

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2018년 2월 1일 (01.02.2018)



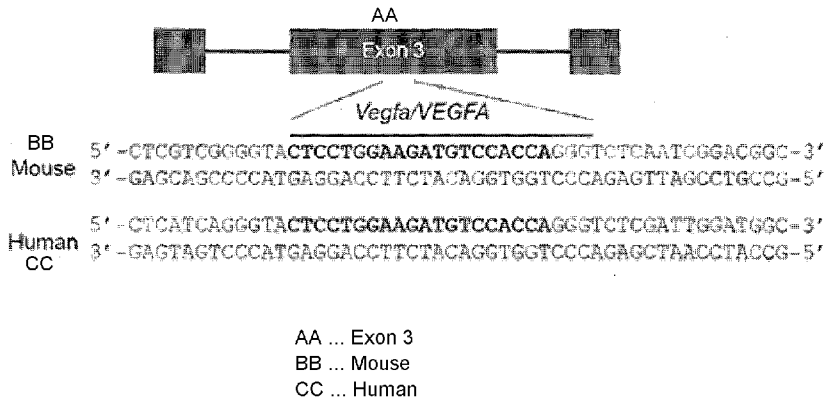
(10) 국제공개번호  
WO 2018/021855 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 38/17* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008122
- (22) 국제출원일: 2017년 7월 27일 (27.07.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 62/367,674 2016년 7월 28일 (28.07.2016) US
- (71) 출원인: 기초과학연구원 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) [KR/KR]; 34047 대전시 유성구 유성대로1689번길 70, Daejeon (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로1, Seoul (KR). 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김진수 (KIM, Jin-Soo); 08831 서울시 관악구 청룡길 77, 203동 601호, Seoul (KR). 김정훈 (KIM, Jeong Hun); 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 박성욱 (PARK, Sung Wook); 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 김경미 (KIM, Kyoung Mi); 03024 서울시 종로구 통일로18길 9, 109동 701호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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).
- 공개:  
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))  
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING OCULAR DISEASES, CONTAINING CAS9 PROTEIN AND GUIDE RNA

(54) 발명의 명칭: Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 안질환 치료용 약학 조성물

【도 1a】



(57) Abstract: Provided are: a pharmaceutical composition for preventing and/or treating ocular diseases, containing a Cas9 protein and a guide RNA targeting *VEGF-A*; and a ribonucleoprotein containing a Cas9 protein and a guide RNA targeting *VEGF-A*.

(57) 요약서: Cas9 단백질 및 *VEGF-A*를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 안질환의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물 및 Cas9 단백질 및 *VEGF-A*를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 리보핵산단백질이 제공된다.



WO 2018/021855 A1

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 안질환 치료용 약학 조성물

## 5 【기술분야】

Cas9 단백질 및 *VEGF-A*를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 안질환의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물 및 Cas9 단백질 및 *VEGF-A*를 표적으로 하는 가이드 RNA를 포함하는 리보핵산단백질이 제공된다.

## 10 【배경기술】

CRISPR-Cas9 뉴클레아제를 이용한 RNA 유도 유전체 교정 (RNA-guided genome surgery 또는 RNA-guided genome editing)은 다양한 유전 질환의 치료에 도움이 될 것으로 기대되지만, 비유전 질환에의 CRISPR-Cas9 뉴클레아제의 치료 효과는 밝혀진 바가 거의 없다.

15 비유전 질환의 일 예로 황반변성(예컨대, 노인성 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD))을 들 수 있다. AMD는 선진국의 고령 인구에서의 주요한 실명 원인이다. 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization; CNV)은 신생 혈관성 AMD의 주요 병리학적 특징이며, 주로 혈관 내피 성장 인자 A (VEGF A)와 같은 혈관 신생  
20 사이토카인(angiogenic cytokines)에 의해 유발된다. 지금까지는, AMD의 치료제로서 *VEGF-A*를 표적으로 하는 단클론 항체 또는 애타머가 주로 개발되어 왔다. 그러나, *VEGF-A*가 망막 세포에서 연속적으로 발현되고 분비되기 때문에, 이들 항-*VEGF-A* 제제는 1년에 적어도 일곱 번 이상 투여되어야 하는 문제가 있다.

25 따라서, 황반변성 등의 안질환의 보다 근본적이면서 지속적인 치료 기술의 개발이 요구된다.

## 【선행기술문헌】

## 【특허문헌】

30 한국특허공개 제10-2015-0101446호 (2015.09.03 공개)

## 【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 명세서는 VEGF-A 의 근본적인 불활성화를 통하여, 그 수준을 병리학적 역치 이하로 낮춤으로써, 안질환의 장기적 또는 영구적인 치료를 가능하게 하는 기술을 제안한다.

5 일 예는 VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 제제를 포함하는, 안질환의 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

상기 VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 제제는 VEGF-A 유전자를 불활성화시킬 수 있는 모든 단백질, 핵산 분자 (DNA 및/또는 RNA), 화학 약물 (chemical drug), 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있다. 일  
10 예에서, 상기 VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 제제는 Cas9 단백질 및 VEGF-A 유전자를 타겟팅하는 가이드 RNA 를 포함하는 것일 수 있다.

다른 예는, VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는 안질환의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 상기 VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 단계는 VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 제제를 안질환의  
15 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 VEGF-A 유전자의 불활성화는 RNA 유도 유전체 교정 (RNA-guided genome surgery or RNA-guided genome editing)에 의하여 수행될 수 있으며, 이 경우, VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 단계는 Cas9 단백질 및 VEGF-A 유전자를 타겟팅하는 가이드 RNA 를 안질환의 예방 및/또는 치료를  
20 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

다른 예는, VEGF-A 유전자를 불활성화시키는 제제의 안질환의 예방 및/또는 치료, 또는 안질환의 치료제 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

다른 예는, VEGFA 유전자의 특정 표적 부위(target site or target region)를 표적화하기 위한 가이드 RNA 를 제공한다.

25 다른 예는, Cas9 단백질 및 VEGFA 유전자 특이적 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA 를 포함하는 VEGFA 유전자 특이적 리보핵산단백질 (RNP)을 제공한다.

다른 예는, 상기 가이드 RNA 또는 VEGFA 유전자 특이적 리보핵산단백질 (RNP)을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

30 다른 예는, 상기 VEGFA 유전자 특이적 리보핵산단백질(RNP)을 안질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 안질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

【과제 해결 수단】

본 발명은 유전자 교정 기술을 이용하여 안질환, 예컨대, VEGF-A 의 과발현과 관련된 안질환을 치료하는 기술을 제공한다.

5 일 예는 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제를 포함하는, 안질환의 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제는 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시킬 수 있는 모든 단백질, 핵산 분자 (DNA 및/또는 RNA), 화학 약물 (chemical drug), 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있다. 일 예에서, 상기 *VEGF-A* 유전자를  
10 불활성화시키는 제제는 Cas9 단백질 및 *VEGF-A* 유전자를 타겟팅하는 가이드 RNA 를 포함하는 것일 수 있다.

다른 예는, *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는 안질환의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 단계는 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제를 안질환의  
15 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화는 RNA 유도 유전체 교정 (RNA-guided genome surgery or RNA-guided genome editing)에 의하여 수행될 수 있으며, 이 경우, *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 단계는 Cas9 단백질 및 *VEGF-A* 유전자를 타겟팅하는 가이드 RNA 를 안질환의 예방 및/또는 치료를  
20 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 방법은, 상기 투여하는 단계 이전에, 안질환의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제는 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제는 다양한 투여 경로를 통하여 투여될 수  
25 있으며, 예컨대, 안구의 병변부위 국소 투여 또는 망막하 주사에 의하여 투여될 수 있다.

다른 예는, *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제의 안질환의 예방 및/또는 치료, 또는 안질환의 치료제 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

상기 불활성화의 표적이 되는 *VEGF-A* 유전자는 눈, 예컨대,  
30 신생혈관성 안질환이 발생한 눈 또는 신생혈관성 안질환의 병변 부위에 위치하는 것일 수 있다.

상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다:

(1) *VEGF-A* 유전자의 전체 또는 1-50bp 또는 1-40bp 길이의 연속적 또는 불연속적 일부분의 결실;

5 (2) *VEGF-A* 유전자 중 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개의 연속적 또는 불연속적인 뉴클레오타이드의 야생형 *VEGF-A* 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환;

(3) *VEGF-A* 유전자 내의 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개의 뉴클레오타이드의 삽입 (부가), 이 때, 상기 삽입되는 뉴클레오타이드는 각각  
10 독립적으로 A, T, C, 및 G 중에서 선택됨; 및

(4) 이들의 조합.

상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제는 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시킬 수 있는 모든 단백질, 핵산 분자 (DNA 및/또는 RNA), 화학 약물 (chemical drug), 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있다. 일  
15 예에서, 상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제는 Cas9 단백질 및 *VEGF-A* 유전자를 타겟팅하는 가이드 RNA 를 포함하는 것일 수 있다. 이 경우, *VEGF-A* 유전자의 불활성화는 RNA 유도 유전체 교정 (RNA-guided genome surgery or RNA-guided genome editing)에 의하여 수행될 수 있다.

*VEGF-A* 유전자의 불활성화가 Cas9 단백질을 이용하여 수행되는 경우,  
20 상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다:

(1) *VEGF-A* 유전자 내의 Cas9 단백질의 PAM (proto-spacer-adjacent Motif) 서열에 인접한 1-50bp 또는 1-40bp 길이의 연속적 또는 불연속적 부위에 위치하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실;

25 (2) *VEGF-A* 유전자 내의 Cas9 단백질의 PAM 서열에 인접한 1-50bp 또는 1-40bp 길이의 연속적 또는 불연속적 부위에 위치하는 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개의 연속적 또는 불연속적인 뉴클레오타이드의 야생형 *VEGF-A* 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환;

(3) *VEGF-A* 유전자 내의 Cas9 단백질의 PAM 서열에 인접한 1-50bp  
30 또는 1-40bp 길이의 연속적 또는 불연속적 부위에 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개의 뉴클레오타이드의 삽입 (부가), 이 때, 상기 삽입되는 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로 A, T, C, 및 G 중에서 선택됨; 및

(4) 이들의 조합.

상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화를 위한 제제는 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자(DNA 또는 mRNA) 및 *VEGF-A* 유전자의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 표적화 서열을 포함하는 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 를 포함하는 것일 수 있다.

Cas9 단백질과 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 는

(a) 생체 (또는 병변 부위) 또는 세포 등에 투여되기 전에 Cas9 단백질과 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 가 결합하여 형성된 (즉, 투여 전에 미리 조립된) 복합체, 즉, 리보핵산단백질 (ribonucleoprotein; RNP) 형태이거나 (이 경우, 리보핵산단백질 형태로 세포막을 통과하여 세포 내 또는 생체 내로 전달됨),

(b) Cas9 단백질을 암호화하는 DNA 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를 암호화하는 DNA 가 각각 별개의 벡터를 통하여 생체 내 또는 세포 내로 투여 (또는 전달)되거나, 하나의 벡터를 통하여 함께 생체 내 또는 세포 내로 투여 (또는 전달)되어, 생체 또는 세포 내에서 복합체를 이루는 것,

(c) Cas9 단백질을 암호화하는 RNA (mRNA) 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를 포함하는 RNA 혼합물 형태, 또는

(d) Cas9 단백질을 암호화하는 유전자 (DNA)를 포함하는 재조합 벡터 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA (예컨대, in vitro 전사에 의하여 얻어짐)의 혼합물

일 수 있다. 일 예에서, 상기 RNA 혼합물은 통상적인 RNA 전달체에 포함되어 세포 내 또는 생체 내에 전달되는 것일 수 있다.

따라서, 상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화를 위한 제제는,

(a) 생체 (또는 병변 부위) 또는 세포 등에 투여되기 전 Cas9 단백질과 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 가 결합하여 형성된 (즉, 투여 전에 미리 조립된) 복합체, 즉, 리보핵산단백질 (ribonucleoprotein; RNP) (이 경우, 리보핵산단백질 형태로 세포막을 통과하여 세포 내 또는 생체 내로 전달됨);

(b) Cas9 단백질을 암호화하는 유전자 (DNA) 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를 암호화하는 DNA 를 하나의 벡터에 함께 포함하거나, 또는 별개의 벡터에 각각 포함하는 재조합 벡터 (즉 Cas9 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를

암호화하는 DNA 를 포함하는 재조합 벡터), 또는 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포;

(c) Cas9 단백질을 암호화하는 RNA (mRNA) 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를 포함하는 RNA 혼합물;

5 (d) Cas9 단백질을 암호화하는 유전자 (DNA)를 포함하는 재조합 벡터 및 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA (예컨대, *in vitro* 전사에 의하여 얻어짐)의 혼합물; 또는

(e) 이들의 조합  
을 포함하는 것일 수 있다.

10 상기 *VEGF-A* 유전자의 불활성화를 위한 제제의 투여는, 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 유전자 (DNA)를 포함하는 재조합 벡터와 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 를 암호화하는 DNA 를 포함하는 재조합 벡터, Cas9 단백질을 암호화하는 RNA (mRNA)와 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA, 또는  
15 유전자 특이적 가이드 RNA 를 동시에 투여하거나, 순서와 상관없이 순차적으로 투여하여 수행될 수 있다.

다른 예는, *VEGFA* 유전자의 특정 표적 부위(target site or target region)를 표적화하기 위한 가이드 RNA 를 제공한다. 일 예에서, 상기 가이드 RNA 는 *VEGFA* 유전자의 특정 표적 부위의 어느 한 가닥 (예컨대, PAM 서열이 위치하는 가닥과 상보적인 가닥)의 핵산 서열과 혼성화 가능한 (예컨대, 상보적 핵산 서열을 갖는) 표적화 서열 (targeting sequence)을 포함하는 것일 수 있다.

다른 예는, Cas9 단백질 및 *VEGFA* 유전자 특이적 표적화 서열을 포함하는 가이드 RNA 를 포함하는 *VEGFA* 유전자 특이적 리보핵산단백질 (RNP)을 제공한다.

다른 예는, 상기 가이드 RNA 또는 *VEGFA* 유전자 특이적 리보핵산단백질 (RNP)을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 황반변성 (예컨대, 노인성 황반변성 (AMD) 등), 망막병증 (예컨대, 당뇨병 망막병증 (diabetic retinopathy) 등) 등과 같은 안질환의 치료  
30 및/또는 예방에 사용될 수 있다.

다른 예는, 상기 *VEGFA* 유전자 특이적 리보핵산단백질(RNP)을 안질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를

포함하는, 안질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 상기 *VEGFA* 유전자 특이적 리보핵산단백질(RNP)은 약학적 유효량으로 투여될 수 있으며, 예컨대, 안구의 병변부위 국소 투여 또는 망막하 주사에 의하여 투여될 수 있다.

상기 안질환은 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 예컨대, VEGF-A 의 과발현과 관련된 안질환일 수 있으며, 신생혈관성 안질환 (neovascular eye disease)일 수 있다. 신생혈관성 안질환은 안구의 혈관신생(neovascularization), 예컨대, 맥락막 혈관신생 (choroidal neovascularization; CNV)에 의하여 유발되는 모든 안질환일 수 있으며, 예컨대, 황반변성 (예컨대, 노인성 황반변성 (age-related macular degeneration; AMD), 근시성 맥락막 혈관신생 (myopic choroidal neovascularization) 등), 망막병증 (예컨대, 당뇨병 망막병증 (diabetic retinopathy), 허혈성 망막병증 (ischemic retinopathy), 분지정맥폐쇄 (branch retinal vein occlusion), 중심정맥폐쇄 (central retinal vein occlusion), 미숙아 망막병증 (retinopathy of prematurity) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택될 것일 수 있다.

VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A)는 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류를 포함하는 포유류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, Human VEGF-A (예컨대, NCBI Accession No. NP\_001020537, NP\_001020538, NP\_001020539, NP\_001020540, NP\_001020541, NP\_001028928, 20 NP\_001165093, NP\_001165094, NP\_001165095, NP\_001165096, NP\_001165097, NP\_001165098, NP\_001165099, NP\_001165100, NP\_001165101, NP\_001191313, NP\_001191314, NP\_001273973, NP\_001303939, NP\_003367 등), Mouse VEGF-A (NCBI Accession No. NP\_001020421, NP\_001020428, NP\_001103736, NP\_001103737, NP\_001103738, NP\_001273985, NP\_001273986, NP\_001273987, 25 NP\_001303970, NP\_033531 등) 등일 수 있다.

Cas9 단백질은 예컨대 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래하는 (분리된) 것일 수 있다.

본 명세서에 사용된 바로서,

'표적 유전자 (target gene)'는 유전자 교정 대상이 되는 유전자 (30 *VEGF-A* 유전자)를 의미하고,

'표적 부위 (target site or target region)'는 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자) 내의 Cas9 에 의한 유전자 교정 (절단 및 뉴클레오타이드의 결실,



첨가, 및/또는 치환)이 일어나는 유전자 부위를 의미하는 것으로, 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자) 내의 Cas9 단백질이 인식하는 PAM 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp 인 유전자 부위를 의미하고 (이 경우, 유전자 교정은 세포 하나에서의 2 쌍의 염색체 중 하나 또는 두 개의 표적 부위에서 일어날 수 있음),

'표적 서열 (target sequence)'은 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자) 내의 가이드 RNA 와 혼성화 가능한 유전자 부위로서, 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자) 내의 Cas9 단백질이 인식하는 PAM 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 17bp 내지 23bp, 예컨대, 20bp 길이의 핵산 서열을 의미하며,

'표적화 서열 (targeting sequence)'은 상기 표적 유전자 내의 표적 서열과 혼성화 가능한 가이드 RNA 부위로서, 17 내지 23 개, 예컨대, 20 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 가이드 RNA 부위일 수 있다.

본 명세서에서, 상기 표적 서열은 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자)의 해당 유전자 부위의 두 개의 DNA 가닥 중 PAM 서열이 위치하는 가닥의 핵산 서열로 표시된다. 이 때, 실제로 가이드 RNA 가 결합하는 DNA 가닥은 PAM 서열이 위치하는 가닥의 상보적 가닥이므로, 상기 가이드 RNA 에 포함된 표적화 서열은, RNA 특성상 T 를 U 로 변경하는 것을 제외하고, 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자)에 위치하는 표적 서열과 동일한 핵산 서열을 갖게 된다. 따라서, 본 명세서에서, 가이드 RNA 의 표적화 서열과 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자)의 표적 서열은 T 와 U 가 상호 변경되는 것을 제외하고 동일한 핵산 서열로 표시된다.

상기 Cas9 단백질이 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NGG-3' (N 은 A, T, G, 또는 C 임)이고, 표적 부위는 표적 유전자 (*VEGF-A* 유전자) 내의 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp 인 유전자 부위일 수 있다.

이 경우, *VEGF-A* 유전자의 불활성화는, *VEGF-A* 유전자에서,

a) 5'-NGG-3' (N 은 A, T, C 또는 G 임) 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 최대 50bp 또는 최대 40bp 길이의 핵산 서열 (표적 부위) 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실,

b) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 최대 50bp 또는 최대 40bp 길이의 핵산 서열 (표적 부위) 내의 하나 이상 (예컨대, 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개)의 뉴클레오타이드의 야생형 유전자와 상이한 뉴클레오타이드로의 치환,

5 c) 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 최대 50bp 또는 최대 40bp 길이의 핵산 서열 (표적 부위) 내로의 하나 이상 (예컨대, 1-20 개, 1-15 개, 또는 1-10 개)의 뉴클레오타이드의 삽입 (이 때, 삽입되는 뉴클레오타이드는 각각 독립적으로 A, T, C 및 G 중에서 선택됨), 또는

10 d) 상기 a) 내지 c) 중에서 선택된 2 가지 이상의 조합에 의하여 유도된 것일 수 있다.

상기 가이드 RNA 는 CRISPR RNA (crRNA), *trans*-activating crRNA (tracrRNA), 및 단일 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있으며, 구체적으로 crRNA 와 tracrRNA 가 서로  
15 결합된 이중 가닥 crRNA:tracrRNA 복합체, 또는 crRNA 또는 그 일부와 tracrRNA 또는 그 일부가 올리고뉴클레오타이드 링커로 연결된 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있다.

상기 가이드 RNA 의 구체적 서열은 Cas9 단백질의 종류 (즉, 유래 미생물)에 따라서 적절히 선택할 수 있으며, 이는 이 발명이 속하는 기술  
20 분야의 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 알 수 있는 사항이다.

*Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 사용하는 경우, crRNA 는 다음의 일반식 1로 표현될 수 있다:



상기 일반식 1에서,

25  $N_{\text{cas9}}$  는 표적화 서열로서, 표적 유전자(*VEGF-A* 유전자)의 표적 서열에 따라서 결정되는 부위이며, 1 은 상기 표적화 서열에 포함된 뉴클레오타이드 수를 나타내는 것으로 17 내지 23 또는 18 내지 22 의 정수, 예컨대 20 일 수 있고;

30 상기 표적 서열의 3' 방향으로 인접하여 위치하는 연속하는 12 개의 뉴클레오타이드(GUUUUAGAGCUA) (서열번호 359)를 포함하는 부위는 crRNA 의 필수적 부분이고,



5'-( $N_{cas9}$ )<sub>1</sub>-(GUUUUAGAGCUA)-(올리고뉴클레오타이드 링커)-  
 (UAGCAAGUJAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC)-3'  
 (일반식 3)

상기 일반식 3 에서, ( $N_{cas9}$ )<sub>1</sub> 는 표적 서열로서 앞서 일반식 1 에서  
 5 설명한 바와 같다.

상기 sgRNA 에 포함되는 올리고뉴클레오타이드 링커는 3 내지 5 개,  
 예컨대 4 개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기  
 뉴클레오타이드들은 서로 같거나 다를 수 있고, A, U, C 및 G 로 이루어진  
 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있다.

10 상기 crRNA 또는 sgRNA 는 5' 말단 (즉, crRNA 의 타겟팅 서열 부위의  
 5' 말단)에 1 내지 3 개의 구아닌(G)을 추가로 포함할 수 있다.

상기 tracrRNA 또는 sgRNA 는 tracrRNA 의 필수적 부분(60nt)의 3'  
 말단에 5 개 내지 7 개의 우라실 (U)을 포함하는 종결부위를 추가로 포함할 수  
 있다.

15 일 예에서, 표적 유전자(*VEGF-A* 유전자)의 표적 서열은 다음으로  
 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다:

- Vegfa*-1: 5'-CTCCTGGAAGATGTCCACCA-3' (서열번호 1) (PAM 서열: GGG);
- Vegfa*-2: 5'-AGCTCATCTCTCCTATGTGC-3' (서열번호 2) (PAM 서열: TGG);
- Vegfa*-3: 5'-GACCCTGGTGGACATCTTCC-3' (서열번호 3) (PAM 서열: AGG);
- 20 *Vegfa*-4: 5'-ACTCCTGGAAGATGTCCACC-3' (서열번호 4) (PAM 서열: AGG);
- Vegfa*-5: 5'- CGCTTACCTTGGCATGGTGG-3' (서열번호 5) (PAM 서열:  
 AGG);
- Vegfa*-6: 5'- GACCGCTTACCTTGGCATGG-3' (서열번호 6) (PAM 서열:  
 TGG);
- 25 *Vegfa*-7: 5'- CACGACCGCTTACCTTGGCA-3' (서열번호 7) (PAM 서열:  
 TGG); 및
- Vegfa*-8: 5'- GGTGCAGCCTGGGACCACTG-3' (서열번호 8) (PAM 서열: AGG).

상기 표적 서열들은 포유류 종간 보존이 잘된 서열로, 예컨대, 인간과  
 설치류 (예컨대, 마우스)에 모두 존재한다. 예컨대, 상기 표적 서열은  
 30 서열번호 1 또는 서열번호 2 의 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

상기 표적 서열은 포유류 간, 예컨대 인간 *VEGF-A* 유전자와 마우스  
*VEGF-A* 유전자 간에 잘 보존되어 있으며, on target 부위에서의 유전자 교정

효율 (예컨대, indel 빈도(%))가 매우 우수하며, on target 이외의 부분에서는 mismatching nucleotide 개수가 3 개 이하, 2 개 이하, 1 개, 또는 0 개인 부위 (off target 부위)가 거의 존재하지 않아서, on target 이외의 부분에서 유전자 교정이 일어날 확률이 매우 낮거나 없어서 안전성이 우수하다 (off-target effect 가 매우 낮거나 거의 없음).

이러한 우수한 교정 효율 및 낮은 off-target effect 에 근거하여, 본 발명의 일 예는 상기한 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 및 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 (DNA 또는 mRNA)를 포함하는 *VEGF-A* 유전자 교정용 조성물을 제공한다. 상기 *VEGF-A* 유전자 교정용 조성물은 가이드 RNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 리보핵산단백질을 포함하는 것일 수 있다. 이 때, 상기 리보핵산단백질은 생체 또는 세포에 투여 전 미리 조립된 것일 수 있다.

본 명세서에서, 표적 유전자의 표적 부위와 혼성화 가능한 가이드 RNA 의 표적화 서열은 표적 서열이 위치하는 DNA 가닥 (즉, PAM 서열이 위치하는 DNA 가닥)의 상보적인 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것으로, 상기 상보적 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 상보적 결합이 가능하다.

예컨대, crRNA 또는 sgRNA 의 표적화 서열 ' $(N_{cas9})_1$ '는 상기한 서열번호 1 내지 4 의 표적 서열과 동일한 서열을 갖는 것일 수 있다 (단, T 를 U 로 바꿈). 즉, crRNA 또는 sgRNA 은 ' $(N_{cas9})_1$ '은 서열번호 9 내지 16 에서 선택된 표적화 서열을 포함하는 것일 수 있다:

*Vegfa-1*: 5'-CUCCUGGAAGAUGUCCACCA-3' (서열번호 9);

*Vegfa-2*: 5'-AGCUCAUCUCUCCUAUGUGC-3' (서열번호 10);

*Vegfa-3*: 5'-GACCCUGGUGGACAUCUCC-3' (서열번호 11);

*Vegfa-4*: 5'-ACUCCUGGAAGAUGUCCACC-3' (서열번호 12);

*Vegfa-5*: 5'- CGCUUACCUUGGCAUGGUGG-3' (서열번호 13);

*Vegfa-6*: 5'- GACCGCUUACCUUGGCAUGG-3' (서열번호 14);

*Vegfa-7*: 5'- CACGACCGCUUACCUUGGCA-3' (서열번호 15); 및

*Vegfa-8*: 5'- GGUGCAGCCUGGGACCACUG-3' (서열번호 16).

예컨대, 상기 crRNA 또는 sgRNA 는 표적화 서열로서 서열번호 9 또는 서열번호 10 을 포함할 수 있다.

일 예에서, 기존에 RNA 를 생체 내 또는 세포 내 전달 시 생기는 세포 생존률 (cell viability) 감소의 문제를 해결하기 위하여, 변형된 형태의 RNA 를 사용할 수 있다. 예컨대, RNA 의 5' 말단에 인산-인산 결합을 포함하지 않도록 변형된 RNA (예컨대, 5' 말단에 트리포스페이트 또는 5 다이포스페이트를 포함하지 않음)를 가이드 RNA 로 사용할 수 있다. 또는, sgRNA (예컨대, 화학적으로 합성된 sgRNA)는 5' 말단 및/또는 3' 말단에 하나 이상 (예컨대, 1 내지 5 개, 또는 2 내지 4 개)의 변형된 리보핵산을 포함할 수 있으며, 이때 변형은 포스포로티오에이트 (phosphorothioate) 및/또는 리보오스의 2' 위치의 변형 (예컨대, 2'-acetylation, 2' methylation, 또는 10 기타 변형) 등을 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 변형된 sgRNA 는 5' 말단 및 3' 말단 각각에 위치하는 3 개의 뉴클레오타이드에 있는 리보오스의 2'-O 위치가 메틸레이션 (메틸기 첨가) 및/또는 포스포로티오에이트 백본(phosphorothioate backbone)으로의 변형 등을 포함하는 것일 수 있다.

다른 예에서, 상기 서열번호 1 내지 4 중에서 선택된 표적 서열을 15 포함하는 가이드 RNA 가 제공된다.

상기 방법에서, 상기 가이드 RNA 와 Cas9 단백질의 세포 내로의 형질도입은 미리 조립된 가이드 RNA 와 Cas9 단백질의 복합체 (리보핵산단백질)를 통상적인 방법 (예컨대, 전기천공, 리포펙션 등)으로 직접 면역세포에 도입하거나, 가이드 RNA 를 암호화하는 DNA 분자와 Cas9 20 단백질을 암호화하는 유전자 (DNA 또는 mRNA) (또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 염기서열 상동성을 갖는 유전자)를 하나의 벡터 또는 각각 별개의 벡터 (예컨대, 플라스미드, 바이러스 벡터 등)에 포함된 상태로 세포에 도입하거나, mRNA delivery 를 통하여 수행할 수 있다.

일 예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스 파코바이러스 (예컨대, 아데노관련(adenoassociated) 바이러스 (AAV)), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스(orthomyxovirus)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들 (예컨대 인플루엔자 바이러스), 랩도바이러스(rhabdovirus) 예컨대, 광견병 30 및 소포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) (예컨대, 홍역 및 센다이(Sendai), 알파바이러스(alphavirus) 및 피코르나바이러스(picornavirus)와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및

헤르페스바이러스(예컨대, 단순포진(Herpes Simplex) 바이러스 타입들 1 및 2, Epstein)-바(Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)), 아데노바이러스를 포함하는 이중-가닥의 DNA 바이러스들, 폭스바이러스(poxvirus)(예컨대, 우두(vaccinia), 계두(fowlpox) 및 카나리아두창(canarypox)) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

상기 Cas9 단백질, 가이드 RNA, 이를 포함하는 리보핵산단백질, 또는 이들 중 하나 이상을 포함하는 벡터는 각각 전기천공법 (electroporation), 리포펙션, 바이러스 벡터, 나노파티클 (nanoparticles) 뿐만 아니라, PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등 당업계에 공지된 다양한 방법들 중에서 선택된 적절한 방법을 통하여 생체 내 또는 세포 내로 전달될 수 있다.

상기 Cas9 단백질, 가이드 RNA, 이를 포함하는 리보핵산단백질의 핵내 전달을 위하여, 상기 Cas9 단백질 및/또는 가이드 RNA 는 통상적으로 사용 가능한 핵 위치호 신호 (nuclear localization signal; NLS)를 추가로 포함할 수 있다.

상기 *VEGF-A* 유전자 특이적 리보핵산단백질에 있어서, Cas9 단백질은 미생물에서 분리된 것, 또는 재조합적 방법 또는 화학적 합성 방법으로 비자연적 생산된 것(non-naturally occurring)일 수 있으며, 상기 가이드 RNA 는 재조합적 또는 화학적으로 생산된 것일 수 있다.

Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자((DNA 또는 mRNA)) 및 *VEGF-A* 유전자의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 표적화 서열을 포함하는 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA 를 포함하는 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제, 또는 *VEGF-A* 유전자 특이적 리보핵산단백질은 다양한 투여 경로를 통하여 생체 내에 투여될 수 있으며, 이에 제한되지는 않지만, 안질환 (*VEGF-A* 유전자 과발현과 관련된 안질환) 병변부위에 국소 투여 또는 망막하 투여 등의 경로로 안구에 투여될 수 있다.

상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제 또는 *VEGF-A* 유전자 특이적 리보핵산단백질의 투여 대상은 *VEGF-A* 유전자 과발현과 관련된 안질환을 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 모든 포유 동물, 예컨대, 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등에서 선택된 동물, 이로부터 분리된 세포 (예컨대, 망막 색소 상피세포 (RPE), 망막 색소

상피세포 (RPE)/맥락막/공막 복합체(RPE/choroid/scleral complex), 등) 또는 조직 (안구 조직), 또는 이의 배양물일 수 있다.

상기 *VEGF-A* 유전자를 불활성화시키는 제제 또는 *VEGF-A* 유전자 특이적 리보핵산단백질은 "약학적 유효량"으로 투여되거나 약학 조성물에 포함될 수 있다. "약학적 유효량"은 적용 부위에서 소망하는 효과, 즉 *VEGF-A* 유전자 교정 효과를 나타낼 수 있는 양을 의미하며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 투여 시간, 투여 경로, 배출 속도, 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

#### 10 【발명의 효과】

본 명세서에서 제안되는 *VEGF-A* 유전자 교정 기술은 높은 유전자 교정 효율뿐 아니라 매우 낮은 off-target effect 를 나타냄으로써 효율적이면서도 안전하게 유전자 교정을 수행할 수 있고, 이를 통하여 *VEGF-A* 단백질 수준을 병리학적 역치 이하로 낮춤으로써, *VEGF-A* 과발현과 관련된 안질환의 장기적 또는 영구적인 치료를 가능하게 한다.

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1a는 마우스 NIH3T3 세포와 인간 ARPE-19 세포의 *Vegfa/VEGFA* 유전자좌의 표적 부위 서열을 보여준다 (PAM 서열: 파란색); sgRNA 표적 서열: 청색).

도 1b는 NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의하여 유도된 돌연변이를 T7 엔도뉴클레아제 1(T7E1) 분석을 통하여 확인한 결과이다.

도 1c는 NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 *Vegfa-1* sgRNA를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의하여 유도된 돌연변이(indel) 빈도를 보여주는 그래프이다.

도 1d는 NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 *Vegfa-1* sgRNA를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP에 의하여 유도되는 대표적인 *Vegfa/VEGFA* 유전자좌에서의 돌연변이 DNA 서열을 보여준다.

도 1e는 confluent ARPE-19 세포에서 *Vegfa-1* sgRNA를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP의 도입에 의하여 유도되는 돌연변이 빈도를 보여주는 그래프이다.



도 1f는 Vegfa-1 sgRNA를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP가 형질 감염된 confluent ARPE-19 세포에서의 VEGFA mRNA 수준을 보여주는 그래프이다.

5 도 1g는 Vegfa-1 sgRNA를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP가 형질 감염된 confluent ARPE-19 세포에서의 VEGFA 단백질 수준을 보여주는 그래프이다.

도 1h는 4종의 sgRNA (Vegfa-1 sgRNA, Vegfa-2 sgRNA, Vegfa-3 sgRNA, 및 Vegfa-4 sgRNA)를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의해 유발되는 NIH3T3 세포에서의 돌연변이 빈도를 보여주는 그래프이다.

도 2a는 Cy3 표지된 Cas9 RNP (Cy3 표지된 Cas9 및 Vegfa-1 sgRNA 복합체) 또는 Cy3 표지된 Cas9 단독 (대조군)으로 형질 감염시키고 24시간 후에 NIH3T3 세포를 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

15 도 2b는 Cy3 표지된 Cas9 RNP 또는 Cy3 표지된 Cas9 단독으로 형질 감염 24시간 후의 총 DAPI 양성 핵 개수에 대한 Cy3 양성 핵 개수의 비율 ( $100 \times [\text{Cy3 양성 핵 개수}] / [\text{총 DAPI 양성 핵 개수}]$ )을 보여주는 그래프이다.

도 2c는 형질 감염 24시간 후에 NIH3T3 세포에서 유도된 돌연변이를 T7E1 assay로 분석한 결과를 보여준다.

20 도 2d는 형질 감염 24시간 후에 NIH3T3 세포에서 유도된 돌연변이 빈도를 보여주는 그래프이다.

도 2e는 Cy3 표지된 Cas9 RNP를 마우스 눈에 주사 한 후 3 일째에 RPE flat-mount를 형광 현미경으로 관찰한 형광 이미지이다.

25 도 2f는 Cy3 표지된 Cas9 RNP주사 후 3일째에 망막 색소 상피세포 (RPE)/맥락막/공막 복합체(RPE/choroid/scleral complex)로부터 분리된 유전체 DNA에서 생체 내에서 유도된 indels의 빈도를 보여주는 그래프이다.

도 2g는 주사 후 24시간 및 72시간째에 RPE/맥락막/공막 복합체에서의 Cas9 단백질의 수준을 웨스턴 블라팅으로 확인한 결과이다.

30 도 2h는 망막 색소 상피세포 (RPE)/맥락막/공막 복합체(RPE/choroid/scleral complex) 중의 망막 색소 상피세포 (RPE)의 분포를 형광 현미경으로 관찰한 형광 이미지이다.

도 2i는 주사 후 24시간 및 72시간째에 RPE/맥락막/공막 복합체에서의 Cas9 단백질의 수준을 웨스턴 블라팅으로 확인한 결과이다.

도 3a는 실시예 3의 시험 과정을 모식적으로 보여주는 그림이다.

도 3b는 주사 후 7 일째, Rosa26-특이성 Cas9 RNP (대조군) 또는 Vegfa- 특이성 Cas9 RNP를 주사한 C57BL/6J 마우스에서 isolectin B4(IB4)로 염색된 laser-induced CNV를 가시화한 사진이다.

5 도 3c는 Vegfa- 특이성 Cas9 RNP를 주사한 C57BL/6J 마우스에서의 CNV 면적을 Rosa26-특이성 Cas9 RNP 주사한 대조군의 CNV 면적과 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 3d는 CNV 영역에서의 Vegfa 단백질 발현 수준을 보여주는 그래프이다.

10 도 3e는 RPE 복합체 내의 Vegfa 표적 부위에서의 Indel 빈도(%)를 보여주는 그래프이다.

도 3f는 RPE 복합체 내의 Rosa26 표적 부위에서의 Indel 빈도(%)를 보여주는 그래프이다.

15 도 3g는 hematoxylin & eosin 염색으로 시료 단면(cross section)의 Laser-induced CNV 구조를 가시화한 결과를 보여주는 사진이다.

도 3h는 targeted deep sequencing를 통한 돌연변이 분석에 사용하기 위한 CNV 시료를 보여준다.

도 3i는 레이저 처리 후 7일째의 Laser-induced CNV를 가시화한 사진이다.

20 도 4a는 in vitro 절단 부위를 보여주는 Genome-wide Circos plot이다.

도 4b는 41 개의 Digenome-capture site (표 5 참조) 및 On-target 서열을 포함한 42개 서열의 Sequence logo를 보여준다.

도 4c는 인간 ARPE-19 세포에서 확인된 off-target 부위 및 indel 빈도를 보여준다.

25 도 5는 마우스 RPE에서 Vegfa-1 sgRNA를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP에 의하여 유도되는 돌연변이 DNA 서열을 나타낸 것으로, a는 RNP 주사 3일 후에 RPE에서 Vegfa-특이적 Cas9 RNP에 의하여 유도되는 대표적인 돌연변이 DNA 서열을 보여주고, b는 RNP 주사 7일 후에 레이저 유도 맥락막 혈관 신생 (laser-induced choroidal neovascularization (CNV))을 갖는 RPE에서의 돌연변이 DNA 서열을 보여준다.

30 도 6은 마우스 RPE의 20개의 잠재적 off-target 부위에서의 indel 빈도(%)를 보여준다.

도 7a는 *Vegfa*-specific Cas9 RNP 주입 7일 후의 *Vegfa*-specific Cas9 RNP 주입된 마우스 및 *Vegfa*-specific Cas9 RNP가 주입되지 않은 정상 대조군 마우스의 망막으로부터 얻은 형광 단면 이미지이다.

도 7b는 opsin positive 영역(%)을 보여주는 그래프이다.

5 도 8은 pET28-NLS-Cas9 벡터의 개열지도이다.

도 9는 pRG2 벡터의 개열지도이다.

**【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】**

이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자  
 10 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

**[참고예]**

**1. Cas9 RNP의 제조**

15 정제된 Cas9 단백질은 ToolGen Inc., South Korea에서 구입하여 준비하였다. sgRNA는 T7 폴리머라제 (New England Biolabs)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 in vitro 전사에 의해 생성하였다. 간략하게, 두 개의 상보적인 올리고뉴클레오티드 (표 1 참조)을 annealing 및 extension하여 sgRNA의 템플릿을 생성하였다.

20 **【표 1】**

*In vitro* transcription templates encoding sgRNAs

sgRNA name	RGEN Target (5' to 3')
<i>Vegfa</i> -1 (Forward)	GAAATTAATACGACTCACTATAGCTCCTGGAAGATGTCCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG (서열번호 17)
<i>Vegfa</i> -2 (Forward)	GAAATTAATACGACTCACTATAGAGCTCATCTCTCCTATGTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG (서열번호 18)
<i>Vegfa</i> -3 (Forward)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGACCCCTGGTGGACATCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG (서열번호 19)
<i>Vegfa</i> -4 (Forward)	GAAATTAATACGACTCACTATAGACTCCTGGAAGATGTCCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG (서열번호 20)
<i>Rosa26</i> (Forward)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGGTCCTCAGAAGCCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG (서열번호 21)
Universal (Reverse)	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC (서열번호 22)

(표적 서열: 밑줄로 표시; crRNA의 필수 부분: 굵은 글씨로 표시;  
뉴클레오타이드 링커: 이탤릭체로 표시)

상기 생성된 sgRNA 템플릿을 T7 RNA 폴리머라제와 함께 NTPs (Jena bioscience) 및 RNase 저해제 (New England Biolabs)를 포함하는 반응 완충액  
5 (40 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 1 mM DTT, pH7.9)에 넣고 37°C에서 16시간 동안 배양하여 전사시켰다. 전사된 sgRNA를 37°C에서 30분 동안 DNase I (New England Biolabs)와 함께 배양하였다. sgRNA를 RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)를 사용하여 정제하고, Nano drop (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 정량화하였다. 정제된 sgRNAs (65μg)를 CIP (Calf intestinal; 1000 units; Alkaline Phosphatase, New England Biolabs)와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하여 3-인산기를 제거하였다. 상기 얻어진 sgRNA를 RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)를 사용하여 다시 정제하고 Nano drop (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 정량화하였다.

모든 Cas9 단백질 및 sgRNA stock을 사용하여 세포 생존률 및 유전체  
15 교정 (indel) 효율을 시험하여, 고효율의 Cas9 단백질 및 sgRNA stock을 선택하여 *in vivo* eye injection에 사용하였다.

## 2. Cas9 단백질 정제

pET28-NLS-Cas9 벡터 (도 8; Cas9: *Streptococcus pyogenes* 유래임  
20 (서열번호 358))를 대장균 균주 BL21 (DE3)으로 형질 전환시킨 후, 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 18°C에서 12시간 동안 Cas9 단백질 발현을 유도하였다. 상기 대장균 세포를 초음파 처리하여 용해시키고, 20,000g에서 30분 동안 원심분리 한 후, 용해성 용해액(soluble lysate)를 취하여 Ni-NTA 비드 (Qiagen)와 혼합하고, Cy3 염료 (GE Healthcare)를 1:10 비율 (Cas9 단백질: Cy3 염료 분자)로 첨가하였다. 상기 혼합물을 암조건 및 4°C 조건에서 밤새(12 시간 이상) 배양하였다. 용리 완충액 (elution buffer; 50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150-500 mM NaCl, 10-25%(w/v) 글리세롤, 0.2 M 이미다졸)을 사용하여 Cy3-표지 Cas9를 용출시키고, 투석용 완충액(dialyzing buffer; 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT,  
25 10%(w/v) 글리세롤)을 사용하여 투석하였다. 정제된 Cy3-표지 Cas9 단백질을 Ultracel 100K cellulose column (Millipore)을 사용하여 농축시켰다. Cy3-표지 Cas9 단백질의 순도는 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. Cy3 표지 효율은

Cas9 단백질 (280 nm) 및 접합된 Cy3 염료 분자의 흡수 스펙트럼을 비교하여 측정하였다.

### 3. 세포 배양 및 형질 감염

5            마우스 NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™) 및 ARPE-19 (인간 망막 색소 상피세포; ATCC® CRL-2302™) 세포주를 10%(v/v) BCS 또는 FBS가 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 및 습윤 대기 조건 하에서 배양하였다 (NIH3T3 및 ARPE-19 세포는 mycoplasma 오염 여부가 시험되지 않음). 형질 감염 하루 전에, NIH3T3 및 ARPE-19 세포를 24-  
10    웰플레이트에 2x10<sup>4</sup>세포/웰의 양으로 접종하였다. 각 웰에는 항생제 무함유 성장배지 250 $\mu$ l가 첨가되어 있다.

          플라스미드 전달의 경우, Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라, Cas9 (1 $\mu$ g; *Streptococcus pyogenes* 유래; 코딩 서열 (4107bp): 서열번호 358) 발현  
15    플라스미드 (pET vector (Addgene) 사용) 및 sgRNA (1 $\mu$ g; 실시예 1) 발현 플라스미드 (pRG2 vector (도 9 참조) 사용)로 상기 24-웰 플레이트의 세포를 형질 감염시켰다.

          RNP 전달의 경우, Cas9 단백질 (4 $\mu$ g; 실시예 2)을 실온에서 5분 동안 sgRNA (2.25 $\mu$ g; 실시예 1)와 함께 배양 한 후, 50 $\mu$ l의 Opti-MEM (Thermo  
20    Fisher Scientific)과 1 $\mu$ l의 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)을 첨가하였다. 10분 후, 상기 RNP 혼합물을 상기 24-웰 플레이트의 세포에 첨가 하여 세포를 형질감염시켰다. 형질 감염 48 시간 후, 세포를 수확하고 T7E1 분석, targeted deep sequencing, 및 qPCR을 수행하였.

          confluent RPE (human retinal pigment epithelial)에서 VEGF-A를  
25    발현시키는 경우, 상기 준비된 ARPE-19 세포는 confluency에 도달한 후 1%(v/v) FBS가 함유된 DMEM/F12에서 유지시켜 시험을 위한 polarized epithelial layer가 형성되도록 하였다. ARPE-19 세포를 12-웰 플레이트에 넣고 Cas9 단백질 8 $\mu$ g, sgRNA 4.5 $\mu$ g 및 lipofectamine 2000 3 $\mu$ l로 형질  
30    감염시켰다. 형질감염 2일 후, 형질 감염 성장 배지 (DMEM + 1%(v/v) FBS)를 신선한 무혈청 배지 0.5 ml으로 바꾸어주었다. 16 시간 후, 세포 및 배지를 수확하고 targeted deep sequencing, qPCR, 및 ELISA를 수행하였다.

4. Cy3- 표지 Cas9 RNP의 이미징 및 카운팅

형질 감염 후 1일째에, 세포를 실온에서 10분간 4%(w/v) PFA(paraformaldehyde)에 고정시킨 후, 실온에서 15분 동안 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1µg/ml, Sigma Aldrich)로 염색하였다. 상기 세포를 x630 배율로 공초점 현미경 (LSM510, Carl Zeiss)으로 시각화하였다. 스캐닝 매개 변수는 다음과 같이 하였다: scaling (x = 0.14µm/pixel, y = 0.14µm/pixel, z = 1µm/pixel), dimensions (x=1024, y=1024, z=6, channels: 3, 12-bit) (with objective C-Apochromat 63x/1.20W Korr UV-VIS-IR). ZEN 2 소프트웨어 (검정색 판, Ver 10.0, Carl Zeiss)를 사용하여 Cy3 양성 핵(Cy3 positive nuclei)을 계수하였다. Cy3 양성 핵의 빈도(frequency)를 정량화하기 위해, 우리는 배율 630배에서 관찰되는 시야 범위에서 Cy3 염색된 핵을 갖는 세포의 수와 전체 세포수를 세고, 4개 시야에 걸쳐서 관찰되는 Cy3 양성 핵의 평균 백분율을 계산 하였다 (n = 3).

5. T7E1 Assay

DNeasy Tissue Kit (Qiagen)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 세포 및 조직으로부터 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. PCR을 사용하여 표적 부위를 증폭시킨 후, 생성물을 열 순환기를 사용하여 변성시키고 어닐링시켰다. 이 때 사용 된 프라이머를 아래의 표 2에 정리하였다:

【표 2】

List of primers used for the T7E1 assay.

Target	1 <sup>st</sup> PCR		2 <sup>nd</sup> PCR	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Vegfa</i> -1 (mouse)	CAAATCTGGGTG	AGATGGTCAAATCGT GGAGAG (서열번호 24)	ACACTCTTCCCTAC	GTGACTGGAGTTCA
	GCGATAGA		ACGACGCTCTCCGA	GACGTGTGCTCTTC
	(서열번호 23)		TCTCAAATCTGGGTG	CGATCTCCAGGGCT
			GCGATAGA	TCATCGTTACA
		(서열번호 25)	(서열번호 26)	
<i>Vegfa</i> -1 (human)	CATCGTGTGATC	CCACCTGTCCCAAA GTGTTA (서열번호 28)	ACACTCTTCCCTAC	GTGACTGGAGTTCA
	TCTGGAATGAA		ACGACGCTCTCCGA	GACGTGTGCTCTTC
	(서열번호 27)		TCTGTGGTGAAGTTC	CGATCTAAAGATGC
			ATGGATGTCTA	CCACCTGCAT

(서열번호 29) (서열번호 30)

어닐링 된 PCR 산물을 T7 엔도뉴클레아제 I (ToolGen, Inc.)과 함께 37°C에서 25분 동안 인큐베이션하고, 아가로오스 겔 전기 영동으로 분석하였다.

5

**6. Targeted deep sequencing**

Phusion 폴리머라제 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 유전체 DNA로부터 온-타겟(on-target) 및 잠재적 오프-타겟(off-target) 영역을 증폭시켰다. Illumina MiSeq(LAS Inc. 한국)을 사용하여 PCR 증폭물의 쌍을 이룬 서열의 분석을 수행하였다. 사용된 프라이머를 표 3내지 표 5에 정리하였다:

**【표 3】**

targeted deep sequencing에 사용된 프라이머

Target	1 <sup>st</sup> PCR		2 <sup>nd</sup> PCR	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Vegfa-1</i> (mouse)	CAAATCTGGGTGGC GATAGA (서열번호 23)	AGATGGTCAAATCG TGGAGAG (서열번호 24)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTCAA ATCTGGGTGGCGATAGA (서열번호 25)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCCAGGGCTTCATCG TTACA (서열번호 26)
<i>Vegfa-2</i> (mouse)	ACCTATCCCTGCTC AGTAGAA (서열번호 31)	CCCAAGAGAGGAAG CAAGAA (서열번호 32)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTATC TGCTCCCTCCCTCTAC (서열번호 33)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTGTCCATCACCATCA CCACCACCAC (서열번호 34)
<i>Vegfa-3</i> (mouse)	CAAATCTGGGTGGC GATAGA (서열번호 23)	AGATGGTCAAATCG TGGAGAG (서열번호 24)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTCAA ATCTGGGTGGCGATAGA (서열번호 25)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCCAGGGCTTCATCG TTACA (서열번호 26)
<i>Vegfa-4</i> (mouse)	CAAATCTGGGTGGC GATAGA (서열번호 23)	AGATGGTCAAATCG TGGAGAG (서열번호 24)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTCAA ATCTGGGTGGCGATAGA	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCCAGGGCTTCATCG

			(서열번호 25)	TTACA (서열번호 26)
<i>Vegfa-1</i> (human)	CATCGTGTGATCTC TGGAATGAA (서열번호 27)	CCACCTGTTCCTCAA AGTGTTA (서열번호 28)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTGTG GTGAAGTTCATGGATGTC TA (서열번호 29)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTAAAGATGCCACCT GCAT (서열번호 30)
<i>Rosa26</i> (mouse)	CCAAAGTCGCTCTG AGTTGT (서열번호 35)	TCGGGTGAGCATGT CTTAATC (서열번호 36)	ACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTCCGATCTCCA AAGTCGCTCTGAGTTGT (서열번호 37)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCTTAAGCTGCC AGAAGA (서열번호 38)

【표 4】

potential off-target 부위에서의 targeted deep sequencing 에 사용된 프라이머

No.	1 <sup>st</sup> PCR		2 <sup>nd</sup> PCR	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
OT1	TCTGTCTGTCTCCAGA CATTTG (서열번호 39)	GTCCTGCTTCTATCCT GCTTA (서열번호 40)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TGTGATCAGCTGACTT CCAGTTC (서열번호 41)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCTCCACAACCTCAAG TCCCATTAC (서열번호 42)
OT2	GACGTGAGAGTGAGCA GTTTAT (서열번호 43)	ACAGCACCCAGATTGT CTTC (서열번호 44)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCCTTGIGTCTTTGA TGCTCT (서열번호 45)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTAAGGTCTGCACCAT GAATCC (서열번호 46)
OT3	GCTGTGCTCAAGACCA ACAA (서열번호 47)	CCGGTCTGTACTGGT GTCT (서열번호 48)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TTGCCTACCTCCACC TTCT (서열번호 49)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTAGATGCTGCCCTAC ATGAAC (서열번호 50)
OT4	GTAGGCTCAACAGCTC TTTCT (서열번호 51)	CATAGTGTGAGTGGTA CTGGTG (서열번호 52)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCCTGAGCTTCTCTG TCCTAAT	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTGCCACTGCTTCTCC TCTCTAT



			(서열번호 53)	(서열번호 54)
OT5	GCCCAAAGTAGCAGGT GATTA (서열번호 55)	CTCAGGCTGTAAGTGA CGATATG (서열번호 56)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TACAGGATGCAAGTCC ACATC (서열번호 57)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCATTCTTCACAGGG CCATCA (서열번호 58)
OT6	AGAAGCTAAGGAGCCC AATTT (서열번호 59)	TACTTTGCCAAGCCCA TGT (서열번호 60)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TGCCTTCTCTTTGGC TGTA (서열번호 61)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTGAACCTACTCTCAT CGTGCTAC (서열번호 62)
OT7	GAGGAGCCCAAGTATA TCACAG (서열번호 63)	GGTCACCATAGCTACA AGAGAG (서열번호 64)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TAAGGCTCCATTAGCC TCTTC (서열번호 65)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCTGTCATGGTGCAC ATCATTC (서열번호 66)
OT8	CCCTGCAGCATTCTCT GTAT (서열번호 67)	GACCCAGTGTATTGTG GGTAG (서열번호 68)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TTGACAAGCCTGACAG TTCATC (서열번호 69)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTGGTGATGGTGAGC AGAAA (서열번호 70)
OT9	CTGGAACCAGAGTCAT AGATAGTTG (서열번호 71)	TCTGAAGCACACACCA GAAG (서열번호 72)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCAAGATACCAAGCA GGTGTC (서열번호 73)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTGAAGCAGTTCAGAG GTCTATGT (서열번호 74)
OT10	CTAGAAGAAGGCAGAG GGAGTA (서열번호 75)	AGGAGGGACAGACTGG TATAAA (서열번호 76)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCACAGCGAGCCAGAA TACA (서열번호 77)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTCTGTGCTACCTGAT CTACTCAAC (서열번호 78)
OT11	GTGTGAATGGAGGCGA AATTG (서열번호 79)	GCAGCTGAGAAGCTAA GGAATA (서열번호 80)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC TTACATAAAGTCCCTG CAACCTG (서열번호 81)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTTTACCAGGACTCTA GTGAGTGG (서열번호 82)
OT12	TAGTACCTGCCACCA GATAG (서열번호 83)	GGGCACTTCTTCAATG CTTAC (서열번호 84)	ACACTCTTTCCTACA CGACGCTCTCCGATC	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT

	83)	84)	TCTCCTGACCAGTGTT CTGTAAT (서열번호 85)	CTAAACCTCGAGTAGG AAGGGA (서열번호 86)
OT13	CCCCTGAGGTTGTAT CAGTTC (서열번호 87)	GATCCAATGGCTTTC ACATAC (서열번호 88)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TAAAGAAGACCAGTGA AGGACTG (서열번호 89)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTAGTCTGATGACCCG AGTTCTA (서열번호 90)
OT14	TCTATATAGGCAGGTT ATGAAAGCA (서열번호 91)	AACCAGGACATATGTG GTAGAAA (서열번호 92)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TAATGGCCTCTGGGA AAGT (서열번호 93)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTCTGAGTCTGAGAGC TTGTAGTG (서열번호 94)
OT15	CACAGACAGTCGCCTT CAAT (서열번호 95)	TGGAAGCCTAACAGG TCAATAA (서열번호 96)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TGCCTCAATGAATCT CCCTTG (서열번호 97)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTGCTCATTGGCAGC ACTTAC (서열번호 98)
OT16	GGAAGATCAGCAGTCT CAACTAA (서열번호 99)	CACATTACCTCAAAGC TGTTTCTT (서열번호 100)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCTCAGTGACAGAGAC TCACCTA (서열번호 101)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTGTGGTGACATGGCT GTATCTT (서열번호 102)
OT17	CTTCCACCGGGTATTT CCTATC (서열번호 103)	TCCCAGAGAGAGTTAG GTTAAGA (서열번호 104)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TAGATGAATGAGCACC AGAGAAA (서열번호 105)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTAGACAAGAAAGGGC AGTAAGAA (서열번호 106)
OT18	CCTGGGAACAACAGCC ATAA (서열번호 107)	GAACATTGGGTAGGTG AGGAAG (서열번호 108)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TTCTCTGTTGAGGTGG GATTTG (서열번호 109)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTGTACTGCTTGAGGA GCTTGT (서열번호 110)
OT19	TGAGCCAGTCCATTCA TTCC (서열번호 111)	TCCCTCCTGTTCTTCT CTTCT (서열번호 112)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TTTGGGACAAGTGTAC AGAGAAC (서열번호 113)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTCTCTCCGAT CTACCTCACCTACAG AGAAGAGA (서열번호 114)

OT20	CCCACAAACCAAGAAC AACA (서열번호 115)	CAGTGTTAAGTGCCCTC TGAGAT (서열번호 116)	ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTCCGATC TCAGAAGGGCGGCATC AG (서열번호 117)	GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTCCGAT CTTTTAGTCTCTGGTT TCCACCT (서열번호 118)
------	-------------------------------------	---	---	--

【표 5】

Digenome-seq에 의하여 포획된 potential off-target 부위에서의 targeted deep sequencing에 사용된 프라이머.

No.	1 <sup>st</sup> PCR		2 <sup>nd</sup> PCR	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
OT1	ATGGAGCTTGCAATTT TAACA (서열번호 119)	CTTTTTTCCCGTGAT CCTCA (서열번호 120)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTATGGAGCTTGCA TTTAAACA (서열번호 121)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGCTGGCTTATT TCATCATTTAG (서열번호 122)
OT2	CAAACTGTCAGTGAG CCAATAC (서열번호 123)	GAAGTGATCCTCCTC TCAATACC (서열번호 124)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCAGGAAGTCAAG CAGGAAGA (서열번호 125)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCATCCATCCAT TCATAACTTTGGA (서열번호 126)
OT3	GTCCAATACTCTAAG CCTCAGTT (서열번호 127)	ACCAGCACCACACTA TCTATTT (서열번호 128)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTATACCTAGTTTG TAGGGTTGTT (서열번호 129)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGCACCACACTA TCTATTTCTGTTAT (서열번호 130)
OT4	ACACTATGATCTTTC CCTGCAA (서열번호 131)	CAGAAACCCTGAAGT CTTGAATTG (서열번호 132)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTCTTCCCTGCA AAGAAGTAAGA (서열번호 133)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGTCATTTGTC CAGAACTGTGT (서열번호 134)
OT5	GGGCAGAAAGGACAG AAACT (서열번호 135)	GGAGAACTGAAACC AGGAGAA (서열번호 136)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCGTAACAGCACC TTGGTCAT (서열번호 137)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCTGAAACCAGG AGAAGTGTAGTC (서열번호 138)

OT6	AGTAGGTGGGAGGGT TCTTAT (서열번호 139)	CACCATCTCTGTGTC TCATCTG (서열번호 140)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAGAAACAGGCAT CTGGAGAAC (서열번호 141)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTTTCAGCATAGT CTTGCTCGTC (서열번호 142)
OT7	TAAGCCTGGCCTGTC TCTT (서열번호 143)	AGAGCAGGACGTGGT GAG (서열번호 144)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTCTCTCCTGGG ACCCT (서열번호 145)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTATACCTAGGAA TGCAGAACAAAG (서열번호 146)
OT8	GGGATTGCACTTAGG TTCTTCT (서열번호 147)	CTATGCGGTCTCTTG TGCTAAT (서열번호 148)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGTCAGGTGGGT AATGATTTCTG (서열번호 149)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCTAATCTGCCT TATGTAATGGGTCT (서열번호 150)
OT9	GACTCCTCTGTGGAA AGAGC (서열번호 151)	AGGACTCCAGTGCTG AGCAC (서열번호 152)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTCCTCTGTGGAA AGAGCCT (서열번호 153)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTACACCGTCTCT CCTTTGTGC (서열번호 154)
OT10	AGGGACCGTATCAGA TATTGTAAATC (서열번호 155)	TCCAATGTATTGCAG CCATCT (서열번호 156)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAATCAATCCTTG TGCAGCTTAATG (서열번호 157)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCAGCCATCTTG CCCTTTGA (서열번호 158)
OT11	CATTGAGGAACCTCA CCTTCTAT (서열번호 159)	ATGAATGTCTTGGA CTGTCCTC (서열번호 160)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGAAGAGGTGTA TTAGGCCATT (서열번호 161)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCCTCTTCTCTC TTGCTTCATCTC (서열번호 162)
OT12	CAAAGCAGCTCCTCT TCCTC (서열번호 163)	CAGTGCCTTTCAGTG AACCT (서열번호 164)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTCTGGGTATAGA GACCATGACA (서열번호 165)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCACAGCCTGAG ATAATGATAGAGAG (서열번호 166)
OT13	GGAGTCGTACCCTGG TTTATTT (서열번호 167)	GAAGCATTGTTCCAC CTAACC (서열번호 168)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGGATAGAAGAT	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTTGCATGTTTGA

			TAGGCAGAGTATG (서열번호 169)	AAGGATGAGC (서열번호 170)
OT14	CTCTCAGACCCTACT CACCTAT (서열번호 171)	CACTGGAAGTACCTG TGGAAG (서열번호 172)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAGACCCTACTCA CCTATATCCTTT (서열번호 173)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTTACCTGTGGAA GCAGGAGA (서열번호 174)
OT15	GGCCATCCTCAAAGA CATGAA (서열번호 175)	TCTCAAACCTCCCGAC CTCA (서열번호 176)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGCATTTCTATTT ATTCATCTCCACAG (서열번호 177)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCTGGGATTACA GGCGTGAG (서열번호 178)
OT16	AGAAGTTTCAGGATG ACAGATCC (서열번호 179)	CAATCCACATCTGGG TGTTTC (서열번호 180)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAGAAGTTTCAGG ATGACAGATCC (서열번호 181)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCAATCCACATC TGCGTGTTTC (서열번호 182)
OT17	TGACTCATTGTGAAT GCCTTTATTC (서열번호 183)	GAGTTGGGTCTCTG CAACT (서열번호 184)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTATAGAGTCTAG ATTAGCAGTAGAGC (서열번호 185)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTAAGCTTATCT GATACATGGATACC (서열번호 186)
OT18	TGCAGCTCTGGACAG GAA (서열번호 187)	GGTGGGTTTCACCAT CCTC (서열번호 188)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGGTGATTCCCT CTGTGG (서열번호 189)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCCATCCTCCTG CCCTCT (서열번호 190)
OT19	GACAGCACTAGGGA TGATGAA (서열번호 191)	GATGGAGCTGCCAA GAAA (서열번호 192)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGGATGATGAAT GGCTGGAT (서열번호 193)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCTTCTCCATGT AGGTGCCTT (서열번호 194)
OT20	CCTGAGAACAAGGAG TGTC AAG (서열번호 195)	CCATGGAATGCCAG ATAGTT (서열번호 196)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGTTGATATCCA GCTTAAGCAATC (서열번호 197)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTTTAAACATCAT TTCTGGCACGTC (서열번호 198)
OT21	AGCTATTGCTGTCAA	TACCCAGTCTCAGGT	ACACTCTTTCCTAC	GTGACTGGAGTTCAG

	TCTCTTACT (서열번호 199)	AGTTCTT (서열번호 200)	ACGACGCTCTCCGA TCTTGCTGTCAATCT CTTACTGTAAC TA (서열번호 201)	ACGTGTGCTCTCCG ATCTTAGCAATGCCA GAACAGACTAA (서열번호 202)
OT22	TGCCACACATCCCAT CATATC (서열번호 203)	CAGCAGACACAGACT CACAA (서열번호 204)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCAACATGAAATG CCAGAGTCAAA (서열번호 205)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCCCATTCAAGT TGCAATCACTATC (서열번호 206)
OT23	TCCTGAAAGAAGGGA TAAGGTAAG (서열번호 207)	TGAGGATGGGTTTCG GTAAAT (서열번호 208)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTATAAGGTAAGCT CAGCCTGTC (서열번호 209)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGTTTCAACATG AAGGCAAGGAG (서열번호 210)
OT24	CAAGAAGGGTGTAG GTTATGAAAG (서열번호 211)	ACAGTCAACCCTTAA GGAAGAG (서열번호 212)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGGTGTAGGTT ATGAAAGTTAAGG (서열번호 213)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTAAGGAAGAGTT GTCTTCACTCG (서열번호 214)
OT25	CTTTCACAGCCAGTC ACAAATAAA (서열번호 215)	CTCACACTCTAGGAA ACAGATGATAG (서열번호 216)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCAATCCACTCAG ACTACAGAGAAA (서열번호 217)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTAGACAGGAGTG TTCTCCAAATC (서열번호 218)
OT26	GTGAGCCAAGATCAC ACCAT (서열번호 219)	CTCTCAGCAAGAAGG CAGATT (서열번호 220)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAGATCACACCAT TGCACTCC (서열번호 221)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGCCAGATCAGT GTCTGCTAAA (서열번호 222)
OT27	GGACACGCTGAGTCA AAGTT (서열번호 223)	CCTTTCCTTCGTGCT GATTGA (서열번호 224)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGCAACCACGTCG ACAATACA (서열번호 225)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGGTGAAGTGA CAAGCAAGTTA (서열번호 226)
OT28	CCCAACAATTCCTTC TTTGAGC (서열번호 227)	TCTGCTATTAGAGGA GGCTAGAA (서열번호 228)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCAATTCCTTCTT TGAGCTCACTAT	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGAGGCTAGAAC AACCTTGGA

			(서열번호 229)	(서열번호 230)
OT29	GGGCAAATCCATAAC CCAGAATA (서열번호 231)	AGGCGATGCATGAGC TTAAA (서열번호 232)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGCAAATCCAT AACCCAGA (서열번호 233)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGTAGTAATCT GGCTACCATCAC (서열번호 234)
OT30	ATTGGCTGGCACACA GTAG (서열번호 235)	CCCAGGATCTAGCAA ACATTCA (서열번호 236)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTGAATGAATGAA GGAAAGAATGGG (서열번호 237)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTGAAAACATTCA TCTTTCGAGCTA (서열번호 238)
OT31	CACCTCTCGCCTTTG ACCTT (서열번호 239)	TGGCTGTGCTCACTT TACTG (서열번호 240)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTAGAGGAGAAAC TGGAGCTTA (서열번호 241)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTACTTACTGCC ACCAGTGC (서열번호 242)
OT32	ATCTTCCACAGGTGC AAATCT (서열번호 243)	TTGCCTATGGCTGCC TTG (서열번호 244)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCTGGTCATTCTC TTCCGTCAA (서열번호 245)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTAACAGTATGGG CCTGAAAAG (서열번호 246)
OT33	CATGTAACCACGACT ACCTCAA (서열번호 247)	CCATGGCTTGACAGCA ATTT (서열번호 248)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGTAACCACGACT ACCTCAAGATATAA (서열번호 249)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCACACAGACGT ACTGTTAAGGA (서열번호 250)
OT34	CTTAGAGGAAAGAGA ACTGGGATTAT (서열번호 251)	AGTGTGGCTGATTAT GGTGATTA (서열번호 252)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCCAAGAGTAGCC TAACCTTACAA (서열번호 253)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCACGTAATTTG CACCTGTAC (서열번호 254)
OT35	TTTCTCTGCCATTCT TCCTCTG (서열번호 255)	GAATGAAGACACGAG GCATTTG (서열번호 256)	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTCTTAGCCCATG TTGCTTCC (서열번호 257)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTTCCAGAATGTA CCTTGCACTTT (서열번호 258)
OT36	TGCTGTCTTTAGTTC CTTCATT	TTAACCCAGCATCAG CTCTC (서열번호	ACACTCTTTCCTAC ACGACGCTCTCCGA	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG

	(서열번호 259)	260)	TCTTGCTGTCTTTAG TTCCTTCATT (서열번호 261)	ATCTTTAACCCAGCA TCAGCTCTC (서열번호 262)
OT37	TTTCCAGAAGAGCCG ACAAG (서열번호 263)	CCAACAACCACCACG ACTAA (서열번호 264)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGGGCCCTTCTGC TTTGAG (서열번호 265)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTAGTCTCCCATG AAGGCTGTA (서열번호 266)
OT38	AAAGTACATAGAGGA CGTGCATAG (서열번호 267)	AGTTCACCACCACCA CAAG (서열번호 268)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTTGCGCAAATACT ACGCCATTC (서열번호 269)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTACAAGTTTGCA CTTGCTTTCA (서열번호 270)
OT39	CACCTGGACCACCAG AAA (서열번호 271)	GCTGTTTGCAAATGC CTCA (서열번호 272)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCACCTGGACCAC CAGAAA (서열번호 273)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTACCATCTCTG CAGACCTTA (서열번호 274)
OT40	CTGATTTCTGAGTT TCTCCCTAA (서열번호 275)	AAGTGTGGGCTGTGC ATAA (서열번호 276)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTCTGTGAAGGGAT TTCAAACCTTCC (서열번호 277)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCGATCAAGGCT AACGTCATCA (서열번호 278)
OT41	CATCTCCTGCTGTGT CATCTT (서열번호 279)	CCAGTCTCGGGTATG TCTTTATT (서열번호 280)	ACACTCTTCCCTAC ACGACGCTCTCCGA TCTGACTGACTTCCA TCTTCCTCAC (서열번호 281)	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTCCG ATCTCAGACTAATAC ATCCGGTCTCATC (서열번호 282)

PAM 서열의 상류 3bp 부위 주위의 돌기는 Cas9 RNP 활성으로 인한 돌연변이로 간주되었다.

### 7. RNA 추출 및 qPCR

5 easy-spin™ Total RNA 추출 키트 (iNtRON, 한국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 NIH3T3 및 ARPE-19 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. Superscript II (Enzymomics, South Korea)를 사용하여 250 ng의 RNA를 역전사시켰다. SYBR Green (KAPA) 및 다음의 프라이머를



사용하여 정량적 PCR (Quantitative PCR; qPCR)을 수행하였다:

mouse *Vegfa*: 5'-ACGTCAGAGAGCAACATCAC-3' (forward; 서열번호 283),  
5'-CTGTCCTTCTTTGGTCTGCATTC-3' (reverse; 서열번호 284);

5 mouse *Gapdh*: 5'-GCTGAGTATGTCGTGGAGTCTA-3' (forward; 서열번호 285),  
5'-GTGGTTCACCCCATCACAA-3' (reverse; 서열번호 286);

human *VEGFA-1*: 5'-CGAGTACATCTTCAAGCCATCC-3' (forward; 서열번호  
287), 5'-GGTGAGGTTTGATCCGCATAAT-3' (reverse; 서열번호 288);

human *VEGFA-2*: 5'-AGAAGGAGGAGGGCAGAAT-3' (forward; 서열번호 289),  
5'-CACAGGATGGCTTGAAGATGTA-3' (reverse; 서열번호 290);

10 human *GAPDH*: 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3' (forward; 서열번호 291),  
5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3' (reverse; 서열번호 292).

#### 8. confluent ARPE-19 세포를 사용한 VEGFA ELISA

15 인간 VEGFA ELISA를 수행하기 위하여, *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 처리된  
confluent ARPE-19 세포를 무혈청 (serum-free) 배지에서 16시간 동안 배양한  
후, 상기 세포 배양물로부터 무혈청 상청액 (supernatant)을 수집하고, 인간  
VEGF Quantikine ELISA Kit (DVE00, R & D systems)를 사용하여 제조사  
지침에 따라 분비된 VEGFA 단백질 수준을 측정하였다.

#### 20 9. 유전체 DNA의 *in vitro* cleavage 및 Digenome sequencing

DNeasy Tissue Kit (Qiagen)을 사용하여 ARPE-19 세포 (ATCC)에서  
유전체 DNA를 분리 하였다. Digenome sequencing을 위하여, 유전체 DNA를  
다음의 방법으로 *in vitro* 절단하였다. 간단히 설명하면, 유전체 DNA  
(20 $\mu$ g)를 Cas9 단백질 (16.7 $\mu$ g) 및 sgRNA (12.5 $\mu$ g)와 함께 반응 완충액 (100  
25 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml BAS, pH 7.9)에서 37 $^{\circ}$ C  
조건으로 3시간 동안 인큐베이션하여 Cas9에 의한 유전체 DNA의 절단이  
일어나도록 하였다. 절단된 유전체 DNA를 RNase A (50 $\mu$ g/ml, Sigma  
Aldrich)로 37  $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하고, DNeasy Tissue Kit (Qiagen)로  
정제하였다. Whole-genome sequencing과 Digenome sequencing은 관련  
30 기술분야에 알려진 방법으로 수행하였다 (Kim, D., Kim, S., Kim, S., Park,  
J. & Kim, J. S. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9  
nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome research* 26, 406-

415 (2016)).

#### 10. RNP가 망막하 주입된 동물의 준비

본 명세서의 실시예에서 사용된 모든 동물의 관리, 사용 및 치료는  
 5 Seoul National University Institutional Animal Care and Use  
 Committee에서 정한 가이드라인 및 'ARVO statement for the Use of Animals  
 in Ophthalmic and Vision Research'을 엄격하게 준수하며 수행하였다. 성체  
 (6 주령) 수컷 SPF C57BL/6J 마우스를 연구에 사용하였다. 마우스는  
 12시간/12시간의 명/암 주기 하에 유지시켰다.

10 상기 준비된 마우스에 대하여 다음의 방법으로 RNP를 망막하  
 주입(Subretinal injections)하였다. 우선, Cas9 단백질 ( $8\mu\text{g}$ ), sgRNA  
 ( $4.5\mu\text{g}$ ) 및 Lipofectamine 2000 (20%(v/v))으로 구성된 RNP를  $2\mu\text{l}$  또는  $3\mu\text{l}$   
 (injection volume)가 되도록 혼합하였다. 상기 준비된 RNP ( $2\mu\text{l}$  또는  
 30  $3\mu\text{l}$ )를 수술 현미경 (Leica Microsystems Ltd.) 하에서 33G 무딘 바늘 (World  
 Precision Instruments Inc.)이 장착된 Nanofil 주사기를 사용하여 마우스의  
 망막 밑 공간(subretinal space)에 주사하였다. 망막 출혈이 있는 마우스  
 개체는 시험에서 제외시켰다.

#### 11. 레이저 유도 맥락막 혈관신생 (Laser-induced choroidal 20 neovascularization; CNV) 동물 모델 제작

tiletamine과 zolazepam를 1:1의 중량비로 혼합한 혼합물을 2.25  
 mg/kg(체중)의 양으로 복강내 주사하여 마우스를 마취시켰다. phenylephrine  
 (0.5%(w/v))과 tropicamide (0.5%(w/v))가 포함된 점안액으로 마우스의  
 동공을 확장시켰다. Indirect head set delivery system (Iridex)과 레이저  
 25 시스템 (Ilooda)을 사용하여 레이저 광응고(Laser photocoagulation)를  
 수행하였다. 레이저 파장은 532 nm로 하였다. 레이저 매개 변수(Laser  
 parameters)는 다음과 같다: 스팟 크기:  $200\mu\text{m}$ , 전력: 1W, 및 노출 시간:  
 100ms. 변형된 시신경 원반(optic disc) 주위의 12시 위치 (우안) 또는 6시  
 위치 (왼쪽 눈)에 레이저 화상(laser burn)을 유도시켰다. 유리체  
 30 출혈(vitreous hemorrhage)이 없는 거품을 발생시킨 레이저 화상만을 시험  
 대상에 포함시켰다. 레이저 화상의 사분면에서 RNP의 망막하 주입을  
 시행하였다. Cas9 RNP (sgRosa26 (Rosa26 targeting sgRNA 포함) 또는

sgVegfa (Vegfa targeting sgRNA 포함))는 각 마우스의 왼쪽 눈 또는 오른쪽 눈에 무작위로 할당하였다. Cas9 RNP의 망막하 주사에 의하여 물집(bleb)이 만들어졌다. 이 물집이 레이저 화상 부위와 중첩되었음을 확인하였다. 물집이 레이저 화상 부위와 중첩된 개체를 이후 시험에 사용하였다. 레이저

5 처리 7일 후, 안구를 실온에서 1시간 동안 4%(w/v) PFA(paraformaldehyde)에서 고정시켰다. RPE (retinal pigment epithelium) 복합체 (RPE/맥락막/공막)을 isolectin-B4 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. I21413, 1:100)으로 4°C에서 밤새 처리하여 면역 염색시켰다. 염색된 RPE 복합체를 형광현미경(Eclipse 90i, Nikon)에 편평하게 올려놓고 x40

10 배율로 관찰하였다. CNV 면적은 blind observer가 Image J 소프트웨어 (1.47v, NIH)를 사용하여 측정하였다.

## 12. 면역 형광 염색 및 이미징

RPE 복합체 중의 RPE 세포수를 고배율 필드 영역 (high power field

15 area) ( $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ , n=8)에서 파라핀에 삽입된 단편 시료(cross section sample,  $4\mu\text{m}$ ) 내의 DAPI 염색된 핵을 계수하여 산정하였다. 주사 후 7 일째에 얻은 단편 시료(n=4)를 anti-opsin 항체 (Millipore, AB5405, 1:1000)와 Alexa Fluor 488 항체 (Thermo Fisher Scientific, 1:500)로 면역염색하였다. opsin positive 영역은 blind observer가 Image J

20 소프트웨어 (1.47v, NIH)를 사용하여 측정하였다. 공초점현미경(LSM 710, Carl Zeiss)을 사용하여 RPE flat-mount에서의 Cy3-Cas9 단백질의 세포 내 분포를 이미징하였다. 스캐닝 파라미터는 다음과 같다: scaling ( $x=0.042\mu\text{m}/\text{pixel}$ ,  $y=0.042\mu\text{m}/\text{pixel}$ ,  $z=0.603\mu\text{m}/\text{pixel}$ ), dimensions ( $x=1024$ ,  $y=1024$ ,  $z=12$ , channels: 2, 8-bit), and zoom (5.0) with objective C-

25 Apochromat 40x/1.20W Korr M27. ZEN 2 소프트웨어를 사용하여 이미지를 처리하였다.

## 13. CNV 영역 및 RPE 복합체로부터 유전체 DNA 추출

RNP를 주사하고 3 일째에 RPE 복합체로부터 유전체 DNA를 분리하고,

30 CNV 면적 측정 후 RNP를 주사하고 7 일째 CNV 시료로부터 유전체 DNA를 분리하였으며, 유전체 DNA 분리는 NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 수행하였다. RNP 효능을 평가하기 위해, 각 RPE 복합체를 4

사분면으로 분할하고, RNP가 주입된 사분면을 처리하여 유전체 DNA를 분리하였다. CNV 영역의 RPE 복합체에서의 indel 빈도를 평가하기 위해, RPE flat-mount를 이미징한 후 PBS로 세척하였다. 유전체 DNA는 다음의 두 개 영역으로부터 분리하였다: (i) CNV의 RNP 주입 영역을 포함하는 사분면 (주입 부위를 대표함); 및 (ii) 반대 사분면 (opposite quadrant; 비주입 부위를 대표함).

#### 14. 마우스 VEGF-A ELISA

마우스 VEGF-A ELISA의 경우, 안구에 총 30 개의 레이저 화상을 유발시킨 후, RNP (3 $\mu$ l)를 망막하 공간(subretinal space)에 주사하였다. 주사 후 3 일째, 전체 RPE 복합체를 망막으로부터 분리하고, 추가 분석을 위해 동결시켰다. RIPA 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0.5% Na.deoxycholate, 0.1% SDS)으로 세포를 용해시키고, 마우스 VEGF Quantikine ELISA Kit (MMV00, R & D systems)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 VEGF-A 수준을 측정 하였다.

#### 15. 웨스턴 블라팅(Western blotting)

RNP의 생체내 전달 후 시간 경과에 따른 RNP 수준을 분석하기 위해, 주사 후 1 일 및 3 일에 얻은 RPE 복합체에 대하여 웨스턴 블라팅을 수행 하였다. 동량의 단백질 (20 $\mu$ g)을 함유한 시료를 분석하였으며; Cas9와 액틴은 각각 항-HA 고친화성 항체 (Roche, 1:1000) 및 항- $\beta$ -액틴 항체 (Sigma Aldrich, 1:1000)를 사용하여 검출하였다. ImageQuant LAS4000 (GE healthcare)를 사용하여 디지털 이미징하였다.

#### 16. 통계처리

데이터 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였다. P value는 unpaired, two sided Student's t-test 또는 one-way ANOVA 및 Tukey post-hoc test (다수의 시험군의 경우)에 의해 결정하였다. 데이터는 s.e.m (standard error of the mean)과 함께 평균값으로 표시하였다.

**실시예 1: Cas9 ribonucleoproteins (RNPs)를 통한 Vegfa/VEGFA**

**유전자의 표적 돌연변이 유발**

마우스 NIH3T3 및 인간 망막 색소 상피 세포주 ARPE-19 에서, VEGF 수용체 1 및 2 에 대한 결합 부위를 암호화하는 Vegfa 유전자의 엑손 3 과 엑손 4 에서 표적 부위를 타겟팅하는 4 개의 단일 사슬 가이드 RNAs (sgRNAs) (Vegfa-1, 2, 3 및 4 로 표시)를 시험하였다. 상기 4 종의 sgRNA (Vegfa-1, 2, 3 및 4)는 참고예 1 을 참조하여 제작하였다.

VEGFA/Vegfa 유전자 내의 CRISPR-Cas9 의 표적 서열(target sequence)을 타겟팅하는 sgRNA 의 표적화 서열(targeting sequence) 및 인간 유전체와 마우스 유전체에서의 homologous site 개수를 아래의 표 6 에 정리하였다:

**【표 6】**

Target	sgRNA with PAM (5' to 3')	Position	Direction	Number of mismatches at homologous sites*		
				0	1	2
<i>Vegfa-1</i>						
human	CTCCTGGAAGATGTCCACCAGG (서열번호 293)	Exon 3	-	1	0	1
mouse				1	0	1
<i>Vegfa-2</i>						
human	AGTCATCTCTCCTATGTGCTGG (서열번호 294)	Exon 4	-	1	0	1
mouse				1	0	3
<i>Vegfa-3</i>						
human	GACCCTGGTGGACATCTCCAGG (서열번호 295)	Exon 3	+	1	0	0
mouse				1	0	1
<i>Vegfa-4</i>						
human	ACTCCTGGAAGATGTCCACCAGG (서열번호 296)	Exon 3	-	1	0	1
mouse				1	0	0

(\* Determined using Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>));

밑줄: PAM 서열)

상기한 바와 같이 제조된 sgRNA 를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 를 마우스 NIH3T3 세포 및 인간 ARPE-19 세포에 각각 도입 (transfection)하여 하기의 시험을 진행하였다. 상기 RNP 의 세포 내로의 도입은, 참조예 3 에

기재된 바와 같이, 플라스미드를 통하여 세포 내에 전달된 핵산 분자가 세포 내에서 sgRNA 와 Cas9 단백질을 발현하도록 하는 방식 (도면에서 plasmid 로 표시)으로 수행하거나, 미리 sgRNA 와 재조합 Cas9 단백질의 복합체(또는 혼합물)를 양이온성 지질 (Lipofectamine)을 사용하여 세포 내로 도입시키는 방식(도면에서 RNP 로 표시)으로 수행하였다.

마우스 NIH3T3 세포와 인간 ARPE-19 세포의 Vegfa/VEGFA 유전자좌의 표적 부위 서열을 도 1a 에 나타내었다 (PAM 서열: 파란색); sgRNA 표적 서열: 청색).

형질감염 2 일 후에 Targeted deep sequencing (참고예 6 참조)을 수행하여, 상기 제조된 4 종의 sgRNA (Vegfa-1 sgRNA, Vegfa-2 sgRNA, Vegfa-3 sgRNA, 및 Vegfa-4 sgRNA)를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의해 유발되는 NIH3T3 세포에서의 돌연변이 빈도를 측정하여, 그 결과를 도 1h 에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=3), One-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

또한, T7 엔도뉴클레아제 1(T7E1) 분석 (참고예 5 참조)을 수행하여, NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 Vegfa-1 sgRNA 를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의하여 유도된 돌연변이를 검출하여, 도 1b 에 나타내었다. 도 1b 에서 화살표는 T7E1 에 의해 절단된 DNA 밴드의 예상 위치를 나타낸다.

또한, 형질감염 2 일 후에 Targeted deep sequencing (참고예 6 참조)을 수행하여, NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 Vegfa-1 sgRNA 를 포함하는 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 또는 이들의 암호화 서열을 포함하는 플라스미드의 도입에 의하여 유도된 돌연변이 빈도를 측정하여, 그 결과를 도 1c 에 나타내었다 (error bar: s.e.m (n=3); One-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

NIH3T3 및 ARPE-19 세포에서 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP(*Vegfa*-1 sgRNA 포함)에 의하여 유도되는 대표적인 Vegfa/VEGFA 유전자좌에서의 돌연변이 DNA 서열을 도 1d 에 나타내었다 (밑줄: sgRNA 가 타겟팅 하는 표적 서열, 파란색: 삽입된 뉴클레오타이드, -: 결실 부위, WT: 야생형; 삼각형: 절단 위치; 오른쪽 수치: 삽입 또는 결실된 뉴클레오타이드 수).

또한, 형질감염 64시간 후에 targeted deep sequencing (참고예 6

참조)을 수행하여, confluent ARPE-19 세포에서 Vegfa-1 sgRNA를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP의 도입에 의하여 유도되는 돌연변이(indel) 빈도를 측정하였으며, 그 결과를 도 1e에 나타내었다. 또한, 정량적 PCR (qPCR) (참고예 7 참조)을 수행하여 측정된 상기 세포에서의 VEGFA mRNA의 상대적 수준을 도 1f에 나타내었으며, 참고예 8을 참조하여 VEGFA ELISA를 수행하여 측정된 상기 세포에서의 VEGFA 단백질 수준을 도 2g에 나타내었다 (Error bar: s.e.m. (n = 5), Student's t-test, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

도 1h에 나타난 바와 같이, 4종의 sgRNA 중 Vegfa-1 sgRNA가 Cas9와 복합체를 형성하여 RNP 형태로 세포내에 도입되는 경우에 NIH3T3 세포에서 가장 높은 indel 효율을 나타냈다. 또한, 도 1b 및 1c에 나타난 바와 같이, indel 효율이 가장 높은 Vegfa-1 sgRNA는 NIH3T3 세포 및 ARPE-19 세포에서 돌연변이를 유발하며, 특히 RNP 형태로 도입시  $82 \pm 5\%$  (NIH3T3 세포) 또는  $57 \pm 3\%$  (ARPE-19 세포)의 빈도로 표적 부위에서 작은 삽입 및 결실(indels)을 유도하는 것이 확인되었다. sgRNA와 Cas9가 RNP 형태로 전달되는 경우, 플라스미드를 통한 형질 감염보다 indel 효율이 높게 나타났다 (도 1c).

도 1e에서와 같이, Vegfa-specific Cas9 RNP 처리시, ARPE-19 세포에서의 돌연변이(indel)는  $40 \pm 8\%$ 의 빈도로 검출되었으며, 도 1f 및 1g에서와 같이, Vegfa-specific Cas9 RNP는 post-mitotic condition 하에서 confluent ARPE-19 세포에서의 VEGFA mRNA 수준과 VEGF 단백질 수준을 각각  $24 \pm 4\%$  (mRNA 수준) 및  $52 \pm 9\%$  (단백질 수준)의 감소폭으로 감소시켰다.

### 실시예 2: Cy3-labeled Cas9 RNP의 *In vitro* 및 *in vivo* 전달

*in vitro* 및 *in vivo*에서의 Cas9 RNP의 위치를 모니터링하기 위하여, Cy3가 접합된 Cas9 단백질(참고예 4)을 사용하였으며, Vegfa-1 sgRNA와 결합되거나 결합되지 않은 Cy3-Cas9를 양이온성 지질과 혼합하여 NIH3T3 세포에 형질 감염시키거나, 망막하 주사를 통하여 Vegfa 특이적 Cy3 표지 또는 비표지 Cas9 RNP를 성체 마우스 안구에 주입하여 하기의 시험을 수행하였다.

Cy3 표지된 Cas9 RNP (Cy3 표지된 Cas9 및 Vegfa-1 sgRNA 복합체) 또는 Cy3 표지된 Cas9 단독 (대조군)으로 형질 감염시키고 24시간 후에 NIH3T3 세포를 공초점 현미경으로 관찰하여 세포 내 Cy3 신호의 위치를

이미징하였다 (참고예 4 참조). 상기 얻어진 이미지를 도 2a에 나타내었다. 도 2a에서, 흰색 화살표는 Cy3 염료의 핵 co-localization을 보여주고, 오른쪽의 z 축 이미지는 Cy3 표지된 Cas9가 핵 내부에 위치함을 보여준다.

또한, 상기 형질 감염 24 시간 후에, 총 DAPI 양성 핵 개수에 대한  
5 Cy3 양성 핵 개수의 비율 ( $100 \times [\text{Cy3 양성 핵 개수}] / [\text{총 DAPI 양성 핵 개수}]$ )을 측정하여, 도 2b에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=3), Student's t-test, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

또한, 상기 형질 감염 24 시간 후에, T7 엔도뉴클레아제 1(T7E1) 분석  
(참고예 5 참조)을 수행하여, NIH3T3 세포에서 Vegfa-1 sgRNA 를 포함하는  
10 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 의 도입에 의하여 유도된 돌연변이를 검출하여, 도 2c 에 나타내었다. 도 2c 에서 화살표는 T7E1 에 의해 절단된 DNA 밴드의 예상 위치를 나타낸다.

또한, 상기 형질 감염 24 시간 후에, Targeted deep sequencing  
(참고예 6 참조)을 수행하여, NIH3T3 세포에서 Vegfa-1 sgRNA 를 포함하는  
15 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 의 도입에 의하여 유도된 돌연변이 빈도를 측정하여, 그 결과를 도 2d 에 나타내었다 (error bar: s.e.m (n=3); One-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Cy3 표지된 Cas9 RNP 를 마우스 눈에 주사 한 후 3 일째에,  
대표적으로 선택된 RPE flat-mount 를 형광 현미경으로 관찰하여 (참고예 11  
20 및 12 참조), 그 결과를 도 2e 에 나타내었다. 도 2e 에서, 흰색 화살표는 Cy3 염료의 핵 co-localization 을 나타낸다.

망막 색소 상피세포 (RPE)/맥락막/공막 복합체(RPE/choroid/scleral complex) 중의 망막 색소 상피세포 (RPE)의 분포를 형광 현미경으로 관찰하여  
(참고예 11 및 12 참조), 그 결과를 도 2h 에 나타내었다. 도 2h 는  
25 RPE/맥락막/공막 복합체의 대표적인 단면도를 보여준다. DAPI 양성 RPE 세포 및 다른 세포는 고배율 필드 영역 ( $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ )에서 계수되었다. 도 2h 의 노란색 선은 RPE 와 맥락막 사이의 경계를 표시하는 것이며, 백색 화살표는 RPE/맥락막/공막 복합체 중의 RPE 핵 ( $10.5 \pm 2.8\%$ , n=8)을 나타낸다.

참고예 13 을 참조하여, 망막 색소 상피세포 (RPE)/맥락막/공막  
30 복합체(RPE/choroid/scleral complex)로부터 분리된 유전체 DNA 를 사용하여, 생체 내에서 유도된 indels 의 빈도를 결정 하였다. Indels 빈도는 주사 후 3 일째에 Targeted deep sequencing (참고예 6 참조)을 수행하여 분석 하였다.



얻어진 결과를 도 2f 에 나타내었다 (Error bars are s.e.m. (n=6), Student's t-test, \*\*  $P < 0.01$ ).

생체 내에서 Vegfa-특이적 Cas9 RNP (Vegfa-1 sgRNA 포함)에 의하여 유도되는 돌연변이 DNA 서열을 도 5 에 나타내었다. 도 5 에서, a 는 주사 3 일 후에 RPE 에서 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 에 의하여 유도되는 대표적인 돌연변이 DNA 서열을 보여주고, b 는 주사 7 일 후에 레이저 유도 맥락막 혈관 신생 (laser-induced choroidal neovascularization (CNV))을 갖는 RPE 에서의 돌연변이 DNA 서열을 보여준다. PAM 서열은 붉은 색으로 나타내고, WT 는 야생형을 의미하며, 오른쪽 수치는 삽입되거나 결실된 뉴클레오타이드 개수를 나타낸다.

웨스턴 블라팅을 수행하여 (참고예 15), 주사 후 24 시간 및 72 시간째에 RPE/맥락막/공막 복합체에서의 Cas9 단백질의 수준을 측정하였으며 (n=4), 그 결과를 도 2g 및 도 2i 에 나타내었다.

도 2a 내지 2d는 in vitro 결과를 보여준다. 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, Cy3-Cas9 RNP는 다수의 핵에서 검출되며, 도 2c 및 2d에 나타난 바와 같이, 표적 부위에서 indel을 유도하는 것이 확인되었다.

Cy3-Cas9 RNP 처리시의 Cy3 양성 핵의 비율 ( $42 \pm 6\%$ ) (도 2b)은 표적 부위에서 indel 빈도 ( $40 \pm 3\%$ ) (도 2d)와 거의 유사하게 나타났으며, 이러한 결과는 핵에 위치한 Cas9에 의하여 세포 내에서 표적 부위가 거의 완전하게 절단되며, 이러한 유전체 교정에 있어서의 rate limiting factor가 Cas9의 핵 위치화라는 것을 의미한다. 한편, Cy3-Cas9가 sgRNA 없이 단독으로 도입된 경우, 핵에서 거의 검출되지 않고 indels을 유도하지 않았다 (도 2a 및 2d). Cas9는 pI 값이 9.12 인 양전하를 띠는 단백질이며 음전하를 띠는 sgRNA가 없을 때 양이온성 지질과 복합체를 형성할 수 없다. Cy3-Cas9 RNP는 Cy3 표지되지 않은 Cas9 RNP보다 활성이 낮았으며, 표지되지 않은 Cas9 RNP는 80%의 빈도로 표적 특이적 돌연변이를 유도했다 (도 2d).

도 2e 내지 2g 및 도 102 내지 도 104 는 in vivo 결과를 보여준다. Cy3-Cas9 RNP 주사 3 일 후에, Cy3 형광 신호가 망막 색소 상피세포 (RPE)의 핵에서 관찰되었다 (in vivo, 도 2e). RPE 는 망막하 주사에 의한 RNP 전달의 주요 표적이기 때문에, RPE 세포 단독으로도 돌연변이 빈도를 이상적으로 분석 가능하다. 그러나 실제로는 targeted deep sequencing 을 위해, RPE/맥락막/공막 복합체로부터 RPE 세포를 분류하는 것이 쉽지 않다.

대신, DAPI 양성 핵을 계산하여 RPE 세포의 비율을 계산하였으며, RPE 세포는 RPE/맥락막/공막 복합체의 세포들 중  $11 \pm 3\%$ 를 차지하였다 (도 2h). 특히, Cy3-비표지 Cas9 RNP 의 망막하 주사는 주사 후 3 일째에 indel 을  $16 \pm 2\%$ 의 빈도로 유발했으며, 생체 내 RPE 세포의 Vegfa 유전자의 표적 부위의 대부분에서 교정이 일어났다 (n=6, 도 2f 및 도 5 의 a). 또한, 웨스턴 블라팅 분석을 통하여, Cas9 단백질이 주입 후 3 일째에 완전히 분해됨을 확인하였으며 (그림 2g 및 2i), 이는 Cas9 가 생체 내에서 빠르게 전환됨을 보여준다.

### 10 실시예 3: Vegfa를 표적으로 하는 Cas9 RNP의 망막하 주사의 노인성 황반변성(AMD) 및 레이저 유발 맥락막 혈관 신생 (CNV)에 대한 효과 시험

Cas9 RNP가 AMD 마우스 모델에서 CNV의 치료에 사용될 수 있는지 조사하기 위하여, 레이저로 유도된 맥락막 혈관 신생 (laser-induced CNV)을 갖는 마우스에 Vegfa 특이적 Cas9 RNP (Vegfa-specific Cas9 RNP; Vegfa-1 sgRNA 포함) 또는 Rosa26 특이적 Cas9 RNP (Rosa26-RNP; Rosa26 sgRNA 포함)를 망막하 주사하여 아래의 시험을 수행하였다. 망막하 주사는 그 자체로 CNV의 크기를 증가시키기 때문에, Rosa26-RNP를 대조군으로 사용하였다.

laser-induced CNV를 갖는 마우스에 미리 조립된 Vegfa-특이적인 Cas9 RNP를 망막하 주사로 투여하였다. 주사 후 7 일째에, 안구 안의 망막 색소 상피세포 (RPE) 복합체를 flat-mounting하고, CNV 영역을 분석 하였다. Cas9 RNP 주입 영역 또는 반대쪽 비 주사 영역 (RNP가 없는 영역)에서 분리된 유전체 DNA를 targeted deep sequencing으로 분석하였다. Vegfa ELISA는 주사 후 3 일째에 수행하였다. 상기 시험 과정을 도 3a에 모식적으로 나타내었다.

주사 후 7 일째, Rosa26-특이성 Cas9 RNP (대조군) 또는 Vegfa-특이성 Cas9 RNP를 주사한 C57BL/6J 마우스에서 isolectin B4(IB4)로 염색된 laser-induced CNV를 가시화하여 (참고예 11 참조), 얻어진 대표적 이미지를 도 3b에 나타내었다. 도 3b에서 노란색 선은 CNV 영역을 구분한다.

주사 후 7 일째, CNV 면적을 평가하여 치료 효과를 평가 하였다. 참고예 11을 참조하여, Vegfa- 특이성 Cas9 RNP를 주사한 C57BL/6J 마우스에서의 CNV 면적을 측정하여, Rosa26-특이성 Cas9 RNP 주사한 대조군의

CNV 면적 (100%)에 대한 상대값(%)으로 도 3c에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=15), Student's t-test, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

CNV 영역에서의 Vegfa 수준 (pg/ml)을 ELISA로 측정하여 (참고예 14 참조), 그 결과를 도 3d에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=10),  
5 Student's t-test, \*\*  $P < 0.01$ ).

RPE 복합체 내의 Vegfa 표적 부위에서의 Indel 빈도(%)를 도 3e에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=7), One-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

RPE 복합체 내의 Rosa26 표적 부위에서의 Indel 빈도(%)를 도 3f에  
10 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=7), Student's t-test, \*  $P < 0.05$ ).

hematoxylin & eosin 염색으로 시료 단면(cross section)의 Laser-induced CNV 구조를 가시화하여 도 3g에 나타내었다. 도 3g에서, 노란색 선은 CNV 경계를 나타내며, 흰색 삼각형은 RPE/맥락막/공막 복합체 중의 망막 색소 상피세포 (RPE) 층을 나타낸다. 대부분의 RPE 세포는 CNV 영역에서  
15 손상을 입은 것을 확인할 수 있다 (Ch: 맥락막, R: 망막, S: 공막).

targeted deep sequencing를 통한 돌연변이 분석에 사용하기 위한 대표적인 CNV 시료를 도 3h에 나타내었다. 도 3h에서, 빨간 선은 돌연변이 분석을 위한 RPE/맥락막/공막 복합체의 경계를 나타낸다. RPE 세포는 노란색  
20 선으로 표시된 CNV 영역 외부에 주로 존재하였다.

레이저 처리 후 7일째의 Laser-induced CNV를 도 3i에 나타내었다. IB4 마커와 DAPI로 공동 염색된 내피 세포를 CNV 영역으로 모집하였다 (가운데).

도 3b 및 3c 에 나타난 바와 같이, Rosa26-RNP 를 주입한 마우스와  
25 비교하여, Vegfa-RNP 를 주입한 한 마우스에서 CNV 면적이 유의하게 감소했다 (Rosa26-RNP 주입 마우스 대비  $58 \pm 4\%$ ,  $n = 15$ ,  $P < 0.001$ , Student's t-test).

또한, 도 3d 에서 보여지는 바와 같이, Vegfa-specific Cas9 RNP 주입시, CNV 영역에서의 Vegfa 단백질의 농도가  $300 \pm 20\text{pg/ml}$  (n=10)로,  
30 Rosa26-RNP 주입시 ( $440 \pm 30\text{pg/ml}$ , n=10)와 비교하여 CNV 영역에서 Vegfa 단백질의 농도를 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있다.

또한, 도 3e 및 3f 에 나타난 바와 같이, Vegfa-specific Cas9 RNP 처리된 CNV 및 Rosa26-RNP 처리된 CNV 에서의 각각의 RNP 의 표적 부위(도 5 의 b 참조)에서의 indel 빈도가 각각  $3.5 \pm 0.3\%$  (Vegfa indel) 및  $3.3 \pm 1.0\%$  (Rosa26 indel)의 빈도로 검출된 반면, 음성 대조군에서는 indel 이 전혀 검출되지 않았다. 이러한 결과는 Vegfa-specific Cas9 RNP 의 망막하 주사에 의하여 크기가 작은 마우스 눈에서도 국소적 치료가 가능함을 보여준다.

한편, 도 3g 에 보여지는 바와 같이, CNV 내의 대부분의 RPE 세포는 레이저 처리에 의해 사멸하였다. 죽은 세포에서는 Cas9 RNP 에 의한 유전자 교정이 일어나지 않고, 살아있는 RPE 세포에서만 유전자 교정이 일어났으며 (도 3h), 그 결과, CNV 가 없는 영역의 세포와 비교하여, 살아있는 RPE 세포에서의 indel 빈도가 더 낮다. 또한, 레이저 치료 후 3 일째에, 내피 세포가 CNV 영역으로 모이고 새로운 혈관이 형성됨을 확인하였다 (도 3i). 이 세포는 유전자 교정되지 않아서 CNV 영역에서의 indel 빈도는 더욱 감소한다. 이러한 결과는 Cas9 RNPs 를 이용한 눈에서의 Vegfa 의 불활성화가 AMD 또는 당뇨병성 망막증과 같은 안구 질환의 효과적인 치료를 위한 치료적 유전체 교정 (therapeutic genome surgery)을 가능하게 함을 시사한다.

치료적 유전체 교정에서의 중요한 문제는 CRISPR-Cas9 뉴클레아제의 표적 특이성이다. 본 실험에 사용된 Vegfa-specific Cas9 RNP 가 마우스 눈 또는 사람 세포에서 off-target 돌연변이를 일으켰는지 여부를 조사하였다. 먼저, Cas-OFFinder 를 사용하여, 마우스 유전체에서 Cas9 RNP 의 Vegfa-1 sgRNA 의 표적 서열과 상동성이 가장 높은 20 개의 잠재적인 off-target 부위를 확인하여, 아래의 표 7 에 정리하였다:

【표 7】

Potential off-target sites of the Vegfa-1 sgRNA (with PAM) in the mouse genome

No.	Gene		Sequence	Chromosome	Position	Direction
On	<i>Vegfa</i>	Exon	CTCCTGGAAGATGCCACCAGGG (서열번호 293)	chr17	46025487	-
OT1	Intergenic region	-	CTCCTGGAAGATTTTCACCAGGG (서열번호 297)	chr2	123023449	-
OT2	<i>Arhgef7</i>	Intron	CTCCTGGAAGATCTCCAGGAAGG (서열번호 298)	chr8	11735358	-

OT3	<i>Gsc</i>	Exon	CTCCTGGAAGAGGTTCTCCAGGG (서열번호 299)	chr12	104472064	+
OT4	<i>Ptpm2</i>	Exon	CTCTGGCAGATGTCCACAAGGG (서열번호 300)	chr12	116842612	+
OT5	<i>Gpr139</i>	Intron	CTCCTGGAAGCTGCCCATCATGG (서열번호 301)	chr7	119178456	-
OT6	<i>Kank4</i>	Intron	CTCCTGGAATAATGCCACCCTGG (서열번호 302)	chr4	98816689	+
OT7	<i>Stk32b</i>	Intron	CTCCTGGAAGATGTGGGCCATGG (서열번호 303)	chr5	37675822	-
OT8	<i>Ptpn11</i>	Intron	CTCCTGAAAGCTGACCACCACGG (서열번호 304)	chr5	121146230	+
OT9	<i>Acad12</i>	Intron	CACATGGAGGATGTCCACCATGG (서열번호 305)	chr5	121606239	+
OT10	Intergenic region	-	CTCCTGGAAGCTGTGACCAGGG (서열번호 306)	chr5	138824186	+
OT11	Intergenic region	-	CTCCTGGAAGAGGACAACCAAGG (서열번호 307)	chr13	44510080	-
OT12	<i>Fibp</i>	Exon	CTGCTGGATGTGTGCCACCAGGG (서열번호 308)	chr19	5462580	-
OT13	Intergenic region	-	CTCCTGGAAGTGTCTCCTTGG (서열번호 309)	chr15	87360502	-
OT14	Intergenic region	-	CCCCTGGAAGATTTCCATCAAGG (서열번호 310)	chr17	37793411	+
OT15	Intergenic region	-	CTCTGGCAGCTGTCCACCATGG (서열번호 311)	chr10	24365585	-
OT16	Intergenic region	-	CTCCAAGAAGATGTCTCCATGG (서열번호 312)	chr10	55869098	-
OT17	<i>Fam180a</i>	Exon	CTCCTGGAAGATGTCTGGAAGG (서열번호 313)	chr6	35325901	-
OT18	<i>Rasgrf1</i>	Exon	CTCCTGGTAGATGTCAGCATGG (서열번호 314)	chr9	89970376	-
OT19	<i>Abca13</i>	Intron	GTCCTGGAAGCTGCCACAAAGG (서열번호 315)	chr11	9509771	+
OT20	<i>C130046K22Rik</i>	Intron	CTCAGTGAAGATGTCCACCAAGG (서열번호 316)	chr11	103713336	+

Cas9 RNP 로 처리된 마우스 눈의 CNV-free RPE 복합체로부터 유전체 DNA 를 분리하여 targeted deep sequencing 을 수행하여, 상기 20 개의 잠재적 off-target 부위에서의 indel 빈도(%)를 구하여 도 6 에 나타내었다 (Error bars indicate s.e.m. (n=3 for Cas9 Mock, n=5 for Cas9 RNP, respectively)).

5 도 6 에서 Mismatched nucleotide 는 붉은 색으로, PAM 서열은 파란색으로 각각 나타내었다. 도 6 에서 보여지는 바와 같이, Cas9 RNP 이 처리된 경우, 20 개의 잠재적 off-target 부위 모두에서 indel 빈도가 0.1%을 넘지 않았으므로, off-target 돌연변이 비율이 시퀀싱 오류 비율 (sequencing error rate; 평균 0.1%)을 넘지 않음이 입증되었다. 즉, 본 시험에서 사용된

10 Vegfa-specific Cas9 RNP 는 RPE 에서 off-target effect 를 나타내지 않음이 확인되었다.

#### 실시예 4: 인간 유전체에서의 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP의 전장 유전체 표적 특이성(Genome-wide target specificity) 시험

15 인간 유전체에서의 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP의 전장 유전체 표적 특이성(Genome-wide target specificity)을 Digenome-seq로 확인하였다 (참고예 6 및 9 참조).

도 4a는 in vitro 절단 부위를 보여주는 Genome-wide Circos plot으로, 인간 유전체 DNA는 붉은 색으로, RGEN-digested 유전체 DNA는 파란색으로

20 표시되어 있다.

41 개의 Digenome-capture site (표 5 참조) 및 On-target 서열을 포함한 42개 서열의 Sequence logo를 도 4b에 나타내었다.

targeted deep sequencing에 의해 인간 ARPE-19 세포에서 확인된 off-target 부위 및 indel 빈도를 도 4c에 나타내었다. 도 4c에서, mismatched

25 뉴클레오타이드는 붉은색으로, PAM 서열은 파란색으로 각각 나타내었다.

도 4a 및 4b 에 나타난 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 의 특정 표적 서열은 인간 VEGFA 유전자에서 잘 보존되어 있다.

Digenome-seq (Kim et al., Nature Methods 12, 237-243 (2015))을 사용하여 전장 유전체 특이성을 확인하였으며, 이 때, 시험관 내에서 (in

30 vitro) 무세포 인간 유전체 DNA (cell-free human genomic DNA)에 *Vegfa*-특이적 Cas9 RNP 를 처리한 후 전체 유전체 시퀀싱을 수행하였다. In vitro 절단 부위에서의 sequence leads 은 무작위로 정렬하기보다는 균일하게

정렬하는 것으로 계산적으로 확인되었고, 이를 통하여 잠재적 off-target 부위의 리스트를 얻었다. 이와 같이 Digenome-seq 를 사용하여 얻어진 on target 부위를 포함한 Vegfa-specific Cas9 RNP 의 42 개의 in vitro 절단 부위를 아래의 표 8에 정리하였다:

5

【표 8】

*In vitro* cleavage sites in the human genome identified by Digenome-seq using the VEGFA sgRNA

No.	Gene		Sequence	Chromosome	Position	Direction
On	<i>VEGFA</i>	Exon	CTCCTGGAAGATGTCCACCAGGG (서열번호 293)	chr6	43745263	-
OT1	<i>NAALADL2</i>	Intron	ATCCTGTAAGACATCCACCCTGG (서열번호 317)	chr3	174605831	-
OT2	Intergenic region	-	TTGCTGGAAGATGTCCCCCTGG (서열번호 318)	chr12	28147929	-
OT3	<i>CPNE4</i>	Intron	TACCTGGAAGAATTCACCACGG (서열번호 319)	chr3	131485198	-
OT4	<i>ABTB2</i>	Intron	GCCTGGGAAGATGTCCACCAGGG (서열번호 320)	chr11	34241888	-
OT5	<i>ARFGEF3</i>	Intron	TTCCAGGAAGAAATCCACCATGG (서열번호 321)	chr6	138531951	-
OT6	Intergenic region	-	ACAATAGAAGAAGTCCACCATGG (서열번호 322)	chr5	21242334	+
OT7	<i>BAIAP2-AS1</i>	Exon	CTCCAGGAAGTTCTCCACCAAGG (서열번호 323)	chr17	79006487	-
OT8	<i>HOMER1</i>	Intron	AATTAATAAGATGTCCACCTACG (서열번호 324)	chr5	78719511	-
OT9	<i>ABCA3</i>	Exon	GTCTGGAAGATGAGACCAAGG (서열번호 325)	chr16	2327650	-
OT10	Intergenic region	-	GTGATGGAAGATGTCCACTTAGG (서열번호 326)	chr2	129298046	-
OT11	Intergenic region	-	CTCCAGGAAGATTCCATCATGG (서열번호 327)	chr4	16957810	+
OT12	Intergenic region	-	GTCTGGAGGATTTCCACCAGGG (서열번호 328)	chr8	70150186	-
OT13	<i>DSCAM</i>	Intron	GTCCAGAAAGATATCCACCTAGG (서열번호 329)	chr21	42029091	-

OT14	<i>CLIP2</i>	Intron	CACCTGGAAGATTTCACCTGG (서열번호 330)	chr7	73770600	+
OT15	Intergenic region	-	CTACTGGAAGAGGTCCACCCTGG (서열번호 331)	chr14	103748791	+
OT16	<i>ACSS2</i>	Intron	CTACTGGGAGAAGTCCACCTGG (서열번호 332)	chr20	33506330	+
OT17	Intergenic region	-	CTCAGGAAGATGTCCACAATGG (서열번호 333)	chr4	74527941	+
OT18	Intergenic region	-	CTCCCGGAAGCTGTCCACCCTGG (서열번호 334)	chr14	106089679	+
OT19	<i>ITIH4, RP5-966M1.6</i>	Intron	ACTCCTGAAGATGTACACCCTGG (서열번호 335)	chr3	52863033	+
OT20	Intergenic region	-	GAAGTGGATGATGTCCACCTGG (서열번호 336)	chr6	157061270	+
OT21	<i>LINC01170</i>	Exon	GCCTTGAAGATGTCCCTCATGG (서열번호 337)	chr5	123650052	+
OT22	Intergenic region	-	CTCCTGAAAGAGTCCACCCAGG (서열번호 338)	chr2	236108683	+
OT23	Intergenic region	-	CTCCTGCAAGATGTCCCTCCAGGA (서열번호 339)	chr2	120420942	-
OT24	Intergenic region	-	GGCCTGGAAAATGTCCACCGTGG (서열번호 340)	chr2	122905021	+
OT25	<i>MGAT5</i>	Intron	TCATGGAAGATATTCACCAGGG (서열번호 341)	chr2	134952386	-
OT26	<i>U91319.1</i>	Intron	AAGATGGAAGACATCCACCAGGG (서열번호 342)	chr16	13592695	+
OT27	Intergenic region	-	CAGCTGGAAGATGTCCACCTTTG (서열번호 343)	chr16	84252079	+
OT28	Intergenic region	-	CAGCTGGAAGATGTCCACCACGA (서열번호 344)	chr1	59037909	+
OT29	Intergenic region	-	CTCCTGGAAGGAGTCCACCATGA (서열번호 345)	chr5	72463793	+
OT30	<i>SLC9A9</i>	Intron	TACTCCTGGGATCTCCACCCATG (서열번호 346)	chr3	143166935	-
OT31	<i>PTPRS</i>	Exon	CGTCTGAAAGATGTCCACCACGC (서열번호 347)	chr19	5207995	+
OT32	Intergenic region	-	GGTCTGGAAGATGTCAACCACAG (서열번호 348)	chr10	131177201	-



OT33	Intergenic region	-	CTCCTGGTCAATATCCACCCAAG (서열번호 349)	chr22	25944921	+
OT34	<i>ERC2</i>	Intron	CCCTGGAAGAATGTCCACCAGGA (서열번호 350)	chr3	55563577	+
OT35	<i>CTD-2130013.1</i>	Intron	TGCCTGAAAGACATCCACCAAGG (서열번호 351)	chr18	44830053	-
OT36	Intergenic region	-	TGACAGGAAGATGTCCACCCATG (서열번호 352)	chr9	28979308	+
OT37	Intergenic region	-	CCTCCTGCTGATGTCCACCAGG (서열번호 353)	chr16	1065437	+
OT38	Intergenic region	-	GCTCCTGGAAGAATCCACCACAG (서열번호 354)	chr10	130753819	+
OT39	<i>BRD1</i>	Intron	CAGCTGGGAGATGTCCACCATGA (서열번호 355)	chr22	50174426	+
OT40	<i>CACNG3</i>	Intron	TTGGGGGAAGAAGTCCACCAAGG (서열번호 356)	chr16	24310237	+
OT41	<i>RP11-57C13.6, RP11-57C13.3</i>	Intron	CCCTAGGAAGAGGTCCACCAGGG (서열번호 357)	chr10	89404735	-

상기 표 8 에 열거된 부위를 유효성 확인을 위하여, Vegfa-specific Cas9 RNP 가 형질 감염된 ARPE-19 세포에서 분리된 유전체 DNA 를 사용하여 targeted deep sequencing 를 수행하였다 (도 4c 참조). 그 결과, 이들 부위는 in vitro 에서 효율적으로 절단되지만, 41 개의 off-target 부위의 절단 부위에서 모두 off-target indel 빈도가 sequencing error rate(평균 0.1%)를 넘지 않는 것으로 확인되었다.

필요하다면, 개선된 특이성을 갖는 변형 된 gRNA (Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. & Joung, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology* **32**, 279-284 (2014); Cho, S. W. *et al.* Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research* **24**, 132-141 (2014)) 또는 Cas9 변이체 (Kleinstiver, B. P. *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* **529**, 490-495 (2016); Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*

351, 84-88 (2016))를 사용함으로써, 미미하나마 존재하는 off-target effect 를 더욱 감소시키거나 방지할 수 있다.

상기 결과를 종합하면, 본 명세서에서 제공되는 Vegfa 표적화 서열을 갖는 sgRNA 를 포함하는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 는 마우스와 인간 모두에서  
5 매우 높은 특이성(in vivo 및 in vitro)을 보임을 확인할 수 있다.

#### 실시예 5: Vegfa-특이적 Cas9 RNP 의 부작용 시험

노인성 황반변성(AMD) 또는 당뇨병성 망막증과 같은 안과 질환의 치료를 위해 Vegfa 유전자를 돌연변이시킬 때의 또 다른 주요 관심사는  
10 눈에서의 영양적 측면에서의 Vegfa 의 역할이다. Vegfa 돌연변이시의 가장 심각한 변화는 원추세포 장애 (Cone dysfunction)인데, 마우스 RPE 에서의 Vegfa 유전자의 조건부 결실 3 일 후에 관찰된다.

본 명세서에서 제공되는 Vegfa-특이적 Cas9 RNP 가 와 같은 원추세포 장애를 일으키는지 여부를 시험하기 위하여, 참고예 12 를 참조하여 opsin  
15 positive 영역을 형광현미경으로 관찰하고 그 면적을 계산하여, 도 7a (형광 이미지) 및 도 7b (opsin positive 영역(%))에 나타내었다.

도 7a 는 Vegfa-specific Cas9 RNP 주입 7 일 후의 Vegfa-specific Cas9 RNP 주입된 정상 C57BL/6J 마우스 (레이저 처리 없이 RNP 주사만 시행한 정상 마우스) 및 Vegfa-specific Cas9 RNP 가 주입되지 않은 정상 대조군  
20 마우스의 망막으로부터 얻은 형광 단면 이미지로, opsin 은 녹색으로 DAPI 은 파란색으로 보여진다. 도 7b 는 opsin positive 영역(%)을 보여주는 그래프로, 정상 대조군 ( $3.0 \pm 0.5\%$ )과 Vegfa-specific Cas9 RNP 주입군 ( $3.1 \pm 0.5\%$ ) 간 유의미한 차이가 없다 (Error bars indicate s.e.m. (n=4); #,  $P > 0.05$  (Student's t-test)).

도 7a 및 7b 에서 확인되는 바와 같이, 본 명세서에서 제공되는 Vegfa-specific Cas9 RNP 는 처리 후 7 일째에도 미처리 정상 대조군과  
25 비교하여 원추세포의 opsin positive 영역에 차이가 없었으며, 이는 원추세포에 기능 이상이 발생하지 않았음을 의미한다. 이러한 결과는 상기 Vegfa-specific Cas9 RNP 가 Vegfa 유전자의 표적 서열만 특이적으로  
30 돌연변이 시키며, 이러한 돌연변이가 심각한 부작용을 유발하지 않음을 보여준다. 또한, 기존의 Vegfa-표적 치료에서, 처리 3 일 후에 부작용이

발생한 것과 비교하여, *Vegfa*-specific Cas9 RNP 를 사용하는 경우에는 처리 7일 후에도 부작용이 발생하지 않았다.

5 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 10 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

**【특허의 범위】**

**【청구항 1】**

Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 (DNA 또는 mRNA) 및 *VEGF-A* 유전자의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 표적화 서열을 포함하는 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함하는, *VEGF-A* 과발현과 관련된 안질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 리보핵산단백질을 포함하는 것인, 안질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**【청구항 3】**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 *VEGF-A* 유전자 내의 서열번호 1 내지 8 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 표적 부위에 혼성화 가능한 것인, 안질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**【청구항 4】**

제3항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 9 내지 16 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 것인, 안질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**【청구항 5】**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 *VEGF-A* 과발현과 관련된 안질환은 황반변성 또는 망막병증인, 안질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**【청구항 6】**

Cas9 단백질 및 *VEGF-A* 유전자의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 표적화 서열을 포함하는 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA를 포함하는 리보핵산단백질.

**【청구항 7】**

제6항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 *VEGF-A* 유전자 내의 서열번호 1 내지 8 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 표적 부위에 혼성화 가능한 것인, 리보핵산단백질.

**【청구항 8】**

제7항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 9 내지 16 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 것인, 리보핵산단백질.

**【청구항 9】**

서열번호 9 내지 16 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 가이드 RNA.

【청구항 10】

5 *VEGF-A* 과발현과 관련된 안질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 (DNA 또는 mRNA) 및 *VEGF-A* 유전자의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 표적화 서열을 포함하는 *VEGF-A* 유전자 특이적 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함하는 약학 조성물.

【청구항 11】

10 제10항에 있어서, 상기 조성물은 Cas9 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는 리보핵산단백질을 포함하는 것인, 안질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

【청구항 12】

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 *VEGF-A* 유전자 내의 서열번호 1 내지 8 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 표적 부위에 혼성화 가능한 것인, 안질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

15 【청구항 13】

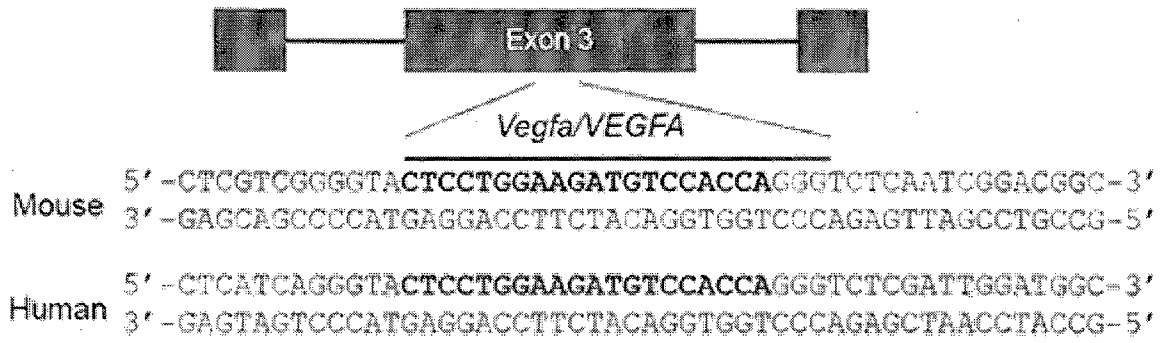
제12항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 9 내지 16 중에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 것인, 안질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

【청구항 14】

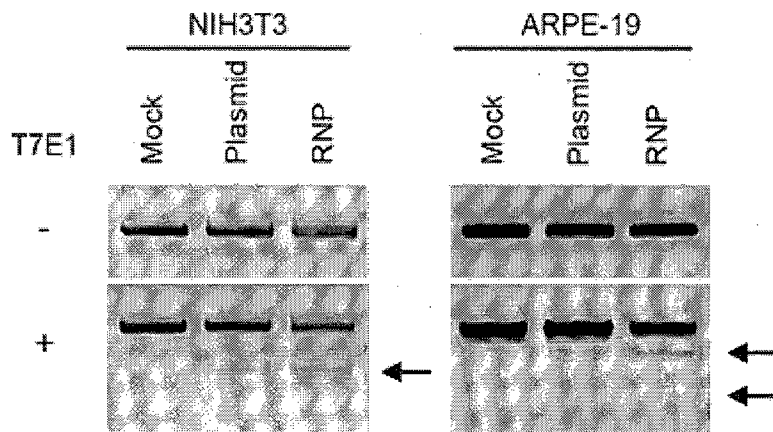
20 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *VEGF-A* 과발현과 관련된 안질환은 황반변성 또는 망막병증인, 안질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

【도면】

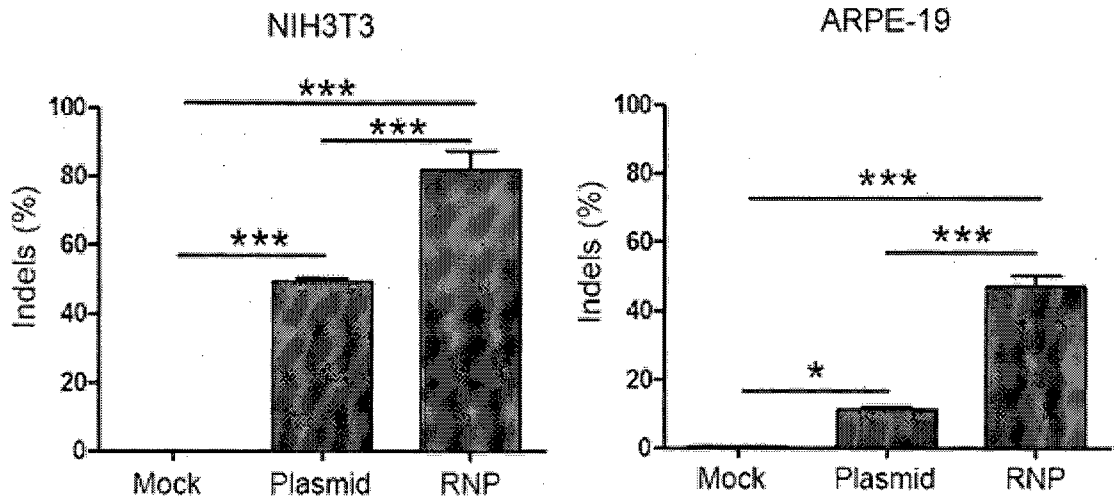
【도 1a】



【도 1b】



【도 1c】



【도 1d】

*Vegfa* (NIH3T3)

▼ PAM

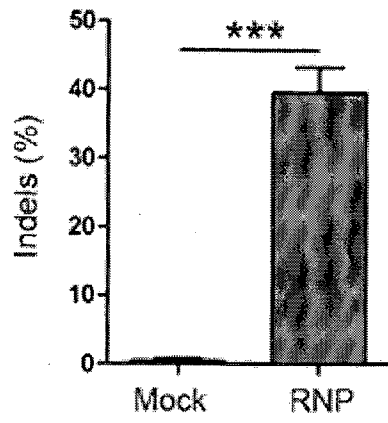
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCA-CCAGGGTCTCAATCGGACGGC	WT
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCAACCAGGGTCTCAATCGGACGGC	+1
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGT----CCAGGGTCTCAATCGGACGGC	-3
CTCGT-----CGGACGGC	-37
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTC-A-CCAGGGTCTCAATCGGACGGC	-1
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTC-----TCAATCGGACGGC	-10

*VEGFA* (ARPE-19)

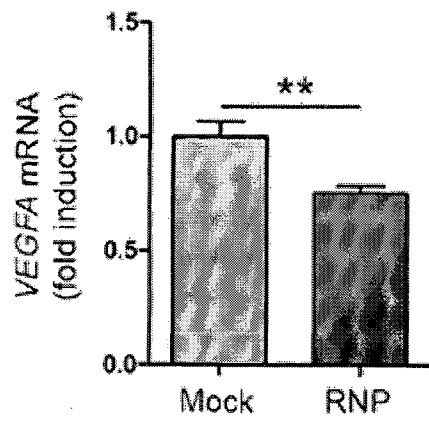
▼ PAM

CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCCA-CCAGGGTCTCGATTGGATGGC	WT
CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCCAACCAGGGTCTCGATTGGATGGC	+1
CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGT----CCAGGGTCTCGATTGGATGGC	-3
CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCC--CCAGGGTCTCGATTGGATGGC	-1
CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCCATCCAGGGTCTCGATTGGATGGC	+1
CTCATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTC-----TCTCGATTGGATGGC	-10

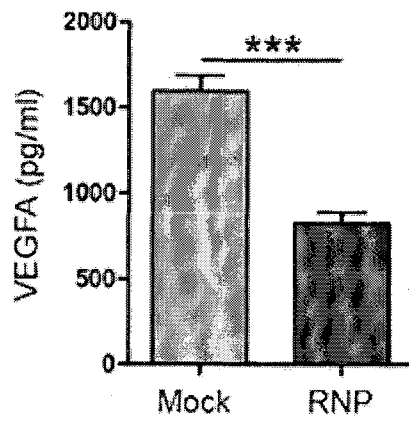
【図 1e】



【図 1f】

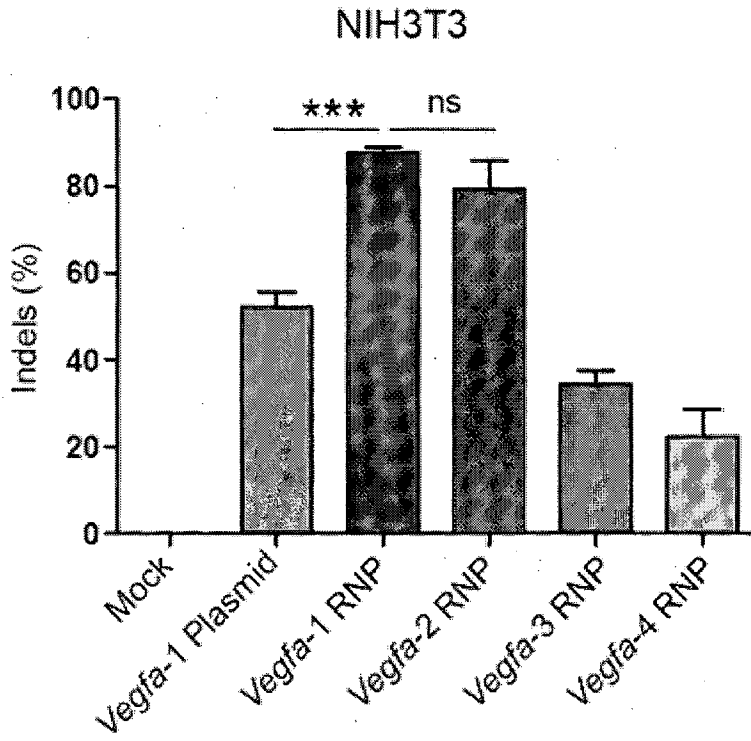


【図 1g】





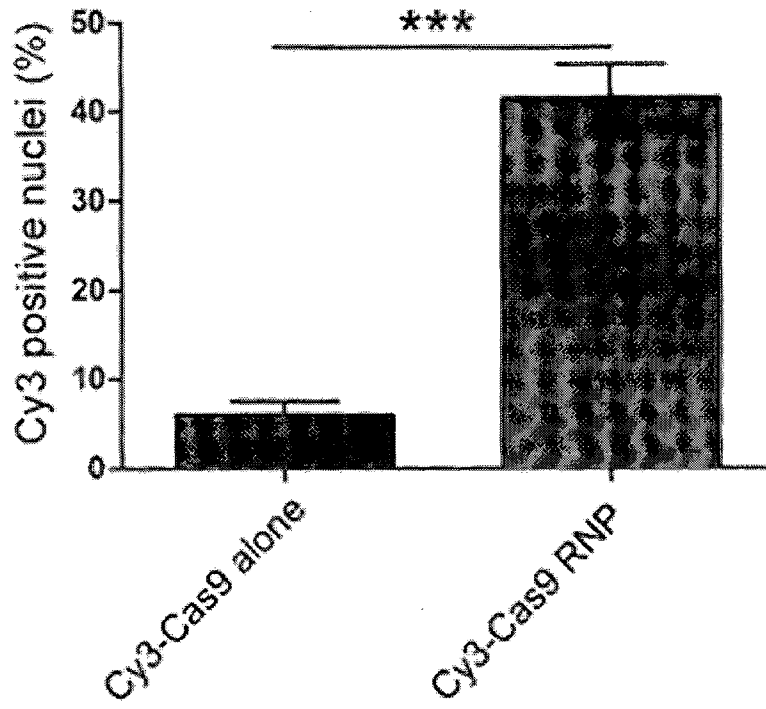
【도 1h】



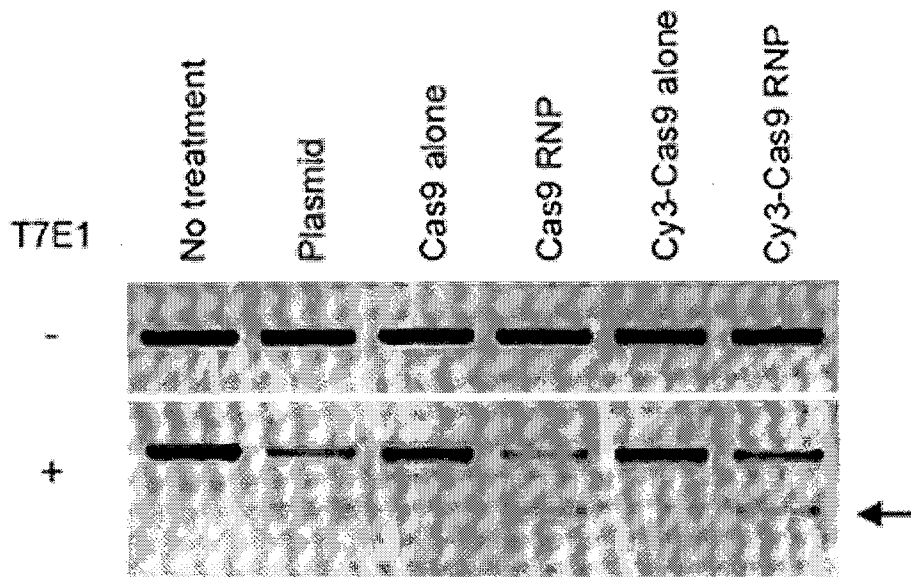
【도 2a】



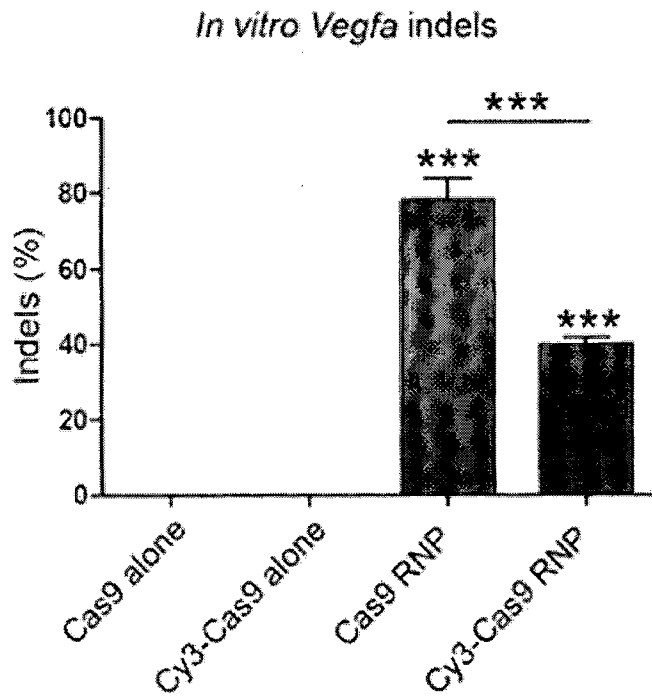
【도 2b】



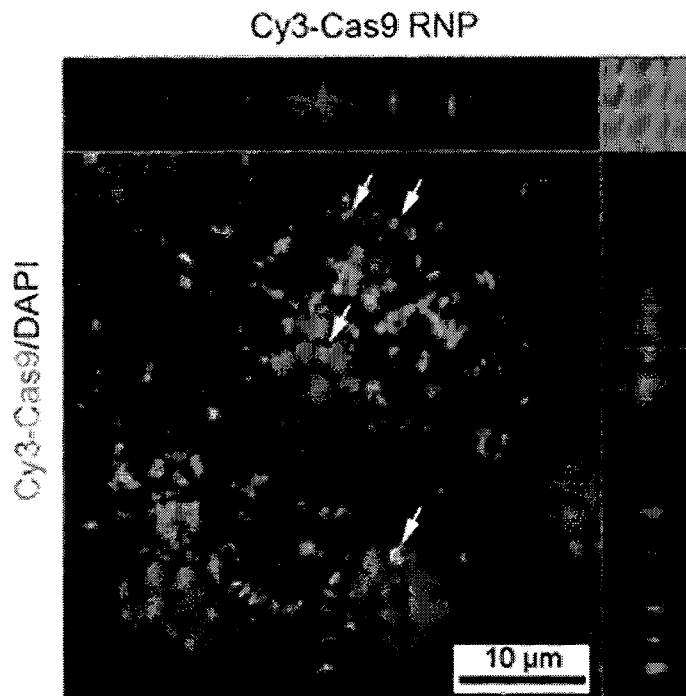
【도 2c】



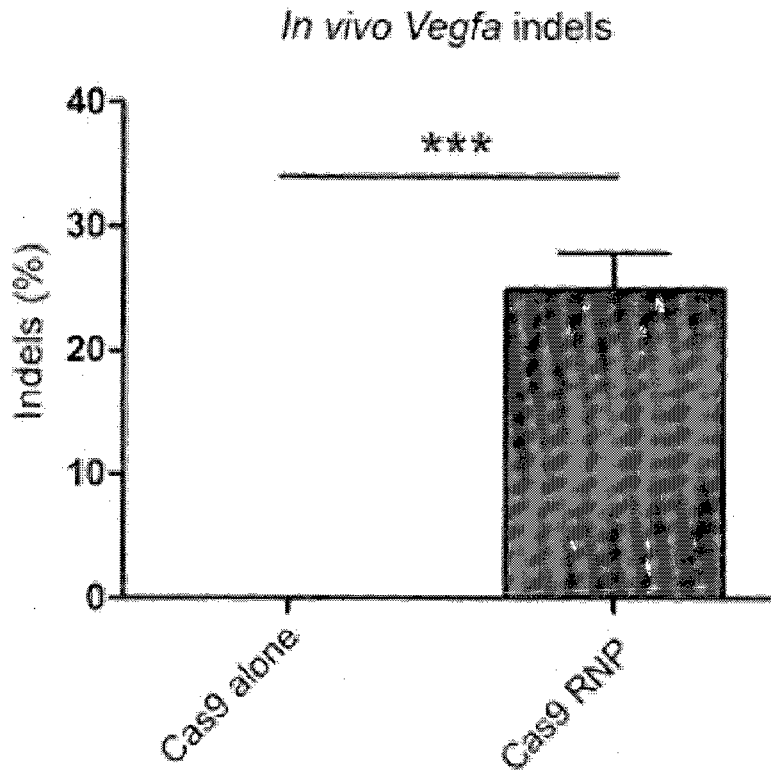
【도 2d】



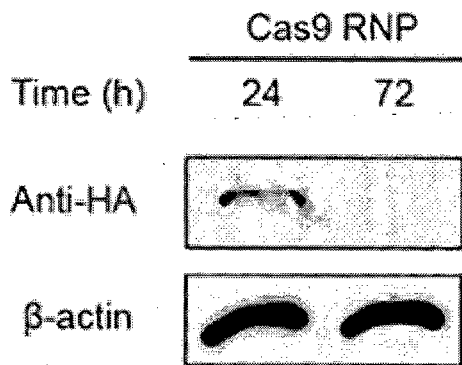
【도 2e】



【도 2f】

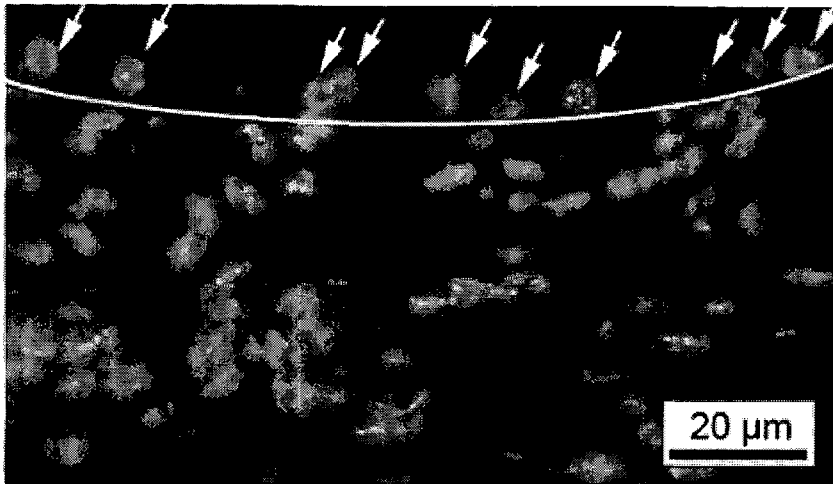


【도 2g】

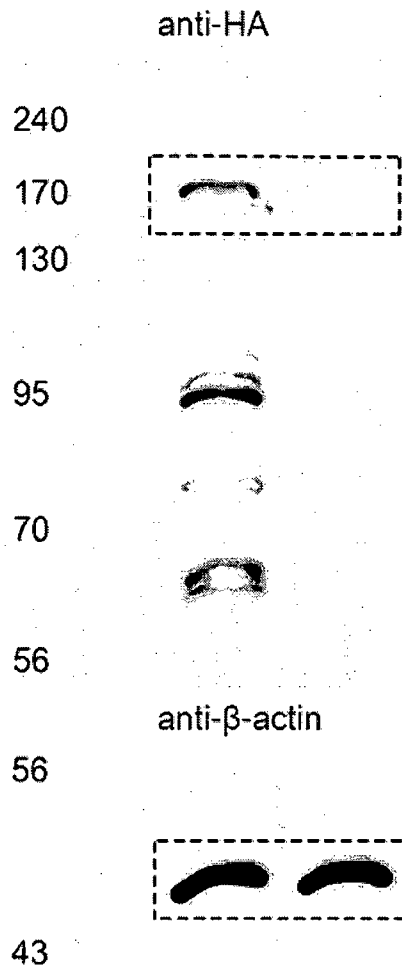


【도 2h】

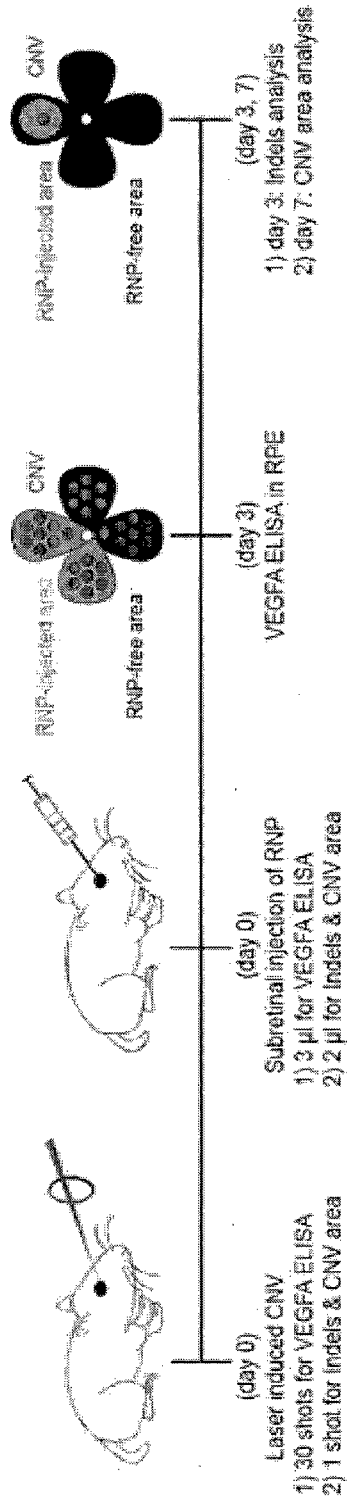
RPE in RPE/choroid/scleral complex



【도 2i】

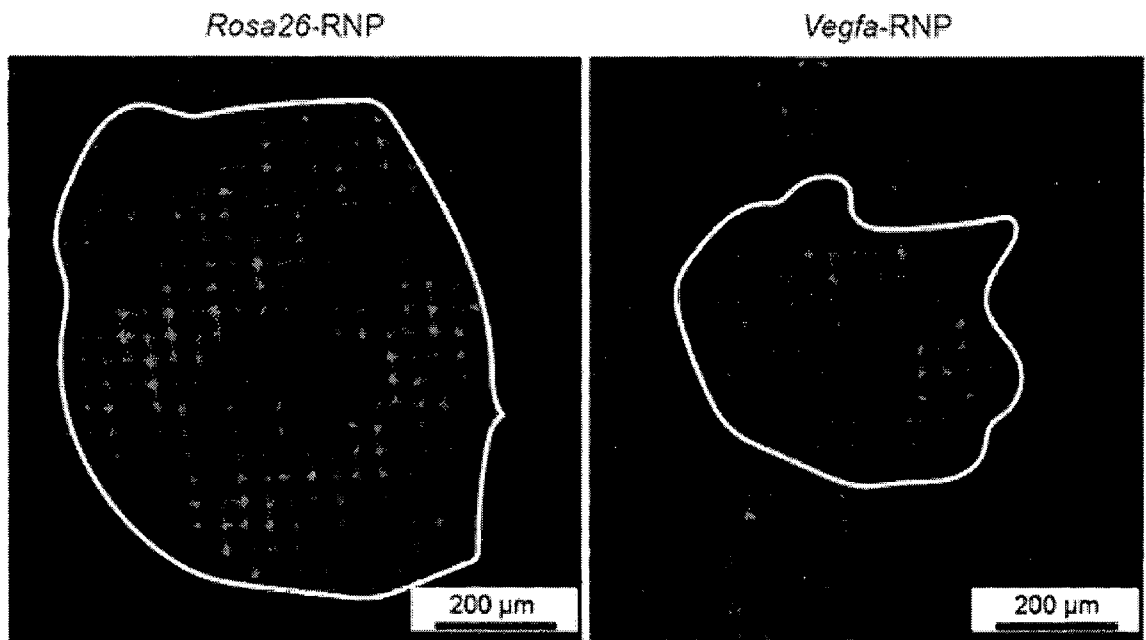


【도 3a】

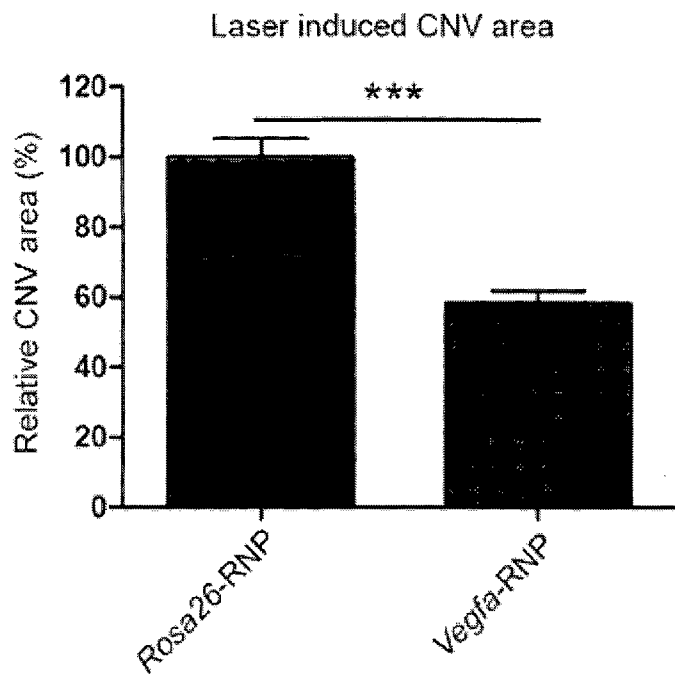




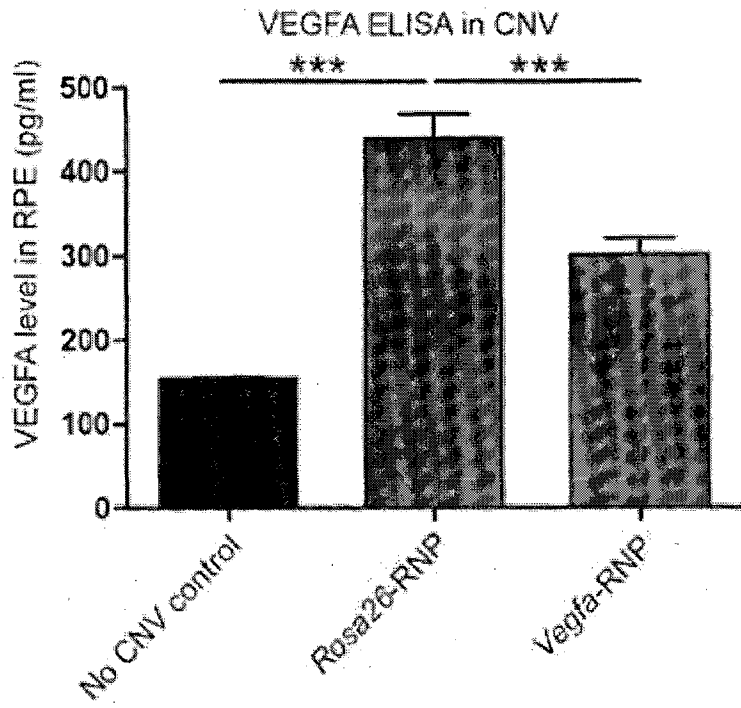
【도 3b】



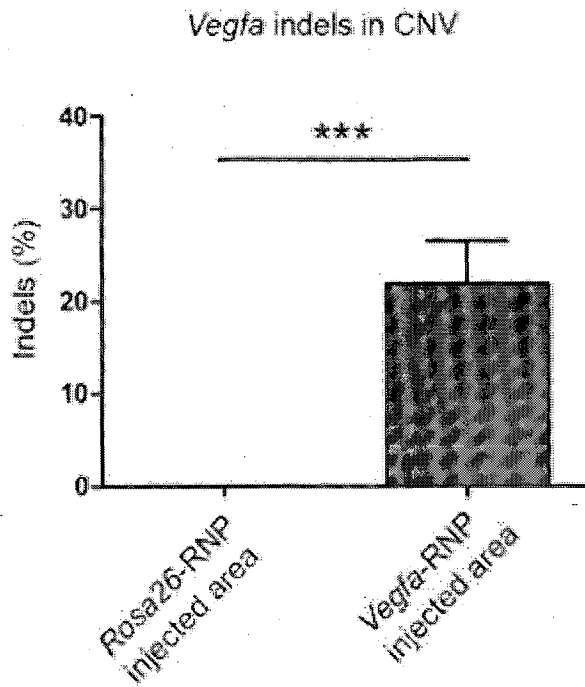
【도 3c】



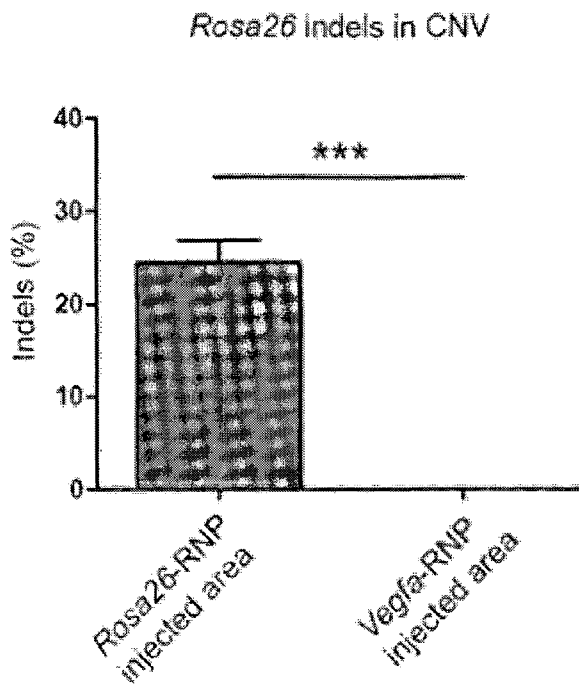
【도 3d】



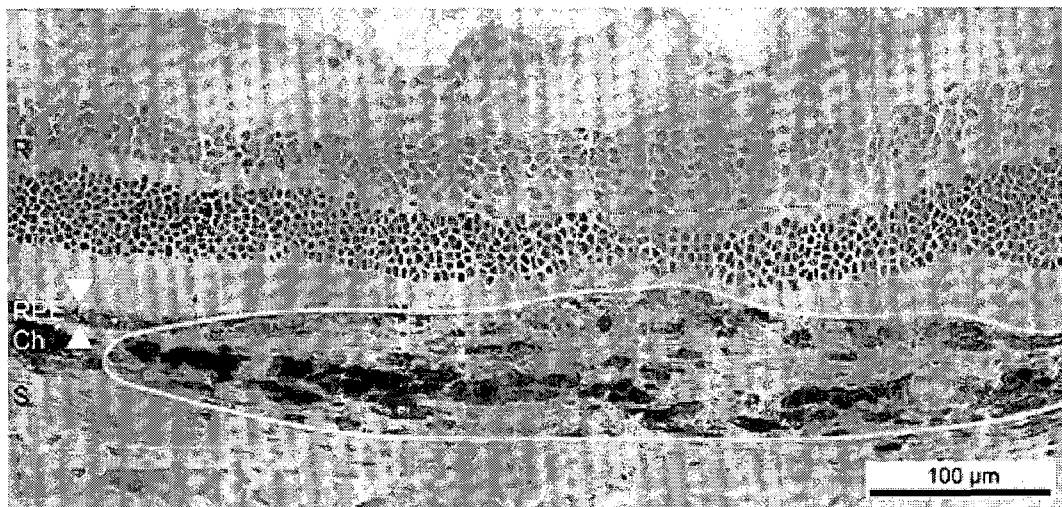
【도 3e】



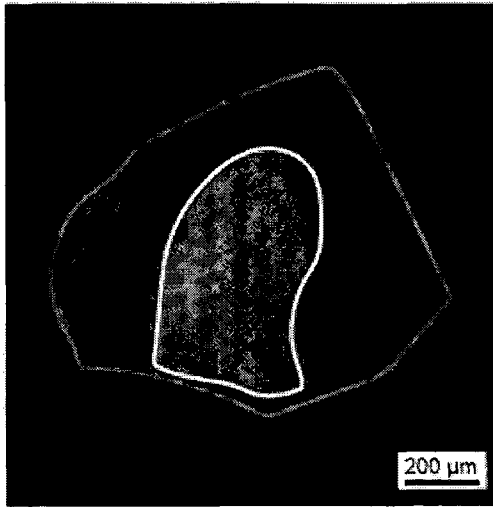
【도 3f】



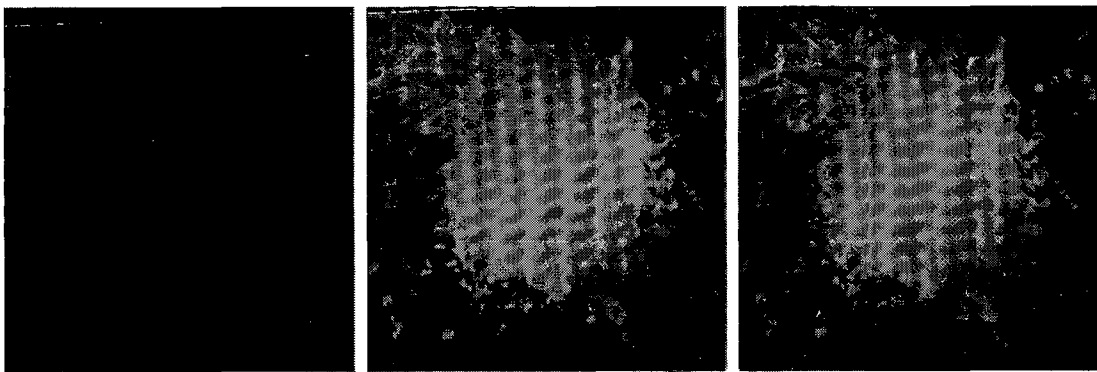
【도 3g】



【도 3h】

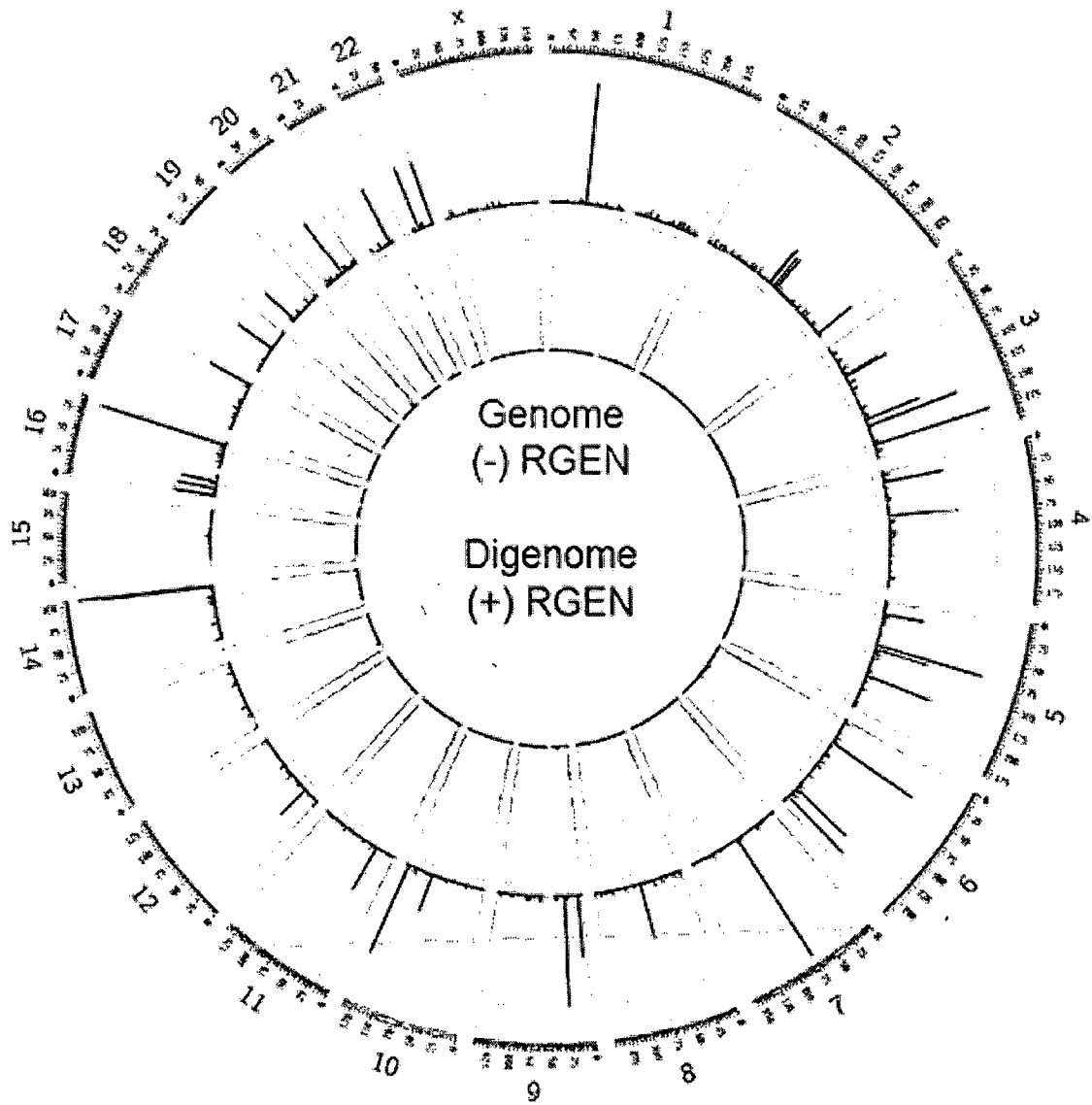


【도 3i】

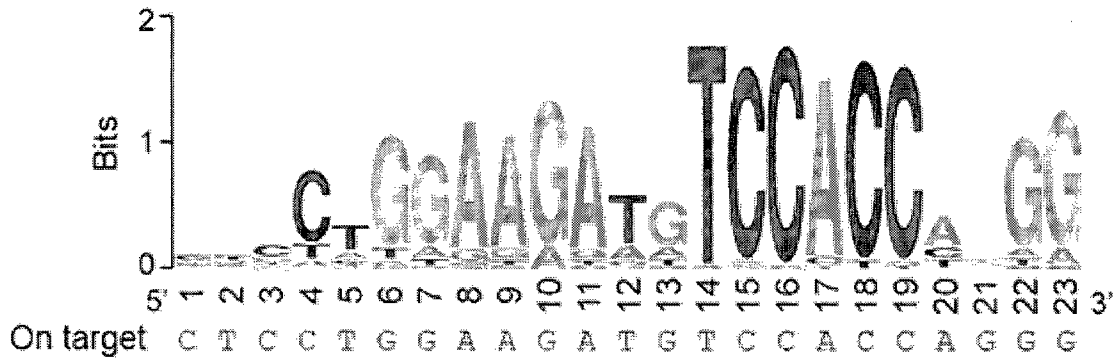


IB4/DAPI

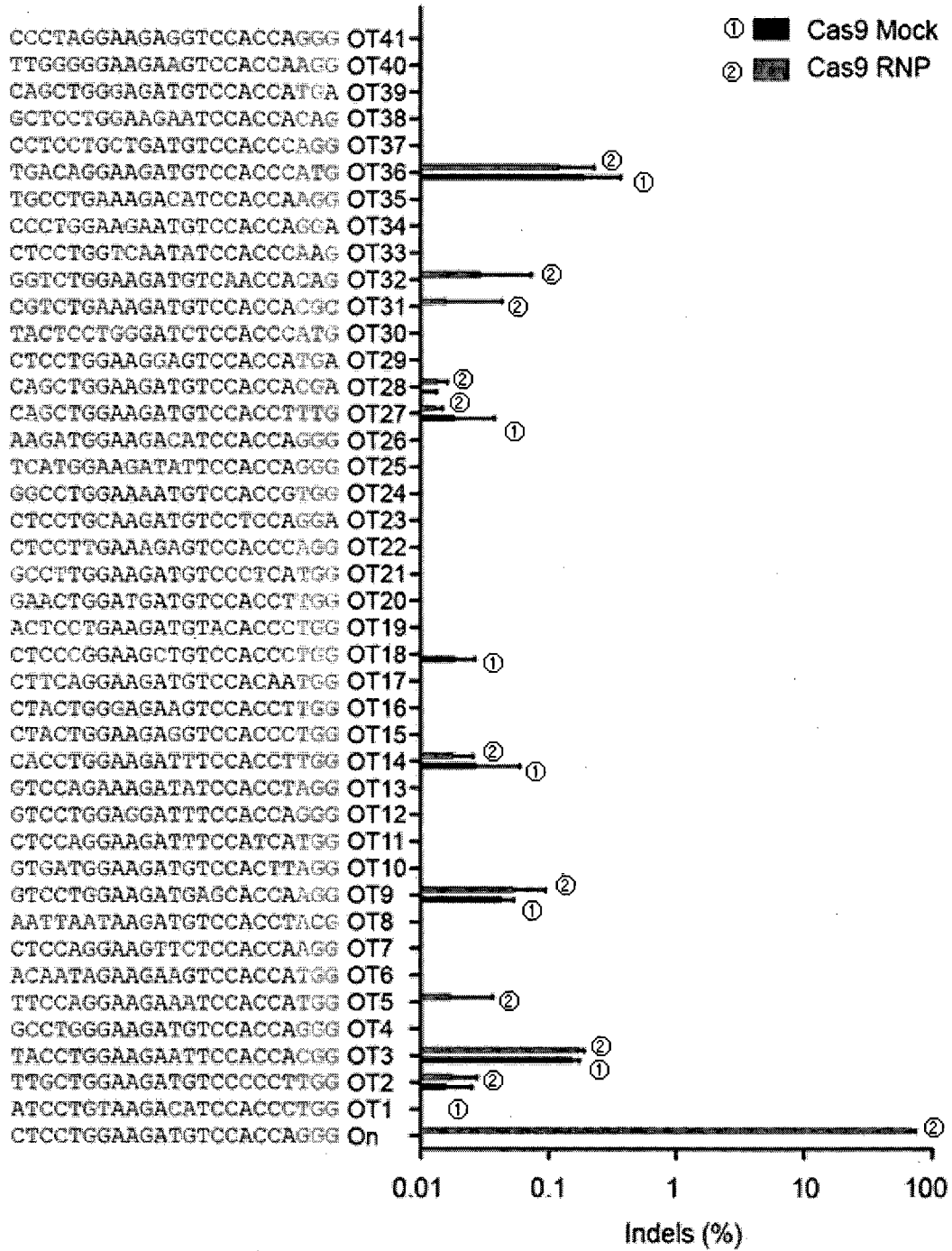
【도 4a】



【도 4b】



【도 4c】



【도 5】

a

*Vegfa*

	▼ PAM	
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCACCAGGGTCTCAATCGGACGGC		WT
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGT-----CTCAATCGGACGGC		-10
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATG-----TCTCAATCGGACGGC		-10
CTCGTCGGGGTACTCCTGG-----AGGGTCTCAATCGGACGGC		-12
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGAT-----GTCTCAATCGGACGGC		-10
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGT---CCAGGGTCTCAATCGGACGGC		-3

b

*Vegfa*

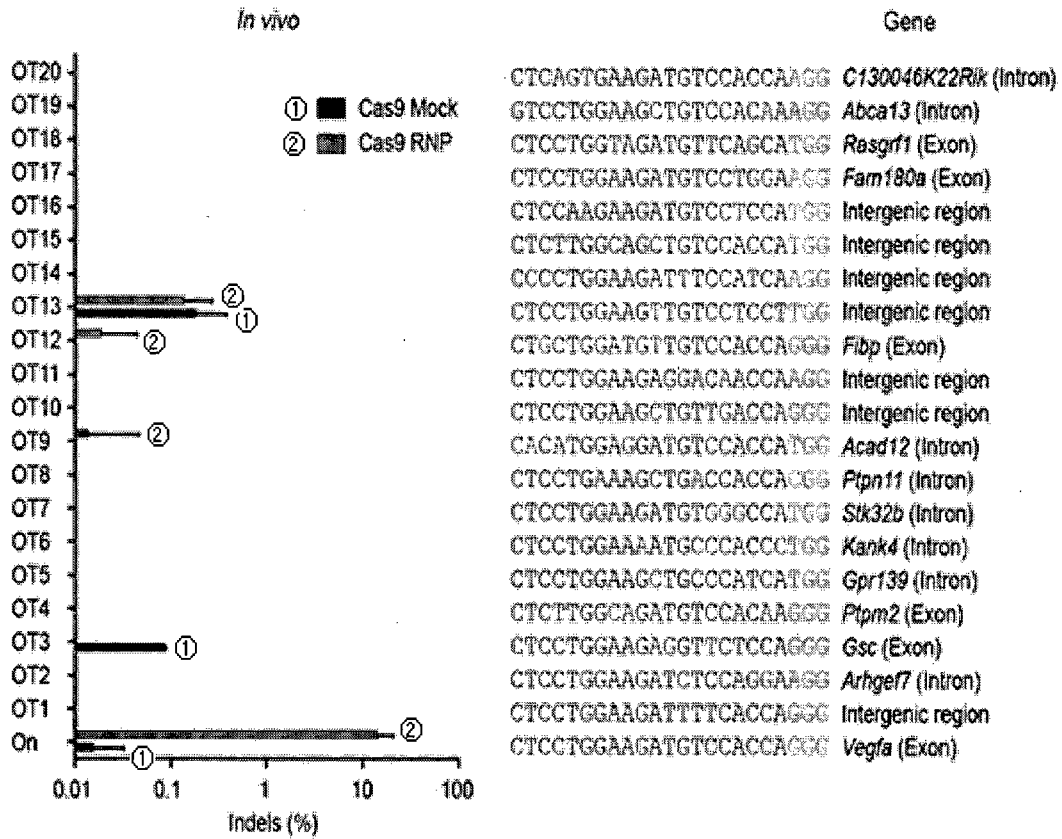
	▼ PAM	
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCA-CCAGGGTCTCAATCGGACGGC		WT
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCAACCAGGGTCTCAATCGGACGGC		+1
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTC-A-CCAGGGTCTCAATCGGACGGC		-1
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTC---CCAGGGTCTCAATCGGACGGC		-2
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCC--CCAGGGTCTCAATCGGACGGC		-1
CTCGTCGGGGTACTCCTGGAAGATGTCCA---AGGGTCTCAATCGGACGGC		-2

*Rosa26*

	▼ PAM	
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCTCAGAAGCC-AGGAGGCAGCAGAGAACTCCC		WT
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCTCAGAAGCC--GGAGGCAGCAGAGAACTCCC		-1
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCTCAGAAGCCAGGAGGCAGCAGAGAACTCCC		+1
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCT-----AGGAGGCAGCAGAGAACTCCC		-8
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCTCAGAAGC--AGGAGGCAGCAGAGAACTCCC		-1
TCCCAGGCCCCAGGGCGGTCTCAGAAGC-----CAGCAGAGAACTCCC		-7

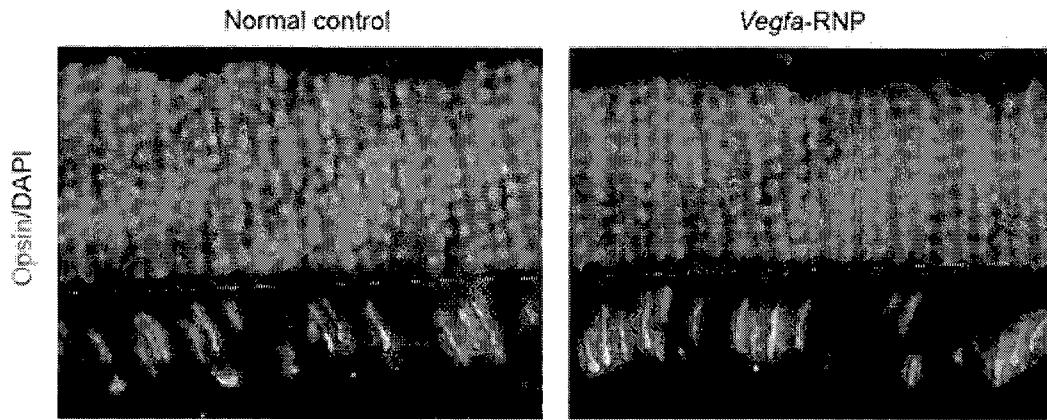


【도 6】

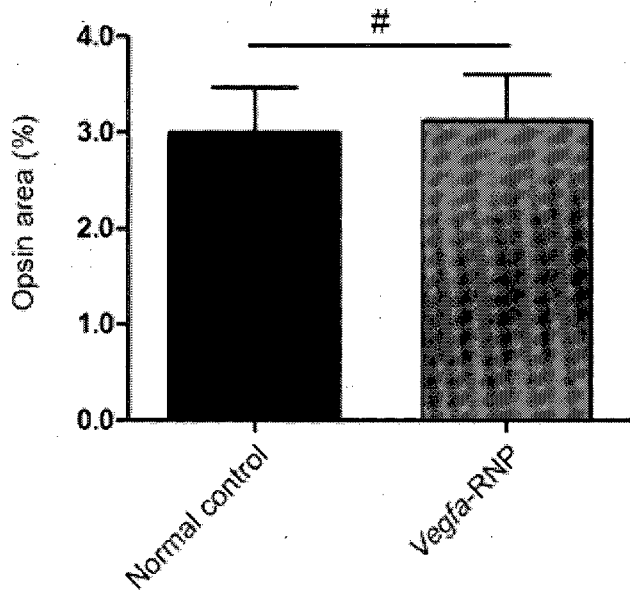


In vivo	Gene
CTCAGTGAAGATGTCCACCAAGG	C130046K22Rik (Intron)
GTCCTGGGAGCTGTCCACAAAGG	Abca13 (Intron)
CTCCTGGTAGATGTTCCAGCATGG	Rasgrf1 (Exon)
CTCCTGGGAGATGTCCGGAGGG	Fam180a (Exon)
CTCCRAGAAGATGTCCCTCCATGG	Intergenic region
CTCTTGGCAGCTGTCCACCATGG	Intergenic region
CCCCTGGGAGATTTCATCAAGG	Intergenic region
CTCCTGGGAGTTGTCCCTCTTGG	Intergenic region
CTGCTGGATGTTGTCCACCAGGG	Fibp (Exon)
CTCCTGGGAGAGGACAACCAAGG	Intergenic region
CTCCTGGGAGCTGTTGACCAGGG	Intergenic region
CACATGGAGGATGTCCACCATGG	Acad12 (Intron)
CTCCTGAAAGCTGACCACCAAGG	Ptpn11 (Intron)
CTCCTGGGAGATGTGGGCCATGG	Stk32b (Intron)
CTCCTGGGAAATGCCACCCTGG	Kank4 (Intron)
CTCCTGGGAGCTGCCCATCATGG	Gprf39 (Intron)
CTCTTGGCAGATGTCCACAAGGG	Ptpm2 (Exon)
CTCCTGGGAGAGGTTCTCCAGGG	Gsc (Exon)
CTCCTGGGAGATCTCCAGGAAGG	Arhgef7 (Intron)
CTCCTGGGAGATTTTCACCAGGG	Intergenic region
CTCCTGGGAGATGTCCACCAGGG	Vegfa (Exon)

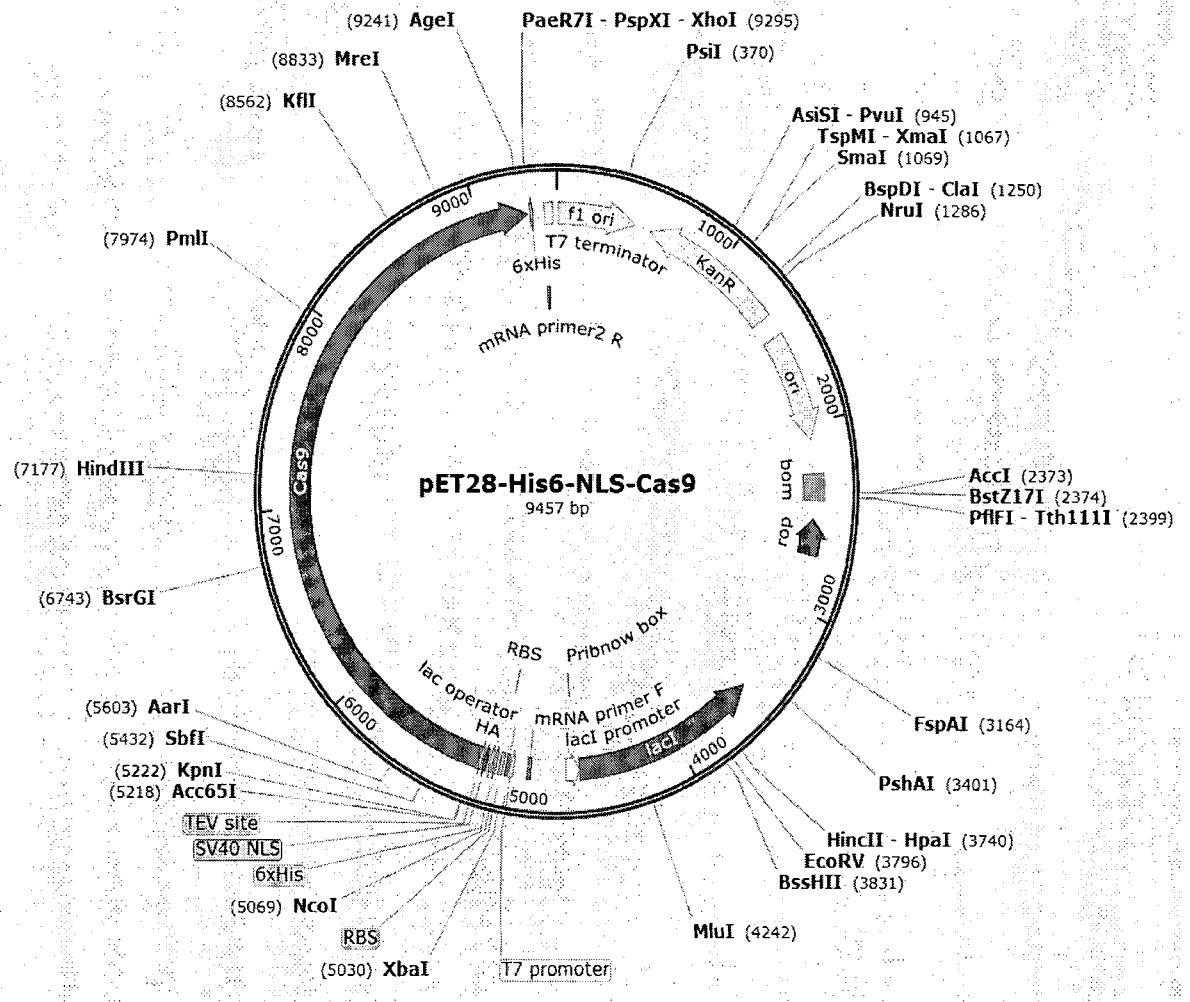
【도 7a】



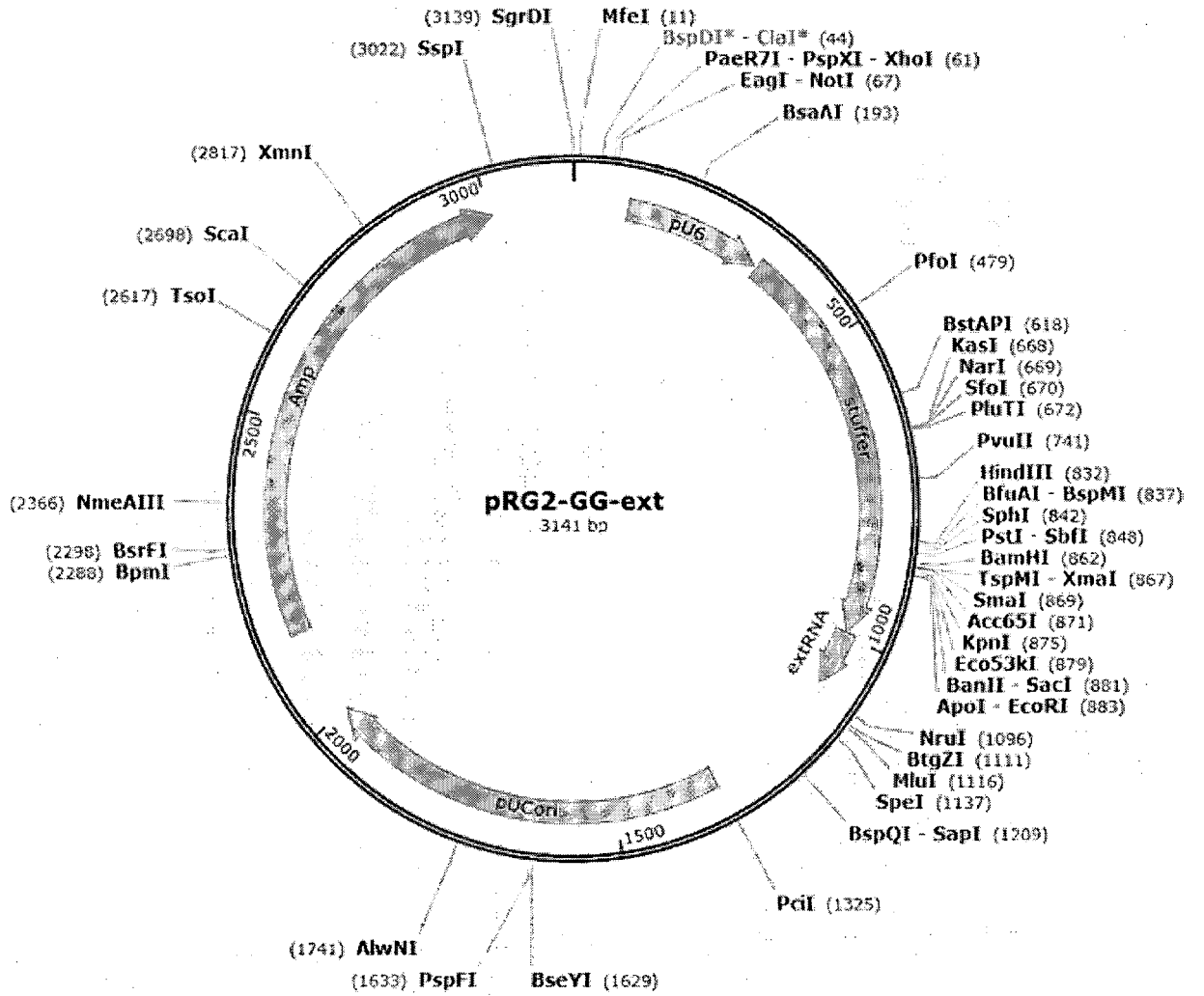
【도 7b】



【도 8】



【도 9】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008122

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(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 38/17; A61K 35/12; C12N 15/113; A61K 9/127; C12Q 1/68; C12N 9/22; A61K 48/00

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) &amp; Keywords: VEGF-A, Cas9, guide RNA, eye disease, ribonucleoprotein

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YIU, Glenn et al., "Genomic Disruption of VEGF in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using CRISPR-Cas9 Endonuclease", ARVO 2016 Annual Meeting Abstracts, 01 May 2016, Program Number: 1159 Internet: <URL: <a href="http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/BI/Session_161.pdf">http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/BI/Session_161.pdf</a> > See the entire document.	1-13
A	US 2015-0376586 A1 (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) 31 December 2015 See paragraphs [0230]-[0231], [0234]-[0236], [0417], [0421]-[0422]; and claims 1, 24.	1-13
A	KR 10-2016-0089527 A (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.) 27 July 2016 See paragraphs [0781]-[0782], [0791]-[0793]; and claim 1.	1-13
A	KOO, Taeyoung et al., "Measuring and Reducing Off-target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9", Molecules and Cells, 19 May 2015 (online), vol. 38, no. 6, pages 475-481 See page 476, left column, lines 19-33; and page 479, right column, lines 12-27.	1-13
A	JP 2015-177801 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 08 October 2015 See paragraph [0007]; and claims 1, 3.	1-13



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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 NOVEMBER 2017 (06.11.2017)

Date of mailing of the international search report

07 NOVEMBER 2017 (07.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008122

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	YIU, Glenn et al., "Genomic Disruption of VEGF-A Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using CRISPR-Cas9 Endonuclease", Investigative Ophthalmology & Visual Science, August 2016, vol. 57, no. 13, pages 5490-5497 See pages 5490-5492, 5495.	1-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008122

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: **14**  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/008122**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
US 2015-0376586 A1	31/12/2015	US 2015-0376587 A1	31/12/2015		
		US 2017-0114334 A1	27/04/2017		
		WO 2015-200555 A2	30/12/2015		
		WO 2015-200555 A3	10/03/2016		
KR 10-2016-0089527 A	27/07/2016	AU 2014-361781 A1	16/06/2016		
		AU 2014-361826 A1	23/06/2016		
		AU 2014-361826 A8	14/07/2016		
		CA 2932475 A1	18/06/2015		
		CA 2932478 A1	18/06/2015		
		CN 106061510 A	26/10/2016		
		CN 106536729 A	22/03/2017		
		EP 3079725 A1	19/10/2016		
		EP 3079726 A2	19/10/2016		
		JP 2017-501149 A	12/01/2017		
		JP 2017-504312 A	09/02/2017		
		KR 10-2016-0089526 A	27/07/2016		
		US 2015-0232883 A1	20/08/2015		
		US 2016-0340661 A1	24/11/2016		
		WO 2015-089419 A2	18/06/2015		
		WO 2015-089419 A3	17/09/2015		
		WO 2015-089419 A9	05/11/2015		
		WO 2015-089462 A1	18/06/2015		
		JP 2015-177801 A	08/10/2015	AU 2009-221775 A1	11/09/2009
				AU 2009-221775 A2	04/11/2010
AU 2009-221775 B2	07/05/2015				
CA 2716793 A1	11/09/2009				
CN 102014932 A	13/04/2011				
CN 102014932 B	25/11/2015				
CN 105267233 A	27/01/2016				
EA 019531 B1	30/04/2014				
EA 201071033 A1	29/04/2011				
EA 201301171 A1	30/10/2014				
EP 2265276 A2	29/12/2010				
EP 2712926 A2	02/04/2014				
HK 1220380 A1	05/05/2017				
JP 2011-518117 A	23/06/2011				
KR 10-1397407 B1	19/06/2014				
KR 10-2010-0126461 A	01/12/2010				
MX 2010009611 A	15/12/2010				
NZ 588280 A	30/11/2012				
SG 188121 A1	28/03/2013				
US 2010-0087508 A1	08/04/2010				
US 2013-0023577 A1	24/01/2013				
US 2016-0000819 A1	07/01/2016				
US 9006197 B2	14/04/2015				
WO 2009-111658 A2	11/09/2009				
WO 2009-111658 A3	29/10/2009				



<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/17; A61K 35/12; C12N 15/113; A61K 9/127; C12Q 1/68; C12N 9/22; A61K 48/00 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: VEGF-A, Cas9, 가이드 RNA, 안질환, 리보핵산단백질		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YIU, GLENN 등, `Genomic disruption of VEGF in human retinal pigment epithelial cells using CRISPR-Cas9 endonuclease`, ARVO 2016 Annual Meeting Abstracts, 2016.05.01, Program Number: 1159 인터넷: <URL: <a href="http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/BI/Session_161.pdf">http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/BI/Session_161.pdf</a> > 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 2015-0376586 A1 (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) 2015.12.31 단락 [0230]-[0231], [0234]-[0236], [0417], [0421]-[0422]; 및 청구항 1, 24 참조.	1-13
A	KR 10-2016-0089527 A (더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 등) 2016.07.27 단락 [0781]-[0782], [0791]-[0793]; 및 청구항 1 참조.	1-13
A	KOO, TAEYOUNG 등, `Measuring and reducing off-target activities of programmable nucleases including CRISPR-Cas9`, Molecules and Cells, 2015.05.19(online), 38권, 6호, 페이지 475-481 페이지 476, 좌측 컬럼, 라인 19-33; 및 페이지 479, 우측 컬럼, 라인 12-27 참조.	1-13
A	JP 2015-177801 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 2015.10.08 단락 [0007]; 및 청구항 1, 3 참조.	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2017년 11월 06일 (06.11.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 11월 07일 (07.11.2017)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405 

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	YIU, GLENN 등, `Genomic disruption of VEGF-A expression in human retinal pigment epithelial cells using CRISPR-Cas9 endonuclease`, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2016.08, 57권, 13호, 페이지 5490-5497 페이지 5490-5492, 5495 참조.	1-13

**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1.  청구항:  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
  
2.  청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
  
3.  청구항: 14  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1.  출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
  
2.  추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
  
3.  출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
  
4.  출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2015-0376586 A1	2015/12/31	US 2015-0376587 A1 US 2017-0114334 A1 WO 2015-200555 A2 WO 2015-200555 A3	2015/12/31 2017/04/27 2015/12/30 2016/03/10
KR 10-2016-0089527 A	2016/07/27	AU 2014-361781 A1 AU 2014-361826 A1 AU 2014-361826 A8 CA 2932475 A1 CA 2932478 A1 CN 106061510 A CN 106536729 A EP 3079725 A1 EP 3079726 A2 JP 2017-501149 A JP 2017-504312 A KR 10-2016-0089526 A US 2015-0232883 A1 US 2016-0340661 A1 WO 2015-089419 A2 WO 2015-089419 A3 WO 2015-089419 A9 WO 2015-089462 A1	2016/06/16 2016/06/23 2016/07/14 2015/06/18 2015/06/18 2016/10/26 2017/03/22 2016/10/19 2016/10/19 2017/01/12 2017/02/09 2016/07/27 2015/08/20 2016/11/24 2015/06/18 2015/09/17 2015/11/05 2015/06/18
JP 2015-177801 A	2015/10/08	AU 2009-221775 A1 AU 2009-221775 A2 AU 2009-221775 B2 CA 2716793 A1 CN 102014932 A CN 102014932 B CN 105267233 A EA 019531 B1 EA 201071033 A1 EA 201301171 A1 EP 2265276 A2 EP 2712926 A2 HK 1220380 A1 JP 2011-518117 A KR 10-1397407 B1 KR 10-2010-0126461 A MX 2010009611 A NZ 588280 A SG 188121 A1 US 2010-0087508 A1 US 2013-0023577 A1 US 2016-0000819 A1 US 9006197 B2 WO 2009-111658 A2 WO 2009-111658 A3	2009/09/11 2010/11/04 2015/05/07 2009/09/11 2011/04/13 2015/11/25 2016/01/27 2014/04/30 2011/04/29 2014/10/30 2010/12/29 2014/04/02 2017/05/05 2011/06/23 2014/06/19 2010/12/01 2010/12/15 2012/11/30 2013/03/28 2010/04/08 2013/01/24 2016/01/07 2015/04/14 2009/09/11 2009/10/29