

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 2월 2일 (02.02.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/008887 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C07K 1/12* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) *C07K 1/22* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/010989

(22) 국제출원일: 2022년 7월 26일 (26.07.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0097893 2021년 7월 26일 (26.07.2021) KR

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 04763 서울특별시 성동구 왕십리로 222, Seoul (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김정훈 (KIM, Jeong Hun); 06070 서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 106동 1001호, Seoul (KR). 우재성 (WOO, Jae-Sung); 06303 서울특별시 강남구 개포로15길 3-15, 101동 201호, Seoul (KR). 배상수 (BAE, Sang Su); 6597 서울특별시 서초구 고무래로 35, 103동 2301호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 702호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: BASE EDITOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 염기 편집기 및 이의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to a base editor, for example, a base editor in a ribonucleotide protein (RNP) complex form, and a use thereof for in vivo gene editing. When used, the base editor in an RNP complex form of the present invention reduces off-target effects and thus can effectively edit a target gene.

(57) 요약서: 본 발명은 염기 편집기, 예를 들어, 리보핵단백질(RNP) 복합체 형태의 염기 편집기, 및 이를 이용한 생체 내 유전자 교정 용도에 관한 것이다. 본 발명의 RNP 복합체 형태의 염기 편집기를 사용시 오프-타겟 효과를 감소시켜 표적 유전자를 효과적으로 교정할 수 있다.



WO 2023/008887 A1

명세서

발명의 명칭: 염기 편집기 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 염기 편집기, 예를 들어, 리보핵단백질(RNP) 복합체 형태의 염기 편집기, 및 이를 이용한 생체 내 유전자 교정 용도에 관한 것이다. 본 발명의 RNP 복합체 형태의 염기 편집기를 사용시 오프-타겟 효과를 감소시켜 표적 유전자를 효과적으로 교정할 수 있다.

배경기술

- [2] CRISPR/Cas9 system을 이용한 유전자 가위 기술은 현재의 유전자 치료 기술에 매우 비약적인 발전을 가져왔다. 이러한 유전자가위들은 공통적으로 DNA 이중나선의 절단(DNA double strand break; DSB)을 유도하게 된다. 그러면 살아있는 세포는 이러한 DSB를 심각한 손상으로 인식하고 이를 복구하기 위한 시스템을 가동한다. 구체적으로, 복구의 속도는 빠르지만 복구원본에 의존하지 않기 때문에 다양한 유전자서열의 변형이 유도되는 비상동말단연결(Non-Homologous End-Joining; NHEJ)과 주형가닥을 통하여 정확한 복구가 가능한 상동재조합(Homologous Direct Repair; HDR) 두 가지 경로를 이용하여 잘린 DNA 가닥을 복구한다. 유전자의 제거를 위해서는 NHEJ 경로가, 유전자의 교정, 삽입을 위해서는 HDR 경로가 통상 이용된다.
- [3] 그런데 HDR에 의한 교정은 매우 비효율적인 것으로 알려져 있으며, 특히 Cas9 nuclease에 의한 DNA 절단은 종종 표적 부위에 원치않는 DNA의 삽입이나 결실(indel)을 일으키곤 한다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 CRISPR/Cas 시스템의 절단 기능을 제거하고 특정 DNA 서열을 인식하는 특정만을 이용하여 사용하기도 한다. 절단기능이 제거된(catalytically impaired) Cas9 단백질(dead Cas9; dCas9)에 다양한 유전자 조절인자들을 결합하여 사용한다. 특히 4세대 유전자 가위 기술이라고 불리는 염기교정 유전자가위(base editor; 이하 "염기 편집기"라고도 함)를 이용하면, 특정 서열을 교정하거나 교체하여 유전자를 결손시키거나 원하는 형질로 전환할 수 있다.
- [4] 염기 편집기로는 크게 2가지 종류가 사용되고 있다. 즉, CRISPR/Cas9의 이중가닥 DNA 절단기능을 제거하거나(dCas9), 단일 가닥 DNA 절단기능만을 제거한 Cas9 nickase (nCas9)에 시토신 탈아미노효소(cytidine deaminase)를 결합하여 DNA 서열 중 시토신(C)만 찾아 티민(T)으로 교체할 수 있는 cytidine base editor(CBE)와, 아데닌 탈아미노효소(Adenine deaminase)를 결합하여 아데닌(A)을 구아닌(G)으로 교체할 수 있는 adenine base editor(ABE)가 있다. 이러한 염기 편집기는 DNA 이중나선의 절단(DSB)을 거의 생성하지 않으며 기증자 DNA 템플릿이 필요하지 않다. 따라서 염기 편집기는 식물 게놈 공학, 마우스 접합체 공학, 생물 의학 응용 등 광범위한 연구 분야에서 널리 활용되고

있다.

- [5] 그러나, CRISPR nuclease와 유사하게, 염기 편집기는 단일 가이드 RNA (sgRNA) 의존적인 게놈 전반에서 off-target 효과를 나타낸다. ABE는 또한 표적서열 모티프에 위치한 아데닌 이외에 시토신의 전환을 촉매하는 것으로 밝혀졌다. 또한, CBE는 게놈에서 sgRNA와는 무관하게 무차별 DNA 탈아미노화를 유발하며, CBE와 ABE는 모두 RNA 전사체에서 전사체 전반의 무차별 RNA 탈아미노화를 유도한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 Cas9 effector engineering 기법을 사용하거나 또는 cytidine/adenine deaminase을 변형시켜보았으나, 문제가 완전히 해결되지는 않았다.
- [6] off-target 효과를 개선시키기 위한 또다른 방법은 염기 편집기를 전달하는 수단을 변경해보는 것이다. 염기 편집기와 sgRNA를 암호화하는 박테리아 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 세포 내 전달하는 방식을 사용하는 경우, 외인성 염기 편집기가 세포 내에서 지속적으로 생성되고 세포 내 농도를 제어하기 어렵기 때문에 일반적으로 높은 off-target 편집 속도를 초래하고 그에 따라 off-target 효과가 누적된다.
- [7] Off-target 효과를 줄이기 위해, 대조적으로, 염기 편집기-sgRNA-RNP 복합체의 형태로 사용하기도 하나, 현재 RNP 시스템은 생물학적 분야에서 널리 사용되지 못하고 있으며, 염기 편집기 단백질을 고순도 및 고수율로 제조하기가 어렵다는 문제도 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 염기 편집기, 예를 들어, 리보핵단백질(RNP) 복합체 형태의 염기 편집기를 제공하고자 한다.
- [9] 본 발명은 또한 RNP 복합체 형태의 염기 편집기를 사용하여 생체 내 유전자를 교정하고자 하며, 특히, 오프-타겟 효과를 감소시켜 질환, 예컨대, 망막 변성 질환과 같은 망막 기능장애와 연관된 표적 유전자를 효과적으로 교정하고자 한다.
- [10] 본 발명은 또한 염기 편집기를 고순도로 정제하는 시스템 또는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 일 실시태양에서, 본 발명은 Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [12] 일 실시태양에서, 본 발명은 (i) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질; 및 (ii) 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 복합체를 제공하며, 여기서 gRNA는 상기 융합 단백질의 Cas9 도메인에 결합된다.
- [13] 일 실시태양에서, 본 발명은

- [14] (i) Cas9 도메인; 및 아데닌 테아미나제 도메인 또는 시티딘 테아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질; 및
- [15] (ii) 가이드 RNA (gRNA)
- [16] 를 포함하는, 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하며, 특히 망막 기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [17] 일 구체적 실시태양에서, 상기 융합 단백질은 우라실 글리코실라제 억제제(UGI) 도메인을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)인 것일 수 있다.
- [18] 일 구체적 실시태양에서, 상기 Cas9 도메인은 뉴클레오티드 듀플렉스 중 뉴클레오티드 표적 가닥을 절단하는 nCas9일 수 있거나, 또는 상기 Cas9 도메인은 표적 핵산 서열의 프로토스페이서 인접 모티브(PAM)을 인식하며, 상기 PAM은 NGG 또는 NG일 수 있다.
- [19] 일 구체적 실시태양에서, 상기 망막 기능장애는 유전자 돌연변이, 예컨대 점 돌연변이에 의해 발병되는 것일 수 있다. 상기 망막 기능장애는 망막 변성 질환; 색소성 망막염; 망막 색소 변성; 혈관무늬 병증; 드루젠(Drusen); 레베르 선천성 흑암시(lebers congenital amaurosis); 유전성 또는 후천성 황반 변성; 연령 관련 황반 변성(AMD); 베스트병(Best disease); 망막 박리; 뇌회형 위축; 맥락막결손; 패턴 이영양증; 망막 색소 상피(RPE) 이영양증; 스타르가르트병(Stargardt disease); 광, 레이저, 감염, 방사선, 신생혈관 또는 외상성 손상 중 어느 하나에 의해 야기된 망막 색소 상피(RPE) 및 망막 손상으로부터 선택되는 것; 망막형성장애; 색맹; 범맥락막위축; 근시성 맥락막신생혈관; 결절맥락막혈관병증; 중심장액맥락망막병증; 황반원공; 황반이상증; 당뇨망막병증; 망막동정맥폐쇄; 고혈압성 망막병증; 망막대동맥류; 안허혈증후군; 미숙아망막병증; 급성망막괴사; 거대세포 바이러스 망막염; 독소플라스마 망막맥락막염; 매독성 맥락망막염; 망막박리; 또는 망막모세포종일 수 있다.
- [20] 일 구체적 실시태양에서, 상기 gRNA는 상기 망막 기능장애와 관련된 표적 서열에 상보적인 인접 뉴클레오티드(contiguous nucleotides)의 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 표적 서열은 상기 망막 기능장애와 관련된 점 돌연변이를 포함하는 것일 수 있다.
- [21] 일 구체적 실시태양에서, 상기 융합 단백질 또는 복합체가 상기 점 돌연변이를 교정시키는 것일 수 있다. 이 때 상기 점 돌연변이는 T에서 C로의 점 돌연변이를 포함하고, 돌연변이체 C 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환과 관련되지 않은 서열을 발생시키는 것이거나; 또는 상기 점 돌연변이는 G에서 A로의 점 돌연변이를 포함하고, 돌연변이체 A 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환과 관련되지 않은 서열을 발생시키는 것일 수 있다.
- [22] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) Cas9 도메인; 및 아데닌 테아미나제 도메인

또는 시터딘 테아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 세포에서 발현시키는 단계이며, 상기 융합 단백질은 추가로 친화성 태그를 포함하는 것인 단계;

- [23] (b) 단계 (a)에서 발현된 융합 단백질을 용해시켜 용해물을 생성하는 단계;
- [24] (c) 단계 (b)의 용해물을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 1차 정제하는 단계;
- [25] (d) 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 2차 정제하는 단계; 및
- [26] (e) 단계 (d)에서 정제된 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 3차 정제하는 단계
- [27] 를 포함하는, 융합 단백질의 정제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [28] 본 발명의 염기 편집기 단백질 및 gRNA, 특히, ABE/CBE RNP 복합체의 전달을 통한 염기 편집은 플라스미드로 인코딩된 ABE/CBE 전달을 통한 염기 편집과 비교하여 DNA와 RNA 모두에서 감소된 오프-타겟 효과를 나타낸다. RNP 복합체 매개 염기 편집의 감소된 오프-타겟 효과로 인해 본 발명의 ABE/CBE RNP 복합체는 특히 치료 응용 분야에서 매우 유익할 것으로 예상된다.
- [29] 또한, 본 발명의 ABE RNP 복합체인 NG-ABEmax RNP를 사용하여 망막 변성 12 (*rd12*) 모델 마우스에서 생체 내 유전자 교정을 유도할 수 있음이 확인되었다. 이에 따라 본 발명의 염기 편집기 단백질 또는 이의 RNP는 안질환 관련 치료분야, 예컨대 망막 변성 질환과 같은 망막 기능장애의 치료에 특히 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 인간 세포 발현 시스템에서 ABE / CBE 단백질의 정제 과정 및 그 결과를 나타낸다.
- [31] a. 염기 편집기 정제 과정의 모식도를 나타낸다.
- [32] b. 정제된 염기 편집기. 크기 배제 크로마토그래피로부터의 ABEmax 또는 AncBE4max의 피크 분획을 수집하고, 농축하고, SDS-PAGE로 분석하였다.
- [33] c. UGI 과발현을 포함하거나 포함하지 않는 RNP- 및 플라스미드-매개 CBE 전달 후 HEK293T 세포에서 target C로부터 전환된 특정 편집된 뉴클레오티드(edited nucleotide)에 대한 서열 판독 백분율(%)을 나타낸다.
- [34] d. RNP- 및 플라스미드-매개 ABE/CBE 전달 및 GFP 벡터 전달 후 HEK293T 세포의 생존력을 나타낸다. 생존율은 CCK-8 분석을 사용하여 결정하였다.
- [35] 도 2는 염기 편집기 발현 및 정제를 위한 구조물(construct) 및 RNP- 및 플라스미드-매개 ABE 및 CBE DNA 편집의 특성을 나타낸다. 구체적으로는 염기 편집기 단백질을 발현하는데 사용되는 pEX-FlagR-ABEmax 및 pEX-FlagR-BE4max 플라스미드의 모식도를 나타낸다(본 발명에서는 ABEmax

및 AncBE4max를 사용함). 의 해칭 부분은 링커 펩티드를 나타낸다.

- [36] 도 3은 RNP 및 플라스미드 매개 ABE 및 CBE DNA 편집의 특성을 보여준다.
- [37] a 및 c. 각각 19개 또는 8개의 게놈 부위에서 RNP- 및 플라스미드-매개 ABE (a) 또는 CBE (c) 전달 후 HEK293T 세포에서의 염기 편집 정도를 나타낸다. 총 시퀀싱 read 중 위치 2-11에서의 A 변환 (ABE의 경우) 또는 C 변환 (CBE의 경우)을 포함하는 시퀀싱 read의 백분율로 나타내었다. 막대는 평균값을 나타내고, 오차 막대는 3개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [38] b 및 d. 각각 19개 또는 8개의 게놈 부위에서 RNP- 및 플라스미드-매개 ABE (b) 또는 CBE (d) 전달 후 HEK293T 세포에서의 Indel을 나타낸다. 총 시퀀싱 read 중 indel이 있는 시퀀싱 read의 백분율로 나타내었다. 점들은 각 표적에 대한 3개의 독립적인 생물학적 replicate의 평균값을 나타낸다. 오차 막대는 점들로 표시된 값의 s.e.m을 나타낸다.
- [39] 도 4는 RNP 및 플라스미드 매개 편집 특성 및 인간 내인성 DNA 표적 부위를 나타낸다.
- [40] a 및 b. ABE 편집 대립 유전자의 염기 변환 수를 나타낸다. 막대는 A 변환을 포함하는 총 read 수에 대한 단일() , 이중() 또는 삼중() A 변환을 포함하는 read 수의 비율을 나타낸다. (a)에서 ABE_site 5의 가장 일반적인 서열 (위치 1-20)이 시각화되며 빈도는 오른쪽에 표시된다. 해칭 표현된 뉴클레오티드는 편집된 서열을 나타낸다.
- [41] c 및 d. 상이한 표적 부위에서의 CBE 편집 대립 유전자에서의 염기 전환 수를 나타낸다. 막대는 단일() , 이중() 또는 삼중() C 변환을 포함하는 read 수와 C 변환을 포함하는 총 read 수의 비율을 나타낸다.
- [42] (a)-(d)에서 오차 막대는 세 개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [43] e. ABE-인코딩 플라스미드의 형질 감염 후 여러 시점에서의 HEK293T 세포의 ABE 편집 효율을 나타낸다.
- [44] f. ABE-인코딩 플라스미드의 형질 감염 후 여러 시점에서 ABE 편집 대립 유전자의 염기 전환의 수를 나타낸다. 오차 막대는 두 개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [45] g 및 h. sgRNA 부재 하에서 ABE 단백질 () 또는 ABE 인코딩 플라스미드 ()의 형질 감염 후 여러 시점에서 HEK293T 세포에서의 ABE 풍부도 분석 결과를 나타낸다. (g)에서 각각의 점은 주어진 전달 방법에 대해 얻은 최대 풍부도 대비 ABE 풍부도를 나타낸다. (h)에서 막대는 형질 감염 6시간 후에 플라스미드 매개 발현으로부터 얻은 것 대비 ABE 풍부도를 나타낸다. 점 (g)와 막대 (h)는 두 개의 독립적인 생물학적 replicate의 평균값을 나타낸다.
- [46] 도 5는 상대적 ABE 풍부도를 추정하기 위한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다.

- [47] a. sgRNA의 부재 하에 ABE 단백질 또는 ABE 인코딩 플라스미드의 전달 후 여러 시점에서 HEK293T 세포에서의 ABE 풍부도를 추정하는데 사용되는 웨스턴 블롯의 대표적인 이미지를 나타낸다.
- [48] b. sgRNA의 존재 하에 ABE 단백질 (—●—) 또는 ABE 인코딩 플라스미드 (—▲—)의 형질 감염 후 여러 시점에서 HEK293T 세포에서의 ABE 풍부도 분석한 결과를 나타낸다. 위쪽 그래프에서, 각각의 점들은 주어진 전달 방법에 대해 얻은 최대 풍부도 대비 ABE 풍부도를 나타낸다. 아래쪽 그래프에서 막대는 형질 감염 24시간 후에 플라스미드 매개 발현에서 얻은 것 대비 ABE 풍부도를 나타낸다. 위쪽 그래프의 점들과 아래쪽 그래프의 막대는 2개의 독립적인 생물학적 replicate의 평균 값을 나타낸다.
- [49] c. (b)에서 ABE 풍부도를 추정하는데 사용된 웨스턴 블롯의 대표적인 이미지를 나타낸다.
- [50] 도 6은 mRNA-매개 ABE 편집 및 화학적으로 합성된 sgRNA-매개 ABE 편집의 최적화 결과를 나타낸다.
- [51] a. 시험관 내에서 전사된 상이한 용량의 sgRNA를 사용하여 3.0 μ g의 ABE 인코딩 mRNA 전달 후 HEK293T 세포의 염기 편집 정도를 나타낸다. 막대는 2개의 독립적인 생물학적 replicate의 평균값을 나타낸다.
- [52] b. HEK_site 2를 표적으로 하는 화학적으로 합성된 sgRNA를 사용한 ABE RNP 또는 ABE 인코딩 mRNA 전달 후 HEK293T 세포의 염기 편집 정도를 나타낸다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 4개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [53] 도 7은 ABE-매개 DNA 오프-타겟 효과의 전달-의존적 변이를 나타낸다.
- [54] a. ABE RNP, ABE-인코딩 mRNA 및 ABE-인코딩 플라스미드 전달 후 HEK293T 세포에서의 오프-타겟 DNA 염기 편집을 나타낸다. A-to-G 편집 효율성(상단 패널)과 온 타겟 A-to-G 편집 효율성 대비 오프-타겟 비율(하단 패널)을 표시하였다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 세 개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [55] b. orthogonal R-loop 분석의 모식도를 나타낸다.
- [56] c 및 d. orthogonal R-loop 분석에 의해 검출된 sgRNA 독립적 오프-타겟 DNA 편집 빈도를 나타낸다. (c)에서는 ABE RNP 또는 ABE 인코딩 플라스미드를, (d)에서는 CBE RNP 또는 CBE 인코딩 플라스미드를 각각 사용하여, 각각의 R-loop에 대해, HEK_site 2를 표적화하는 sgRNA, 및 R-loop 5 또는 6을 표적화하는 SaCas9 sgRNA와 함께 dSaCas9-인코딩 플라스미드와 함께 공동 형질 감염하여 수행하였다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 세 개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m.을 나타낸다.
- [57] 도 8은 ABE-매개 RNA 오프-타겟 효과의 전달 의존적 변이를 나타낸다.
- [58] a. sgRNA의 존재 하에 ABE RNP, ABE-인코딩 mRNA, 및 ABE-인코딩 플라스미드 전달 후 HEK293T 세포에서의 오프-타겟 RNA 염기 편집 정도를

- 나타낸다. A-to-I mRNA 편집의 효율성을 나타낸다. 녹색 형광 단백질 (GFP)을 인코딩하는 플라스미드의 전달을 대조군으로서 사용하였다. 막대는 평균값을 나타내고 오류 막대는 4개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [59] b. sgRNA의 부재 하에 ABE 단백질 및 ABE 인코딩 플라스미드 전달 후 HEK293T 세포에서의 오프-타겟 RNA 염기 편집. A-to-I mRNA 편집의 효율성을 나타낸다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 4개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [60] 도 9는 생체 내 DNA 편집을 위해 화학적으로 합성된 sgRNA 또는 NG-ABEmax를 사용한 RNP 매개 DNA 편집의 활성을 보여준다.
- [61] a. 망막 하 주사를 통한 마우스로의 ABEmax RNP 전달의 개략도를 나타낸다. RNP (점으로 채워진 원)는 양이온성 지질 나노 입자로 캡슐화되었다.
- [62] b. 정상 마우스에서의 생체 내 ABE RNP 매개 DNA 편집의 효율성을 나타내기 위해 사용된 *Fah*, *Vegfa*, *Nr2e3*의 DNA 서열을 나타낸다.
- [63] c. NG-ABEmax RNP 전달 후 HEK293T 세포의 3개 게놈 부위에서의 염기 편집 정도를 나타낸다. 총 시퀀싱 read 중 위치 2-11에 A 변환을 포함하는 시퀀싱 read의 백분율을 나타낸다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 3개의 독립적인 생물학적 replicate의 s.e.m을 나타낸다.
- [64] 도 10은 *rd12* 마우스에서의 질병 관련 돌연변이의 NG-ABEmax RNP-매개 보정 정도를 나타낸다.
- [65] a. *rd12* 마우스의 *Rpe65*에서의 넌센스 돌연변이의 NG-ABEmax RNP 매개 교정 전략을 나타낸다.
- [66] b. 다양한 sgRNA를 사용하는 *rd12* mEF에서의 NG-ABEmax RNP 매개 돌연변이 보정의 효율성을 보여준다. 대조군은 sgRNA가 없는 NG-ABEmax이다. 막대는 두 개의 독립적인 replicate의 평균값을 나타낸다. gX19 및 gX20은 각각 19- 및 20-nt 스페이서를 함유하며 mismatched 5'G를 갖는 시험관 내 전사된 sgRNA를 나타낸다. X19 및 X20은 각각 19-nt 스페이서와 20-nt 스페이서를 함유하는 화학적으로 합성된 sgRNA를 나타낸다. gX19+CIP는 gX19와 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP, NEB)를 함께 처리한 것을 나타낸다.
- [67] c. 망막 하 주사를 통한 *rd12* 마우스의 NG-ABEmax RNP- 매개 처리의 개략도를 나타낸다. RNP (점으로 채워진 원)는 양이온성 지질 나노 입자로 캡슐화되었다.
- [68] d. 주사 후 6 시간에 *rd12* 마우스로부터의 RPE의 대표적인 공초점 현미경 사진이다. 스케일 바는 10 μ m임.
- [69] e. *rd12* 마우스에서 NG-ABEmax RNP 매개 돌연변이 보정의 효율성 (n = 8)을 나타낸다. NG-ABEmax RNP가 주입되거나 주입되지 않은 눈의 RPE로부터 얻은 게놈 DNA를 분석하여 표적 A-to-G 편집 효율성을 결정하였다. 막대는 평균값을 나타내고 오차 막대는 8개의 독립적인 반복실험의 s.e.m을 나타낸다. Mann-Whitney 테스트에 의한 ***P < 0.001.
- [70] f. NG-ABEmax RNP를 주사한 *rd12* 마우스로부터의 RPE에서 *Rpe65* mRNA의

상대적 발현도를 나타낸다 (n = 4).

- [71] g. 주사 5주 후에 rd12 마우스로부터의 RPE의 대표적인 공초점 현미경 이미지이다. 스케일 바는 10 μm 임. ***P < 0.001 (Dunn's 다중 비교 테스트를 사용한 Kruskal-Wallis 테스트). Non-target : 비표적화 sgRNA를 포함하는 NG-ABEmax RNP를 주사한 비표적 rd12 마우스; Target : 표적화 sgRNA를 포함하는 NG-ABEmax RNP가 주사된 표적 rd12 마우스.
- [72] 도 11은 rd12 마우스에서 질병 관련 돌연변이를 수정하기 위한 생체 내 NG-ABEmax RNP 처리 결과를 보여준다.
- [73] a. NG-ABEmax RNP 주사 72시간 후에 rd12 마우스로부터의 RPE의 대표적인 공초점 현미경 사진이다. 스케일 바는 10 μm 임.
- [74] b. NG-ABEmax 및 표적 sgRNA를 주사한 유년기 및 성체 rd12 마우스의 눈으로부터의 RPE에서 분리된 DNA로부터의 대표적인 서열 분석 결과를 나타낸다. rd12 마우스의 돌연변이된 T 뉴클레오티드와 이 위치에서의 보정 효율은 의 해칭으로 표시된다.

발명의 실시를 위한 형태

- [75] 융합 단백질, gRNA 및 이들의 복합체
- [76] 본 발명은 Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [77] 일 실시태양에서, 본 발명은 (i) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질; 및 (ii) 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 복합체를 제공하며, 여기서 gRNA는 상기 융합 단백질의 Cas9 도메인에 결합된다.
- [78] 본원에 사용된 용어 "Cas9" 또는 "Cas9 뉴클레아제"는 Cas9 단백질, 또는 그의 단편 (예를 들어, Cas9의 활성, 불활성, 또는 부분적 활성 DNA 절단 도메인, 에컨대, Cas 니카제, 및/또는 Cas9의 gRNA 결합 도메인을 포함하는 단백질)을 포함하는 RNA-안내된 뉴클레아제를 지칭한다. Cas9은 가이드 RNA와 결합하여 타겟하는 유전자 또는 핵산의 서열 또는 위치를 절단 또는 변형시키는 효소로서, 가이드 RNA가 상보적인 결합을 하는 핵산 가닥(strand)을 절단할 수 있는 HNH 도메인, 가이드 RNA와 비상보적인 결합을 하는 핵산 가닥(strand)을 절단할 수 있는 RuvC 도메인, 타겟을 인식하는 REC 도메인 및 PAM을 인식하는 PI 도메인으로 구성될 수 있다. 구체적인 Cas9의 서열 및 구조는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Ferretti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001)]; [Deltcheva E. et al., Nature 471:602-607(2011)]; 및 [Jinek M. et al., Science 337:816-821(2012)] 참조, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨).
- [79] Cas9의 불활성 단백질은 호환적으로 "dCas9" 단백질(즉, 뉴클레아제-"죽은" Cas9)로 지칭될 수 있다. 불활성 DNA 절단 도메인을 갖는 Cas9 단백질 (또는

그의 단편)을 생성하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Jinek et al., Science. 337:816-821(2012)]; [Qi et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression" (2013) Cell.

28;152(5):1173-83] 참조, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨).

- [80] 본원에 사용된 용어 "Cas9 니카제" 또는 "nCas9"은 듀플렉스 핵산 분자 (예를 들어, 듀플렉스 DNA 분자)의 단지 1개의 가닥만을 절단할 수 있는 Cas9 단백질을 지칭한다. 이에 따라, 본 발명의 Cas9 도메인은 뉴클레오티드 듀플렉스 중 뉴클레오티드 표적 가닥을 절단하는 nCas9일 수 있다.
- [81] 일 실시태양에서, Cas9의 단편을 포함하는 단백질이 제공된다. 예를 들어, 상기 단백질은 2개의 Cas9 도메인 중 1개를 포함한다: (1) Cas9의 gRNA 결합 도메인; 또는 (2) Cas9의 DNA 절단 도메인. 일 실시태양에서, Cas9 또는 그의 단편을 포함하는 단백질은 "Cas9 변이체"로 지칭된다. Cas9 변이체는 Cas9, 또는 그의 단편에 대한 상동성을 공유한다.
- [82] 본원에 사용된 용어 "데아미나제" 또는 "데아미나제 도메인"은 탈아미노화 반응을 촉매하는 단백질 또는 효소를 지칭한다. 일 실시태양에서, 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 아데닌 데아미나제이거나; 또는 시티딘 데아미나제이다.
- [83] 아데닌 데아미나제는 당염기에서 정의된 바와 같으며(예를 들어, U.S. Pat. No. 10,113,163 등 참조), 아데닌 또는 아데노신의 가수분해적 탈아미노화를 촉매한다. 일 실시태양에서, 아데닌 데아미나제는 아데노신 또는 데옥시아데노신을 각각 이노신 또는 데옥시이노신으로의 가수분해적 탈아미노화를 촉매한다. 몇몇 실시태양에서, 아데닌 데아미나제는 표적 핵산의 sense strand에서는 A에서 G로 전환시키며, 표적 핵산의 anti-sense strand에서는 T에서 C로 전환시킨다.
- [84] 유사하게, 시티딘 데아미나제는 시티딘 또는 데옥시시티딘을 유리딘 또는 데옥시유리딘으로 가수분해적 탈아미노화를 촉매한다. 몇몇 실시태양에서, 시티딘 데아미나제는 표적 핵산의 sense strand에서는 C에서 T로 전환시키며, 표적 핵산의 anti-sense strand에서는 G에서 A로 전환시킨다.
- [85] 일 실시태양에서, 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 유기체, 예컨대 인간, 침팬지, 고릴라, 원숭이, 소, 개, 래트, 또는 마우스로부터의 천연-발생 데아미나제이다. 일 실시태양에서, 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 자연에서 발생하지 않는 유기체로부터의 천연-발생 데아미나제의 변이체이다.
- [86] 본원에 사용된 용어 "융합 단백질"은 적어도 2종의 상이한 단백질로부터의 단백질 도메인을 포함하는 혼성 폴리펩티드를 지칭한다. 1종의 단백질은 융합 단백질의 아미노-말단 (N-말단) 부분에 또는 카르복시-말단 (C-말단) 단백질에 위치하며, 따라서 각각 "아미노-말단 융합 단백질" 또는 "카르복시-말단 융합 단백질"을 형성할 수 있다. 단백질은 핵산 편집 단백질의 상이한 도메인, 예를 들어, 핵산 결합 도메인 (예를 들어, 표적 부위에의 단백질의 결합을 지정하는

Cas9의 gRNA 결합 도메인) 및 핵산 절단 도메인 또는 촉매적 도메인을 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 본 발명의 융합 단백질은 핵산, 예를 들어, RNA와의 복합체 형태로 존재할 수 있다.

- [87] 본원에 사용된 용어 "염기 편집기(Base Editor; BE)"는 종종 "핵염기 편집기(NucleoBase Editor; NBE)"로도 지칭되며, 크리스퍼(CRISPR) 유전자 편집에서 유래된 염기 교정 수단을 의미하며, DNA 두 가닥 모두를 자르는 기존의 유전자 가위와 달리 단일 염기를 교체하는 방식으로 작동한다. 염기 편집기는 DNA 한 쪽 가닥을 자르는 Cas9 니카제(nCas9)와 아데닌 또는 시토신을 분해하는 데아미나제로 구성된다. 이 경우, 본원에 사용된 용어 "염기 편집기"는 본원에 기재된 Cas9 융합 단백질을 지칭한다. 구체적으로는 CRISPR/Cas9 이중가닥 DNA 절단 기능을 제거한 dead Cas9(dCas9) 또는 nCas9에 아데닌 데아미나제를 결합한 아데닌 염기 편집기(ABE) 및 시토신 데아미나제를 결합한 시토신 염기 편집기(CBE)가 있다. 예를 들어, CBE의 경우 잘려진 DNA의 한 가닥에서 데아미나제가 시토신(C)을 우라실(U)로 교체하면 우라실(U)로 변환된 염기는 DNA 복구 과정에 의해 티민(T)이 된다. 염기 편집기를 사용하면 특정 서열을 교정하거나 교체함으로써 유전자를 결손시키거나 형질 전환시킬 수 있다.
- [88] 일 실시태양에서, 아데닌 데아미나제는 박테리아, 예컨대, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. putrefaciens*, *H. influenzae*, 또는 *C. crescentus*로부터 유래된 것일 수 있다. 일 예시적 실시태양에서, 아데닌 데아미나제는 TadA 데아미나제, 예컨대 *E. coli* TadA 데아미나제(ecTadA), 절단된(truncated) *E. coli* TadA 데아미나제, 또는 테옥시뉴클레오타이드에 적용할 수 있도록 개량된(engineered) *E. coli* TadA 데아미나제일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [89] 일 실시태양에서, 시티딘 데아미나제는 아포지단백질 B mRNA-편집 복합체(APOBEC) 패밀리의 데아미나제이다. 일 실시태양에서, 데아미나제는 APOBEC1 데아미나제, APOBEC2 데아мина제, APOBEC3A 데아미나제, APOBEC3B 데아미나제, APOBEC3C 데아미나제, APOBEC3D 데아미나제, APOBEC3F 데아미나제, APOBEC3G 데아미나제, APOBEC3H 데아미나제, 또는 APOBEC4 데아미나제이다. 일 실시태양에서, 데아미나제는 활성화-유도된 데아미나제(AID)이다. 일 실시태양에서, 데아미나제는 칠성장어(Lamprey) CDA1(pmCDA1) 데아미나제이다.
- [90] 위 언급된 아데닌 데아미나제 또는 시티딘 데아미나제의 종류는 예시적으로 열거된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이로 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 통상적으로 변경 또는 변형가능한 범위는 모두 포함하는 것으로 해석된다.
- [91] 일 실시태양에서, 본 발명의 염기 편집기 또는 융합 단백질, 특히, 시토신 데아미나제를 포함하는 시토신 염기 편집기(CBE)는 우라실 글리코실라제 억제제(UGI) 도메인을 추가로 포함할 수 있다.
- [92] 본원에 사용된 용어 "우라실 글리코실라제 억제제" 또는 "UGI"는 우라실-DNA

글리코실라제 염기-삭제 복구 효소를 억제할 수 있는 단백질을 지칭한다.

본원에서 사용가능한 UGI 도메인은 당업계에서 공지된 도메인을 사용할 수 있다.

- [93] 일 실시태양에서, 본 발명의 융합 단백질은 당업계에서 공지된 융합 단백질이면 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 예시적인 융합 단백질은 아래 표 1(CBE 융합 단백질) 및 2(ABE 융합 단백질)에 열거된 것 중 어느 하나일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

- [94] [표1]

AncBE4max	enAsCas12a-BE	A3A-BE3	AncBE4max-P2A-GFP
BE1	ScCas9-BE3	eA3A-BE3	CBE1 (rAPOBEC1-XTEN-dCas9-NLS)
BE2	YE1-BE3 or YE1-BE4	eA3A-HF1-BE3-2xUGI	CBE2 (rAPOBEC1-XTEN-dCas9-UGI-NLS)
BE3	EE-BE3	eA3A-Hypa-BE3-2xUGI	CBE3 (rAPOBEC1-XTEN-nCas9-UGI-NLS)
BE4	YE2-BE3	BE3(hA3A-Y130F)	CBE4
BE4max	YEE-BE3	BE3(hA3A-R128A)	CBE4-Gam
xCas9(3.7)-BE3	YFE-BE4max	Target-AID	<i>S. aureus</i> CBE4
VQR-BE3	dCpf1-BE-YE	nCDA1-BE3	<i>S. aureus</i> BE4-Gam
EQR-BE3	CP1012-CBE	Target-AID-NG	dCBE4
VRER-BE3	CP1028-CBE	hAID-BE3	dCBE4-Gam
CBE-NG	HF-BE3	BE4-PpAPOBEC1[R33A]	ABE-P48R
Spy-mac BE4max	Sniper-BE3	BE4-PpAPOBEC1[H122A]	ABE-P48R-UGI
Sa-BE3	SECURE-BE3	BE4-RrA3F	
SaKKH-BE3	SECURE-BE3	BE4-AmAPOBEC1	
SauriBE4max	BE3-R132E	BE4-SsAPOBEC3B	
dLbCpf1-BE	BE3-(W90F+R126E)		

[95] [표2]

ABEmax	SauriABEmax	CP1249-ABE
ABE7.10	ABE8e	ABEmax-AW
VQR-ABE	SaABE8e	ABE8e(TadA-8e V106W)
VRQR-ABE	LbABE8e	ABE8.17-m
VRER-ABE	enAsABE8e	SECURE-ABE (K20A/R21A)
NG-ABE	ABE8s	SECURE-ABE (V82G)
xCas9(3.7)-ABE	NG-ABE8s	ABE7.10-F148A
Spy-macABEmax	Sa-ABE8s	ABE4max-P2A-GFP
Sa-ABE	CP1012-ABE	dABE7.10 (ecTadA(wt)-linker(32aa)-ecTadA*(7.10)-linker(32aa)-dCas9-NLS)
SaKKH-ABE	CP1028-ABE	ABE8eWQ
ScCas9-ABE	CP1041-ABE	ABE8eWA

[96]

[97] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 융합 단백질은 ABEmax 또는 AncBE4max, 예컨대, pCMV_ABEmax (addgene no. 112095) 및 pCMV_AncBE4max (addgene no. 112094)로부터 각각 발현된 ABEmax 및 AncBE4max일 수 있다.

[98] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 융합 단백질 중 Cas9 도메인은 표적 핵산 서열의 프로토스페이서 인접 모티브(PAM)을 인식하며, 이 때 상기 PAM은 NGG 또는 NG일 수 있으며, 그 외 당업계에서 알려진 다양한 PAM, 예를 들어, Cas9 변이체(예컨대, near PAM-less Cas9 variant (SpRY))가 인식하는 PAM일 수 있다(예를 들어, 문헌 [Russell T. Walton et al., Science 17 Apr 2020: Vol. 368, Issue 6488, pp. 290-296] 참조). 이에 따라, 상기 언급된 융합 단백질은 NG PAM을 표적화하는 것일 수 있다. 일 예시적 실시태양에서, NG PAM을 표적화하는 융합 단백질은, pCMV_ABEmax의 Cas9 서열을 pX330-SpCas9-NG의 SpCas9-NG 서열 (addgene no. 117919)로 대체한 것일 수 있다.

[99] 본원에 사용된 용어 "가이드 RNA" 또는 "gRNA"는 표적 유전자 또는 핵산 특이적 RNA를 의미하며, CRISPR 효소와 결합하여 CRISPR 효소를 표적 유전자 또는 핵산으로 인도하는 RNA를 의미한다. gRNA는 2개 이상의 RNA의

복합체로서, 또는 단일 RNA 분자로서 존재할 수 있다. 단일 RNA 분자로서 존재하는 gRNA는 단일-안내자 RNA (sgRNA)로 지칭될 수 있으며, "gRNA"는 단일 분자로서 또는 2개 이상의 분자의 복합체로서 존재하는 안내자 RNA를 지칭하는 데 호환적으로 사용된다. 전형적으로, 단일 RNA 종으로서 존재하는 gRNA는 2개의 도메인을 포함한다: (1) 표적 핵산과 상동성을 공유하는 (예를 들어, 및 표적에의 Cas9 복합체의 결합을 지정하는) 도메인 (crRNA; crispr RNA); 및 (2) Cas9 단백질에 결합하는 도메인(tracrRNA; transactivating RNA).

[100] 일 실시태양에서, 본 발명의 융합 단백질과 gRNA는 복합체 형태로 존재하며, 이 때 상기 gRNA는 상기 Cas9 도메인에 결합될 수 있다. 이 때 상기 복합체는 RNP (리보핵단백질) 형태일 수 있다.

[101] 본원에 사용된 용어 "RNP(리보핵단백질)"는 RNA와 단백질의 복합체를 의미한다. 자연에 존재하는 RNA 중 tRNA를 제외한 대부분의 RNA가 단백질과 결합하여 존재한다. 구체적인 예로는, 리보솜, 스플라이소솜(spliceosome), 전령리보핵단백질(mRNA), CRISPR/CAS9 등이 있다. 세포 내에서 단백질 합성장소인 리보솜은 RNA와 수십 종류의 중성 또는 약염기성 단백질이 결합하여 과립구조를 이루고 있다. 상기 RNA는 sgRNA(single guide RNA), crRNA(crispr RNA) 또는 tracrRNA(transactivating RNA)일 수 있다. 이때, 상기 RNA 서열은 표적이 되는 유전자 서열과 상보적인 서열을 가질 수 있다. 일 구체적 실시태양에서, 본 발명의 gRNA는 망막 기능장애(예컨대 망막 변성 질환 등)과 관련된 표적 핵산 서열에 상보적인 인접 뉴클레오티드(contiguous nucleotides)의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 표적이 되는 유전자는 목적에 따라 다양한 유전자에서 선택될 수 있다. 본원에서 상기 단백질은 융합 단백질, 즉, 염기 편집기일 수 있다.

[102]

[103] 본 발명의 융합 단백질, 특히, 융합 단백질과 gRNA와 RNP 복합체 형태(이하 "RNP 복합체"로 지칭되기도 함)에 의한 염기 편집은 감소된 오프-타겟 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 RNP 복합체를 통한 염기 편집은 플라스미드로 인코딩된 융합 단백질(즉, ABE 또는 CBE)와 비교하여 단일 염기 전환에 대한 다중 염기 전환의 비율이 낮은 편집 패턴을 나타내고, 이는 주로 본 발명의 ABE/CBE RNP 복합체가 세포에서 수명이 짧기 때문이다.

[104] 본원에 사용된 용어 "염기 편집"은 동일한 위치에서 초기 (예를 들어, 야생형) 염기와 비교시 뉴클레오티드 염기가 변형되는 프로세스를 지칭한다. 염기 편집에서 아데닌 및 시티딘 데아미나제는 각각의 뉴클레오티드 표적으로부터 아미노기를 제거하여, 각각 이노신 및 우리딘으로 전환시킨다. DNA 복구 또는 복제 동안, 이노신은 폴리머라제 효소에 의해 구아닌으로서 인식되고 우리딘은 티민으로서 인식되어, 편집된 이중 가닥 DNA에서 A:T 염기쌍이 G:C 염기쌍으로 전환되거나 또는 C:G 염기쌍이 T:A 염기쌍으로 전환된다.

[105] 본원에 사용된 용어 "염기 편집 윈도우"는 염기 편집기에 의해 편집되어야

하는 임의의 염기를 지칭하며, 전형적으로 표적 DNA에 대한 염기 편집 시스템의 적어도 하나의 성분의 결합 후 접근가능한 영역 내에 있는, 편집 시스템의 임의의 성분으로부터 임의의 거리일 수 있다. PAM 서열을 필요로 하는 염기 편집기 (예를 들어, Cas9 함유 편집기)는 전형적으로 PAM 서열로부터 13개 내지 16개 이상의 뉴클레오티드일 수 있는 3, 4, 5, 6, 7개 또는 그 초과 뉴클레오티드의 염기 편집 윈도우를 갖는다.

- [106] 본원에 사용된 용어 "온-타겟(on-target)"은 표적 특이적 염기 편집기가 상보적으로 결합하는 표적 유전자 또는 핵산의 서열 또는 위치를 의미하며, 본원에 사용된 용어 "오프-타겟(off target)"은 표적 특이적 염기 편집기가 부분적으로 상보적인 결합을 하는, 목적하지 않지만 염기 편집의 활성이 일어나는 표적 유전자 또는 핵산의 서열 또는 위치를 의미한다.
- [107] 오프-타겟은 표적 특이적 염기 편집기가 표적으로 하지 않는 유전자 또는 핵산의 서열 또는 위치, 또는 온-타겟의 핵산 서열과 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 핵산 서열이다. 상기 온-타겟의 핵산 서열과 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 핵산 서열이란 온-타겟 핵산 서열과 유사한 핵산 서열로, 하나 이상의 다른 염기서열을 포함하거나 하나 이상의 염기서열이 삭제된 핵산 서열일 수 있다.

[108]

[109] 융합 단백질 또는 RNP 복합체의 용도

- [110] 본 발명은 융합 단백질 또는 RNP 복합체의 용도, 구체적으로, 생체 내 유전자 교정에 사용되는 용도를 제공한다. 일 실시태양은 본 발명의 융합 단백질 또는 RNP 복합체는 표적 핵염기, 예를 들어, A 잔기 또는 C 잔기를 탈아미노화함으로써 유전적 결함의 교정, 예를 들어, 유전자 생성물에서의 기능의 소실을 초래하는 점 돌연변이를 교정할 수 있다. 일 실시태양에서, 유전적 결함은 질환 또는 장애, 예를 들어, 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환과 연관된다.

- [111] 이에 따라, 본 발명은 (i) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질; 및 (ii) 가이드 RNA (gRNA)를 포함하는, 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 융합 단백질 및 gRNA는 리보핵단백질(RNP) 복합체 형태로 존재할 수 있다.

- [112] 일 실시태양에서, 표적 DNA 서열은 질환 또는 장애와 연관된 서열, 예컨대, 질환 또는 장애와 연관된 점 돌연변이를 포함한다. 일 실시태양에서, Cas9 단백질, Cas9 융합 단백질, 또는 RNP 복합체의 활성은 점 돌연변이를 교정시킨다. 일 실시태양에서, 표적 DNA 서열은 질환 또는 장애와 연관된 G→A 점 돌연변이를 포함하고, 여기서, 돌연변이체 A 염기의 탈아미노화는 질환 또는 장애와 연관되지 않은 서열을 초래한다. 또다른 실시태양에서, 표적 DNA 서열은 질환 또는 장애와 연관된 T→C 점 돌연변이를 포함하고, 여기서, 돌연변이체 C

염기의 탈아미노화는 질환 또는 장애와 연관되지 않은 서열을 초래한다.

- [113] 일 실시태양에서, 표적 DNA 서열은 단백질을 코딩하고, 여기서, 점 돌연변이는 코돈에 있으며, 야생형 코돈에 비해 돌연변이체 코돈에 의해 코딩되는 아미노산의 변화를 초래한다. 일 실시태양에서, 돌연변이체 A 또는 C의 탈아미노화는 돌연변이체 코돈에 의해 코딩되는 아미노산의 변화를 초래한다. 일 실시태양에서, 돌연변이체 A 또는 C의 탈아미노화는 야생형 아미노산을 코딩하는 코돈을 초래한다.
- [114] 일 구체적 실시태양에서, 표적 DNA 서열은 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환과 관련된 것일 수 있다. 상기 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환은 유전자 돌연변이, 구체적으로, 점 돌연변이에 의해 발병되는 것일 수 있다. 이에 따라 본 발명의 융합 단백질 또는 RNP 복합체는 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환에서 유전자 돌연변이가 발생한 표적 서열에 작용하는 것일 수 있다. 구체적 실시태양에서, RNP 복합체가 표적 DNA 서열과 접촉할 수 있고, 이 때 gRNA는 상기 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환과 관련된 표적 서열에 상보적인 인접 뉴클레오티드(contiguous nucleotides)의 서열을 포함할 수 있다.
- [115] 본 발명에서 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환과 관련된 점 돌연변이는 T에서 C로의 점 돌연변이를 포함하고, 본 발명의 융합 단백질 또는 RNP 복합체에 의한 돌연변이체 C 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환과 연관되지 않은 서열을 발생시키는 것일 수 있다. 또는, 점 돌연변이는 G에서 A로의 점 돌연변이를 포함하고, 본 발명의 융합 단백질 또는 RNP 복합체에 의한 돌연변이체 A 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애, 특히 망막 변성 질환과 연관되지 않은 서열을 발생시키는 것일 수 있다.
- [116] 본원에 사용된 용어 "표적 부위"는 데아미나제 또는 데아미나제를 포함하는 융합 단백질 (예를 들어, 본원에 제공된 dCas9-데아미나제 융합 단백질)에 의해 탈아미노화되는 핵산 분자 내의 서열을 지칭한다. 일 실시태양에서, 본 발명의 표적 서열은 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환과 관련된 점 돌연변이를 포함한다.
- [117] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 표적 DNA 분자를 (a) 본원에 제공된 Cas9 단백질 또는 융합 단백질과, 및 적어도 1종의 gRNA (여기서, gRNA는 약 15 내지 100개 뉴클레오티드 길이이고, 표적 서열에 상보적인 적어도 10개의 인접한 뉴클레오티드의 서열을 포함함); 또는 (b) 본원에 제공된 RNP 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시태양에서, 접촉은 대상체에서 생체 내에서 발생한다.
- [118] 일 구체적 실시태양에서, 본 발명은 망막 기능장애, 특히 망막 변성의 치료를 필요로 하는 대상체에서 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성을 치료하기 위한 생체 내 유전자 교정 방법으로서, 융합 단백질 및 gRNA; 또는 RNP 복합체를 Lipofectamine 2000과 함께 대상체에 전달하는 단계를 포함하는, 대상체에서 생체 내 유전자 교정 방법을 제공한다. 이 때 융합 단백질 및 gRNA; 또는 RNP

복합체는 망막 기능장애를 치료하기에 적절한 경로, 예컨대, 망막 하(subretinal), 피하(subcutaneously), 피내(intradermally), 안구내(intraocularly), 유리체내(intravitreally) 등으로 전달될 수 있다.

- [119] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 개별적 유기체, 예를 들어, 개별적 포유동물을 지칭한다. 일 실시태양에서, 대상체는 인간이다. 일 실시태양에서, 대상체는 비-인간 포유동물이며, 예컨대 양, 염소, 소, 고양이, 또는 개일 수 있다.
- [120] 일 구체적 실시태양에서, 본 발명의 RNP 복합체를 사용하여 *rd12* 마우스에서 생체 내 유전자 교정, 구체적으로, 망막 변성을 일으키는 RPE65 유전자의 넌센스 돌연변이를 교정할 수 있다.
- [121] 본원에 사용된 용어 "망막 기능장애"는 망막 조직이 정상적인 기능 또는 역할을 하지 못하는 모든 형태, 과정 및/또는 이로 인한 결과물 등을 포함하는 모든 상태를 의미한다.
- [122] 본원에 사용된 용어 "망막 변성"은 망막 또는 망막색소상피 (Retinal Pigment Epithelium cell; RPE) 세포들의 점진적이고도 중독적인 사멸에 의해 야기되는, 망막 악화 현상을 의미한다. 망막 변성에는 동맥 또는 정맥 폐색, 당뇨망막병증, 수정체후부 섬유증식증/미숙 망막병증, 또는 질병(대개 유전)과 같은 몇 가지 원인이 있다. 이들은 시력 손상, 야맹증, 망막 박리, 광민감증, 터널 시야, 및 전체 시력 손상에 이르는 주변시 손상과 같은 여러 가지 방식으로 일어날 수 있다.
- [123] 본 발명의 망막 기능장애는 망막 변성 질환; 색소성 망막염; 망막 색소 변성; 혈관무늬 병증; 드루젠(Drusen); 레베르 선천성 흑암시(lebers congenital amaurosis); 유전성 또는 후천성 황반 변성; 연령 관련 황반 변성 (AMD); 베스트병 (Best disease); 망막 박리; 뇌회형 위축; 맥락막결손; 패턴 이영양증; 망막 색소 상피 (RPE) 이영양증; 스타르가르트병(Stargardt disease); 광, 레이저, 감염, 방사선, 신생혈관 또는 외상성 손상 중 어느 하나에 의해 야기된 망막 색소 상피 (RPE) 및 망막 손상; 망막형성장애; 색맹; 범맥락막위축; 근시성 맥락막신생혈관; 결절맥락막혈관병증; 중심장액맥락망막병증; 황반원공; 황반이상증; 당뇨망막병증; 망막동정맥폐쇄; 고혈압성 망막병증; 망막대동맥류; 안허혈증후군; 미숙아망막병증; 급성망막괴사; 거대세포 바이러스 망막염; 독소플라스마 망막맥락막염; 매독성 맥락망막염; 망막박리; 또는 망막모세포종이나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [124] 특히, 본 발명의 망막 변성 질환은 상기 열거된 질환, 예를 들어, 색소성 망막염; 망막 색소 변성; 혈관무늬 병증; 드루젠(Drusen); 레베르 선천성 흑암시 (lebers congenital amaurosis); 유전성 또는 후천성 황반 변성; 연령 관련 황반 변성(AMD); 베스트병(Best disease); 망막 박리; 뇌회형 위축; 맥락막결손; 패턴 이영양증; 망막 색소 상피 (RPE) 이영양증; 스타르가르트병(Stargardt disease); 또는 광, 레이저, 감염, 방사선, 신생혈관 또는 외상성 손상 중 어느 하나에 의해 야기된 망막 색소 상피 (RPE) 및 망막 손상이거나, 또는 이와 관련되어 발병된 것일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

- [125] 본 발명의 융합 단백질 또는 RNP 복합체로 예방 또는 치료되는 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환은 유전자 돌연변이, 특히 점 돌연변이를 포함하는 것일 수 있다. 일 실시태양에서, 본 발명의 망막 기능장애, 예컨대 망막 변성 질환은 표 3에 열거된 하나 이상의 유전자 돌연변이와 관련된 것일 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 gRNA는 하기 유전자 중 하나 이상의 유전자를 표적으로 하는 것일 수 있다.

[126] [표3]

ABCA4	PLA2G5	C1QTNF5	GABRB3	NPHP3	RIMS1
ABHD12	POMGNT1	C2ORF71	GALK1	NPHP4	RLBP1
ADGRA3	PRCD	CA4	GALT	NPVF	ROM1
ADIPOR1	PRKCG	CABP4	GCNT2	NR2E3	RP1
AGBL5	PROM1	CACNA1F	GDF3	NR2F1	RP1L1
AHI1	PRPF3	CACNA2D4	GDF6	NRL	RP2
AHR	PRPF31	CANT1	GFER	NTF4	RP9
AIPL1	PRPF4	CAPN5	GJA1	NYX	RPE65
ARHGEF18	PRPF6	CAV1	GJA3	OAT	RPGR
ARL2BP	PRPF8	CBS	GJA8	OCRL	RPGRIP1
ARL3	PRPH2	CC2D2A	GLI2	OFD1	RPGRIP1L
ARL6	RBP3	CDH23	GNAT1	OPA1	RS1
BBS1	RBP4	CDH3	GNAT2	OPA3	RTN4IP1
BBS10	RD3	CDHR1	GNGT1	OPN1LW	SAG
BBS12	RDH11	CEP290	GNGT2	OPN1MW	SALL2
BBS2	RDH12	CERKL	GNPAT	OPN1SW	SBF2
BBS4	REEP6	CFH	GPR98	OPTC	SC5DL
BBS5	RGR	CHD7	GRIP1	OPTN	SDCCAG8
BBS7	RHO	CHM	GRK1	OTX2	SEC23A
BBS9	RLBP1	CHMP4B	GRK7	P3H2	SEMA3E
BEST1	ROM1	CISD2	GRM6	PANK2	SEMA4A
C1QTNF5	RP1	CJA8	GUCA1A	PAX2	SHH
C2ORF71	RP1L1	CLDN19	GUCA1B	PAX6	SIL1
C8orf37	RP2	CLN3	GUCA1C	PCDH15	SIPA1L3
CA4	RP9	CLPB	GUCY2D	PDC	SIX3
CACNA1F	RPE65	CLRN1	GUCY2F	PDE6A	SIX5
CC2D2A	RPGR	CLUL1	HCCS	PDE6B	SIX6
CDH23	RPGRIP1	CNGA1	HESX1	PDE6C	SLC16A12
CDHR1	RPGRIP1L	CNGA3	HMCN1	PDE6D	SLC1A7
CEP290	SAG	CNGB1	HMGB3	PDE6G	SLC24A1

CERKL	SAMD11	CNGB3	HMX1	PDE6H	SLC25A18
CHM	SEMA4A	CNNM4	HSF4	PDZD7	SLC25A22
CLCC1	SLC7A14	COL11A1	IDH3B	PEX1	SLC25A46
CLN3	SNRNP200	COL18A1	IFT140	PEX10	SLC2A1
CLRN1	SPATA7	COL2A1	IGBP1	PEX11B	SLC33A1
CNGA1	SPP2	COL4A1	IKBKG	PEX12	SMOC1
CNGB1	TOPORS	COL9A1	IMPDH1	PEX13	SNRNP200
CRB1	TRIM32	CRABP1	IMPG2	PEX14	SNX3
CRX	TRNT1	CRABP2	INPP5E	PEX16	SOLH
CYP4V2	TTC8	CRB1	INVS	PEX19	SOX2
DHDDS	TTPA	CRX	IQCB1	PEX2	SPATA7
DHX38	TUB	CRYAA	JAG1	PEX26	SPG7
EMC1	TULP1	CRYAB	JAM3	PEX3	SRD5A3
EYS	USH1C	CRYBA1	KCNJ13	PEX5L	SREBF2
FAM161A	USH2A	CRYBA2	KCNV2	PEX6	STRA6
FLVCR1	WFS1	CRYBA4	KIF11	PEX7	TBC1D20
FSCN2	WHRN	CRYBB1	KLHL7	PGK1	TBK1
GNAT1	ZNF408	CRYBB2	LARGE	PHYH	TDRD7
GNPTG	ZNF513	CRYBB3	LCA5	PIGL	TEAD1
GUCA1B	ABCA4	CRYGB	LEMD2	PITPNM3	TEK
GUCY2D	ABCB6	CRYGC	LEPREL1	PITX2	TENM3
HGSNAT	ABCC6	CRYGD	LIM2	PITX3	TFAP2A
HK1	ABHD12	CRYGS	LMX1B	POMGNT1	TFPT
IDH3B	ACO2	CTDP1	LOXL1	POMT1	TGIF1
IFT140	ACTB	CTNNB1	LRAT	POMT2	TIMM8A
IFT172	ACVR1	CYP1B1	LRIT1	PORCN	TIMP3
IMPDH1	ADAM9	CYP27A1	LRP5	PQBP1	TLR4
IMPG1	ADAMTSL4	CYP4V2	LSS	PRCD	TMEM114
IMPG2	AFG3L2	CYP51A1	LTBP2	PROM1	TMEM126A
INPP5E	AGK	DFNB31	m.11778G>	PRPF3	TMEM67

			A;		
INVS	AGPS	DHCR7	m.14484T>C	PRPF31	TMEM70
IQCB1	AHI1	DHDDS	m.3460G>A;	PRPF6	TMEM98
KIAA1549	AIPL1	DMD	MAB21L2	PRPF8	TOPORS
KIZ	AKR1E2	DNM1L	MAF	PRPH2	TREX1
KLHL7	ALDH18A1	EFEMP1	MAN2B1	PRSS56	TRIM32
LCA5	ALDH1A1	ELOVL4	MERTK	PVRL3	TRPM1
LRAT	ALDH1A2	EPG5	MFN2	PXDN	TSPAN12
MAK	ALDH1A3	EPHA2	MFRP	RAB18	TTC8
MERTK	ALMS1	ERCC1	MFSD6L	RAB3GAP1	TTPA
MFRP	ANTXR1	ERCC2	MIP	RAB3GAP2	TTR
MKKS	AOC2	ERCC3	MIR184	RARA	TULP1
MTATP6	ARL6	ERCC5	MITF	RARB	UNC119
MTTS2	ARR3	ERCC6	MKKS	RARG	UNC45B
MVK	ASB10	ERCC8	MKS1	RAX	USH1C
NEK2	ATOH7	EYA1	MPP4	RAX2	USH1G
NEUROD1	ATXN7	EYS	MSMO1	RB1	USH2A
NMNAT1	B3GALTL	FAM126A	MT-ATP6	RBP1	VAX1
NPHP1	B3GLCT	FAM161A	MT-CO1	RBP3	VCAN
NPHP3	BBS1	FBLN5	MT-CO3	RBP4	VIM
NPHP4	BBS10	FBN1	MTCYB	RCBTB1	VPS13B
NR2E3	BBS12	FDXR	MT-ND1	RCVRN	VSX1
NRL	BBS2	FKRP	MT-ND2	RD3	VSX2
OFD1	BBS4	FKTN	MT-ND4	RDH10	WDR36
PANK2	BBS5	FLVCR1	MT-ND5	RDH11	WFS1
PCARE	BBS7	FOXC1	MT-ND6	RDH12	WR
PCDH15	BBS9	FOXD3	MTTP	RDH5	YAP1
PDE6A	BCMO1	FOXE3	MYO7A	RDH8	YME1L1
PDE6B	BCOR	FOXL2	MYOC	RECQL2	ZIC2

PDE6G	BEST1	FRAS1	NAA10	RECQL4	ZNF408
PEX1	BFSP1	FREM1	NCALD	RGR	ZNF513
PEX2	BFSP2	FREM2	NDP	RGS11	
PEX26	BMP4	FSCN2	NF2	RGS16	
PEX7	BMP7	FTL	NHS	RGS9	
PHYH	C12orf57	FYCO1	NMNAT1	RGS9BP	
PITPNM3	C12ORF65	FZD4	NPHP1	RHO	

[127]

[128] 일 실시태양에서, 본 발명의 약학 조성물은 융합 단백질 또는 RNP 복합체를 유효량으로 포함할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 유전자 교정 방법은 융합 단백질 또는 RNP 복합체를 유효량으로 대상체에게 전달할 수 있다.

[129] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 바람직한 생물학적 반응을 유발하는데 충분한 생물학적 활성제의 양을 지칭한다. 예를 들어, 일 실시태양에서, 융합 단백질 또는 RNP 복합체의 유효량은 융합 단백질 또는 RNP 복합체에 의해 특이적으로 결합되고 편집되는 표적 부위의 편집을 유도하는 데 충분한 양을 지칭할 수 있다.

[130]

[131] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 융합 단백질 또는 RNP 복합체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 망막 기능장애의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[132] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 망막 기능장애의 예방 또는 치료를 위한 상기 융합 단백질 또는 RNP 복합체의 용도를 제공한다.

[133] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 망막 기능장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제(medicament)의 제조에 사용하기 위한, 상기 융합 단백질 또는 RNP 복합체의 용도를 제공한다.

[134] 융합 단백질, RNP 복합체, 망막 기능장애는 상술한 바와 같다.

[135]

[136] 융합 단백질의 정제 방법

[137] 본 발명은 융합 단백질을 고순도로 정제하는 방법을 제공한다.

[138] 일 실시태양에서, 본 발명은

[139] (a) Cas9 도메인; 및 아테닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 세포에서 발현시키는 단계이며, 상기 융합 단백질은 추가로 친화성 태그를 포함하는 것인 단계;

[140] (b) 단계 (a)에서 발현된 융합 단백질을 용해시켜 용해물을 생성하는 단계;

[141] (c) 단계 (b)의 용해물을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 1차 정제하는 단계;

- [142] (d) 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 2차 정제하는 단계; 및
- [143] (e) 단계 (d)에서 정제된 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 3차 정제하는 단계
- [144] 를 포함하는, 융합 단백질의 정제 방법을 제공한다.
- [145] 일 구체적 실시태양에서, 상기 친화성 태그가 폴리히스티딘 태그 또는 FLAG 태그일 수 있으며, 예컨대, 단계 (a)의 융합 단백질은 N-말단에 10xHis-Flag 태그를 포함하고, C-말단에 mCherry-10xHis 태그를 포함하는 것일 수 있다.
- [146] 일 구체적 실시태양에서, 단계 (c)는 단계 (b)의 용해물을 Ni-NTA 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 Ni-NTA 수지에 결합된 것일 수 있다.
- [147] 일 구체적 실시태양에서, 단계 (d)는 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 α -FLAG M1 아가로스 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 α -FLAG M1 아가로스 수지에 결합된 것일 수 있다.
- [148] 일 구체적 실시태양에서, 단계 (e)의 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad 16/600 Superdex 200pg, HiLoad 26/600 Superdex 200pg, 또는 HiLoad 16/600 Superdex 75pg 컬럼에서 수행되는 것일 수 있으며, 구체적으로는, HiLoad 16/600 Superdex 200pg 컬럼을 사용할 수 있다.
- [149] 본 발명은 또한
- [150] (a) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 세포에서 발현시키는 단계이며, 상기 융합 단백질은 추가로 N-말단에 10xHis-Flag 태그를 포함하고, C-말단에 mCherry-10xHis 태그를 포함하는 것인 단계;
- [151] (b) 단계 (a)에서 발현된 융합 단백질을 용해시켜 용해물을 생성하는 단계;
- [152] (c) 단계 (b)의 용해물을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 1차 정제하는 단계이며, 이 때 상기 단계는 상기 용해물을 Ni-NTA 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 Ni-NTA 수지에 결합된 것인 단계;
- [153] (d) 단계 (c)에서 정제된 단백질을 Ni-NTA 수지와 접촉시켜 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 2차 정제하는 단계이며, 이 때 상기 단계는 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 α -FLAG M1 아가로스 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 α -FLAG M1 아가로스 수지에 결합된 것인 단계; 및
- [154] (e) 단계 (d)에서 정제된 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 3차 정제하는 단계이며, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad 16/600 Superdex 200pg, HiLoad 26/600 Superdex 200pg, 또는 HiLoad 16/600 Superdex 75pg 컬럼에서 수행되는 것인 단계
- [155] 를 포함하는, 융합 단백질의 정제 방법을 제공한다.

- [156] 일 실시태양에서, 본 발명은 상기 정제 방법에 따라 정제된 융합 단백질을 제공한다.
- [157] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 정제 방법에 따라 정제된 융합 단백질; 및 상기 융합 단백질의 Cas9 도메인에 결합된 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 제공한다.
- [158]
- [159] 이하, 실험 방법 및 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [160]
- [161] <실험 방법>
- [162] 본 발명은 하기와 같은 실험 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [163]
- [164] 1. 염기 편집기 인코딩 플라스미드 제조
- [165] pEX-FlagR-ABEmax 및 pEX-FlagR-BE4max를 제조하기 위해, ABEmax 및 BE4max 코딩 서열 (CDS)을 각각 pCMV_ABEmax (addgene no. 112095) 및 pCMV_AncBE4max (addgene no. 112094)로부터 증폭시키고 XhoI 및 XbaI 제한 부위를 사용하여 포유류 발현 pEX-FlagR 벡터에 클로닝하였다.
- [166] pCMV-NGABEmax를 제조하기 위해 PmlI 및 EcoRI 제한 부위를 사용하여 pCMV_ABEmax의 Cas9 서열을 pX330-SpCas9-NG의 SpCas9-NG 서열 (addgene no. 117919)로 대체하였다.
- [167] pEX-FlagR-NGABEmax를 제조하기 위해 pCMV-NGABEmax의 NGABEmax 서열을 pEX-FlagR에 클로닝하였다. 매칭되는 중첩이 있는 ABEmax 또는 BE4max CDS를 포함하는 Gibson 단편을 Phusion High-Fidelity Polymerase (NEB)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 단편을 겔 정제하고 50 °C에서 1시간 동안 NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (NEB)를 사용하여 조립하고 화학적으로 적합한 E. coli (DH5α, Enzymonics)로 변형시켰다. sgRNA에 해당하는 서열을 BsaI-분해 pRG2 벡터 (Addgene no. 104174)에 클로닝하였다. 이 단계를 위해 스페이서 서열 (표 4)을 포함하는 올리고를 어닐링하여 호환 가능한 오버행이 있는 이중 가닥 DNA 단편을 형성하고 T4 리가아제 (Enzymonics)를 사용하여 연결하였다. 형질 감염 실험에 사용된 모든 플라스미드는 NucleoBond Xtra Midi Plus EF kit (MN)를 사용하였다.
- [168] 하기 표 4는 gRNA를 제조하는데 사용된 프라이머를 나타낸다. 20-nt 표적 프로토스페이서는 밑줄로 표기하였다. 표적 DNA 서열이 'G'로 시작하지 않는 경우, 인간 U6 프로모터는 전사 시작 부위에서 'G'를 선호하므로, 프라이머의 5' 말단에서 'G'를 추가하였다(gX20 otherwise GX19).

[169] [표4]

프라이머	서열	서열번호
F-ABE_site 2	5'-CACCGAGTATGAGGCATAGACTGC-3'	1
R-ABE_site 2	5'-AAACGCAGTCTATGCCTCATACTC-3'	2
F-ABE_site 4	5'-CACCGAGCAAAGAGAATAGACTGT-3'	3
R-ABE_site 4	5'-AAACACAGTCTATTCTCTTTGCTC-3'	4
F-ABE_site 5	5'-CACCGATGAGATAATGATGAGTCA-3'	5
R-ABE_site 5	5'-AAACTGACTCATCATTATCTCATC-3'	6
F-ABE_site 8	5'-CACCGTAAACAAAGCATAGACTGA-3'	7
R-ABE_site 8	5'-AAACTCAGTCTATGCTTTGTTTAC-3'	8
F-ABE_site 10	5'-CACCGAACATAAAGAATAGAATGA-3'	9
R-ABE_site 10	5'-AAACTCATTCTATTCTTTATGTTC-3'	10
F-ABE_site 13	5'-CACCGAAGATAGAGAATAGACTGC-3'	11
R-ABE_site 13	5'-AAACGCAGTCTATTCTCTATCTTC-3'	12
F-ABE_site 16	5'-CACCGGGAATAAATCATAGAATCC-3'	13
R-ABE_site 16	5'-AAACGGATTCTATGATTTATTCCC-3'	14
F-ABE_site 17	5'-CACCGACAAAGAGGAAGAGAGACG-3'	15
R-ABE_site 17	5'-AAACCGTCTCTCTTCCTCTTTGTC-3'	16
F-ABE_site 28	5'-CACCGACAAACCAGAAGCCGCTCC-3'	17
R-ABE_site 28	5'-AAACGGAGCGGCTTCTGGTTTGTC-3'	18
F-CCR5_site 10	5'-CACCGGTGACAAGTGTGATCACTT-3'	19
R-CCR5_site 10	5'-AAACAAGTGATCACACTTGTCACC-3'	20
F-FANCF	5'-CACCGGAATCCCTTCTGCAGCACC-3'	21

R-FANCF	5'-AAAC <u>GGTGCTGCAGAAGGGATTCC</u> -3'	22
F-HBG_site 1	5'-CACCGCTTGACCAATAGCCTTGACA- 3'	23
R-HBG_site 1	5'-AAACT <u>TGTCAAGGCTATTGGTCAAGC</u> - 3'	24
F-HBG_site 2	5'-CACCGATATTTGCATTGAGATAGTG- 3'	25
R-HBG_site 2	5'-AAACC <u>ACTATCTCAATGCAAATATC</u> - 3'	26
F-HBG_site 3	5'-CACCGTGGGGAAGGGGCCCCCAAG-3'	27
R-HBG_site 3	5'-AAACCTTGGGGGCCCCTTCCCCAC-3'	28
F-HEK293_site 2	5'-CACCGAACACAAAGCATAGACTGC-3'	29
R-HEK293_site 2	5'-AAACGCAGTCTATGCTTTGTGTTC-3'	30
F-HEK293_site 3	5'-CACCGGCCCAGACTGAGCACGTGA-3'	31
R-HEK293_site 3	5'-AAACTCAGTGCTCAGTCTGGGCC-3'	32
F-HEK293_site 4	5'-CACCGGCACTGCGGCTGGAGGTCC-3'	33
R-HEK293_site 4	5'-AAACGGACCTCCAGCCGCAGTGCC-3'	34
F-HPRT_Exon 4	5'-CACCGGGGACATAAAAGTAATTGG-3'	35
R-HPRT_Exon 4	5'-AAACCCAATTACTTTTATGTCCCC-3'	36
F-HPRT Exon 8	5'-CACCGAAGTATTCATTATAGTCAA-3'	37
R-HPRT Exon 8	5'-AAACTTGACTATAATGAATACTTC-3'	38
F-VEGFA	5'-CACCGGTGAGTGAGTGTGTGCGTG-3'	39
R-VEGFA	5'-AAACCACGCACACACTCACTCACC-3'	40
F-PPP1R12C_site 3	5'-CACCGACCCTCAGCCGTGCTGCTC-3'	41

R-PPP1R12C_site 3	5'-AAAC <u>GAGCAGCACGGCTGAGGGTC</u> -3'	42
F-PPP1R12C_site 4	5'-CACCGCTCTCAGCCTGGAGACCAC-3'	43
R-PPP1R12C_site 4	5'-AAAC <u>GTGGTCTCCAGGCTGAGAGC</u> -3'	44
F-PPP1R12C_site 6	5'-CACCGGGGCTCAACATCGGAAGAG-3'	45
R-PPP1R12C_site 6	5'-AAAC <u>CTCTTCCGATGTTGAGCCCC</u> -3'	46
F-PPP1R12C_site 9	5'-CACCGCTGGCTCAGGTTCAAGAGA-3'	47
R-PPP1R12C_site 9	5'-AAAC <u>TCTCCTGAACCTGAGCCAGC</u> -3'	48
F-EMX1	5'-CACCGAGTCCGAGCAGAAGAAGAA-3'	49
R-EMX1	5'-AAAC <u>TTCTTCTTGCTCGGACTC</u> -3'	50
F-EMX1_GGT PAM	5'-CACCGCAGGGATCCAAGCACACAA-3'	51
R-EMX1_GGT PAM	5'-AAAC <u>TTGTGTGCTTGGATCCCTGC</u> -3'	52
F-VEGFA_CGT PAM	5'-CACCGCTCTCAGGCCCTGTCCGCA-3'	53
R-VEGFA_CGT PAM	5'-AAAC <u>TGCGGACAGGGCCTGAGAGC</u> -3'	54
F-GRIN2B_AGA PAM	5'-CACCGAGCAAATACCAGAGATAAG-3'	55
R-GRIN2B_AGA PAM	5'-AAAC <u>CTTATCTCTGGTATTTGCTC</u> -3'	56
F-FANCF_GGA PAM	5'-CACCGAGAAACCAAATCTCCAGGA-3'	57
R-FANCF_GGA PAM	5'-AAAC <u>TCCTGGAGATTGTTGGTTCTC</u> -3'	58
F-PTEN_GGA PAM	5'-CACCGTACCTAATGGACTTCAGGG-3'	59
R-PTEN_GGA PAM	5'-AAAC <u>CCCTGAAGTCCATTAGGTAC</u> -3'	60
F-MECP2_AGT PAM	5'-CACCGCCTTCATAGAATTGAAGAG-3'	61
R-MECP2_AGT PAM	5'-AAAC <u>CTCTTCAATTCTATGAAGGC</u> -3'	62

[171] **2. 융합 단백질 발현 및 정제**

[172] 인간 배아 신장 293 EBNA1 (HEK293E) 세포를 5% 소 태아 혈청 (FBS)이 보충된 칼슘 미포함 glucose 4500 mg/L (WELGENE)을 갖는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)의 현탁액 중에서 37 °C에서 성장시켰다. 염기 편집기(ABEmax 또는 BE4max)의 과발현을 위해, HEK293E 세포를 pEX-FlagR-ABEmax (NG PAM 또는 NGG PAM) 또는 pEX-FlagR-AncBE4max (NGG PAM) 플라스미드로 일시적으로 형질 감염시켰으며, 이는 각 염기 편집기가 N 말단에 10xHis-Flag 태그가 있고 C 말단에 mCherry-10xHis 태그가 있는 융합 단백질로 발현되도록 설계되었다. 세포를 25 kDa 선형 폴리에틸렌이민 (Polysciences)으로 7×10^5 세포/mL의 밀도로 형질 감염시켰다. 형질 감염 직후 Dimethyl sulfoxide (Amresco)를 1%의 최종 농도로 첨가하고 온도를 33 °C로 낮추었다. 형질 감염 2일 후, tryptone (Amresco)을 0.5%의 최종 농도로 첨가하였다. 형질 감염 4일 후, 세포를 500 g에서 20분 동안 수확하고 20% 글리세롤이 보충된 용해 완충액 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl 및 2 mM β -mercaptoethanol]에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포는 초음파 처리에 의해 용해되었다. 생성된 용액을 원심 분리하고 상청액을 Ni-NTA 컬럼 (Qiagen)에 로딩시켰다. 컬럼을 40 mM 이미다졸이 보충된 버퍼 A [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoethanol 및 20 % glycerol] (MilliporeSigma)로 세척한 후, 결합된 단백질을 200 mM 이미다졸이 보충된 버퍼 A로 용출시켰다. 용출된 단백질을 tobacco etch virus (TEV) 프로테아제 및 human rhinovirus (HRV) 3C 프로테아제로 밤새 처리하여 N 말단에서 FLAG 태그를 노출시키고 각각 C 말단 mCherry-10xHis 태그를 제거하였다. 샘플을 5 mM CaCl_2 의 존재 하에 α -FLAG M1 아가로스 수지 (MilliporeSigma)와 혼합하고 4 °C에서 1 시간 동안 천천히 회전시켰다. 1 mM CaCl_2 가 보충된 완충액 A로 세척한 후, 결합된 단백질을 5 mM EGTA가 보충된 완충액 A로 용출시켰다. 용출된 FLAG-ABEmax (또는 FLAG-CBEmax)를 농축하고, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 및 20 % 글리세롤을 포함하는 완충액 (저장 버퍼)으로 평형화된 HiLoad 16/600 Superdex 200pg 컬럼을 사용하여 추가로 정제하였다. 피크 분획을 ~10 mg/mL로 농축하고 액체 질소에서 급속 냉동하고 -80 °C에 보관하였다.

[173]

[174] **3. 가이드 RNA (sgRNA) 제조**

[175] 염기 편집기의 RNP 전달을 위해 sgRNA를 T7 RNA polymerase 및 template oligonucleotide를 사용하여 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성하였다(표 5). *rd12* 대립 유전자를 표적으로 하는 시험관 내 전사된 sgRNA를 5'-triphosphate를 제거하기 위해 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP, NEB)로 추가로 처리하였다(gX19 + CIP). *rd12* 대립 유전자 (X19_IDT 및 X20_IDT)를 표적으로 하는 화학적으로 합성된 sgRNA는 화학적 변형을 포함하고 (Alt-R sgRNA), 이는

Integrated DNA Technologies (IDT), Inc.에서 구입하였다.

- [176] 하기 표 5는 시험관 내 전사 gRNA를 생성하는데 사용된 프라이머를 나타낸다.
20-nt 표적 프로토스페이서는 밑줄로 표기하였다.

[177] [표5]

프라이머	서열	서열번호
R-sgRNA scaffold	5'-AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTT TCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAAA CTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTTAAAC-3'	63
F-ABE_site 2	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAGTATG <u>AGGCATAGACTGCGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	64
F-ABE_site 4	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAGCAAA <u>GAGAATAGACTGTGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	65
F-ABE_site 5	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGATGAGA <u>TAATGATGAGTCAGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	66
F-ABE_site 8	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGTAAACA <u>AAGCATAGACTGAGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	67
F-ABE_site 10	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAACATA <u>AAGAATAGAATGAGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	68
F-ABE_site 13	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAAGATA <u>GAGAATAGACTGCGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	69
F-ABE_site 16	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAATA <u>AATCATAGAATCCGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	70
F-ABE_site 17	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGACAAAG <u>AGGAAGAGAGACGTTTAAGAGCTATGCTG</u> GAAAC-3'	71
F-ABE_site 28	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGACAAAC <u>CAGAAGCCGCTCCGTTTAAGAGCTATGCTGG</u> AAAC-3'	72
F-CCR5_site 10	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGACA	73

	<u>AGTGTGATCACTT</u> GTTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	
F-FANCF	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGAATCC <u>CTTCTGCAGCACCG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	74
F-HBG_site 1	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>CTTGACC</u> <u>AATAGCCTTGACAG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	75
F-HBG_site 2	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGATATTG <u>CATTGAGATAGTG</u> GTTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	76
F-HBG_site 3	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGTGGGGA <u>AGGGGCCCCCAAG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	77
F-HEK293_site 2	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAACACA <u>AAGCATAGACTGCG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	78
F-HEK293_site 3	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGCCCAG <u>ACTGAGCACGTGAG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	79
F-HEK293_site 4	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGCACTG <u>CGGCTGGAGGTCCG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	80
F-HPRT_Exon 4	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGACA <u>TAAAAGTAATTGGG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	81
F-HPRT Exon 8	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGAAGTAT <u>TCATTATAGTCAA</u> GTTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	82
F-VEGFA	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGAGT <u>GAGTGTGTGCGTG</u> GTTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	83
F-PPP1R12C_site 3	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGACCCTC <u>AGCCGTGCTGCTCG</u> TTTAAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	84

F-PPP1R12C_site 4	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GCTCTCAG</u> <u>CCTGGAGACCACGTTT</u> AAGAGCTATGCTGGA AAC-3'	85
F-PPP1R12C_site 6	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GGGGCTC</u> <u>AACATCGGAAGAGGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	86
F-PPP1R12C_site 9	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GCTGGCTC</u> <u>AGGTTTCAGGAGAGTTT</u> AAGAGCTATGCTGGA AAC-3'	87
F-EMX1	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>AGTCCG</u> <u>AGCAGAAGAAGAA</u> GTTTAAAGAGCTATGCTG GAAAC-3'	88
F-EMX1_GGT PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>CAGGGA</u> <u>TCCAAGCACACAAGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	89
F-VEGFA_CGT PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GCTCTCAG</u> <u>GCCCTGTCCGCAGTTT</u> AAGAGCTATGCTGGA AAC-3'	90
F-GRIN2B_AGA PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>AGCAAA</u> <u>TACCAGAGATAAGGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	91
F-FANCF_GGA PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>AGAACC</u> <u>CAAATCTCCAGGAGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	92
F-PTEN_GGA PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>TACCTA</u> <u>ATGGACTTCAGGGGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG AAAC-3'	93
F-MECP2_AGT PAM	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>CCTTCAT</u> <u>AGAATTGAAGAGGTTT</u> AAGAGCTATGCTGGA AAC-3'	94
F-Target rd12 gX20	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>ACATCA</u> <u>GAGGAGACTGCCAGGTTT</u> AAGAGCTATGCTG GAAAC-3'	95
F-Target rd12 gX19	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>CATCAG</u> <u>AGGAGACTGCCAGGTTT</u> AAGAGCTATGCTGG	96

	AAAC-3'	
--	---------	--

[178]

[179] **4. ABE 인코딩 mRNA 제조**

[180] pCMV_ABEmax는 PmeI로 분해하여 선형화되었으며 ABE 인코딩 mRNA의 시험관 내 합성을 위한 템플릿으로 사용되었다. ABE 인코딩 mRNA는 mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kit (Invitrogen)를 사용하여 전사되었고 5' 말단에서 공동 전사적으로(co-transcriptionally) 캡핑되어 7-메틸 구아노신 캡핑된 mRNA를 제조하였다. 이어서 mRNA의 3' 말단을 제조사의 지침에 따라 Poly(A) Tailing Kit (Invitrogen)로 폴리아데닐화하였다.

[181]

[182] **5. 염기 편집(base-editing) 실험을 위한 세포 배양 및 형질 감염**

[183] HEK293T 세포 (ATCC CRL-11268)를 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM (WELGENE)에서 배양시켰다.

[184] ABE 또는 CBE RNP-매개 게놈 편집을 위해, 15 µg의 염기 편집기 단백질 (10 mg/ml의 ABE 또는 8 mg/ml의 CBE가 저장 버퍼에 용해된 것)과 8 µg의 시험관 내 전사 또는 화학적 합성된 sgRNA를 혼합하고 실온에서 10분 동안 배양시켜 RNP 복합체를 형성하였다. 그런 다음 RNP 복합체를 HEK293T 세포 (1.5×10^5)와 혼합하고 Neon Transfection System을 통해 전기 천공하였다.

[185] ABE RNP 매개 RNA 오프-타겟 편집(off-target editing) 및 시간 경로(time course) 분석을 위해, HEK293T 세포 (1.5×10^5)를 sgRNA 없이 상기와 같이 전기 천공하였다.

[186] ABE 또는 CBE 인코딩 플라스미드-매개 게놈 편집을 위해, ABE 또는 CBE 인코딩 플라스미드 (0.5 µg)와 sgRNA 인코딩 플라스미드 (0.17 µg)를 HEK293T 세포 (1.5×10^5)와 혼합하고 Neon Transfection System을 통해 전기 천공하였다.

[187] ● ABE 인코딩 mRNA-매개 게놈 편집을 위해, ABE 인코딩 mRNA (3.0 µg) 및 다양한 용량의 sgRNA (0.6, 1.5, 3.0, 8.0 또는 16.0 µg)를 HEK293T 세포 (1.5×10^5)와 혼합하고 Neon Transfection System을 통해 전기 천공하였다.

[188] ● 염기 편집기 플라스미드를 사용한 orthogonal R-loop 분석을 위해, 500 ng의 dead SaCas9 플라스미드 (addgene no. 138162), 170 ng의 SaCas9 sgRNA 플라스미드, 500 ng의 염기 편집기 플라스미드, 및 170 ng의 염기 편집기 sgRNA 플라스미드를 2 µL의 Lipofectamine 2000 (cat no. 11668019, Thermo)을 사용하여 HEK293T 세포(1.0×10^5)로 공동 형질 감염시켰다.

[189] ● 염기 편집기 RNP를 사용한 orthogonal R-loop 분석을 위해, 500 ng의 dead SaCas9 플라스미드, 170 ng의 SaCas9 sgRNA 플라스미드, 및 670 ng의 pUC19 플라스미드 (음성 대조군 플라스미드)를 2 µL의 Lipofectamine 2000을 사용하여 HEK293T 세포 (1.0×10^5)로 공동 형질 감염시켰다.

[190] ● 형질 감염 하루 후에 염기 편집기 플라스미드 없이 처리된 세포를 트립신

처리하고 100 x g에서 8분 동안 원심 분리하였다. 세포를 재현탁한 후, 세포를 염기 편집기 단백질 (15 µg) 및 Neon Transfection System을 통해 시험관 내 전사된 sgRNA (8 µg)로 전기 천공하였다.

- [191] ● 시험관 내 *rd12* 돌연변이 교정(correction)을 위해, *rd12* 마우스의 mEF를 10% FBS, 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (WELGENE) 및 4 mM 글루타민 (Glutamax-I, Gibco)이 보충된 DMEM에서 유지하였다. ABE-RNP 매개 유전자 교정을 위해, mEF (1.5×10^5)를 NGABEmax 단백질 (15 µg) 및 시험관 내 전사된 sgRNA (8 µg), CIP 처리된 시험관 내 전사된 sgRNA (8 µg), 또는 화학적으로 합성된 sgRNA (IDT, 8 µg)로 Neon Transfection System을 통해 전기 천공하였다.

[192]

[193] **6. 웨스턴 블롯 분석을 통한 ABE 발현량 평가**

- [194] Protease inhibitor cocktail (SIGMA)이 보충된 RIPA 버퍼 (SIGMA)를 사용하여 ABE 형질 감염 HEK293T 세포로부터 세포 용해물을 제조하였다. 단백질 농도는 BCA 분석 키트 (Thermo Fisher)를 사용하여 측정되었다. 동일한 양의 단백질을 Mini Protean TGX Protein Gel (BioRad) 상에 로딩하고 80 V에서 20분, 120 V에서 40분 동안 실행하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 옮긴 후, 블롯을 항-Cas9 (#844301, BioLegend) 및 항-튜불린 (#3873, Cell Signaling) 항체와 함께 배양한 다음 적절한 horseradish peroxidase (HRP) 접합 2차 항체 (#7076, Cell Signaling)와 함께 배양하였다. HRP 반응의 화학 발광은 Fusion SL gel chemiluminescence documentation system (Vilber Lourmat)을 사용하여 검출되었다.

[195]

[196] **7. 실험에 사용된 동물**

- [197] 8주령 수컷 C57BL/6 마우스와 *rd12* 마우스 (stock no. 005379, The Jackson Laboratory)의 짝짓기 쌍을 Central Laboratory Animal을 통해 구입하고 12시간 암광주기 하에 유지하였다. 모든 동물 실험은 안과 및 시력 연구에서의 동물 사용에 대한 시력 및 안과 연구 협회 성명서의 지침에 따라 수행되었다.

[198]

[199] **8. 마우스 망막 하 주사**

- [200] 3주령 마우스 (유년기 마우스) 또는 6개월령 마우스 (성체 마우스)를 마취시켰다. 마우스에 33 게이지 blunt needle이 장착된 맞춤형 Nanofil 주사기 (World Precision Instrument)를 사용하여 한쪽 눈에 RNP와 Lipofectamine® 2000 (cat no. 11668019, Thermo)의 1:1 (v/v) 혼합물을 망막 하 주사하였다. 각 용량에는 12.54 µg NG-ABEmax 및 5.76 µg의 적절한 sgRNA를 포함되었다. 눈 한쪽 당 총 부피는 3 µL였다.

[201]

- [202] **9. 표적화 딥 시퀀싱 (Targeted deep sequencing) - 온-타겟(ontarget) 및 오프-타겟(off-target) editing 분석**

- [203] DNA 또는 RNA 온-타겟(on-target) 및 오프-타겟(off-target) 부위의 분석을 위해, 지정된 시점 또는 형질 감염 3일 후에 NucleoSpin Tissue Kit (MN) 또는 NucleoSpin RNA Plus Kit (MN)를 사용하여 ABE 형질 감염 세포에서 게놈 DNA 또는 총 RNA를 추출하였다. PrimeScript RT master mix (TAKARA)를 사용하여 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 정상 또는 *rd12* 마우스에서 ABE 표적 부위의 서열 분석을 위해, ABE RNP/Lipofectamine 2000 혼합물의 망막 하 주사 후 1주 또는 5주 시점에 NucleoSpin Tissue Kit (MN)를 사용하여 망막색소상피(RPE) 세포에서 게놈 DNA를 추출하였다. 서열 라이브러리 생성을 위해 KOD Multi & Epi PCR kit (TOYOBO)를 사용하여 온-타겟(on-target) 및 오프-타겟(off-target) 부위를 증폭시켰다(표 6 및 7). 이러한 라이브러리는 TruSeq HT Dual Index system을 갖는 MiniSeq (Illumina)를 사용하여 서열화되었다. 즉, Illumina MiniSeq 플랫폼을 사용하여 동일한 양의 PCR 앰플리콘을 paired-end read 서열 분석에 적용하였다. MiniSeq 후, BE-analyzer를 사용하여 야생형과 돌연변이 서열 비교를 통해 paired-end read를 분석하였다.
- [204] 하기 표 6은 DNA 온-타겟(on-target) editing의 분석을 위해 사용된 프라이머를 나타낸다. HT True seq index의 확장(extension)을 위한 5' tail 서열은 밑줄로 나타내었다.

[205] [표6]

프라이머	서열	서열번호
fwd-ABE_site 2	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGGGAACCTCAGGTGAAAAGTC</u>	97
rev-ABE_site 2	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCTAGGCAACAAGAGCAAAA</u>	98
fwd-ABE_site 4	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTTCTCGATCTCCTGACCTCGT</u>	99
rev-ABE_site 4	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTGTCAGGTAATGTGCTAAACAGAGA</u>	100
fwd-ABE_site 5	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAAGTCAAGCCTGAGCTTCCA</u>	101
rev-ABE_site 5	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCCAAAGTGCTGGGATTTTA</u>	102
fwd-ABE_site 8	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGCCGTGGGAGACAATTCATA</u>	103
rev-ABE_site 8	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGGTTCTGTTTGTGGCCAAG</u>	104
fwd-ABE_site 10	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAAAGTCACTCTGCTGTGCTATTAGA</u>	105
rev-ABE_site 10	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTGAGCAAGGCACAGAAAGAC</u>	106
fwd-ABE_site 13	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTTCAAACACTGGGTCATACTTCTTC</u>	107
rev-ABE_site 13	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCATCTGGGCACAGTGTTAC</u>	108
fwd-ABE_site 16	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCCACCTGGAATGAGTTTTCG</u>	109
rev-ABE_site 16	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTATGCCAGATACCAGCAATCC</u>	110
fwd-ABE_site 17	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCAAGCCTGATTCCAAGGAGA</u>	111
rev-ABE_site 17	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u>	112

	<u>ATCTAAATGAGCCTCTGGTGGAGA</u>	
fwd-ABE_site 28	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTTTCTTGTAGCCCTCTTTTTATTGG</u>	113
rev-ABE_site 28	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCTATCACAATCACAACCTGCAA</u>	114
fwd-CCR5_site 10	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCCTGACAATCGATAGGTACC</u>	115
rev-CCR5_site 10	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTAGCCCCAAGATGACTATCTT</u>	116
fwd-FANCF	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAGCATTGCAGAGAGGCGTAT</u>	117
rev-FANCF	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTATGGATGTGGCGCAGGTAG</u>	118
fwd-HBG	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCC</u>	119
rev-HBG	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGGAATGACTGAATCGGAACAA</u>	120
fwd-HEK293_site 2	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGGACGTCTGCCCAATATGTAA</u>	121
rev-HEK293_site 2	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTAAGGGGGGAAAAATTGTCCAG</u>	122
fwd-HEK293_site 3	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAAACGCCCATGCAATTAGTC</u>	123
rev-HEK293_site 3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCAGCCAACTTGTCAACC</u>	124
fwd-HEK293_site 4	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCTCCCTTCAAGATGGCTGAC</u>	125
rev-HEK293_site 4	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTAACGGAGACACACACACAGG</u>	126
fwd-HPRT_Exon 4	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTTTGAAGTTTGTGTGTGTACATAAGGA</u>	127
rev-HPRT_Exon 4	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTGATTGATTGAAAGCACACTGTT</u>	128
fwd-HPRT Exon 8	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u>	129

	<u>CTGAGAGGCACATTTGCCAGTAT</u>	
rev-HPRT Exon 8	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTATGAGGTGCTGGAAGGAGAA</u>	130
fwd-VEGFA	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTACAGGGAAGCTGGGTGAAT</u>	131
rev-VEGFA	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCACACGCACACACTCACTCA</u>	132
fwd-PPP1R12C_site 3	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGGAATTCTGCATCATGTGGGCGTGTCC</u>	133
rev-PPP1R12C_site 3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGGATCAGCCAGGAACGAAGACCACTG</u> G	134
fwd-PPP1R12C_site 4	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAAGACAATCCTAGGAAGCAGGGTCAGC</u>	135
rev-PPP1R12C_site 4	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGGGCCAACATCGCCGCCG</u>	136
fwd-PPP1R12C_site 6	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGCCAGGCAGATAGACCAGACTGAGC</u>	137
rev-PPP1R12C_site 6	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGCCTCCTTACCATTCCCCTTCGACC</u>	138
fwd-EMX1_GGT PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTTTCTTCCCACCTGGAATGTC</u>	139
rev-EMX1_GGT PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGCACTGACTGGACACAAGTGA</u>	140
fwd-VEGFA_CGT PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTGGTCACTCCAGGATTCCAATAG</u>	141
rev-VEGFA_CGT PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCAAGGTTACAGCCTGAAA</u>	142
fwd-GRIN2B_AGA PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCCTCCTTTGTCTCTGCCTGT</u>	143
rev-GRIN2B_AGA PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTGGATCTACATCACGTAACCTGTCTT</u>	144
fwd-FANCF_GGA PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTCCGATGAGGAGACACTCCAA</u>	145

rev-FANCF_GGA PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTCCACAGGCTGCTGAGAAAC</u>	146
fwd-PTEN_GGA PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAGATTTCTAAGCCACAGAAAAAGA</u>	147
rev-PTEN_GGA PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTGGTGACCAGCATTTTATGG</u>	148
fwd-MECP2_AGT PAM	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT</u> <u>CTAATGGAAGATCCAGAGAAAGC</u>	149
rev-MECP2_AGT PAM	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG</u> <u>ATCTTGCTACTCCAGTGAACACACAA</u>	150

- [206] 하기 표 7은 DNA 또는 RNA 오프-타겟(off-target) editing의 분석을 위해 사용된 프라이머를 나타낸다. HT True seq index의 확장(extension)을 위한 5' tail 서열은 밑줄로 나타내었다.

[207] [표7]

프라이머	서열	서열번호
fwd-HBG OT1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG</u> CTGGGGAGAGAAAAGGAAA	151
rev-HBG OT1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GACTGTGCAAATGCTTCTCG	152
fwd-HBG OT2	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTA</u> GGCTATTGGTCAAGGCAAG	153
rev-HBG OT2	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ACGGCTGACAAAAGAAGTCC	154
fwd-HBG OT3	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG</u> CTGGGGAGAGAAAAGGAAA	155
rev-HBG OT3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GACTGTGCAAATGCTTCTCG	156
fwd-HBG OT4	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG</u> CCAGCTAACATGGGTCATT	157
rev-HBG OT4	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GCCAGAATCGAGCACTGAG	158
fwd-HBG OT5	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTC</u> CTTGGCTTGCTATTTGGAG	159
rev-HBG OT5	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GGTTCCCTCAAAACCTCCTC	160
fwd-HBG OT6	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> AGCCACTGTCCTGGCTTCT	161
rev-HBG OT6	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GCTTCCCAGTGACACACAGA	162
fwd-VEGFA3 OT1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG</u> CTCTCCACCTCGATGTCA	163
rev-VEGFA3 OT1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ATCCGGTGCTGCAGTGAG	164
fwd-VEGFA3 OT2	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> TGCTGTGTCTTCCTTCTGC	165
rev-VEGFA3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>	166

OT2	TTGGTGGGACTGATGATGAA	
fwd-VEGFA3 OT3	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTC</u> AGAAGTGGTTGATGAATTGC	167
rev-VEGFA3 OT3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> GAAACCATTGTTGGGCTTTCCT	168
fwd-HPRT_E8 OT	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> TGCTGAGCTCTTATATGTGCAA	169
rev-HPRT_E8 OT	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> TTCTCTTGCCCTGACCATTC	170
fwd-HEK4 OT1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTA</u> GACTCATAGCTGGGGCTGA	171
rev-HEK4 OT1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CCGGATGATTCTCCTACTTCC	172
fwd-HEK4 OT2	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTC</u> AAGGTCTGAGGCTCGAATC	173
rev-HEK4 OT2	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> AGAGCAAACCTTGGCATTGT	174
fwd-HEK4 OT3	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> GAGCTCATTTCACCAGAA	175
rev-HEK4 OT3	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> ATGGGAAATACGGGCTTAGG	176
fwd-AARS1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> CAGTTTTGCCCGATCTCCT	177
rev-AARS1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CCCATGGTGCCTGACTAACA	178
fwd-RSL1D1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> GGCTTTCCAAATCAGTGGGTC	179
rev-RSL1D1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CTCATAAGCTTAGACCAACAAGC	180
fwd-CIP1	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG</u> CTGAGGGCCATCTGAAACA	181
rev-CIP1	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> AGGGTGCCTTCATGGTTAGC	182
fwd-PERP	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTC</u>	183

	TGTGGTGGAAATGCTCCCAAG	
rev-PERP	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CACTCTCAGGAAGACAAGCATC	184
fwd-TOPORS	<u>ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTT</u> CAGTTTGGCCCGATCTCCT	185
rev-TOPORS	<u>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u> CCCATGGTGCCTGACTAACA	186

[208]

[209] **10. 면역 형광 분석을 통한 리보핵단백질 (RNP) 전달 확인**

[210] 망막 하 주사 후 지정된 시점에 마우스를 희생시키고 RPE-choroid-scleral 복합체를 제조하였다. 이어서 상기 복합체를 항-FLAG (cat no. MA1-142-A488, Thermo), 항-ZO-1 (cat no. 339194, Thermo), 또는 항-RPE65 (cat no. NB100-355AF488, Novus) 항체로 처리하고 공초점 현미경으로 관찰하였다. 핵은 4',6-diamidino-2-phenylindole (cat. no. D9542, Sigma)을 사용하여 확인되었다.

[211]

[212] **11. qRT-PCR (정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응)을 통한 유전자 발현 수준 확인**

[213] ABE RNP/Lipofectamine 2000 혼합물의 망막 하 주사 5주 후에 TRIzol 시약 (cat no. 15596018, Thermo)을 사용하여 RPE 세포로부터 총 RNA를 제조하였다. 추출된 RNA의 품질 및 양은 NanoDrop 2000 분광 광도계 (Thermo)로 평가하였다. cDNA를 High-Capacity RNA-to-cDNA kit (cat no. 4387406, Thermo)으로 제조하였다. qRT-PCR은 TaqMan Fast Advanced Master Mix (cat no. 4444556, Thermo) 및 Gene Expression Assay (Thermo)를 사용하여 StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo)으로 수행되었다. 유전자 발현 분석의 product ID는 다음과 같다: *Rpe65*의 경우 Mm00504133_m1; *Gapdh*의 경우 Mm99999915_g1; 및 *Rn18s*의 경우 Mm03928990_g1. 상대적 *Rpe65* 유전자 발현 수준은 *Gapdh* 및 *Rn18s*의 유전자 발현 수준으로 정규화되었다. 모든 절차는 Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments 가이드라인에 따라 수행되었다.

[214]

[215] **실시예 1: 인간 세포 발현 시스템에서의 ABE/CBE RNP 복합체 제조**

[216] **1.1 고순도 ABE/CBE 단백질 제조**

[217] 인간 세포 시스템에서 재조합 염기 편집기 단백질을 제조하기 위해, ABE 및 CBE의 최적화된 형태(즉, ABEmax 및 AncBE4max)를 각각 인코딩하는 서열을 포유류 발현 벡터 pEX-FlagR에 클로닝하였다. 이 벡터는 적색 형광 단백질(mCherry) 및 이중 친화성 태그를 표적 단백질에 융합하여 이는 각각

단백질 발현을 쉽게 모니터링하고 효율적으로 단백질을 정제할 수 있도록 설계되었다(도 1a 및 도 2).

[218] 제조된 플라스미드를 현탁 배양에서 HEK293E 세포로 형질 감염시키고 Ni-친화성, 항-FLAG-M1-친화성, 및 크기 배제 크로마토그래피 기술을 순차적으로 사용하여 ABE/CBE 단백질을 정제하였다. 폴리히스티딘(poly-His) 및 mCherry 태그는 정제 동안 프로테아제 절단에 의해 제거되었고, 따라서 N-말단 FLAG 태그만 남은 정제된 ABE/CBE 단백질을 수득하였다. 이러한 발현 및 정제 방법을 통해 1 리터의 세포 배양으로부터 고순도 CBE 또는 ABE 단백질 1 mg을 재현 가능하게 수득하였다(도 1b).

[219] **1.2 정제된 ABE/CBE 단백질의 활성 확인**

[220] 정제된 ABE/CBE 단백질의 활성을 확인하기 위해 HEK293T 세포에서 19 개의 다른 내인성 부위를 표적으로 하는 ABE RNP와 8개의 다른 내인성 부위를 표적으로 하는 CBE RNP를 테스트하였다. 또한, 대조군으로서 ABE/CBE 인코딩 플라스미드를 형질 감염시켰다.

[221] 형질 감염 3일 후 벌크 세포 집단에서 얻은 고속 염기서열 분석(high throughput sequencing; HTS) 데이터에 따를 때, ABE/CBE RNP는 효과적인 편집 활성을 나타내었으며, 이는 인간 세포 시스템에서 ABE/CBE 단백질이 성공적으로 제조되었음을 나타낸다.

[222] CBE는 편집 효율을 향상시키기 위해 우라실 DNA 글리코실라제 억제제(UGI)를 포함하였다. 따라서, RNP에서 CBE와 융합된 UGI의 농도가 플라스미드-인코딩 버전의 것보다 상대적으로 낮아 세포에서 우라실 N-글리코실라제 활성을 억제하기에 불충분한 것을 알 수 있었다.

[223] 추가적으로 UGI를 과발현시킨 경우, 전체 CBE RNP 편집 활성이 향상되었고, 임의의 C 편집(off-target)을 포함하는 산물(product)에 비해 C to T 편집(on-target)을 포함하는 산물의 비율이 증가하였다(도 1c).

[224] 또한 ABE 및 CBE RNP가 ABE 및 CBE 인코딩 플라스미드보다 형질 감염 후 더 높은 세포 생존력을 나타내었다(도 1d). 대조군으로서 GFP 벡터 (~ 3.5kb)를 형질 감염시켰을 경우 세포 생존력의 경미한 감소가 관찰되었고, ABE/CBE 플라스미드의 큰 크기 (~ 9kb)가 세포 생존력 감소의 원인일 수 있음을 나타낸다. 즉, 큰 크기의 플라스미드 (6 ~ 16kbp)가 낮은 생존력과 형질 감염 효율을 나타낸다고 볼 수 있다.

[225] 이러한 결과는 RNP 시스템이 의학적 치료에 적합할 것임을 나타낸다.

[226]

[227] **실시예 2: 염기 편집의 특성 확인**

[228] **2.1 염기 편집 활성 윈도우 및 염기 편집 패턴 분석**

[229] ABE/CBE RNP와 ABE/CBE 플라스미드로부터 유도된 편집 활성 윈도우 및 편집 패턴을 차별화할 수 있는지 분석하였다.

[230] RNP 및 플라스미드 인코딩 염기 편집기의 염기 편집 데이터를 분석한 결과,

RNP 및 플라스미드 인코딩 염기 편집기의 선호되는 편집 활성 윈도우는 유사했지만(결과 미도시) 편집 패턴은 상이하였다(도 4a 내지 4d). 일반적으로 RNP 인코딩 염기 편집기는 플라스미드 인코딩 염기 편집기보다 대립 유전자에서 더 적은 염기를 변환하였다. ABE_site 5(A5)의 경우(도 4a), 단일 염기 전환(막대기 중  부분은) ABE RNP 처리된 세포 중 47.8%였지만 플라스미드 처리된 세포 중 16.4%에 불과하였고, 다중 염기 전환(막대기 중  및  부분은) RNP를 통한 전달 대비 플라스미드를 통한 전달의 경우에 더 자주 발생하였다. 이러한 경향은 대부분의 다른 표적 (A8, A10, A16; 도 4b) 및 CBE의 경우 (도 4c 및 4d)에서도 관찰되었다.

[231] 2.2 세포 수명과 염기 편집의 관계

[232] 상이한 염기 편집 결과에 대한 이유를 조사하기 위해, 플라스미드 인코딩 ABE로부터 다른 시점에서 유도된 다른 편집 패턴 빈도를 측정하였다(도 4e). 단일 염기 전환 대비 다중 염기 전환의 비율은 시간 의존적 방식으로 점진적으로 증가하였고(도 4f), 이는 플라스미드 인코딩 ABE의 장기간 발현이 다중 염기 전환에 영향을 미침을 나타낸다. 대조적으로, 플라스미드 인코딩 ABE/CBE에 비해 ABE/CBE RNP는 bystander 뉴클레오타이드의 편집 횟수가 더 적었는데, 이는 주로 ABE/CBE RNP가 세포에서 수명이 짧기 때문이다.

[233] 2.3 단백질 발현량 확인

[234] 두 가지 다른 전달 방법으로부터 세포에서의 ABE 단백질의 양을 확인하기 위해 sgRNA 없이 ABE 단백질 또는 ABE 인코딩 플라스미드를 형질 감염시킨 후, 웨스턴 블롯(Western blot) 분석을 사용하여 다른 시점들에서 세포 용해물 중 ABE 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 통한 전달 실험에서는, 초기 ABE 단백질 농도는 12 시간 동안 유지되었고, 24 시간이 되었을 때 급격히 감소하였다. 그러나 플라스미드를 통한 전달의 경우에는, ABE 농도가 6 시간까지 급격히 증가한 후 최대 농도는 24 시간까지 유지되었다. 이후 6일 동안 농도가 서서히 감소하였다 (도 4g 및 5a).

[235] 플라스미드 형질 감염 세포에서 6 시간 시점 대비 각 시점에서의 ABE 단백질 풍부도(abundance)를 비교한 결과, 단백질 전달 유래 ABE 단백질 농도는 초기 3 시간 동안은 제외하고는 항상 플라스미드 전달 유래 ABE 농도보다 낮았다 (도 4h).

[236] 추가적으로, ABE RNP 또는 ABE/sgRNA 인코딩 플라스미드가 형질 감염된 후 세포 중 sgRNA 존재 하에서 ABE 단백질 풍부도를 측정하였다(도 5b 및 5c). 전반적인 경향은 sgRNA가 없는 상기 결과와 유사하지만 ABE RNP 및 ABE 플라스미드 전달 방법 모두에서 ABE 농도가 더 느리게 감소하는 것을 발견하였다. 이는 Cas9/sgRNA 복합체가 세포에서 apo Cas9 단백질보다 더 안정적이기 때문이다.

[237]

- [238] 실시예 3: DNA 오프-타겟 효과 확인
- [239] 3.1 sgRNA 의존적 오프-타겟 DNA 편집 활성 확인
- [240] 먼저 ABE의 Cas9 이펙터 부분에 의해 유발되는 것으로 알려진 sgRNA 의존적 오프-타겟 DNA 편집 활성을 평가하였다.
- [241] 이 실험에서는, RNP 및 플라스미드 전달 방법에 추가로 mRNA 전달 방법을 사용하였다. mRNA는 시험관 내(*in vitro*) 전사되었고, sgRNA는 Integrated DNA Technologies (IDT), Inc.에서 합성되었다. ABE 인코딩 mRNA 및 sgRNA의 농도를 최적화하기 위해, HEK_site 2에서의 아데닌 염기 편집에 대해 여러가지 용량으로 테스트하여, HEK293T 세포에서 가장 효율적인 조건을 확인하였다(즉, 3.0 ug의 각 ABE-인코딩 mRNA 및 sgRNA)(도 6).
- [242] 4개의 정의된 표적 (즉, HBG_site 3, HPRT_exon 8, VEGFA, 및 HEK_site 4; 표 8)에 대해 ABE RNP, ABE 인코딩 mRNA, 및 ABE 인코딩 플라스미드의 형질 감염 후 온-타겟 및 오프-타겟 모두에서 편집 빈도를 평가하였다.
- [243] 하기 표 8은 DNA-오프-타겟 편집 활성을 분석하기 위해 사용된 온-타겟 및 오프-타겟 부위를 나타낸다. PAM(Protospacer adjacent motif)은 이탤릭체로 표시하였다. 온-타겟 프로토스페이서 서열에 대한 mismatch 또는 bulge는 소문자 또는 하이픈으로 표기하였다. 각각의 표적에서 가장 빈번하게 편집된 A 뉴클레오티드는 밑줄로 나타내었다. 하기 표 8에서 "position"은 잠재적인 절단 부위를 나타낸다(PAM으로부터 3 nt 떨어짐). 하기 표 8의 Gene에서 "OT"는 Off-Target을 나타낸다.

[244] [표8]

Gene	Sequences with PAM	Position	서열번호
HBG_site 3	GTGGGG <u>A</u> AGGGGCCCCCAAGAG G	chr11_5276202	187
HBG_OT1	GgtGGG <u>A</u> tGGGGtCCCCAAGTGG	chr3_13705838	188
HBG_OT2	GgtGGGg <u>A</u> GcGGCCCCCcAGTGG	chr9_138419302	189
HBG_OT3	agtGGGg <u>A</u> GGcGCCcCAAGTGG	chr15_84049561	190
HBG_OT4	GTGGGG- <u>A</u> GtGGCCCCCAAGAGG	chr10_73282210	191
HBG_OT5	GTGGGG- <u>A</u> GcGGCCCCCcAGTGG	chr9_138419300	192
HBG_OT6	aTGaGG <u>A</u> AGcGaCCCCAAGAGG	chr3_4746491	193
VEGFA	GGTG <u>A</u> GTGAGTGTGTGCGTGTGG	chr9_110103695	194
VEGFA_OT1	aGTG <u>A</u> GTGAGTGTGTGtGTGGGG	chr14_65569159	195
VEGFA_OT2	tGTG <u>A</u> GTaAGTGTGTGtGTGTGG	chr14_62078773	196
VEGFA_OT3	GGTG <u>A</u> GTGtGTGTGTGCaTGTGG	chr2_177463426	197
HPRT_exon 8	GAAGT <u>A</u> TTCATTATAGTCAAGGG	chrX_134498649	198
HPRT-E8_OT	GAAGc <u>A</u> TTCATTATAGTCAAAGG	chr11_93649491	199
HEK_site 4	GGC <u>A</u> CTGCGGCTGGAGGTGGGG G	chr20_32761949	200
HEK4_OT1	tGC <u>A</u> CTGCGGcGGAGGaGGTGG	chr20_61435489	201
HEK4_OT2	GGC <u>A</u> CgaCGGCTGGAGGTGGGGG	chr10_125006288	202
HEK4_OT3	GGC <u>A</u> tcaCGGCTGGAGGTGGAGG	chr10_75343344	203

[245]

[246] 고속 염기서열 분석(HTS) 데이터 결과를 도 7a에 나타내었다. 플라스미드 전달 방법은 HBG_site 3에서 RNP 및 mRNA 전달 방법에 비해 A-to-G 교정 효율이 높았으나, 이 경우에도 오프-타겟 비율이 RNP 및 mRNA 전달 방법에 비해 현저히 높았다. RNP 및 mRNA 전달 방법은 HPRT_exon 8, VEGFA, HEK_site 4에서 플라스미드 전달 방법에 비해 높은 A-to-G 교정 효율을 나타내는 경우에도, 오프-타겟(OT) 비율은 크게 감소하였다(도 7a).

[247] **3.2 sgRNA 독립적 오프-타겟 DNA 편집 활성 확인**

[248] 다음으로, ABE 또는 CBE에 대해 sgRNA 독립적 무차별 DNA 탈아미노화 활성을 확인하였다. 이를 위해 단일 가닥 DNA 영역이 촉매적으로 비활성인 SaCas9 (dSaCas9)로 형성될 수 있는 Orthogonal R-loop 분석법을 수행하였다(도 7b).

[249] 하기 표 9는 Orthogonal R-loop 분석에 사용된 프라이머를 나타낸다. 20-nt 표적 프로토스페이서는 밑줄로 나타내었다. TruSeq HT index의 확장 (extension)을 위한 5' tail 서열은 이탤릭체로 나타내었다.

[250] [표9]

프라이머	서열	서열번호
F-R-loop5	5'-CACCGTCTGCTTCTCCAGCCCTGGC-3'	204
R-R-loop5	5'-AAATGCCAGGGCTGGAGAAGCAGAC-3'	205
F-R-loop6	5'-CACCGGATGTTCCAATCAGTACGCA-3'	206
R-R-loop6	5'-AAATTGCGTACTGATTGGAACATCC-3'	207
fwd-R-loop site 5	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GCCTAGAAAGGCATGGATGA-3'	208
rev-R-loop site 5	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT CTAGCCCCTGTCTAGGAAAAGC-3'	209
fwd-R-loop site 6	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT AAGTTGCCAGAGTCAAGGA-3'	210
rev-R-loop site 6	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT CTCCCAGGTGCTGACGTAGGTA-3'	211

[251]

[252] Orthogonal R-loop 분석의 결과에서 ABE RNP 형질 감염 세포의 R-loop 부위 5와 부위 6에서는 A 편집이 거의 발견되지 않은 반면에, ABE 인코딩 플라스미드 형질 감염 세포에서 두 R-loop 부위 (부위 5 및 6)의 CA₁₂G, CA₉A 및 AA₁₀T 모티프에서는 꽤 상당한 A 편집이 관찰되었다(도 7c). 마찬가지로, 유사한 경향이 CBE RNP와 CBE 인코딩 플라스미드 형질 감염 세포에서 관찰되었다(도 7d).

[253] 이러한 결과는 RNP를 통한 전달이 훨씬 더 정밀하고 특이적인 염기 편집 결과를 가져옴을 나타낸다.

[254]

[255] 실시예 4: 전사체에서의 RNA 오프-타겟 효과 확인

[256] 본 실시예에서는 각 전달 방법에 따른 무차별 ABE-매개 RNA 탈아미노화 활성을 확인하였다.

[257] 이를 위해 HEK_site 2를 표적으로 하는 sgRNA의 존재 하에 ABE RNP, ABE 인코딩 mRNA, 또는 ABE 인코딩 플라스미드의 형질 감염 후 RNA 전사체 (AARS1, RSL1D1 및 TOPORS; 표 10)에서 유도된 상보적 DNA (cDNA)에서 아데닌 돌연변이 빈도를 계산하였다.

[258] 하기 표 10은 본 실시예에서 사용된 RNA 오프-타겟 부위를 나타낸다. 편집된 A 뉴클레오티드는 밑줄로 나타내었다. 아래 표 10에서 "position"은 각각의 편집된 A 뉴클레오티드의 위치를 나타낸다.

[259] [표10]

Gene	Sequences	Position	서열번호
<i>AARS1</i>	CCACT <u>A</u> CGACCGGATTGGT G	chr16_70271877	212
<i>RSL1D1</i>	CGGCT <u>A</u> CGGAATTTAGGAG A	chr16_11836797	213
<i>TOPORS</i>	TTCAT <u>A</u> CGAAGAAGGCAG CC	chr9_32543383	214

[260]

[261] 그 결과를 도 8에 나타내었다. RNP로 형질 감염된 세포에서 ABE는 AARS1 및 RSL1D1 부위에서 어느 시점에서든 RNA 편집 활성이 거의 없었고 TOPORS 부위에서는 처음 3시간 동안 미미한 RNA 편집 활성을 보인 반면에, mRNA 또는 플라스미드로 형질 감염된 세포는 3일 이상 동안 세 부위 모두에서 지속적인 무차별 RNA 탈아미노화를 나타냈다(도 8a). 이러한 RNA 탈아미노화 활성과 sgRNA의 연관성을 확인하기 위해 sgRNA 없이 동일 실험을 반복한 결과 오프-타겟 RNA 편집이 유사하게 발생함을 확인하였다(도 8b).

[262] 이로부터 본 발명의 RNP는 매우 낮은 오프-타겟 효과를 나타냄이 확인되었다.

[263]

[264] **실시예 5: 생체 내(in vivo) 염기 편집 및 돌연변이 교정 효과 확인**

[265] ABE RNP의 생체내 사용을 입증하기 위해, ABE RNP 전달을 통한 생체 내 DNA 편집을 확인하였다.

[266] **5.1 ABE RNP 전달을 통한 정상 마우스 표적 염기 편집 확인**

[267] 본 실험에서는 정상 마우스에서 *Fah*, *Vegfa* 및 *Nr2e3* 유전자를 표적으로 하였다. 정제된 ABEmax와 sgRNA (IDT의 합성)를 Lipofectamine 2000과 함께 망막 하 주사를 통해 성체 마우스의 한쪽 눈에 주입하였다(도 9a). 주입 1주 후 RNP 주입 마우스의 망막 색소 상피 세포(RPE cell)로부터 게놈 DNA를 분리하여 고속 염기서열 분석(HTS) 데이터를 얻었다. 결과는 *Fah*, *Vegfa* 및 *Nr2e3*에서 명확한 염기 편집을 보여주었다(도 9b).

- [268] **5.2 망막 변성 Rpe65 유전자 돌연변이의 교정**
- [269] *rd12* 마우스에서 망막 변성을 일으키는 *Rpe65* 유전자의 넌센스 돌연변이를 교정하고자 하였다.
- [270] 돌연변이 근처에 관련된 NGG 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열이 없었기 때문에(도 10a), 7개의 추가 돌연변이를 삽입하여 NG PAM 표적화 가능한 ABEmax (이하, NG-ABEmax) 단백질을 구성하였다. NG-ABEmax RNP 형태로 전달 후 NG-ABEmax 단백질이 3 개의 내인성 표적 (VEGFA, GRIN2B, PTEN)에서 편집 활성을 나타내는지 테스트하였다. 고속 염기서열 분석(HTS) 데이터에 따를 때, NG-ABEmax RNP는 3개 표적 모두에서 편집 활성을 나타냄이 확인되었다(도 9c).
- [271] 그 다음, TGA PAM을 포함하고 질병 관련 *Rpe65* 포인트 돌연변이(c.130C> T)가 위치 6에서의 아데닌 (A6)과 일치하는 sgRNA를 설계하였다(도 10a). *rd12* 마우스의 배아 섬유 아세포 (*rd12* mEF)에서 다양한 형태의 sgRNA를 갖는 NG-ABEmax RNP를 사용하여 돌연변이가 교정되는 때의 효율을 확인하였다(도 10b). 사용된 sgRNA의 형태에 따라 효율의 차이는 있었으나, 모두 교정 효과를 나타냄이 확인되었다. 이는 본 발명의 RNP는 임의의 공지된 sgRNA와 사용할 수 있음을 나타낸다.
- [272] 도 10b의 결과, IDT의 화학적 합성 sgRNA (X20_IDT)가 가장 효과적인 편집 활성을 나타냈기에, 이를 마우스로의 생체 내 전달에 사용하였다.
- [273] 궁극적으로 정제된 NG-ABEmax 및 X20_IDT sgRNA (이하, 표적 sgRNA)를 Lipofectamine 2000과 함께 망막 하 주사를 통해 성체 또는 유년기 *rd12* 마우스의 한쪽 눈에 주입하였다(도 10c). 주입된 NG-ABEmax RNP가 주입 6시간 후 RPE에서 세포질과 핵에 성공적으로 배치된 반면(도 10d), NG-ABEmax RNP는 주입 72시간 후에는 RPE에서 검출되지 않음을 발견하였고(도 11a), 이는 RNP가 배양된 세포에서와 같이 생체 내 세포에서 빠르게 분해됨을 나타낸다(도 4g).
- [274] 특히, NG-ABEmax RNP 주입 마우스의 RPE에서 분리된 게놈 DNA의 고속 염기서열 분석(HTS) 데이터에 따를 때, 본 발명의 RNP는 bystander 편집이 관찰되지 않았으며, *rd12* 돌연변이의 정밀한 교정을 보여주었다(도 11b).
- [275] 기능적 *Rpe65* 유전자의 회복은 mRNA와 단백질 수준 모두에서 검증되었다. 표적 sgRNA를 포함하는 ABE RNP로 처리된 *rd12* 마우스의 RPE에서 *Rpe65* mRNA 발현의 현저한 증가를 관찰하였다. 이들 마우스에서 발현 수준은 정상 마우스의 2.8 %로, 비처리 *rd12* 마우스(no injection) 또는 비표적화 sgRNA를 포함하는 ABE RNP (non-target) 처리 *rd12* 마우스의 발현 수준보다 유의하게 높았다 (도 10f). 또한, *Rpe65*가 NG-ABEmax RNP 처리 *rd12* 마우스의 RPE에서 발현됨을 확인하였고 (도 10g), 이는 돌연변이 *Rpe65*를 성공적으로 유전자 교정할 수 있음을 나타낸다.

청구범위

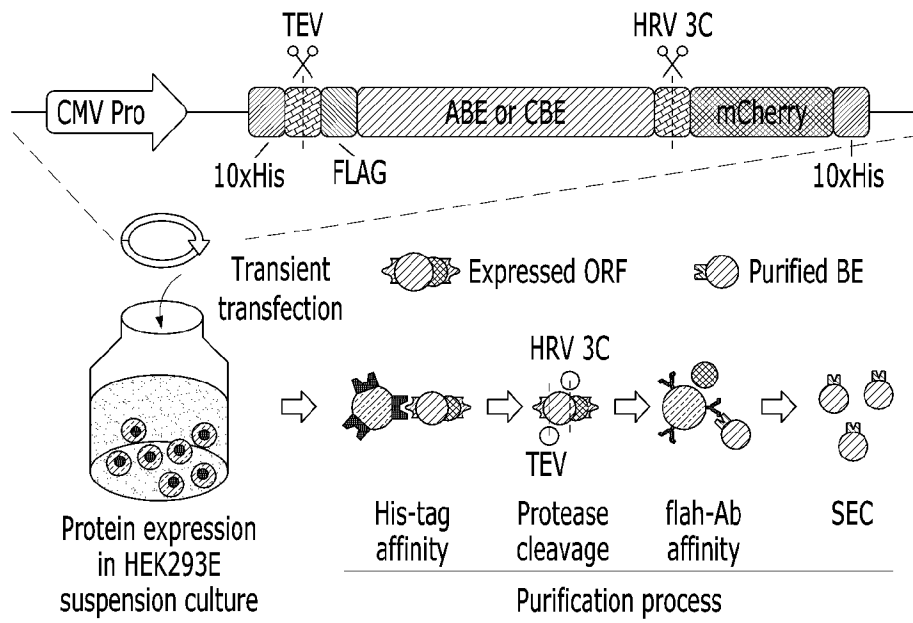
- [청구항 1] (i) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질; 및
(ii) 가이드 RNA (gRNA)
를 포함하는, 망막 기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 우라실 글리코실라제 억제제(UGI) 도메인을 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 Cas9 도메인은 뉴클레오티드 듀플렉스 중 뉴클레오티드 표적 가닥을 절단하는 nCas9인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 아데닌 데아미나제를 결합한 아데닌 염기 편집기(ABE) 또는 시티딘 데아미나제를 결합한 시티딘 염기 편집기(CBE)인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 Cas9 도메인은 표적 핵산 서열의 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)을 인식하며, 상기 PAM은 NGG 또는 NG인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 융합 단백질과 상기 gRNA는 리보핵단백질(RNP) 복합체 형태로 존재하며, 이 때 상기 gRNA는 상기 Cas9 도메인에 결합된 것인, 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 망막 기능장애는 유전자의 점 돌연변이에 의해 발병되는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 융합 단백질 또는 복합체가 상기 점 돌연변이를 교정시키는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 점 돌연변이는 T에서 C로의 점 돌연변이를 포함하고, 돌연변이체 C 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애와 관련되지 않은 서열을 발생시키는 것이거나; 또는
상기 점 돌연변이는 G에서 A로의 점 돌연변이를 포함하고, 돌연변이체 A 염기의 탈아미노화는 상기 망막 기능장애와 관련되지 않은 서열을 발생시키는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA는 상기 망막 기능장애와 관련된 표적 서열에 상보적인 인접 뉴클레오티드(contiguous nucleotides)의 서열을 포함하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA는 망막 기능장애 관련 유전자를 표적으로 하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 13] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 망막 기능장애는 망막 변성 질환; 색소성 망막염; 망막 색소 변성; 혈관무늬 병증;

드루젠(Drusen); 레베르 선천성 흑암시(lebers congenital amaurosis); 유전성 또는 후천성 황반 변성; 연령 관련 황반 변성 (AMD); 베스트병(Best disease); 망막 박리; 뇌회형 위축; 맥락막결손; 패턴 이영양증; 망막 색소 상피 (RPE) 이영양증; 스타르가르트병(Stargardt disease); 광, 레이저, 감염, 방사선, 신생혈관 또는 외상성 손상 중 어느 하나에 의해 야기된 망막 색소 상피 (RPE) 및 망막 손상으로부터 선택되는 것; 망막형성장애; 색맹; 범맥락막위축; 근시성 맥락막신생혈관; 결절맥락막혈관병증; 중심장액맥락망막병증; 황반원공; 황반이상증; 당뇨망막병증; 망막동정맥폐쇄; 고혈압성 망막병증; 망막대동맥류; 안허혈증후군; 미숙아망막병증; 급성망막괴사; 거대세포 바이러스 망막염; 독소플라스마 망막맥락막염; 매독성 맥락망막염; 망막박리; 또는 망막모세포종인, 약학 조성물.

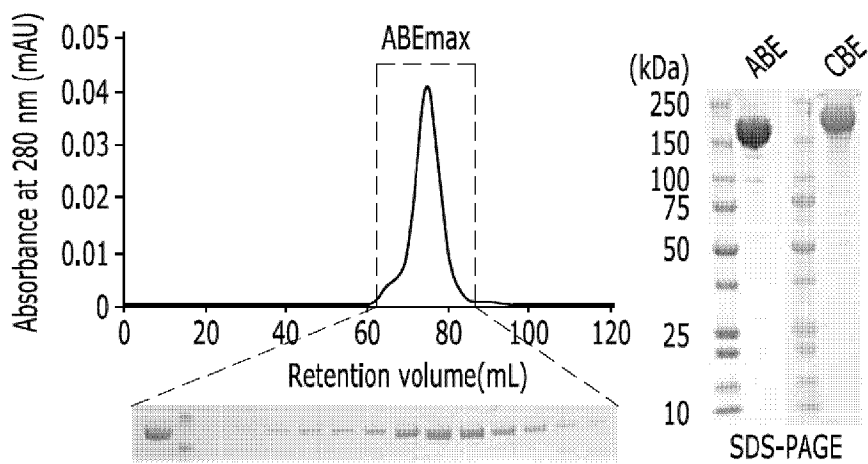
- [청구항 14] (a) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 세포에서 발현시키는 단계이며, 상기 융합 단백질은 추가로 친화성 태그를 포함하는 것인 단계;
 (b) 단계 (a)에서 발현된 융합 단백질을 용해시켜 용해물을 생성하는 단계;
 (c) 단계 (b)의 용해물을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 1차 정제하는 단계;
 (d) 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 2차 정제하는 단계; 및
 (e) 단계 (d)에서 정제된 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 3차 정제하는 단계를 포함하는, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 친화성 태그가 폴리히스티딘 태그 또는 FLAG 태그인 것인, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 단계 (a)의 융합 단백질은 N-말단에 10xHis-Flag 태그를 포함하고, C-말단에 mCherry-10xHis 태그를 포함하는 것인, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 17] 제14항에 있어서, 단계 (c)는 단계 (b)의 용해물을 Ni-NTA 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 Ni-NTA 수지에 결합된 것인, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 18] 제14항에 있어서, 단계 (d)는 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 α -FLAG M1 아가로스 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 α -FLAG M1 아가로스 수지에 결합된 것인, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 19] 제14항에 있어서, 단계 (e)의 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad 16/600 Superdex 200pg, HiLoad 26/600 Superdex 200pg, 또는 HiLoad 16/600 Superdex 75pg 컬럼에서 수행되는 것인, 융합 단백질의 정제 방법.

- [청구항 20] (a) Cas9 도메인; 및 아데닌 데아미나제 도메인 또는 시티딘 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 세포에서 발현시키는 단계이며, 상기 융합 단백질은 추가로 N-말단에 10xHis-Flag 태그를 포함하고, C-말단에 mCherry-10xHis 태그를 포함하는 것인 단계;
- (b) 단계 (a)에서 발현된 융합 단백질을 용해시켜 용해물을 생성하는 단계;
- (c) 단계 (b)의 용해물을 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 1차 정제하는 단계이며, 이 때 상기 단계는 상기 용해물을 Ni-NTA 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 Ni-NTA 수지에 결합된 것인 단계;
- (d) 단계 (c)에서 정제된 단백질을 Ni-NTA 수지와 접촉시켜 친화 크로마토그래피(Affinity Chromatography)로 2차 정제하는 단계이며, 이 때 상기 단계는 단계 (c)에서 정제된 융합 단백질을 α -FLAG M1 아가로스 수지와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 융합 단백질은 α -FLAG M1 아가로스 수지에 결합된 것인 단계; 및
- (e) 단계 (d)에서 정제된 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 3차 정제하는 단계이며, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad 16/600 Superdex 200pg, HiLoad 26/600 Superdex 200pg, 또는 HiLoad 16/600 Superdex 75pg 컬럼에서 수행되는 것인 단계를 포함하는, 융합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 21] 제20항의 정제 방법에 따라 정제된 융합 단백질; 및 상기 융합 단백질의 Cas9 도메인에 결합된 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체.
- [청구항 22] 제21항의 복합체를 포함하는, 망막 기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

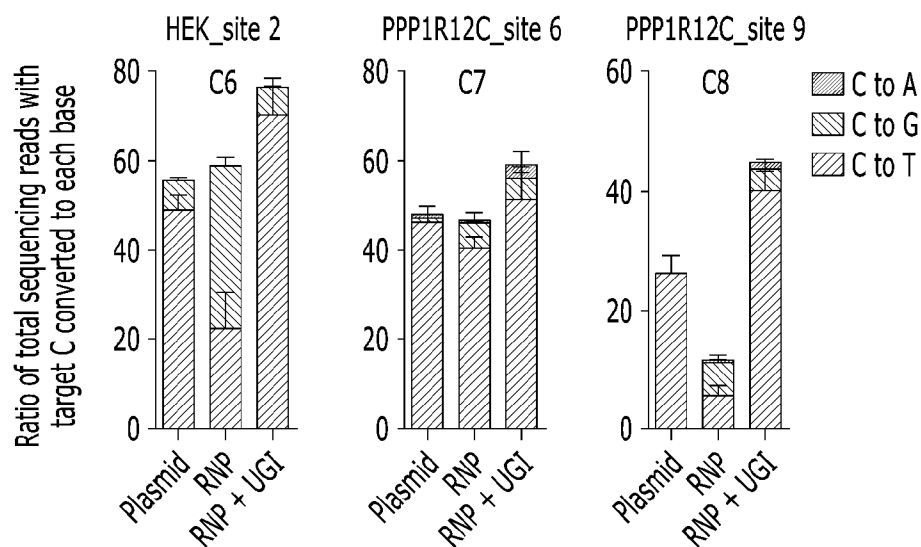
[도 1a]



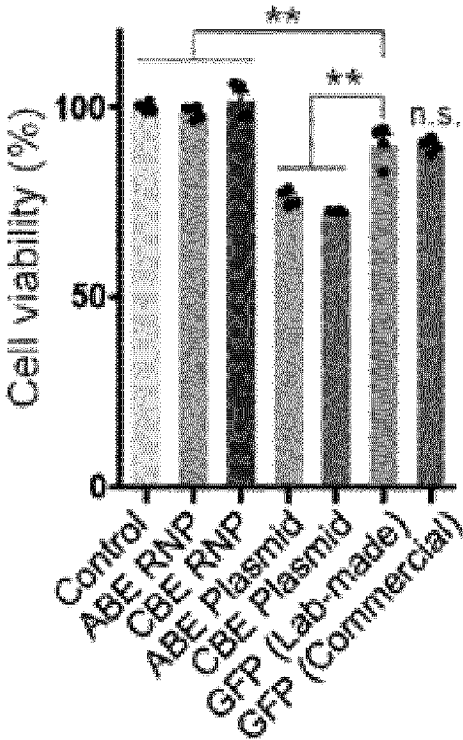
[도 1b]



[도 1c]

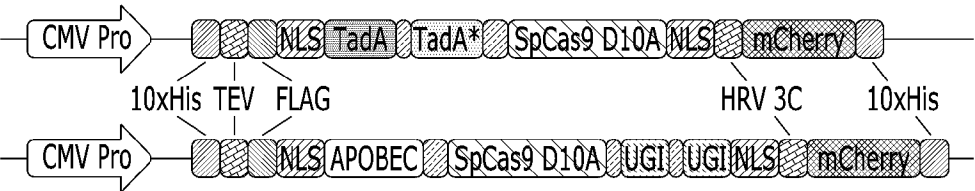


[도1d]



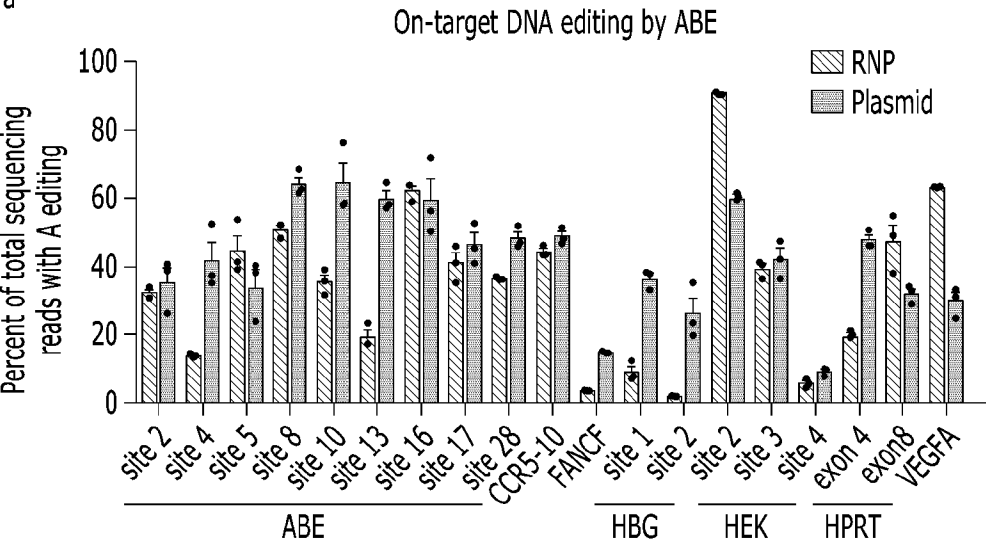
[도2]

ABEbax (ABE7.10) and AncBE4max

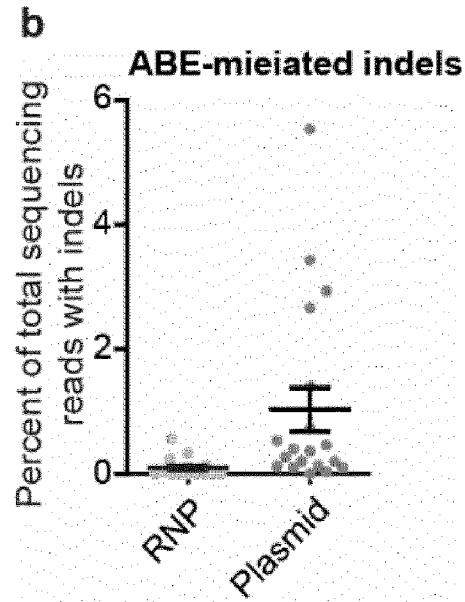


[도3a]

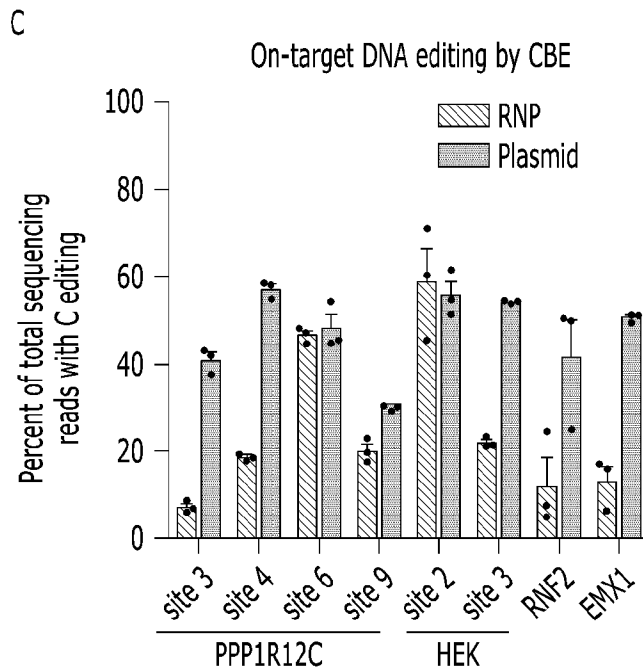
a



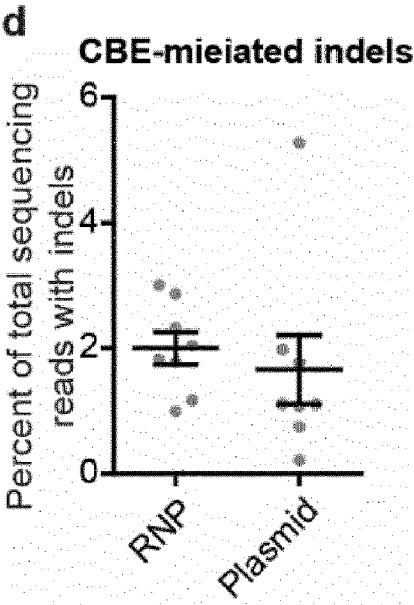
[도3b]



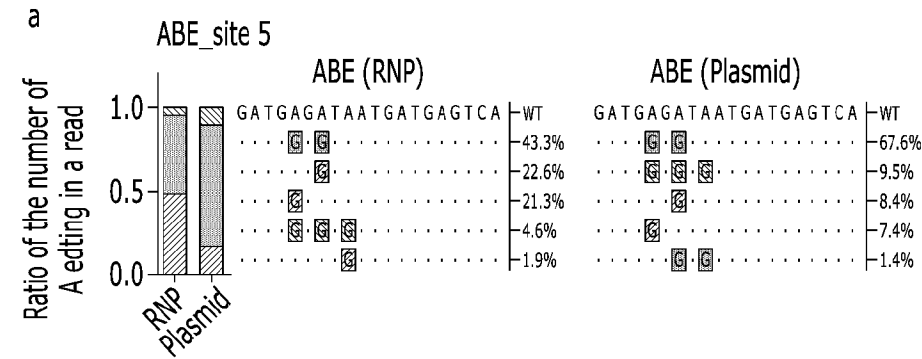
[도3c]



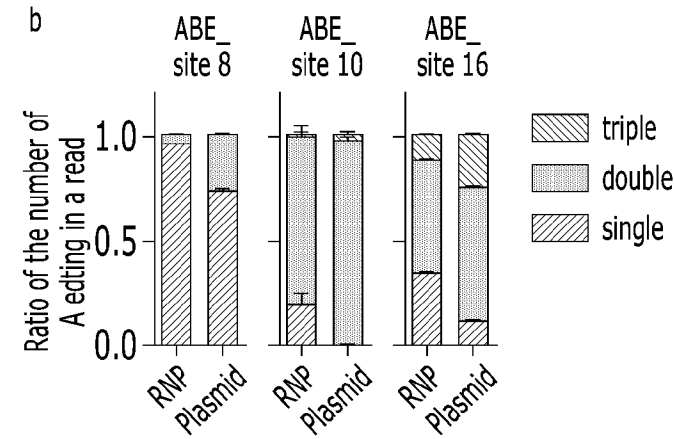
[도3d]



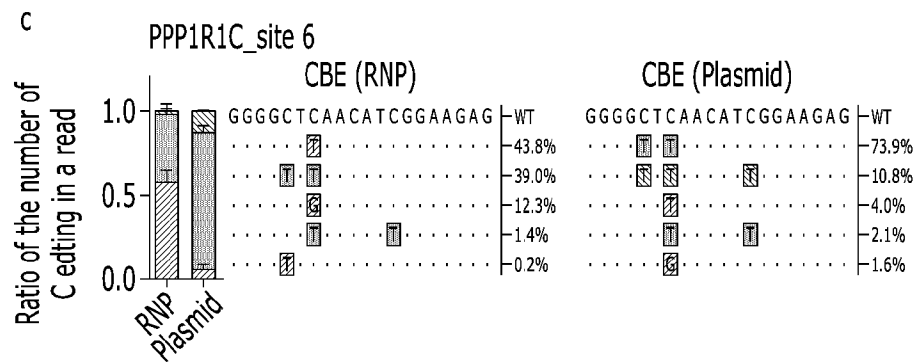
[도4a]



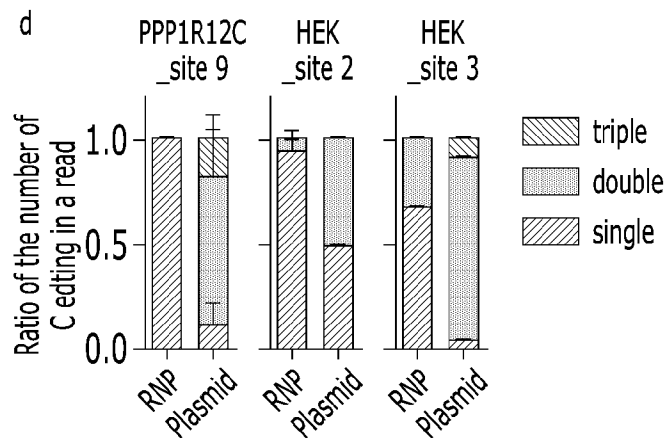
[도4b]



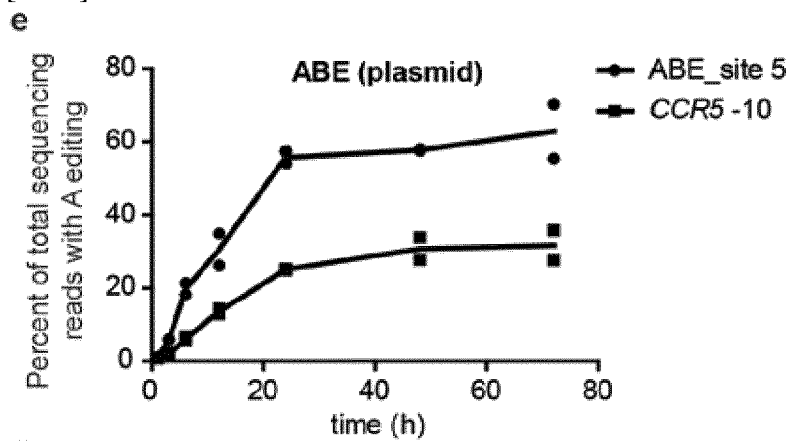
[도4c]



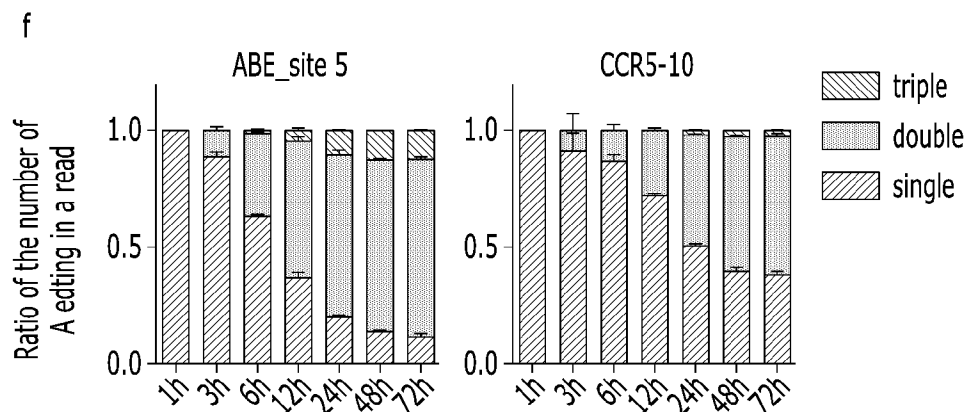
[도4d]



[도4e]

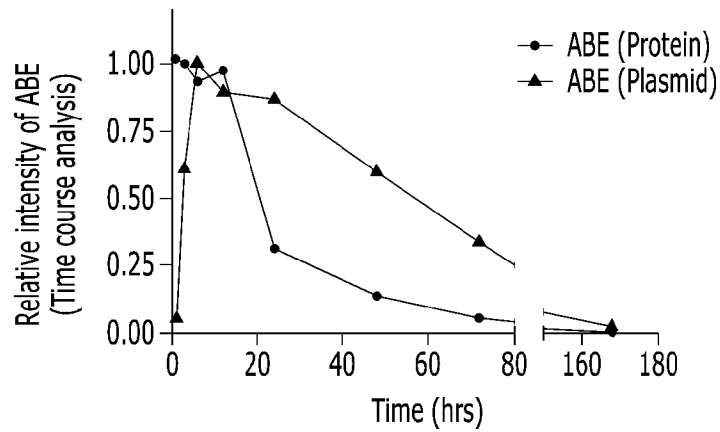


[도4f]



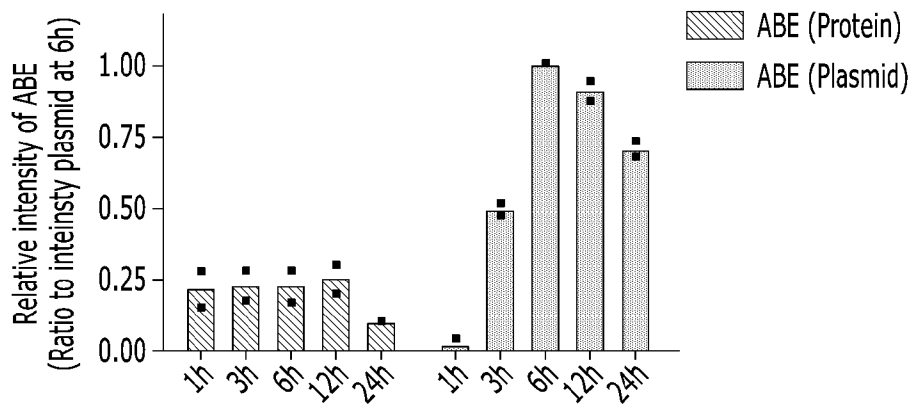
[도4g]

g



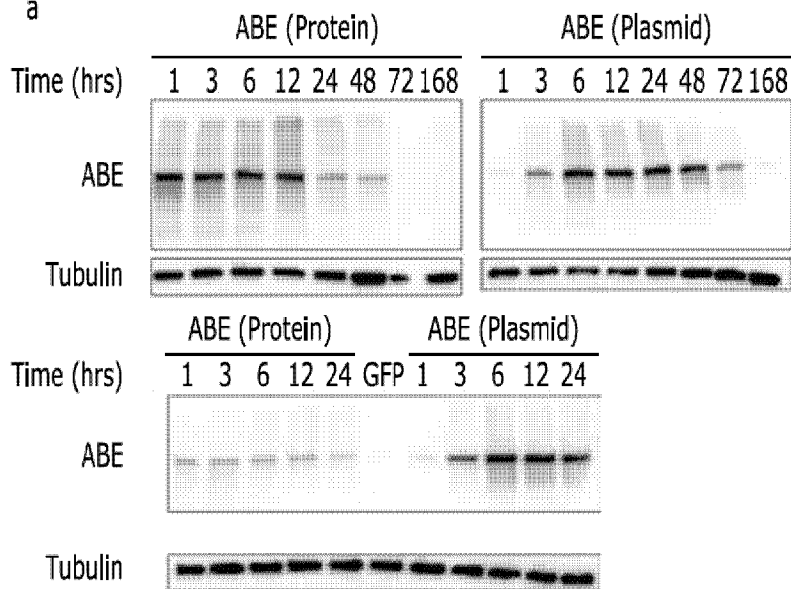
[도4h]

h

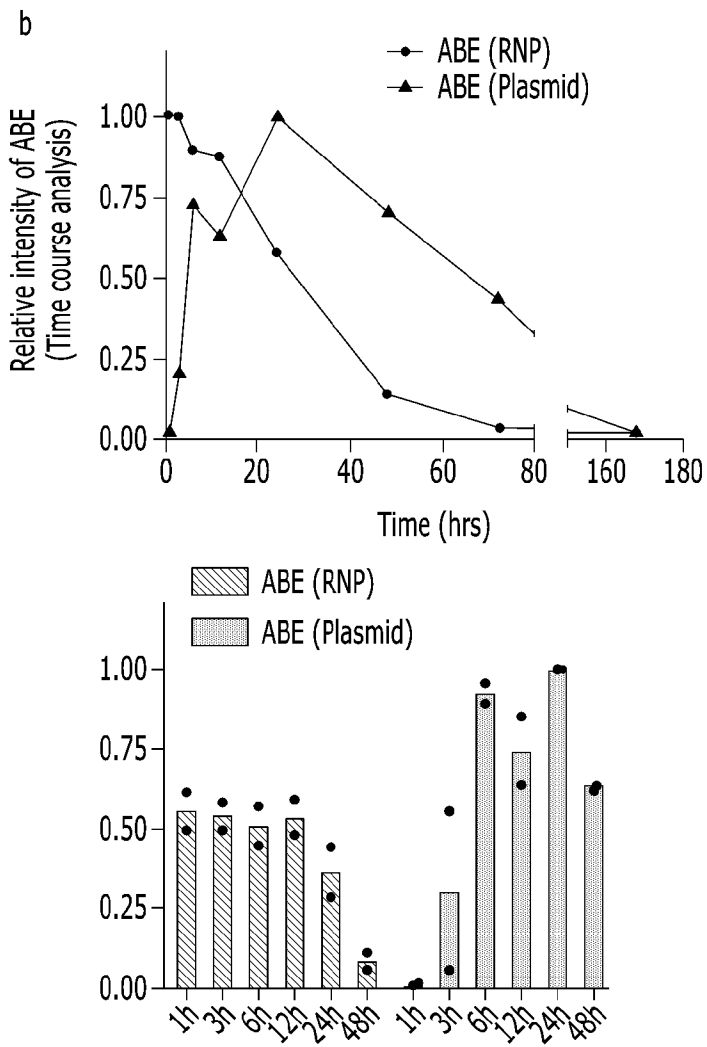


[도5a]

a

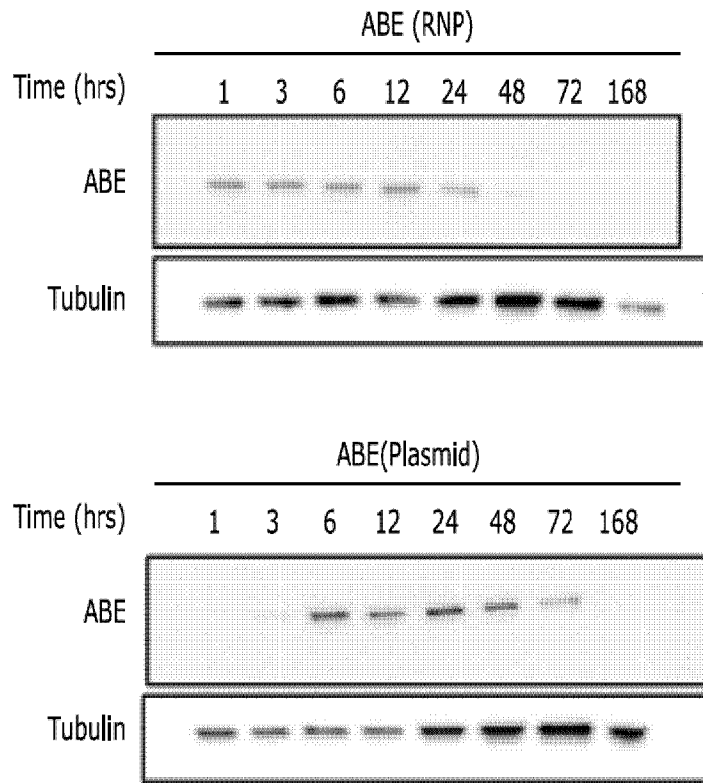


[도5b]



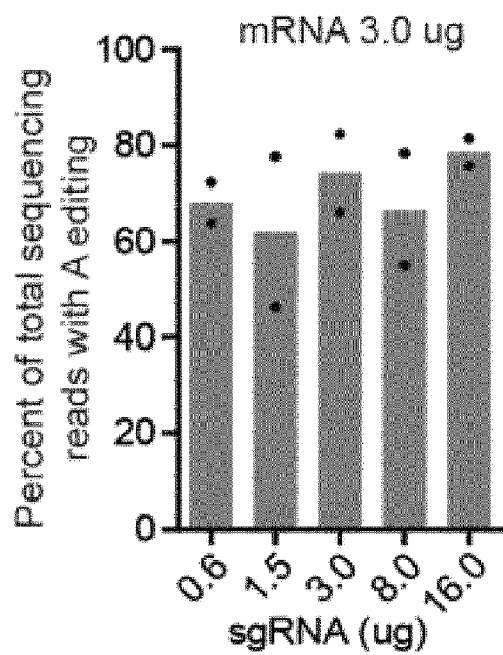
[도5c]

c

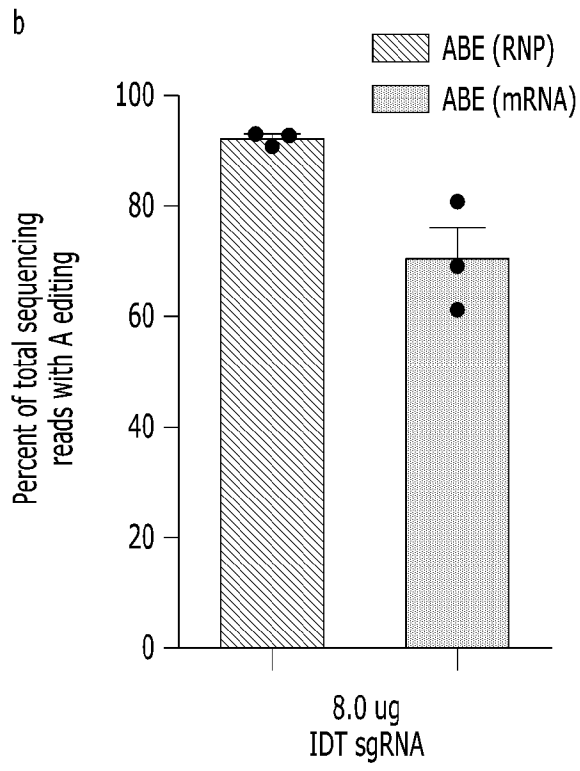


[도6a]

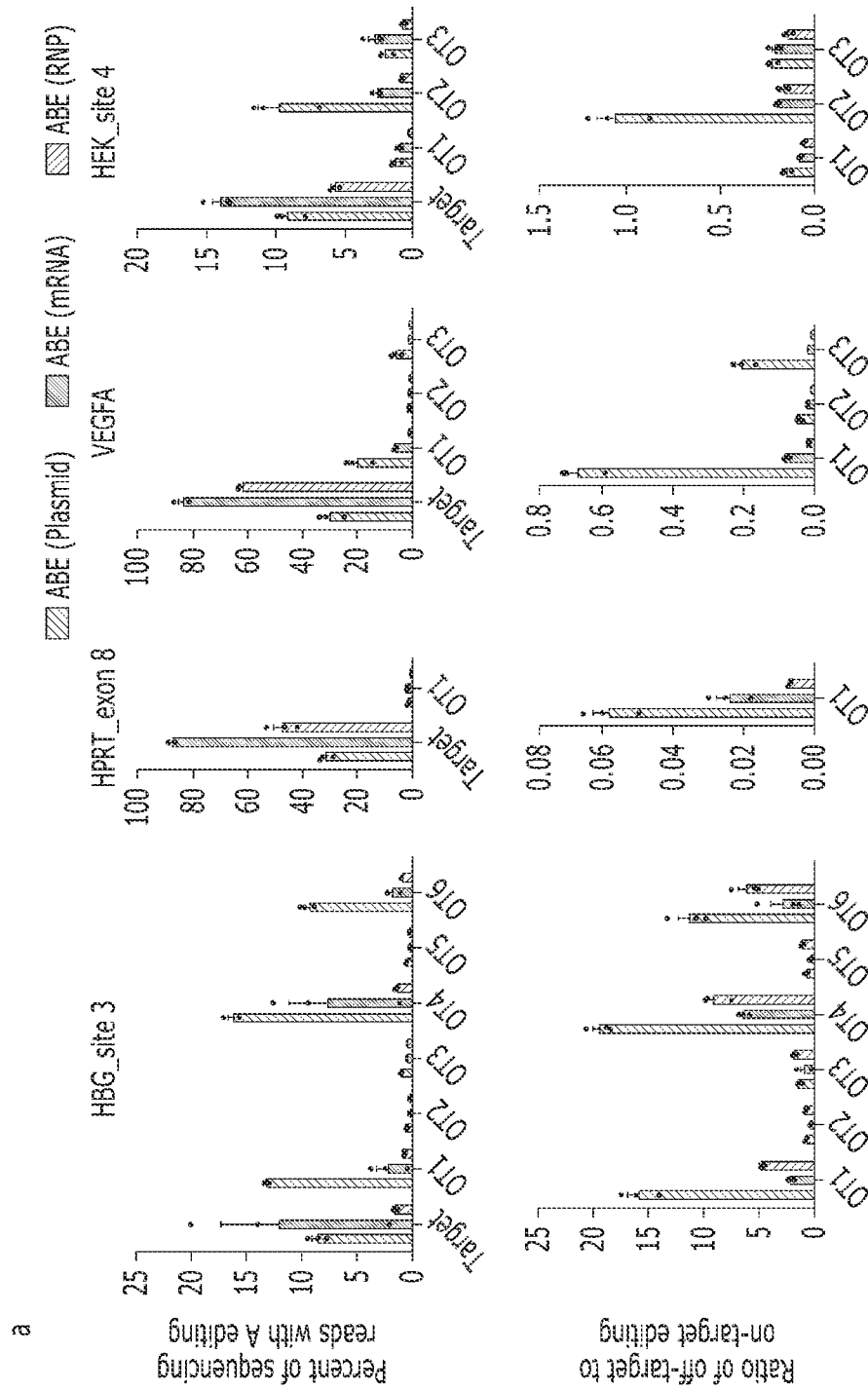
a



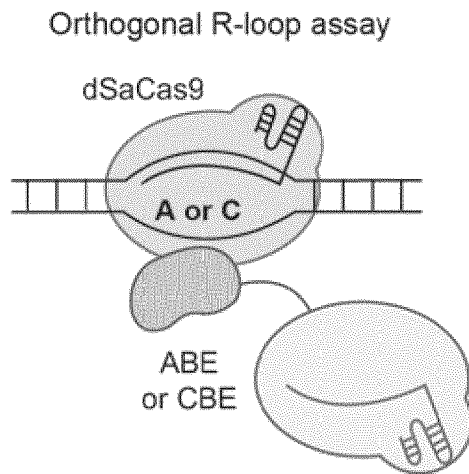
[도6b]



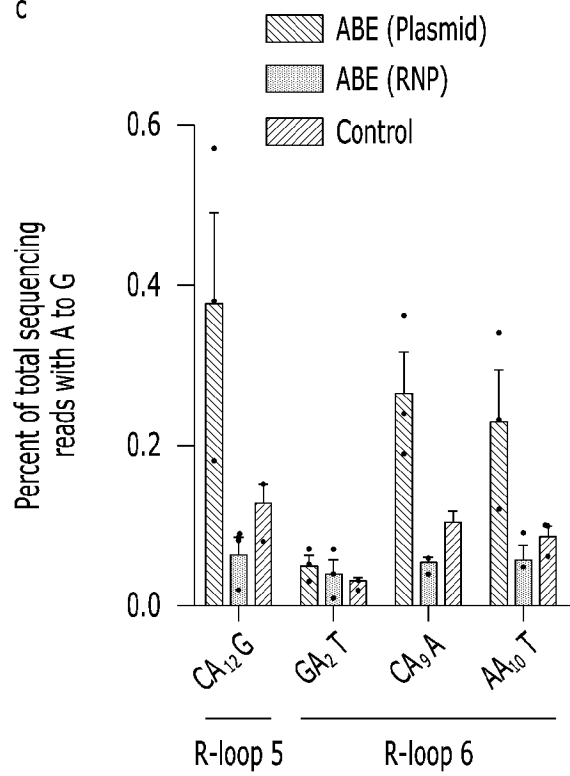
[도 7a]



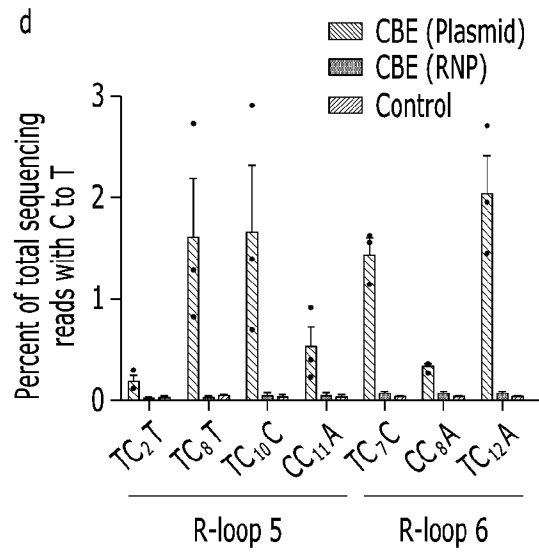
[도7b]

b

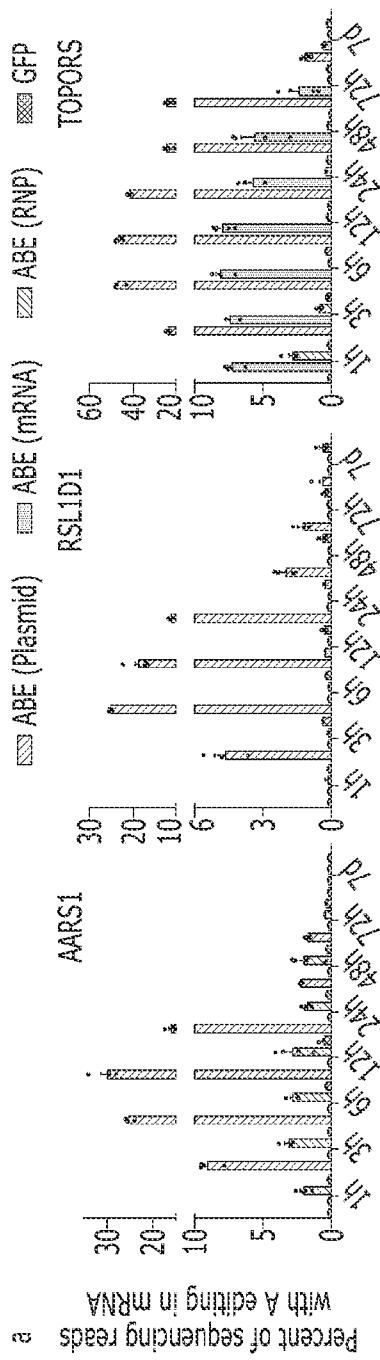
[도7c]

c

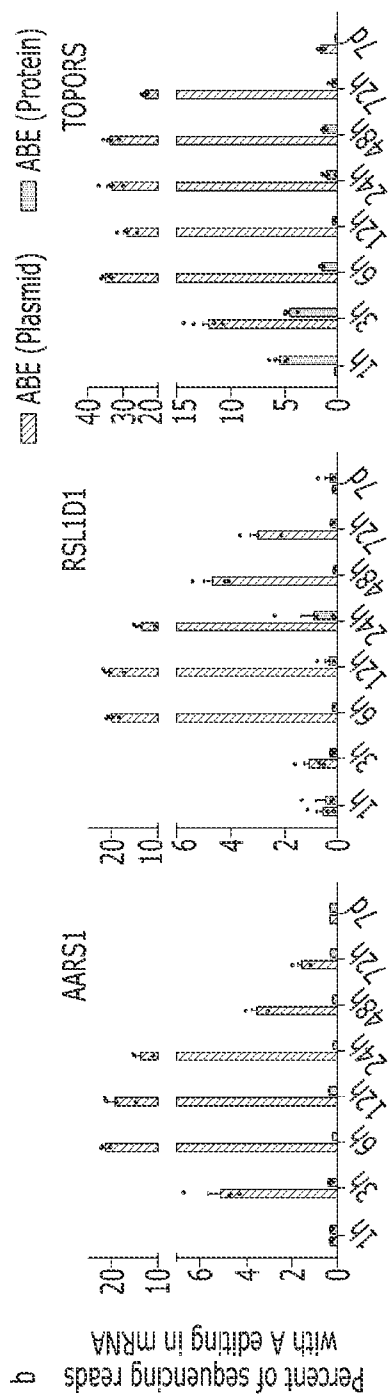
[도7d]



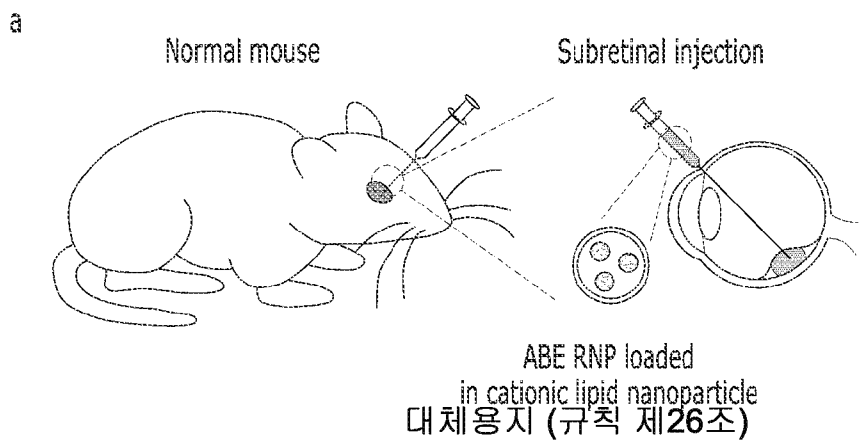
[Fig. 8a]



[도8b]



[도9a]

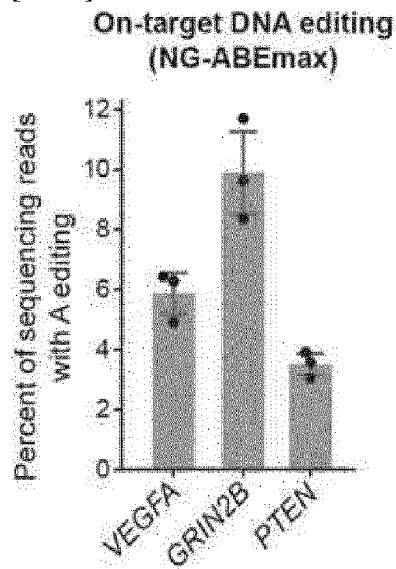


[도9b]

b

Target	Sequence	Ref
<i>Fah</i>	GTCCTC <u>AT</u> GAACGACTGGAG <u>CGG</u>	Liver, ABE
<i>Vegfa</i>	GGAG <u>AG</u> CAGAAGTCCCATGA <u>AGG</u>	Eye, Cas9
<i>Nr2e3</i>	CTGTGT <u>AT</u> CCTGGTCCCGGAA <u>AGG</u>	Eye, ABE

[도9c]



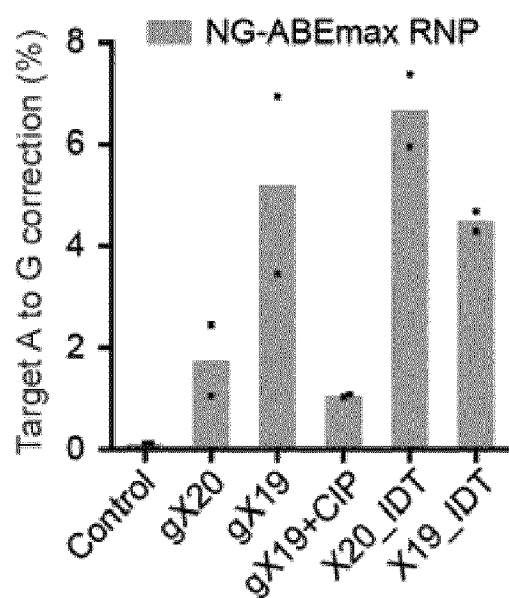
[도10a]

a

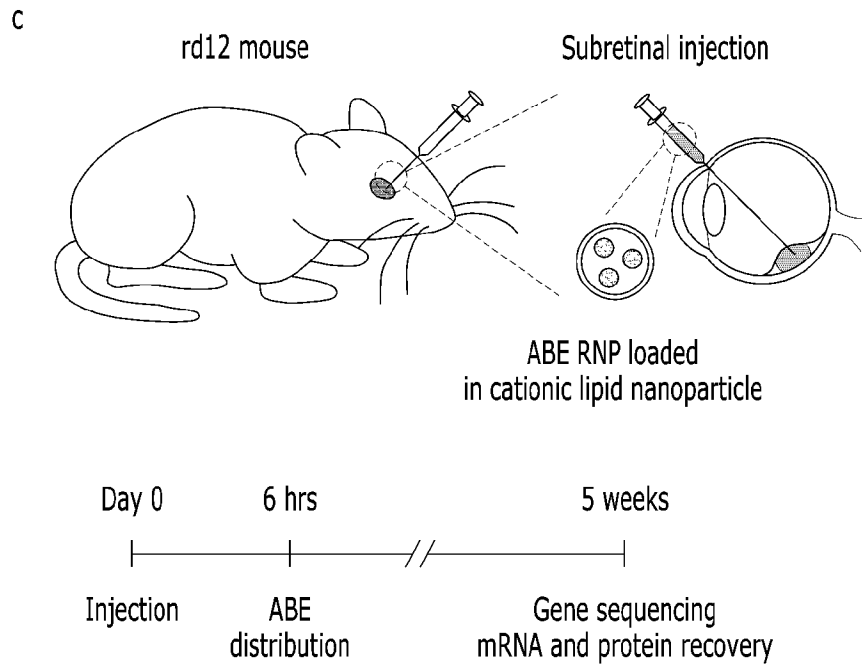
Targeting rd12 allele (Rpe65 c. 130C>T) with NG-ABEmax

Trp	Leu	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	*	Cys	Gly
5' - TGG	CTC	ACT	GGC	AGT	CTC	CTC	<u>TGA</u>	TGT	GGG -3'
3' - ACC	GAG	TGA	CCG	TCA	GAG	GAG	<u>ACT</u>	ACA	CCC -5'
AGT			A ₈			A ₆	A ₃		
PAM			Editing Window						

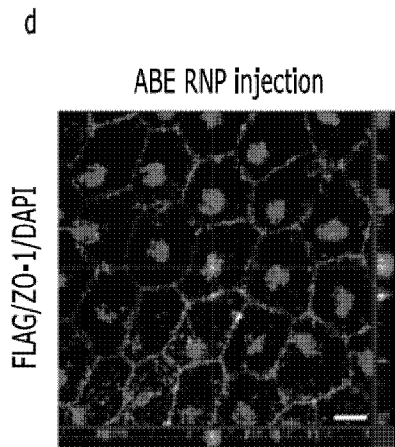
[도10b]

b

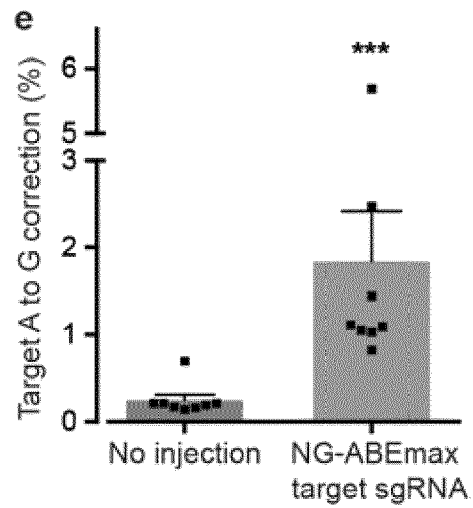
[도10c]



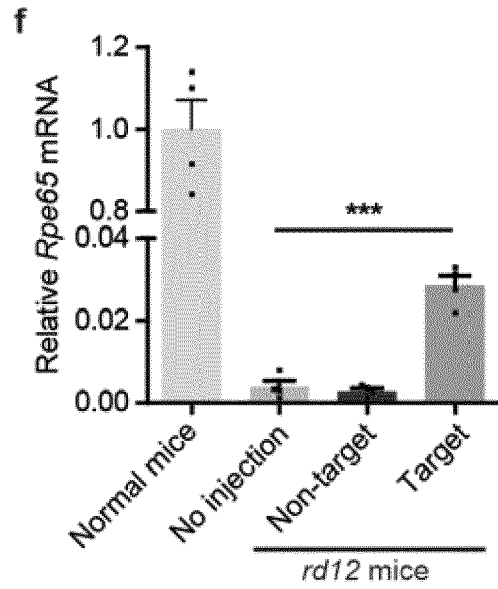
[도10d]



[도10e]

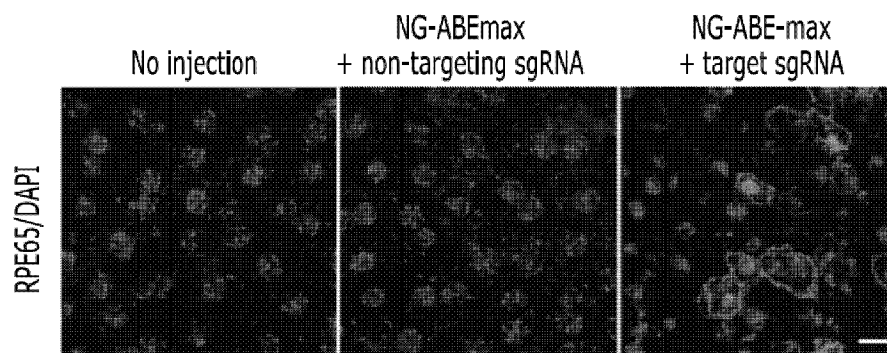


[도 10f]



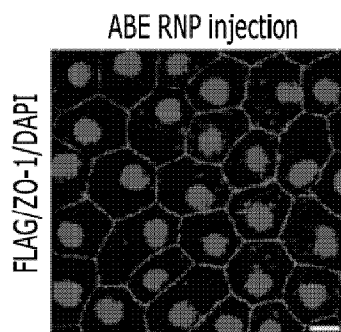
[도 10g]

g



[도 11a]

a



[도11b]

Juvenile rd12 mouse

	Trp			Leu			Thr			Gly			Ser			Leu			Leu			Stop			Cys			Gly		
	T	G	G	C	T	C	A	C	T	G	G	C	A	G	T	C	T	C	C	T	C	T	G	A	T	G	T	G	G	
A	0	0.1	0.1	0	0	0	99.8	0	0	0.1	0.2	0	99.7	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	99.7	0	0.1	0	0.1	0.2	
T	99.8	0	0	0.1	99.1	0.1	0	0	99.7	0	0	0.2	0.1	0	99.5	0	99.6	0	0	99.6	0	94.3	0	0	99.7	0	99.6	0	0	
G	0	99.9	99.9	0	0	0	0.2	0	0	99.9	99.8	0	0.2	99.9	0	0	0	0	0	0	0	0	99.9	0.2	0	99.9	0	99.9	99.7	
C	0.1	0	0	99.9	0.9	99.9	0	100	0.3	0	0	99.8	0	0	0.4	100	0.4	99.9	99.9	0.4	100	5.7	0	0	0.2	0	0.3	0	0	

Adult rd12 mouse

	Trp			Leu			Thr			Gly			Ser			Leu			Leu			Stop			Cys			Gly		
	T	G	G	C	T	C	A	C	T	G	G	C	A	G	T	C	T	C	C	T	C	T	G	A	T	G	T	G	G	
A	0	0	0.3	0	0	0	99.7	0	0.1	0.1	0.2	0	99.6	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	99.6	0	0	0	0.1	0.2	0.2	
T	99.7	0	0	0.1	99.1	0	0.1	0	99.6	0	0.1	0.2	0	0	99.5	0	99.6	0	0	99.6	0	98.4	0	0	99.8	0	99.7	0.1	0	0.1
G	0	99.9	99.7	0	0	0	0.2	0	0	99.9	99.8	0	0.3	100	0	0	0	0	0	0	0.1	99.9	0.2	0	99.9	0	99.9	99.8	99.8	
C	0.2	0	0	99.9	0.9	99.9	0	100	0.3	0	0	99.8	0	0	0.5	99.9	0.4	100	100	0.4	100	1.5	0	0.1	0.2	0	0.2	0	0	0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/010989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C07K 1/12(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 48/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/113(2010.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Cas9(Cas9), 아데닌 데아미나제(adenine deaminase), 시티딘 데아미나제(cytidine deaminase), 융합 단백질(fusion protein), 가이드 RNA(guide RNA), 복합체(complex), 망막 기능장애(retina dysfunction), 치료(treatment), 예방(prevention), 점 돌연변이(point mutation), 교정(correction), 친화성 태그(affinity tag), 친화 크로마토그래피(affinity chromatography), 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 정제(purification)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2019-0130613 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 22 November 2019 (2019-11-22) See abstract, claims 1, 41-42, 46-47, 74-75, 115-116, 118, 122-123, 137-138, 163, 165 and 169, paragraphs [0003], [0007]-[0008], [0040], [0046]-[0047], [0089], [0254], [0471]-[0473], [0480], [0489]-[0490], [0494], [0526], [0553], [0569] and [0829], and figures 3-4, 7 and 126b.	1-22
A	KR 10-2021-0023830 A (BEAM THERAPEUTICS, INC.) 04 March 2021 (2021-03-04) See entire document.	1-22
A	JEONG, Y. K. et al. Current status and challenges of DNA base editing tools. Molecular Therapy. 2020, vol. 28, no. 9, pp. 1938-1952. See entire document.	1-22
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 November 2022		Date of mailing of the international search report 23 November 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/010989**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ABDULLAH et al. CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants. Synthetic and Systems Biotechnology. 2020, vol. 5, no. 4, pp. 277-292. See entire document.	1-22
A	KR 10-2019-0039703 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 15 April 2019 (2019-04-15) See entire document.	1-22
A	KR 10-2018-0013780 A (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE et al.) 07 February 2018 (2018-02-07) See entire document.	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/010989

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/010989

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0130613	A	22 November 2019	CN	110914426	A	24 March 2020
				EP	3601562	A1	05 February 2020
				JP	2020-511970	A	23 April 2020
				US	11268082	B2	08 March 2022
				US	2018-0312828	A1	01 November 2018
				WO	2018-176009	A1	27 September 2018
KR	10-2021-0023830	A	04 March 2021	CN	112601816	A	02 April 2021
				EP	3790964	A1	17 March 2021
				JP	2021-523736	A	09 September 2021
				US	2021-0371858	A1	02 December 2021
				WO	2019-217941	A1	14 November 2019
KR	10-2019-0039703	A	15 April 2019	CN	109890424	A	14 June 2019
				EP	3481434	A1	15 May 2019
				JP	2019-520391	A	18 July 2019
				US	2020-0080108	A1	12 March 2020
				WO	2018-009562	A1	11 January 2018
KR	10-2018-0013780	A	07 February 2018	CN	109789185	A	21 May 2019
				EP	3492096	A1	05 June 2019
				JP	2019-522034	A	08 August 2019
				JP	6875500	B2	26 May 2021
				US	11123409	B2	21 September 2021
				US	2018-0078620	A1	22 March 2018
				WO	2018-021855	A1	01 February 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C07K 1/12(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i																	
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/113(2010.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Cas9(Cas9), 아데닌 데아미나제(adenine deaminase), 시티딘 데아미나제(cytidine deaminase), 융합 단백질(fusion protein), 가이드 RNA(guide RNA), 복합체(complex), 망막 기능장애(retina dysfunction), 치료(treatment), 예방(prevention), 점 돌연변이(point mutation), 교정(correction), 친화성 태그(affinity tag), 친화 크로마토그래피(affinity chromatography), 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 정제(purification)																	
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2019-0130613 A (프레지던트 엔드 펄로우즈 오브 하바드 칼리지) 2019.11.22 요약, 청구항 1, 41-42, 46-47, 74-75, 115-116, 118, 122-123, 137-138, 163, 165, 169, 단락 [0003], [0007]-[0008], [0040], [0046]-[0047], [0089], [0254], [0471]-[0473], [0480], [0489]-[0490], [0494], [0526], [0553], [0569], [0829], 도면 3-4, 7, 126b</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2021-0023830 A (빔 테라퓨틱스, 인크.) 2021.03.04 전체 문헌</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JEONG, Y. K. 등, "Current status and challenges of DNA base editing tools", Molecular Therapy, 2020, 제28권, 제9호, 페이지 1938-1952 전체 문헌</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ABDULLAH 등, "CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants", Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 제5권, 제4호, 페이지 277-292 전체 문헌</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2019-0130613 A (프레지던트 엔드 펄로우즈 오브 하바드 칼리지) 2019.11.22 요약, 청구항 1, 41-42, 46-47, 74-75, 115-116, 118, 122-123, 137-138, 163, 165, 169, 단락 [0003], [0007]-[0008], [0040], [0046]-[0047], [0089], [0254], [0471]-[0473], [0480], [0489]-[0490], [0494], [0526], [0553], [0569], [0829], 도면 3-4, 7, 126b	1-22	A	KR 10-2021-0023830 A (빔 테라퓨틱스, 인크.) 2021.03.04 전체 문헌	1-22	A	JEONG, Y. K. 등, "Current status and challenges of DNA base editing tools", Molecular Therapy, 2020, 제28권, 제9호, 페이지 1938-1952 전체 문헌	1-22	A	ABDULLAH 등, "CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants", Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 제5권, 제4호, 페이지 277-292 전체 문헌	1-22
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항															
X	KR 10-2019-0130613 A (프레지던트 엔드 펄로우즈 오브 하바드 칼리지) 2019.11.22 요약, 청구항 1, 41-42, 46-47, 74-75, 115-116, 118, 122-123, 137-138, 163, 165, 169, 단락 [0003], [0007]-[0008], [0040], [0046]-[0047], [0089], [0254], [0471]-[0473], [0480], [0489]-[0490], [0494], [0526], [0553], [0569], [0829], 도면 3-4, 7, 126b	1-22															
A	KR 10-2021-0023830 A (빔 테라퓨틱스, 인크.) 2021.03.04 전체 문헌	1-22															
A	JEONG, Y. K. 등, "Current status and challenges of DNA base editing tools", Molecular Therapy, 2020, 제28권, 제9호, 페이지 1938-1952 전체 문헌	1-22															
A	ABDULLAH 등, "CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants", Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 제5권, 제4호, 페이지 277-292 전체 문헌	1-22															
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																	
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																	
국제조사의 실제 완료일 2022년11월23일(23.11.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년11월23일(23.11.2022)															
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373															

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0039703 A (더 존스 홉킨스 유니버시티) 2019.04.15 전체 문헌	1-22
A	KR 10-2018-0013780 A (기초과학연구원 등) 2018.02.07 전체 문헌	1-22

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0130613 A	2019/11/22	CN 110914426 A	2020/03/24
		EP 3601562 A1	2020/02/05
		JP 2020-511970 A	2020/04/23
		US 11268082 B2	2022/03/08
		US 2018-0312828 A1	2018/11/01
		WO 2018-176009 A1	2018/09/27
KR 10-2021-0023830 A	2021/03/04	CN 112601816 A	2021/04/02
		EP 3790964 A1	2021/03/17
		JP 2021-523736 A	2021/09/09
		US 2021-0371858 A1	2021/12/02
		WO 2019-217941 A1	2019/11/14
KR 10-2019-0039703 A	2019/04/15	CN 109890424 A	2019/06/14
		EP 3481434 A1	2019/05/15
		JP 2019-520391 A	2019/07/18
		US 2020-0080108 A1	2020/03/12
		WO 2018-009562 A1	2018/01/11
KR 10-2018-0013780 A	2018/02/07	CN 109789185 A	2019/05/21
		EP 3492096 A1	2019/06/05
		JP 2019-522034 A	2019/08/08
		JP 6875500 B2	2021/05/26
		US 11123409 B2	2021/09/21
		US 2018-0078620 A1	2018/03/22
		WO 2018-021855 A1	2018/02/01