

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 7 월 25 일 (25.07.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/155111 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12N 9/78 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/000873

(22) 국제출원일:

2024 년 1 월 17 일 (17.01.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0007674 2023 년 1 월 18 일 (18.01.2023) KR

(71) 출원인: 주식회사 엣진 (EDGENE, INC.) [KR/KR];
22013 인천광역시 연수구 인천타워대로 99, 10층
1005-에이-7호, Incheon (KR).

(72) 발명자: 김진수 (KIM, Jin Soo); 22013 인천광역시
연수구 인천타워대로 99, 10층 1005-에이-7호, Incheon
(KR). 이성현 (LEE, Seong Hyun); 22013 인천광역시
연수구 인천타워대로 99, 10층 1005-에이-7호, Incheon
(KR).

(74) 대리인: 최은선 (CHOI, Eun Sun); 06646 서울특별시
서초구 서초대로 48길 20, 4층, Seoul (KR).

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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,

(54) Title: CELL-FREE TEST METHOD FOR MEASURING BASE EDITING ABILITY OF BASE EDITOR

(54) 발명의 명칭: 염기 에디터의 염기 교정 능력을 측정하는 세포의 시험법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for testing genome editing in a cell-free, in vitro system and, in particular, to a method for identifying and quantifying target DNA mutations by a base editor without using eukaryotic cells and without separate complicated experimental procedures. By using the present invention, target DNA mutations can be identified and quantified by a base editor without using cells and without separate complicated experimental procedures. In addition, a base editor having the ability to edit target DNA mutations in actual cells can be screened through a simple cell-free test method.

(57) 요약서: 본 발명은 세포의 시험관 환경(cell-free, in vitro system)에서 유전체 에디팅을 시험할 수 있는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 진핵세포를 사용하지 않고 별도의 복잡한 실험 과정 없이 염기 에디터에 의한 타겟 DNA 변이를 확인하고 정량할 수 있는 방법에 관한 것이다. 본 발명을 사용함으로써, 세포를 사용하지 않고 별도의 복잡한 실험 과정 없이 염기 에디터에 의한 타겟 DNA 변이를 확인하고 정량할 수 있다. 또한, 간편한 세포의 시험법을 통해 실제 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 능력을 갖춘 염기 에디터를 스크리닝할 수 있다.

WO 2024/155111 A1

명세서

발명의 명칭: 염기 에디터의 염기 교정 능력을 측정하는 세포외 시험법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포외 시험관 환경(cell-free, in vitro system)에서 유전체 염기 에디팅을 시험할 수 있는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 세포를 사용하지 않고 별도의 복잡한 실험 과정 없이 염기 에디터에 의한 타겟 DNA 변이를 확인하고 정량할 수 있는 방법이다. 타겟 DNA는 세포로부터 증폭하여 사용할 수 있으나, 보다 유용하게는 이중가닥 DNA 합성을 통해 염기 에디팅을 필요로 하는 생물체(예를 들어 유전병 환자)의 돌연변이 DNA를 모방하여 사용할 수 있다. 특정 돌연변이를 지닌 세포주 또는 모델 동물 없이 DNA 에디팅 효율을 측정함으로써 아데닌 염기 에디터, 시토신 염기 에디터, DdCBE(DddA-derived cytosine base editor), TALED(TALE-linked deaminase), 징크 핑거 탈아미노효소(ZFD(zinc finger deaminase)), CRISPR 시스템 등 다양한 염기 에디터들의 염기 교정 능력에 관한 일차적 시험법으로 사용될 수 있다.

[2]

배경기술

- [3] 게놈 에디팅의 도구로 사용되는 여러 단백질들이 있다. 예를 들어, 염기 에디팅은 Cas9 Nickase(nickase)(nCas9), 촉매능력이 죽은 Cas9(dCas9) 등에 탈아미노효소(deaminase)와 같은 염기-전환 효소(base-converting enzyme)를 연결한 융합단백질을 이용해 이중가닥 절단(double-strand break(DSB))을 일으키지 않고, 예를 들어 A-to-G(아데닌 염기 에디터) 또는 C-to-T(시토신 염기 에디터)와 같은 단일 염기 변이를 유도한다. 프라임 에디팅은 nCas9에 역전사효소를 연결한 융합단백질과 RNA 주형을 포함한 프라임 에디팅 가이드 RNA(pegRNA)를 이용해서 핵 DNA의 특정 위치에 염기 변이와 작은 삽입 또는 결실(인델(indel))을 포함해 다양한 맞춤 변이를 유도하는데 사용된다. 또한, DdCBE 및 TALED 기술은 핵 DNA 뿐 아니라, 세포 소기관 DNA의 시토신 또는 아데닌 염기를 에디팅하여 티민 혹은 구아닌으로 단일염기 변이를 일으킬 수 있다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 게놈 에디팅을 생물체의 내인성(endogenous) 유전자에 적용하여 그 효율을 관찰하는 것은 정상 유전자를 가진 세포주를 사용할 수 있기 때문에 상대적으로 쉬운 반면, 변이를 가진 DNA를 에디팅 타겟으로 하는 실험은 쉽지 않다. 원하는 변이를 갖는 생물체 모델 또는 환자에게서 세포를 분리하고, 일차 세포(primary cell)에 직접 실험하거나 세포주로 제작하여 시험할 수는 있으나 세포의 유지 관

리가 힘들며 상대적으로 긴 시간(예를 들어, 3-4개월)이 소요된다. 이에, 본 발명의 목적은 세포외, 시험관 환경(cell-free, in vitro system)에서 유전체 에디팅을 시험할 수 있는 방법으로서, 세포를 사용하지 않고 별도의 복잡한 실험 과정 없이 염기 에디터에 의한 타겟 DNA 변이를 확인하고 정량할 수 있는 방법을 제공하는 데에 있다. 또한, 그러한 간편한 세포외 시험법을 통해 실제 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 능력을 갖춘 염기 에디터를 스크리닝할 수 있는 방법을 제공하기 위한 것이기도 하다.

[6]

과제 해결 수단

[7] 본 발명에 따른 세포외 시험법은 에디팅 타겟이 되는 단리된 이중가닥 DNA를 세포외 환경에서 염기 에디팅 단백질과 접촉시켜 염기가 교정된 DNA를 얻고, 얻어진 염기 교정된 DNA를 시퀀싱하여 염기 교정 활성을 측정하는 것을 수반한다. 여기서, 염기 에디팅 단백질은 염기 에디팅 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA 포함) 또는 이를 포함하는 벡터의 형태로 타겟 DNA와 함께 하나의 반응 튜브(one pot)에 혼합되어 염기 교정 단백질로서 합성되고, 별도의 단백질 정제 과정 없이 DNA 염기 교정을 위한 반응에 사용될 수도 있고, 발현되고 정제된 형태로 타겟 DNA와 함께 혼합되어 사용될 수도 있다. 타겟 DNA는 핵 DNA, 미토콘드리아 DNA 또는 엽록체 DNA일 수 있으며, 동물 또는 식물의 세포로부터 추출되어 증폭하거나 합성하여 사용할 수 있다. 이와 같이 세포를 사용하지 않고 세포외 환경에서 염기를 교정하더라도 세포 내에서 염기 교정이 이루어졌을 때와 실질적으로 동일한 교정 활성을 보인다는 사실이 처음 확인되었는바, 세포를 사용하는 복잡한 실험 과정 없이도 세포외 환경에서 염기 에디터에 의한 타겟 DNA 변이를 확인하고 염기 교정 능력을 측정함으로써 해당 염기 에디터의 염기 교정 활성을 측정할 수 있게 되었고, 간단한 세포외 시험법만으로도 실제 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 스크리닝할 수 있게 되었다.

[8]

도면의 간단한 설명

[9] 도 1은 본 발명에 따라 세포외 환경에서 DdCBE(DddA-derived cytosine base editor)를 이용하여 인간 미토콘드리아의 ND1 유전자 부위를 대상으로 염기 에디팅한 결과이다. 1397N은 N-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타내고, 1397C는 C-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타낸다. 왼쪽편의 박스로 표시한 부분은 1397N을 포함하는 융합 단백질(left DdCBE)이 인식하는 DNA 서열을 나타내는 것이고, 오른쪽편의 박스로 표시한 부분은 1397C를 포함하는 융합 단백질(right DdCBE)이 인식하는 DNA 서열을 나타내는 것이다. 진한 정도로서 염기 교정의 효율을 표시하였다. 구아닌(G) 염기 위치에도 염기 교정이 된 것으로 표시된 것은 해당 위치에서 염기쌍을 이루는 시토신(C) 염기가 교정된 것을 나타낸다.

[10]

[11] 도 2는 본 발명에 따라 세포외 환경에서 TALED(TALE-linked deaminase)를 이용하여 인간 미토콘드리아의 ND1 유전자 부위를 대상으로 염기 에디팅한 결과이다. 1397N은 N-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타내고, 1397C는 C-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타낸다. 왼쪽편의 박스로 표시한 부분은 1397C 및 TadA8e와 연결된 TALE 단백질을 포함하는 융합 단백질(left split TALED(sTALED))이 인식하는 DNA 서열을 나타내는 것이고, 오른쪽편의 박스로 표시한 부분은 1397N과 연결된 TALE 단백질을 포함하는 융합 단백질(right split TALED(sTALED))이 인식하는 DNA 서열을 나타내는 것이다. 진한 정도로서 염기 교정의 효율을 표시하였다. 티민(T) 염기 위치에도 염기 교정이 된 것으로 표시된 것은 해당 위치에서 염기쌍을 이루는 아데닌(A) 염기가 교정된 것을 나타낸다. 시토신(C) 염기가 교정된 것은 TALED에 포함된 DddA_{tox}로 인해 C-to-T 교정이 일어난 결과이고, 구아닌(G) 염기 위치에도 염기 교정이 된 것으로 표시된 것은 해당 위치에서 염기쌍을 이루는 시토신(C) 염기가 교정된 것을 나타낸다.

[12]

[13] 도 3은 본 발명에 따라 세포외 환경에서 인간 미토콘드리아의 ND1 유전자 부위를 대상으로 DdCBE를 이용하여 C-to-T 교정한 결과 및 TALED를 이용하여 A-to-G 교정한 결과와, HEK293T 세포에 동일한 DdCBE를 적용하여 C-to-T 교정한 결과 및 동일한 TALED를 적용하여 A-to-G 교정한 결과를 비교한 것이다. IVTT는 본 발명에 따른 세포외 시험법으로 염기 교정이 행해진 것을 나타내는 것이고, HEK293T는 HEK293T 세포를 이용해서 염기 교정이 행해진 것을 나타내는 것이다.

[14]

[15] 도 4는 본 발명에 따라 세포외 환경에서 인간 미토콘드리아의 ND1 유전자 부위를 대상으로 DdCBE를 이용하여 얻은 C-to-T 교정 효율 및 TALED를 이용하여 얻은 A-to-G 교정 효율과, HEK293T 세포에 동일한 DdCBE를 적용하여 얻은 C-to-T 교정 효율 및 동일한 TALED를 적용하여 얻은 A-to-G 교정 효율을 막대 그래프로 비교한 것이다.

[16]

[17] 도 5는 본 발명에 따라 세포외 환경에서 TALED를 이용하여 레베르 유전성 시신경병증(LHON) 환자의 미토콘드리아의 ND1 유전자를 구성하는 G3460A 변이(미토콘드리아의 3460번째 염기가 G가 아닌 A로 되어 있는 변이)를 대상으로 A-to-G 염기 교정한 결과이다. m.A3460G는 G3460A 변이에 대해 A-to-G 교정을 행한다는 의미이다. 1397N은 N-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타내고, 1397C는 C-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타낸다. 왼쪽편의 박스로 표시한 부분은 TALE과 1397C 및 TadA8e를 포함하는 융합 단백질(17 C 또는 18 C)이 인식하

는 DNA 서열을 나타내는 것이고, 오른쪽편의 박스로 표시한 부분은 TALE 및 1397N을 포함하는 융합 단백질(56 N 또는 57 N)이 인식하는 DNA 서열을 나타낸 것이다. 박스친 "A"가 G3460A 변이를 나타내는 것이고, 진한 정도로서 염기 교정의 효율을 표시하였다. 오른쪽의 막대 그래프는 3460A→G 교정 효율을 보여주는 것이다.

[18]

[19] 도 6는 UDC cell에서 TALED를 이용하여 LHON 환자의 미토콘드리아의 ND1 유전자를 구성하는 G3460A 변이를 대상으로 A-to-G 염기 교정한 결과이다. 1397N은 N-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타내고, 1397C는 C-말단 쪽 G1397 DddA_{tox} 분할체를 나타낸다. 왼쪽편의 박스로 표시한 부분은 TALE과 1397C 및 TadA8e를 포함하는 융합 단백질(17 C 또는 18 C)이 인식하는 DNA 서열을 나타내는 것이고, 오른쪽편의 박스로 표시한 부분은 TALE 및 1397N을 포함하는 융합 단백질(56 N 또는 57 N)이 인식하는 DNA 서열을 나타낸 것이다. 박스친 "A"가 G3460A 변이를 나타내는 것이고, 진한 정도로서 염기 교정의 효율을 표시하였다. 오른쪽의 막대 그래프는 3460A→G 교정 효율을 보여주는 것이다.

[20]

[21] 도 7은 도 5에 나타난 융합 단백질 17 C와 융합 단백질 57 N을 염기 에디터로 사용하여 얻은 세포외 염기 교정 효율과, 도 6에 나타난 동일한 염기 에디터를 사용하여 얻은 세포내 염기 교정 효율을 막대 그래프로 비교한 것이다.

[22]

[23] 도 8은 도 5에 나타난 융합 단백질 18 C와 융합 단백질 56 N을 염기 에디터로 사용하여 얻은 세포외 염기 교정 효율과, 도 6에 나타난 동일한 염기 에디터를 사용하여 얻은 세포내 염기 교정 효율을 막대 그래프로 비교한 것이다.

[24]

[25] 도 9는 도 5에 나타난 융합 단백질 18 C와 융합 단백질 57 N을 염기 에디터로 사용하여 얻은 세포외 염기 교정 효율과, 도 6에 나타난 동일한 염기 에디터를 사용하여 얻은 세포내 염기 교정 효율을 막대 그래프로 비교한 것이다.

[26]

[27] 도 10은 도 5에 나타난 염기 에디터들을 사용하여 얻은 3460A→G 염기 교정 효율과 도 6에 나타난 동일한 염기 에디터들을 사용하여 얻은 3460A→G 염기 교정 효율을 막대 그래프로 비교한 것이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 다른 방식으로 정의되지 않는한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 용어들은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것들이다.

[30]

[31] 본 명세서에서 사용되는 용어 "교정", "편집" 및 "에디팅"은 상호 호환적으로 사용가능하고, 특이적 게놈 표적의 선택적 변이에 의해서 핵산 서열을 변경시키는 방법을 의미한다. 이러한 특이적 게놈 표적은 유전자, 프로모터, 오픈 리딩 프레임 또는 임의의 핵산 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[32]

[33] 본 명세서에서 사용되는 용어 "염기 에디터", "염기 에디팅 시스템" 및 "염기 교정 시스템"은 상호 호환적으로 사용가능하고, 게놈 표적의 선택적 변이에 의해서 핵산 서열을 변경시키는 활성을 갖는 물질을 의미하며, 하나 이상의 서로 다른 염기 에디터의 조합을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "염기 에디터", "염기 에디팅 시스템" 또는 "염기 교정 시스템"은 문맥에 따라 폴리펩티드(융합 단백질일 수 있음) 또는 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 조합의 형태일 수 있고, 하나 이상의 폴리펩티드(융합 단백질일 수 있음) 또는 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물일 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "염기 교정 시스템" 또는 "염기 교정 조성물"은 하나의 염기 에디터 또는 둘 이상의 서로 다른 염기 에디터의 조합을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 서로 다른 염기 에디터는 동시에 사용될 수도 있고 별도로 사용될 수도 있다.

[34]

[35] 본 발명에 따른 염기 교정 시스템의 표적 DNA 변이를 교정하는 능력은 염기 교정 단백질에 의해 제공되며, 상기 염기 교정 단백질은 적어도 DNA 결합 단백질 및 염기-전환 단백질을 포함하기 때문에 "융합 단백질"이라고도 칭해진다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 "염기 교정 시스템" 또는 "염기 에디터"는 하나 이상의 융합 단백질 형태일 수도 있고, 상기 하나 이상의 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA) 형태일 수도 있고, 단백질과 폴리뉴클레오티드의 조합(예를 들어, 염기 교정 단백질(융합 단백질)과 가이드 RNA를 포함하는 경우)일 수도 있다.

[36]

[37] 본 명세서에서 사용되는 용어 "표적", "타겟", "표적 부위" 또는 "타겟 부위"는 임의의 조성 및/또는 길이의 사전에 확인된 핵산 서열을 의미한다. 이러한 표적 부위는 유전자, 프로모터, 오픈 리딩 프레임 또는 임의의 핵산 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[38]

[39] 본 명세서에서 사용되는 용어 "cell free, in vitro", "세포외 시험관 환경" 또는 "세포외"는 세포(세포를 포함하는 조직, 기관, 유기체(organism)을 포함)를 사용하지 않는 시험관 환경을 의미하며, 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포외 시험법"은 세포(세포를 포함하는 조직, 기관, 유기체(organism)을 포함)를 사용하지 않는 시험법을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "in vitro coupled transcription/translation", "IVTT" 또는 "시험관내 전사 및 번역 반응"은 상기 "세포외 시험관 환

경"에서 염기 교정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA)가 전사 또는 전사 및 번역을 거친 후 기능성 염기 교정 단백질로서 염기 교정 활성을 발휘하게끔 하는 시스템을 의미한다.

[40]

[41] 본 발명은

[42] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 염기 교정 시스템에 사용되는 하나 이상의 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계;

[43] (b) 단계 (a)로부터 얻어진 DNA를 시퀀싱하여, 상기 염기 교정 시스템의 염기 교정 활성을 측정하는 단계, 및

[44] (c) 상기 염기 교정 시스템이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계

[45] 를 포함하는 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[46]

[47] 상기 방법에 따라 제공되는 정보는 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "DNA 변이를 교정하는 능력"은 실제 세포 내에서 DNA 변이를 교정하는 능력을 의미한다. 상기 "DNA 변이를 교정하는 능력"에 관한 정보는 관심있는 DNA 변이(또는 오프-타겟 변이)를 일으키는 지 일으키지 않는지에 관한 정성적인 정보일 수도 있고, 관심있는 DNA 변이(또는 오프-타겟 변이)를 얼마나 일으키는지에 관한 정량적인 정보일 수도 있다. 상기 정량적인 정보는 예를 들어서, 0.5% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상, 19% 이상, 또는 20% 이상의 효율로 DNA 염기를 교정한다는 것일 수 있다.

[48]

[49] 염기 교정 효율은 염기 교정이 행해진 DNA에 대한 전체 시퀀싱 판독결과 중 염기 교정의 결과가 반영된 시퀀싱 판독물의 백분율 값으로 표현될 수 있으며, 염기 교정 빈도라고 표현될 수도 있다.

[50]

[51] 본 발명에 따른 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법은 실제 세포에서 사용할 수 있는 염기 에디터를 스크리닝하는 방법의 일부일 수 있다.

[52]

[53] 구체적으로, 본 발명은 다음 단계들을 포함하는 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

[54] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 후보 염기 에디터들과 접촉시키는 단계로서, 상기 후보 염기 에디터들은 각각 독립적으로 하나

이상의 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 단계;

[55] (b) (a) 단계로부터 얻어진 DNA 분자들을 시퀀싱하여, 상기 후보 염기 에디터들의 염기 교정 활성을 측정하는 단계;

[56] (c) 상기 후보 염기 에디터들이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계; 및

[57] (d) (c) 단계로부터 얻어진 정보를 기초로, 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 선별하는 단계.

[58]

[59] 본 명세서에서 사용되는 "측정"이라는 용어는 염기 변이가 일어난 빈도를 정량적으로 결정하는 것뿐 아니라, 염기 변이가 일어났는지 여부를 정성적으로 확인하는 것을 포괄한다. 염기 변이가 일어났는지 여부는 전형적으로는, 생명공학 기술 분야에 널리 알려진 DNA 시퀀싱 기법을 통해 확인할 수 있다.

[60]

[61] 본 명세서에서 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 염기 교정 시스템에 사용되는 하나 이상의 염기 교정 단백질과 접촉시킨다고 할 때에는, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 염기 교정 단백질을 각각 반응물의 형태로서 반응 튜브에 첨가하는 것뿐 아니라, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA에 염기 교정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 DNA 또는 mRNA (또는 이를 포함하는 벡터)의 형태로 혼합하여, 시험관 내 전사 및/또는 번역 과정의 산물로서 얻어지는 염기 교정 단백질이 타겟 DNA와 반응하는 것을 포함한다.

[62]

[63] 본 발명에 따른 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계는, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 하나 이상의 염기 교정 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 혼합하고, 상기 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA 포함)가 세포 외에서 전사되고 번역되는 것을 수반하는 것일 수 있다.

[64]

[65] 본 발명에 사용되는 염기 교정 단백질은 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA 포함) 또는 이를 포함하는 벡터의 형태로 타겟 DNA와 함께 하나의 반응 튜브에 혼합되어 별도의 단백질 정제 과정 없이 염기 교정 단백질 발현 및 DNA 염기 교정을 위한 반응에 사용될 수 있다. 예를 들어, 발현용 플라스미드를 사용할 수 있고, 상기 플라스미드는 예를 들어 T7 프로모터 또는 SP6 프로모터를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 위와 같은 방법은 플라스미드 DNA와 타겟 DNA를 시험관내 전사 및 번역을 위한 반응물들과 함께 하나의 반응 튜브에 섞은 후 합성된 단백질을 별도로 정제하는 과정 없이 진행될 수 있다.

염기 교정 단백질의 발현 및 DNA 염기 교정은 하나의 튜브에서 원포트(one-pot) 반응을 통해 이루어질 수 있다.

[66]

[67] 본 발명에 따른 세포외 시험법을 위한 반응 시스템은 시험관내 전사 및 번역 반응을 위한 인자 및 효소, 반응 시스템에 요구되는 다른 효소, 여러가지 기질, 완충액 및 염들을 포함할 수 있고, 또한 DNA 교정 과정에 필요한 DNA 복제와 관련된 효소 및 반응물들이 첨가될 수 있다. 상기 반응 시스템에 포함되는 구성성분들에는 예를 들어, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 4가지 염기(아데닌, 시토신, 구아닌 및 우라실)에 대한 NTP(리보뉴클레오타이드 트리포스페이트)들, 캡 아날로그, 리보뉴클레아제 억제제, 프로테아제 억제제, 아미노산 혼합물, tRNA, 아미노아실-tRNA 합성효소, 메티오닐-tRNA 트랜스포밀라제, rRNA를 포함하는 리보솜, 개시 인자(initiation factor), 신장 인자(elongation factor), 종결 인자(termination factor), 피로인산가수분해효소, $MgCl_2$, 산화방지제, 완충액, 폴리아민 등으로부터 선택되는 하나 이상이 포함될 수 있으며, 상기 성분들(특히 단백질 합성에 필요한 성분들)의 전부 또는 일부는 세포 용균물(예를 들어, reticulocyte 용균물)의 형태로 제공될 수도 있다.

[68]

[69] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 전사 및 번역 반응은 통상 알려진 반응 조건 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 20-40°C의 온도에서 4-20시간 반응시킬 수 있고, 바람직하게는 30°C에서 6시간 반응시킨 후, 37°C에서 16시간 반응시킬 수 있다.

[70]

[71] 전사 또는 번역 반응을 위한 인자와 효소 이외에 추가될 수 있는 효소의 예로는 크레아틴 키나제, 미오키나제 및 뉴클레오시드 디포스페이트 키나제 등과 같은 반응 시스템에서 재생하는 에너지를 위한 효소 및 무기 피로포스파타제와 같이 전사 또는 번역 반응이 수행되는 동안에 형성되는 무기 피로인산을 가수분해하는 효소를 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[72]

[73] 여러가지 기질의 예로는 정상적인 아미노산, 에너지원인 뉴클레오타이드 트리포스페이트, 크레아틴 포스페이트 및 포르밀엽산 등을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 ATP, GTP, CTP 및 UTP를 포함한다.

[74]

[75] 완충액으로는 예를 들어, 인산칼륨 완충액을 사용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 염으로는 예를 들어, 글루탐산칼륨, 염화암모늄, 아세트산마그네슘, 염화칼슘, 푸트레신, 스퍼미딘 및 디티오프레이톨을 사용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[76]

- [77] 본 발명에 따른 세포외 시험법 중 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계는 염기 교정 단백질에 의해 타겟 DNA 변이가 교정되는 과정을 포함한다. 상기 염기 교정 반응은, 염기 교정 단백질과 타겟 DNA와의 접촉이 이루어진 후, DNA 복제 과정이 이루어짐으로써 수행된다.
- [78]
- [79] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 단백질이 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA 포함) 또는 이를 포함하는 벡터의 형태로 제공되는 경우, 상기 염기 교정 단백질의 발현 및 DNA 염기 교정은 하나의 튜브에서 원포트(one-pot) 반응을 통해 이루어질 수 있으며, 예를 들어 시험관내 전사 및 번역 반응을 위한 반응을 완료한 후, 반응이 완료된 튜브를 그대로 PCR 과정에 적용시킬 수 있다.
- [80]
- [81] 본 발명에 따른 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계는, 세포 외에서 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 염기 교정 단백질을 직접 혼합하는 것을 수반할 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법 중 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 염기 교정 단백질과 접촉하는 단계는 염기 교정 단백질에 의해 타겟 DNA 변이가 교정되는 과정을 포함한다. 상기 염기 교정 반응은, 염기 교정 단백질과 타겟 DNA와의 접촉이 이루어진 후, DNA 복제 과정이 이루어짐으로써 수행된다.
- [82]
- [83] 이 경우, 본 발명에 사용되는 염기 교정 단백질은 별도로 발현되고/거나 정제된 형태로 타겟 DNA와 함께 혼합된다. 염기 교정 단백질을 발현시키고 정제하는 방법은 생물공학 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.
- [84]
- [85] 본 발명의 일 측면은, 본 발명에 따른 세포외 염기 교정 능력 시험법에 사용하기 위한 IVTT 키트(조성물)에 관한 것이다. 상기 키트는 시험관내 전사 및 번역 반응을 위한 인자 및 효소, 반응 시스템에 요구되는 다른 효소, 여러가지 기질, 완충액 및 염들을 포함할 수 있고, 또한 DNA 교정 과정에 필요한 DNA 복제와 관련된 효소 및 반응물들이 첨가될 수 있다. 상기 키트에 포함되는 구성성분들에는 예를 들어, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 4가지 염기(아데닌, 시토신, 구아닌 및 우라실)에 대한 NTP(리보뉴클레오티드 트리포스페이트)들, 캡 아날로그, 리보뉴클레아제 억제제, 프로테아제 억제제, 아미노산 혼합물, tRNA, 아미노아실-tRNA 합성효소, 메티오닐-tRNA 트랜스포밀라제, rRNA를 포함하는 리보솜, 개시 인자(initiation factor), 신장 인자(elongation factor), 종결 인자(termination factor), 피로인산가수분해효소, $MgCl_2$, 산화방지제, 완충액, 폴리아민 등으로부터 선택되는 하나 이상이 포함될 수 있으며, 상기 성분들(특히 단백질 합성에 필요한 성분들)의 전부 또는 일부는 세포 용균물(예를 들어, reticulocyte 용균물)의 형태로 제공

될 수도 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법은 염기 교정 시스템으로 사용되는 염기 교정 단백질(들)을 암호화하는 DNA를 상기 키트 조성물과 혼합한 후, DNA 전사 및 번역, 그리고 DNA 염기 교정을 허용케 하는 반응 조건 하에서 반응시키는 것을 수반할 수 있다.

[86]

[87] 본 발명에서, 염기 교정 단백질에 의한 교정 반응을 통해 얻어진 염기 교정된 DNA를 비롯한 반응 생성물들(상기 단계 (a)를 통해 얻어진 생성물들)은 별도의 정제 없이 곧바로 시퀀싱을 통한 염기 교정 활성 측정 단계(상기 단계 (b))에 사용될 수 있다. DNA의 시퀀싱 방법으로는, targeted deep sequencing 또는 Sanger sequencing 기법 등 생명공학 기술분야에서 널리 알려진 통상의 기법을 사용할 수 있다.

[88]

[89] 놀랍게도, 본 발명에 따라 세포를 사용하지 않고 세포외 환경에서 염기를 교정하고 그 염기 교정 결과를 측정한 결과, 세포 내에서 염기 교정을 수행한 후 그 염기 교정 결과를 측정한 결과와 사실상 동일함이 실험적으로 확인되었다. 여기서, 염기 교정 결과가 사실상 동일하다는 것은, 염기 서열에 따른 염기 교정 여부 및/또는 빈도의 경향성이 동일하다는 것을 의미한다. 구체적으로, 세포외 환경에서 염기를 교정하였을 때 교정된 것으로 확인된 염기 서열은, 실제 세포 내에서 염기 교정을 수행하였을 때에도 동일하게 교정되었음이 확인되었다. 또한, 세포외 환경에서 상대적으로 높은 빈도로 염기 교정이 이루어진 염기 서열은, 실제 세포 내에서 염기 교정을 수행하였을 때에도 상대적으로 높은 빈도로 염기 교정이 이루어짐이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따라 특정 타겟 DNA를 대상으로 세포외에서 염기 교정을 수행하였을 때 목적하는 서열 부위에서 원하는 서열 교정이 이루어진 것을 확인하였다면, 이는 실제 세포 내에서도 동일한 서열 부위에서 원하는 서열 교정이 이루어질 가능성이 매우 높다는 것을 의미하기 때문에, 다양한 염기 에디터들의 일차적 시험법으로서 매우 유용하게 사용될 수 있다. 종래에는 세포를 이용해서 시험하지 않고서는 염기 에디터의 염기 교정 활성/능력을 결정할 수 없다고 여겨졌기 때문에, 본 발명에서와 같은 세포외 시험법을 통해 염기 에디터의 염기 교정 능력을 결정하는 방법이 시험되거나 기술된 바 없었다.

[90]

[91] 세포 내에서 유전자 교정효율을 관찰하기 위해서는 먼저 세포를 배양해야 한다. 이때 세포의 종류와 유전자 교정을 일으키는 물질의 조합 수, 즉 스크리닝 갯수에 따라 형질주입을 하기 위한 적절한 세포 수를 확보하기까지 일반적으로 1 내지 3일, 계대 배양까지 필요로 할 경우에는 5 내지 6일 정도의 시간이 소요된다. 반면, IVTT 키트를 사용하여 세포외 조건에서 유전자 교정효율을 관찰하기 위해서는, IVTT 키트 조성물에 타겟 DNA와, 유전자 교정 단백질을 코딩하는 DNA를 섞어서, 예를 들어 30°C에서 6시간, 37°C에서 16시간 인큐베이션시키고, PCR을 수행하기만 하면 된다. 상기 인큐베이션은 PCR 기기에서 이루어질 수도

있다. 세포 실험은 3 내지 12일 정도의 시간을 필요로 하는 반면, 본 발명의 IVTT 시스템을 이용한 세포외 실험은 하루만에 가능하다.

[92]

[93] 이후 라이브러리 제작 과정에도 세포를 이용해서 염기 교정 능력을 측정하는 경우에는 세포를 용해시키는 과정이 필요하며, 이를 주형으로 하여 nested 1차 PCR를 수행한 후, 1차 PCR 산물을 주형으로 하여 2차 PCR을 수행하고, 다시 2차 PCR 산물을 주형으로 해서 인덱스 함유 프라이머를 사용하여 3차 PCR을 수행하여 최종 인덱스 서열을 추가하는 과정을 거치게 된다. 그러나, IVTT 시스템을 이용한 세포외 조건에서는 위 PCR 시스템으로 30 °C 6시간, 37 °C 16시간 인큐베이션하고, 얻어진 것을 주형으로 하여 2차 PCR 부터 진행하는 것으로 충분하다.

[94]

[95] 이처럼, 본 발명의 IVTT 시스템은 세포를 이용해서 실험하는 것보다 더 간단하며, 시간을 단축시킬 수 있다는 이점이 있다. 치료제 개발을 목적으로 하는 경우에도, 일반적으로는, 돌연변이된 세포가 필요하고, 세포 내에 유전자 교정물질을 형질주입하기 위한 방법과 조건이 세포에 따라 달라지는 경우가 많다. 반면, 본 발명의 IVTT 시스템을 이용하면 돌연변이된 DNA를 직접 제작할 수 있으며, 형질주입 과정이 생략되므로 조건을 최적화할 필요가 없다는 장점이 있다.

[96]

[97] 본 발명에 사용되는 타겟 DNA는 하나 이상의 단일 염기 유전 변이를 포함할 수 있다. 유전되는 단일 염기 돌연변이를 교정하기 위한 염기 교정 시스템의 염기 교정 능력을 확인하는 것은, 해당 유전 변이를 갖는 식물 또는 동물(예를 들어, 유전병 환자)로부터 세포를 분리해야 하기 때문에 특히 쉽지 않다. 따라서, 본 발명에 따른 세포외 시험법만을 수행하더라도 세포 내에서 염기 교정이 이루어졌을 때와 실질적으로 동일한 교정 활성을 확인할 수 있다는 효과는 유전병에서와 같은 유전 변이를 교정하는 기술을 개발함에 있어 특히 유용할 수 있다.

[98]

[99] 본 발명에 사용되는 단리된 타겟 DNA는 핵 DNA, 또는 세포소기관 DNA일 수 있다. 상기 세포소기관 DNA는 미토콘드리아 DNA 또는 엽록체 DNA일 수 있으며, 동물 또는 식물의 세포로부터 추출되어 증폭된 것이거나 합성된 것일 수 있다. 예를 들어, 단리된 타겟 DNA는 유전병을 가진 인간의 핵 DNA 이거나 미토콘드리아 DNA일 수 있다. 이중가닥 DNA를 세포로부터 추출하여 증폭하는 방법이나, 그 서열을 기초로 화학적으로 합성하는 방법은 생명공학 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.

[100]

[101] 본 발명에 따른 세포외 시험법을 통해 염기 교정 능력을 측정할 수 있는 염기 교정 시스템은 아데닌(A) 염기를 구아닌(G), 시토신(C) 또는 티민(T)으로 교정하는 활성을 갖거나, 구아닌(G) 염기를 아데닌(A), 시토신(C) 또는 티민(T)으로 교정하는 활성을 갖거나, 시토신(C) 염기를 아데닌(A), 구아닌(G) 또는 티민(T)으로 교

정하는 활성을 갖거나, 티민(T) 염기를 아데닌(A), 구아닌(G) 또는 시토신(C)으로 교정하는 활성을 갖거나, 이들 활성들 중 하나 이상을 가질 수도 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 세포외 시험법을 통해 염기 교정 능력을 측정할 수 있는 염기 교정 시스템은 아데닌(A) 염기를 구아닌(G)으로 교정하는 활성을 갖거나, 시토신(C) 염기를 티민(T)으로 교정하는 활성을 갖거나, 두 가지 활성을 모두 가질 수 있다.

[102]

[103] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로 하나 이상의 염기-전환 효소를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 염기 교정 단백질은 타겟 DNA의 이중가닥 절단을 일으키지 않는 것을 특징으로 한다.

[104]

[105] 본 명세서에서 사용되는 용어 "염기-전환 효소"는 DNA 염기의 퓨린 또는 피리미딘 고리의 치환기를 다른 기 또는 원자로 전환시키는 반응을 촉매하거나, DNA의 N-글리코시드 결합을 가수분해하여 DNA 염기를 제거하는 반응을 촉매하여, 표적 염기가 결국에(DNA 복제 및/또는 수선 기구를 통해) 다른 종류의 염기로 전환(교정)되는 과정에 관여하는 효소를 의미한다. DNA 염기의 퓨린 또는 피리미딘 고리의 치환기를 다른 기 또는 원자로 전환시키는 반응을 촉매하는 유형의 염기-전환 효소에는 탈아미노효소가 포함되고, DNA의 N-글리코시드 결합을 가수분해하여 DNA 염기를 제거하는 반응을 촉매하는 유형의 염기-전환 효소에는 DNA 글리코실라제가 포함된다.

[106]

[107] 예를 들어, 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 포함될 수 있는 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로 시토신 탈아미노효소 및/또는 아데닌 탈아미노효소를 염기-전환 효소로서 포함할 수 있다.

[108]

[109] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 사용될 수 있는 시토신 탈아미노효소는 시토신 염기를 우리딘으로 전환시키는 활성을 갖는 임의의 아미노기 이탈 효소를 의미하는 것으로서, 조류(algae), 박테리아, 진균류, 식물, 무척추동물 및 포유동물을 포함하지만 여기에 한정되지는 않는 임의의 생물체(예를 들어, 진핵생물 또는 원핵생물)로부터 유래되거나 변이된(예를 들어, 엔지니어링되거나 진화된) 것일 수 있다. 예를 들어, APOBEC(apolipoprotein B editing complex), AID(activation-induced deaminase), 박테리아 아데닌 탈아미노효소인 TadA(tRNA-specific adenosine deaminase) 또는 이의 오솔로그(ortholog)에서 유래되거나 변이된 시토신 탈아미노효소, 또는 박테리아 시토신 탈아미노효소인 DddA 또는 이의 오솔로그(ortholog)에서 유래되거나 변이된 시토신 탈아미노효소 또는 그의 분할체일 수 있다. 상기 언급된 TadA로부터 변이된 시토

신 탈아미노효소는 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 6, 26, 27, 28, 46, 48, 49, 61, 74, 76, 77, 82, 96, 107, 108, 112, 114, 115, 119, 122, 127, 142, 143, 151, 154 및 158번째 아미노산 잔기 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 변이된 것일 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 27번째 아미노산이 리신으로 변이되고 28번째 아미노산이 알라닌으로 변이되고 61번째 아미노산이 이소류신으로 변이되고 96번째 아미노산이 아스파라진으로 변이된 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 시토신 탈아미노효소의 구성에 관해서는 전체로서 본 출원에 참고로 포함되는 국제특허출원 공개공보 WO 2022/060185, WO 2023/086953 등을 비롯하여 본 출원 이전에 이미 알려져 있는 내용들이 인용될 수 있다.

[110]

[111] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 시토신 탈아미노효소가 포함되는 경우, 시토신 탈아미노효소는 제1 분할체 및 제2 분할체의 형태로 포함될 수 있고, 전장(full-length)의 형태로 포함될 수도 있다. 제1 분할체 및 제2 분할체의 형태를 갖는 경우, 상기 제1 분할체 및 제2 분할체는 각각 서로 다른 DNA 결합 단백질에 연결되는 형태를 갖는다.

[112]

[113] 본 명세서에서, 두 단백질이 "연결"된다고 하는 것은 직접 연결된 것일 수도 있고, 링커나 다른 단백질(들)을 통해서 간접적으로 연결된 것일 수도 있다.

[114]

[115] 본 발명에 사용되는 시토신 탈아미노효소는 DddA_{tox}일 수 있는데, DddA_{tox}는 *Burkholderia cenocepacia*에서 유래된 박테리아 독소 중 효소 기능을 발휘하는 부분으로서, 이중나선 DNA의 시토신을 탈아미노화할 수 있다. DddA_{tox}는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[116]

[117] 서열번호 2: wild-type DddA_{tox}

[118] GSYALGPYQISAPQLPAYNGQTVGTFYYVNDAGGLESKVF
SSGGPTPYPNYANAGHVEGQSALFMRDNGISEGLVFHNNP
EGTCGFCVNMETLLPENAKMTVVPPEGAIPVKRGATGET
KVFTGNSNSPKSPTKGGC

[119]

[120] DddA_{tox}는 세포에 독성을 주기 때문에 숙주세포에서의 독성을 피하기 위해 2개의 비활성화된 분할체(split), 즉 제1 분할체 및 제2 분할체의 형태로 나누어 사용될 수 있다. 본 발명에 사용되는 시토신 탈아미노효소가 제1 분할체 및 제2 분할체의 형태로 사용되는 경우, 상기 제1 분할체와 제2 분할체 각각은 탈아미노활성이 없다.

[121]

- [122] 상기 DddA_{tox} 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 N 말단에서부터 G33, G44, A54, N68, G82, N98, 또는 G108까지의 서열을 포함할 수 있고, 제2 분할체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 G34, P45, G55, N69, T83, A99, 또는 A109로부터 C 말단까지의 서열을 포함할 수 있다.
- [123]
- [124] 바람직하게는, DddA_{tox} 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 N 말단에서부터 G44까지의 서열(하기 서열번호 3)을 포함하고, 제2 분할체는 P45에서부터 C 말단까지의 서열(하기 서열번호 4)을 포함할 수 있다.
- [125]
- [126] 서열번호 3: wild-type DddA_{tox} G1333-N
- [127] GSYALGPYQISAPQLPAYNGQTVGTFYYVNDAGGLESKVFSGG
- [128]
- [129] 서열번호 4: wild-type DddA_{tox} G1333-C
- [130] PTPYPNYANAGHVEGQSALFMRDNGISEGLVFHNNPEGTC
GFCVNMETETLLPENAKMTVVPPEGAIPVKRGATGETKVFT
GNSNSPKSPTKGGC
- [131]
- [132] 바람직하게는, DddA_{tox} 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 N 말단에서부터 G108까지의 서열(하기 서열번호 5)을 포함하고, 제2 분할체는 A109에서부터 C 말단까지의 서열(하기 서열번호 6)을 포함할 수도 있다.
- [133]
- [134] 서열번호 5: wild-type DddA_{tox} G1397-N
- [135] GSYALGPYQISAPQLPAYNGQTVGTFYYVNDAGGLESKV
SSGGPTPYPNYANAGHVEGQSALFMRDNGISEGLVFHNNP
EGTCGFCVNMETETLLPENAKMTVVPPEG
- [136]
- [137] 서열번호 6: wild-type DddA_{tox} G1397-C
- [138] AIPVKRGATGETKVFTGNSNSPKSPTKGGC
- [139]
- [140] 시토신 탈아미노효소로서 DddA_{tox}의 제1 분할체 및 제2 분할체가 사용되는 경우, 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체와 제2 분할체가 서로 결합하는 표면에 위치하는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, DddA_{tox}의 제1 분할체 및 제2 분할체는 각각 서열번호 3(G1333-N) 및 서열번호 4(G1333-C)의 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이 경우 상기 서열번호 3의 3, 5, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 28, 30 및 31번 위치로 구성된 군에서 선택되는

하나 이상 또는 상기 서열번호 4의 13, 16, 17, 20, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 56, 57, 58 및 60번 위치로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 예로서, DddA_{tox}의 제1 분할체는 서열번호 5(G1397-N) 및 서열번호 6(G1397-C)의 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이 경우 상기 서열번호 5의 87, 88, 91, 92, 95, 100, 101, 102 및 103번 위치로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상 또는 상기 서열번호 6의 13, 14, 15 및 16번 위치로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 "다른 아미노산"은 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 발린, 아스파라긴산, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 히스티딘, 라이신, 및 상기 아미노산들의 공지된 모든 변형체 중에서, 야생형 단백질이 원래 변이 위치에 갖는 아미노산을 제외한 아미노산들 중에서 선택된 아미노산을 의미한다. 이러한 변이체를 사용하게 되면, 각각 DNA 결합 단백질에 연결된 두 개의 DddA_{tox} 분할체 쌍이 DNA에 결합하지 못할 경우 제대로 된 기능을 수행하지 못함으로써, 원치 않는 비표적 C-to-T 교정을 일으키지 않고 매우 효율적이고 정밀한 C-to-T 교정을 일으킬 수 있다. 이러한 변이체의 예로서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 DddA_{tox}의 제1 분할체("G1397-N" 또는 "G1397N"이라 칭해질 수 있음) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 DddA_{tox}의 제2 분할체("G1397-C" 또는 "G1397C"라 칭해질 수 있음)를 들 수 있다.

[141]

[142] 본 명세서에서, "G1333-N", "G1333N" 또는 "1333N"이라는 용어는, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 wild-type DddA_{tox}의 제1 분할체 또는 그의 아미노산 변이체를 의미할 수 있고, "G1333-C", "G1333C" 또는 "1333C"라는 용어는, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 wild-type DddA_{tox}의 제2 분할체 또는 그의 아미노산 변이체를 의미할 수 있다.

[143]

[144] 본 명세서에서, "G1397-N", "G1397N" 또는 "1397N"이라는 용어는, 서열번호 5 또는 7의 아미노산 서열을 갖는 wild-type DddA_{tox}의 제1 분할체 또는 그의 아미노산 변이체를 의미할 수 있고, "G1397-C", "G1397C" 또는 "1397C"라는 용어는, 서열번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 갖는 wild-type DddA_{tox}의 제2 분할체 또는 그의 아미노산 변이체를 의미할 수 있다.

[145]

[146] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 사용되는 시토신 탈아미노효소는 전장의 형태로 사용될 수도 있고, 이 때 사용되는 전장의 시토신 탈아미노효소(예를 들어, DddA_{tox})는 독성이 없거나 낮은 독성만을 갖도록 아미노산 서열이 변형된 것이다. DddA_{tox}의 C-말단에는 양전하를 가지는 아미노산이 특이적으로 몰려있다. DNA는 음전하를 띄기 때문에 단백질의 양전하

성질을 가지는 아미노산과 결합한다. 이 양전하를 가지는 아미노산을 치환하여 DddA_{tox}가 DNA와 결합하는 힘을 약하게 하여 세포내 독성을 낮추거나 제거할 수 있다. 즉, 양전하를 가지는 아미노산을 치환하여 독성을 가지지 않게 되면 대장균을 이용한 클로닝이 가능하여 전장 DddA_{tox}를 확보할 수 있다. 이러한 비독성 전장 시토신 탈아미노효소는 서열번호 2의 야생형 아미노산 서열 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 제공될 수 있다. 상기 "다른 아미노산"은, 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 발린, 아스파라긴산, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 히스티딘, 라이신, 및 상기 아미노산들의 공지된 모든 변형체 중에서, 야생형 단백질이 원래 변이 위치에 갖는 아미노산을 제외한 아미노산들 중에서 선택된 아미노산을 의미한다. 예를 들어, 상기 다른 아미노산은 알라닌일 수 있다.

[147]

[148] 예를 들어, 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 포함될 수 있는 전장 시토신 탈아미노효소 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 37번 위치의 S의 G로의 치환, 59번 위치의 G의 S로의 치환, 109번 위치의 A의 V로의 치환 및 129번 위치의 S의 G로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 가질 수 있다.

[149]

[150] 예를 들어, 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 포함될 수 있는 전장 시토신 탈아미노효소 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 37번 위치의 S의 G로의 치환, 59번 위치의 G의 S로의 치환, 109번 위치의 A의 V로의 치환 및 129번 위치의 S의 G로의 치환을 모두 갖는 것일 수 있다.

[151]

[152] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 사용될 수 있는 아데닌 탈아미노효소는 아데닌 염기를 하이포잔틴(또는 뉴클레오시드로서 이노신)으로 전환시키는 활성을 갖는 아미노기 이탈 효소를 의미하는 것으로서, 조류(algae), 박테리아, 진균류, 식물, 무척추동물 및 포유동물을 포함하지만 여기에 한정되지는 않는 임의의 생물체(예를 들어, 진핵생물 또는 원핵생물), 예를 들어 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. putrefaciens*, *H. influenzae*, 또는 *C. crescentus*로부터 유래되거나 변이된(예를 들어, 엔지니어링되거나 진화된) 것일 수 있다. 그러한 아데닌 탈아미노효소는 예를 들어, APOBEC, AID, 또는 TadA, 또는 그의 변이체일 수 있다. 상기 언급된 TadA는 예를 들어 TadA8e(서열번호 1) 또는 그의 절단형이나 변이체(예를 들어, 테옥시뉴클레오티드에 적용할 수 있도록 개량되거나 진화된 변이체)일 수 있다. 상기 언급된 TadA8e의 변이체는 예를 들어, 서열번호 1의 23, 28, 30, 36, 46, 48, 49, 51, 76, 82, 82, 84, 106, 108, 110, 111, 146, 147, 152, 154, 155, 156 및 157번째 아미노산 잔기 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 변이된 것일 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 아데닌 탈아미노효소의 구

성에 관해서는 전체로서 본 출원에 참고로 포함되는 국제특허출원 공개공보 WO 2022/060185, WO 2023/086953 등을 비롯하여 본 출원 이전에 이미 알려져 있는 내용들이 인용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 사용될 수 있는 아데닌 탈아미노효소는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 그의 보존적 아미노산 치환체를 포함하는 것일 수 있다.

[153]

[154] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로, 시토신 탈아미노효소(또는 그의 분할체) 또는 아데닌 탈아미노효소, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다.

[155]

[156] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로, 징크 핑거 단백질(zinc finger protein), TALE(transcriptional activator-like effector) 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 및 CRISPR 연관 니카제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 결합 단백질을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 염기 교정 단백질은 타겟 DNA의 이중가닥 절단을 일으키지 않는 것을 특징으로 한다.

[157]

[158] 본 발명에서 사용되는 염기 교정 시스템이 하나 이상의 서로 다른 염기 에디터의 조성물의 형태인 경우, 하나의 염기 에디터는 징크 핑거 단백질, TALE 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 또는 CRISPR 연관 니카제를 포함하고, 또다른 염기 에디터는 그와 독립적으로, 징크 핑거 단백질, TALE 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 또는 CRISPR 연관 니카제를 포함할 수 있다. 징크 핑거 단백질, TALE 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 및 CRISPR 연관 니카제의 구성에 관해서는 전체로서 본 출원에 참고로 포함되는 국제특허출원 공개번호 WO 2022/060185 및 WO 2022/017745를 비롯하여 본 출원 이전에 이미 알려져 있는 내용들이 인용될 수 있다.

[159]

[160] 징크 핑거는 대표적인 DNA 결합 단백질 구조로서, 주요한 DNA-결합 단백질 모티프를 형성하며, 징크 핑거의 알파-나선(α -helix)과 DNA의 주홈(major groove) 사이의 상호 작용이 DNA 서열의 인식을 강하고 특이적으로 가능하게 한다. 1개 이상의 징크 핑거 모티프들이 조합되어 사용될 수 있다.

[161]

[162] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 사용되는 DNA 결합 단백질은 TALE 단백질일 수 있다. 본 발명의 TALE 단백질은 하나 이상의 TALE-반복 모듈을 통해 서열-특이적인 방식으로 뉴클레오티드에 결합하는 단백질을 가리킨다. 상기 TALE 단백질은 적어도 하나의 TALE-반복 모듈, 바람직하게는 1 내지 30개의 TALE-반복 모듈을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

TALE-반복 모듈들은 "TALE 어레이"라고 부를 수도 있고, "TALE 단백질"이라는 표현은 TALE 어레이의 양측으로 각각 N-말단 도메인과 C-말단 도메인(half domain이 포함될 수 있음)이 포함되는 구성을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 "TALE"이라는 표현은 달리 표시되지 않는 한, "TALE 단백질"을 의미한다.

[163]

[164] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 사용되는 DNA 결합 단백질로서 TALE 단백질이 사용되는 경우, 단일 모듈 TALE 어레이 또는 다중 모듈 TALE 어레이(예를 들어, 제1 TALE(또는 left TALE) 어레이 및 제2 TALE(또는 right TALE) 어레이의 듀얼 모듈 TALE 어레이)가 사용될 수도 있다.

[165]

[166] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템이 각각 TALE 단백질을 포함하는 2개의 융합 단백질을 포함하는 경우, 2개의 융합 단백질은 각각 제1 TALE 단백질 및 제2 TALE 단백질을 갖는다. 제1 TALE 단백질 및 제2 TALE 단백질은 각각 독립적으로, 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 하나 이상의 염기-전환 효소, 예를 들어 시토신 탈아미노효소 및 아데닌 탈아미노효소 중 적어도 하나와 연결될 수 있다. 예를 들어, 제1 TALE 단백질(left TALE)을 포함하는 제1 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 5' 방향의 상류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)에 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체가 포함되고, 제2 TALE 단백질(right TALE)을 포함하는 제2 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 3' 방향의 하류에 결합하는 융합 단백질)에 시토신 탈아미노효소의 제2 분할체가 포함될 수 있고, 상기 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 중 어느 하나 또는 둘 모두에 아데닌 탈아미노효소가 포함될 수 있다. 다른 방식으로는, 제1 TALE 단백질(left TALE)을 포함하는 제1 융합 단백질에 시토신 탈아미노효소의 제2 분할체가 포함되고, 제2 TALE 단백질(right TALE)을 포함하는 제2 융합 단백질에 시토신 탈아미노효소의 제1 분할체가 포함될 수 있고, 상기 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 중 어느 하나 또는 둘 모두에 아데닌 탈아미노효소가 포함될 수 있다. 다른 방식으로는, 제1 TALE 단백질을 포함하는 제1 융합 단백질 및 제2 TALE 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질 중 어느 하나에 시토신 탈아미노효소의 전장 형태가 포함될 수 있고, 상기 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 중 어느 하나 또는 둘 모두에 아데닌 탈아미노효소가 포함될 수 있다.

[167]

[168] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 사용되는 DNA 결합 단백질은 "Cas 단백질"이라고 불리는 CRISPR-연관 단백질일 수 있다. DNA 교정 도구로서 잘 알려진 "CRISPR 시스템"은 Cas 단백질과 관련 RNA 성분(들)이 함께 작동하여 DNA의 특정 염기를 인식하고 해당 부위를 교정하는

기능을 발휘하는 리보핵단백질 복합체를 의미하며, "CRISPR/Cas 시스템"이라고도 부른다.

[169]

[170] "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미한다. Cas 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관(CRISPR-associated, cas) 유전자는 종종 CRISPR-반복 스페이스 배열(CRISPR repeat-spacer array)과 관련된다. 40 개 이상의 서로 다른 Cas 단백질 패밀리가 기술되어 왔고, 알려진 Cas 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터(National Center for Biotechnology Information(NCBI))의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas 단백질은 박테리아와 같은 미생물에서 분리된 것이거나, 재조합적 합성 또는 인공적인 합성 등과 같이 비자연적으로 생성된 것일 수 있다.

[171]

[172] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 사용되는 DNA 결합 단백질은 CRISPR 연관 뉴클레아제일 수 있다. 이 때, 용어 "CRISPR 연관 뉴클레아제"는 가이드 RNA와 복합체를 형성할 때 (엔도)뉴클레아제 활성을 갖는 임의의 Cas 단백질 또는 이의 변이체를 의미한다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 CRISPR 연관 뉴클레아제가 염기 교정 단백질의 일부로서 사용되는 경우, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 해당 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA)와 접촉시킬 때, 가이드 RNA가 함께 첨가될 수 있다.

[173]

[174] 본 명세서에서 사용되는 용어 "가이드 RNA"는 표적 DNA에 특이적인 DNA로서, Cas 단백질과 복합체를 형성할 수 있고, Cas 단백질을 표적 DNA로 가져오는 RNA를 말한다. 상기 가이드 RNA는 2개의 RNA, 즉 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스활성화 crRNA(transactivating crRNA, tracrRNA)로 이루어져 있는 것일 수 있으며, 또는 crRNA 및 tracrRNA의 필수적 부분의 융합에 의해 생성된 단일 사슬 RNA(single-chain RNA, sgRNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중 RNA(dual RNA)일 수 있다. 만약 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 필수적인 부분 및 표적과 상보적인 부분을 포함한다면, 어떠한 가이드 RNA라도 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있다.

[175]

[176] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 사용되는 DNA 결합 단백질은 CRISPR 연관 니카제일 수 있다. 이 때, 용어 "CRISPR 연관 니카제"는 가이드 RNA와 복합체를 형성할 때 니카제 활성을 갖는 임의의 Cas 단백질 또는 이의 변이체를 의미한다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용되는 CRISPR 연관 니카제는, 기존의 Cas 단백질로부터 DNA 이중 가닥을 절단하는 엔도뉴클레아제 활성의 일부 또는 전부를 소실시키고 니카제 활성을 갖도록 변이된 것일 수 있다. "니카제" 활성은 DNA 분자의 한 가닥만을 절단하는 활성

을 의미한다. 그러한 변이체는 박테리아와 같은 미생물에서 분리된 것이거나, 재조합적 합성 또는 인공적인 합성 등과 같이 비자연적으로 생성된 것일 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 CRISPR 연관 니카제가 염기 교정 단백질의 일부로서 사용되는 경우, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 해당 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA)와 접촉시킬 때, 역전사 효소 또는 역전사효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 mRNA)와 가이드 RNA(프라임 에디팅 가이드 RNA라고도 함)가 함께 첨가될 수 있다.

[177]

[178] DNA 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질에 시토신 탈아미노효소가 포함되는 경우, 시토신 탈아미노효소는 DNA 결합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있다. DNA 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질에 아데닌 탈아미노효소가 포함되는 경우, 아데닌 탈아미노효소는 TALE 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있다. DNA 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질에 시토신 탈아미노효소와 아데닌 탈아미노효소가 모두 포함되는 경우, 아데닌 탈아미노효소는 시토신 탈아미노효소의 N-말단 또는 C-말단(바람직하게는 C-말단)에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있다.

[179]

[180] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템이 2개의 융합 단백질을 포함하는 경우, 상기 융합 단백질들은 서로 다른 단백질 구성요소들(예를 들어, DNA 결합 단백질 및 하나 이상의 염기-전환 효소)의 조성 및 배열을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 5' 방향의 상류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)은 아데닌 탈아미노효소를 포함하는 반면, 제2 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 3' 방향의 하류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)은 아데닌 탈아미노효소를 포함하지 않을 수 있고, 그 반대일 수도 있다. 예를 들어, 제1 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 5' 방향의 상류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)은 TALE 단백질을 포함하는 반면, 제2 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 3' 방향의 하류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)은 징크 핑거 단백질을 포함할 수 있고, 그 반대일 수도 있다.

[181]

[182] 융합 단백질의 단백질 구성요소들의 배열에 있어서, 제1 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 5' 방향의 상류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)과 제2 융합 단백질(염기 교정 표적 부위보다 3' 방향의 하류에서 DNA에 결합하는 융합 단백질)은 서로 독립적인 배열을 취할 수 있다. 예를 들어, 제1 융합 단백질에서는 아데닌 탈아미노효소가 시토신 탈아미노효소의 C-말단 이후에 위치하는 반면, 제2 융합 단백질에서는 아데닌 탈아미노효소가 시토신 탈아미노효소의 N-말단 이전

에 위치할 수 있고, 그 반대일 수도 있다. 예를 들어, 제1 융합 단백질에서는 DNA 결합 단백질이 시토신 탈아미노효소의 C-말단 이후에 위치하는 반면, 제2 융합 단백질에서는 DNA 결합 단백질이 시토신 탈아미노효소의 N-말단 이전에 위치할 수 있고, 그 반대일 수도 있다.

[183]

[184] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 융합 단백질은 각각 독립적으로 UGI(uracil glycosylase inhibitor; 우라실 글리코실라제 억제제)를 추가로 포함할 수 있다. UGI는 DNA에서 우라실(U) 염기를 제거하는 작용을 촉매하는 돌연변이 DNA를 복구하는 효소 UDG(uracil DNA glycosylase) 활성을 억제시켜 염기 교정 효율을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 염기 교정 단백질에 UGI가 사용되는 경우, 그 위치는 다양할 수 있으며, 예를 들어 시토신 탈아미노효소의 C-말단에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[185]

[186] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 융합 단백질은 각각 독립적으로 NES(nuclear export signal; 핵외 수출 신호)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 NES 서열은 핵외로 전위케 하는 능력을 부여하는 임의의 신호서열일 수 있는바, 천연의 NES 또는 인위적으로 합성된 NES가 사용될 수 있다. 예를 들어, MVM(mirute virus of mice) 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 NES가 사용되는 경우, 그 위치는 다양할 수 있으며, 예를 들어 시토신 탈아미노효소의 N-말단에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[187]

[188] 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 하나 이상의 융합 단백질은 각각 독립적으로 MTS(mitochondrial targeting sequence; 미토콘드리아 타겟팅 서열)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 MTS는 미토콘드리아 내로 전위케 하는 능력을 갖춘 임의의 신호서열일 수 있는 바, 다양한 미토콘드리아 단백질들의 N-말단에 존재하는 천연의 MTS일 수 있으며, 또한 인위적으로 합성된 MTS가 사용될 수도 있다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 MTS가 사용되는 경우, 그 위치는 다양할 수 있으며, 예를 들어 DNA 결합 단백질의 N-말단 또는 NES의 N-말단에 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 및/또는 다른 단백질 구성요소를 통해) 연결될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[189]

- [190] 본 명세서에서 사용되는 용어 "융합 단백질"은 둘 이상의 상이한 폴리펩티드가 펩티드 결합을 통해 결합되어 형성된 폴리펩티드를 가리킨다. 본 발명에 따른 세포외 시험법에 사용될 수 있는 염기 교정 시스템에 포함되는 융합 단백질은 DNA 결합 단백질 및 염기-전환 효소를 포함하고, 추가로 UGI 및/또는 NES 및/또는 MTS를 포함할 수 있으며, 이들 단백질 구성요소들은 링커를 통해 연결되거나 직접 연결될 수 있다. 또한, 필요에 따라서 태그 서열이 부가될 수 있다. 융합 단백질 (또는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드)을 설계 및 구성하는 방법은 생명공학 분야에 공지된 임의의 방법일 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드는 벡터 내로 삽입될 수 있다.
- [191]
- [192] 본 발명은 상기한 바와 같은 내용을 바탕으로, 하기 (1) 내지 (44)에 관한 것일 수 있지만, 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [193]
- [194] (1) 하기 단계들을 포함하는 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법:
- [195] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 염기 교정 시스템에 사용되는 하나 이상의 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계;
- [196] (b) 단계 (a)로부터 얻어진 DNA를 시퀀싱하여, 상기 염기 교정 시스템의 염기 교정 활성을 측정하는 단계, 및
- [197] (c) 상기 염기 교정 시스템이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계.
- [198]
- [199] (2) (1)에 있어서, 단계 (a)는 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 혼합하고, 상기 폴리뉴클레오티드가 세포 외에서 전사되고 번역되는 것을 수반하는 것인 방법.
- [200]
- [201] (3) (2)에 있어서, 염기 교정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 DNA 또는 mRNA인 방법.
- [202]
- [203] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 염기 교정 단백질을 발현시키고 DNA 염기를 교정하는 것이 원포트(one-pot) 반응을 통해 수행되는 것인 방법.
- [204]
- [205] (5) (1)에 있어서, 단계 (a)는 세포 외에서 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 염기 교정 단백질을 혼합하는 것을 수반하는 것인 방법.
- [206]

- [207] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 반응 생성물을 별도의 정제 없이 단계 (b)에 사용하는 방법.
- [208]
- [209] (7) (1) 내지 (6) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이가 하나 이상의 단일 염기 변이를 포함하는 것인 방법.
- [210]
- [211] (8) (1) 내지 (7) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 동물 또는 식물의 세포로부터 추출되어 증폭된 것이거나 인공적으로 합성된 것인 방법.
- [212]
- [213] (9) (1) 내지 (8) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 핵 DNA 또는 세포소기관 DNA 인 방법.
- [214]
- [215] (10) (9)에 있어서, 세포소기관 DNA가 미토콘드리아 DNA 또는 엽록체 DNA인 방법.
- [216]
- [217] (11) (1) 내지 (10) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 유전병을 가진 인간의 핵 DNA이거나 미토콘드리아 DNA인 방법.
- [218]
- [219] (12) (1) 내지 (11) 중 어느 한 항에 있어서, 염기 교정이 아데닌(A) 염기를 구아닌(G)으로 교정하거나, 시토신(C) 염기를 티민(T) 염기로 교정하거나, 두 가지 모두를 수행하는 것인 방법.
- [220]
- [221] (13) (1) 내지 (12) 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로, 징크 핑거 단백질(zinc finger protein), TALE(transcriptional activator-like effector) 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 및 CRISPR 연관 니카제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 결합 단백질을 포함하는 것인 방법.
- [222]
- [223] (14) (13)에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 뉴클레아제를 포함하며, 단계 (a)에서 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [224]
- [225] (15) (13)에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 니카제를 포함하며, 단계 (a)에서 역전사효소 또는 역전사효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [226]

- [227] (16) (1) 내지 (15) 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 단백질이 각각 독립적으로 염기-전환 효소를 포함하는 것인 방법.
- [228]
- [229] (17) (16)에 있어서, 하나 이상의 염기-전환 효소가 각각 독립적으로 APOBEC(apolipoprotein B editing complex), AID(activation-induced deaminase), TadA(tRNA-specific adenosine deaminase) 또는 DddA_{tox}, 또는 그의 변이체 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [230]
- [231] (18) (17)에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 2개의 분할체의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [232]
- [233] (19) (17)에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 전장 단백질의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [234]
- [235] (20) (1) 내지 (19) 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 교정 단백질이 각각 독립적으로 UGI(uracil glycosylase inhibitor)를 포함하는 것인 방법.
- [236]
- [237] (21) 하기 단계들을 포함하는 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 스크리닝하는 방법:
- [238]
- [239] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 후보 염기 에디터들과 접촉시키는 단계로서, 상기 후보 염기 에디터들은 각각 독립적으로 하나 이상의 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 단계;
- [240] (b) (a) 단계로부터 얻어진 DNA 분자들을 시퀀싱하여, 상기 후보 염기 에디터들의 염기 교정 활성을 측정하는 단계;
- [241] (c) 상기 후보 염기 에디터들이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계; 및
- [242] (d) (c) 단계로부터 얻어진 정보를 기초로, 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 선별하는 단계.
- [243]
- [244] (22) (21)에 있어서, 단계 (a)는 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 혼합하고, 상기 폴리뉴클레오티드가 세포 외에서 전사되고 번역되는 것을 수반하는 것인 방법.
- [245]
- [246] (23) (22)에 있어서, 염기 교정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 DNA 또는 mRNA인 방법.

[247]

[248] (24) (21) 내지 (23) 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 염기 교정 단백질을 발현시키고 DNA 염기를 교정하는 것이 원포트(one-pot) 반응을 통해 수행되는 것인 방법.

[249]

[250] (25) (21)에 있어서, 단계 (a)는 세포 외에서 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 염기 교정 단백질을 혼합하는 것을 수반하는 것인 방법.

[251]

[252] (26) (21) 내지 (25) 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 반응 생성물을 별도의 정제 없이 단계 (b)에 사용하는 방법.

[253]

[254] (27) (21) 내지 (26) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이가 하나 이상의 단일 염기 변이를 포함하는 것인 방법.

[255]

[256] (28) (21) 내지 (27) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 동물 또는 식물의 세포로부터 추출되어 증폭된 것이거나 인공적으로 합성된 것인 방법.

[257]

[258] (29) (21) 내지 (28) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 핵 DNA 또는 세포소기관 DNA 인 방법.

[259]

[260] (30) (29)에 있어서, 세포소기관 DNA가 미토콘드리아 DNA 또는 엽록체 DNA 인 방법.

[261]

[262] (31) (21) 내지 (30) 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 유전병을 가진 인간의 핵 DNA이거나 미토콘드리아 DNA인 방법.

[263]

[264] (32) (21) 내지 (31) 중 어느 한 항에 있어서, 염기 교정이 아데닌(A) 염기를 구아닌(G)으로 교정하거나, 시토신(C) 염기를 티민(T) 염기로 교정하거나, 두 가지 모두를 수행하는 것인 방법.

[265]

[266] (33) (21) 내지 (32) 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로, 징크 핑거 단백질(zinc finger protein), TALE(transcriptional activator-like effector) 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 및 CRISPR 연관 니카제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 결합 단백질을 포함하는 것인 방법.

[267]

- [268] (34) (33)에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 뉴클레아제를 포함하며, 단계 (a)에서 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [269]
- [270] (35) (33)에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 니카제를 포함하며, 단계 (a)에서 역전사효소 또는 역전사효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [271]
- [272] (36) (21) 내지 (35) 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 단백질이 각각 독립적으로 염기-전환 효소를 포함하는 것인 방법.
- [273]
- [274] (37) (36)에 있어서, 하나 이상의 염기-전환 효소가 각각 독립적으로 APOBEC(apolipoprotein B editing complex), AID(activation-induced deaminase), TadA(tRNA-specific adenosine deaminase) 또는 DddA_{tox}, 또는 그의 변이체 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [275]
- [276] (38) (37)에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 2개의 분할체의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [277]
- [278] (39) (37)에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 전장 단백질의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [279]
- [280] (40) (21) 내지 (39) 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 교정 단백질이 각각 독립적으로 UGI(uracil glycosylase inhibitor)를 포함하는 것인 방법.
- [281]
- [282] (41) (1) 내지 (40) 중 어느 한 항에 있어서, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 리보뉴클레오티드 트리포스페이트 혼합물, 아미노산 혼합물, tRNA, rRNA를 포함하는 리보솜, 개시 인자, 신장 인자, 종결 인자 및 완충액을 포함하는 조성물이 단계 (a)에서 사용되는 것인 방법.
- [283]
- [284] (42) (21) 내지 (41) 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 선별된 염기 에디터.
- [285]
- [286] (43) (21) 내지 (41) 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 선별된 염기 에디터로서, 단계 (a)에서 사용된 하나 이상의 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 염기 에디터.
- [287]

[288] (44) DNA 중합효소, RNA 중합효소, 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 혼합물, 아미노산 혼합물, tRNA, rRNA를 포함하는 리보솜, 개시 인자, 신장 인자, 종결 인자 및 완충액을 포함하는, (1) 내지 (41) 중 어느 한 항에 따른 방법인 키트.

[289]

[290] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[291]

[292] **실시예 1: 주형 DNA 증폭**

[293]

[294] DNA 교정을 위한 타겟 DNA로서 인간 미토콘드리아 ND1 유전자를 모방한 이중가닥 DNA 서열을 gBlock DNA 단편으로서 IDT(Integrated DNA Technologies)로부터 합성하였다. 얻어진 주형 DNA의 서열은 다음과 같다.

[295]

[296] TACTATTGCCAGCATTGCTGCCCTCAACCTAGGCCTCCTAT
 TTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTACTCAATCCT
 CTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATC
 GGCGCACTGCGAGCAGTAGCCCAAACAATCTCA
AGATGGTGCACGATGCACAG (밀줄친 서열은 오염을 방지하기 위한 임의의 PCR 증폭 서열임)

[297]

[298] 포워드 프라이머(TACTATTGCCAGCATTGCTGC) 및 리버스 프라이머(CTGTGCATCGTGCACCATCT)를 이용하여 주형 DNA를 증폭한 후 PCR 정제 키트(Geneall)로 정제하였다. 실험하기 직전 신선하게 10 ng/μl로 증류수에 묽혀서 사용하였다.

[299]

[300] **실시예 2: 시험관내 전사 및 번역(IVTT) 및 염기 교정**

[301]

[302] 실시예 1에서 얻어진 주형 DNA를 10 ng/μL로 정량한 후, 주형 DNA(1ng, 5ng 또는 10 ng), left DdCBE(또는 sTALED)를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 μg 및 right DdCBE(또는 sTALED)를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 μg 및 in vitro coupled transcription/translation(IVTT) kit mixture 20 μL을 포함하는 반응 혼합물(25 μL까지 증류수 포함)을 튜브에 섞은 후 30°C에서 6시간 반응시킨 후 37°C에서 16시간 반응시켰다. 사용된 IVTT kit는 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems(Promega)이며 TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate에 TNT® Reaction Buffer, TNT® RNA Polymerase, Amino Acid Mixture, RNasin® Ribonuclease Inhibitor 등이 포함된 TNT® Quick Master Mix 를 사용하였다.

[303]

[304] 상기 left DdCBE 및 sTALED, 및 right DdCBE 및 sTALED의 아미노산 서열은 다음과 같다. 사용된 단백질들은 T7 프로모터(TAATACGACTCACTATAG)와 종결 서열 사이에 위치해 있다.

[305]

[306] Left DdCBE:

[307]

[308] MALSRAVCGTSRQLAPVLGYLGSRQKHS�PDYPYDVPDYA
GYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGIRIQDLRTLGYSSQQQKEKI
KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAV
KYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGEL
RGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN
LTPDQVVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
VAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVVAIASN
IGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVVAIASHDGGKQALETVQR
LLPVLCQDHGLTPDQVVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPAQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLT
PAQVVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVVAIASHDG
GKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVVAIASHDGGKQALE
TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVVAIASNNGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGLTPAQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
HGLTPAQVVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE
QVVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPDPALAALLVGSGSYA
LGPYQISAPQLPAYNGQTVGTFYYVNDAGGLESKVFSSGG
PTYPNYANAGHVEGQSALFMRDNGISEGLVFHNNPEGTC
GFCVNMETETLLPENAKMTVVPPEGSSGSTNLSDIIEKETG
KQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML (서열번호 9)

[309]

[310] Right DdCBE:

[311]

[312] MASVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSLDYKDHDGDYK
DHDIDYKDDDDKGIRIQDLRTLGYSSQQQKEKIKPKVRSTV
AQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAA
LPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLD
TGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTDPDQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVVAIASNIG

GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPA
 QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
 LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
 VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASH
 DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQA
 LETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPD
 PALAALLVGSAIPVKRGATGETKVFTGNSNSPKSPTKGGC
 SGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP
 ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML(서열번
 호 10)

[313]

[314] Left sTALED

[315]

[316] MALSRAVCGTSRQLAPVLGYLGSRQKHS�PDYPYDVPDYA
 GYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGIRIQDLRTLGYSSQQQKEKI
 KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAV
 KYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGEL
 RGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN
 LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
 VAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASN
 IGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQA
 LETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQR
 LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLC
 QAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLT
 PAQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDG
 GKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE

QVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPDPALAAALTNDHLVAL
 ACLGGRPALDAVKKGLLVGSAIPVKRGATGETKVFTGNSN
 SPKSPTKGGCSGSETPGTSESATPESSEVEFSHEYWMRHA
 LTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRAIGLHDPT
 AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMI
 HSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEG
 ILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN(서열번호 11)

[317]

[318] Right sTALED:

[319]

[320] MASVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSLDYKDHDGDYK
 DHDIDYKDDDDKGIRIQDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTV
 AQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAA
 LPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLD
 TGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTDPQVVA
 IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNIG
 GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPA
 QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
 LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
 VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASH
 DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQA
 LETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPD
 PALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGGSGSGSYAL
 GPYQISAPQLPAYNGQTVGTFFYYVNDAGGLESKVFSSGGP
 TPYPNYANAGHVEGQSALFMRDNGISEGLVFHNNPEGTCG
 FCVNMTETLLPENAKMTVVPPEG(서열번호 12)

[321]

[322] 실시예 3: 염기 교정 확인을 위한 시퀀싱 및 염기 교정 효율 측정

[323]

[324] 실시예 2에서 얻어진 반응물을 정제 없이 주형으로 사용하여, targeted deep sequencing 기법으로 서열을 분석하였다(시퀀싱은 Sanger sequencing 기법을 사용할 수 있다). 이 때, 우라실 또는 하이포잔틴(뉴클레오시드로서 이노신) 오류 내성을 갖는 DNA 중합효소를 사용하여 주형을 증폭하였다. 얻어진 염기 교정 결과를 도 1 및 2에 나타내었다. 도 1의 염기 교정 결과는 상기 left DdCBE 및 right DdCBE를 염기 에디터로 사용하여 얻은 것이고, 도 2의 염기 교정 결과는 상기 left sTALED 및 right sTALED를 염기 에디터로 사용하여 얻은 것이다.

[325]

[326] 실시예 4: 세포 내 염기 교정

[327]

[328] HEK293T 세포를 TC-Treated Multiple Well Plates(Corning)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)(Welgene)과 1% antibiotic-antimycotic 용액을 포함하는 DMEM(Welgene) 배양액으로 5% CO₂에서 37°C로 유지하여 배양하였다. HEK293T 세포를 48-웰 플레이트에 0.75 x 10⁵ cell/well 로 분주하고, left DdCBE(또는 sTALED)를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 µg 및 right DdCBE(또는 sTALED)를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 µg를 혼합한 후, Opti-MEM 25 µl을 넣었다(혼합물 1). 그 후, lipofectamine 2000 1.5 µl와 Opti-MEM 25 µl을 섞었다(혼합물 2). 혼합물 1과 혼합물 2를 1:1 부피비로 혼합한 후 15분간 상온에서 배양하였다. 배양물을 하나의 웰 당 50 µl씩 넣고, 4일간 배양한 후, 세포 배양 배지를 제거하였다. 세포 용해(cell lysis) 완충액(50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05% SDS 및 1:20 부피비의 Proteinase K)을 웰 당 100 µl 넣어 세포 용해를 진행하였다. 그 후, 50°C에서 1시간, 80°C 20분 배양 후 4°C에 보관하였다. 미토콘드리아 DNA만 구분할 수 있는 Deep-sequencing primer로 증폭한 후 시퀀싱하였다. 얻어진 염기 교정 결과를, 실시예 3에서 세포외 시험법을 통해 얻어진 염기 교정 결과와 비교하였다(도 3 및 4).

[329]

[330] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 세포외 시험법을 통해 DdCBE에 의해서 C-to-T 교정된 염기 서열들은 모두 세포 실험을 통해서도 교정되었고, 또한 TALED에 의해서 A-to-G 교정된 염기 서열들 역시 모두 세포 실험을 통해서도 동일하게 교정되었음이 확인되었다. 또한, 예를 들어, 세포외 시험법을 통해 ACTCAATCCTCTGATC 서열 중 밑줄친 염기 서열에서 C-to-T 염기 교정이 비교적 높은 빈도로 일어나고, ACTCAATCCTCTGATC 서열 중 밑줄친 염기 서열에서 A-to-G 염기 교정(상기 밑줄친 염기가 T인 경우, 그와 쌍을 이룬 A 염기가 교정된 경우에 해당함)이 비교적 높은 빈도로 일어났는데, 이러한 염기 교정의 경향성은 세포 실험을 통해서도 동일하게 확인되었다.

[331]

[332] 실시예 5: m.A3460G 교정을 위한 주형 DNA 증폭

[333]

[334] 대표적인 미토콘드리아 유전질환인 LHON의 원인인 ND1 유전자의 G3460A 돌연변이를 교정하는 염기 에디터를 선별하기 위해 G3460A 돌연변이를 가지는 이중가닥 DNA 서열을 gBlock DNA 단편으로서 IDT(Integrated DNA Technologies)로부터 합성하였다. 얻어진 주형 DNA의 서열은 다음과 같다.

[335]

[336] CTTCAAGGACGACGGCAACCTAGGCTATATACAACTACG
CAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAA
CCCTTCGCTGACACCATAAACTCTTCACCAAA
GAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATCACCTCTACA
TCACCGCCCCGACCTTAGCGGCATCAAGGTGAACTTCA (밑줄친 서열은 오염을 방지하기 위한 임의의 PCR 증폭 서열임; 굵은 글씨체로 표시한 A가 G3460A 변이를 나타냄)

[337]

[338] 포워드 프라이머(CTTCAAGGACGACGGCAACCTAGGCTATATACA
CAACTACGC) 및 리버스 프라이머(TGAAGTTCACCTTGATGC
CGCTAAGGTCGGGGCGGTGATG)를 이용하여 주형 DNA를 PCR로 증폭한 후 PCR SV mini kit(Geneall)로 정제하였다. 실험하기 직전 신선하게 10 ng/μl로 증류수에 묽혀서 사용하였다.

[339]

[340] 실시예 6: m.A3460G 교정을 위한 염기 에디터 제작

[341]

[342] T7 프로모터(TAATACGACTCACTATAG)를 포함하는 TALED를 제작하였다. 구체적으로 TAL 이펙터 어레이 플라스미드와 발현 플라스미드를 골든-게이트 클로닝 시스템으로 제작하였다. 컴피턴트(competent) DH5α(enzymomics) 대장균 세포에 열 충격(42°C) 방법으로 형질전환하여 단일 콜로니를 LB 배지에 37°C에서 밤새 진탕 인큐베이션으로 배양하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 Plasmid SV mini kit(GeneAll)로 플라스미드 DNA를 정제하였다. 정제된 플라스미드 DNA, 즉 TALED들은 sanger sequencing(Macrogen)으로 염기서열을 확인하였다.

[343]

[344] 제작한 염기 교정 단백질들의 아미노산 서열은 다음과 같다.

[345]

[346] 17 C:

[347]

[348] MASVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSLDYKDHDGDYK
DHDIDYKDDDDKGIRIQDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTV
AQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAA
LPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLD

TGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTDPQVVA
 IASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDG
 GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQDHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQD
 HGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPE
 QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIA
 SNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
 LTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQV
 VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASH
 DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQA
 LESIVAQLSRPDPALAAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK
 GLLVGSAIPVKRGATGETKVFTGNSNSPKSPTKGGCSGSE
 TPGTSESATPESSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVP
 VGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLV
 MQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNS
 KRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
 RMPRQVFNAQKKAQSSIN(서열번호 13)

[349]

[350] 18 C:

MASVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSLDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGIRIQDLRTLGYSS
QQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIV
GVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNL
TPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQ
AHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLP
VLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQ
RLLPVLCQDHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNIGGKQAL
ETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG
KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASH
DGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVA
IASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQ
VVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPDPALAAL
TNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLLVGSaipVKRGATGETKVFTGNSNSPKSPTKGGCSGSETP
GTSESATPESSEVEFSHEYWMRHaltLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDP
TAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLM
NVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN(서열번호 14)

[351]

[352] 56 N:

[353]

[354] MALSRAVCGTSRQLAPVLGYLGSRQKHSLPDYPYDVPDYA
GYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGIRIQDLRTLGYSSQQQQEKI
KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHHPAALGTVAV
KYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGEL
RGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN
LTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
VAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASN
GGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPEQVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQR
LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
QDHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
PAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVA
IASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNIG
GKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNNGGKQALE
TVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
HGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE
QVVAIASNNGGKQALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVAL

ACLGGRPALDAVKKGLGGSGSGSYALGPYQISAPQLPAYN
 GQTVGTFYYVNDAGGLESKFSSGGPTYPNYANAGHVEG
 QSALFMRDNGISEGLVFHNNPEGTCGFCVNMETLLPENAKMTVVPPEG(서열
 번호 15)

[355]

[356] 57 N:

[357]

[358] MALSRAVCGTSRQLAPVLGYLGSRQKHS�PDYPYDVPDYA
 GYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGIRIQDLRTLGYSSQQQKEI
 KPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAV
 KYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGEL
 RGPPLQLDTGQLLKIAGRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLN
 LTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQV
 VAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASN
 GGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPEQVVAIASNGGGKQA
 LETVQRLLPVLCQAHGLTPAQVVAIASNNGGKQALETVQR
 LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
 QDHGLTPAQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
 PAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVA
 IASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPDQVVAIASNIG
 GKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQDHGLTPAQVVAIASNIGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPA
 QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA
 SNGGGKQALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGR
 PALDAVKKGLGGSGSGSYALGPYQISAPQLPAYNGQTVGT
 FYYVNDAGGLESKFSSGGPTYPNYANAGHVEGQSALFM
 RDNGISEGLVFHNNPEGTCGFCVNMETLLPENAKMTVVPPEG(서열번호 16)

[359]

[360] 실시예 7: m.A3460G 교정을 위한 시험관내 전사 및 번역(IVTT) 및 염기 교정

[361]

[362] 실시예 5에서 얻어진 주형 DNA를 10 ng/μL로 정량한 후, 주형 DNA 10 ng, 서열번호 13 또는 14의 아미노산 서열을 갖는 염기 교정 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 μg 및 서열번호 15 또는 16의 아미노산 서열을 갖는 염기 교정 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드 0.5 μg 및 in vitro coupled transcription/translation(IVTT) kit mixture 20 μL을 포함하는 반응 혼합물(25 μL까지 증류수 포함)을 튜브에 섞은 후 30°C에서 6시간 반응

시킨 후 37°C에서 16시간 반응시켰다. 사용된 IVTT kit는 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega)이며 TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate에 TNT® Reaction Buffer, TNT® RNA Polymerase, Amino Acid Mixture, RNasin® Ribonuclease Inhibitor 등이 포함된 TNT® Quick Master Mix 를 사용하였다.

[363]

[364] 얻어진 염기 교정 결과를 도 5에 나타내었다.

[365]

[366] 실시예 8: m.A3460G 교정을 위한 세포 내 염기 교정

[367]

[368] 미토콘드리아 ND1 유전자의 G3460A 점 돌연변이를 가지는 LHON 환자의 소변으로부터 세포를 단리하여 primary cell을 확보하였으며, 이를 passage 2에서 소분하여 동결보존 하였다. 환자유래 소변세포(UDC: Urine derived cell)는 0.1% 젤라틴(Welgene)으로 코팅한 12-웰 Clear TC-Treated Multiple Well Plates(Corning)에 Renal Epithelial cell Growth Medium Bullet kit(REGM, Lonza) 배양액으로 5% CO₂에서 37°C로 유지하여 배양하였다. UDC 세포를 96-웰 Clear TC-Treated Multiple Well Plates(Corning)에 1 웰당 0.6×10^4 세포수가 되도록 시딩(seeding)해 주었다. 20-24시간 후, 염기 교정 단백질 17 C 또는 18 C를 인코딩하고 있는 플라스미드 250 ng과 염기 교정 단백질 56 N 또는 57 N을 인코딩하고 있는 플라스미드 250 ng을 Lipofectamine LTX reagent(Invitrogen)을 이용하여 형질주입한 뒤 미리 시딩해 놓은 96-웰 플레이트에 넣어 주었다. 형질주입된 세포들을 배양액을 교체해주면서 5% CO₂에서 37°C로 유지 배양하였다.

[369]

[370] 형질주입된 UDC 세포들을 세포 용해 완충액(50 mM Tris-HCl pH 7.4(Welgene), 1mM EDTA pH 8.0(Welgene), 0.005 % 나트륨 도데실 황산염(Welgene), 및 1:20 부피비의 Proteinase K(Qiagen))을 웰 당 100 µl 넣어준 뒤, 50°C에서 1시간, 80°C 20분 PCR 기계로 인큐베이션하고 4°C에 보관하였다.

[371]

[372] 세포 용해(cell lysis)한 것을 정제 없이 주형으로 하여, 표적 부위의 염기교정 비율 분석을 위해 표적 딥 시퀀싱(targeted deep sequencing) 기법으로 서열을 분석하였다. 딥 시퀀싱 라이브러리를 제작하기 위해 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase(TAKARA)를 사용하여 미토콘드리아 DNA만 구분할 수 있는 Deep-sequencing primer로 nested 1차 PCR 및 1차 PCR를 주형으로 하여 2차 PCR를 진행하였고, 인덱스 함유 프라이머를 사용하여 3차 PCR를 수행하여 최종 인덱스 서열을 추가하였다. 인덱스 서열이 추가된 3차 PCR 반응물을 PCR SV mini kit(GeneAll)를 사용하여 정제하였으며, MiniSeq Mid Output Kit(Illumina)를 사용하여 MiniSeq system(Illumina)를 이용하여 paired-end sequencing 하였다.

[373]

- [374] 얻어진 염기 교정 결과를 도 6에 나타내었고, 실시예 7에서 얻어진 세포외 시험법을 통해 얻어진 염기 교정 결과와 비교하였다(도 7 내지 10). 도 10에서 확인되는 바와 같이, 세포외 시험법을 통해 G3460A 변이에 대한 교정(on-target 교정) 능력이 확인된 염기 에디터들은 모두 세포내 실험에서도 동일한 on-target 교정 능력을 발휘함이 확인되었다. 또한, 도 7 내지 9에서 확인되는 바와 같이, on-target 교정 능력뿐 아니라, bystander(비-타겟) 염기 교정 효율도 세포외 시험법과 세포내 실험 사이에서 유사한 경향성을 나타냄이 확인되었다.

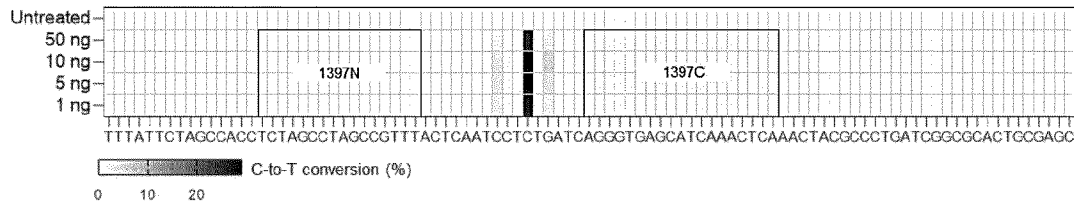
청구범위

- [청구항 1] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 염기 교정 시스템에 사용되는 하나 이상의 염기 교정 단백질과 접촉시키는 단계; (b) 단계 (a)로부터 얻어진 DNA를 시퀀싱하여, 상기 염기 교정 시스템의 염기 교정 활성을 측정하는 단계, 및 (c) 상기 염기 교정 시스템이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계를 포함하는 염기 교정 시스템의 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 단계 (a)는 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 혼합하고, 상기 폴리뉴클레오티드가 세포 외에서 전사되고 번역되는 것을 수반하는 것인 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 염기 교정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 DNA 또는 mRNA인 방법.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 염기 교정 단백질을 발현시키고 DNA 염기를 교정하는 것이 원포트(one-pot) 반응을 통해 수행되는 것인 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 단계 (a)는 세포 외에서 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 염기 교정 단백질을 혼합하는 것을 수반하는 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 반응 생성물을 별도의 정제 없이 단계 (b)에 사용하는 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이가 하나 이상의 단일 염기 변이를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 동물 또는 식물의 세포로부터 추출되어 증폭된 것이거나 인공적으로 합성된 것인 방법.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 핵 DNA 또는 세포소기관 DNA 인 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 세포소기관 DNA가 미토콘드리아 DNA 또는 엽록체 DNA인 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA가 유전병을 가진 인간의 핵 DNA이거나 미토콘드리아 DNA 인 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 염기 교정이 아데닌(A) 염기를 구아닌(G)으로 교정하거나, 시토신(C) 염기를 티민(T) 염기로 교정하거나, 두 가지 모두를 수행하는 것인 방법.

- [청구항 13] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 염기 교정 단백질은 각각 독립적으로, 징크 핑거 단백질(zinc finger protein), TALE(transcriptional activator-like effector) 단백질, CRISPR 연관 뉴클레아제 및 CRISPR 연관 니카제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 결합 단백질을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 뉴클레아제를 포함하며, 단계 (a)에서 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 하나 이상의 DNA 결합 단백질이 CRISPR 연관 니카제를 포함하며, 단계 (a)에서 역전사효소 또는 역전사효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 가이드 RNA가 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA와 추가로 접촉되는 것인 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 단백질이 각각 독립적으로 염기-전환 효소를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 하나 이상의 염기-전환 효소가 각각 독립적으로 APOBEC(apolipoprotein B editing complex), AID(activation-induced deaminase), TadA(tRNA-specific adenosine deaminase) 또는 DddA_{tox}, 또는 그의 변이체 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 2개의 분할체의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, DddA_{tox} 또는 그의 변이체가 전장 단백질의 형태로 사용되는 것인 방법.
- [청구항 20] 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 염기 교정 단백질이 각각 독립적으로 UGI(uracil glycosylase inhibitor)를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 21] (a) 타겟 DNA 변이를 포함하는 단리된 DNA를 세포외 환경에서 후보 염기 에디터들과 접촉시키는 단계로서, 상기 후보 염기 에디터들은 각각 독립적으로 하나 이상의 염기 교정 단백질 또는 그를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 단계;
(b) (a) 단계로부터 얻어진 DNA 분자들을 시퀀싱하여, 상기 후보 염기 에디터들의 염기 교정 활성을 측정하는 단계;
(c) 상기 후보 염기 에디터들이 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정하는 능력에 관한 정보를 제공하는 단계; 및
(d) (c) 단계로부터 얻어진 정보를 기초로, 세포 내에서 동일한 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 선별하는 단계를 포함하는 세포 내에서 타겟 DNA 변이를 교정할 수 있는 염기 에디터를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 22] 제21항에 따른 방법에 의해 선별된 염기 에디터.

- [청구항 23] DNA 중합효소, RNA 중합효소, 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 혼합물, 아미노산 혼합물, tRNA, rRNA를 포함하는 리보솜, 개시 인자, 신장 인자, 종결 인자 및 완충액을 포함하는, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 키트.

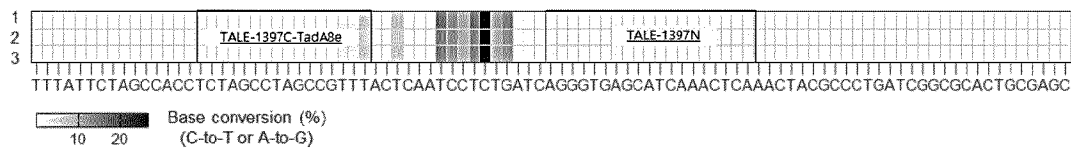
[도1]

DdCBE, 1397 split, MT-ND1 site

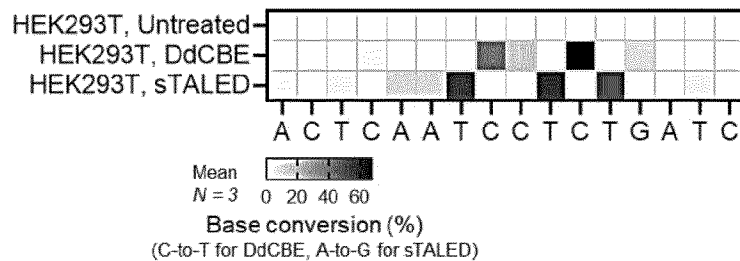
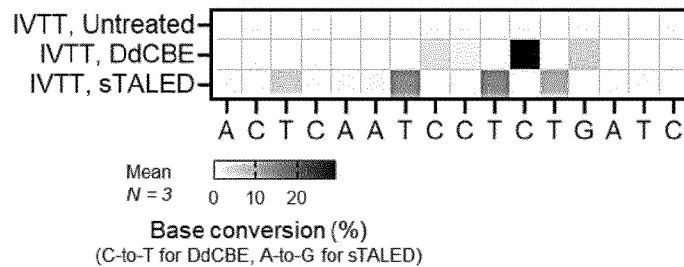
[도2]

sTALED, MT-ND1 site

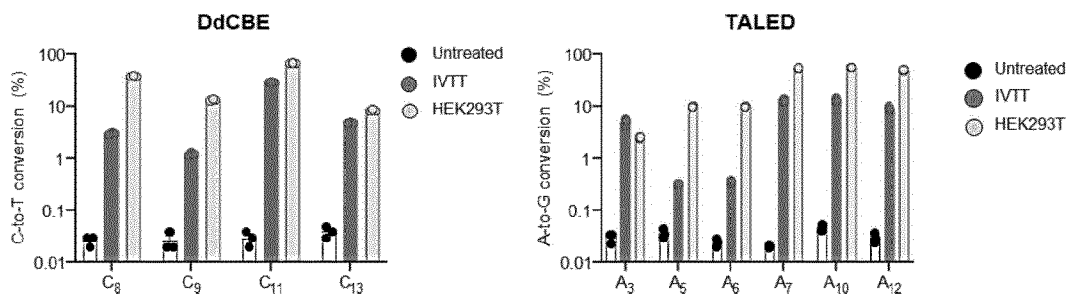
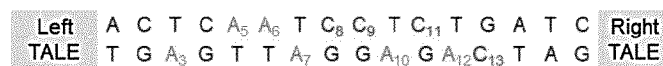
Replication



[도3]

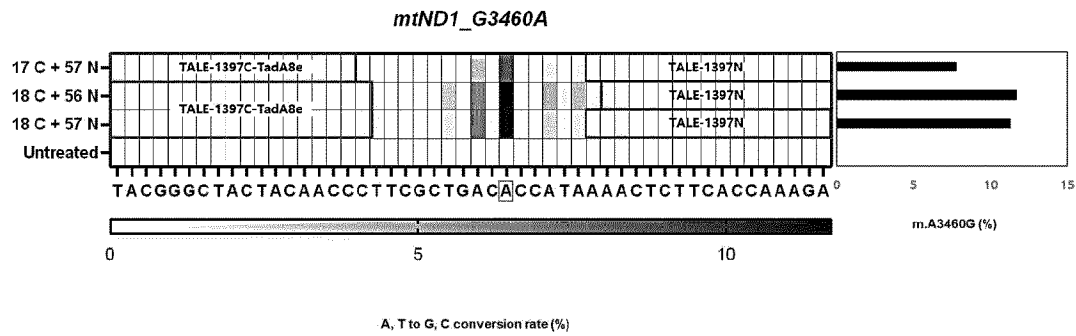
Human MT-ND1 site

[도4]

Human MT-ND1 site

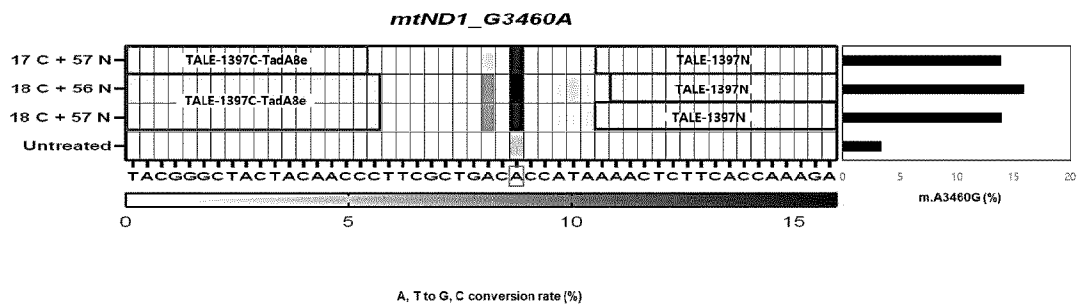
[도5]

IVTT 결과

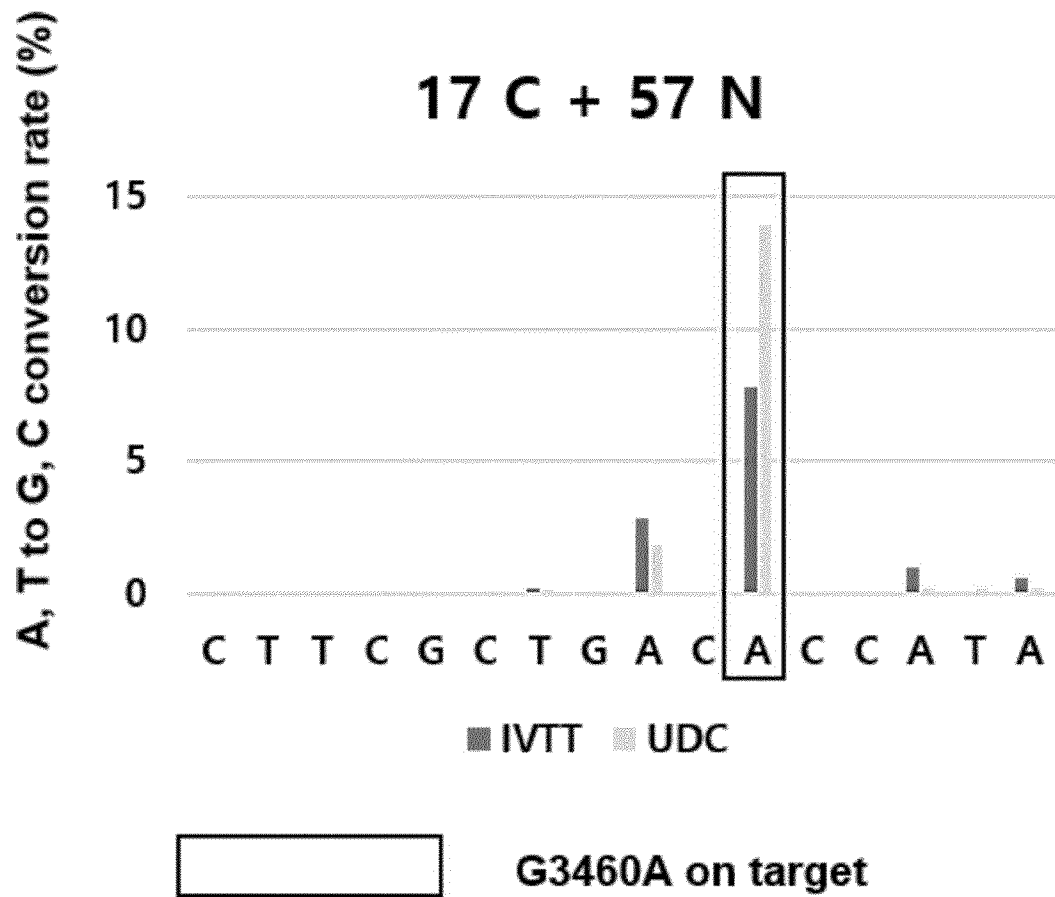


[도6]

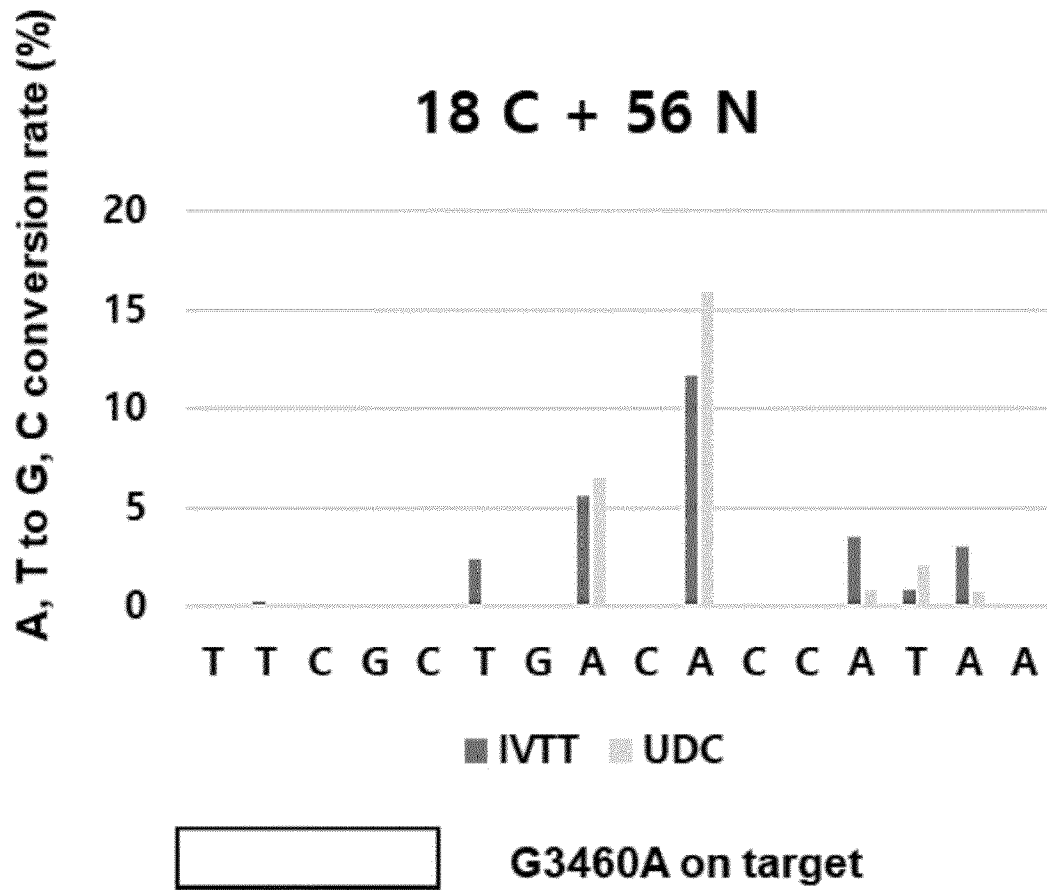
UDC cell 결과



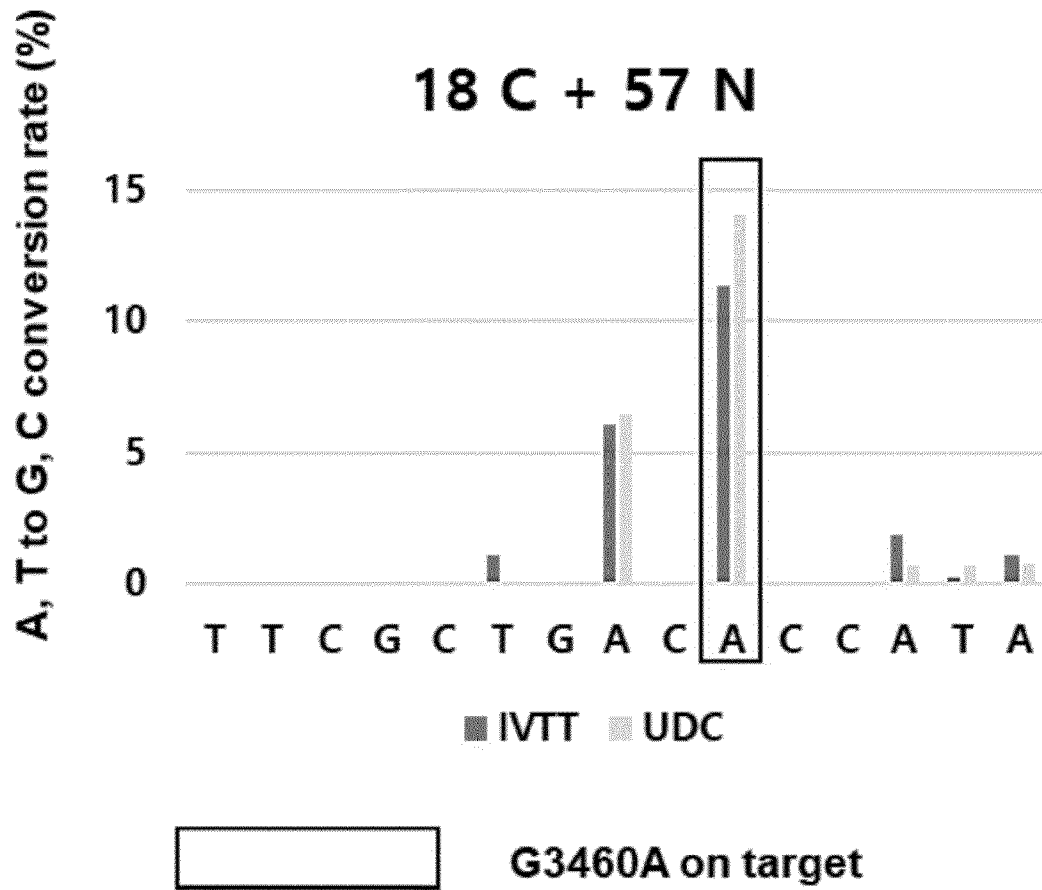
[도7]



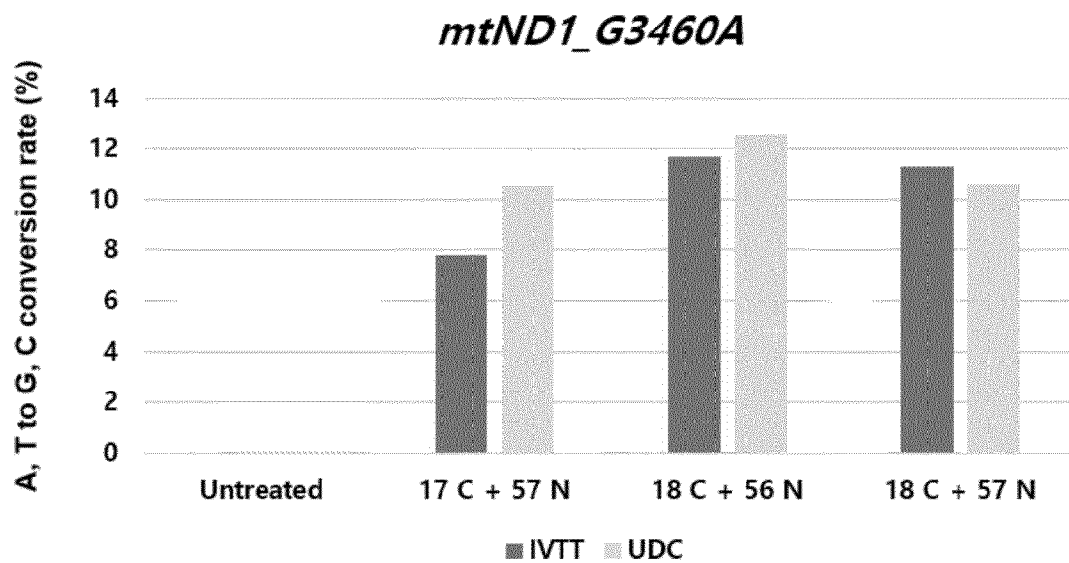
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/000873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6869(2018.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 9/78(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)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) C12Q 1/6869(2018.01); C12N 15/864(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12Q 1/6827(2018.01); G16B 30/00(2019.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 염기 교정 단백질(base editing protein), DNA, 세포외 시험관 환경(cell-free, in vitro system), 세포(cell), 시퀀싱(sequencing), 원포트(one-pot), 선별(screening)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0029937 A (TOOLGEN INCORPORATED et al.) 21 March 2018 (2018-03-21) See claims 8-10 and 18; and paragraphs [0021]-[0025], [0117] and [0189]-[0195].	1-5,21-22
X	KR 10-2018-0084671 A (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) 25 July 2018 (2018-07-25) See claims 1-3 and 9-10; and paragraphs [0092]-[0099] and [0103].	1-5,21-22
A	EP 4012037 A1 (FUDAN UNIVERSITY) 15 June 2022 (2022-06-15) See entire document.	1-5,21-22
A	MEHRAVAR, M. et al. In vitro pre-validation of gene editing by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2019, vol. 11, no. 3, pp. 259-263. See entire document.	1-5,21-22
A	EBRAHIMI, V. et al. Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review. Gene. (electronic publication) 26 May 2020, vol. 753, thesis no. 144813, pp. 1-11. See entire document.	1-5,21-22
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 April 2024		Date of mailing of the international search report 24 April 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANSBURY, B. M. et al. CRISPR-directed in vitro gene editing of plasmid DNA catalyzed by Cpf1 (Cas12a) nuclease and a mammalian cell-free extract. The CRISPR Journal. 2018, vol. 1, no. 2, pp. 191-202. See entire document.	1-5,21-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/000873

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/000873**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.: **10,14-15,17-19**
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:
Claims 10, 14-15 and 17-19 refer to dependent claims not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: **6-9,11-13,16,20,23**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/000873

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0029937	A	21 March 2018	EP	3530737	A1	28 August 2019
				EP	3530737	A4	29 April 2020
				JP	2019-526271	A	19 September 2019
				KR	10-2026421	B1	27 September 2019
				US	2020-0131536	A1	30 April 2020
				WO	2018-052247	A1	22 March 2018
KR	10-2018-0084671	A	25 July 2018	CN	110234770	A	13 September 2019
				EP	3572525	A2	27 November 2019
				EP	3572525	A4	30 September 2020
				JP	2020-505062	A	20 February 2020
				KR	10-2084186	B1	03 March 2020
				US	2018-0258418	A1	13 September 2018
				WO	2018-135838	A2	26 July 2018
				WO	2018-135838	A3	06 December 2018
EP	4012037	A1	15 June 2022	CN	110499334	A	26 November 2019
				CN	110499335	A	26 November 2019
				CN	110499335	B	28 March 2023
				CN	110551760	A	10 December 2019
				CN	110551760	B	18 November 2022
				CN	110551761	A	10 December 2019
				CN	110551761	B	18 November 2022
				CN	110551762	A	10 December 2019
				CN	110551762	B	10 March 2023
				CN	110551763	A	10 December 2019
				CN	110551763	B	10 March 2023
				CN	110577969	A	17 December 2019
				CN	110577969	B	22 July 2022
				CN	110577970	A	17 December 2019
				CN	110577970	B	18 November 2022
				CN	110577971	A	17 December 2019
				CN	110577971	B	18 November 2022
				CN	110577972	A	17 December 2019
				CN	110577972	B	11 October 2022
				JP	2022-543451	A	12 October 2022
				WO	2021-023307	A1	11 February 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6869(2018.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 9/78(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6869(2018.01); C12N 15/864(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12Q 1/6827(2018.01); G16B 30/00(2019.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 염기 교정 단백질(base editing protein), DNA, 세포외 시험관 환경(cell-free, in vitro system), 세포(cell), 시퀀싱(sequencing), 원포트(one-pot), 선별(screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0029937 A (주식회사 톨젠 등) 2018.03.21 청구항 8-10, 18; 단락 [0021]-[0025], [0117], [0189]-[0195]	1-5,21-22
X	KR 10-2018-0084671 A (기초과학연구원) 2018.07.25 청구항 1-3, 9-10; 단락 [0092]-[0099], [0103]	1-5,21-22
A	EP 4012037 A1 (FUDAN UNIVERSITY) 2022.06.15 전체 문헌	1-5,21-22
A	MEHRAVAR, M. et al., 'In vitro pre-validation of gene editing by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein', Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2019, 11권, 3호, 259-263 페이지 전체 문헌	1-5,21-22
A	EBRAHIMI, V. 등, 'Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review', Gene, (전자공개)2020.05.26, 753권, 논문번호 144813, 1-11 페이지 전체 문헌	1-5,21-22

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년04월23일(23.04.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년04월24일(24.04.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SANSBURY, B. M. 등, 'CRISPR-directed in vitro gene editing of plasmid DNA catalyzed by Cpf1 (Cas12a) nuclease and a mammalian cell-free extract', The CRISPR Journal, 2018, 1권, 2호, 191-202 페이지 전체 문헌	1-5,21-22

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

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: **10,14-15,17-19**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 10, 14-15 및 17-19는 PCT 규칙 6.4(a)의 규정을 충족하지 않는 종속항을 인용하고 있습니다.

3. ☒ 청구항: **6-9,11-13,16,20,23**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0029937 A	2018/03/21	EP 3530737 A1	2019/08/28
		EP 3530737 A4	2020/04/29
		JP 2019-526271 A	2019/09/19
		KR 10-2026421 B1	2019/09/27
		US 2020-0131536 A1	2020/04/30
		WO 2018-052247 A1	2018/03/22
KR 10-2018-0084671 A	2018/07/25	CN 110234770 A	2019/09/13
		EP 3572525 A2	2019/11/27
		EP 3572525 A4	2020/09/30
		JP 2020-505062 A	2020/02/20
		KR 10-2084186 B1	2020/03/03
		US 2018-0258418 A1	2018/09/13
		WO 2018-135838 A2	2018/07/26
		WO 2018-135838 A3	2018/12/06
EP 4012037 A1	2022/06/15	CN 110499334 A	2019/11/26
		CN 110499335 A	2019/11/26
		CN 110499335 B	2023/03/28
		CN 110551760 A	2019/12/10
		CN 110551760 B	2022/11/18
		CN 110551761 A	2019/12/10
		CN 110551761 B	2022/11/18
		CN 110551762 A	2019/12/10
		CN 110551762 B	2023/03/10
		CN 110551763 A	2019/12/10
		CN 110551763 B	2023/03/10
		CN 110577969 A	2019/12/17
		CN 110577969 B	2022/07/22
		CN 110577970 A	2019/12/17
		CN 110577970 B	2022/11/18
		CN 110577971 A	2019/12/17
		CN 110577971 B	2022/11/18
		CN 110577972 A	2019/12/17
		CN 110577972 B	2022/10/11
		JP 2022-543451 A	2022/10/12
		WO 2021-023307 A1	2021/02/11