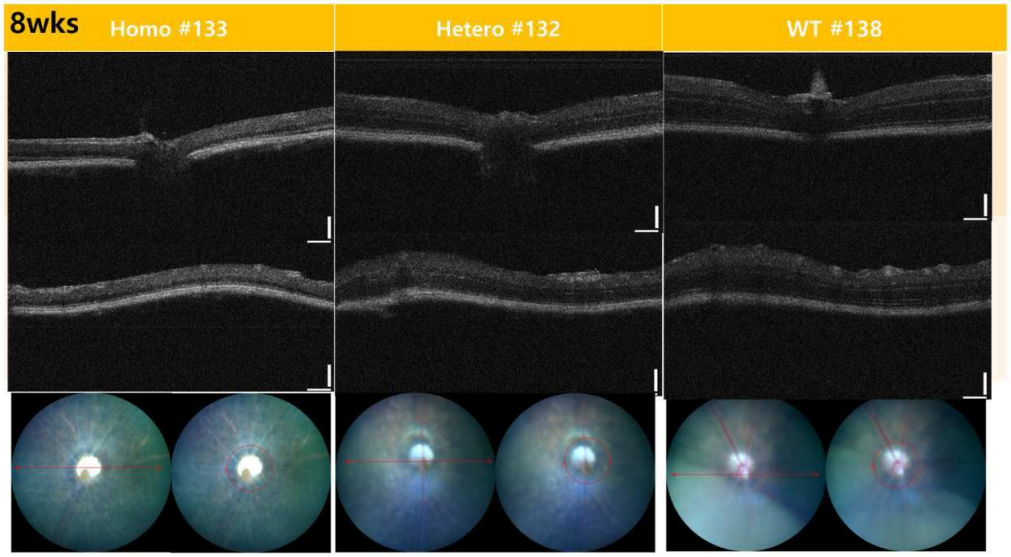
도면5c


IMPDH1 sequencing
Predicted mutant
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattcc
acgcgcgtgtctggacttcttcttgggtctgatgggagaccggaggttcctaagg
Impdh1 mRNA
225 230 235 240
Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Asp Ser
Impdh1
tgcgcgcacagacctgaagaagaacccagactaccctctggcctccaaggattcc
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACAGAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGACTCC
#64 (WT)
20 30 40 50 60
TGCGCGCACAGACCTGAAGAAGAACCCAGACTACCCTCTGGCCTCCAAGGATTCC
#68 (Hom)
20 30 40 50 60 70

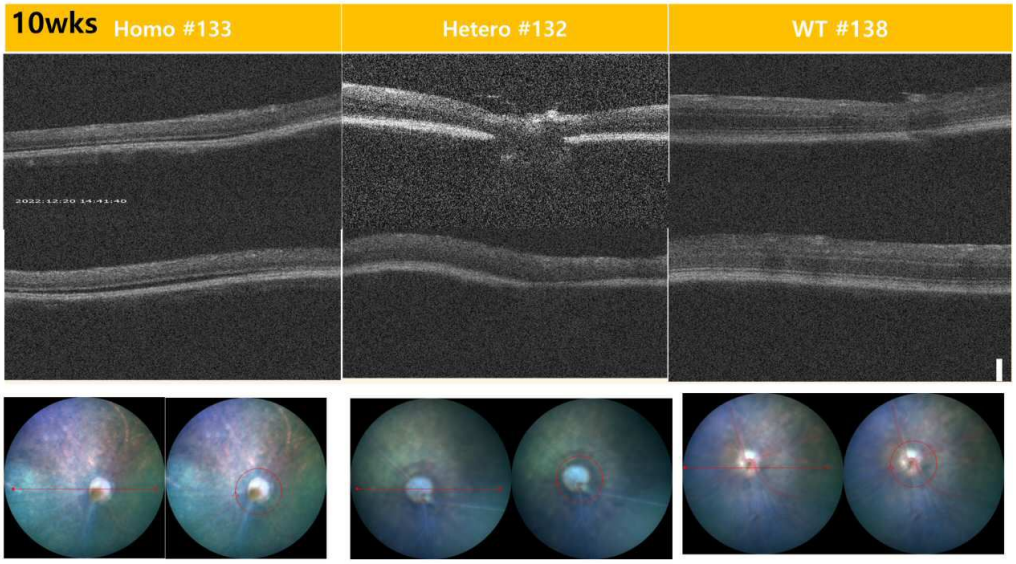
도면6a


4wks
Homo #133
Hetero #132
WT #138

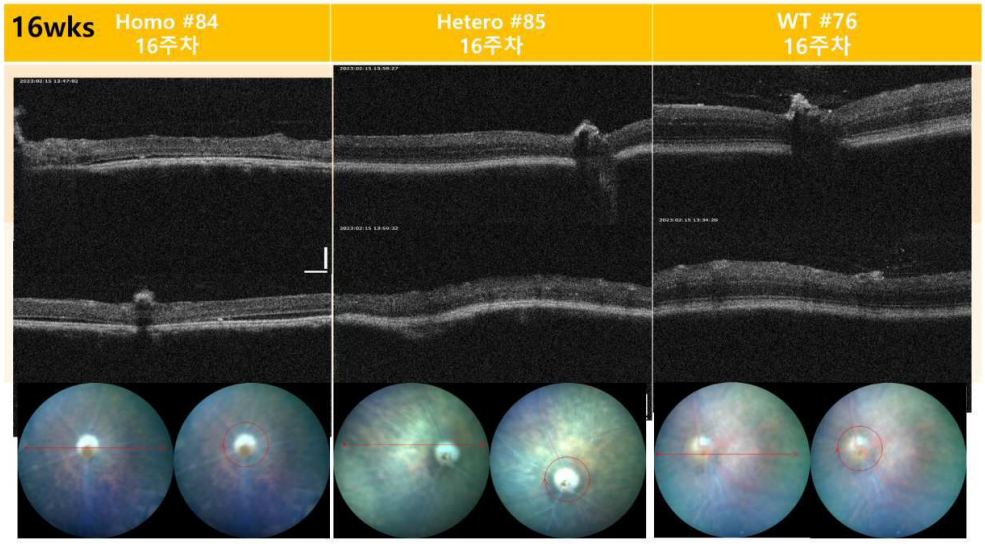
도면6b


8wks
Homo #133
Hetero #132
WT #138

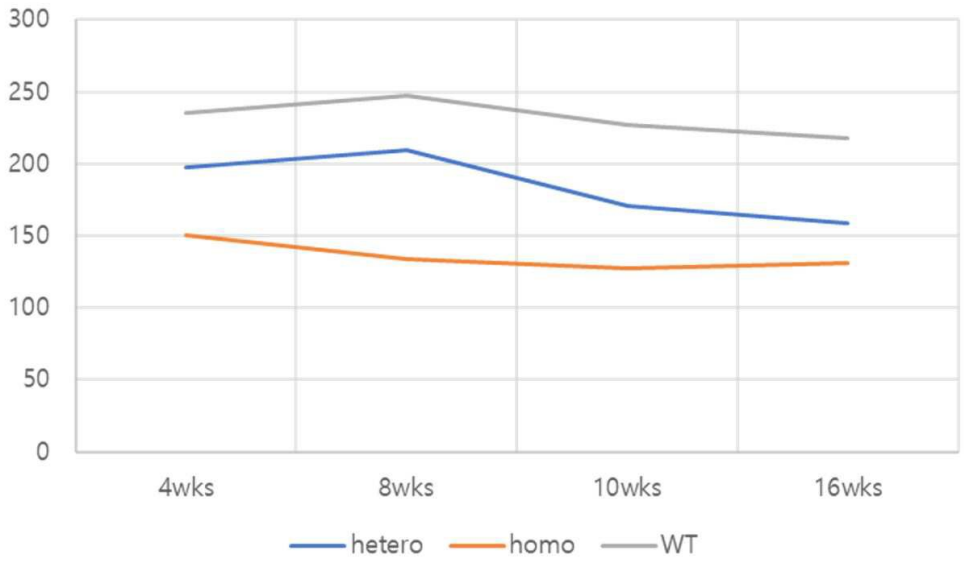
도면6c


10wks
Homo #133
Hetero #132
WT #138

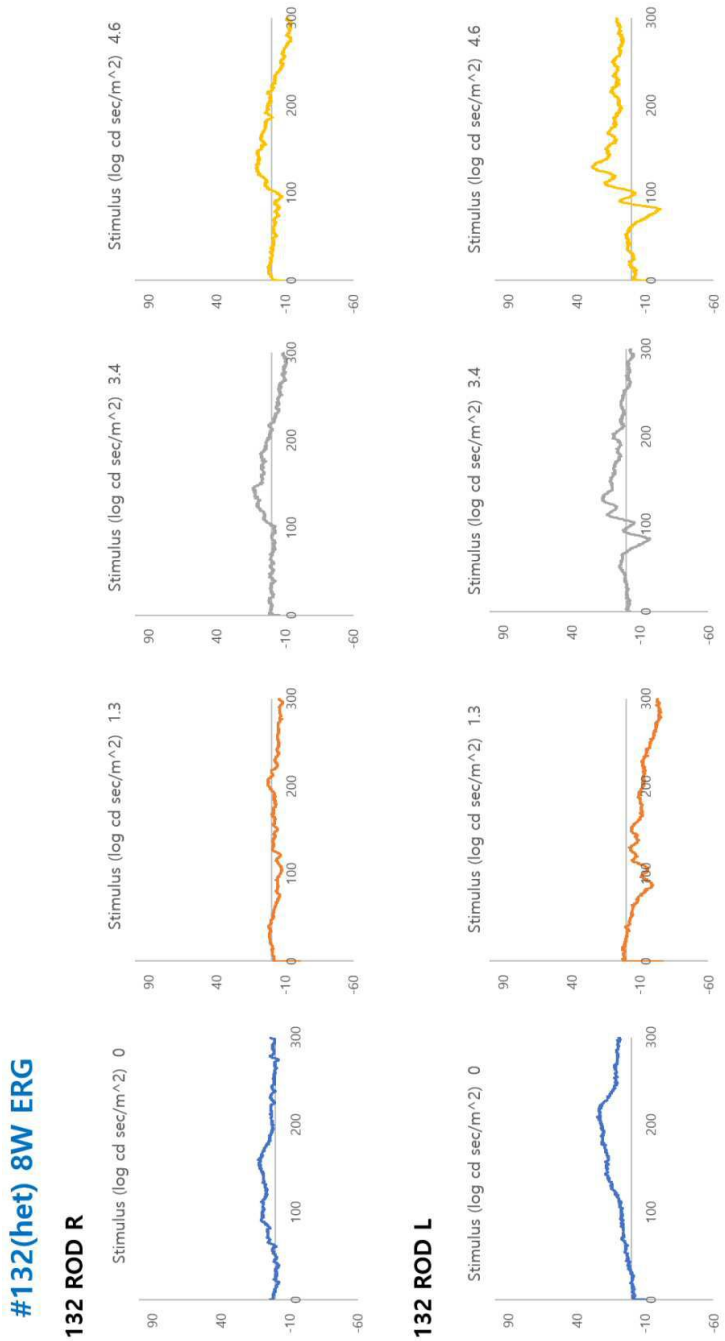
도면6d


16wks
Homo #84
16주차
Hetero #85
16주차
WT #76
16주차

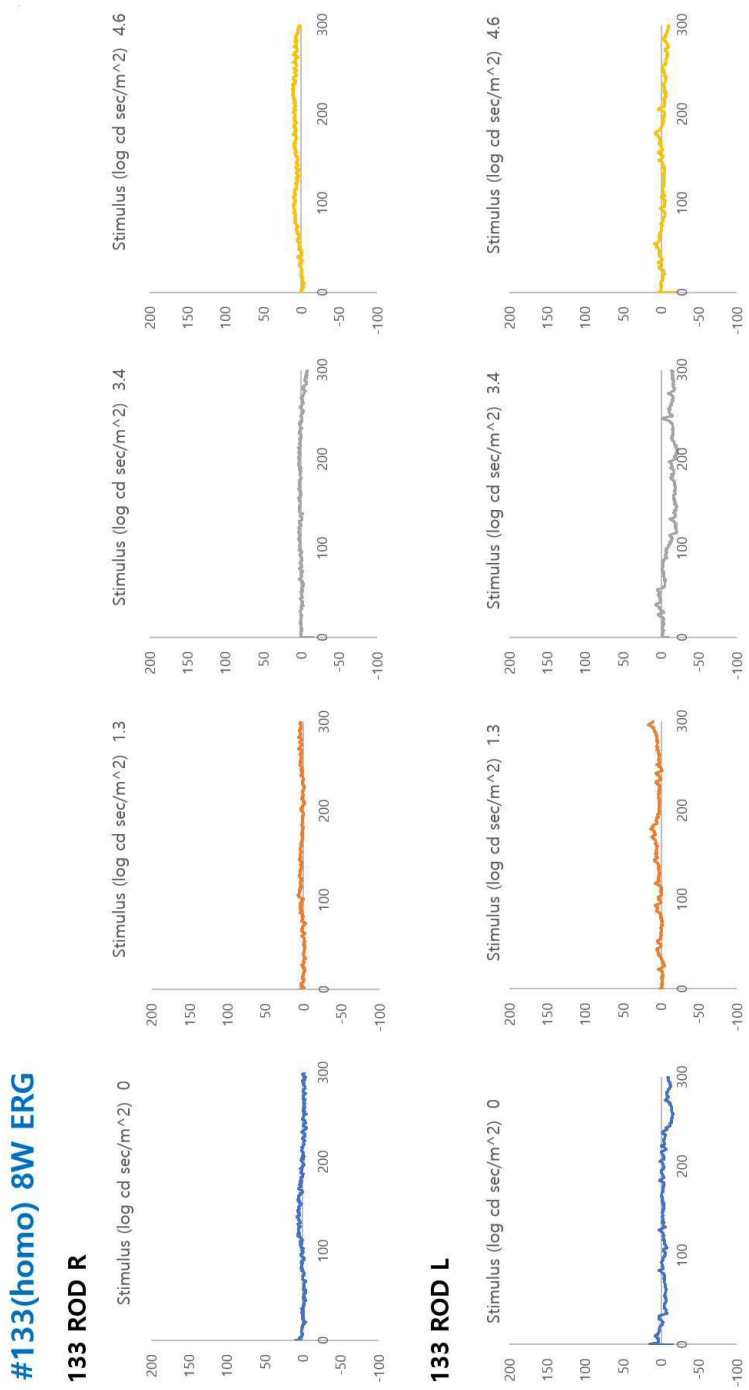
도면6e


300
250
200
150
100
50
0
4wks
8wks
10wks
16wks
hetero
homo
WT

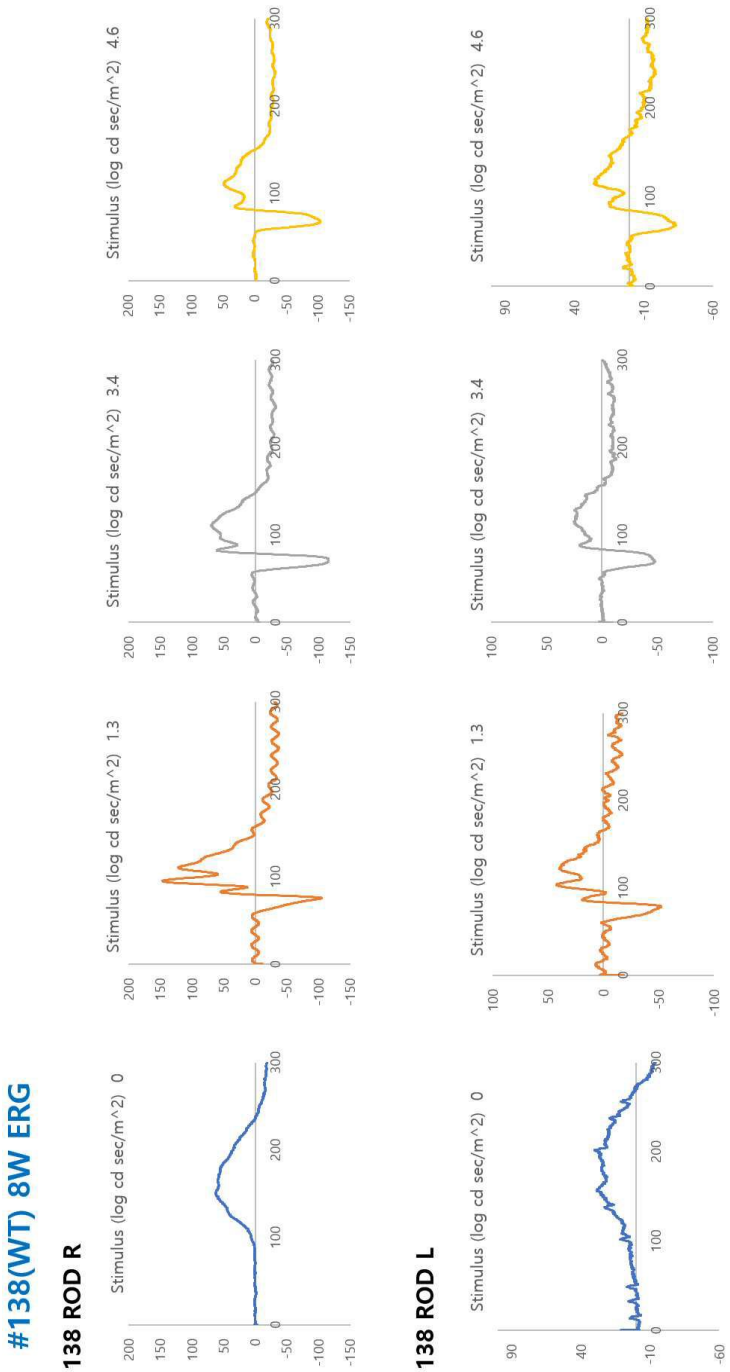
도면7a


#132(het) 8W ERG
132 ROD R
132 ROD L
Stimulus (log cd sec/m^2) 0
Stimulus (log cd sec/m^2) 1.3
Stimulus (log cd sec/m^2) 3.4
Stimulus (log cd sec/m^2) 4.6
90
40
-10
-60
0
100
200
300

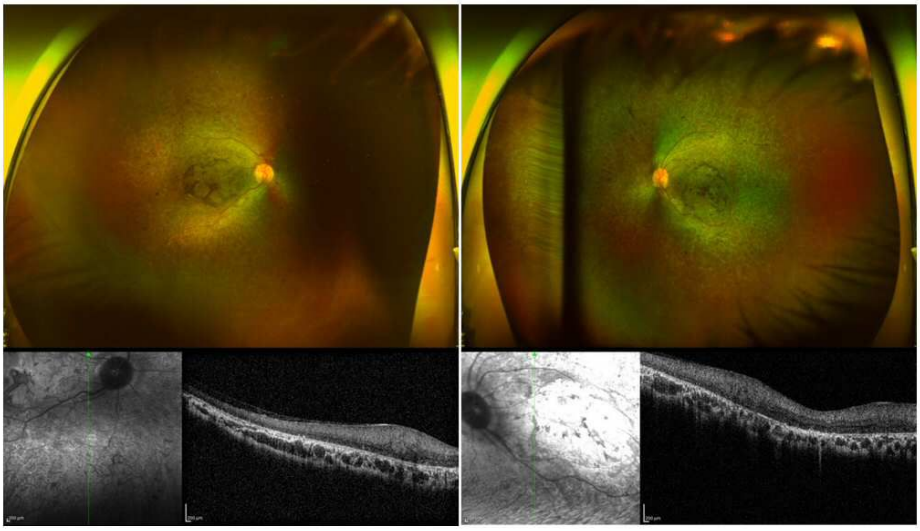
도면7b


#133(homo) 8W ERG
133 ROD R
133 ROD L
Stimulus (log cd sec/m^2) 0
Stimulus (log cd sec/m^2) 1.3
Stimulus (log cd sec/m^2) 3.4
Stimulus (log cd sec/m^2) 4.6
200
150
100
50
0
-50
-100
0
100
200
300

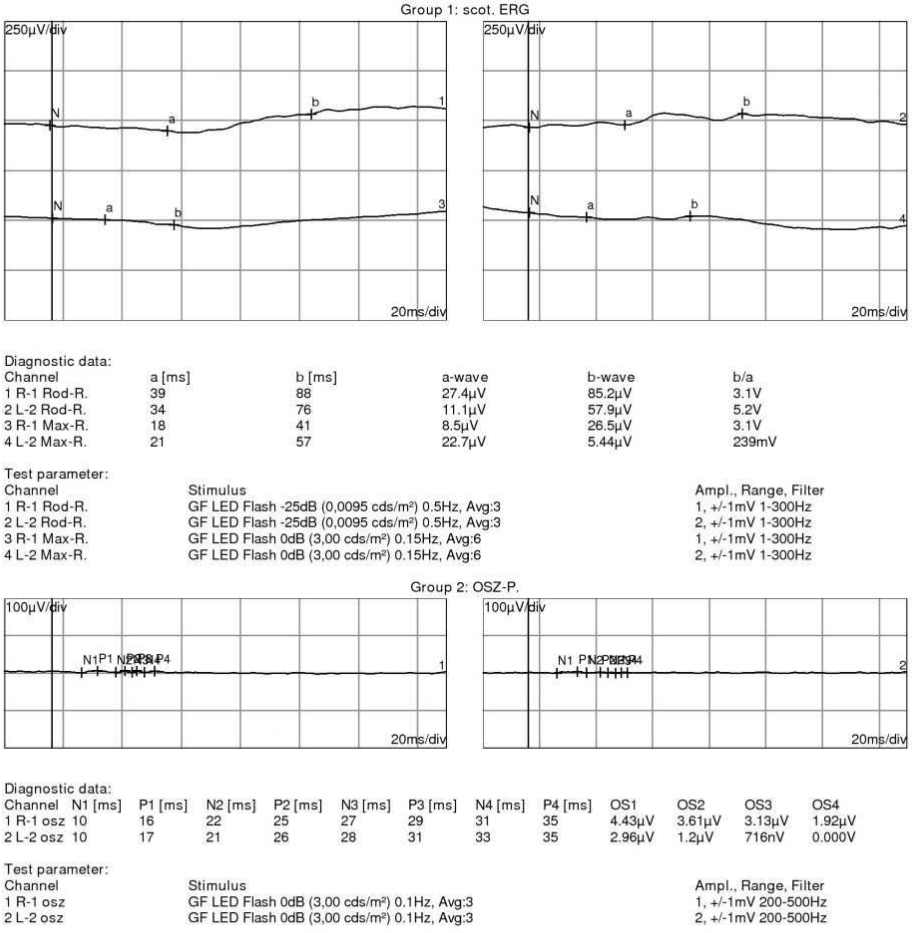
도면7c


#138(WT) 8W ERG
138 ROD R
138 ROD L
Stimulus (log cd sec/m^2) 4.6
Stimulus (log cd sec/m^2) 3.4
Stimulus (log cd sec/m^2) 1.3
Stimulus (log cd sec/m^2) 0

도면8a



도면8b



Diagnostic data:

Channel	a [ms]	b [ms]	a-wave	b-wave	b/a
1 R-1 Rod-R.	39	88	27.4µV	85.2µV	3.1V
2 L-2 Rod-R.	34	76	11.1µV	57.9µV	5.2V
3 R-1 Max-R.	18	41	8.5µV	26.5µV	3.1V
4 L-2 Max-R.	21	57	22.7µV	5.44µV	239mV

Test parameter:

Channel	Stimulus	Ampl., Range, Filter
1 R-1 Rod-R.	GF LED Flash -25dB (0,0095 cds/m²) 0.5Hz, Avg:3	1, +/-1mV 1-300Hz
2 L-2 Rod-R.	GF LED Flash -25dB (0,0095 cds/m²) 0.5Hz, Avg:3	2, +/-1mV 1-300Hz
3 R-1 Max-R.	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.15Hz, Avg:6	1, +/-1mV 1-300Hz
4 L-2 Max-R.	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.15Hz, Avg:6	2, +/-1mV 1-300Hz

Diagnostic data:

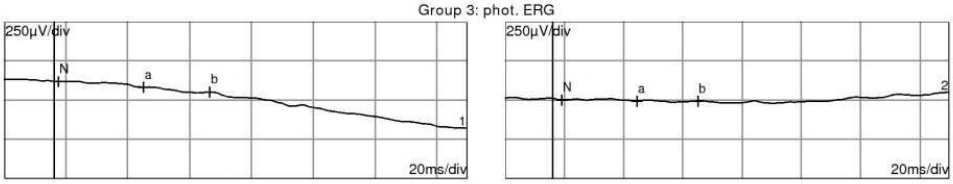
Channel	N1 [ms]	P1 [ms]	N2 [ms]	P2 [ms]	N3 [ms]	P3 [ms]	N4 [ms]	P4 [ms]	OS1	OS2	OS3	OS4
1 R-1 osz	10	16	22	25	27	29	31	35	4.43µV	3.61µV	3.13µV	1.92µV
2 L-2 osz	10	17	21	26	28	31	33	35	2.96µV	1.2µV	716nV	0.000V

Test parameter:

Channel	Stimulus	Ampl., Range, Filter
1 R-1 osz	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.1Hz, Avg:3	1, +/-1mV 200-500Hz
2 L-2 osz	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.1Hz, Avg:3	2, +/-1mV 200-500Hz

도면8c

Group 3: phot. ERG



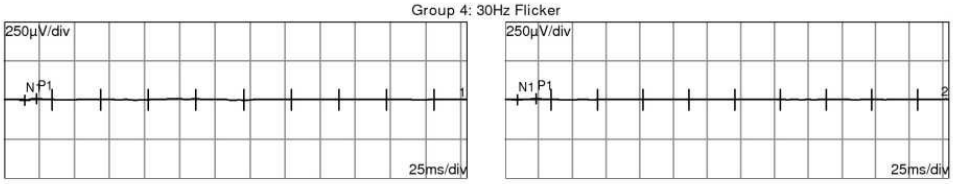
Diagnostic data:

Channel	a [ms]	b [ms]	a-wave	b-wave	b/a
1 R-1 Cone-R	29	50	36µV	29.7µV	824mV
2 L-2 Cone-R	28	49	9.46µV	258nV	27.3mV

Test parameter:

Channel	Stimulus	Ampl., Range, Filter
1 R-1 Cone-R	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.5Hz, Avg:3	1, +/-1mV 1-300Hz
2 L-2 Cone-R	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 0.5Hz, Avg:3	2, +/-1mV 1-300Hz

Group 4: 30Hz Flicker



Diagnostic data:

Channel	N1 [ms]	P1 [ms]	N1-P1	30Hz Amp
1 R-1 30Hz Flicker	15	23	8.99µV	478nV
2 L-2 30Hz Flicker	9	23	6.19µV	75.4nV

Test parameter:

Channel	Stimulus	Ampl., Range, Filter
1 R-1 30Hz Flicker	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 29.412Hz, Avg:16	1, +/-1mV 1-300Hz
2 L-2 30Hz Flicker	GF LED Flash 0dB (3,00 cds/m²) 29.412Hz, Avg:16	2, +/-1mV 1-300Hz

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.