(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0112361
(43) 공개일자 2024년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) *C12N 9/78* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7022051
(22) 출원일자(국제) 2022년12월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/080834
(87) 국제공개번호 WO 2023/102537
국제공개일자 2023년06월08일
(30) 우선권주장
63/285,995 2021년12월03일 미국(US)
63/298,621 2022년01월11일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사 추세츠주 캠브리지 메인 스트리트 415
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17
(72) 발명자
류, 데이빗, 알.
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
라구람, 아디트야
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
반스코타, 사마그야
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
(74) 대리인
양영준, 이상남

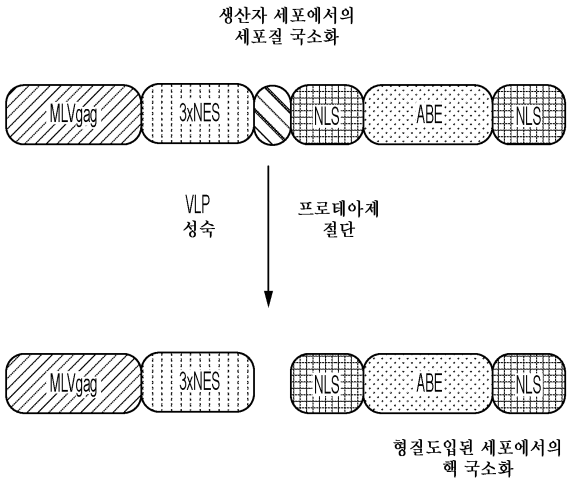
전체 청구항 수 : 총 163 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 프로그래밍가능한 융합 단백질의 전달을 위한 자가-조립 바이러스-유사 입자 및 그의 제조 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 유전자 편집제, 예컨대 핵산-프로그래밍가능한 DNA-결합 단백질 (napDNAbp) 및 염기 편집기 융합 단백질을 전달하기 위한 바이러스-유사 입자 ("BE-VLP" 또는 "eVLP"), 및 이러한 eVLP를 포함하는 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 eVLP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이는 상기 eVLP를 생성하는데 유용할 수 있다. 본원에 기재된 eVLP를 표적 세포에 도입시킴으로써 표적 세포의 게놈을 편집하는 방법 또한 본원에 제공된다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 eVLP의 성분을 구성하는 융합 단백질, 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 및 키트를 제공한다.

대 표 도 - 도2d



(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 9/78 (2013.01)
C07K 2319/09 (2013.01)
C07K 2319/095 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2740/13022 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질 및 융합 단백질을 포함하는 바이러스-유사 입자로서, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자:

(i) gag 뉴클레오캡시드 단백질;

(ii) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp);

(iii) 절단가능한 링커; 및

(iv) 핵 유출 서열 (NES).

청구항 2

제1항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 바이러스-유사 입자.

청구항 3

제2항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 바이러스-유사 입자.

청구항 4

제2항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)인 바이러스-유사 입자.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질이 가이드 RNA (gRNA)에 결합된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 데아미나제 도메인을 추가로 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 7

제6항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 바이러스-유사 입자.

청구항 8

제6항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 바이러스-유사 입자.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 염기 편집기를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 10

제9항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 바이러스-유사 입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 핵 국소화 서열 (NLS)을 추가로 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NLS를 추가로 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 16

제15항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 바이러스-유사 입자.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, gag-pro 폴리단백질이 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 21

지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열 (NES)을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 바이러스-유사 입자.

청구항 22

제21항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 바이러스-유사 입자.

청구항 23

제22항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 바이러스-유사 입자.

청구항 24

제22항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)인 바이러스-유사 입자.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질이 가이드 RNA (gRNA)에 결합된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp가 데아미나제 도메인에 융합된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 27

제26항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 바이러스-유사 입자.

청구항 28

제26항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 바이러스-유사 입자.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 데아미나제에 융합된 napDNAbp가 염기 편집기를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 30

제29항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 바이러스-유사 입자.

청구항 31

제21항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 32

제21항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp 및/또는 데아미나제가 핵 국소화 서열 (NLS)에 융합된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 33

제32항에 있어서, napDNAbp 및/또는 데아미나제가 2개의 NLS에 융합되거나, 또는 napDNAbp가 제1 NLS에 융합되고 데아미나제가 제2 NLS에 융합된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 34

제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp 및 융합 단백질이 이전에 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 절단가능한 링커를 통해 융합되었고, 절단가능한 링커가 후속적으로 gag-pro-폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단된 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 35

제34항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 36

제35항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 바이러스-유사 입자.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 38

제21항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, gag-pro 폴리단백질이 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 39

제21항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 40

제21항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 41

제29항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 염기 편집기가 하기 구조를 포함하는 것인 바이러스-유사 입자:

[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질인 바이러스-유사 입자.

청구항 43

제42항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 레트로바이러스 외피 당단백질인 바이러스-유사 입자.

청구항 44

제42항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, HIV-1 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질인 바이러스-유사 입자.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 특정한 세포 유형에 표적화시키는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 46

제45항에 있어서, 세포 유형이 면역 세포, 신경 세포, 또는 망막 색소 상피 세포인 바이러스-유사 입자.

청구항 47

제45항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 VSV-G 단백질이고, VSV-G 단백질이 바이러스-유사 입자를 망막 색소 상피 (RPE) 세포에 표적화시키는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 48

제45항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 HIV-1 외피 당단백질이고, HIV-1 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 CD4+ 세포에 표적화시키는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 49

제45항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 FuG-B2 외피 당단백질이고, FuG-B2 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 뉴런에 표적화시키는 것인 바이러스-유사 입자.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 바이러스-유사 입자를 포함하는 세포.

청구항 51

하기를 포함하는 복수개의 폴리뉴클레오티드:

(i) 바이러스 외피 당단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드;

(ii) 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드;

(iii) 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 제3 폴리뉴클레오티드:

(a) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질;

(b) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp);

(c) 절단가능한 링커; 및

(d) 핵 유출 서열 (NES); 및

(iv) 가이드 RNA (gRNA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 gRNA는 제3 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 융합 단백질의 napDNAbp에 결합하는 것인 제4 폴리뉴클레오티드.

청구항 52

제51항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비가 대략 10:1, 대략 9:1, 대략 8:1, 대략 7:1, 대략 6:1, 대략 5:1, 대략 4:1, 대략 3:1, 대략 2:1, 대략 1.5:1, 대략 1:1, 또는 대략 0.5:1인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 53

제52항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비가 대략 3:1인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 55

제54항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 56

제54항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 57

제51항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 데아미나제 도메인을 추가로 포함하는 것인 복수개

의 폴리뉴클레오티드.

청구항 58

제57항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 59

제57항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 염기 편집기를 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 61

제60항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 62

제51항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 63

제51항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 핵 국소화 서열 (NLS)을 추가로 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 64

제63항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NLS를 추가로 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 65

제51항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 66

제51항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 67

제66항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 69

제51항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, gag-pro 폴리단백질이 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 70

제51항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또

는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 71

제51항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 복수개의 폴리뉴클레오티드:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 72

제51항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 73

제72항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 레트로바이러스 외피 당단백질인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 74

제72항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, HIV-1 바이러스 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질인 복수개의 폴리뉴클레오티드.

청구항 75

제51항 내지 제74항 중 어느 한 항의 복수개의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 벡터.

청구항 76

제75항에 있어서, 각각의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리뉴클레오티드가 별도의 벡터 상에 있는 것인 하나 이상의 벡터.

청구항 77

제75항에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상이 동일한 벡터 상에 있는 것인 하나 이상의 벡터.

청구항 78

제51항 내지 제74항 중 어느 한 항의 복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 제75항 내지 제77항 중 어느 한 항의 하나 이상의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 79

제51항 내지 제74항 중 어느 한 항의 복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 제75항 내지 제77항 중 어느 한 항의 하나 이상의 벡터를 세포에 형질감염시키는 것을 포함하는, 바이러스-유사 입자 (VLP)를 제조하는 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 VLP를 특정한 세포 유형에 표적화시키는 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 세포 유형이 면역 세포, 신경 세포, 또는 망막 색소 상피 세포인 방법.

청구항 82

제80항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 VSV-G 단백질이고, VSV-G 단백질이 바이러스-유사 입자를 망막 색

소 상피 (RPE) 세포에 표적화시키는 것인 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 HIV-1 외피 당단백질이고, HIV-1 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 CD4+ 세포에 표적화시키는 것인 방법.

청구항 84

제80항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 FuG-B2 외피 당단백질이고, FuG-B2 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 뉴런에 표적화시키는 것인 방법.

청구항 85

바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질 및 융합 단백질을 포함하는 바이러스-유사 입자 (VLP)를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 제약 조성물:

(i) gag 뉴클레오캡시드 단백질;

(ii) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp);

(iii) 절단가능한 링커; 및

(iv) 핵 유출 서열 (NES).

청구항 86

제85항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 제약 조성물.

청구항 87

제86항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 제약 조성물.

청구항 88

제86항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)인 제약 조성물.

청구항 89

제85항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질이 가이드 RNA (gRNA)에 결합된 것인 제약 조성물.

청구항 90

제85항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 데아미나제 도메인을 추가로 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 91

제90항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 제약 조성물.

청구항 92

제90항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 제약 조성물.

청구항 93

제90항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 염기 편집기를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 제약 조성물.

청구항 95

제85항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 96

제85항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 핵 국소화 서열 (NLS)을 추가로 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 97

제96항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NLS를 추가로 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 98

제85항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 것인 제약 조성물.

청구항 99

제85항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 100

제99항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 제약 조성물.

청구항 101

제99항 또는 제100항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 102

제85항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, gag-pro 폴리단백질이 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 103

제85항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 104

제85항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 제약 조성물:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 105

지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 및 융합 단백질을 포함하는 바이러스-유사 입자를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 융합 단백질은 gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열 (NES)을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 106

제105항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 제약 조성물.

청구항 107

제106항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 제약 조성물.

청구항 108

제106항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)인 제약 조성물.

청구항 109

제106항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질이 가이드 RNA (gRNA)에 결합된 것인 제약 조성물.

청구항 110

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp가 데아미나제 도메인에 융합된 것인 제약 조성물.

청구항 111

제110항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 제약 조성물.

청구항 112

제110항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 제약 조성물.

청구항 113

제110항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 데아미나제에 융합된 napDNAbp가 염기 편집기를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 114

제113항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 제약 조성물.

청구항 115

제105항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 116

제105항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp 및/또는 데아미나제가 핵 국소화 서열 (NLS)에 융합된 것인 제약 조성물.

청구항 117

제116항에 있어서, napDNAbp 및/또는 데아미나제가 2개의 NLS에 융합되거나, 또는 napDNAbp가 제1 NLS에 융합되고 데아미나제가 제2 NLS에 융합된 것인 제약 조성물.

청구항 118

제105항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, napDNAbp 및 융합 단백질이 이전에 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 절단가능한 링커를 통해 융합되었고, 절단가능한 링커가 후속적으로 gag-pro-폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단된 것인 제약 조성물.

청구항 119

제118항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 120

제119항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 제약 조성물.

청구항 121

제119항 또는 제120항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 122

제105항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, gag-pro 폴리단백질이 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 123

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 124

제105항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 제약 조성물:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 125

제113항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 염기 편집기가 하기 구조를 포함하는 것인 제약 조성물:

[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 126

제85항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질인 제약 조성물.

청구항 127

제126항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 레트로바이러스 외피 당단백질인 제약 조성물.

청구항 128

제126항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, HIV-1 바이러스 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질인 제약 조성물.

청구항 129

제85항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 특정한 세포 유형에 표적화시키는 것인 제약 조성물.

청구항 130

제129항에 있어서, 세포가 면역 세포, 신경 세포, 또는 망막 색소 상피 세포인 제약 조성물.

청구항 131

제129항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 VSV-G 단백질이고, VSV-G 단백질이 바이러스-유사 입자를 망막 색소 상피 (RPE) 세포에 표적화시키는 것인 제약 조성물.

청구항 132

제129항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 HIV-1 외피 당단백질이고, HIV-1 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 CD4+ 세포에 표적화시키는 것인 제약 조성물.

청구항 133

제129항에 있어서, 바이러스 외피 당단백질이 FuG-B2 외피 당단백질이고, FuG-B2 외피 당단백질이 바이러스-유사 입자를 뉴런에 표적화시키는 것인 제약 조성물.

청구항 134

표적 세포를 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 바이러스-유사 입자 또는 제85항 내지 제133항 중 어느 한 항의 제약 조성물과 접촉시켜, 이로써 핵산 분자에 대한 하나 이상의 변형을 표적 부위에 설치하는 것을 포함하는, 염기 편집에 의해 표적 세포에서 핵산 분자를 편집하는 방법.

청구항 135

제134항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 136

제134항 또는 제135항에 있어서, 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 137

제134항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체에 있는 것인 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 139

제134항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자에 대한 하나 이상의 변형이 질환 또는 장애의 증상을 감소시키거나, 완화시키거나 또는 예방하는 것과 연관이 있고, 임의적으로 질환 또는 장애가 CNS 장애, 간 장애, 또는 안구 장애인 방법.

청구항 140

하기를 포함하는 융합 단백질:

(i) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질;

(ii) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp);

(iii) 절단가능한 링커; 및

(iv) 핵 유출 서열 (NES).

청구항 141

제140항에 있어서, napDNAbp가 Cas9 단백질인 융합 단백질.

청구항 142

제141항에 있어서, Cas9 단백질이 Cas9 닉카제인 융합 단백질.

청구항 143

제141항에 있어서, Cas9 단백질이 뉴클레아제-불활성 Cas9 단백질인 융합 단백질.

청구항 144

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 단백질이 가이드 RNA (gRNA)에 결합된 것인 융합 단백질.

청구항 145

제140항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 데아미나제 도메인을 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 146

제145항에 있어서, 데아미나제 도메인이 아데노신 데아미나제 도메인인 융합 단백질.

청구항 147

제145항에 있어서, 데아미나제 도메인이 시토신 데아미나제 도메인인 융합 단백질.

청구항 148

제145항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 염기 편집기를 포함하는 것인 융합 단백질.

청구항 149

제148항에 있어서, 염기 편집기가 ABE8e인 융합 단백질.

청구항 150

제140항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES, 6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개의 NES를 포함하는 것인 융합 단백질.

청구항 151

제140항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 핵 국소화 서열 (NLS)을 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 152

제151항에 있어서, 2개의 NLS를 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 153

제140항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 napDNAbp와 NES 사이에 위치하는 것인 융합 단백질.

청구항 154

제140항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 융합 단백질.

청구항 155

제154항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위인 융합 단백질.

청구항 156

제154항 또는 제155항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 단백질.

청구항 157

제140항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, gag 뉴클레오캡시드 단백질이 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 것인 융합 단백질.

청구항 158

제140항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 하기 구조를 포함하는 것인 융합 단백질:

[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]

여기서]-[는 임의적인 링커를 포함함.

청구항 159

제140항 내지 제158항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 160

제159항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 161

제140항 내지 제158항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 제159항의 폴리뉴클레오티드, 또는 제160항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 162

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 바이러스-유사 입자, 제85항 내지 제133항 중 어느 한 항의 복수개의 폴리뉴클레오티드, 또는 제140항 내지 제158항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 키트.

청구항 163

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제51항 내지 제74항 중 어느 한 항의 복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 제75항 내지 제77항 중 어느 한 항의 하나 이상의 벡터를 세포에 형질감염시키거나, 형질도입시키거나, 전기천공시키거나 또는 달리 삽입하고, 세포에서 복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 하나 이상의 벡터로부터 바이러스-유사 입자의 성분을 발현하여, 이로써 바이러스-유사 입자가 세포에서 자발적으로 조립되게 함으로써 생성된 바이러스-유사 입자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 12월 3일에 출원한 미국 가출원, U.S.S.N. 63/285,995, 및 2022년 1월 11일에 출원한 미국 가출원, U.S.S.N. 63/298,621을 우선권으로 주장하며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **연방 정부의 후원을 받은 연구**

[0004] 본 발명은 국립보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 보조금 번호 UG3AI150551, U01AI142756, R35GM118062, RM1HG009490, R01EY009339, 및 T32GM095450 하에 정부 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0005] 최근에 개발된 유전자 편집제는 살아있는 유기체에서 게놈 DNA의 정밀한 조작을 가능하게 하고, 여러 유전 질환의 근본 원인의 치료 가능성을 증가시킨다 (Anzalone *et al.*, 2020; Doudna, 2020). 염기 편집기 (BE)는 이중-가닥 DNA 파손 (DSB)의 필요없이 표적화된 단일-뉴클레오티드 전환을 매개하여, 이로써 원치않는 편집 결과, 예컨대 indel, 대규모 결실 (Kosicki *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020), 전좌 (Giannoukos *et al.*, 2018; Stadtmauer *et al.*, 2020; Webber *et al.*, 2019), 염색체 파열 (Leibowitz *et al.*, 2021), 또는 다른 염색체 이상을 최소화시킨다. 시토신 염기 편집기 (CBE) (Komor *et al.*, 2016; Nishida *et al.*, 2016) 및 아데닌 염기 편집기 (ABE) (Gaudelli *et al.*, 2017)는 원칙적으로 대부분의 공지된 질환-유발 단일-뉴클레오티드 변이체를 함께 교정할 수 있다 (Anzalone *et al.*, 2020; Rees and Liu, 2018). 이전에, BE는 마우스 및 비-인간 영장류에서 병원성 점 돌연변이를 교정하고, 질환 표현형을 구제하는데 적용되었으며 (Levy *et al.*, 2020; Yeh *et*

al., 2020), 이는 치료 전략으로서 생체내 염기 편집의 잠재성을 강조한다.

[0006] 생체내 염기 편집의 광범위한 치료적 적용에는 BE를 다중 조직 및 장기에 안전하고 효율적으로 전달하는 방법이 필요하다. 생체내 BE 전달을 위해 지금까지 보고된 대부분의 강건한 접근법은 바이러스, 예컨대 아데노-연관된 바이러스 (AAV) 또는 렌티바이러스 (LV)를 사용하여, BE-코딩 DNA를 표적 조직에 전달하는 것을 수반한다 (Levy *et al.*, 2020; Newby and Liu, 2021). 그러나, 편집제를 코딩하는 DNA의 바이러스 전달은 형질도입된 세포에서 발현을 연장시키고, 이는 표적-이탈 편집의 빈도를 증가시킨다 (Akcakaya *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020; Yeh *et al.*, 2018). 또한, DNA의 바이러스 전달은 형질도입된 세포의 게놈에 바이러스 벡터가 통합될 가능성을 증가시키며, 두 가지 모두 종양 형성 또는 다른 부작용을 촉진시킬 수 있다 (Anzalone *et al.*, 2020; Chandler *et al.*, 2017). 추가로, 바이러스 전달 벡터 (예를 들어, AAV 또는 LV)의 형질감염 방법 및 성능의 지속적인 발전에도 불구하고, 이들 접근법의 효율은 특히 환경의 변형에 매우 민감한 일차 세포에서 극적으로 달라질 수 있고, 형질감염제 및/또는 벡터에 대한 반응으로 변경될 수 있다.

[0007] 생체내에서 유전자 편집제 (예를 들어, BE)를 전달하기 위한 대안적인 한 가지 방법은 DNA 대신에 단백질 (예를 들어, BE) 또는 리보핵단백질 (RNP) (예를 들어, 가이드 RNA와 복합체화된 BE)을 직접적으로 전달하는 것이다. BE-코딩 DNA 또는 mRNA 대신에 BE RNP의 전달이 전형적으로 표적-적중 편집 효율을 희생하지 않고도 표적-이탈 편집을 실질적으로 감소시킨다는 이전의 보고에 의해 입증된 바와 같이, 세포에서 RNP의 짧은 수명은 표적-이탈 편집에 대한 기회를 제한한다 (Doman *et al.*, 2020; Rees *et al.*, 2017). 지질-캡슐화된 BE RNP의 국소 투여 후 마우스 내이 및 망막에서 성공적인 염기 편집이 이전에 보고되었지만 (Yeh *et al.*, 2018), 생체내에서 BE RNP를 다중 조직 및 장기에 전달하는 일반화가능한 전략은 이전에 보고된 적이 없다. 따라서, BE 리보핵단백질 (RNP)을 그를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직 또는 장기에 효과적으로 전달하고, 표적 편집을 희생하지 않고도 표적-이탈 편집을 제한 및/또는 회피함으로써 전체 안전성을 개선시키는 방식의 시스템/방법이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 세포를 감염시킬 수 있지만 바이러스 유전 물질이 결여된 바이러스 단백질의 조립체인 바이러스-유사 입자 (VLP)는 리보핵단백질 (RNP)로서 유전자 편집제를 전달하기 위한 잠재적으로 유망한 비히클로 부상하였다 (Campbell *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2016; Gee *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2021; Indikova and Indik, 2020; Lyu *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Mangeot *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). RNP 카고를 전달하는 VLP는 바이러스 전달의 효율 및 조직 표적화 이점을 활용하지만, 바이러스 게놈 통합 및 편집제의 연장된 발현과 연관된 위험을 피한다. 그러나, 유전자 편집제 RNP를 전달하기 위한 기존의 VLP-매개된 전략은 지금까지 생체내에서 낮은 내지 중간 정도의 편집 효율 또는 그들의 치료 효능의 제한된 검증을 지원한다 (Campbell *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2016; Gee *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2021; Indikova and Indik, 2020; Lyu *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Mangeot *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). 실제로, RNP-패키징 VLP를 사용하는 산후 생체내 유전자 편집의 치료 수준은 이전에 보고된 적이 없다.

[0009] 본 개시내용은 바이러스 및 비-바이러스 전달 전략 둘 다의 주요 이점을 제공하는 시험관내에서 및 생체내에서 치료용 RNP, 예컨대 Cas9 및 염기 편집기 (또는 본원에 개시된 "BE")를 패키징하고 전달하기 위한 조작된 바이러스-유사 입자 (본원에서 "VLP" 또는 "eVLP"로 상호교환적으로 지칭됨)의 개발 및 적용을 기반으로 한다. 다양한 실시양태에서, 이전에 보고된 VLP를 기반으로 한 초기 설계의 광범위한 VLP 아키텍처 조작을 통해 (Mangeot *et al.*, "Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins," *Nature* Communications, 2019) 리보핵단백질, 예컨대 sgRNA와 복합체화된 Cas9 및 BE를 세포, 조직 또는 대상체에게 전달할 수 있는 1세대, 2세대, 3세대 및 4세대 eVLP를 생성하였다. 카고 패키징, 방출, 및 국소화 병목 현상을 극복하기 위해 VLP 아키텍처를 반복적으로 조작함으로써, 최소 검출 표적-이탈 편집 뿐만 아니라, eVLP-전달된 BE 카고의 더 높은 편집 효율과 함께, 다양한 세포 유형 및 내인성 게놈 로커스에 걸쳐 시험관내에서 효율적인 표적-적중 염기 편집을 매개하는 최적화된 eVLP를 생성하였다.

[0010] 실시예의 다양한 실시양태에 기재된 바와 같이, 이러한 eVLP는 다중 불멸화된 세포주, 일차 인간 및 마우스 섬유모세포, 및 일차 인간 T 세포를 비롯한 다양한 세포 유형에서 최소 표적-이탈 편집으로 고도로 효율적인 염기 편집을 가능하게 할 뿐만 아니라, 이전에 보고된 Cas9-VLP와 비교하여 Cas9 뉴클레아제-매개된 indel 형성을 4.7배 개선시켰다. 본원에 기재된 BE-VLP 사용의 예시적인 적용은 실시예에서 마우스에게 eVLP의 단일 생체내 주사가 다중 장기에서 다양한 표적 유전자의 효율적인 염기 편집을 매개하였고, 혈청 Pcsk9 수준을 강력하게 녹다운시켰으며, 유전적 실명의 마우스 모델에서 시각 기능을 부분적으로 복원시켰음을 나타낸다. 실시예를 비롯

한 본 개시내용은 치료적 관련 효율, 및 표적-이탈 편집 또는 DNA 통합의 최소 위험으로 시험관내에서 및 생체내에서 유전자 편집제 (예를 들어, Cas9 또는 BE 리보핵단백질)를 일시적으로 전달하는데 유용한 플랫폼으로서 eVLP를 확립하고, 다른 단백질 및 RNP의 생체내 전달을 유사하게 개선시킨다.

[0011] 다양한 실시양태에서, eVLP (예를 들어, BE-VLP)는 하기를 포함하는 초분자 조립체를 포함한다: (a) 하기를 포함하는 외피: (i) 지질 막 (예를 들어, 단일층 또는 이중층 막) 및 (ii) 바이러스 외피 당단백질, 및 (b) 외피로 둘러싸이고 하기를 포함하는 다중-단백질 코어 영역: (i) Gag 단백질, (ii) Gag-Pro-Pol 단백질, 및 (iii) 절단가능한 링커 (예를 들어 프로테아제-절단가능한 링커, 예를 들어 MMLV 프로테아제-절단가능한 링커)를 통해 카고 단백질 (예를 들어 napDNAbp, 예컨대 Cas9, 또는 BE)에 융합된 Gag 단백질을 포함하는 Gag-카고 융합 단백질. 다양한 실시양태에서, 카고 단백질은 napDNAbp (예를 들어, Cas9)이다. 다른 실시양태에서, 카고 단백질은 염기 편집기이다. 다양한 다른 실시양태에서, VLP의 다중-단백질 코어 영역은 하나 이상의 가이드 RNA 분자를 추가로 포함하며, 이는 napDNAbp 또는 염기 편집기와 복합체화되어 리보핵단백질 (RNP)을 형성한다. 다양한 실시양태에서, VLP는 VLP의 다양한 단백질 및 핵산 (sgRNA) 성분을 코딩하는 플라스미드 DNA로 일시적으로 형질전환된 생산자 세포에서 제조된다. 이론에 구애되지 않고, 성분들은 세포 막에서 자가 조립되고, 세포로부터 완전히 성숙한 VLP를 방출시키기 위해 천연 발생 버딩 메카니즘 (예를 들어, 레트로바이러스 버딩 또는 다른 외피 바이러스의 버딩 메카니즘)에 따라 버딩된다. 일단 형성되면, Gag-Pol-Pro는 Gag-카고의 프로테아제-민감성 링커 (즉, [Gag]-[절단가능한 링커]-[카고], 여기서 카고는 BE-RNP 또는 napDNAbp RNP일 수 있음)를 절단하여, 이로써 경우에 따라 VLP 내에서 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNA를 방출시킨다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 프로테아제-민감성 링커가 절단된 VLP를 제공한다 (예를 들어, 하기를 포함하는 2개의 절단 생성물을 생성함: (i) gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열을 포함하는 융합 단백질, 및 (ii) 추가의 도메인, 예컨대 하나 이상의 NLS 및/또는 데아미나제에 융합될 수 있는 (즉, 염기 편집기를 형성하기 위해) napDNAbp). 예를 들어, 본 개시내용은 지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열 (NES)을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 VLP를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 절단된 및 절단되지 않은 생성물의 혼합물을 포함하는 VLP를 제공한다 (즉, napDNAbp 또는 BE의 일부는 gag 단백질로부터 절단되어 유리된 반면에, 일부는 gag 단백질로부터 아직 절단되지 않았음). 일부 실시양태에서, napDNAbp 또는 BE의 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과는 VLP 내부의 gag 단백질로부터 절단되었다. VLP가 수용자 세포에게 투여되고, 상기 수용자 세포에 의해 흡수되면, VLP의 내용물이 방출되며, 예를 들어 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNP가 방출된다. 일단 세포에 유입되면, RNP는 세포의 핵으로 전좌될 수 있으며 (특히, NLS가 RNP의 일부로 포함되는 경우), 여기서 가이드 RNA에 의해 지정된 표적 부위(들)에서 DNA 편집, 절단, 또는 다른 변형이 발생할 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 VLP의 다양한 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 벡터를 제공한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질 및 융합 단백질을 포함하는 바이러스-유사 입자 (VLP)를 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)을 제공하며, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함한다: (i) gag 뉴클레오캡시드 단백질; (ii) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp); (iii) 절단가능한 링커; 및 (iv) 핵 유출 서열 (NES). 일부 실시양태에서, napDNAbp는 하나 이상의 추가의 도메인, 예컨대 하나 이상의 NLS 및/또는 하나 이상의 데아미나제에 융합된다 (즉, 염기 편집기를 형성하기 위해). 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열 (NES)을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 VLP (즉, 절단가능한 링커가 프로테아제에 의해 절단된 VLP)를 포함한다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 하나 이상의 추가의 도메인, 예컨대 하나 이상의 NLS 및/또는 하나 이상의 데아미나제에 융합된다 (즉, 염기 편집기를 형성하기 위해). 본원에 제공된 제약 조성물의 각각의 성분은 VLP와 관련하여 상기 기재된 임의의 옵션, 또는 본 개시내용에 의해 제공된 임의의 다른 옵션을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용가능한 부형제를 추가로 포함한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 표적 세포를 본원에 제공된 임의의 조성물과 접촉시켜, 이로써 핵산 분자에 대한 하나 이상의 변형을 표적 부위에 설치하는 것을 포함하는, 염기 편집에 의해 표적 세포에서 핵산 분자를 편집하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 수의학적 또는 농업적 용도와 관련된 동물로부터의 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체에 있다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자에 대한 하나 이상의

변형은 질환 또는 장애의 증상의 감소, 완화 또는 예방과 연관이 있다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 융합 단백질을 제공한다: (i) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질; (ii) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp); (iii) 절단가능한 링커; 및 (iv) 핵 유출 서열 (NES). 본원에 제공된 융합 단백질의 각각의 성분은 BE-VLP와 관련하여 본원에 기재된 임의의 옵션, 또는 본 개시내용에 의해 제공된 임의의 다른 옵션을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 임의의 eVLP 성분, 예컨대 본원에 제공된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본원에 제공된 임의의 eVLP 단백질, 예컨대 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 벡터를 포함하는 세포, 및 본원에 제공된 임의의 복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 eVLP 단백질, 예컨대 융합 단백질을 포함하는 키트를 제공한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 형질감염시키거나, 형질도입시키거나, 전기천공시키거나 또는 달리 삽입하고, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로부터 VLP의 성분을 발현하여, 이로써 바이러스-유사 입자가 세포에서 자발적으로 조립되게 함으로써 생성된 VLP를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 조성물, 방법 또는 세포를 이용하여 본원에 기재된 VLP를 생성할 수 있다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 VLP, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 융합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 VLP, 폴리뉴클레오티드, 조성물, 및 융합 단백질을 사용하여 표적 세포에서 핵산 분자를 편집하는 방법을 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 VLP, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 조성물, 및 융합 단백질을 포함하는 세포를 제공한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 VLP, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 조성물, 및 융합 단백질을 포함하는 키트를 제공한다.

[0020] 상기 개념, 및 하기에서 논의되는 추가의 개념이 임의의 적합한 조합으로 배열될 수 있음을 이해해야 하며, 본 개시내용이 이러한 관점으로 제한되지 않기 때문이다. 추가로, 본 개시내용의 다른 이점 및 신규 특징은 첨부된 도면과 함께 고려될 때 다양한 비제한적인 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적인 실시양태의 상세한 설명과 조합되어 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1d: BE-VLP 아키텍처 및 초기 (v1) 편집 효율. **도 1a**: BE-VLP의 개략도. 염기 편집기 단백질은 입자 성숙 시 MLV 프로테아제에 의해 절단되는 링커를 통해 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) gag 폴리단백질의 C-말단에 융합된다. BE = 염기 편집기. **도 1b**: HEK293T 세포의 2개의 게놈 로커스에서 v1 BE-VLP의 아데닌 염기 편집 효율. 표적 아데닌의 프로토스페이서 위치는 아래 첨자로 표시되며 (즉, A_5 = 위치 5의 아데닌), 여기서 PAM은 위치 21-23이다. 데이터는 n = 3개의 독립적인 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. **도 1c**는 본원에서 고려되는 바이러스-유사 입자에 대한 일반화된 구조를 제공하며, 이는 (a) 레트로바이러스 버딩 과정의 결과로서 생산자 세포의 세포 막으로부터 유래되는 지질 막, (b) 바이러스 외피 당단백질 (이는 수용자 세포에 대한 결합을 용이하게 하고, 친화성을 일으킴), 및 (c) 레트로바이러스 Gag 단백질을 포함하는 단백질의 조립체를 포함하는 단백질 코어 또는 쉘을 포함하고, Gag 단백질의 일부는 절단가능한 단백질 카고 (예를 들어, napDNAbp 또는 BE) 또는 Pro-Pol (프로테아제 활성을 포함함)에 융합된다. 절단가능한 단백질 카고는 프로테아제-절단가능한 링커에 의해 Gag 단백질에 결합되고, VLP의 조립 후 어느 시점에서 Pro-Pol에 의해 절단되기 시작한다. 백그라운드로서, **도 1d**는 전형적인 레트로바이러스의 버딩 과정, 및 "MA" 도메인 (매트릭스 도메인), "CA" 도메인 (캡시드 도메인), 및 "NC" 도메인 (뉴클레오캡시드 도메인)을 포함하는 Gag 폴리단백질의 관여를 도시하는 개략도를 제공한다. 이론에 구애되지 않고, 본원에 기재된 eVLP의 Gag, Gag-Pro-Pol, 및 Gag-카고 융합은 유사한 버딩 과정을 유도하여, 생산자 세포로부터 방출되는 성숙 eVLP를 형성하는 것으로 믿어진다.

도 2a-2g: BE-VLP의 최적화 (VLP 효능을 제한하는 병목 현상에 대한 해결책의 식별 및 조작은 v2, v3, 및 v4 eVLP를 생성함). **도 2a**: 더욱 효율적인 링커 절단은 VLP 성숙 후 개선된 카고 방출을 일으킨다. **도 2b**:

HEK293T 세포에서 BCL11A 인핸서 부위의 위치 A7에서 v1 및 v2 BE-eVLP의 아데닌 염기 편집 효율. 프로테아제-절단가능한 링커 서열의 최적화가 도시된다 (**도 8** 또한 참조). **도 2c**: 생산자 세포에서의 카고의 개선된 국소화는 eVLP로의 더욱 효율적인 혼입을 일으킨다. **도 2d**: 절단가능한 링커의 상류에 3xNES 모티프의 설치는 생산자 세포에서의 gag-3xNES-카고의 세포질 국소화 및 형질도입된 세포에서 유리 ABE 카고의 핵 국소화를 촉진시킨다. **도 2e**: gag-ABE 국소화의 최적화 (**도 9a-9b** 또한 참조). HEK293T 세포에서 BCL11A 인핸서 부위의 위치 A_7에서 v2.4 및 v3 BE-eVLP의 아데닌 염기 편집 효율. **도 2f**: 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론은 입자당 카고 단백질의 양과 효율적인 입자 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제의 양 사이에 균형을 이룬다. **도 2g**: gag-ABE:gag-pro-pol 비의 최적화. HEK293T 세포에서 BCL11A 인핸서 부위의 위치 A_7에서 상이한 gag-ABE:gag-pro-pol 화학량론에 의한 v3.4 eVLP의 아데닌 염기 편집 효율. 범례는 gag-ABE 및 gag-pro-pol 플라스미드의 총량 중 % gag-ABE 플라스미드를 나타낸다. **도 2b, 2e,** 및 **2g**: 값 및 오차 막대는 n = 3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균 ± s.e.m.을 반영한다. 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 4-파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하였다.

도 3a-3j: BE-eVLP의 특징분석. **도 3a**: 항-Cas9 및 항-MLV (p30) ELISA에 의한 eVLP당 BE 분자의 정량화 (**도 10a-10c** 또한 참조). 값 및 오차 막대는 n=3개의 독립적인 복제물의 평균±s.e.m.을 반영한다. **도 3b**: v1 sgRNA 존재비에 대해 정규화된, sgRNA-특이적 프라이머를 사용하는 RT-qPCR에 의한 상대적인 sgRNA 존재비의 정량화. 값 및 오차 막대는 n=3개의 기술적 복제물의 평균±s.e.m.을 반영한다. **도 3c-3d**: HEK293T 세포의 *BCL11A* 인핸서 부위에서 (**도 3c**) 및 NIH 3T3 세포의 *Dnmt1* 부위에서 (**도 3d**) v1, v2.4, v3.4 및 v4 BE-eVLP에 의한 편집 효율의 비교. 값 및 오차 막대는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균 ± s.e.m.을 반영한다. 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 4-파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하였다. **도 3e**: *HEK2* 또는 *BCL11A* 인핸서 로커스를 별도로 표적화하는 단일 BE-eVLP 또는 두 로커스 모두를 동시에 표적화하는 멀티플렉스 v4 BE-eVLP의 HEK293T 세포에서 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. **도 3f**: Neuro-2a 세포 또는 3T3 섬유모세포에서 FuG-B2-위형화된 v4 BE-eVLP의 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. **도 3g**: v4 BE-eVLP 또는 ABE8e 플라스미드로 처리된 HEK293T 세포의 3가지 표적-적중 게놈 로커스 및 그들의 상응하는 Cas-의존성 표적-이탈 부위에서 아데닌 염기 편집 효율. OT1 = 표적-이탈 부위 1, OT2 = 표적-이탈 부위 2, OT3 = 표적-이탈 부위 3. **도 3h**: v4 BE-eVLP 또는 ABE8e 플라스미드로 처리된 HEK293T 세포의 6가지 표적-이탈 R-루프에서 Cas-독립적인 표적-이탈 편집 빈도. OTRL = 표적-이탈 R-루프. (실험 타임라인에 대해서는 도 11a, 및 표적-적중 편집 대조군에 대해서는 도 11b 또한 참조). **도 3i**: 용해된 VLP 또는 용해 완충제 단독의 qPCR에 의해 검출된 v4 BE-eVLP당 BE-코딩 DNA의 분자. **도 3j**: BE-VLP로 처리되거나 또는 BE-코딩 플라스미드로 형질감염된 세포로부터의 용해물의 qPCR에 의해 검출된 BE-코딩 DNA의 양. **도 3e-3j**: 데이터는 n = 3개의 독립적인 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m.으로 나타낸다.

도 4a-4c: v4 BE-eVLP를 사용하여 일차 인간 및 마우스 세포에서 염기 편집. **도 4a**: 환자-유래된 일차 인간 섬유모세포에서 *COL7A1*(R185X) 돌연변이의 교정 효율. v4 BE-VLP에 의한 형질도입 48시간 후에 게놈 DNA를 세포로부터 수확하였다. 값 및 오차 막대는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균±s.e.m.을 반영한다. 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 4-파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하였다. **도 4b**: 일차 마우스 섬유모세포에서 *Idua*(W392X) 돌연변이의 교정 효율. v4 BE-VLP에 의한 형질도입 48시간 후에 게놈 DNA를 세포로부터 수확하였다. 값 및 오차 막대는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균±s.e.m.을 반영한다. 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 4-파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하였다. **도 4c**: 일차 인간 T 세포의 *B2M* 및 *CIITA* 로커스에서 아데닌 염기 편집 효율. T 세포는 v4 BE-VLP에 의해 2회 형질도입되었고, 제2 형질도입 48시간 후에 게놈 DNA를 세포로부터 수확하였다 (실시예 참조). 데이터는 n = 3개의 독립적인 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다.

도 5a-5b: v4 BE-eVLP를 사용하여 중추 신경계에서 생체내 염기 편집. **도 5a**: v4 BE-eVLP의 P0 ICV 주사의 개략도. *Dnmt1*-표적화 v4 BE-eVLP는 EGFP-KASH를 코딩하는 렌티바이러스와 함께 공동-주사되었다. 주사 3주 후에 조직을 수확하였고, 피질 및 중뇌를 분리하였다. 각각의 조직에 대해 핵을 분리하였고, 분류되지 않은 벌크 (모든 핵) 또는 GFP+ 핵으로서 고처리량 시퀀싱에 의해 분석하였다. **도 5b**: 분류되지 않은 벌크 (모든 핵) 및 GFP+ 집단의 *Dnmt1* 로커스에서의 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n = 4마리의 마우스에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다.

도 6a-6e: v4 BE-eVLP의 단일 전신 주사로부터 Pcsk9의 생체내 녹다운. **도 6a**: BE-eVLP의 전신 주사의 개략도. *Pcsk9*-표적화 BE-eVLP는 6 내지 7주령 C57BL/6J 마우스의 안구 후방으로 주사되었다. 주사 1주 후에

장기를 수확하였고, 분류되지 않은 세포의 게놈 DNA를 시퀀싱하였다. **도 6b**: v1 BE-VLP 또는 v4 BE-eVLP의 전신 주사 후에 마우스 간의 *Pcsk9* 엑손 1 스플라이스 공여자에서 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n=3마리의 마우스 ($4x10^{11}$ VLP에서 v1 BE-VLP 및 v4 BE-eVLP) 또는 n=4마리의 마우스 ($7x10^{11}$ eVLP에서 v4 BE-eVLP)에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. **도 6c**: $7x10^{11}$ v4 BE-eVLP의 전신 주사 후에 마우스 심장, 신장, 간, 폐, 근육 및 비장의 *Pcsk9* 엑손 1 스플라이스 공여자에서 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n=4마리의 마우스 (처리) 또는 n=3마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. **도 6d**: v4 BE-eVLP-처리, AAV-처리 및 비처리 마우스의 간으로부터의 14가지의 CIRCLE-seq-지정된 표적-이탈 로커스에 대한 프로토스페이서 위치 4-10 내에서 A·T에서 G·C로의 돌연변이를 함유하는 DNA 시퀀싱 판독. 데이터는 n=4마리의 마우스 (BE-eVLP), n=5마리의 마우스 (AAV), 또는 n=3마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. vg = 바이러스 게놈. **도 6e**: ELISA에 의해 측정된 혈청 Pcsk9 수준. 데이터는 n=4마리의 마우스 (처리) 또는 n=3마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다.

도 7a-7j: 유전적 실명의 마우스 모델에서 v4 BE-eVLP에 의한 생체내 염기 편집. **도 7a**: 프로토스페이서의 위치 A6에서 A·T에서 G·C로의 전환에 의해 교정될 수 있는 R44X 돌연변이 (표지 "R44X" 아래에 회색 이탤릭체로 표시됨)를 둘러싸는 Rpe65 엑손 3 (회색으로 음영 처리되고, PAM은 밑줄 표시됨)의 개략도. 도시된 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 497 (상부) 및 서열식별번호: 498 (하부)이다. **도 7b**: 망막하 주사의 개략도. 주사 5주 후에, 망막전위도 (ERG)를 통해 표현형 구제를 평가하였고, 후속적으로 시퀀싱을 위해 조직을 수확하였다. **도 7c**: rd12 마우스로부터 수확한 게놈 DNA에서 프로토스페이서의 위치 A_3, A_6 및 A_8에서 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n = 6마리의 마우스 (둘 다 처리된 그룹) 또는 n = 4마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. **도 7d**: 처리된 rd12 마우스로부터 수확한 게놈 DNA의 대립 유전자 빈도 분포. 데이터는 n = 6마리의 마우스에 대한 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. 8e-LV = ABE8e-NG-LV, 8e-eVLP = v4 ABE8e-NG-eVLP. **도 7e**: 밤새 암순응 후에 ERG에 의해 측정된 암소시 a-파 및 b-파 진폭. 데이터는 n = 8마리의 마우스 (야생형), n = 6마리의 마우스 (ABE8e-NG-LV 및 v4 ABE8e-NG-eVLP) 또는 n = 4마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. **도 7f**: rd12 마우스로부터 수확한 게놈 DNA에서 프로토스페이서의 위치 A3, A6 및 A8에서 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n = 6마리의 마우스 (v4 ABE7.10-NG-eVLP) 또는 n = 4마리의 마우스 (ABE7.10-NG-LV 및 비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. P 값은 양측 t-검정을 이용하여 계산되었다. **도 7g**: 처리된 rd12 마우스로부터 수확한 게놈 DNA의 대립 유전자 빈도 분포. 데이터는 n = 6마리의 마우스 (v4 ABE7.10-NG-eVLP) 또는 n = 4마리의 마우스 (ABE7.10-NG-LV 및 비처리)에 대한 평균 ± s.e.m으로 나타낸다. 7.10-LV = ABE7.10-NG-LV, 7.10-eVLP = v4 ABE7.10-NG-eVLP. **도 7h**: 밤새 암순응 후에 ERG에 의해 측정된 암소시 a-파 및 b-파 진폭. 데이터는 n=8마리의 마우스 (야생형), n=7마리의 마우스 (v4 ABE7.10-NG-eVLP), n=5마리의 마우스 (ABE7.10-NG-LV), 또는 n=4마리의 마우스 (비처리)에 대한 개별 데이터 점 및 평균±s.e.m으로 나타낸다. P 값은 양측 t-검정을 이용하여 계산되었다. **도 7i**: 야생형, 비처리, v4 ABE7.10-NG-eVLP-처리 및 ABE7.10-NG-LV-처리 마우스의 RPE 조직으로부터의 단백질 추출물의 웨스턴 블롯. **도 7j**: 야생형, 비처리, ABE7.10-NG-LV-처리 및 v4 ABE7.10-NG-eVLP-처리 마우스로부터의 대표적인 ERG 파형.

도 8a-8e: v1 BE-VLP 및 v2 BE-eVLP의 조작 및 특징분석. **도 8a**: VLP 생성의 검증. 항-Cas9, 항-p30 및 항-VSV-G 항체를 사용하여 정제된 BE-VLP로부터 단백질의 이뮤노블롯 분석. **도 8b**: HEK293T 세포에서 *BCL11A* 인핸서 부위의 위치 A_7에서 v1 BE-VLP의 아데닌 염기 편집 효율. 값 및 오차 막대는 n=3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균±s.e.m.을 반영한다. 데이터는 비선형 회귀를 이용하여 4-파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하였다. **도 8c**: gag 구조 단백질에 융합된 ABE8e를 갖는 미성숙 BE-VLP의 개략도. 단백질 분해 비리온 성숙 동안에 gag로부터 ABE8e의 유리를 촉진시키는 최적의 절단가능한 서열을 결정하기 위해, 다양한 MMLV 프로테아제 절단 부위가 gag와 ABE8e 사이에 삽입되었다. 화살표는 절단 부위를 나타낸다. 도시된 서열은 PRSSLY (서열식별번호: 499), PALTP (서열식별번호: 500), VQAL (서열식별번호: 501), VLTQ (서열식별번호: 502), PLQVL (서열식별번호: 503), TLNIERR (서열식별번호: 504), TSTLL (서열식별번호: 505), 및 MENSS (서열식별번호: 506)이다. **도 8d**: 정제된 v2 BE-VLP 변이체에서의 절단된 ABE8e 대 전장 gag-ABE8e를 평가하는 대표적인 웨스턴 블롯. **도 8e**: 웨스턴 블롯으로부터 절단된 ABE8e 분율의 농도계-기반 정량화. 데이터는 n=3개의 기술적 복제물에 대한 평균 값 +/- s.e.m.으로 나타낸다.

도 9a-9d: 생산자 세포에서의 gag-ABE 국소화의 개선. **도 9a**: 핵 배제 신호 (NES)의 존재 (우측) 및 부재 (좌

측) 시에 생산자 세포에서의 BE-RNP 카고의 국소화를 도시하는 개략도. **도 9b**: v2.4 및 v3 BE-eVLP 구축물. 3가지 HIV NES를 gag-ABE 융합체의 C-말단 또는 N-말단에 융합시켰다. 단백질 분해 비리온 성숙 후에 최종 BE 카고가 NES에 없도록, 프로테아제 절단가능한 링커를 ABE와 NES 서열 사이에 혼입시켰다. 도시된 프로테아제 절단 서열은 TSTLL (서열식별번호: 505), MENSS (서열식별번호: 506), MSKLL (서열식별번호: 507), ATVVS (서열식별번호: 508), PLQVL (서열식별번호: 503), TLNIERR (서열식별번호: 504), IRKIL (서열식별번호: 509), 및 FLDG (서열식별번호: 510)이다. **도 9c**: v2.4 gag-ABE 구축물 또는 v3.4 gag-3xNES-ABE 구축물로 형질감염된 생산자 세포의 대표적인 면역형광 영상. 형질감염 48시간 후, 세포를 파라포름알데히드에서 고정시키고, 제공된 범례에 도시된 바와 같이, 세포골격을 염색하기 위해 항-튜불린 항체로 염색하고, 핵 염색을 위해 DAPI를 사용하고, gag-ABE 융합을 시각화하기 위해 항-Cas9 항체를 사용하였다. 축적 막대는 50 μm를 나타낸다. **도 9d**: v2.4 gag-ABE 구축물 또는 v3.4 gag-3xNES-ABE 구축물의 세포질 국소화의 자동화된 영상 분석-기반 정량화. 데이터는 n=3개의 기술적 복제물에 대한 평균 값 +/- s.e.m.으로 나타낸다. P 값은 양측 t-검정을 이용하여 계산되었다.

도 10a-10g: BE-eVLP의 특징분석. **도 10a**: v4 BE-eVLP의 대표적인 음성-염색 투과 전자 현미경 사진 (TEM). 축적 막대는 200 nm를 나타낸다. **도 10b-10c**: v1, v2.4, v3.4 및 v4 BE-eVLP에 대한 단백질 함량은 항-Cas9 또는 항-MLV(p30) ELISA에 의해 측정되었다. 데이터는 n=3개의 기술적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 10d**: HEK293T 세포의 *BCL11A* 인핸서 부위에서 입자 수-정규화된 v1, v2.4, v3.4 및 v4 BE-VLP에 의한 편집 효율 비교. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 10e**: HEK293T 세포 및 NIH 3T3 섬유모세포의 v4 BE-eVLP 처리 후 세포 생존력. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 10f**: HEK293T 세포의 *EMX1* 로커스에서 v1 Cas9-VLP 및 v4 Cas9-eVLP에 의해 생성된 indel 빈도. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 10g**: Neuro-2a 세포 또는 3T3 섬유모세포에서 VSV-G-위형화된 v4 BE-eVLP의 아데닌 염기 편집 효율. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다.

도 11a-11d: v4 BE-eVLP에 의한 표적-이탈 편집의 평가. **도 11a**: 직교식 R-루프 검정에 대한 실험 타임라인. **도 11b**: 직교식 R-루프 실험에 대한 표적-적중 편집 대조군. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 11c**: RDEB 섬유모세포의 v4 BE-VLP 처리 후 세포 생존력. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 11d**: v4-BE-eVLP 처리된 RDEB 환자-유래된 섬유모세포의 게놈 DNA로부터 이전에 식별된 10가지 표적-이탈 로커스에 대해 프로토스페이서 위치 4-10 내에서 A·T에서 G·C로의 돌연변이를 함유하는 DNA 시퀀싱 판독. 회색 점선은 0.1%의 가장 높은 관찰된 백그라운드 돌연변이율을 나타낸다. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다.

도 12: Dnmt1에서의 Neuro2a 세포의 BE-VLP의 편집 효율.

도 13a-13b: P0 ICV 주사 후 마우스 뇌로부터 핵 분류에 대한 유세포 분석. **도 13a**: 단일항 핵은 FSC/BSC 비 및 다이사이클 루비(DyeCycle Ruby) 신호를 기반으로 하여 게이팅되었다. 첫번째 행은 GFP-음성 샘플에 대한 게이팅 전략을 입증한다. 벌크 핵은 단일항 핵에 대한 게이트 D를 통과한 이벤트에 상응한다. **도 13b**: P0 ICV 주사 후 유세포 분석에 의해 측정된 GFP-양성 핵의 백분율. 데이터는 n=3개의 생물학적 복제물에 대한 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다.

도 14a-14c: 전신 v4 BE-eVLP 주사 후 간 독성의 평가. **도 14a**: v4 BE-eVLP 주사 1주 후에 혈장 아스파르테이트 트랜스아미나제 (AST) 및 알라닌 트랜스아미나제 (ALT) 수준. **도 14b-14c**: (**도 14b**) 비처리 마우스 및 (**도 14c**) v4 BE-eVLP 처리 마우스의 주사 1주 후에 간의 헤마톡실린 및 에오신 염색에 의한 조직병리학적 평가. 각각의 대표적인 예가 도시된다. 축적 막대는 50 μm를 나타낸다.

도 15a-15c: v4 BE-eVLP 또는 렌티바이러스 처리 후 RPE cDNA의 시퀀싱 분석. **도 15a**: v4 BE-eVLP 및 렌티바이러스 처리는 표적 아데닌 (A_6)에서 50-60%의 A·T에서 G·C로의 전환을 일으켰다. 데이터는 n = 6개 (ABE8e-NG-LV, ABE8e-NG-eVLP, 및 ABE7.10-NG-eVLP), 또는 n = 4개 (ABE7.10-NG-LV 및 비처리)의 복제물에 대한 개별 데이터 점 및 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다. **도 15b-15c**: (**도 15b**) *Mcm3ap* 및 (**도 15c**) *Perp* 전사체의 고처리량 시퀀싱에 의해 측정되는 v4 BE-eVLP 및 렌티바이러스에 의한 표적-이탈 A에서 G로의 RNA 편집. 데이터는 n = 6개 (ABE8e-NG-LV, ABE8e-NG-eVLP, 및 ABE7.10-NG-eVLP), 또는 n = 4개 (ABE7.10-NG-LV 및 비처리)의 복제물에 대한 평균 값±s.e.m.으로 나타낸다.

도 16. eVLP의 다양한 자가-조립 성분을 코딩하는 발현 플라스미드 세트를 사용하여 생산자 세포에서의 BE RNP

를 포함하는 eVLP (예를 들어, BE-VLP)의 실시양태의 개요: (a) Gag-BE 융합 단백질 (예를 들어, 레트로바이러스 Gag, MMLV-Gag-BE 융합 단백질)을 코딩하는 플라스미드; (b) Gag-Pro-Pol 단백질 (예를 들어, 레트로바이러스 단백질, 예컨대 MMLV 프로테아제 전구체)을 코딩하는 플라스미드; (c) BE sgRNA를 코딩하는 플라스미드; 및 (d) 외피 당단백질 (예를 들어, 수포성 구내염 바이러스의 스파이크 당단백질 (VSV-G))을 코딩하는 플라스미드. 플라스미드를 생산자 세포에 일시적으로 공동-형질감염시키고, 코딩된 단백질 및 sgRNA 생성물이 코딩된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 4세대 eVLP와 같이, 본 발명자들은 VLP로 패키징되는데 이용되는 Gag-카고의 양과 VLP 성숙을 위해 필요한 레트로바이러스 프로테아제 (Gag-Pro-Pol 융합에서 "Pro")의 양 사이에 균형을 이루는 Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 화학량론 비를 발견하였다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 비는 생산자 세포에게 일시적으로 전달된 각각의 성분을 코딩하는 플라스미드의 적절한 비에 의해 달성된다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합의 화학량론을 조절하기 위해, VLP 생성을 위해 형질감염되는 Gag-카고를 코딩하는 플라스미드 (예를 들어, Gag-3xNES-ABE8e) 대 야생형 MMLV gag-pro-pol 플라스미드의 비를 변화시켰다. gag-카고 플라스미드의 양을 v3.4 BE-eVLP를 생성하기 위해 사용되는 원래의 비율보다 높게 증가시키면 (38% Gag-카고 플라스미드 및 62% gag-pro-pol 플라스미드) 편집 효율이 개선되지 않는다는 것이 발견되었다 (**도 2g**). gag-카고 플라스미드의 비율을 38%에서 25%로 감소시키면 편집 효율이 적당히 개선되었다 (**도 2g**). 그러나, gag-카고 플라스미드의 비율을 25% 아래로 추가로 감소시키면 편집 효율이 감소되었다 (**도 2g**). 이들 결과는 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 gag-카고의 양과 VLP 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 모델과 일치한다. 한 실시양태에서, 최적화의 이러한 최종 라운드 결과를 통해 4세대 (v4) BE-eVLP 제형이 밝혀졌고 (**도 2g**), 이는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론 (25% gag-BE)과 v3.4 BE-eVLP 아키텍처를 조합한다.

도 16에 도시된 바와 같이, 본 개시내용은 본원에 기재된 eVLP (예를 들어, BE-VLP) 자가-조립 성분을 코딩하는 복수개의 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 복수개의 폴리뉴클레오티드를 제공한다: (i) 바이러스 외피 당단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드); (ii) 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드); (iii) 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 제3 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드): (a) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질; (b) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp); (c) 절단가능한 링커; 및 (d) 핵 유출 서열 (NES)); 및 (iv) 가이드 RNA (gRNA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제4 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드). 일부 실시양태에서, gRNA는 제3 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 융합 단백질의 napDNAbp에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비는 대략 10:1, 대략 9:1, 대략 8:1, 대략 7:1, 대략 6:1, 대략 5:1, 대략 4:1, 대략 3:1, 대략 2:1, 대략 1.5:1, 대략 1:1, 또는 대략 0.5:1이다. 특정 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비는 대략 3:1이다.

도 17a-17b: v4 BE-eVLP는 일차 인간 조혈 줄기 세포 (HSC)를 효율적으로 편집할 수 있다. **도 17a**: HSC에 대한 4-마커 분류. 조혈 선조 세포 (HPC): $CD34^{+}/CD38^{+}$. HSC: $CD34^{+}/CD38^{-}/CD90^{+}/CD45RA^{-}$. **도 17b**: *BCL11A* 인핸서 로커스에서 아데닌 염기 편집.

도 18: v4 BE-eVLP는 HSC 세포 생존력을 최소한으로 교란시킨다.

도 19a-19b: v4 BE-eVLP는 최소 표적-이탈 편집으로 효율적인 표적-적중 편집을 가능하게 한다. 동일한 부위를 표적화하는 이전의 염기 편집 접근법 (예를 들어, [Zeng *et al., Nat. Med.* (2020)])과 비교하여 더 낮은 Cas-의존성 표적-이탈 편집이 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] **정의**

[0023] 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 본 발명에서 사용되는 여러 용어의 일반적인 정의를 기술자에게 제공한다: [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper

Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 바와 같이, 하기 용어들은 달리 명시되지 않는다면 그들에 대해 부여된 의미를 갖는다.

[0024] **아데노신 데아미나제**

[0025] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아데노신 데아미나제" 또는 "아데노신 데아미나제 도메인"은 아데노신 (또는 아데닌)의 탈아미노화 반응을 촉매하는 단백질 또는 효소를 지칭한다. 상기 용어들은 상호교환적으로 사용된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 아데노신 데아미나제 도메인을 포함하는 핵염기 편집기 융합 단백질을 제공한다. 예를 들어, 아데노신 데아미나제 도메인은 링커에 의해 연결된 제1 아데노신 데아미나제 및 제2 데아미나제 도메인의 이종이량체를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 아데노신 데아미나제 (예를 들어, 조작된 아데노신 데아미나제 또는 진화된 아데노신 데아미나제)는 DNA 또는 RNA에서 아데닌 (A)을 이노신 (I)으로 전환시키는 효소일 수 있다. 이러한 아데노신 데아미나제는 A:T에서 G:C로의 염기 쌍 전환을 일으킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 데아미나제 유기체로부터의 천연 발생 데아미나제의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 데아미나제는 천연에서 발생하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 데아미나제는 천연 발생 데아미나제와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일하다.

[0026] 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 박테리움, 예컨대, 이. 콜라이(*E. coli*), 에스. 아우레우스(*S. aureus*), 에스. 티피(*S. typhi*), 에스. 푸트레파시엔스(*S. putrefaciens*), 에이치. 인플루엔자에(*H. influenzae*), 또는 씨. 크레센투스(*C. crescentus*)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 TadA 데아미나제이다. 일부 실시양태에서, TadA 데아미나제는 이. 콜라이 TadA 데아미나제 (ecTadA)이다. 일부 실시양태에서, TadA 데아미나제는 말단절단된 이. 콜라이 TadA 데아미나제이다. 예를 들어, 말단절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 하나 이상의 N-말단 아미노산이 누락될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19 또는 20개의 N-말단 아미노산 잔기가 누락될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 ecTadA는 전장 ecTadA에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19 또는 20개의 C-말단 아미노산 잔기가 누락될 수 있다. 일부 실시양태에서, ecTadA 데아미나제는 N-말단 메티오닌을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 본원에 추가로 기재된 바와 같이 ecTadA(8e) (즉, 염기 편집기 ABE8e에서 사용됨)를 포함한다. 2018년 3월 15일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2018/0073012를 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0027] **염기 편집**

[0028] "염기 편집"은 표적화된 게놈 로커스에서 특이적 핵산 염기에서 또 다른 염기로의 전환을 수반하는 게놈 편집 기술을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 이는 이중-가닥 DNA 파손 (DSB), 또는 단일 가닥 파손 (즉, 니킹)을 필요로 하지 않고 달성될 수 있다. 지금까지, CRISPR-기반 시스템을 비롯한 다른 게놈 편집 기술은 관심 로커스에 DSB를 도입시키는 것으로 시작된다. 후속적으로, 세포 DNA 복구 효소가 파손을 수리하여, 일반적으로 DSB 부위에서 염기의 무작위 삽입 또는 결실 (indel)이 일어난다. 그러나, 전체 게놈의 확률론적 파괴보다는 표적 로커스에서 점 돌연변이의 도입 또는 교정이 필요한 경우, 이들 게놈 편집 기술은 교정률이 낮고 (예를 들어, 전형적으로 0.1% 내지 5%) 주요 게놈 편집 생성물이 indel이기 때문에 적합하지 않다. 무작위 indel을 동시에 도입시키지 않고 유전자 교정 효율을 증가시키기 위해, CRISPR/Cas9 시스템은 DSB를 형성하지 않고 한 DNA 염기를 또 다른 염기로 직접적으로 전환시키도록 변형된다. [Komor, A.C., *et al.*, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424 (2016)]를 참조하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0029] **염기 편집기**

[0030] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "염기 편집기 (BE)" 및 "핵염기 편집기"는 핵산 서열 (예를 들어, DNA 또는 RNA) 내의 염기 (예를 들어, A, T, C, G, 또는 U)를 변형시켜, 한 염기를 또 다른 염기로 전환시킬 수 있는 (예를 들어, A에서 G로, A에서 C로, A에서 T로, C에서 T로, C에서 G로, C에서 A로, G에서 A로, G에서 C로, G에서 T로, T에서 A로, T에서 C로, 또는 T에서 G로) 폴리펩티드를 포함하는 작용제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 핵산 내의 염기, 예컨대 DNA 분자 내의 염기를 탈아미노화시킬 수 있다. 아데노신 핵염기 편집기의 경우에는, 핵염기 편집기가 DNA에서 아데닌 (A)을 탈아미노화시킬 수 있다. 이러한 핵염기 편집기에는 아데노신 데아미나제에 융합된 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp)이 포함될 수 있다. 일

부 핵염기 편집기에는 본원에 기재된 염기 편집 방법에서 활용되는 CRISPR-매개된 융합 단백질이 포함된다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 R-루프의 형성을 통해 가이드 RNA-프로그래밍된 방식으로 핵산에 결합하지만 핵산을 절단시키지 않는, 데아미나제에 융합된 뉴클레아제-불활성 Cas9 (dCas9)를 포함한다. 예를 들어, PCT/US2016/058344 (2017년 4월 27일에 WO 2017/070632로 공개되었고, 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 융합 단백질의 dCas9 도메인은 D10A 및 H840A 돌연변이 (Cas9가 핵산 듀플렉스의 한 가닥만을 절단할 수 있게 함)를 포함할 수 있다. 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) Cas9의 DNA 절단 도메인은 2개의 서브도메인, HNH 뉴클레아제 서브도메인 및 RuvC1 서브도메인을 포함한다. HNH 서브도메인은 gRNA에 상보성인 가닥 ("표적화된 가닥", 또는 편집 또는 탈아미노화가 발생하는 가닥)을 절단하는 반면에, RuvC1 서브도메인은 PAM 서열을 함유하는 비-상보성 가닥 ("비-편집된 가닥")을 절단한다. RuvC1 돌연변이체 D10A는 표적화된 가닥에서 닉을 생성하는 반면에, HNH 돌연변이체 H840A는 비-편집된 가닥에서 닉을 생성한다 ([Jinek *et al.*, *Science*, 337:816-821(2012); Qi *et al.*, *Cell*. 28;152(5):1173-83 (2013)] 참조).

[0031] 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 1) 뉴클레오티드-, 뉴클레오시드- 또는 핵염기-변형 효소 및 2) 특이적 핵산 서열에 결합하도록 프로그래밍될 수 있는 핵산 결합 단백질의 조합을 이용하여 폴리뉴클레오티드 서열의 핵염기의 또 다른 핵염기로의 전환 (즉, 전이 또는 전위)를 주로 (예를 들어, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 99% 초과, 99.9% 초과, 또는 100%) 초래하는 거대분자 또는 거대분자 복합체이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 표적 서열로 안내하는 DNA 결합 도메인 (예를 들어 프로그래밍가능한 DNA 결합 도메인, 예컨대 dCas9 또는 nCas9)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 프로그래밍가능한 DNA 결합 도메인 (예를 들어, dCas9 또는 nCas9)에 융합된 핵염기 변형 도메인을 포함한다. 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "핵염기 변형 효소" 및 "핵염기 변형 도메인"은 핵염기를 변형시킬 수 있고 한 핵염기를 또 다른 것으로 전환시킬 수 있는 효소 (예를 들어 데아미나제, 예컨대 시티딘 데아미나제 또는 아데노신 데아미나제)를 지칭한다. 핵염기 편집기의 핵염기 변형 효소는 핵산 서열에서 시토신 (C) 염기를 표적화할 수 있고, C를 티민 (T) 염기로 전환시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, C에서 T로의 편집은 데아미나제, 예를 들어 시티딘 데아미나제에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, A에서 G로 편집은 데아미나제, 예를 들어 아데노신 데아미나제에 의해 수행된다. 다른 유형의 염기 전환 (예를 들어, C에서 G로)을 수행할 수 있는 핵염기 편집기 또한 고려된다.

[0033] "분할 핵염기 편집기"는 2개의 별도의 핵산에 의해 코딩되는 N-말단 부분 (N-말단 절반부로도 지칭됨) 및 C-말단 부분 (C-말단 절반부로도 지칭됨)으로서 제공되는 핵염기 편집기를 지칭한다. 핵염기 편집기의 N-말단 부분 및 C-말단 부분에 상응하는 폴리펩티드는 조합되어 완전한 핵염기 편집기를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, dCas9 또는 nCas9를 포함하는 핵염기 편집기의 경우, "분할"은 분할 Cas9에서 본원에 기재된 위치에서 dCas9 또는 nCas9 도메인에 위치한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기의 N-말단 부분은 분할 Cas9의 N-말단 부분을 함유하고, 핵염기 편집기의 C-말단 부분은 분할 Cas9의 C-말단 부분을 함유한다. 유사하게, 인테인-N 또는 인테인-C는 핵염기 편집기의 N- 및 C-말단 부분의 결합을 위해 각각 핵염기 편집기의 N-말단 부분 또는 C-말단 부분에 융합되어, 완전한 핵염기 편집기를 형성할 수 있다.

[0034] 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 C를 T로 전환시킨다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 시토신 데아미나제를 포함한다. "시토신 데아미나제" 또는 "시티딘 데아미나제"는 화학 반응 "시토신 + H_2O → 우라실 + NH_3" 또는 "5-메틸-시토신 + H_2O → 티민 + NH_3"을 촉매하는 효소를 지칭한다. 반응식으로부터 명백할 수 있듯이, 이러한 화학 반응은 C에서 U/T로의 핵염기 변화를 일으킨다. 유전자의 맥락에서, 이러한 뉴클레오티드 변화 또는 돌연변이는 단백질에서 아미노산 변화를 일으킬 수 있고, 이는 단백질 기능, 예를 들어 기능 상실 또는 기능 획득에 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, C에서 T로의 핵염기 편집기는 시티딘 데아미나제에 융합된 dCas9 또는 nCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시티딘 데아미나제 도메인은 dCas9 또는 nCas9의 N-말단에 융합된다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 우라실 글리코실라제를 억제하는 도메인 및/또는 핵 국소화 신호를 추가로 포함한다. 이러한 핵염기 편집기는 관련 기술분야에, 예를 들어 [Rees & Liu, *Nat Rev Genet*. 2018;19(12):770-788 및 Koblan *et al.*, *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):843-846]; 뿐만 아니라 2018년 3월 15일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2018/0073012 (2018년 10월 30일에 미국 특허 번호 10,113,163으로 허여됨); 2017년 5월 4일일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2017/0121693 (2019년 1월 1일에 미국 특허 번호 10,167,457로 허여됨); 2017년 4월 27일에 공개된 PCT 공개 번호 WO 2017/070633; 2015년 6월 18일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2015/0166980; 2017년 12월 12일에 허여된 미국 특허 번호 9,840,699; 2018년 9월 18일에 허여된 국 특허 번호 10,077,453; 2019년 1월 31일에 공개된 PCT 공개 번호 WO 2019/023680; 2018년 9월 27일에 공개된 PCT 공개 번호 WO 2018/0176009, 2019년 5월 23일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/033848, 2019년 8월 23

일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/47996; 2019년 9월 5일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/049793; 2020년 4월 17일에 출원된 국제 특허 출원 번호 PCT/US2020/028568; 2019년 11월 15일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/61685; 2019년 10월 24일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/57956; 2019년 10월 29일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/58678에 기재되어 있으며, 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 A를 G로 전환시킨다. 일부 실시양태에서, 핵염기 편집기는 아데노신 데아미나제를 포함한다. "아데노신 데아미나제"는 퓨린 대사에 관여하는 효소이다. 이는 음식물로부터 아데노신의 분해를 위해 및 조직에서 핵산의 전환을 위해 필요하다. 인간에서 그의 주요 기능은 면역계의 발달 및 유지이다. 아데노신 데아미나제는 DNA의 맥락에서 아데노신의 가수분해성 탈아미노화를 촉매한다 (이노신을 형성하여, G로서 염기 쌍을 형성함). DNA에 대해 작용하는 공지된 천연 아데노신 데아미나제는 없다. 대신에, 공지된 아데노신 데아미나제 효소는 RNA (tRNA 또는 mRNA)에 대해서만 작용한다. DNA 기질을 수용하고 dA를 데옥시이노신으로 탈아미노화시키는 진화된 데옥시아데노신 데아미나제 효소는 예를 들어 2017년 8월 3일에 출원된 PCT 출원 PCT/US2017/045381 (WO 2018/027078로 공개됨), PCT 출원 번호 PCT/US2019/033848 (WO 2019/226953으로 공개됨), 2019년 5월 23일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/033848, 및 2020년 4월 17일에 출원된 PCT 특허 출원 번호 PCT/US2020/028568에 기재되어 있으며; 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0036] 예시적인 아데노신 및 시티딘 핵염기 편집기는 또한 [Rees & Liu, Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells, *Nat. Rev. Genet.* 2018;19(12):770-788]; 뿐만 아니라 2018년 3월 15일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2018/0073012 (2018년 10월 30일에 미국 특허 번호 10,113,163으로 허여됨); 2017년 5월 4일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2017/0121693 (2019년 1월 1일에 미국 특허 번호 10,167,457로 허여됨); 2017년 4월 27일에 공개된 PCT 공개 번호 WO 2017/070633; 2015년 6월 18일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2015/0166980; 2017년 12월 12일에 허여된 미국 특허 번호 9,840,699; 및 2018년 9월 18일에 허여된 미국 특허 번호 10,077,453에 기재되어 있으며, 이들 각각의 내용은 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0037] **시토신 데아미나제**

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, CDA 유전자에 의해 코딩되는 "시토신 데아미나제"는 시티딘 (즉, 리보스 고리에 부착될 때 염기 시토신)에서 우리딘으로 (C에서 U로) 및 데옥시시티딘에서 데옥시우리딘으로 (C에서 U로) 아민 기의 제거를 촉매하는 효소이다. 시토신 데아미나제의 비제한적인 예는 APOBEC1 ("아포지단백질 B mRNA 편집 효소, 촉매적 폴리펩티드 1")이다. 또 다른 예는 AID ("활성화-유도된 시토신 데아미나제")이다. 표준 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 수소 결합 쌍 형성 하에, 시토신 염기는 구아닌 염기에 수소 결합된다. 시티딘이 우리딘으로 전환되는 경우 (또는 데옥시시티딘이 데옥시우리딘으로 전환되는 경우), 우리딘 (또는 우리딘의 우라실 염기)은 염기 아데닌과 수소 결합 쌍을 형성한다. 따라서, 시토신 데아미나제에 의한 "C"에서 우리딘 ("U")으로의 전환은 세포 복구 및/또는 복제 과정 동안에 "G" 대신에 "A"의 삽입을 야기할 것이다. 아데닌 "A"가 티민 "T"와 쌍을 형성하기 때문에, DNA 복제와 협력하여 시토신 데아미나제는 이중-가닥 DNA 분자에서 C·G 쌍 형성에서 T·A 쌍 형성으로의 전환을 야기한다.

[0039] **Cas9**

[0040] 용어 "Cas9" 또는 "Cas9 뉴클레아제"는 Cas9 도메인 또는 그의 단편 (예를 들어, Cas9의 활성 또는 불활성 DNA 절단 도메인 및/또는 Cas9의 gRNA 결합 도메인을 포함하는 단백질)을 포함하는 RNA-가이드된 뉴클레아제를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "Cas9 도메인"은 Cas9의 활성 또는 불활성 절단 도메인 및/또는 Cas9의 gRNA 결합 도메인을 포함하는 단백질 단편이다. "Cas9 단백질"은 전장 Cas9 단백질이다. Cas9 뉴클레아제는 때때로 casn1 뉴클레아제 또는 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat: 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부)-연관된 뉴클레아제로도 지칭된다. CRISPR는 이동성 유전 요소 (바이러스, 수송가능한 요소, 및 접합성 플라스미드)에 대한 보호를 제공하는 적응성 면역계이다. CRISPR 클러스터는 스페이서, 선행의 이동성 요소에 상보성인 서열, 및 표적 침입 핵산을 함유한다. CRISPR 클러스터는 전사되어, CRISPR RNA (crRNA)로 가공된다. 유형 II CRISPR 시스템에서, 프리-crRNA의 정확한 가공에는 트랜스-코딩된 소형 RNA (tracrRNA), 내인성 리보뉴클레아제 3 (rnc), 및 Cas9 도메인이 필요하다. tracrRNA는 프리-crRNA의 리보뉴클레아제 3-보조 가공을 위한 가이드의 역할을 한다. 후속적으로, Cas9/crRNA/tracrRNA는 스페이서에 상보성인 선형 또는 원형 dsDNA 표적을 엔도뉴클레오틱으로 절단한다. crRNA에 상보성이 아닌 표적 가닥은 먼저 엔도뉴클레오틱으로 절단된 다음, 3'-5' 엑소뉴클레오틱으로 트리밍된다. 사실상, DNA-결합 및 절단에는 전형적으로 단백질 및 2가지 RNA 모두가 필요하다. 그러나, 단일 가이드 RNA ("sgRNA", 또는 간단히 "gRNA")가

crRNA 및 tracrRNA 둘 다의 측면을 단일 RNA 종에 혼입시키도록 조작될 수 있다. 예를 들어, [Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. *Science* 337:816-821(2012)]를 참조하며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다. Cas9는 CRISPR 반복 서열에서 짧은 모티프 (PAM 또는 프로토스페이서 인접 모티프)를 인식하여, 자가 대 비-자가를 구별하는데 도움이 된다. Cas9 뉴클레아제 서열 및 구조는 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, ["Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti *et al.*, J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., *Nature* 471:602-607(2011); 및 "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. *Science* 337:816-821(2012)]를 참조하며, 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨). Cas9 오르토로그는 에스. 피오게네스 및 에스. 써모필루스(*S. thermophilus*)를 비롯하여 이로 제한되지 않는 다양한 종에 기재되어 있다. 추가의 적합한 Cas9 뉴클레아제 및 서열은 본 개시내용을 기반으로 하여 관련 기술분야의 기술자에게 명백할 것이며, 이러한 Cas9 뉴클레아제 및 서열에는 [Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) *RNA Biology* 10:5, 726-737] (그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 유기체 및 로커스로부터의 Cas9 서열이 포함된다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 DNA 절단 도메인을 부분적으로 손상시키거나 또는 불활성화시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0041] 뉴클레아제-불활성화된 Cas9 도메인은 "dCas9" 단백질 (뉴클레아제-"데드" Cas9의 경우)로 상호교환적으로 지칭될 수 있다. 불활성 DNA 절단 도메인을 갖는 Cas9 도메인 (또는 그의 단편)을 생성하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, [Jinek *et al.*, *Science*. 337:816-821(2012); Qi *et al.*, "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression" (2013) *Cell*. 28;152(5):1173-83]을 참조하며, 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨). 예를 들어, Cas9의 DNA 절단 도메인은 2가지 서브도메인, HNH 뉴클레아제 서브도메인 및 RuvC1 서브도메인을 포함하는 것으로 공지되어 있다. HNH 서브도메인은 gRNA에 상보성인 가닥을 절단하는 반면에, RuvC1 서브도메인은 비-상보성 가닥을 절단한다. 이들 서브도메인 내의 돌연변이는 Cas9의 뉴클레아제 활성을 침묵시킬 수 있다. 예를 들어, 돌연변이 D10A 및 H840A는 에스. 피오게네스 Cas9의 뉴클레아제 활성을 완전히 불활성화시킨다 (Jinek *et al.*, *Science*. 337:816-821(2012); Qi *et al.*, *Cell*. 28;152(5):1173-83 (2013)). 일부 실시양태에서, Cas9의 단편을 포함하는 단백질이 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 단백질은 하기 2가지 Cas9 도메인 중 하나를 포함한다: (1) Cas9의 gRNA 결합 도메인; 또는 (2) Cas9의 DNA 절단 도메인. 일부 실시양태에서, Cas9 또는 그의 단편을 포함하는 단백질은 "Cas9 변이체"로 지칭된다. Cas9 변이체는 Cas9 또는 그의 단편과 상동성을 공유한다. 예를 들어, Cas9 변이체는 야생형 Cas9 (예를 들어, 서열식별번호: 13의 SpCas9)와 적어도 약 70% 동일, 적어도 약 80% 동일, 적어도 약 90% 동일, 적어도 약 95% 동일, 적어도 약 96% 동일, 적어도 약 97% 동일, 적어도 약 98% 동일, 적어도 약 99% 동일, 적어도 약 99.5% 동일, 적어도 약 99.8% 동일, 또는 적어도 약 99.9% 동일하다. 일부 실시양태에서, Cas9 변이체는 야생형 Cas9 (예를 들어, 서열식별번호: 13의 SpCas9)와 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 또는 그 초과의 아미노산 변화를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas9 변이체는 서열식별번호: 13 Cas9의 단편 (예를 들어, gRNA 결합 도메인 또는 DNA-절단 도메인)을 포함하며, 따라서 단편은 야생형 Cas9 (예를 들어, 서열식별번호: 13의 SpCas9)의 상응하는 단편과 적어도 약 70% 동일, 적어도 약 80% 동일, 적어도 약 90% 동일, 적어도 약 95% 동일, 적어도 약 96% 동일, 적어도 약 97% 동일, 적어도 약 98% 동일, 적어도 약 99% 동일, 적어도 약 99.5% 동일, 또는 적어도 약 99.9% 동일하다. 일부 실시양태에서, 단편은 상응하는 야생형 Cas9 (예를 들어, 서열식별번호: 13의 SpCas9)의 아미노산 길이의 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 동일한, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%이다.

[0042] CRISPR

[0043] CRISPR는 원핵생물에 침입한 바이러스에 의한 이전 감염의 조각을 나타내는 박테리아 및 고세균의 DNA 서열 (즉, CRISPR 클러스터)의 계열이다. DNA 조각은 유사한 바이러스에 의한 후속적인 공격으로부터 DNA를 검출 및

파괴하고, 원핵생물 면역 방어 시스템인 CRISPR-연관된 단백질 (Cas9 및 그의 상동체를 포함함) 및 CRISPR-연관된 RNA의 어레이와 함께 효과적으로 구성하기 위해 원핵생물 세포에 의해 사용된다. 사실상, CRISPR 클러스터는 전사되어, CRISPR RNA (crRNA)로 가공된다. 특정 유형의 CRISPR 시스템 (예를 들어, 유형 II CRISPR 시스템)에서, 프리-crRNA의 정확한 가공에는 트랜스-코딩된 소형 RNA (tracrRNA), 내인성 리보뉴클레아제 3 (rnc), 및 Cas9 단백질이 필요하다. tracrRNA는 프리-crRNA의 리보뉴클레아제 3-보조 가공을 위한 가이드의 역할을 한다. 후속적으로, Cas9/crRNA/tracrRNA는 RNA에 상보성인 선형 또는 원형 dsDNA 표적을 엔도뉴클레오틱으로 절단한다. 구체적으로, crRNA에 상보성이 아닌 표적 가닥은 먼저 엔도뉴클레오틱으로 절단된 다음, 3'-5' 엑소뉴클레오틱으로 트리밍된다. 사실상, DNA-결합 및 절단에는 전형적으로 단백질 및 2가지 RNA 모두가 필요하다. 그러나, 단일 가이드 RNA ("sgRNA", 또는 간단히 "gRNA")가 crRNA 및 tracrRNA 둘 다의 측면을 단일 RNA 종 (가이드 RNA)에 혼입시키도록 조작될 수 있다. 예를 들어, [Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. *Science* 337:816-821(2012)]를 참조하며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다. Cas9는 CRISPR 반복 서열에서 짧은 모티프 (PAM 또는 프로토스페이서 인접 모티프)를 인식하여, 자가 대 비-자가를 구별하는데 도움이 된다. CRISPR 생물학, 뿐만 아니라 Cas9 뉴클레아제 서열 및 구조는 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, ["Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes." Ferretti *et al.*, J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); 및 "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. *Science* 337:816-821(2012)]를 참조하며, 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨). Cas9 오르토로그는 에스. 피오게네스 및 에스. 써모필루스를 비롯하여 이로 제한되지 않는 다양한 종에 기재되어 있다. 추가의 적합한 Cas9 뉴클레아제 및 서열은 본 개시내용을 기반으로 하여 관련 기술분야의 기술자에게 명백할 것이며, 이러한 Cas9 뉴클레아제 및 서열에는 [Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) *RNA Biology* 10:5, 726-737] (그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 유기체 및 로커스로부터의 Cas9 서열이 포함된다.

[0044] 특정 유형의 CRISPR 시스템 (예를 들어, 유형 II CRISPR 시스템)에서, 프리-crRNA의 정확한 가공에는 트랜스-코딩된 소형 RNA (tracrRNA), 내인성 리보뉴클레아제 3 (rnc), 및 Cas9 단백질이 필요하다. tracrRNA는 프리-crRNA의 리보뉴클레아제 3-보조 가공을 위한 가이드의 역할을 한다. 후속적으로, Cas9/crRNA/tracrRNA는 RNA에 상보성인 선형 또는 원형 핵산 표적을 엔도뉴클레오틱으로 절단한다. 구체적으로, crRNA에 상보성이 아닌 표적 가닥은 먼저 엔도뉴클레오틱으로 절단된 다음, 3'-5' 엑소뉴클레오틱으로 트리밍된다. 사실상, DNA-결합 및 절단에는 전형적으로 단백질 및 2가지 RNA 모두가 필요하다. 그러나, 단일 가이드 RNA ("sgRNA", 또는 간단히 "gRNA")가 crRNA 및 tracrRNA 둘 다의 측면을 단일 RNA 종 (가이드 RNA)에 혼입시키도록 조작될 수 있다.

[0045] 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 CRISPR-연관된 ("Cas") 유전자의 발현 또는 활성 지시에 관연하는 전사체 및 다른 요소를 집합적으로 지칭하며, Cas 유전자를 코딩하는 서열, tracr (트랜스-활성화 CRISPR) 서열 (예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr 메이트 서열 (내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "직접 반복부" 및 tracrRNA-가공된 부분적인 직접 반복부를 포함함), 가이드 서열 (내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서"로도 지칭됨), 또는 CRISPR 로커스로부터의 다른 서열 및 전사체를 포함한다. 시스템의 tracrRNA는 가이드 RNA에 존재하는 tracr 메이트 서열에 (완전히 또는 부분적으로) 상보성이다.

[0046] **데아미나제**

[0047] 용어 "데아미나제" 또는 "데아미나제 도메인"은 탈아미노화 반응을 촉매하는 단백질 또는 효소를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 데아미나제는 아데닌 또는 아데노신의 가수분해성 탈아미노화를 촉매하는 아데노신 (또는 아데닌) 데아미나제이다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 데옥시리보핵산 (DNA)에서 아데닌 또는 아데노신의 이노신으로의 가수분해성 탈아미노화를 촉매한다. 다른 실시양태에서, 데아미나제는 시티딘 또는 시토신의 가수분해성 탈아미노화를 촉매하는 시티딘 (또는 시토신) 데아미나제이다.

[0048] 본원에 제공된 데아미나제는 임의의 유기체, 예컨대 박테리움으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 유기체로부터의 천연 발생 데아미나제의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 데아미나제 또는 데아미나제 도메인은 천연에서 발생하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 데아미나제

또는 데아미나제 도메인은 천연 발생 데아미나제와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75% 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일하다.

[0049] **융합 단백질**

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질"은 적어도 2개의 상이한 단백질로부터의 단백질 도메인을 포함하는 혼성체 폴리펩티드를 지칭한다. 한 단백질은 융합 단백질의 아미노-말단 (N-말단) 부분 또는 카르복시-말단 (C-말단) 단백질에 위치하여, 각각 "아미노-말단 융합 단백질" 또는 "카르복시-말단 융합 단백질"을 형성할 수 있다. 단백질은 핵산 편집 단백질의 상이한 도메인, 예를 들어 핵산 결합 도메인 (예를 들어, 표적 부위에 대한 단백질의 결합을 안내하는 Cas9의 gRNA 결합 도메인) 및 핵산 절단 도메인 또는 촉매적 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 예에는 Cas9 또는 그의 등가물과 데아미나제의 융합체가 포함된다. 본원에 제공된 임의의 단백질은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 단백질은 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해 생성될 수 있고, 이는 펩티드 링커를 포함하는 융합 단백질에 특히 적합하다. 재조합 단백질 발현 및 정제를 위한 방법은 널리 공지되어 있으며, [Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4^{th} ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))] (그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들이 포함된다.

[0051] **그룹-특이적 항원 (gag)**

[0052] 이론에 의해 제한되지 않고, 전형적인 외피 바이러스 생활환의 맥락에서, Gag는 (i) 외피 (버딩 동안에 세포 막으로부터 형성된 지질 막 및 그 안에 삽입된 하나 이상의 당단백질을 포함함), 및 (ii) 내부 단백질 쉘인 캡시드를 갖는 완전히 형성된 외피 비리온의 버딩을 비롯하여 바이러스 조립의 대부분의 단계를 조직하는 것을 담당하는 주요 구조 단백질이다. 대부분의 이들 조립 단계는 3가지 Gag 서브도메인 - 매트릭스 (MA), 캡시드 (CA), 및 뉴클레오캡시드 (NC; 도 1)와의 상호작용을 통해 발생한다. 이들 3가지 영역은 상이한 레트로바이러스 속 사이에서 낮은 수준의 서열 보존을 가지며, 이는 관찰된 높은 수준의 구조적 보존을 부정하는 것이다. 이들 3가지 도메인 외에도, Gag 단백질은 광범위하게 달라질 수 있다. 예를 들어, HIV-1 Gag는 C-말단 p6 단백질 뿐만 아니라, CA-NC 및 NC-p6 접합을 구분하는 2가지 스페이서 단백질, SP1 및 SP2를 추가로 코딩하지만, HTLV-1은 MA, CA 및 NC 이외에 추가의 서열을 함유하지 않는다 (Oroszlan and Copeland, 1985; Henderson *et al.*, 1992).

[0053] Gag는 "바이러스 구조 단백질"로도 지칭된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "바이러스 구조 단백질"은 바이러스의 캡시드 단백질 또는 단백질 코어의 전체 구조에 기여하는 바이러스 단백질을 지칭한다. 용어 "바이러스 구조 단백질"은 바이러스의 캡시드 단백질 또는 단백질 코어의 구조에 기여하는 이러한 바이러스 단백질의 기능적 단편 또는 유도체를 추가로 포함한다. 바이러스 구조 단백질의 예는 MMLV Gag이다. 바이러스 막 융합 단백질은 바이러스 구조 단백질로 고려되지 않는다. 전형적으로, 상기 바이러스 구조 단백질은 바이러스 코어의 내부에 국한된다.

[0054] **그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질**

[0055] 용어 "그룹-특이적 항원 뉴클레오캡시드 단백질" 또는 "gag 뉴클레오캡시드 단백질"은 레트로바이러스를 비롯한 여러 바이러스의 내부 쉘의 코어 구조 성분을 구성하는 단백질을 지칭한다. 본 개시내용의 BE-VLP에 사용되는 gag 뉴클레오캡시드 단백질은 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질, FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 이러한 단백질을 생성하는 임의의 다른 바이러스로부터의 뉴클레오캡시드 단백질일 수 있다.

[0056] **그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질**

[0057] "그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질" 또는 "gag-pro 폴리단백질"은 그에 연결된 바이러스 프로테아제를 추가로 포함하는 gag 뉴클레오캡시드 단백질을 지칭한다. Gag-pro 폴리단백질은 원형질 막으로부터 비리온의 방출 동안에 또는 직후에 gag 및 gag-pol 폴리단백질 또는 뉴클레오캡시드 단백질의 단백질 분해 절단을 매개한다. 본원에 기재된 BE-VLP에서, gag-pro 폴리단백질의 프로테아제는 BE-VLP를 표적 세포에 전달한 후 염기 편집기를 방출시키기 위해 융합 단백질에서 절단가능한 링커를 절단하는 것을 담당한다. 일부 실시양태에서, gag-pro 폴리단백질은 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질이다.

[0058] **가이드 RNA ("gRNA")**

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "가이드 RNA"는 가장 일반적으로 CRISPR-Cas9의 Cas 단백질과 회합하며, Cas9와

회합하여, 가이드 RNA의 프로토스페이서 서열에 대한 상보성을 포함하는 DNA 분자의 특이적 서열로 Cas9 단백질을 안내하는 특정한 유형의 가이드 핵산이다. 그러나, 이 용어는 천연 발생 또는 비-천연 발생 (예를 들어, 조작된 또는 재조합) 여부와 무관하게 Cas9 등가물, 상동체, 오르토로그 또는 파라로그와 회합하고, 달리 Cas9 등가물이 특이적 표적 뉴클레오티드 서열에 국소화되도록 프로그래밍하는 동등한 가이드 핵산 분자를 또한 포함한다. Cas9 등가물에는 Cpf1 (유형-V CRISPR-Cas 시스템), C2c1 (유형 V CRISPR-Cas 시스템), C2c2 (유형 VI CRISPR-Cas 시스템), 및 C2c3 (유형 V CRISPR-Cas 시스템)을 비롯하여 임의의 유형의 CRISPR 시스템 (예를 들어, 유형 II, V, VI)으로부터의 다른 napDNAbp가 포함될 수 있다. 추가의 Cas 등가물은 [Makarova *et al.*, "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," *Science* 2016; 353(6299)]에 기재되어 있으며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 가이드 RNA의 예시적인 서열 및 구조는 본원에 제공된다.

[0060] 가이드 RNA는 가장 일반적으로 CRISPR-Cas9의 Cas 단백질과 회합하며, Cas9와 회합하여, 가이드 RNA의 프로토스페이서 서열에 대한 상보성을 포함하는 DNA 분자의 특이적 서열로 Cas9 단백질을 안내하는 특정한 유형의 가이드 핵산이다. 기능적으로, 가이드 RNA는 Cas9와 회합하여, 가이드 RNA의 프로토스페이서 서열에 상보성인 서열을 포함하는 DNA 분자의 특이적 서열로 Cas9 단백질을 안내한다 (또는 프로그래밍한다). gRNA는 CRISPR/Cas 시스템의 성분이다. 전형적으로, 가이드 RNA는 CRISPR-표적화 RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)의 융합체를 포함하며, Cas9 뉴클레아제에 대한 표적화 특이성 및 스캐폴딩/결합 능력 둘 다를 제공한다. "crRNA"는 표적 특이성을 부여하고 Cas9에 결합하기 위해 tracrRNA를 필요로 하는 박테리아 RNA이다. "tracrRNA"는 crRNA를 Cas9 뉴클레아제에 연결시키는 박테리아 RNA이며, 전형적으로 임의의 crRNA와 결합할 수 있다. Cas DNA-결합 단백질의 서열 특이성은 표적 DNA 서열에 대해 뉴클레오티드 염기-쌍 형성 상보성을 갖는 gRNA에 의해 결정된다. 천연 gRNA는 표적화될 DNA 서열을 지정하는 20개 뉴클레오티드 (nt) 특이성 결정 서열 (SDS) 또는 스페이서를 포함하고, 바로 뒤에 gRNA를 Cas9와 회합시키는 80 nt 스캐폴드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 SDS는 15 내지 100개 뉴클레오티드 또는 그 초과의 길이를 갖는다. 예를 들어, SDS는 15 내지 90, 15 내지 85, 15 내지 80, 15 내지 75, 15 내지 70, 15 내지 65, 15 내지 60, 15 내지 55, 15 내지 50, 15 내지 45, 15 내지 40, 15 내지 35, 15 내지 30 또는 15 내지 20개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, SDS는 20개 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, SDS는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 표적 DNA 서열의 적어도 일부는 gRNA의 SDS에 상보성이다. Cas9가 DNA 표적 서열에 성공적으로 결합하기 위해, 표적 서열의 영역은 gRNA 서열의 SDS에 상보성이고, 바로 뒤에 정확한 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열 (예를 들어, Cas9의 경우 NGG, 및 Cpf1의 경우 TTN, TTTN 또는 YTN)이 있다. 일부 실시양태에서, SDS는 그의 표적 서열에 100% 상보성이다. 일부 실시양태에서, SDS 서열은 그의 표적 서열에 100% 미만의 상보성이며, 따라서 그의 표적 서열에 부분적으로 상보성인 것으로 고려된다. 예를 들어, 표적화 서열은 그의 표적 서열에 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% 또는 90% 상보성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 주형 DNA 또는 표적 DNA의 SDS는 1, 2, 3, 4 또는 5개 뉴클레오티드만큼 gRNA의 상보성 영역과 상이할 수 있다.

[0061] 일부 실시양태에서, 가이드 RNA는 약 15-120개 뉴클레오티드 길이이고, 표적 서열에 상보성인 적어도 10개의 인접한 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 또는 120개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA는 표적 서열에 상보성인 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 초과의 인접한 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 서열 상보성은 아데닌과 티민 (DNA) 또는 우라실 (RNA) 사이의 및 구아닌과 시토신 사이의 뚜렷한 상호작용을 지칭한다.

[0062] **링커**

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 2개의 다른 분자 또는 모이어티를 연결하는 분자를 지칭한다. 링커는 2개의 융합 단백질을 연결하는 링커인 경우 아미노산 서열일 수 있다. 예를 들어, Cas9는 아미노산 링커 서열에 의해 데아미나제 (예를 들어, 아데노신 데아미나제 또는 시토신 데아미나제)에 융합될 수 있다. 링커는 또한 (예를 들어, gRNA에서) 2개의 뉴클레오티드 서열을 함께 연결하는 경우 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 다른 실시양태에서, 링커는 유기 분자, 기, 중합체, 또는 화학적 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 링커는 5-200개 아미노산 길이, 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29, 30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150 또는 150-200개 아미노산 길이이다. 더 길거나 또는 더 짧은 링커 또한 고려된다.

[0064] "절단가능한 링커"는 임의의 수단에 의해 분할 또는 절단될 수 있는 링커를 지칭한다. 링커는 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 BE-VLP의 NES와 napDNAbp 사이의 링커는 절단가능한 링커를 포함한다. 절단가능한 링커는 자가-절단 펩티드 (예를 들어 2A 펩티드, 예컨대 EGRGSLLTCGDVEENPGP (서열식별번호: 9), ATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열식별번호: 10), QCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열식별번호: 11), 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열식별번호: 12))를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 프로테아제와 접촉한 후에 절단되는 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용은 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열의 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단가능한 링커의 사용을 고려한다. 특정 실시양태에서, 절단가능한 링커는 MMLV 프로테아제 절단 부위 또는 FMLV 프로테아제 절단 부위를 포함한다.

[0065] **napDNAbp**

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질" 또는 "napDNAbp" (Cas9가 한 예임)는 DNA 분자에서 특이적 서열을 표적화하고 그에 결합하기 위해 RNA:DNA 혼성화를 이용하는 단백질을 지칭한다. 각각의 napDNAbp는 가이드 핵산 또는 그의 일부 (예를 들어, 가이드 RNA의 프로토스페이서)에 상보성인 DNA 가닥 (즉, 표적 가닥)을 포함하는 DNA 서열에 napDNAbp를 국소화시키는 적어도 하나의 가이드 핵산 (예를 들어, 가이드 RNA)과 회합된다. 달리 말하면, 가이드 핵산은 napDNAbp (예를 들어, Cas9 또는 등가물)가 상보성 서열에 국소화하고 결합하도록 "프로그래밍"한다.

[0067] 이론에 구애되지 않고, napDNAbp - 가이드 RNA 복합체의 결합 메카니즘은 일반적으로 R-루프를 형성하는 단계를 포함하며, 이로써 napDNAbp가 이중-가닥 DNA 표적의 풀림을 유도하여 napDNAbp에 의해 결합된 영역에서 가닥을 분리한다. 이어서, 가이드 RNA 프로토스페이서는 "표적 가닥"에 혼성화한다. 이는 표적 가닥에 상보성인 "비-표적 가닥"을 대체하여, R-루프의 단일 가닥 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 하나 이상의 뉴클레아제 활성을 가지며, DNA를 절단하여, 다양한 유형의 병변을 남긴다. 예를 들어, napDNAbp는 제1 위치에서 비-표적 가닥을 절단하고/거나 제2 위치에서 표적 가닥을 절단하는 뉴클레아제 활성을 포함할 수 있다. 뉴클레아제 활성에 따라, 표적 DNA가 절단되어, 두 가닥 모두 절단되는 "이중-가닥 파손"을 형성할 수 있다. 다른 실시양태에서, 표적 DNA는 단일 부위에서만 절단될 수 있으며, 즉, DNA는 한 가닥 상에 "닉"을 형성한다. 상이한 뉴클레아제 활성을 갖는 예시적인 napDNAbp에는 "Cas9 닉카제" ("nCas9") 및 뉴클레아제 활성을 갖지 않는 탈활성화된 Cas9 ("데드 Cas9" 또는 "dCas9")가 포함된다. 이들 및 다른 napDNAbp에 대한 예시적인 서열이 본원에 제공된다.

[0068] **닉카제**

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, "닉카제"는 이중-가닥 표적 DNA 서열의 두 상보성 가닥 중 하나만을 절단하여, 이로써 해당 가닥 상에 닉을 생성할 수 있는 napDNAbp (예를 들어, Cas 단백질)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 이중 가닥 표적 DNA 서열의 비-표적 가닥을 절단한다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 정규 napDNAbp (예를 들어, Cas 단백질)의 촉매적 도메인에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 하나 이상의 돌연변이는 촉매적 도메인의 뉴클레아제 활성을 감소시키거나 또는 폐지한다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 야생형 Cas9 서열에 비해 또는 다른 Cas9 변이체 또는 Cas9 등가물에서 동등한 아미노산 위치에 비해 RuvC-유사 도메인에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas9이다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 야생형 Cas9 서열에 비해 또는 다른 Cas9 변이체 또는 Cas9 등가물에서 동등한 아미노산 위치에 비해 HNH-유사 도메인에서 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas9이다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 정규 Cas9 서열에 비해 또는 다른 Cas9 변이체 또는 Cas9 등가물에서 동등한 아미노산 위치에 비해 Cas9의 RuvC I 촉매적 도메인에서 아스파르테이트에서 알라닌으로의 치환 (D10A)을 포함하는 Cas9이다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 정규 Cas9 서열에 비해 또는 다른 Cas9 변이체 또는 Cas9 등가물에서 동등한 아미노산 위치에 비해 H840A, N854A, 및/또는 N863A 돌연변이를 포함하는 Cas9이다. 일부 실시양태에서, 용어 "Cas9 닉카제"는 두 뉴클레아제 도메인 중 하나가 불활성화된 Cas9를 지칭한다. 이 효소는 표적 DNA의 한 가닥만을 절단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 닉카제는 Cas9 닉카제가 아닌 Cas 단백질이다.

[0070] **핵 유출 서열 (NES)**

[0071] 용어 "핵 유출 서열" 또는 "NES"는 예를 들어 핵 수송에 의해 핵공 복합체를 통해 세포 핵으로부터 세포질로 단백질 수송을 촉진시키는 아미노산 서열을 지칭한다. 핵 유출 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 숙련된 기술자에게 자명할 것이다. 예를 들어, NES 서열은 [Xu, D. *et al.* Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Mol Biol. Cell.* 2012, 23(18) 3677-3693]에 기재되어 있으며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0072] **핵 국소화 서열 (NLS)**

[0073] 용어 "핵 국소화 서열" 또는 "NLS"는 예를 들어 핵 수송에 의해 세포 핵으로 단백질 유입을 촉진시키는 아미노산 서열이다. 핵 국소화 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 숙련된 기술자에게 자명할 것이다. 예를 들어, NLS 서열은 2000년 11월 23일에 출원된 플랭크(Plank) 등의 국제 PCT 출원 PCT/EP2000/011690 (2001년 5월 31일에 WO/2001/038547로 공개됨)에 기재되어 있으며, 예시적인 핵 국소화 서열의 개시내용에 대한 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, NLS는 아미노산 서열 PKKKRKV (서열식별번호: 204)를 포함한다.

[0074] **핵산 분자**

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 중합체는 천연 뉴클레오시드 (즉, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신, 및 데옥시시티딘), 뉴클레오시드 유사체 (예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸아데노신, 5-메틸시티딘, C5 브로모우리딘, C5 플루오로우리딘, C5 아이오도우리딘, C5 프로피닐 우리딘, C5 프로피닐 시티딘, C5 메틸시티딘, 7 데아자아데노신, 7 데아자구아노신, 8 옥소아데노신, 8 옥소구아노신, O(6) 메틸구아닌, 4-아세틸시티딘, 5-(카르복시히드록시메틸)우리딘, 디히드로우리딘, 메틸수도우리딘, 1-메틸 아데노신, 1-메틸 구아노신, N6-메틸 아데노신, 및 2-티오시티딘), 화학적으로 변형된 염기, 생물학적으로 변형된 염기 (예를 들어, 메틸화된 염기), 삽입된 염기, 변형된 당 (예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 2'-O-메틸시티딘, 아라비노스, 및 헥소스), 또는 변형된 포스페이트 기 (예를 들어, 포스포로티오에이트 및 5' N 포스포르아미다이트 연결)를 포함할 수 있다.

[0076] **프로테아제 절단 부위**

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로테아제 절단 부위"는 프로테아제, 즉, 단백질 분해를 촉매하고 단백질을 더 작은 폴리펩티드 또는 단일 아미노산으로 분해하는 효소에 의해 인식되어 절단되는 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 본원에 기재된 바와 같이 융합 단백질의 절단가능한 링커에 포함된다. 특정 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 gag-pro 폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 MMLV 프로테아제 절단 부위 또는 FMLV 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 서열식별번호: 1-8 또는 499-510 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 1-8 또는 499-510 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0078] **단백질, 펩티드 및 폴리펩티드**

[0079] 용어 "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 펩티드 (아미드) 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능을 갖는 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드는 적어도 3개의 아미노산 길이일 것이다. 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드는 개별 단백질 또는 단백질의 집합을 지칭할 수 있다. 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드에서 아미노산 중 하나 이상은 예를 들어 화학적 개체, 예컨대 탄수화물 기, 히드록실 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 접합, 관능화 또는 다른 변형을 위한 링커 등을 첨가함으로써 변형될 수 있다. 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드는 또한 단일 분자일 수 있거나 또는 다중-분자 복합체일 수 있다. 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드는 단지 천연 발생 단백질 또는 펩티드의 단편일 수 있다. 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드는 천연 발생, 재조합 또는 합성, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 본원에 제공된 임의의 단백질은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 단백질은 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해 생성될 수 있고, 이는 펩티드 링커를 포함하는 융합 단백질에 특히 적합하다. 재조합 단백질 발현 및 정제를 위한 방법은 널리 공지되어 있고, [Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, N.Y. (2012))] (그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들이 포함된다.

[0080] **대상체**

[0081] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 개별 유기체, 예를 들어 개별 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 영장류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 설치류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 양, 염소, 소, 고양이 또는 개이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 척추동물, 양서류, 파충류, 어류, 곤충, 파리, 또는 선충류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연구 동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 유전자 조작되며, 예를 들어 유전자 조작된 비-인간 대상체이다. 대상체는 임의의 성별 및 임의의 발달 단계일 수 있다.

[0082] **치료**

[0083] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 바와 같이 질환 또는 장애, 또는 그의 하나 이상의 증상의 진행을 역전시키거나, 완화시키거나, 발생을 지연시키거나 또는 억제하는데 도움이 되는 임상적 개입을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 바와 같이 질환 또는 장애, 또는 그의 하나 이상의 증상의 진행을 역전시키거나, 완화시키거나, 발생을 지연시키거나 또는 억제하는데 도움이 되는 임상적 개입을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 하나 이상의 증상이 발생한 후에 및/또는 질환이 진단된 후에 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료는 예를 들어 증상의 발생을 예방하거나 또는 지연시키기 위해 또는 질환의 발생 또는 진행을 억제하기 위해 증상의 부재 시에 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 (예를 들어, 증상의 병력에 비추어 및/또는 유전적 또는 다른 민감성 인자에 비추어) 증상의 발생 전에 민감한 개체에게 투여될 수 있다. 치료는 또한 증상이 해결된 후에 예를 들어 그의 재발을 예방하거나 또는 지연시키기 위해계속될 수 있다.

[0084] **변이체**

[0085] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 천연에서 발생하는 것과 상이한 패턴을 갖는 특성을 나타내는 것을 의미하는 것으로 고려되어야 하며, 예를 들어 변이체 Cas9는 야생형 Cas9 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 잔기에서 하나 이상의 변화를 포함하는 Cas9이다. 용어 "변이체"는 참조 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖고, 참조 서열과 동일한 또는 실질적으로 동일한 기능적 활성 또는 활성들을 갖는 상동성 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한 참조 서열과 동일한 또는 실질적으로 동일한 기능적 활성 또는 활성들을 나타내는 참조 서열의 돌연변이체, 말단절단 또는 도메인을 포함한다.

[0086] **벡터**

[0087] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 관심 유전자를 코딩하도록 변형될 수 있고, 숙주 세포에 유입되어, 숙주 세포 내에서 돌연변이 및 복제된 다음, 복제된 형태의 벡터를 또 다른 숙주 세포에 전달할 수 있는 핵산을 지칭한다. 예시적인 적합한 벡터에는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 박테리오파지 및 사상성 파지, 및 접합성 플라스미드가 포함된다. 추가의 적합한 벡터는 본 개시내용을 기반으로 하여 관련 기술분야의 기술자에게 자명할 것이다.

[0088] **바이러스 외피 당단백질**

[0089] 용어 "바이러스 외피 당단백질"은 바이러스 외피, 즉, 숙주 세포 사이를 이동할 때 바이러스 유전 물질을 보호하는 여러 유형의 바이러스의 최외층의 일부를 형성하는 올리고당류-함유 단백질을 지칭한다. 바이러스 외피가 막과 융합하여, 바이러스 입자의 내용물 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 BE-VLP를 포함할 수 있음)이 숙주 세포에 유입되도록, 당단백질은 표적 세포 막 상의 수용체를 인식하고 그에 결합하는 것을 보조할 수 있다. 이 성질은 "친화성"으로도 지칭될 수 있다. 본 개시내용의 BE-VLP (또는 일명 eVLP)에서 사용되는 바이러스 외피 당단백질은 외피 바이러스로부터의 임의의 당단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질이다. 특정 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, HIV-1 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질이다.

[0090] **바이러스-유사 입자 (VLP)**

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 바이러스-유사 입자는 하기를 포함하는 초분자 조립체로 구성된다: (a) 하기를 포함

하는 외피: (i) 지질 막 (예를 들어, 단일층 또는 이중층 막) 및 (ii) 바이러스 외피 당단백질, 및 (b) 하기를 포함하는 다중-단백질 코어 영역: (ii) Gag 단백질, (ii) Gag 단백질 및 Pro-Pol을 포함하는 제1 융합 단백질, 및 (iii) 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 카고 단백질에 융합된 Gag 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질. 다양한 실시양태에서, 카고 단백질은 napDNAbp (예를 들어, Cas9)이다. 다른 실시양태에서, 카고 단백질은 염기 편집기이다. 다양한 다른 실시양태에서, VLP의 다중-단백질 코어 영역은 하나 이상의 가이드 RNA 분자를 추가로 포함하며, 이는 napDNAbp 또는 염기 편집기와 복합체화되어 리보핵단백질 (RNP)을 형성한다. 다양한 실시양태에서, VLP는 VLP의 다양한 단백질 및 핵산 (sgRNA) 성분을 코딩하는 플라스미드 DNA로 일시적으로 형질전환된 생산자 세포에서 제조된다. 성분들은 세포 막에서 자가 조립되고, 세포로부터 완전히 성숙한 VLP를 방출시키기 위해 레트로바이러스 버딩의 천연 발생 메카니즘에 따라 버딩된다. 일단 형성되면, Pol-Pro는 Gag-카고 링커 (예를 들어, Gag를 BE RNP 또는 napDNAbp RNP에 연결시키는 링커)를 연결하는 프로테아제-민감성 링커를 절단하여, 경우에 따라 VLP 내에서 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNA를 방출시킨다. VLP가 수용자 세포에 투여되고, 상기 세포에 의해 흡수되면, 유리 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNA를 비롯한 VLP의 내용물이 방출된다. 일단 세포에 유입되면, RNP는 세포의 뉴클레아제로 전좌될 수 있으며 (특히, NLS가 RNP에 포함되는 경우), 여기서 가이드 RNA에 의해 지정된 표적 부위에서 DNA 편집이 발생할 수 있다. 다양한 실시양태는 하나 이상의 개선을 포함한다.

[0092] 한 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 v.2 VLP (또는 "2세대" VLP)에 대해 본원에서 입증된 바와 같이 VLP 성숙 후에 절단 효율을 개선시키도록 최적화된다.

[0093] 또 다른 실시양태에서, Gag-카고 융합 (예를 들어, Gag::BE)은 융합 폴리펩티드 단백질의 길이를 따라 하나 이상의 위치에서 절단가능한 링커에 의해 연결될 수 있는 하나 이상의 핵 유출 신호를 추가로 포함하며, 이로써 생산자 세포에서 VLP 조립 동안에 Gag-카고 융합이 (경쟁하는 NLS 신호의 존재로 인해) 생산자 세포의 핵에서 축적되지 않고, 대신에 세포질에서 이용가능하게 되어, 세포 막에서 VLP 조립 과정이 진행된다. 생산자 세포로부터 방출된 후 성숙한 VLP 내부에 유입되면, NES는 Pro-Pol에 의해 절단되어, 이로써 NES로부터 카고 (예를 들어, napDNAbp 또는 BE)를 분리할 수 있다. 따라서, 수용자 세포에 전달 시, 카고 (예를 들어, 전형적으로 하나 이상의 NLS 요소에 의해 플랭킹된 napDNAbp 또는 BE)는 NES 요소를 포함하지 않을 것이며, 그렇지 않으면 카고가 뉴클레아제로 수송되지 못하게 하고, 유전자 편집 활성을 방해할 수 있다. 이는 본원에 기재된 v.3 VLP (또는 "3세대" VLP)로 예시된다.

[0094] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 v.4 VLP (또는 "4세대" VLP)에 의해 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은 VLP로 패키징되는데 이용되는 Gag-카고의 양과 VLP 성숙을 위해 필요한 레트로바이러스 프로테아제 (Gag-Pro-Pol 융합에서 "Pro")의 양 사이에 균형을 이루는 Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 화학량론 비를 발견하였다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 비는 생산자 세포에 일시적으로 전달되는 각각의 성분을 코딩하는 플라스미드의 적절한 비에 의해 달성된다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합의 화학량론을 조절하기 위해, VLP 생성을 위해 형질감염되는 Gag-카고를 코딩하는 플라스미드 (예를 들어, Gag-3xNES-ABE8e) 대 야생형 MMLV gag-pro-pol 플라스미드의 비를 변화시켰다. gag-카고 플라스미드의 양을 v3.4 BE-eVLP를 생성하기 위해 사용되는 원래의 비율보다 높게 증가시키면 (38% Gag-카고 플라스미드 및 62% gag-pro-pol 플라스미드) 편집 효율이 개선되지 않는다는 것이 발견되었다 (**도 2g**). gag-카고 플라스미드의 비율을 38%에서 25%로 감소시키면 편집 효율이 적당히 개선되었다 (**도 2g**). 그러나, gag-카고 플라스미드의 비율을 25% 아래로 추가로 감소시키면 편집 효율이 감소되었다 (**도 2g**). 이들 결과는 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 gag-카고의 양과 VLP 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 모델과 일치한다. 한 실시양태에서, 최적화의 이러한 최종 라운드 결과를 통해 4세대 (v4) BE-eVLP 제형이 밝혀졌고 (**도 2g**), 이는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론 (25% gag-BE)과 v3.4 BE-eVLP 아키텍처를 조합한다.

[0095] 일부 실시양태에서, VLP는 특정한 세포 유형으로의 전달을 위해 VLP를 표적화하기 위한 추가의 작용제를 포함한다. 예를 들어, 이러한 추가의 표적화제는 VLP의 외부 지질 막 캡슐화 층에 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 표적화제는 단백질이다. 특정 실시양태에서, 추가의 표적화제는 항체이다.

[0096] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 바이러스-유래된 입자는 하나 이상의 바이러스-유래된 단백질(들)에 의해 형성된 바이러스-유사 입자를 포함하며, 바이러스-유래된 입자에는 바이러스 게놈이 실질적으로 결여되어 있어서, 수용자 세포에 전달될 때 VLP는 복제 능력이 없다.

[0097] **야생형**

[0098] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "야생형"은 숙련자에 의해 이해되는 관련 기술분야의 용어이며, 돌연변이체 또는 변이체 형태와는 구별되는 바와 같이 천연에서 발생하는 유기체, 균주, 유전자 또는 특징의 전형적인 형태를 의미한다.

[0099] **상세한 설명**

[0100] 본 개시내용은 시험관내에서 및/또는 생체내에서 리보핵단백질 카고, 예컨대 napDNAbp-가이드 RNA 카고 또는 염기 편집기-가이드 RNA 카고를 패키징 및 전달하기 위한 조작된 VLP (eVLP) 플랫폼의 개발 및 적용을 기반으로 한다. 염기 편집기-가이드 RNA 리보핵단백질 카고를 전달하는 실시양태에서, eVLP는 염기 편집기 바이러스-유사 단백질 (BE-VLP)로 지칭될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 최적화된 BE-VLP는 다양한 세포 유형에서 최소 표적-이탈 편집으로 고도로 효율적인 염기 편집을 가능하게 한다. 특히, 본원에 기재된 BE-VLP는 핵-유출 서열 (NES) 및 핵 국소화 서열 (NLS) 둘 다 동일한 융합 단백질에 포함되어, 생성 동안 및 전달 동안에 세포의 상이한 부분으로 융합 단백질의 이동을 촉진시킬 수 있다는 놀라운 발견을 기반으로 한다. 본원에 기재된 BE-VLP는 바이러스 생산자 세포에서 생성되고, BE-VLP 내부의 융합 단백질에서 하나 이상의 NES 서열의 존재로 인해 핵으로부터 유출된다. 표적 세포에 전달된 후, BE가 VLP로부터 방출될 때 NES는 융합 단백질로부터 절단되어, BE (하나 이상의 NLS 서열을 포함함)가 표적 세포의 핵에 유입되고, 게놈을 편집할 수 있게 한다. 본 개시내용은 또한 BE의 고도로 효율적인 절단 및 전달을 촉진시키기 위해 염기 편집기의 나머지 부분으로부터 NES 및 VLP 단백질을 분리하는 프로테아제 절단 부위의 최적화를 기재한다. 최종적으로, 본 개시내용은 또한 BE-VLP 생성의 높은 효율을 보장하는 BE-VLP의 다양한 성분의 비의 최적화를 기재한다.

[0101] 따라서, 본 개시내용은 염기 편집기 융합 단백질 (BE-VLP)을 전달하기 위한 바이러스-유사 입자 및 이러한 BE-VLP를 포함하는 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 BE-VLP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이는 상기 VLP를 생성하는데 유용할 수 있다. 본원에 기재된 BE-VLP를 표적 세포에 도입시킴으로써 표적 세포의 게놈을 편집하는 방법 또한 본원에 제공된다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 BE-VLP의 성분을 구성하는 융합 단백질 뿐만 아니라, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 및 키트를 제공한다.

[0102] <u>eVLP</u>

[0103] 다양한 실시양태에서, eVLP (예를 들어, BE-VLP)는 하기를 포함하는 초분자 조립체를 포함한다: (a) 하기를 포함하는 포함하는 외피: (i) 지질 막 (예를 들어, 단일층 또는 이중층 막) 및 (ii) 바이러스 외피 당단백질, 및 (b) 외피로 둘러싸이고 하기를 포함하는 다중-단백질 코어 영역: (i) Gag 단백질, (ii) Gag-Pro-Pol 단백질, 및 (iii) 절단가능한 링커 (예를 들어, 프로테아제-절단가능한 링커)를 통해 카고 단백질 (예를 들어, napDNAbp 또는 BE)에 융합된 Gag 단백질을 포함하는 Gag-카고 융합 단백질. 다양한 실시양태에서, 카고 단백질은 napDNAbp (예를 들어, Cas9)이다. 다른 실시양태에서, 카고 단백질은 염기 편집기이다. 다양한 다른 실시양태에서, VLP의 다중-단백질 코어 영역은 하나 이상의 가이드 RNA 분자를 추가로 포함하며, 이는 napDNAbp 또는 염기 편집기와 복합체화되어 리보핵단백질 (RNP)을 형성한다. 다양한 실시양태에서, VLP는 VLP의 다양한 단백질 및 핵산 (sgRNA) 성분을 코딩하는 플라스미드 DNA로 일시적으로 형질전환된 생산자 세포에서 제조된다. 이론에 구애되지 않고, 성분들은 세포 막에서 자가 조립되고, 세포로부터 완전히 성숙한 VLP를 방출시키기 위해 천연 발생 버딩 메카니즘 (예를 들어, 레트로바이러스 버딩 또는 다른 외피 바이러스의 버딩 메카니즘)에 따라 버딩된다. 일단 형성되면, Gag-Pol-Pro는 Gag-카고의 프로테아제-민감성 링커 (즉, [Gag]-[절단가능한 링커]-[카고], 여기서 카고는 BE-RNP 또는 napDNAbp RNP일 수 있음)를 절단하여, 이로써 경우에 따라 VLP 내에서 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNA를 방출시킨다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 napDNAbp 또는 염기 편집기가 gag 단백질로부터 절단되고 VLP 내에서 방출된 VLP를 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 지질 막 및 바이러스 외피 당단백질에 의해 캡슐화된, 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 핵 유출 서열 (NES)을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 VLP를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 절단된 및 절단되지 않은 생성물의 혼합물을 포함하는 VLP를 제공한다 (즉, gag 단백질로부터 절단된 및 gag 단백질로부터 아직 절단되지 않은 napDNAbp의 혼합물). 일부 실시양태에서, napDNAbp는 (예를 들어, 염기 편집기를 형성하기 위해) 하나 이상의 추가의 도메인, 예컨대 하나 이상의 NLS 및/또는 데아미나제에 융합된다.

[0104] VLP가 수용자 세포에게 투여되고, 상기 수용자 세포에 의해 흡수되면, VLP의 내용물이 방출되며, 예를 들어 BE RNP 및/또는 napDNAbp RNP가 방출된다. 일단 세포에 유입되면, RNP는 세포의 뉴클레아제로 전좌될 수 있으며 (특히, NLS가 RNP에 포함되는 경우), 여기서 가이드 RNA에 의해 지정된 표적 부위에서 DNA 편집이 발생할 수 있다. 다양한 실시양태는 하나 이상의 개선을 제공한다.

[0105] 한 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 v.2 VLP (또는 "2세대" VLP)에 대해 본원에서 입증된 바와 같이 VLP 성숙 후 절단 효율을 개선시키도록 최적화된다.

[0106] 또 다른 실시양태에서, Gag-카고 융합 (예를 들어, Gag-BE)은 융합 폴리펩티드 단백질의 길이를 따라 하나 이상의 위치에서 절단가능한 링커에 의해 연결될 수 있는 하나 이상의 핵 유출 신호를 추가로 포함하며, 이로써 생산자 세포에서 VLP 조립 동안에 Gag-카고 융합이 (경쟁하는 NLS 신호의 존재로 인해) 생산자 세포의 핵에서 축적되지 않고, 대신에 세포질에서 이용가능하게 되어, 세포 막에서 VLP 조립 과정이 진행된다. 생산자 세포로부터 방출된 후 성숙한 VLP 내부에 유입되면, NES는 Gag-Pro-Pol에 의해 절단되어, 이로써 NES로부터 카고 (예를 들어, napDNAbp 또는 BE)를 분리할 수 있다. 수용자 세포에 전달 시, 카고 (예를 들어, 전형적으로 하나 이상의 NLS 요소에 의해 플랭킹된 napDNAbp 또는 BE)는 NES 요소를 포함하지 않을 것이며, 그렇지 않으면 카고가 뉴클레아제로 수송되지 못하게 하고, 유전자 편집 활성을 방해할 수 있다. 이는 본원에 기재된 v.3 VLP (또는 "3세대" VLP)로 예시된다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 v.4 VLP (또는 "4세대" VLP)에 의해 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은 VLP로 패키징되는데 이용되는 Gag-카고의 양과 VLP 성숙을 위해 필요한 레트로바이러스 프로테아제 (Gag-Pro-Pol 융합에서 "Pro")의 양 사이에 균형을 이루는 Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 화학량론 비를 발견하였다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 비는 생산자 세포에 일시적으로 전달되는 각각의 성분을 코딩하는 플라스미드의 적절한 비에 의해 달성된다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합의 화학량론을 조절하기 위해, VLP 생성을 위해 형질감염되는 Gag-카고를 코딩하는 플라스미드 (예를 들어, Gag-3xNES-ABE8e) 대 야생형 MMLV gag-pro-pol 플라스미드의 비를 변화시켰다. gag-카고 플라스미드의 양을 v3.4 BE-eVLP를 생성하기 위해 사용되는 원래의 비율보다 높게 증가시키면 (38% Gag-카고 플라스미드 및 62% gag-pro-pol 플라스미드) 편집 효율이 개선되지 않는다는 것이 발견되었다 (**도 2g**). gag-카고 플라스미드의 비율을 38%에서 25%로 감소시키면 편집 효율이 적당히 개선되었다 (**도 2g**). 그러나, gag-카고 플라스미드의 비율을 25% 아래로 추가로 감소시키면 편집 효율이 감소되었다 (**도 2g**). 이들 결과는 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 gag-카고의 양과 VLP 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 모델과 일치한다. 한 실시양태에서, 최적화의 이러한 최종 라운드 결과를 통해 4세대 (v4) BE-eVLP 제형이 밝혀졌고 (**도 2g**), 이는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론 (25% gag-BE)과 v3.4 BE-eVLP 아키텍처를 조합한다. 일부 실시양태에서, gag-pro-폴리단백질 대 gag-카고의 비는 대략 10:1, 대략 9:1, 대략 8:1, 대략 7:1, 대략 6:1, 대략 5:1, 대략 4:1, 대략 3:1, 대략 2:1, 대략 1.5:1, 대략 1:1, 또는 대략 0.5:1이다.

[0108] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 외피, 및 (b) 다중-단백질 코어를 포함하는 eVLP를 제공하며, 여기서 외피는 지질 막 (예를 들어, 지질 단일층 또는 이중층 막) 및 바이러스 외피 당단백질을 포함하고, 다중-단백질 코어는 Gag (예를 들어, 레트로바이러스 Gag), 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질 (즉, "Gag-Pro-Pol"), 및 Gag-카고 (예를 들어, Gag-napDNAbp 또는 Gag-BE)를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 다양한 실시양태에서, Gag-카고는 리보핵단백질 카고, 예를 들어 가이드 RNA와 복합체화된 napDNAbp 또는 BE를 포함할 수 있다. 더욱 추가의 실시양태에서, Gag-카고 (예를 들어, napDNAbp 또는 BE에 융합된 Gag)는 세포에서 카고의 세포 위치를 조절하기 위해 하나 이상의 NLS 서열 및/또는 하나 이상의 NES 서열을 포함할 수 있다. NLS 서열은 세포의 뉴클레아제로 카고의 수송을 용이하게 하여, 편집을 용이하게 할 것이다. NES는 그 반대일 것이며, 즉, 핵 밖으로 카고를 수송하고/거나 핵 내로 카고의 수송을 방지할 것이다. 특정 실시양태에서, NES는 절단가능한 링커 (예를 들어, 프로테아제 링커)에 의해 융합 단백질에 커플링될 수 있으며, 이로써 생산자 세포에서 조립 동안에 NES 신호가 세포질에서 카고를 유지시키고, 패키징 과정에서 이용가능하도록 작동한다. 그러나, 성숙한 VLP가 성숙 형태로 생산자 세포로부터 버딩되거나 또는 방출되면, NES에 연결된 절단가능한 링커가 절단되어, 이로써 NES와 카고의 회합을 제거할 수 있다. 따라서, NES가 없으면, 카고가 그의 NLS 서열을 갖는 뉴클레아제로 전좌되어, 이로써 편집을 용이하게 할 것이다. 다양한 napDNAbp가 본 개시내용의 시스템에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 Cas9 단백질 (예를 들어, Cas9 닉카제, 데드 Cas9 (dCas9), 또는 본원에 기재된 또 다른 Cas9 변이체)이다. 일부 실시양태에서, Cas9 단백질은 가이드 RNA (gRNA)에 결합된다. 융합 단백질은 다른 단백질 도메인, 예컨대 이펙터 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 데아미나제 도메인 (예를 들어, 아데노신 데아미나제 도메인 또는 시토신 데아미나제 도메인)을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 염기 편집기, 예컨대 ABE8e, 또는 본원에 기재된 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 염기 편집기를 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 1개 초과의 NES (예를 들어, 2개의 NES, 3개의 NES, 4개의 NES, 5개의 NES,

6개의 NES, 7개의 NES, 8개의 NES, 9개의 NES, 또는 10개 이상의 NES)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 핵 국소화 서열 (NLS), 또는 1개 초과의 NLS (예를 들어, 2개의 NLS, 3개의 NLS, 4개의 NLS, 5개의 NLS, 6개의 NLS, 7개의 NLS, 8개의 NLS, 9개의 NLS, 또는 10개 이상의 NLS)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 적어도 1개의 NES 및 1개의 NLS를 포함할 수 있다.

[0110] 본원에 기재된 Gag-카고 융합 단백질은 하나 이상의 절단가능한 링커를 포함한다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 단백질은 Gag를 카고에 연결시키는 절단가능한 링커를 포함하며, 이로써 Gag-카고 융합체가 성숙 VLP (Gag-Pro-Pol 또한 함유함)로 패키징되었을 때, 프로테아제 활성이 Gag-카고 절단가능한 링커를 절단하여, 이로써 카고를 방출시키도록 한다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커가 (예를 들어, Gag-Pro-Pol 단백질에 의해) 절단될 때, NES가 카고 단백질로부터 분리되도록 이러한 위치에 절단가능한 링커가 제공될 수도 있다. 융합 단백질의 이러한 배열은 BE-VLP 생성 동안에 생성 세포의 핵으로부터 융합 단백질이 유출되게 하고, 이후에 표적 세포에 전달된 후에 NES는 융합 단백질로부터 절단될 수 있거나, 또는 표적 세포에 전달되기 전이지만 VLP로 패키징된 후에 BE를 방출시키고 표적 세포의 핵에 유입되게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 프로테아제 절단 부위 (예를 들어, 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) 프로테아제 절단 부위 또는 프렌드(Friend) 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) 프로테아제 절단 부위)를 포함한다. 다양한 프로테아제 절단 부위가 본 개시내용의 융합 단백질에서 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 서열식별번호: 1-4 중 하나에 비해 1개의 돌연변이, 2개의 돌연변이, 3개의 돌연변이, 4개의 돌연변이, 5개의 돌연변이, 또는 5개 초과의 돌연변이를 포함하는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질의 절단가능한 링커는 gag-pro 폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단된다. 특정 실시양태에서, BE-VLP가 조립되어 표적 세포로 전달될 때까지, 융합 단백질의 절단가능한 링커는 gag-pro 폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP의 gag-pro 폴리단백질은 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP에서 융합 단백질의 gag 뉴클레오캡시드 단백질은 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질 또는 FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함한다.

[0111] 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 하기 비제한적인 구조를 포함한다:

[0112] [gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS], 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 아미노산 링커, 또는 본원에 제공된 임의의 링커)를 포함함;

[0113] [1X-3X NES]-[gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS], 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 아미노산 링커, 또는 본원에 제공된 임의의 링커)를 포함함; 또는

[0114] [gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]-[절단가능한 링커]-[NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]-[절단가능한 링커]-[1X-3X NES], 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 아미노산 링커, 또는 본원에 제공된 임의의 링커)를 포함함.

[0115] 절단가능한 링커가 VLP 내의 프로테아제에 의해 절단된 실시양태에서, VLP는 구조 [gag 뉴클레오캡시드 단백질]-[1X-3X NES]를 포함하는 융합 단백질, 및 유리 napDNAbp 또는 염기 편집기를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 염기 편집기는 구조 [NLS]-[데아미나제 도메인]-[napDNAbp]-[NLS]를 포함하며, 여기서]-[의 각각의 예는 임의적인 링커 (예를 들어, 아미노산 링커, 또는 본원에 제공된 임의의 링커)를 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 상기 임의의 구축물은 3X NES를 포함한다.

[0117] 본 개시내용에 의해 제공되는 eVLP (예를 들어, BE-VLP)는 바이러스 외피 당단백질을 포함하는 외부 캡슐화 층 (또는 외피 층)을 포함한다. 본원에 기재된 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 바이러스 외피 당단백질이 본 개시내용의 BE-VLP에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질이다. 특정 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 레트로바이러스 외피 당단백질이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, HIV-1 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 시스템을 특정한 세포 유형 (예를 들어, 면역 세포, 신경 세포, 망막 색소 상피 세포 등)에 표적시킨다. 예를 들어, 본원에 기재된 eVLP에서 상이

한 외피 당단백질을 사용하면 그들의 세포 친화성이 변경되어, BE-VLP가 특이적 세포 유형에 표적화되게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 VSV-G 단백질이고, VSV-G 단백질은 시스템을 망막 색소 상피 (RPE) 세포에 표적화시킨다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 HIV-1 외피 당단백질이고, HIV-1 외피 당단백질은 시스템을 CD4+ 세포에 표적화시킨다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 FuG-B2 외피 당단백질이고, FuG-B2 외피 당단백질은 시스템을 뉴런에 표적화시킨다.

[0118] 일반적으로 관심 코딩 핵산을 함유하는 바이러스 벡터 입자를 생성하기 위한 일반적인 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 관심 코딩 핵산을 함유하지 않지만 단백질 카고 (예를 들어, BE RNP)를 전달하도록 설계된 본 발명에 따른 바이러스-유래된 입자를 생성하는 방법에도 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0119] 통상적인 바이러스 벡터 입자는 관련 기술분야에 널리 공지된 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-연관된 바이러스 벡터 입자를 포함한다. 사용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터 입자의 검토를 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Kushnir *et al.* (2012, *Vaccine*, Vol. 31: 58-83), Zeltons (2013, *Mol Biotechnol*, Vol. 53: 92-107), Ludwig *et al.* (2007, *Curr Opin Biotechnol*, Vol. 18(no 6): 537-55) 및 Naskalaska *et al.* (2015, Vol. 64 (no 1): 3-13)]을 참조할 수 있다. 추가로, 단백질을 세포에 전달하기 위해 바이러스-유래된 입자를 사용하는 다양한 방법에 대한 참조는 관련 기술분야의 기술자가 [Maetzig *et al.* (2012, *Current Gene Therapy*, Vol. 12: 389-409)]의 논문, 뿐만 아니라 [Kaczmarczyk *et al.* (2011, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 108 (no 41): 16998-17003)]의 논문에서 확인한다.

[0120] 일반적으로, 본 개시내용에 따라 사용되는 바이러스-유사 입자 (바이러스-유사 입자는 "바이러스-유래된 입자"로도 지칭될 수 있음)는 하나 이상의 바이러스-유래된 구조 단백질(들) 및/또는 하나 이상의 바이러스-유래된 외피 단백질에 의해 형성된다.

[0121] 본 발명에 따라 사용되는 바이러스-유사 입자는 그가 유입된 숙주 세포에서 복제 능력이 없다.

[0122] 바람직한 실시양태에서, 바이러스-유사 입자는 하나 이상의 레트로바이러스-유래된 구조 단백질(들) 및 임의적으로 하나 이상의 바이러스-유래된 외피 단백질(들)에 의해 형성된다.

[0123] 바람직한 실시양태에서, 바이러스-유래된 구조 단백질은 레트로바이러스 Gag 단백질 또는 그의 펩티드 단편이다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, Gag 및 Gag/pol 전구체는 전장 게놈 RNA로부터 폴리단백질로서 발현되고, 이는 기능적 형태를 획득하기 위해 레트로바이러스 프로테아제 (PR)에 의해 매개되는 단백질 분해 절단을 필요로 한다. 추가로, 레트로바이러스 사이에서 구조적으로 보존된 Gag는 적어도 3개의 단백질 단위: 매트릭스 단백질 (MA), 캡시드 단백질 (CA) 및 뉴클레오캡시드 단백질 (NC)로 구성되는 반면에, Pol은 레트로바이러스 프로테아제 (PR), 레트로트랜스크립타제 (RT), 및 인테그라제 (IN)로 구성된다.

[0124] 일부 실시양태에서, 바이러스-유래된 입자는 레트로바이러스 Gag 단백질을 포함하지만, Pol 단백질은 포함하지 않는다.

[0125] 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 렌티바이러스 벡터를 비롯한 레트로바이러스 벡터의 숙주 범위는 위형화로 공지된 과정에 의해 확장되거나 또는 변경될 수 있다. 위형화된 렌티바이러스 벡터는 다른 외피 바이러스로부터 유래된 당단백질을 보유하는 바이러스 벡터 입자로 구성된다. 이러한 위형화된 바이러스 벡터 입자는 당단백질이 유래되는 바이러스 형태의 친화성을 갖는다.

[0126] 일부 실시양태에서, 바이러스-유사 입자는 특정 진핵생물 세포에 대해 상기 바이러스-유사 입자에 친화성을 부여하는 하나 이상의 바이러스 구조 단백질(들) 또는 바이러스 외피 단백질(들)을 포함하는 위형화된 바이러스-유사 입자이다. 본원에 기재된 위형화된 바이러스-유사 입자는 위형화를 위해 사용되는 바이러스 단백질로서 VSV-G 단백질, 홍역 바이러스 HA 단백질, 홍역 바이러스 F 단백질, 인플루엔자 바이러스 HA 단백질, 몰로니 바이러스 MLV-A 단백질, 몰로니 바이러스 MLV-E 단백질, 개코원숭이 내인성 레트로바이러스 (BAEV) 외피 단백질, 에볼라 바이러스 당단백질, 및 거품형성 바이러스 외피 단백질, 또는 이들 바이러스 외피 단백질 중 2가지 이상의 조합을 포함하는 군에서 선택된 바이러스 외피 단백질을 포함할 수 있다.

[0127] 위형화 바이러스 벡터 입자에 대해 널리 공지된 예시는 수포성 구내염 바이러스 당단백질 (VSV-G)에 의한 바이러스 벡터 입자의 위형화로 구성된다. 바이러스 벡터 입자의 위형화에 대해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Yee *et al.* (1994, *Proc Natl Acad Sci, USA*, Vol. 91: 9564-9568) Cronin *et al.* (2005, *Curr Gene Ther*, Vol. 5(no 4): 387-398)]를 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0128] 관심 단백질(들)을 표적 세포에 전달하기 위한 바이러스-유사 입자, 더욱 정확하게는 VSV-G 위형화된 바이러스-

유사 입자를 생성하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 [Mangeot *et al.* (2011, *Molecular Therapy*, Vol. 19 (no 9): 1656-1666)]를 참조할 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 바이러스-유사 입자는 바이러스 외피 단백질을 추가로 포함하며, (i) 상기 바이러스 외피 단백질은 바이러스 구조 단백질과 동일한 바이러스로부터 유래하고, 예를 들어 바이러스 Gag 단백질과 동일한 바이러스로부터 유래하거나, 또는 (ii) 상기 바이러스 외피 단백질은 바이러스 구조 단백질이 유래되는 바이러스와 별개인 바이러스부터 유래하고, 예를 들어 바이러스 Gag 단백질이 유래되는 바이러스와 별개인 바이러스부터 유래한다.

[0130] 관련 기술분야의 기술자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이, 본 개시내용에 따라 사용되는 바이러스-유사 입자는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스-유래된 벡터 입자, 소 면역결핍 바이러스-유래된 입자, 유인원 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자, 고양이 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자, 인간 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자, 말 감염 빈혈 바이러스-유래된 벡터 입자, 염소 관절염 뇌염 바이러스-유래된 벡터 입자, 개코원숭이 내인성 바이러스-유래된 벡터 입자, 광견병 바이러스-유래된 벡터 입자, 인플루엔자 바이러스-유래된 벡터 입자, 노로바이러스-유래된 벡터 입자, 호흡기 세포융합 바이러스-유래된 벡터 입자, A형 간염 바이러스-유래된 벡터 입자, B형 간염 바이러스-유래된 벡터 입자, E형 간염 바이러스-유래된 벡터 입자, 뉴캐슬 질환 바이러스-유래된 벡터 입자, 노워크 바이러스-유래된 벡터 입자, 파르보바이러스-유래된 벡터 입자, 유두종 바이러스-유래된 벡터 입자, 효모 레트로트랜스포손-유래된 벡터 입자, 홍역 바이러스-유래된 벡터 입자, 및 박테리오파지-유래된 벡터 입자를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0131] 특히, 본 발명에 따라 사용되는 바이러스-유사 입자는 레트로바이러스-유래된 입자이다. 이러한 레트로바이러스는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스, 소 면역결핍 바이러스, 유인원 면역결핍 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 말 감염 빈혈 바이러스, 및 염소 관절염 뇌염 바이러스 중에서 선택될 수 있다.

[0132] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 사용되는 바이러스-유사 입자는 렌티바이러스-유래된 입자이다. 렌티바이러스는 레트로바이러스 과에 속하며, 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 고유의 능력을 갖는다.

[0133] 이러한 렌티바이러스는 소 면역결핍 바이러스, 유인원 면역결핍 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 말 감염 빈혈 바이러스, 및 염소 관절염 뇌염 바이러스 중에서 선택될 수 있다.

[0134] 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 [Sharma *et al.* (1997, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 94: 10803+-10808), Guibingua *et al.* (2002, *Molecular Therapy*, Vol. 5(no 5): 538-546)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스-유래된 (MLV-유래된) 벡터 입자는 MLV-A-유래된 벡터 입자 및 MLV-E-유래된 벡터 입자를 포함하는 군에서 선택될 수 있다.

[0135] 소 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 [Rasmussen *et al.* (1990, *Virology*, Vol. 178(no 2): 435-451)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0136] 유인원 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자, 예컨대 VSV-G 위형화된 SIV 바이러스-유래된 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Mangeot *et al.* (2000, *Journal of Virology*, Vol. 71(no 18): 8307-8315), Negre *et al.* (2000, *Gene Therapy*, Vol. 7: 1613-1623) Mangeot *et al.* (2004, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32 (no 12), e102)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0137] 고양이 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Saenz *et al.* (2012, *Cold Spring Harb Protoc*, (1): 71-76; 2012, *Cold Spring Harb Protoc*, (1): 124-125; 2012, *Cold Spring Harb Protoc*, (1): 118-123)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0138] 인간 면역결핍 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Jalaguier *et al.* (2011, *PlosOne*, Vol. 6(no 11), e28314), Cervera *et al.* (*J Biotechnol*, Vol. 166(no 4): 152-165), Tang *et al.* (2012, *Journal of Virology*, Vol. 86(no 14): 7662-7676)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0139] 말 감염 빈혈 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Olsen (1998, *Gene Ther*, Vol. 5(no 11): 1481-1487)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0140] 염소 관절염 뇌염 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Mselli-Lakhal *et al.* (2006, *J Virol Methods*, Vol. 136(no 1-2): 177-184)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원

에 참조로 포함된다.

[0141] 개코원숭이 내인성 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Girard-Gagnepain *et al.* (2014, *Blood*, Vol. 124(no 8): 1221-1231)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0142] 광견병 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Kang *et al.* (2015, *Viruses*, Vol. 7: 1134-1152, doi:10.3390/v7031134), Fontana *et al.* (2014, *Vaccine*, Vol. 32(no 24): 2799-27804)] 또는 WO 2012/0618로 공개된 PCT 출원에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0143] 인플루엔자 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Quan *et al.* (2012, *Virology*, Vol. 430: 127-135) 및 Latham *et al.* (2001, *Journal of Virology*, Vol. 75(no 13): 6154-6155)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0144] 노로바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Tome-Amat *et al.*, (2014, *Microbial Cell Factories*, Vol. 13: 134-142)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0145] 호흡기 세포융합 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Walpita *et al.* (2015, *PlosOne*, DOI: 10.1371/journal.pone.0130755)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0146] B형 간염 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Hong *et al.* (2013, Vol. 87(no 12): 6615-6624)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0147] E형 간염 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Li *et al.* (1997, *Journal of Virology*, Vol. 71(no 10): 7207-7213)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0148] 뉴캐슬 질환 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Murawski *et al.* (2010, *Journal of Virology*, Vol. 84(no 2): 1110-1123)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0149] 노워크 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Herbst-Kralovetz *et al.* (2010, *Expert Rev Vaccines*, Vol. 9(no 3): 299-307)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0150] 파르보바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Ogasawara *et al.* (2006, *In Vivo*, Vol. 20: 319-324)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0151] 유두종 바이러스-유래된 벡터 입자를 제조하기 위해, 관련 기술분야의 기술자는 특히 [Wang *et al.* (2013, *Expert Rev Vaccines*, Vol. 12(no 2): doi:10.1586/erv.12.151)]에 개시된 방법을 참조할 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0152] 본원에서 사용되는 바이러스-유사 입자는 Gag 단백질이며, 가장 바람직하게는 라우스 육종 바이러스 (RSV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV), 몰로니 백혈병 바이러스 (MLV), 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1 및 HIV-2), 특히 유형 1의 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1)로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스로부터 기원하는 Gag 단백질이다.

[0153] 일부 실시양태에서, 바이러스-유사 입자는 또한 하나 이상의 바이러스 외피 단백질(들)을 포함할 수 있다. 하나 이상의 바이러스 외피 단백질(들)의 존재는 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 표적화되는 세포에 대한 더욱 특이적인 친화성을 상기 바이러스-유래된 입자에 부여할 수 있다. 하나 이상의 바이러스 외피 단백질(들)은 레트로바이러스로부터의 외피 단백질, 비-레트로바이러스 바이러스로부터의 외피 단백질, 및 이들 바이러스 외피 단백질과 다른 펩티드 또는 단백질의 키메라로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 관심 비-렌티바이러스 외피 당단백질은 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) 균주 WE54 외피 당단백질이다. 이들 외피 당단백질은 레트로바이러스 유래된 벡터에 의해 형질도입될 수 있는 세포의 범위를 증가시킨다.

[0154] napDNAbp

[0155] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 BE-VLP 뿐만 아니라, 본원에 기재된 BE-VLP의 코어 성분을 구성하는 융합 단백질은 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp)을 포함한다.

[0156] 다양한 실시양태에서, BE-VLP 및 융합 단백질은 야생형 Cas9 서열, 예를 들어 하기 나타낸 바와 같이 서열식별번호: 13의 정규 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 서열을 갖는 napDNAbp 도메인을 포함할 수 있다:

설명	서열	SEQ ID NO:
SpCas9 *스트렙토코쿠스 피오게네스* M1 스위스프롯 수탁 번호 Q99ZW2 야생형	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLV EEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSA RLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSK DTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVK VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY GDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSD KLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF SKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTT IDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	13

[0157]

[0158] 다른 실시양태에서, BE-VLP 및 융합 단백질은 변형된 Cas9 서열, 예를 들어 하기 나타낸 바와 같이 야생형 SpCas9 (서열식별번호: 13)에 비해 H840A 치환을 갖는 서열식별번호: 14의 스트렙토코쿠스 피오게네스 Cas9의 닉카제 변이체를 갖는 napDNAbp 도메인을 포함할 수 있다:

| Cas9 닉카제

H840**A**를 갖는
스트렙토코쿠스 피오게네스
Q99ZW2 Cas9 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL
LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEE
SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI
DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH
LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR
KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF
KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTL
TLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIAN
LAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS
RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVD**A**IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN**R**GKSDNVPSEEVVKKM
KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH
VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGK
ATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR
KVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFD
SPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGY
KEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYL
ASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV
LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL
DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD | SEQ ID NO: 14 |

[0159]

[0160] 본원에 기재된 BE-VLP 및 융합 단백질은 상기 기재된 임의의 변형된 Cas9 서열, 또는 그와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 임의의 변이체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 염기 편집기 융합 단백질은 상응하는 아미노산 위치에서 본원에 기재된 돌연변이 중 하나 이상에 의해 변형될 수 있는 임의의 하기 다른 야생형 SpCas9 서열을 포함한다:

[0161]

설명	서열
SpCas9 *스트렙토코쿠스 퍼오게네스* MGAS1882 야생형 NC_017053.1	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCG GTGATCACTGATGATTATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACA GACCGCCACAGTATCAAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGGCAGTGGAGAG ACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAA GAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGAT AGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGA ACGTCATCCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAA CTATCTATCATCTGCGAAAAAAATTGGCAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTT AATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAG ATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAATCTAC AATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAGTAGAGTAGATGCTAAAGCGATT CTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCC GGTGAGAAGAGAAATGGCTTGTTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGATTGACC CCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAG ATACTTACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATGCTGAT TTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTCAGATATCCTAAGAGT AAATAGTGAAATAACTAAGGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAGCGCTACGATGAA CATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAACAACTTCCAGAAAAG TATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGG GAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATG GTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGA CCTTTGACAACGGCTCTATTCCCCATCAAATTCACTTGGGTGAGCTGCATGCTATTTT GAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAA AAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCG TTTTGCATGGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGA AGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAAACTTTGAT AAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTA CGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTGAGGGAATGCGAAAACCAG CATTTCTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAATC GAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAAAGAAGATTATTTCAAAAAAATAGAATGTTTTG ATAGTGTTGAAATTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGCGCCTACCA TGATTTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGAT ATCTTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGGGATGATTGAGG AAAGACTTAAAACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAAC GTCGCCGTTATACTGGTTGGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGA TAAGCAATCTGGCAAAACAATATTAGATTTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGC AATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGAAGATATTCAAAAAG CACAGGTGTCTGGACAAGGCCATAGTTTACATGAACAGATTGCTAACTTAGCTGGCA GTCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAATTGTTGATGAACTGGTCA AAGTAATGGGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTGAAAATCAGA CAACTCAAAAGGGCCAGAAAAATTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAGG TATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATT GCAAAATGAAAAGCTCTATCTCTATTATCTACAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGA CCAAGAATTAGATATTAATCGTTTAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAAA GTTTCATTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTACTAACGCGTTCTGATAAAAATCG TGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAAACTATT GGAGACAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAATTTAACGA AAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACTTGATAAAGCTGGTTTTATCAAACGCCAAT TGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAGTCGCATGA ATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAAA ATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATT AACAATTACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAACTGCTTTGA TTAAGAAATATCCAAAACTTGAATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGAT GTTCGTAAAATGATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCAAAATAT TTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAACAGAAATTACACTTGCAAATGGAG

	AGATTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGG GATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAAGTATTGTCCATGCCCCAAGTCAAT ATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATTTTACC AAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAAAAT ATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGA AAAAGGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTAT GGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAGCTAAAGGATATAA GGAAGTTAAAAAAGACTTAATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAA AACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCT GGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGA AGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCATAAGCAT TATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGA TGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGCATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGT GAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGGAGCTCCCGCTG CTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGT TTTAGATGCCACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATT TGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA (SEQ ID NO: 15)
SpCas9 *스트렙토코쿠스 피오게네스* MGAS1882 야생형 NC_017053.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFGSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLADSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN SDVDKLFIQLVQIYNQLFEENPINASRVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKRNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNSEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLG ELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGAY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRGMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRR RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGHSLHEQIANLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN RLSDYDVDHIVPQSFIKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNA KLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDK LIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESE FVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNG ETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEA KGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY EKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPI REQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ LGGD (SEQ ID NO: 16)
SpCas9 *스트렙토코쿠스 피오게네스* 야생형 SWBC2D7W014	ATGGATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGACATCGGCACTAATTCCGTTGGATGGGCTG TCATAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTTAAGGTGTTGGGGAACACAG ACCGTCATTCGATTAAAAAGAATCTTATCGGTGCCCTCCTATTCGATAGTGGCGAAAC GGCAGAGGCGACTCGCCTGAAACGAACCGCTCGGAGAAGGTATACACGTCGCAAG AACCGAATATGTTACTTACAAGAAATTTTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACGAT TCTTTCTTTCACCGTTTGGAAGAGTCCTTCCTTGTCGAAGAGGACAAGAAACATGAA CGGCACCCCATCTTTGGAAACATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTACCCA ACGATTTATCACCTCAGAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACCTGAG GTTAATCTACTTGGCTCTTGCCCATATGATAAAGTTCCGTGGGCACTTTCTCATTGAG GGTGATCTAAATCCGGACAACTCGGATGTCGACAAACTGTTCATCCAGTTAGTACAA ACCTATAATCAGTTGTTTGAAGAGAACCCTATAAATGCAAGTGGCGTGGATGCGAAG GCTATTCTTAGCGCCCGCCTCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCACAA TTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCGGTAACCTTATAGCGCTCTCACTAGGC CTGACACCAAATTTTAAGTCGAACTTCGACTTAGCTGAAGATGCCAAATTGCAGCTT AGTAAGGACACGTACGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCACAAATTGGAGATCAG TATGCGGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTTAGCGATGCAATCCTCCTATCTGACA TACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGCGCCGTTATCCGCTTCAATGATCAAAA GGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACACTTCTCAAGGCCCTAGTCCGTCAGCAA

[0162]

	CTGCCTGAGAAATATAAGGAAATATTCTTTGATCAGTCGAAAAACGGGTACGCAGGT TATATTGACGGCGGAGCGAGTCAAGAGGAATTCTACAAGTTTATCAAACCCATATTAG AGAAGATGGATGGGACGGAAGAGTTGCTTGTAAAACTCAATCGCGAAGATCTACTG CGAAAGCAGCGGACTTTCGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGCGA ATTGCATGCTATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCCTCAAAGACAATCGT GAAAAGATTGAGAAAATCCTAACCTTTCGCATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCC CGAGGGAACTCTCGGTTCGCATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAACGATTACTCC ATGGAATTTTGAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTCATCGAGAG GATGACCAACTTTGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCCTAAGCACAGTTT ACTTTACGAGTATTTCACAGTGTACAATGAACTCACGAAAGTTAAGTATGTCACTGA GGGCATGCGTAAACCCGCCTTTCTAAGCGGAGAACAGAAGAAAGCAATAGTAGATC TGTTATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAAGCAATTGAAAGAGGACTACTTTA AGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTCGAGATCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATG CGTCACTTGGTACGTATCATGACCTCCTAAAGATAATTAAAGATAAGGACTTCCTGGA TAACGAAGAGAATGAAGATATCTTAGAAGATATAGTGTTGACTCTTACCCTCTTTGAA GATCGGGAAATGATTGAGGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTCGACGATAA GGTTATGAAACAGTTAAAGAGGCGTCGCTATACGGGCTGGGGACGATTGTCGCGGA AACTTATCAACGGGATAAGAGACAAGCAAAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAA AGAGCGACGGCTTCGCCAATAGGAACTTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTTAA CCTTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTTCCGGACAAGGGGACTCATTGCAC GAACATATTGCGAATCTTGCTGGTTCGCCAGCCATCAAAAAGGGCATACTCCAGACA GTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACGTCACAAACCGGAAAACAT TGTAATCGAGATGGCACGCGAAAATCAAACGACTCAGAAGGGGCAAAAAAACAGT CGAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAAGAACTGGGCAGCCAGATCTT AAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACCCAATTGCAGAACGAGAAACTTTACCTCTATTA CCTACAAAATGGAAGGGACATGTATGTTGATCAGGAACTGGACATAAACCGTTTATC TGATTACGACGTCGATCACATTGTACCCCAATCCTTTTTGAAGGACGATTCAATCGAC AATAAAGTGCTTACACGCTCGGATAAGAACCGAGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAG CGAGGAAGTCGTAAAGAAAATGAAGAACTATTGGCGGCAGCTCCTAAATGCGAAAC TGATAACGCAAAGAAAGTTCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCT GAACTTGACAAGGCCGGATTTATTAAACGTCAGCTCGTGGAAACCCGCCAAATCAC AAAGCATGTTGCACAGATACTAGATTCCCGAATGAATACGAAATACGACGAGAACGA TAAGCTGATTCGGGAAGTCAAAGTAATCACTTTAAAGTCAAAATTGGTGTCGGACTT CAGAAAGGATTTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCATGCGCA CGACGCTTATCTTAATGCCGTCGTAGGGACCGCACTCATTAAGAAATACCCGAAGCT AGAAAGTGAGTTTGTGTATGGTGATTACAAAGTTTATGACGTCCGTAAGATGATCGC GAAAAGCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAGCCAAATACTTCTTTTATTCTAACAT TATGAATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAACGGAGAGATACGCAAACGACC TTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAATCGTATGGGATAAGGGCCGGGACT TCGCGACGGTGAGAAAAGTTTTGTCCATGCCCCAAGTCAACATAGTAAAGAAAACT GAGGTGCAGACCGGAGGGTTTTCAAAGGAATCGATTCTTCCAAAAAGGAATAGTGA TAAGCTCATCGCTCGTAAAAAGGACTGGGACCCGAAAAAGTACGGTGGCTTCGATA GCCCTACAGTTGCCTATTCTGTCCTAGTAGTGGCAAAAGTTGAGAAGGGAAAATCCA AGAAACTGAAGTCAGTCAAAGAATTATTGGGGATAACGATTATGGAGCGCTCGTCTT TTGAAAAGAACCCCATCGACTTCCTTGAGGCGAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAAG GATCTCATAATTAAACTACCAAAGTATAGTCTGTTTGAGTTAGAAAATGGCCGAAAA CGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTTCAAAAGGGGAACGAACTCGCACTACCGTC TAAATACGTGAATTTCCTGTATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAGGTTCACCT GAAGATAACGAACAGAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACATTATCTCGACGA AATCATAGAGCAAATTTCGGAATTCAGTAAGAGAGTCATCCTAGCTGATGCCAATCT GGACAAAGTATTAAGCGCATACAACAAGCACAGGGATAAACCCATACGTGAGCAGG CGGAAAATATTATCCATTTGTTTACTCTTACCAACCTCGGCGCTCCAGCCGCATTCAA GTATTTTGACACAACGATAGATCGCAAACGATACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGA CGCGACACTGATTCACCAATCCATCACGGGATTATATGAAACTCGGATAGATTTGTCA CAGCTTGGGGGTGACGGATCCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGACTACA AAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACA AGGCTGCAGGA (SEQ ID NO: 17)
SpCas9 스트렙토코쿠	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF

[0163]

스 피오게네스 야생형 SWBC2D7W014의 코딩된 생성물	GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN SDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLG ELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRR RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELD INRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLL NAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLE AKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDL SQLGGDGSPKKKRKVSSDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKAAG (SEQ ID NO: 18)
SpCas9 *스트랩토코쿠스 피오게네스* M1GAS 야생형 NC_002737.2	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCG GTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACA GACCGCCACAGTATCAAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAG ACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAA GAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGAT AGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGA ACGTCATCCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAA CTATCTATCATCTGCGAAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTT AATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAG ATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAACCTA CAATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAGTGGAGTAGATGCTAAAGCGAT TCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCC GGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGACC CCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAG ATACTTACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATGCTGAT TTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTCAGATATCCTAAGAGT AAATACTGAAATAACTAAGGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAACGCTACGATGAA CATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAACAACTTCCAGAAAAG TATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGG GAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATG GTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGA CCTTTGACAACGGCTCTATTCCCCATCAAATTCACTTGGGTGAGCTGCATGCTATTTT GAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAA AAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCG TTTTGCATGGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGA AGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAAACTTTGAT AAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTA CGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAG CATTTCTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAATC GAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAAAGAAGATTATTTCAAAAAAATAGAATGTTTTG ATAGTGTTGAAATTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCTACCA TGATTTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGAT ATCTTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGATGATTGAGG AAAGACTTAAAACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAAC GTCGCCGTTATACTGGTTGGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGA TAAGCAATCTGGCAAAACAATATTAGATTTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGC AATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGAAGACATTCAAAAAG

[0164]

	CACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGAACATATTGCAAATTTAGCTGGTA GCCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTGATGAATTGGTCA AAGTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTGAAAATC AGACAACTCAAAAGGGCCAGAAAAATTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGA AGGTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCA ATTGCAAAATGAAAAGCTCTATCTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTG GACCAAGAATTAGATATTAATCGTTTAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACA AAGTTTCCTTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTCTTAACGCGTTCTGATAAAAA TCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAAACT ATTGGAGACAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAATTTAA CGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACTTGATAAAGCTGGTTTTATCAAACGC CAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAGTCGC ATGAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCT TAAAATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGA GATTAACAATTACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAACTGCT TTGATTAAGAAATATCCAAAACTTGAATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTT ATGATGTTCGTAAAATGATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCA AAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAACAGAAATTACACTTGCAA ATGGAGAGATTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATT GTCTGGGATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAAGTATTGTCCATGCCCCAA GTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAAT TTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAA AAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAA GGTGGAAAAAGGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCA CAATTATGGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAAATCCGATTGACTTTTAGAAGCTAAAG GATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTAATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGA GTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAA ATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAA AAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCA TAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTT TAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGCATATAACAAACATAGAGACAAAC CAATACGTGAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTACGTTGACGAATCTTGGAGC TCCCGCTGCTTTTAAATATTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACGTCTACAA AAGAAGTTTTAGATGCCACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACG CATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA (SEQ ID NO: 19)
SpCas9 *스트렙토코쿠스 피오게네스* M1GAS 야생형 NC_002737.2의 코딩된 생성물 (정규 Q99ZW2 야생형과 100% 동일함)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN SDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLG ELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRR RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELD INRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLL NAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLE AKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDL SQLGGD (SEQ ID NO: 13)

[0165]

[0166] 본원에 기재된 BE-VLP 및 융합 단백질은 임의의 상기 SpCas9 서열, 또는 그와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 임의의 변이체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, Cas9 단백질은 에스. 피오게네스로부터의 정규 Cas9와 상이한 또 다른 박테리아 종으로부터의 야생형 Cas9 오르토로그일 수 있다. 예를 들어, 하기 Cas9 오르토로그의 변형된 버전은 H840A 또는 야생형 SpCas9에서 임의의 다른 관심 아미노산에 상응하는 위치에서 돌연변이를 만들어서 본 명세서에 기재된 BE-VLP 및 융합 단백질과 관련하여 사용될 수 있다. 또한, 임의의 하기 오르토로그와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 임의의 변이체 Cas9 오르토로그 또한 염기 편집기와 함께 사용될 수 있다.

설명	서열
LfCas9 *락토바실루스 페르멘툼* 야생형 *진뱅크: SNX31424.1* 1	MKEYHIGLDIGTSSIGWAVTDSQFKLMRIKGKTAIGVRLFEEGKTAAERRTFRTTRRRLKR RKWRLHYLDEIFAPHLQEVDENFLRRLKQSNIHPEDPTKNQAFIGKLLFPDLLKKNERGY PTLIKMRDELPVEQRAHYPVMNIYKLREAMINEDRQFDLREVYLAVHHIVKYRGHFLNN ASVDKFKVGRIDFDKSFNVLNEAYEELQNGEGSFTIEPSKVEKIGQLLLDTKMRKLDRQ KAVAKLLEVKVADKEETKRNKQIATAMSKLVLGYKADFATVAMANGNEWKIDLSSETSE DEIEKFREELSDAQNDILTEITSLFSQIMLNEIVPNGMSISESMMDRYWTHERQLAEVKEY LATQPASARKEFDQVYNKYIGQAPKERGFDLEKGLKKILSKKENWKEIDELLKAGDFLP KQRTSANGVIPHQMHQQELDRIIEKQAKYYPWLATENPATGERDRHQAKYELDQLVSFR IPYYVGPLVTPEVQKATSGAKFAWAKRKEDGEITPWNLWDKIDRAESAEAFIKRMTVKD TYLLNEDVLPANSLLYQKYNVLNELNNVRVNGRRLSVGIKQDIYTELFKKKKTVKASDV ASLVMAKTRGVNKPSVEGLSDPKKFNSNLATYLDLKSIVGDKVDDNRYQTDLENIIEWR SVFEDGEIFADKLTEVEWLTDEQRSALVKKRYKGWGRLSKKLLTGIVDENGQRIIDLMW NTDQNFKEIVDQPVFKEQIDQLNQKAITNDGMTLRERVESVLDDAYTSPQNKKAIWQVV RVVEDIVKAVGNAPKSISIEFARNEGNKGEITRSRRTQLQKLFEDQAHELVKDTSLTEELE KAPDLSDRYYFYFTQGGKDMYTGDPINFDEISTKYDIDHILPQSFVKDNSLDNRVLTSRK ENNKKSDQVPAKLYAAKMKPYWNQLLKQGLITQRKFENLTKDVDQNIKYRSLGFVKRQ LVETRQVIKLTANILGSMYQEAGTEIIETRAGLTKQLREEFDLPKVREVNDYHHAVDAYL TTFAGQYLNRRYPKLRSFFVYGEYMKFKHGSDLKLRNFNFFHELMEGDKSQGKVVDQQ TGELITTRDEVAKSFDRLLNMKYMLVSKEVHDRSDQLYGATIVTAKESGKLTSPIEIKKNR LVDLYGAYTNGTSAFMTIIKFTGNKPKYKVIGIPTTSAASLKRAGKPGSESYNQELHRIIK SNPKVKKGFEIVVPHVSYGQLIVDGDCKFTLASPTVQHPATQLVLSKKSLETISSGYKILK DKPAIANERLIRVFDEVVGQMNRYFTIFDQRSNRQKVADARDKFLSLPTESKYEGAKKV QVGKTEVITNLLMGLHANATQGDLKVLGLATFGFFQSTTGLSLSEDTMIVYQSPTGLFER RICLKDI (SEQ ID NO: 20)
SaCas9 *스타필로코쿠스 아우레우스* 야생형 진뱅크: AYD60528.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE ATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIK DKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVD HIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKG RDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDS PTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (SEQ ID NO: 13)
SaCas9 *스타필로코쿠스 아우레우스*	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRR RRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVH NVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVK EAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGH CTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTL KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQ SSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRL KLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK

[0167]

설명	서열
	DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLED LLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKK HILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRV NNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKA KKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLI NDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKL IMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSR NKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIA SKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK (SEQ ID NO: 21)
StCas9 *스트렙토코쿠스 써모필루스 유니프롯KB/스위스-프롯:G3ECR1.2* 야생형	MLFNKCIIISINLDFSNKEKCMTKPYSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSKKMKVLGNTS KKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQR LDDSFLVPDDKRDSKYPIFGNLVEEKVYHDEFPTIYHLRKYLADSTKKADLRLVYLALA HMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQLEEIVKDKISKLE KKDRILKLFPGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETLLGY IGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNI SLKTYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKNLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRK QRTFDNGSIPYQIHLQEMRAILDKQAKFYPFLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDF AWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNE LTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIE KQFNSSLSTYHDLLNIINDKEFLDDSSNEAIIEEIIHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVL KKLSRRHYTGWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDDALSFKKKI QKAQIIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMAREN QYTNQGKSNSQQRLKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGK DMYTGDDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVKKRK TFWYQLLKSKLISQRKFDNLTKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFN NKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVREINDFHHAHDAYLNAVIASALLKK YPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEET GESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSN ENLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGTIEKGAKKKITNVLEFQGISILDRINYRKD KLNFLLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRMLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVK LLYHAKRISNTINENHRKYVENHKKEFEELFYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQ NHSIDELCSSFIGPTGSERKGLFELTSRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQS VTGLYETRIDLAKLGEG (SEQ ID NO: 22)
LcCas9 *락토바실루스 크리스파투스* NCBI 참조 서열: WP_133478044.1 야생형	MKIKNYNLALTPSTSAVGHVEVDDDLNILEPVHHQKAIGVAKFGEGETAEARRLARSAR RTTKRRANRINHYFNEIMKPEIDKVDPLMFDRIKQAGLSPLDERKEFRTVIFDRPNIASYY HNQFPTIWHLQKYLMITDEKADIRLIYWALHSLLKHRGHFFNTTPMSQFKPGKLNLKDD MLALDDYNDLEGLSFAVANSPEIEKVIKDRSMHKKEKIAELKKLIVNDVPDKDLAKRNN KIITQIVNAIMGNSFHLNFIFDMDLDKLTSKAWSFKLDDPELDTKFDAISGSMTDNQIGIFE TLQKIYSAISLLDILNGSSNVVDAKNALYDKHKRDLNLYFKFLNTLPDEIAKTLKAGYTL YIGNRKKDLLAARKLLKVNVAKNFSQDDFYKLINKELKSIDKQGLQTRFSEKVGELVAQ NNFLPVQRSSDNVFIPYQLNAITFNKILENQGKYYDFLVKPNPAKKDRKNAPYELSQLM QFTIPYYVGPLVTPEEQVKSGIPKTSRFAWMVRKDNGAITPWNFYDKVDIEATADKFIKR SIAKDSYLLSELVLPKHSLLYEKYEVFNELSNVSLDGKKLSGGVKQILFNEVFKKTNKVN TSRILKALAKHNIPGSKITGLSNPEEFTSSLQTYNAWKKYFPNQIDNFAYQQDLEKMIEWS TVFEDHKILAKKLDEIEWLDDDQKKFVANTRLRGWGRLSKRLLTGLKDNYGKSIMQRL ETTKANFQQIVYKPEFREQIDKISQAAAKNQSLEDILANSYTSPSNRKAIRKTMSVVDEYI KLNHGKEPDKIFLMFQRSEQEKGKQTEARSKQLNRILSQLKADKSANKLFSKQLADEFS NAIKKSKYKLNDKQYFYFQQLGRDALTGEVIDYDELYKYTVLHIIPRSKLTDDSQNNKV LTKYKIVDGSVALKFGNSYSDALGMPIKAFWTELNRLKLIPKGKLLNLTTDFSTLNKYQR DGYIARQLVETQQIVKLLATIMQSRFKHTKIIEVRNSQVANIRYQFDYFRIKNLNEYYRGF DAYLAAVVGTYLYKVYPKARRLFVYGQYLKPKKTNQENQDMHLDSEKKSQGFNFLWN LLYGKQDQIFVNGTDVIAFNRKDLITKMNTVYNYKSQKISLAIDYHNGAMFKATLFPRN DRDTAKTRKLIPKKKDYDTDIYGGYTSNVDGYMLLAEIIKRDGNKQYGFYGVPSRLVSE LDTLKKTRYTEYEEKLKEIIKPELGVDLKKIKKIKILKNKVPFNQVIIDKGSKFFITSTSYR WNYRQLILSAESQQTLMDLVVDPDFSNHKARKDARKNADERLIKVYEEILYQVKNYMP MFVELHRCYEKLVDAQKTFKSLKISDKAMVLNQILLLHSNATSPVLEKLGYHTRFTLGK KHNLISENAVLVTQSITGLKENHVSIKQML (SEQ ID NO: 23)

[0168]

설명	서열
PdCas9 *페디코쿠스 담노수스* NCBI 참조 서열: WP_062913273.1 야생형	MTNEKYSIGLDIGTSSIGFAVVNDNNRVIRVKGKNAIGVRLFDEGKAAADRRSFRTTRRS FRTTRRRLSRRRWRLKLLREIFDAYITPVDEAFFIRLKESNLSPKDSKKQYSGDILFNDRS DKDFYEKYPTIYHLRNALMTEHRKFDVREIYLAIHHIMKFRGHFLNATPANNFKVGRLN LEEKFEELNDIYQRVFPDESIEFRTDNLEQIKEVLLDNKRSRADRQRTLVSDIYQSSEDKDI EKRNKAVATEILKASLGNKAKLNVITNVEVDKEAAKEWSITFDSESIDDDLAKIEGQMTD DGHEIIEVLRSLYSGITLSAIVPENHTLSQSMVAKYDLHKDHLKLFKKLINGMTDTKKAK NLRAAYDGYIDGVKGKVLPQEDFYKQVQVNLDDSAEANEIQTYIDQDIFMPKQRTKAN GSIPHQLQQQELDQIIENQKAYYPWLAELNPNPDKKRQQLAKYKLDELVTFRVPYYVGP MITAKDQKNQSGAEFAWMIRKEPGNITPWNFDQKVDRMATANQFIKRMTTTDTYLLGE DVLPAQSLLYQKFEVLNELNKIRIDHKPISIEQKQQIFNDLFKQFKNVTIKHLQDYLVSQG QYSKRPLIEGLADEKRFNSSLSTYSDLCGIFGAKLVEENDRQEDLEKIIEWSTIFEDKKIYR AKLNDLTWLTDDQKEKLATKRYQGWGRLSRKLLVGLKNSEHRNIMDILWITNENFMQI QAEPDFAKLVTDANKGMLEKTDSQDVINDLYTSPQNKKAIRQILLVVHDIQNAMHGQAP AKIHVEFARGEERNPRRSVQRQRQVEAAYEKVSNELVSAKVRQEFKEAINNKRDFKDRL FLYFMQGGIDIYTGKQLNIDQLSSYQIDHILPQAFVKDDSLTNRVLTNENQVKADSVPIDI FGKKMLSVWGRMKDQGLISKGKYRNLTMNPENISAHTENGFINRQLVETRQVIKLAVNI LADEYGDSTQIISVKADLSHQMREDFELLKNRDVNDYHHAFDAYLAAFIGNYLLKRYPK LESYFVYGDFKKFTQKETKMRRFNFIYDLKHCDQVVNKETGEILWTKDEDIKYIRHLFA YKKILVSHEVREKRGALYNQTIYKAKDDKGSGQESKKLIRIKDDKETKIYGGYSGKSLAY MTIVQITKKNKVSYRVIGIPTLALARLNKLENDSTENNGELYKIIKPQFTHYKVDKKNGEI IETTDDFKIVVSKVRFQQLIDDAGQFFMLASDTYKNNAQQLVISNNALKAINNTNITDCP RDDLERLDNLRLDSAFDEIVKKMDKYFSAYDANNFREKIRNSNLIFYQLPVEDQWENNK ITELGKRTVLTRILQGLHANATTTDMSIFKIKTPFGQLRQRSGISLSENAQLIYQSPTGLFER RVQLNKIK (SEQ ID NO: 24)
FnCas9 *푸소박테리움 누클레아툼* NCBI 참조 서열: WP_060798984.1	MKKQKFSDYYLGFDIGTNSVGWCVTDLDYNVLRFNKKDMWGSRLFEEAKTAAERRVQ RNSRRRLKRRKWRLNLLEEIFSNEILKIDSNFFRRLKESSLWLEDKSSKEKFTLFNDDNYK DYDFYKQYPTIFHLRNELIKNPEKKDIRLVYLAIHSIFKSRGHFLFEGQNLKEIKNFETLYN NLIAFLEDNGINKIIDKNNIEKLEKIVCDSKKGLKDKEKEFKEIFNSDKQLVAIFKLSVGSS VSLNDLFDTDEYKKGEVEKEKISFREQIYEDDKPIYYSILGEKIELLDIAKTFYDFMVLNN ILADSQYISEAKVKLYEEHKKDLKNLKYIIRKYNKGNYDKLFKDKNENNYSAYIGLNKE KSKKEVIEKSRLKIDDLIKNIKGYLPKVEEIEEKDKAIFNKILNKIELKTILPKQRISDNGTL PYQIHEAELEKILENQSKYYDFLNYEENGIITKDKLLMTFKFRIPYYVGPLNSYHKDKGG NSWIVRKEEGKILPWNFEQKVDIEKSAEEFIKRMTNKCTYLNGEDVIPKDTFLYSEYVIL NELNKVQVNDEFLNEENKRKIIDELFKENKKVSEKKFKEYLLVKQIVDGTIELKGVKDSF NSNYISYIRFKDIFGEKLNLDIYKEISEKSILWKCLYGDDKKIFEKKIKNEYGDILTKDEIKK INTFKFNNWGRLSEKLLTGIEFINLETGECYSSVMDALRRTNYNLMELLSSKFTLQESINN ENKEMNEASYRDLIEESYVSPSLKRAIFQTLKIYEEIRKITGRVPKKVFIEMARGGDESMK NKKIPARQEQLKKLYDSCGNDIANFSIDIKEMKNSLISYDNNSLRQKKLYLYYLQFGKCM YTGREIDLDRLLQNNDTYDIDHIYPRSKVIKDDSFDNLVLVLKNENAEKSNEYPVKKEIQ EKMKSFWRFLKEKNFISDEKYKRLTGKDDFELRGFMARQLVNVRQTTKEVGKILQQIEP EIKIVYSKAEIASSFREMFDFIKVRELNDTHHAKDAYLNIVAGNVYNTKFTEKPYRYLQEI KENYDVKKIYNYDIKNAWDKENSLEIVKKNMEKNTVNITRFIKEKKGQLFDLNPIKKGE TSNEIISIKPKVYNGKDDKLNEKYGYYKSLNPAYFLYVEHKEKNKRIKSFERVNLVDVNN IKDEKSLVKYLIENKKLVEPRVIKKVYKRQVILINDYPYSIVTLDSNKLMDFENLKPLFLE NKYEKILKNVIKFLEDNQGKSEENYKFIYLKKKDRYEKNETLESVKDRYNLEFNEMYDK FLEKLDSKDYKNYMNNKKYQELLDVKEKFIKLNLFDKAFTLKSFLDLFNRKTMADFSK VGLTKYLGKIQKISSNVLSKNELYLLEESVTGLFVKKIKL (SEQ ID NO: 25)
EcCas9 *엔테로코쿠스 세코룸* NCBI 참조 서열: WP_047338501.1 야생형	RRKQRIQILQELLGEEVLKTDPGFFHRMKESRYVVEDKRTLDGKQVELPYALFVDKDYT DKEYYKQFPTINHLIVYLMTTSDTPDIRLVYLALHYYMKNRGNFLHSGDINNVKDINDIL EQLDNVLETFLDGWNLKLKSYVEDIKNIYNRDLGRGERKKAFVNTLGAKTKAEKAFCS LISGGSTNLAELFDDSSLKEIETPKIEFASSSLEDKIDGIQEALEDRFAVIEAAKRLYDWKTL TDILGDSSSLAEARVNSYQMHHEQLLELKSLVKEYLDRKVFQEVFVSLNVANNYPAYIG HTKINGKKKELEVKRTKRNDFYSYVKKQVIEPIKKKVSDEAVLTKLSEIESLIEVDKYLPL QVNSDNGVIPYQVKLNELTRIFDNLENRIPVLRENRDKIIKTFKFRIPYYVGSLNGVVKNG KCTNWMVRKEEGKIYPWNFEDKVDLEASAEQFIRRMTNKCTYLVNEDVLPKYSLLYSK YLVLSELNNLRIDGRPLDVKIKQDIYENVFKKNRKVTLKKIKKYLLKEGIITDDDELSGLA DDVKSSLTAYRDFKEKLGHLDLSEAQMENIILNITLFGDDKKLLKKRLAALYPFIDDKSL NRIATLNYRDWGRLSERFLSGITSVDQETGELRTIIQCMYETQANLMQLLAEPYHFVEAI

[0169]

설명	서열
	EKENPKVDLESISYRIVNDLYVSPAVKRQIWQTLLVIKDIKQVMKHDPERIFIEMAREKQE SKKTKSRKQVLSEVYKKAKEYEHLFEKLNSLTEEQLRSKKIYLYFTQLGKCMYSGEPIDF ENLVSANSNYDIDHIYPQSKTIDDSFNNIVLVKKSLNAYKSNHYPIDKNIRDNEKVKTLW NTLVSKGLITKEKYERLIRSTPFSDEELAGFIARQLVETRQSTKAVAEILSNWFPESEIVYSK AKNVSNFRQDFEILKVRELNDCHHAHDAYLNIVVGNAYHTKFTNSPYRFIKNKANQEYN LRKLLQKVNKIESNGVVAWVGQSENNPGTIATVKKVIRRNTVLISRMVKEVDGQLFDLT LMKKGKGQVPIKSSDERLTDISKYGGYNKATGAYFTFVKSKKRGKVVRSFEYVPLHLSK QFENNNELLKEYIEKDRGLTDVEILIPKVLINSLFRYNGSLVRITGRGDTRLLLVHEQPLYV SNSFVQQLKSVSSYKLKKSENDNAKLTKTATEKLSNIDELYDGLLRKLDLPIYSYWFSSIK EYLVESRTKYIKLSIEEKALVIFEILHLFQSDAQVPNLKILGLSTKPSRIRIQKNLKDTDKMS IIHQSPSGIFEHEIELTSL (SEQ ID NO: 26)
AhCas9 *아나에로스티페스 하드루스* NCBI 참조 서열: WP_044924278.1 야생형	MQNGFLGITVSSEQVGWAVTNPKYELERASRKDLWGVRLFDKAETAEDRRMFRTNRRL NQRKKNRIHYLRDIFHEEVNQKDPNFFQQLDESNFCEDDRTVEFNFDTNLYKNQFPTVY HLRKYLMETKDKPDIRLVYLAFSKFMKNRGHFLYKGNLGEVMDFENSMKGFCESLEKF NIDFPTLSDEQVKEVRDILCDHKIAKTVKKKNIITITKVKSKTAKAWIGLFCGCSVPVKVL FQDIDEEIVTDPEKISFEDASYDDYIANIEKGVGIYYEAIVSAKMLFDWSILNEILGDHQLL SDAMIAEYNKHHDDLKRLQKIIKGTGSRELYQDIFINDVSGNYVCYVGHAKTMSSADQK QFYTFLKNRLKNVNGISSEDAEWIDTEIKNGTLLPKQTKRDNSVIPHQLQLREFELILDN MQEMYPFLKENREKLLKIFNFVIPYYVGPLKGVVRKGESTNWMVPKKDGVIHPWNFDE MVDKEASAECFISRMTGNCSYLFNEKVLPKNSLLYETFEVLNELNPLKINGEPISVELKQ RIYEQLFLTGKKVTKKSLTKYLIKNGYDKDIELSGIDNEFHSNLKSHIDFEDYDNLSDEEV EQIILRITVFEDKQLLKDYLNREFVKLSEDERKQICSLSYKGWGNLSEMLLNGITVTDSN GVEVSVMDMLWNTNLNLMQILSKKYGYKAEIEHYNKEHEKTIYNREDLMDYLNIPPAQ RRKVNQLITIVKSLKKTYGVPNKIFFKISREHQDDPKRTSSRKEQLKYLYKSLKSEDEKHL MKELDELNDHELSNDKVYLYFLQKGRCIYSGKKLNLSRLRKSNYQNDIDYIYPLSAVND RSMNNKVLTGIQENRADKYTYFPVDSEIQKKMKGFWMELVLQGFMTKEKYFRLSRENDD FSKSELVSFIEREISDNQQSGRMIASVLQYYFPESKIVFVKEKLISSFKRDFHLISSYGHNHL QAAKDAYITIVVGNVYHTKFTMDPAIYFKNHKRKDYDLNRLFLENISRDGQIAWESGPY GSIQTVRKEYAQNHIAVTKRVVEVKGGLFKQMPLKKGHGEYPLKTNDPRFGNIAQYGG YTNVTGSYFVLVESMEKGKKRISLEYVPVYLHERLEDDPGHKLLKEYLVDHRKLNHPKI LLAKVRKNSLLKIDGFYYRLNGRSGNALILTNAVELIMDDWQTKTANKISGYMKRRAID KKARVYQNEFHIQELEQLYDFYLDKLKNGVYKNRKNNQAELIHNEKEQFMELKTEDQC VLLTEIKKLFVCSPMQADLTLIGGSKHTGMIAMSSNVTKADFAVIAEDPLGLRNKVIYSH KGEK (SEQ ID NO: 27)
KvCas9 *칸들레리아 비튤리나* NCBI 참조 서열: WP_031589969.1 야생형	MSQNNNKIYNIGLDIGDASVGWAVVDEHYNLLKRHGKHMWGSRLFTQANTAVERRSSR STRRRYNKRRERIRLLREIMEDMVLDVDPTFFIRLANVSFLDQEDKKDYLKENYHSNYN LFIDKDFNDKTYYDKYPTIYHLRKHLCESKEKEDPRLIYLALHHIVKYRGNFLYEGQKFS MDVSNIEDKMIDVLRQFNEINLFEYVEDRKKIDEVLNVLKEPLSKKHKAEKAFALFDTT KDNKAAYKELCAALAGNKFNVTKMLKEAELHDEDEKDISFKFSDATFDDAFVEKQPLL GDCVEFIDLLHDIYSWVELQNILGSAHTSEPSISAAMIQRYEDHKNDLKLLKDVIRKYLP KKYFEVFRDEKSKKNNYCNYINHPSKTPVDEFYKYIKKLIEKIDDPDVKTILNKIELESFM LKQNSRTNGAVPYQMQLDELNKILENQSVYYSDLKDNEDKIRSILTFRIPYYFGPLNITKD RQFDWIIKKEGKENERILPWNANEIVDVDKTADEFIKRMRNFCTYFPDEPVMAKNSLTVS KYEVLNEINKLRINDHLIKRDMKDKMLHTLFMDHKSISANAMKKWLVKNQYFSNTDDI KIEGFQKENACSTSLTPWIDFTKIFGKINESNYDFIEKIIYDVTVFEDKKILRRRLKKEYDL DEEKIKKILKLKYSGWSRLSKKLLSGIKTKYKDSTRTPETVLEVMERTNMNLMQVINDE KLGFKKTIDDANSTSVSGKFSYAEVQELAGSPAIKRGIWQALLIVDEIKKIMKHEPAHVYI EFARNEDEKERKDSFVNQMLKLYKDYDFEDETEKEANKHLKGEDAKSKIRSERLKLYYT QMGKCMYTGKSLDIDRLDTYQVDHIVPQSLLKDDSIDNKVLVLSSENQRKLDDLVIPSSI RNKMYGFWEKLFNNKIISPKKFYSLIKTEFNEKDQERFINRQIVETRQITKHVAQIIDNHY ENTKVVTVRADLSHQFRERYHIYKNRDINDFHHAHDAYIATILGTYIGHRFESLDAKYIY GEYKRIFRNQKNKGKEMKKNNDGFILNSMRNIYADKDTGEIVWDPNYIDRIKKCFYYK DCFVTKKLEENNGTFFNVTVLPNDTNSDKDNTLATVPVNKYRSNVNKYGGFSGVNSFIV AIKGKKKKGKKVIEVNKLTGIPLMYKNADEEIKINYLKQAEDLEEVQIGKEILKNQLIEK DGGLYYIVAPTEIINAKQLILNESQTKLVCEIYKAMKYKNYDNLDSEKIIDLYRLLINKME LYYPEYRKQLVKKFEDRYEQLKVISIEEKCNIIKQILATLHCNSSIGKIMYSDFKISTTIGRL NGRTISLDDISFIAESPTGMYSKKYKL (SEQ ID NO: 28)
스타필로쿠	MRLFEEGHTAEDRRLKRTARRRISRRRNRLRYLQAFFEEAMTDLDENFFARLQESFLVPE

[0170]

설명	서열
스 아우레우스 Cas9	DKKWHRHPIFAKLEDEVAYHETYPTIYHLRKKLADSSEQADLRLIYLALAHIVKYRGHFL IEGKLSTENTSVKDQFQQFMVIYNQTFVNGESRLVSAPLPESVLIEEELTEKASRTKKSEK VLQQFPQEKANGLFGQFLKLMVGNKADFKKVFGLEEEAKITYASESYEEDLEGILAKVG DEYSDVFLAAKNVYDAVELSTILADSDKKSHAKLSSSMIVRFTEHQEDLKKFKRFIRENC PDEYDNLFKNEQKDGYAGYIAHAGKVSQLKFYQYVKKIIQDIAGAEYFLEKIAQENFLR KQRTFDNGVIPHQIHLAELQAIIHRQAAYYPFLKENQEKIEQLVTFRIPYYVGPLSKGDAS TFAWLKRQSEEPIRPWNLQETVDLDQSATAFIERMTNFDTYLPSEKVLPKHSLLYEKFMV FNELTKISYTDDRGIKANFSGKEKEKIFDYLFKTRRKVKKKDIIQFYRNEYNTEIVTLSGL EEDQFNASFSTYQDLLKCGLTRAELDHPDNAEKLEDIIKILTIFEDRQRIRTQLSTFKGQFS AEVLKKLERKHYTGWGRLSKKLINGIYDKESGKTILDYLVKDDGVSKHYNRNFMQLIN DSQLSFKNAIQKAQSSEHEETLSETVNELAGSPAIKKGIYQSLKIVDELVAIMGYAPKRIV VEMARENQTTSTGKRRSIQRLKIVEKAMAEIGSNLLKEQPTTNEQLRDTRLFLYYMQNG KDMYTGDELSLHRLSHYDIDHIIPQSFMKDDSLDNLVLVGSTENRGKSDDVPSKEVVKD MKAYWEKLYAAGLISQRKFQRLTKGEQGGLTLEDKAHFIQRQLVETRQITKNVAGILDQR YNAKSKEKKVQIITLKASLTSQFRSIFGLYKVREVNDYHHGQDAYLNCVVATTLLKVYPN LAPEFVYGEYPKFQTFKENKATAKAIIYTNLLRFFTEDEPRFTKDGEILWSNSYLKTIKKE LNYHQMNIVKKVEVQKGGFSKESIKPKGPSNKLIPVKNGLDPQKYGGFDSPVVAYTVLF THEKGKKPLIKQEILGITIMEKTRFEQNPILFLEEKGFLRPRVLMKLPKYTLYEFPEGRRRL LASAKEAQKGNQMVLPEHLLTLLYHAKQCLLPNQSESLAYVEQHQPEFQEILERVVDFA EVHTLAKSKVQQIVKLFEANQTADVKEIAASFIQLMQFNAMGAPSTFKFFQKDIERARYT SIKEIFDATIIYQSPTGLYETRRKVVD (SEQ ID NO: 29)
스타필로코쿠스 아우레우스 Cas9	KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRR HRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNV NEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEA KQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCT YFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQ IAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSS EDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKL VPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKD AQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLL NNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHI LNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNN LDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKK VMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELIND TLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIM EQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRN KVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQA EFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIAS KTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG (SEQ ID NO: 30)
게오바실루스 써모데니트리피칸스 Cas9	MKYKIGLDIGITSIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRLARSARRRLRR RKHRLERIRRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRVEALDRKLNNDELARILLHLA KRRGFRSNRKSERTNKENSTMLKHIEENQSILSSYRTVAEMVVKDPKFSLHKRNKEDNY TNTVARDDLEREIKLIFAKQREYGNIVCTEAFEHEYISIWASQRPFASKDDIEKKVGFCTFE PKEKRAPKATYTFQSFTVWEHINKLRLVSPGGIRALTDDERRLIYKQAFHKNKITFHDVR TLLNLPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAYHKIRKAIDSVYGKGAAKSFRPIDF DTFGYALTMFKDDTDIRSYLRNEYEQNGKRMENLADKVYDEELIEELLNLSFSKFGHLS LKALRNILPYMEQGEVYSTACERAGYTFTGPKKKQKTVLLPNIPPIANPVVMRALTQAR KVVNAIIKKYGSPVSIHIELARELSQSFDERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTLNP TGLDIVKFKLWSEQNGKCAYSLQPIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTK ENREKGNRTPAEYLGLGSERWQQFETFVLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEENEFKNRN LNDTRYISRFLANFIREHLKFADSDDKQKVYTVNGRITAHLRSRWNFNKNREESNLHHA VDAAIVACTTPSDIARVTAFYQRREQNKELSKKTDPQFPQPWPHFADELQARLSKNPKES IKALNLGNYDNEKLESLQPVFVSRMPKRSITGAAHQETLRRYIGIDERSGKIQTVVKKKL SEIQLDKTGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGELGPIIRTI KIIDTTNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPIYTIDMMKGILPNKAIEPNKP YSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIEFPREKTIKTAVGEEIKIKDLFAYYQTIDSSNGGLSL VSHDNNFSLRSIGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGVASSSHSKAGETIRPL (SEQ ID NO: 31)

[0171]

설명	서열
ScCas9 *에스. 카니스* 1375 AA 159.2 kDa	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESFLVEEDKKNERHPIFG NLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALAHIIKFRGHFLIEGKLNAENSD VAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSARLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNII ALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKDTYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILL SDILRSNSEVTKAPLSASMVKRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAG YVGIGIKHRKRTTKLATQEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH QIHLKELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTER MRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIIGVEDRFNASLGT YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKR RHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQV SGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGL QQSRERKKRIEEGIKELESQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKNDKPIRE VKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYG DYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKLANGEIRKRPLIETNGETGE VVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTR KYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKLKSVKELVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKD IKKELIFKLPKYSLFELENGRRRMLASATELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNN LGYIEQHREEFKEIFEKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTS FGASGGFTFLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD (SEQ ID NO: 32)

[0172]

[0173] 본원에 기재된 BE-VLP 및 융합 단백질에서 사용되는 napDNAbp는 임의의 적합한 상동체 및/또는 오르토로그 또는 천연 발생 효소, 예컨대 Cas9를 포함할 수 있다. Cas9 상동체 및/또는 오르토로그는 에스. 피오게네스 및 에스. 써모필루스를 비롯하여 이로 제한되지 않는 다양한 종에서 기재되었다. Cas 모이어티는 닉카제로서 구성될 수 있으며 (예를 들어, 돌연변이 유발되거나, 재조합적으로 조작되거나, 또는 천연으로부터 달리 수득될 수 있으며), 즉, 표적 이중-가닥 DNA의 단일 가닥만을 절단할 수 있다. 추가의 적합한 Cas9 뉴클레아제 및 서열은 본 개시내용을 기반으로 하여 관련 기술분야의 기술자에게 자명할 것이고, 이러한 Cas9 뉴클레아제 및 서열에는

[Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) *RNA Biology* 10:5, 726-737] (그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 유기체 및 로커스로부터의 Cas9 서열이 포함된다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 불활성 (예를 들어, 불활성화된) DNA 절단 도메인을 가지며; 즉, Cas9는 닉카제이다. 일부 실시양태에서, Cas9 단백질은 상기 표에서 Cas9 오르토로그 중 어느 하나에 의해 제공된 Cas9 단백질의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 VLP는 임의의 Cas9 등가물을 표적 세포에 전달하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Cas9 등가물"은 그의 아미노산 일차 서열 및/또는 그의 3차원 구조가 진화론적 관점에서 상이하고/거나 관련이 없을 수 있음에도 불구하고 Cas9와 동일한 기능을 하는 임의의 napDNAbp 단백질을 포함하는 광범위한 용어이다. 따라서, Cas9 등가물에 진화론적으로 관련이 있는 본원에 기재되거나 또는 포함되는 임의의 Cas9 오르토로그, 상동체, 돌연변이체, 또는 변이체가 포함되지만, Cas9 등가물은 Cas9와 동일한 또는 유사한 기능을 갖도록 수렴 진화 과정을 통해 진화되었을 수 있지만, 아미노산 서열 및/또는 3차원 구조와 관련하여 반드시 임의의 유사성을 갖지는 않는 단백질을 또한 포함한다. Cas9 등가물이 수렴 진화를 통해 발생하는 단백질을 기반으로 할 수 있음에도 불구하고, 본원에 기재된 VLP는 Cas9와 동일한 또는 유사한 기능을 제공하는 임의의 Cas9 등가물을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Cas9가 CRISPR-Cas 시스템의 유형 II 효소를 나타내는 경우, Cas9 등가물은 CRISPR-Cas 시스템의 유형 V 또는 유형 VI 효소를 나타낼 수 있다.

[0175] 예를 들어, Cas12e (CasX)는 보고에 따르면 Cas9와 동일한 기능을 갖지만, 수렴 진화를 통해 진화된 Cas9 등가물이다. 따라서, 본원에 기재된 VLP를 사용하여 전달되도록 [Liu *et al.*, "CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors," *Nature*, 2019, Vol.566: 218-223]에 기재된 Cas12e (CasX) 단백질이 고려된다. 또한, Cas12e (CasX)의 임의의 변이체 또는 변형이 고려될 수 있으며, 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0176] Cas9는 매우 다양한 종에서 진화된 박테리아 효소이다. 그러나, 본원에서 고려되는 Cas9 등가물은 또한 박테리아와 상이한 단일-세포 원핵생물 미생물의 도메인 및 킹덤을 구성하는 고세균으로부터 수득될 수 있다.

[0177] 일부 실시양태에서, Cas9 등가물은 Cas12e (CasX) 또는 Cas12d (CasY)를 지칭할 수 있으며, 이는 예를 들어 [Burstein *et al.*, "New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes." *Cell Res.* 2017 Feb 21. Doi: 10.1038/cr.2017.21]에 기재되었고, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 게놈-분석 메타게놈을 이용하여, 고세균 생물 도메인에서 최초로 보고된 Cas9를 비롯하여 수많은 CRISPR-Cas 시스템이 확인되었다. 이러한 분기하는 Cas9 단백질은 활성 CRISPR-Cas 시스템의 일부로서 거의 연구되지 않은 나노고세균에서 발견되었다. 박테리아에서, 이전에 공지되지 않은 2가지 시스템: CRISPR- Cas12e 및 CRISPR- Cas12d가 발견되었으며, 이는 지금까지 발견된 가장 컴팩트한 시스템이다. 일부 실시양태에서, Cas9는 Cas12e, 또는 Cas12e의 변이체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, Cas9는 Cas12d, 또는 Cas12d의 변이체를 지칭한다. 다른 RNA-가이드된 DNA 결합 단백질이 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp)로서 사용될 수 있으며, 본 개시내용의 범주 내에 있음을 이해해야 한다. [Liu *et al.*, "CasX enzymes comprises a distinct family of RNA-guided genome editors," *Nature*, 2019, Vol.566: 218-223] 또한 참조한다. 임의의 이들 Cas9 등가물은 본 개시내용에 의해 고려된다.

[0178] 일부 실시양태에서, Cas9 등가물은 천연 발생 Cas12e (CasX) 또는 Cas12d (CasY) 단백질과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 천연 발생 Cas12e (CasX) 또는 Cas12d (CasY) 단백질이다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 야생형 Cas 모이어티 또는 본원에 제공된 임의의 Cas 모이어티와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0179] 다양한 실시양태에서, 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질에는 비제한적으로 Cas9 (예를 들어, dCas9 및 nCas9), Cas12e (CasX), Cas12d (CasY), Cas12a (Cpf1), Cas12b1 (C2c1), Cas13a (C2c2), Cas12c (C2c3), 아르고노트, 및 Cas12b1이 포함된다. Cas9에 비해 상이한 PAM 특이성을 갖는 핵산 프로그래밍가능한 DNA-결합 단백질의 한 예는 프레보텔라(Prevotella) 및 프란시셀라(Francisella) 1로부터의 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (즉, Cas12a (Cpf1))이다. Cas9와 유사하게, Cas12a (Cpf1)는 또한 클래스 2 CRISPR 이펙터

이지만, 효소의 유형 II 하위 그룹이 아니라 유형 V 하위 그룹의 구성원이다. Cas12a (Cpf1)가 Cas9와 구별되는 특징으로 강건한 DNA 간섭을 매개하는 것으로 나타났다. Cas12a (Cpf1)는 tracrRNA가 결여된 단일 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제이며, 이는 T-풍부 프로토스페이서-인접 모티프 (TTN, TTTN, 또는 YTN)를 활용한다. 더욱이, Cpf1은 엇갈린 DNA 이중-가닥 파손을 통해 DNA를 절단한다. 16개의 Cpf1-패밀리 단백질 중에서, 아시다미노코쿠스(*Acidaminococcus*) 및 라크노스피라세아에(*Lachnospiraceae*)로부터의 2가지 효소가 인간 세포에서 효율적인 게놈-편집 활성을 갖는 것으로 나타났다. Cpf1 단백질은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 이전에 [Yamano *et al.*, "Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA." *Cell* (165) 2016, p. 949-962]에 기재되었으며; 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0180] 더욱 다른 실시양태에서, Cas 단백질에는 임의의 CRISPR 연관된 단백질, 예컨대 비제한적으로 Cas12a, Cas12b1, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (Csn1 및 Csx12로도 공지됨), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 이들의 상동체, 또는 이들의 변형된 버전이 포함될 수 있고, 바람직하게는 닉카제 돌연변이 (예를 들어, 서열식 별번호: 13의 야생형 Cas9 폴리펩티드의 D10A 돌연변이에 상응하는 돌연변이)를 포함한다.

[0181] 다양한 다른 실시양태에서, napDNAbp는 임의의 하기 단백질일 수 있다: Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12e (CasX), Cas12d (CasY), Cas12b1 (C2c1), Cas13a (C2c2), Cas12c (C2c3), GeoCas9, CjCas9, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas14, Csn2, xCas9, SpCas9-NG, 순환 치환된 Cas9, 또는 아르고노트 (Ago) 도메인, 또는 이들의 변이체.

[0182] 본원에 기재된 VLP는 또한 가이드 뉴클레오티드 서열-프로그래밍가능한 DNA-결합 단백질 도메인으로서 사용될 수 있는 Cas12a (Cpf1) (dCpf1) 변이체의 전달을 위해 사용될 수 있다. Cas12a (Cpf1) 단백질은 Cas9의 RuvC 도메인과 유사한 RuvC-유사 엔도뉴클레아제 도메인을 갖지만, HNH 엔도뉴클레아제 도메인은 갖지 않으며, Cas12a (Cpf1)의 N-말단은 Cas9의 알파-나선 인식 로브를 갖지 않는다. Cas12a (Cpf1)의 RuvC-유사 도메인이 DNA 가닥 둘 다의 절단을 담당하고, RuvC-유사 도메인의 불활성화가 Cas12a (Cpf1) 뉴클레아제 활성을 불활성화시킨다는 것이 [Zetsche *et al.*, *Cell*, 163, 759-771, 2015] (이는 본원에 참조로 포함됨)에 나타나 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, napDNAbp는 미생물 CRISPR-Cas 시스템의 단일 이펙터이다. 미생물 CRISPR-Cas 시스템의 단일 이펙터에는 비제한적으로 Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12b1 (C2c1), Cas13a (C2c2), 및 Cas12c (C2c3)가 포함된다. 전형적으로, 미생물 CRISPR-Cas 시스템은 클래스 1 및 클래스 2 시스템으로 나뉘어 진다. 클래스 1 시스템은 다중-서브유닛 이펙터 복합체를 갖는 반면에, 클래스 2 시스템은 단일 단백질 이펙터를 갖는다. 예를 들어, Cas9 및 Cas12a (Cpf1)는 클래스 2 이펙터이다. Cas9 및 Cas12a (Cpf1) 외에도, 3가지 별개의 클래스 2 CRISPR-Cas 시스템 (Cas12b1, Cas13a, 및 Cas12c)이 [Shmakov *et al.*, "Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR Cas Systems", *Mol. Cell*, 2015 Nov 5; 60(3): 385-397]에 기재되어 있으며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0184] 2가지 시스템, Cas12b1 및 Cas12c의 이펙터는 Cas12a와 관련된 RuvC-유사 엔도뉴클레아제 도메인을 함유한다. 제3 시스템, Cas13a는 2개의 예측된 HEPN Rnase 도메인을 갖는 이펙터를 함유한다. Cas12b1에 의한 CRISPR RNA의 생성과는 달리 성숙 CRISPR RNA의 생성은 tracrRNA-독립적이다. Cas12b1은 DNA 절단을 위해 CRISPR RNA 및 tracrRNA 둘 다에 의존한다. 박테리아 Cas13a는 그의 RNA-활성화된 단일-가닥 RNA 분해 활성과는 별개로 CRISPR RNA 성숙을 위한 고유의 Rnase 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이들 Rnase 기능은 서로 상이하고, Cas12a의 CRISPR RNA-프로세싱 거동과도 상이하다. 예를 들어, [East-Seletsky, *et al.*, "Two distinct Rnase activities of CRISPR-Cas13a enable guide-RNA processing and RNA detection", *Nature,* 2016 Oct 13;538(7624):270-273]을 참조하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 렙토트리키아 샤히이(*Leptotrichia shahii*)에서 Cas13a의 시험관내 생화학적 분석을 통해, Cas13a가 단일 CRISPR RNA에 의해 가이드되고, 상보성 프로토스페이서를 운반하는 ssRNA 표적을 절단하도록 프로그래밍될 수 있는 것으로 나타났다. 2개의 보존된 HEPN 도메인에서 촉매적 잔기는 절단을 매개한다. 촉매적 잔기에서의 돌연변이는 촉매적으로 불활성인 RNA-결합 단백질을 생성한다. 예를 들어, [Abudayyeh *et al.*, "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector", *Science,* 2016 Aug 5; 353(6299)]을 참조하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0185] 알리시클로바실루스 아시도테라스트리스(*Alicyclobaccillus acidoterrastris*) Cas12b1 (AacC2c1)의 결정 구조는 키메라 단일-분자 가이드 RNA (sgRNA)와의 복합체에서 보고되었다. 예를 들어, [Liu *et al.*, "C2c1-sgRNA

Complex Structure Reveals RNA-Guided DNA Cleavage Mechanism", *Mol. Cell,* 2017 Jan 19;65(2):310-322]를 참조하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 결정 구조는 삼원 복합체로서 표적 DNA에 결합된 알리시클로바실루스 아시도테라스트리스 C2c1에서 또한 보고되었다. 예를 들어, [Yang *et al.*, "PAM-dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease", *Cell,* 2016 Dec 15;167(7):1814-1828]을 참조하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 표적 및 비-표적 DNA 가닥 둘 다를 갖는 AacC2c1의 촉매 능력이 있는 형태는 단일 RuvC 촉매적 포켓 내에 독립적으로 위치하게 포획되었고, C2c1-매개된 절단은 표적 DNA의 엇갈린 7개 뉴클레오티드 파손을 생성한다. C2c1 삼원 복합체 및 이전에 확인된 Cas9 및 Cpf1 대응물의 구조적 비교는 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 사용되는 메카니즘의 다양성을 입증한다.

[0186] 일부 실시양태에서, napDNAbp는 C2c1, C2c2 또는 C2c3 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 C2c1 단백질이다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 Cas13a 단백질이다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 Cas12c 단백질이다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 천연 발생 Cas12b1 (C2c1), Cas13a (C2c2) 또는 Cas12c (C2c3) 단백질과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 천연 발생 Cas12b1 (C2c1), Cas13a (C2c2), 또는 Cas12c (C2c3) 단백질이다.

[0187] **다른 프로그래밍가능한 뉴클레아제**

[0188] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 VLP는 napDNAbp, 예컨대 Cas9 단백질을 단독으로 또는 융합 단백질 (예를 들어, 염기 편집기)의 일부로서 전달하기 위해 사용된다. 이들 단백질은 gRNA의 스페이서 부분에 상보성인 서열을 갖고 필요한 PAM 서열을 또한 갖는 DNA 상의 표적 부위로 Cas9 단백질을 가이드하는 가이드 RNA와 복합체를 형성함으로써 "프로그래밍가능"하다. 그러나, 본원에서 구상된 특정 실시양태에서, napDNAbp는 본원에 기재된 VLP를 사용하여 표적 세포에 전달될 수 있는 상이한 유형의 프로그래밍가능한 단백질, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)로 치환될 수 있다.

[0189] 따라서, 본원에 기재된 VLP를 이용하여 전달하는데 적합한 뉴클레아제가 반드시 핵산 표적화 분자 (예컨대 가이드 RNA)에 의해 "프로그래밍"될 필요는 없으며, 오히려 DNA-결합 도메인, 예컨대 특히 뉴클레아제의 특이성을 정의함으로써 프로그래밍될 수 있는 것으로 고려된다. napDNAbp 모이어티와 마찬가지로, 표적 DNA의 한 가닥만이 절단되도록 이러한 대안적인 프로그래밍가능한 뉴클레아제가 변형되는 것이 바람직할 수 있다. 달리 말하면, 프로그래밍가능한 뉴클레아제는 닉카제로서 기능할 수 있다.

[0190] 적합한 대안적인 프로그래밍가능한 뉴클레아제는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. TALENS는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소이다. 이들 시약은 효율적이고 프로그래밍가능하며 특이적인 DNA 절단을 가능하게 하고, 현장에서 게놈 편집을 위한 강력한 도구를 나타낸다. 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE)는 실제로 임의의 DNA 서열에 결합하도록 신속하게 조작될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 TALEN은 광범위하며, 또 다른 TALEN의 도움없이 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있는 단량체 TALEN을 포함한다. 용어 TALEN은 또한 동일한 부위에서 DNA를 절단하기 위해 함께 작동하도록 조작된 TALEN 쌍의 구성원 중 하나 또는 둘 다를 지칭하기 위해 사용된다. 함께 작동하는 TALEN은 DNA의 방향성을 참조하여 좌측-TALEN 및 우측-TALEN으로 지칭될 수 있다. 미국 일련 번호 12/965,590; 미국 일련 번호 13/426,991 (미국 특허 번호 8,450,471); 미국 일련 번호 13/427,040 (미국 특허 번호 8,440,431); 미국 일련 번호 13/427,137 (미국 특허 번호 8,440,432); 및 미국 일련 번호 13/738,381을 참조하며, 이들 모두는 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 또한, TALENS는 WO 2015/027134, U.S. 9,181,535, [Boch *et al.*, "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors", *Science*, vol. 326, pp. 1509-1512 (2009), Bogdanove *et al.*, TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting, *Science*, vol. 333, pp. 1843-1846 (2011), Cade *et al.*, "Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs", *Nucleic Acids Research*, vol. 40, pp. 8001-8010 (2012), 및 Cermak et al., "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting", *Nucleic Acids Research*, vol. 39, No. 17, e82 (2011)]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0191] 아연 핑거 뉴클레아제는 대안적인 프로그래밍가능한 뉴클레아제로도 사용될 수 있으며, 본원에 기재된 VLP를 이용하여 전달될 수 있다. TALENS와 마찬가지로, ZFN 단백질은 닉카제로서 기능하도록 변형될 수 있고, 즉, 표적 DNA의 한 가닥만을 절단하도록 ZFN을 조작할 수 있다. ZFN 단백질은 관련 기술분야에서, 예를 들어 [Carroll *et al.*, "Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases," *Genetics*, Aug 2011, Vol. 188: 773-782; Durai

et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells," *Nucleic Acids Res*, 2005, Vol. 33: 5978-90; 및 Gaj *et al.*, "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering," *Trends Biotechnol*. 2013, Vol.31: 397-405]에 광범위하게 기재되어 있으며, 이들 각각은 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0192] **데아미나제 도메인**

[0193] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP 및 융합 단백질은 (예를 들어, 염기 편집기가 VLP에 캡슐화되고 전달될 때) 데아미나제 도메인을 추가로 포함한다. 데아미나제 도메인은 시토신 데아미나제 도메인 또는 아데노신 데아미나제 도메인일 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, C를 T로 전환시키는 염기 편집기는 시토신 데아미나제를 포함한다. "시토신 데아미나제"는 화학 반응 "시토신 + H_2O → 우라실 + NH_3" 또는 "5-메틸-시토신 + H_2O → 티민 + NH_3"을 촉매하는 효소를 지칭한다. 반응식으로부터 명백할 수 있듯이, 이러한 화학 반응은 C에서 U/T로의 핵염기 변화를 일으킨다. 유전자의 맥락에서, 이러한 뉴클레오티드 변화 또는 돌연변이는 단백질에서 아미노산 변화를 일으킬 수 있고, 이는 단백질 기능, 예를 들어 기능 상실 또는 기능 획득에 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, C에서 T로의 염기 편집기는 시토신 데아미나제에 융합된 dCas9 또는 nCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시토신 데아미나제 도메인은 dCas9 또는 nCas9의 N-말단에 융합된다.

[0195] 적합한 시토신 데아미나제 도메인의 비제한적인 예가 서열식별번호: 33-56으로서 하기에 제공된다.

인간 AID

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTAR
LYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHEN
SVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL (SEQ ID NO: 33)

마우스 AID

MDSLLMKQKKFLYHFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSATSCSLDFGHLRNKSGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVAEFLRWNPNLSLRIFTAR
LYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGVQIGIMTFKDYFYCWNTFVENRERTFKAWEGLHEN
SVRLTRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRMLGF (SEQ ID NO: 34)

개 AID

MDSLLMKQRKFLYHFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGHLRNKSGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGYPNLSLRIFAAR
LYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENREKTFKAWEGLHEN
SVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL (SEQ ID NO: 35)

소 AID

MDSLLKKQRQFLYQFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSPTSFSLDFGHLRNKAGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGYPNLSLRIFTAR
LYFCDKERKAEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHE
NSVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL (SEQ ID NO: 36)

마우스 APOBEC-3

MGPFCLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLGYAKGRKDTFLCYEVTRKDCDSPV
SLHHGVFKNKDNIHAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFECAEQIVR
FLATHHNLSLDIFSSRLYNVQDPETQQNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKKCWKKFVD
NGGRRFRPWKRLLTNFRYQDSKLQEILRPCYIPVPSSSSSTLSNICLTKGLPETRFCVE
GRRMDPLSEEEFYSQFYNQRVKHLCYYHRMKPYLCYQLEQFNGQAPLKGCLLSEKG
KQHAEILFLDKIRSMELSQVTITCYLTWSPCPNCAWQLAAFKRDRPDLILHIYTSRLY
FHWKRPFQKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFVNPKRPFWPWKGLEIISRRT
QRRLRRIKESWGLQDLVNDFGNLQLGPPMS (SEQ ID NO: 37)

래트 APOBEC-3

MGPFCLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLRYAIDRKDTFLCYEVTRKDCDSPVS
LHHGVFKNKDNIHAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFECAEQVLRF
LATHHNLSLDIFSSRLYNIRDPENQQNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKKCWKKFVDN
GGRRFRPWKKLLTNFRYQDSKLQEILRPCYIPVPSSSSSTLSNICLTKGLPETRFCVER
RRVHLLSEEEFYSQFYNQRVKHLCYYHGVKPYLCYQLEQFNGQAPLKGCLLSEKGK
QHAEILFLDKIRSMELSQVIITCYLTWSPCPNCAWQLAAFKRDRPDLILHIYTSRLYFH
WKRPFQKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFVNPKRPFWPWKGLEIISRRTQR
RLHRIKESWGLQDLVNDFGNLQLGPPMS (SEQ ID NO: 38)

[0196] 레서스 마카크 APOBEC-3G

MVEPMDPRTFVSNFNNRPILSGLNTVWLCCEVKTKDPSGPPLDAKIFQGKVYSKAKY
HPEMRFLRWFHKWRQLHHDQEYKVTWYVSWSPCTRCANSVATFLAKDPKVTLTIF
VARLYYFWKPDYQQALRILCQKRGGPHATMKIMNYNEFQDCWNKFVDGRGKPFKP
RNNLPKHYTLLQATLGELLRHLMDPGTFTSNFNNKPWVSGQHETYLCYKVERLHND
TWVPLNQHRGFLRNQAPNIHGFPKGRHAELCFLDLIPFWKLDGQQYRVTCFTSWSPC
FSCAQEMAKFISNNEHVSLCIFAARIYDDQGRYQEGLRALHRDGAKIAMMNYSEFEY
CWDTFVDRQGRPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAI (SEQ ID NO: 39)

침팬지 APOBEC-3G

MKPHFRNPVERMYQDTFSDNFYNRPILSHRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQ
VYSKLKYHPEMRFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKCTRDVATFLAEDP
KVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYS
QRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTSNFNNELWVRGRHETYLCYEV
ERLHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLHQDYRVT
CFTSWSPCFSCAQEMAKFISNNKHVSLCIFAARIYDDQGRCQEGLRTLAKAGAKISIM
TYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO:
40)

녹색 원숭이 APOBEC-3G

MNPQIRNMVEQMEPDIFVYYFNNRPILSGRNTVWLCYEVKTKDPSGPPLDANIFQGK
LYPEAKDHPEMKFLHWFRKWRQLHRDQEYEVTWYVSWSPCTRCANSVATFLAEDP
KVTLTIFVARLYYFWKPDYQQALRILCQERGGPHATMKIMNYNEFQHCWNEFVDG
QGKPFKPRKNLPKHYTLLHATLGELLRHVMDPGTFTSNFNNKPWVSGQRETYLCYK
VERSHNDTWVLLNQHRGFLRNQAPDRHGFPKGRHAELCFLDLIPFWKLDDQQYRVT
CFTSWSPCFSCAQKMAKFISNNKHVSLCIFAARIYDDQGRCQEGLRTLHRDGAKIAV
MNYSEFEYCWDTFVDRQGRPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAI (SEQ ID NO: 41)

인간 APOBEC-3G

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQ
VYSELKYHPEMRFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKCTRDMATFLAEDP
KVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYS
QRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEV
ERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRV
TCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISI
MTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN (SEQ ID NO:
42)

인간 APOBEC-3F

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPRLDAKIFRGQ
VYSQPEHHAEMCFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDCVAKLAEFLAEHPNV
TLTISAARLYYYWERDYRRALCRLSQAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPFMP
WYKFDDNYAFLHRTLKEILRNPMEAMYPHIFYFHFKNLRKAYGRNESWLCFTMEV
VKHHSPVSWKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTSWSPC
PECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGLRSLSQEGASVEIMGYKDFK
YCWENFVYNDDEPFKPWKGLKYNFLFLDSKLQEILE (SEQ ID NO: 43)

[0197] 인간 APOBEC-3B

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFR
GQVYFKPQYHAEMCFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDCVAKLAEFLSEHP
NVTLTISAARLYYYWERDYRRALCRLSQAGARVTIMDYEEFAYCWENFVYNEGQQ
FMPWYKFDENYAFLHRTLKEILRYLMDPDTFTFNFNNDPLVLRRRQTYLCYEVERL
DNGTWVLMDQHMGFLCNEAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFI
SWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSI
MTYDEFEYCWDTFVYRQGCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO:
44)

인간 APOBEC-3C

MNPQIRNPMKAMYPGTFYFQFKNLWEANDRNETWLCFTVEGIKRRSVVSWKTGVF
RNQVDSETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTKYQVTWYTSWSPCPDCAGEVAEFLARH
SNVNLTIFTARLYYFQYPCYQEGLRSLSQEGVAVEIMDYEDFKYCWENFVYNDNEPF
KPWKGLKTNFRLLKRRLRESLQ (SEQ ID NO: 45)

인간 APOBEC-3A

MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLH
NQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAF
LQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQ
GCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO: 46)

인간 APOBEC-3H

MALLTAETFRLQFNNKRRLRRPYYPRKALLCYQLTPQNGSTPTRGYFENKKKCHAEI
CFINEIKSMGLDETQCYQVTCYLTWSPCSSCAWELVDFIKAHDHLNLGIFASRLYYH
WCKPQQKGLRLLCGSQVPVEVMGFPKFADCWENFVDHEKPLSFNPYKMLEELDKN
SRAIKRRLERIKIPGVRAQGRYMDILCDAEV (SEQ ID NO: 47)

인간 APOBEC-3D

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFR
GPVLPKRQSNHRQEVYFRFENHAEMCFLSWFCGNRLPANRRFQITWFVSWNPCLPC
VVKVTKFLAEHPNVTLTISAARLYYYRDRDWRWVLLRLHKAGARVKIMDYEDFAY
CWENFVCNEGQPFMPWYKFDDNYASLHRTLKEILRNPMEAMYPHIFYFHFKNLLKA
CGRNESWLCFTMEVTKHHSAVFRKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPN
TNYEVTWYTSWSPCPECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLCYFWDTDYQEGLCSLS
QEGASVKIMGYKDFVSCWKNFVYSDDEPFKPWKGLQTNFRLLKRRLREILQ (SEQ
ID NO: 48)

인간 APOBEC-1

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKN
TTNHVEVNFIKKFTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECSQAIREFLSRHPGVTLVIYV
ARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWPQY
PPLWMMLYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLI
HPSVAWR (SEQ ID NO: 49)

마우스 APOBEC-1

[0198] MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSVWRHTSQN

TSNHVEVNFLEKFTTERYFRPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRHPYVTLFIYIA
RLYHHTDQRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQEYCYCWRNFVNYPPSNEAYWPRYPHL
WVKLYVLELYCIILGLPPCLKILRRKQPQLTFFTITLQTCHYQRIPPHLLWATGLK
(SEQ ID NO: 50)

래트 APOBEC-1

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLK (SEQ
ID NO: 51)

페트로미존 마리누스 CDA1 (pmCDA1)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG
NGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTKSPAV (SEQ ID NO: 52)

진화된 pmCDA1 (evoCDA1)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFSNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG
NGHTLKIWVCKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMFQVKILHTTKSPAV (SEQ ID NO: 53)

인간 APOBEC3G D316R_D317R

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQ
VYSELKYHPEMRFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKCTRDMATFLAEDP
KVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYS
QRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEV
ERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRV
TCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAGAKISI
MTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN (SEQ ID NO:
54)

인간 APOBEC3G 쵀 A

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQ (SEQ ID NO: 55)

인간 APOBEC3G 쵀 A D120R_D121R

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQ (SEQ ID NO: 56)

[0199]

[0200] 일부 실시양태에서, 염기 편집기는 A를 G로 전환시킨다. 일부 실시양태에서, 염기 편집기는 아데노신 데아미나제를 포함한다. "아데노신 데아미나제"는 퓨린 대사에 관여하는 효소이다. 이는 음식물로부터 아데노신의 분해를 위해 및 조직에서 핵산의 전환을 위해 필요하다. 인간에서 그의 주요 기능은 면역계의 발달 및 유지이다. 아데노신 데아미나제는 DNA의 맥락에서 아데노신의 가수분해성 탈아미노화를 촉매한다 (이노신을 형성하여, G로서 염기 쌍을 형성함). DNA에 대해 작용하는 공지된 아데노신 데아미나제는 없다. 대신에, 공지된 아데노신 데아미나제 효소는 RNA (tRNA 또는 mRNA)에 대해서만 작용한다. DNA 기질을 수용하고, dA를 데옥시이노신으로 탈아미노화시키며, 본원에서 아데노신 핵염기 편집기에서 사용되는 진화된 데옥시아데노신 데아미나제 효소는 예를 들어 2017년 8월 3일에 출원된 PCT 출원 PCT/US2017/045381 (WO 2018/027078로 공개됨), PCT 출원 번호 PCT/US2019/033848 (WO 2019/226953으로 공개됨), 2019년 5월 23일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2019/033848, 및 2020년 4월 17일에 출원된 PCT 출원 번호 PCT/US2020/028568에 기재되어 있으며; 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 기질로서 DNA를 수용하는 진화된 아데노신 데아미나제의 비제한적인 예는 하기에 제공된다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 임의의 하기 아미노산 서열, 또는 임의의 하기 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.9% 동일한 아미노산 서열을 포함한다:

ecTadA

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 57)

ecTadA (D108N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 58)

ecTadA (D108G)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 59)

ecTadA (D108V)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 60)

ecTadA (H8Y, D108N, N127S)

SEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 61)

ecTadA (H8Y, D108N, N127S, E155D)

SEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQDIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 62)

ecTadA (H8Y, D108N, N127S, E155G)

SEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQGIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 63)

[0201] ecTadA (H8Y, D108N, N127S, E155V)

SEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQVIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 64)

ecTadA (A106V, D108N, D147Y, 및 E155V)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 65)

ecTadA (S2A, I49F, A106V, D108N, D147Y, E155V)

AEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPFGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 66)

ecTadA (H8Y, A106T, D108N, N127S, K160S)

SEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGTRNAKTG
AAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQSKAQSSTD
(SEQ ID NO: 67)

ecTadA (R26G, L84F, A106V, R107H, D108N, H123Y, A142N, A143D, D147Y, E155V,
I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVHNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNDLLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 68)

ecTadA (E25G, R26G, L84F, A106V, R107H, D108N, H123Y, A142N, A143D, D147Y,
E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDGGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVHNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNDLLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 69)

ecTadA (E25D, R26G, L84F, A106V, R107K, D108N, H123Y, A142N, A143G, D147Y,
E155V, I156F

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDDGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVKNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNGLLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 70)

[0202] ecTadA (R26Q, L84F, A106V, D108N, H123Y, A142N, D147Y, E155V, I156F

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEQEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 71)

ecTadA (E25M, R26G, L84F, A106V, R107P, D108N, H123Y, A142N, A143D, D147Y, E155V, I156F

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDMGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVPNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNDLLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 72)

ecTadA (R26C, L84F, A106V, R107H, D108N, H123Y, A142N , D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDECEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVHNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 73)

ecTadA (L84F, A106V , D108N, H123Y, A142N, A143L, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNLLLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 74)

ecTadA (R26G, L84F, A106V, D108N, H123Y, A142N , D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 75)

ecTadA (R51H, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F, K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGHHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 76)

ecTadA (E25A, R26G, L84F, A106V, R107N, D108N, H123Y, A142N, A143E, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDAGEVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVNNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECNELLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 77)

ecTadA (N37T, P48T, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F)

[0203] SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHTNRVIGEGWNRTIGRHDPTA

HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 78)

ecTadA (N37S, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHSNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 79)

ecTadA (H36L, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 80)

ecTadA (H36L, P48L, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRLIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 81)

ecTadA (H36L, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, K57N, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 82)

ecTadA (H36L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 83)

ecTadA (L84F, A106V, D108N, H123Y, S146R, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLRYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 84)

ecTadA (N37S, R51H, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHSNRVIGEGWNRPIGHHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 85)

[0204]

ecTadA (R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F, K157N

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 86)

saTadA (D108N)

GSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLGEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAHAE
HIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGADNPKGGCSGS
LMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACSTLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO: 87)

saTadA (D107A_D108N)

GSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLGEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAHAE
HIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGAANPKGGCSGS
LMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACSTLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO: 88)

saTadA (G26P_D107A_D108N)

GSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLPEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAHAE
HIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGAANPKGGCSGS
LMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACSTLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO: 89)

saTadA (G26P_D107A_D108N_S142A)

GSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLPEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAHAE
HIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGAANPKGGCSGS
LMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACATLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO: 90)

saTadA (D107A_D108N_S142A)

GSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLGEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAHAE
HIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGAANPKGGCSGS
LMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACATLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO: 91)

ecTadA (P48S)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRSIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 92)

ecTadA (P48T)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRTIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 93)

ecTadA (P48A)

[0205] SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRAIGRHDPTA

HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 94)

ecTadA (A142N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECNALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 95)

ecTadA (W23R)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 96)

ecTadA (W23L)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 97)

ecTadA (R152P)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMPRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 98)

ecTadA (R152H)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTG
AAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMHRQEIKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 99)

ecTadA (L84F, A106V, D108N, H123Y, D147Y, E155V, I156F)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 100)

ecTadA (H36L, R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, E155V, I156F,

K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
[0206] AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD

(SEQ ID NO: 101)

ecTadA (H36L, P48S, R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, E155V, I156F, K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRSIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 102)

ecTadA (H36L, P48A, R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, E155V, I156F, K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 103)

ecTadA (W23L, H36L, P48A, R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, R152P, E155V, I156F, K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 104)

ecTadA (W23R, H36L, P48A, R51L, L84F, A106V, D108N, H123Y, S146C, D147Y, R152P, E155V, I156F, K157N)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 113)

스타필로코쿠스 아우레우스 TadA:

MGSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLGEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLQQPTAH
AEHIAIERAAKVLGSWRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGADDPKGGCS
GSLMNLLQQSNFNHRAIVDKGVLKEACSTLLTTFFKNLRANKKSTN (SEQ ID NO:
105)

바실루스 서브틸리스 TadA:

MTQDELYMKEAIKEAKKAEEKGEVPIGAVLVINGEIIARAHNLRETEQRSIAHAEML
VIDEACKALGTWRLEGATLYVTLEPCPMCAGAVVLSRVEKVVFGAFDPKGGCSGTL
MNLLQEERFNHQAEVVSGVLEEECGGMLSAFFRELRKKKKAARKNLSE (SEQ ID
NO: 106)

[0207] *살모넬라 티피무리움* (*에스. 티피무리움*) TadA:

MPPAFITGVTSLSDVELDHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNHRVIGEG
WNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVLQNYRLLDTTLYVTLEPCVMCAGAMVHSRIG
RVVFGARDAKTGAAGSLIDVLHHPGMNHRVEIIEGVLRDECATLLSDFFRMRRQEIK
ALKKADRAEGAGPAV (SEQ ID NO: 107)

슈와넬라 푸트레파시엔스 (*에스. 푸트레파시엔스*) TadA:

MDEYWMQVAMQMAEKAEAAGEVPVGAVLVKDGQQIATGYNLSISQHDPTAHAEI
LCLRSAGKKLENYRLLDATLYITLEPCAMCAGAMVHSRIARVVYGARDEKTGAAGT
VVNLLQHPAFNHQVEVTSGVLAEACSAQLSRFFKRRRDEKKALKLAQRAQQGIE
(SEQ ID NO: 108)

헤모필루스 인플루엔자에 F3031 (*에이치. 인플루엔자에*) TadA:

MDAAKVRSEFDEKMMRYALELADKAEALGEIPVGAVLVDDARNIIGEGWNLSIVQS
DPTAHAEIIALRNGAKNIQNYRLLNSTLYVTLEPCTMCAGAILHSRIKRLVFGASDYK
TGAIGSRFHFFDDYKMNHTLEITSGVLAEECSQKLSTFFQKRREEKKIEKALLKSLSD
K (SEQ ID NO: 109)

카울로박터 크레센투스 (*씨. 크레센투스*) TadA:

MRTDESEDQDHRMMRLALDAARAAAEAGETPVGAVILDPSTGEVIATAGNGPIAAH
DPTAHAEIAAMRAAAAKLGNYRLTDLTLVVTLEPCAMCAGAISHARIGRVVFGADD
PKGGAVVHGPKFFAQPTCHWRPEVTGGVLADESADLLRGFFRARRKAKI (SEQ ID
NO: 110)

게오박터 술푸레두센 (*지. 술푸레두센스*) TadA:

MSSLKKTPIRDDAYWMGKAIREAAKAAARDEVPIGAVIVRDGAVIGRGHNLREGSN
DPSAHAEMIAIRQAARRSANWRLTGATLYVTLEPCLMCMGAIILARLERVVFGCYDP
KGGAAGSLYDLSADPRLNHQVRLSPGVCQEECGTMLSDFFRDLRRRKKAKATPALF
IDERKVPPEP (SEQ ID NO: 111)

스트렙토코쿠스 피오게네스 (*에스. 피오게네스*) TadA

MPYSLEEQTYFMQEALKEAEKSLQKAEIPIGCVIVKDGEIIGRGHNAREESNQAIMHA
EIMAINEANAHEGNWRLLDTTLFVTIEPCVMCSGAIGLARIPHVIYGASNQKFGGADS
LYQILTDERLNHRVQVERGLLAADCANIMQTFFRQGRERKKIAKHLIKEQSDPFD
(SEQ ID NO: 112)

TadA 7.10:

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD
(SEQ ID NO: 113)

TadA 7.10 (V106W) (*이. 콜라이*)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGWRNAKT
GAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD

[0208]

(SEQ ID NO: 114)

TadA-8e (*이. 콜라이*)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRG
AAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN
(SEQ ID NO: 115)

TadA-8e(V106W) (*이. 콜라이*)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGWRNSKR
GAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN
(SEQ ID NO: 116)

[0209]

[0210] **염기 편집기**

[0211] 일부 측면에서, 본 개시내용은 염기 편집기를 전달하기 위한 eVLP 및 융합 단백질을 제공한다. 염기 편집기는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재된 BE-VLP는 이미 공지되었거나 또는 추후에 개발될 임의의 염기 편집기를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 전달을 위해 고려되는 염기 편집기는 본원에 제공된 염기 편집기 서열 중 어느 하나와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0212] 일부 측면에서, 본 개시내용의 BE-VLP는 napDNAbp 도메인, 및 C:G 핵염기 쌍의 시토신 핵염기를 우라실로 효소

적으로 탈아미노화시키는 시토신 데아미나제 도메인을 포함하는 시티딘 염기 편집기 (CBE)를 포함한다. 우라실은 후속적으로 세포의 DNA 복구 및 복제 기구에 의해 티민 (T)으로 전환될 수 있다. 반대쪽 가닥 상의 미스매칭된 구아닌 (G)은 후속적으로 세포의 DNA 복구 및 복제 기구에 의해 아데닌 (A)으로 전환될 수 있다. 이러한 방식으로, 표적 C:G 핵염기 쌍은 궁극적으로 T:A 핵염기 쌍으로 전환된다.

[0213] 일부 측면에서, 본 개시내용의 BE-VLP는 시티딘 염기 편집기의 사용을 포함한다. 예시적인 시티딘 염기 편집기에는 BE3, BE3.9max, BE4max, BE4-SaKKH, BE3.9-NG, BE3.9-NRRH, 또는 BE4max-VRQR이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 다른 시티딘 염기 편집기는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 시티딘 염기 편집기가 본 개시내용의 BE-VLP를 이용하여 전달될 수 있음을 인식할 것이다.

[0214] 본원에 기재된 BE-VLP에서 CBE는 하나 이상의 핵 국소화 신호 (NLS) 및/또는 하나 이상의 우라실 글리코실라제 억제제 (UGI) 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 염기 편집기는 하기 구조를 포함할 수 있다: NH_2-[제1 핵 국소화 서열]-[시토신 데아미나제 도메인]-[napDNAbp 도메인]-[제1 UGI 도메인]-[제2 UGI 도메인]-[제2 핵 국소화 서열]-COOH, 여기서 "]-["의 각각의 예는 임의적인 링커 서열의 존재를 나타냄. 예시적인 CBE는 NH_2-[NLS]-[시토신 데아미나제]-[Cas9 닉카제]-[UGI 도메인]-[UGI 도메인]-[NLS]-COOH 구조를 갖는 "BE4max" 아키텍처를 포함하는 구조를 가질 수 있고, 최적화된 핵 국소화 신호를 가지며, napDNAbp 도메인은 Cas9 닉카제를 포함한다. 이 BE4max 구조는 [Koblan *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):843-846] (본원에 참조로 포함됨)에서 보고된 바와 같이 인간 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈 용법을 갖는 것으로 보고되었다.

[0215] 다른 실시양태에서, CBE는 Cas9 닉카제 이외의 Cas9 변이체, 예컨대 SpCas9-NG, xCas9, 또는 원형 과돌연변이체 CP1028을 포함하는 napDNAbp 도메인을 함유하는 변형된 BE4max 아키텍처를 포함하는 구조를 가질 수 있다. 따라서, 예시적인 CBE는 하기 구조를 포함할 수 있다: NH_2-[NLS]-[시토신 데아미나제]-[xCas9]-[UGI 도메인]-[UGI 도메인]-[NLS]-COOH; 또는 NH_2-[NLS]-[시토신 데아미나제]-[SpCas9-NG]-[UGI 도메인]-[UGI 도메인]-[NLS]-COOH, 여기서 "]-["의 각각의 예는 임의적인 링커 서열의 존재를 나타냄.

[0216] 본원에 개시된 BE-VLP에서 CBE는 변형된 (또는 진화된) 시토신 데아미나제 도메인, 예컨대 확장된 PAM 서열을 인식하고, 5'-GC 표적의 탈아미노화 효율을 개선시켰고/거나, 더 좁은 표적 윈도우에서 편집하는 데아미나제 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 개시된 시티딘 염기 편집기는 진화된 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 예컨대 진화된 Cas9를 포함한다.

[0217] 예시적인 시티딘 염기 편집기는 본원에 개시되고, 본원에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 또한 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 시티딘 염기 편집기는 본원에 개시된 CBE 서열 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 개시된 시티딘 핵염기 편집기는 본원에 개시된 CBE 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. C에서 T로의 핵염기 편집기의 비제한적인 예는 하기에 제공된다:

에스케리키아 콜라이 발현을 위한 His_6-rAPOBEC1-XTEN-dCas9

MGSSHHHHHHMSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGR
HSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSR
YPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNE
AHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHIL
WATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD
DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR
LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
ILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD
TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE
HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKI
LTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDK
NLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENED
ILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD
KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAG
SPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP
KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAK
GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
EKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDK
PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
DLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 117)

포유동물 발현을 위한 rAPOBEC1-XTEN-dCas9-NLS

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
[0218] DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF

EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSPKKKRKV (SEQ ID NO: 118)

포유동물 발현을 위한 hAPOBEC1-XTEN-dCas9-NLS

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKN
TTNHVEVNFIKKFTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECSQAIREFLSRHPGVTLVIYV
ARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWPQY
PPLWMMLYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLI
HPSVAWRSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD
DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR
LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
ILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD
TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE
HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKI
LTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDK
NLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENED
ILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD
KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAG
SPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP
KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAK
GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
EKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRD
KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETR
IDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 119)

rAPOBEC1-XTEN-dCas9-UGI-NLS

[0219] MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT

NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLT
SDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 120)

rAPOBEC1-XTEN-SpCas9 닉카제-UGI-NLS (BE3)

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTITLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE

[0220]

HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLT
SDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 121)

pmCDA1-XTEN-dCas9-UGI (박테리아)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG
NGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTKSPAVSGSETPGTSESATPESDKK
YSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEAT
RLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD
NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKN
GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLA
AKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI
FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDN
GSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT
RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE
LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEI
SGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY
AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ
LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMG
RHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK
LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK
SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLV
ETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINN
YHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVN
IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE
KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
RKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKH
YLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF
KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSMTNLSDIIEKE
TGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWA
LVIQDSNGENKIKML (SEQ ID NO: 122)

pmCDA1-XTEN-nCas9-UGI-NLS (포유동물 구축물)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG

[0221]

NGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTKSPAVSGSETPGTSESATPESDKK
YSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEAT
RLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD
NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKN
GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLA
AKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI
FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDN
GSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT
RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE
LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEI
SGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY
AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ
LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMG
RHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK
LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK
SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLV
ETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINN
YHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVN
IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE
KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
RKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKH
YLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF
KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETG
KQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALV
IQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 123)

huAPOBEC3G-XTEN-dCas9-UGI (박테리아)

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD
STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK

[0222]

LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSMTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP
ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML (SEQ ID NO:
124)

huAPOBEC3G-XTEN-nCas9-UGI-NLS (포유동물 구축물)

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD
STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPE
SDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRK
V (SEQ ID NO: 125)

huAPOBEC3G (D316R_D317R)-XTEN-nCas9-UGI-NLS (포유동물 구축물)

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD

[0223]

EHSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD
STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPE
SDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRK
V (SEQ ID NO: 126)

고충실도 핵염기 편집기

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTAFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGALSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMALIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS

[0224]

ELDKAGFIKRQLVETRAITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
(SEQ ID NO: 127)

rAPOBEC1-XTEN-SaCas9n-UGI-NLS) (SaBE3 및 SaBE3.9max)

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRS
KRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFS
AALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDG
EVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGS
PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEK
LEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK
DITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHN
LSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRS
FIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGK
ENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNK
VLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEER
DINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRK
WKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMP
EIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLI
VNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYK
YYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPY
RFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYN
NDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIK
KYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEV
IGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 128)

rAPOBEC1-XTEN-SaCas9n-UGI-NLS

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRS
KRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFS
AALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDG
EVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGS
PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEK
LEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK

[0225]

DITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHN
LSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRS
FIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGK
ENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNK
VLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEER
DINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRK
WKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMP
EIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLI
VNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYK
YYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPY
RFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYK
NDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIK
KYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEV
IGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 129)

핵염기 편집기 4-SSB

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSGGSGGSASRGVNKVILVGNLGQDPEVRYMPNGGAVANITLATSESWRDKATGE
MKEQTEWHRVVLFGKLAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWTDQSGQDRYTTEVV
VNVGGTMQMLGGRQGGGAPAGGNIGGGQPQGGWGQPQQPQGGNQFSGGAQSRPQ
QSAPAAPSNEPPMDFDDDIPFSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 130)

[0226]

핵염기 편집기 4-$(GGS)_3$

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 131)

핵염기 편집기 4-XTEN

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE

[0227]

DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
SETPGTSESATPESTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAY
DESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID
NO: 132)

핵염기 편집기 4-32aa 링커

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGGS
SGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKF
KVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEM
AKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG
VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAK
LQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASM
IKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI
LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR
EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERM
TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN
EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKL
INGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER
MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD
VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT
QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI
REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESE
FVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR
KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPI
DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY
NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIT
GLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDIL
VHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

[0228]

(SEQ ID NO: 133)

핵염기 편집기 4-2X UGI

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSET
PGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR
LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF
EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL
KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV
KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE
HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN
KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP
TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI
IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDN
EQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG
GSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLL
TSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVE
EVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGG
SPKKKRKV (SEQ ID NO: 134)

핵염기 편집기 4 (BE4)

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIAR
LYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLW
VRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGGS
SGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKF
KVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEM
AKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG
VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAK
LQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASM
IKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI

[0229]

LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR
EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERM
TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN
EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKL
INGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER
MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD
VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT
QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI
REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESE
FVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR
KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPI
DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY
NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIT
GLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGN
KPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSG
GSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLL
TSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 135)

BE4max (또한 AncBE4max)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTN
SVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR
YTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH
EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQ
LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL
SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE
GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA
SLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKV
MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF
KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN
GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV
VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV
AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY
LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNF
FKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTG
GFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS

[0230]

VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK
RYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQL
VIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQD
SNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDI
LVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEF
EPKKKRKV (SEQ ID NO: 136)

AID-BE4max

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTAR
LYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHEN
SVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSG
GSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENV
MLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQE
SILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGE
NKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 137)

AID-VRQR-BE4max

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTAR
LYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHEN
SVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS

[0231]

GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASARELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSG
GSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENV
MLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQE
SILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGE
NKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 138)

AncBE4max 689

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EIKWGTSHKIWRHSSKNTTKHVEVNFIEKFTSERHFCPSTSCSITWFLSWSPCGECSK
AITEFLSQHPNVTLVIYVARLYHHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMTAPEYDYCWR
NFVNYPPGKEAHWPRYPPLWMKLYALELHAGILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQS
CHYQRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAI
GTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEV
AYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDK
LFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD
AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN
GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH
LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETIT
PWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV
TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF
NASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDK
VMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLT
FKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV
IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ

[0232]

NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH
VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDA
YLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM
NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKL
KSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS
AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQI
SEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTID
RKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGK
QLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVI
QDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPE
SDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGS
EFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 139)

YE1-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSYSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPENRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 140)

YE2-BE4

[0233]

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSYSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLEDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 141)

YEE-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSYSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPENRQGLEDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF

[0234]

ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 142)

EE-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPENRQGLEDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 143)

[0235]

R33A-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELAKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 144)

R33A+K34A-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELAAETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE

[0236]

DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 145)

FERNY-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVFERNYDPRELRKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNN
RTQHAEVYFLENIFNARRFNPSTHCSITWYLSWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIY
VARLYYHEDERNRQGLRDLVNSGVTIRIMDLPDYNYCWKTFVSDQGGDEDYWPGH
FAPWIKQYSLKLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNSVG*
WAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK
KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPI
NASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAK
LQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRY
DEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG
TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFR
IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL
PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF
KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM
IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR
NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVM
GRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKL
YLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP
SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV
AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV
VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN
GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRN
SDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLY
LASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHR
DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDL
*SQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHT
AYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIE
KETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKP
WALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 146)

[0237]

AALN-BE4

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELAAETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHLANPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 147)

SpCas9-NG에 의해 변형된 BE4max (“BE4-NG”)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE

[0238]

KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARFLQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAFKYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 148)

BE4max-SaKKH

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSG*KRNYILGLAIGITS*
VGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNL
LTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQ
ISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFI
DTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNA
LNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGK
PEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISN
LKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILS
PVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRT
TGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKV
LVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFS
VQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNK
GYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFIT
PHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKL
KKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPV
IKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKE
NYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDIT
YREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSGGSGG
STNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAP
EYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEV
IGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 149)

[0239] BE4max-NRRH

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLTIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQGDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTAAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGVLHKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGVPAAFKYFDTTIDKKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI
*DLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILV
HTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDI
IEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYK
PWALVIQDSNGENKIKMLSGGS<u>KRTADGSEFEPKKKRKV</u> (SEQ ID NO: 150)

BE4max-VQR

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF

[0240]

ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETR
*IDLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDIL
VHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLS
DIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPE
YKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 151)

BE4max-VRQR

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLY
EINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSR
AITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFV
NYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHY
QRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNS*
VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN
PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP
KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK
HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETR
*IDLSQLGGD*SGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDIL
VHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLS
DIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPE
YKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 152)

[0241]

[0242] 일부 측면에서, 본 개시내용의 BE-VLP는 아데닌 염기 편집기를 포함한다. 예시적인 아데닌 핵염기 편집기에는 ABE7.10 (또는 ABEmax), ABE8e, ABE8e-SaKKH, ABE8e-NG, ABE-xCas9, ABE7.10-SaKKH, ABE7.10-NG, ABE7.10-VRQR, ABE7.10-VQR, ABE8e-NRTH, ABE8e-NRRH, ABE8e-VQR, 또는 ABE8e-VRQR이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, BE-VLP에 의해 전달되는 아데닌 염기 편집기는 ABE8e 또는 ABE7.10이다. ABE8e는 때때로 본원에서 "ABE8" 또는 "ABE8.0"으로 지칭된다. ABE8e 염기 편집기 및 그의 변이체는 TadA-8e 아데노신 데아미나제 단량체 (단량체 형태) 또는 TadA-8e 아데노신 데아미나제 동종이량체 또는 이종이량체 (이량체 형태)를 함유하는 아데노신 데아미나제 도메인을 포함할 수 있다. 다른 ABE는 A 핵염기를 탈아미노화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0243] 본 개시내용의 일부 측면은 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp) 및 적어도 2개의 아데노신 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 임의의 특정한 이론에 구애되기를 바라지 않지만, 아데노신 데아미나제의 이량체화 (예를 들어, 시스 또는 트랜스)는 융합 단백질이 핵산 염기를 변형시키는, 예를 들어 아데닌을 탈아미노화시키는 능력 (예를 들어, 효율)을 개선시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 임의의 융합 단백질은 2, 3, 4 또는 5개의 아데노신 데아미나제 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 융합 단백질은 2개의 아데노신 데아미나제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 융합 단백질은 2개의 아데노신 데아미나제만을 함유한다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 동일하다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 본원에 제공된 임의의 아데노신 데아미나제이다. 일부 실시양태에서, 아데노신 데아미나제는 상이하다.

[0244] 일부 실시양태에서, 제1 아데노신 데아미나제, 제2 아데노신 데아미나제, 및 napDNAbp를 갖는 예시적인 융합 단백질의 일반적인 아키텍처는 하기 구조 중 어느 하나를 포함하며, 여기서 NLS는 핵 국소화 서열 (예를 들어, 본

원에 제공된 임의의 NLS)이고, NH_2는 융합 단백질의 N-말단이고, COOH는 융합 단백질의 C-말단이다: NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[제1 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-COOH.

[0245] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 융합 단백질은 링커를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 도메인 또는 단백질 (예를 들어, 제1 아데노신 데아미나제, 제2 아데노신 데아미나제, 및/또는 napDNAbp) 중 하나 이상의 사이에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 일반적인 아키텍처에서 사용된 "]-["는 임의적인 링커의 존재를 나타낸다. 제1 아데노신 데아미나제, 제2 아데노신 데아미나제, napDNAbp, 및 NLS를 포함하는 예시적인 융합 단백질이 제공된다: NH_2-[NLS]-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[NLS]-COOH; NH_2-[NLS]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-[NLS]-COOH; NH_2-[NLS]-[napDNAbp]-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[NLS]-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제1 아데노신 데아미나제]-[제2 아데노신 데아미나제]-[NLS]-COOH; NH_2-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[NLS]-COOH; NH_2-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[NLS]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-COOH; NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[napDNAbp]-[NLS]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-COOH; NH_2-[NLS]-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[NLS]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-COOH; NH_2-[napDNAbp]-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[NLS]-COOH.

[0246] 예시적인 ABE에는 비제한적으로 하기 융합 단백질이 포함된다.

[0247] 일부 실시양태에서, A에서 G로의 염기 편집기는 NH_2-[제2 아데노신 데아미나제]-[제1 아데노신 데아미나제]-[dCas9]-COOH의 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 아데노신 데아미나제는 야생형 ecTadA (서열식별번호: 153)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 각각의 도메인 사이에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 링커는 32개 아미노산 길이이고, SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS (서열식별번호: 306)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0248] 예시적인 아데닌 염기 편집기는 아미노산 서열 서열식별번호: 153-203 중 어느 하나와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 개시된 아데닌 염기 편집기는 임의의 서열식별번호: 153-203과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 개시된 아데닌 염기 편집기는 임의의 서열식별번호: 153-203의 아미노산 서열을 포함한다.

[0249] A에서 G로의 염기 편집기의 비제한적인 예는 서열식별번호: 153-203으로서 하기에 제공된다.

ecTadA(wt)-XTEN-nCas9-NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 153)

ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-NLS: (포유동물 구축물, DNA에 대해 활성)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
[0250]

KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 154)

ecTadA(D108G)-XTEN-nCas9-NLS: (포유동물 구축물, DNA에 대해 활성, A에서 G로 편집)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 155)

ecTadA(D108V)-XTEN-nCas9-NLS: (포유동물 구축물, DNA에 대해 활성, A에서 G로 편집)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI

[0251]

KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 156)

ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-UGI-NLS (A에서 G로의 편집기의 BE3 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY

[0252]

GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 157)

ecTadA(D108G)-XTEN-nCas9-UGI-NLS (A에서 G로의 편집기의 BE3 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 158)

ecTadA(D108V)-XTEN-nCas9-UGI-NLS (A에서 G로의 편집기의 BE3 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL

[0253]

TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 159)

ecTadA(D108N)-XTEN-dCas9-UGI-NLS (포유동물 세포, A에서 G로의 편집기의 BE2 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK

[0254]

GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 160)

ecTadA(D108G)-XTEN-dCas9-UGI-NLS (포유동물 세포, A에서 G로의 편집기의 BE2 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 161)

ecTadA(D108V)-XTEN-dCas9-UGI-NLS (포유동물 세포, A에서 G로의 편집기의 BE2 유사체)

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD

[0255]

LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDE
NVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 162)

ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-AAG(E125Q)-NLS – cat. 알킬아데노신 글리코실라제

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE

[0256]

QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPNGTELRGRIVETQAYL
GPEDEAAHSRGGRQTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMYFCMNISSQGDGACVLLRAL
EPLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAINKSFDQRDLAQDEA
VWLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSPWVSVVDRVAEQDT
QASGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 163)

ecTadA(D108G)-XTEN-nCas9-AAG(E125Q)-NLS – cat. 알킬아데노신 글리코실라제

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPNGTELRGRIVETQAYL
GPEDEAAHSRGGRQTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMYFCMNISSQGDGACVLLRAL
EPLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAINKSFDQRDLAQDEA
VWLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSPWVSVVDRVAEQDT
QASGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 164)

ecTadA(D108V)-XTEN-nCas9-AAG(E125Q)-NLS – cat. 알킬아데노신 글리코실라제

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL

[0257]

AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPNGTELRGRIVETQAYL
GPEDEAAHSRGGRQTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMYFCMNISSQGDGACVLLRAL
EPLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAINKSFDQRDLAQDEA
VWLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSPWVSVVDRVAEQDT
QASGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 165)

ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-EndoV(D35A)-NLS: cat. 엔도뉴클레아제 V를 함유함

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY

[0258]

DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSDLASLRAQQIELASSVIREDRLDKDPPDLIAGAAVGFEQGGEVTRAAMV
LLKYPSLELVEYKVARIATTMPYIPGFLSFREYPALLAAWEMLSQKPDLVFVDGHGIS
HPRRLGVASHFGLLVDVPTIGVAKKRLCGKFEPLSSEPGALAPLMDKGEQLAWVWR
SKARCNPLFIATGHRVSVDSALAWVQRCMKGYRLPEPTRWADAVASERPAFVRYT
ANQPSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 166)

ecTadA(D108G)-XTEN-nCas9-EndoV (D35A)-NLS: cat. 엔도뉴클레아제 V를 함유함

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARGAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSDLASLRAQQIELASSVIREDRLDKDPPDLIAGAAVGFEQGGEVTRAAMV
LLKYPSLELVEYKVARIATTMPYIPGFLSFREYPALLAAWEMLSQKPDLVFVDGHGIS
HPRRLGVASHFGLLVDVPTIGVAKKRLCGKFEPLSSEPGALAPLMDKGEQLAWVWR
SKARCNPLFIATGHRVSVDSALAWVQRCMKGYRLPEPTRWADAVASERPAFVRYT
ANQPSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 167)

ecTadA(D108V)-XTEN-nCas9-EndoV(D35A)-NLS: cat. 엔도뉴클레아제 V를 함유함

[0259] MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT

AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARVAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDSGGSDLASLRAQQIELASSVIREDRLDKDPPDLIAGAAVGFEQGGEVTRAAMV
LLKYPSLELVEYKVARIATTMPYIPGFLSFREYPALLAAWEMLSQKPDLVFVDGHGIS
HPRRLGVASHFGLLVDVPTIGVAKKRLCGKFEPLSSEPGALAPLMDKGEQLAWVWR
SKARCNPLFIATGHRVSVDSALAWVQRCMKGYRLPEPTRWADAVASERPAFVRYT
ANQPSGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 168)

[0260]

진화의 제1 라운드로부터 생성된 변이체 (박테리아에서) ecTadA(H8Y_D108N_N127S)-

XTEN-dCas9

MSEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTDS
GSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIK
KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE
ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH
MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT
LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLV
KLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY
YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK
VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVK
QLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL

TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK
TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKK
GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELG
SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLK
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKA
ERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK
LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD
VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG
GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEV
KKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQL
GGD (SEQ ID NO: 169)

진화의 제2 라운드로부터의 강화된 변이체 (박테리아에서) ecTadA

(H8Y_D108N_N127S_E155X)-XTEN-dCas9; X=D, G 또는 V

MSEVEFSYEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMSHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQXIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGD (SEQ ID NO: 170)

pNMG-160: ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-GGS-AAG*(E125Q)-GGS-NLS

[0261] MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT

AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDGGSKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPNGTELRGRIVETQAYLG
PEDEAAHSRGGRQTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMYFCMNISSQGDGACVLLRALE
PLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAINKSFDQRDLAQDEAV
WLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSPWVSVVDRVAEQDTQ
AGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 171)

pNMG-161: ecTadA(D108N)-XTEN-nCas9-GGS-EndoV*(D35A)-GGS-NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL
TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP
YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE
KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIV
LTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK

[0262]

KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE
QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQ
LGGDGGSDLASLRAQQIELASSVIREDRLDKDPPDLIAGAAVGFEQGGEVTRAAMVL
LKYPSLELVEYKVARIATTMPYIPGFLSFREYPALLAAWEMLSQKPDLVFVDGHGIS
HPRRLGVASHFGLLVDVPTIGVAKKRLCGKFEPLSSEPGALAPLMDKGEQLAWVWR
SKARCNPLFIATGHRVSVDSALAWVQRCMKGYRLPEPTRWADAVASERPAFVRYT
ANQPGGSPKKKRKV (SEQ ID NO: 172)

pNMG-371: ecTadA(L84F_A106V_D108N_H123Y_D147Y_E155V_I156F)-SGGS-SGGS-

XTEN-SGGS-SGGS- ecTadA(L84F_A106V_D108N_H123Y_D147Y_E155V_I156F)-

SGGS-SGGS-XTEN-SGGS-SGGS-nCas9-SGGS- NLS

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTA
HAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTG
AAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTDS
GGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDERE
VPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS

[0263]

LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 173)

pNMG-616 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

_E155V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 174)

pNMG-624 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-32 a.a. 링커-

ecTadA(W23R_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

_E155V_I156F _K157N)-24 a.a. 링커_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT

[0264]

GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESDKKYSI
GLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL
KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI
VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF
FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ
ID NO: 175)

pNMG-476 아미노산 서열 (진화 #3 이종 이량체, wt TadA + TadA evo #3 돌연변이):

ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(L84F_A106V_D108N_H123Y_D147Y_E155V_I156F)-(SGGS)2-XTEN-

(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLSYFFRMRRQVFKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ

[0265]

YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 176)

pNMG-477 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_E155V_I156F

_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF

[0266]

YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 177)

pNMG-558 아미노산 서열: ecTadA(야생형)- 32 a.a. 링커-

ecTadA(H36L_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_E155V_I156F

_K157N)- 24 a.a. 링커_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRPIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESDKKY
SIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATR
LKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF
FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ
ID NO: 178)

pNMG-576 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

[0267] ecTadA(H36L_P48S_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_E155V_I156F

_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRSIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 179)

pNMG-577 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_P48S_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_A142N_D147Y_E155

V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRSIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECNALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI

[0268]

EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 180)

pNMG-586 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_E155V_I156F

_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR

[0269]

SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 181)

pNMG-588 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_A142N_D147Y_E155

V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECNALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 182)

[0270] pNMG-620 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23R_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

_E155V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 183)

pNMG-617 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142A_S146C_D147Y

_E155V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECNALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE

[0271]

RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 184)

pNMG-618 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142A_S146C_D147Y

_R152P_E155V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECNALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT

[0272]

QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 185)

pNMG-620 아미노산 서열: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23R_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

_E155V_I156F _K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV (SEQ ID NO: 183)

[0273]

pNMG-621 아미노산 서열: ecTadA(야생형)- 32 a.a. 링커-

ecTadA(H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P_E155

V_I156F _K157N)- 24 a.a. 링커_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESDKKY
SIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATR
LKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF
FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ
ID NO: 186)

pNMG-622 아미노산 서열: ecTadA(야생형)- 32 a.a. 링커-

ecTadA(H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142N_S146C_D147Y_R152

P_E155V_I156F _K157N)- 24 a.a. 링커_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECNALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESDKKY

[0274]

SIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATR
LKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF
FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ
ID NO: 187)

pNMG-623 아미노산 서열: ecTadA(야생형)- 32 a.a. 링커-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

_E155V_I156F _K157N)- 24 a.a. 링커_nCas9_GGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESDKKYSI
GLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL
KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI
VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH

[0275]

DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD
NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNY
HHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF
FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV (SEQ
ID NO: 188)

ABE6.3 ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_P48S_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_E155V_I156F

_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRSIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECAALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP

[0276]

KKKRKV* (SEQ ID NO: 189)

ABE7.8 ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142N_S146C_D147Y

_E155V_I156F_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECNALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV* (SEQ ID NO: 190)

ABE7.9 ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23L_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142N_S146C_D147Y

_R152P¬_E155V_I156F_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRALDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT

[0277]

FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECNALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF
DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV* (SEQ ID NO: 191)

ABE7.10 ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(W23R_H36L_P48A_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_S146C_D147Y_R152P

¬_E155V_I156F_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDERE
VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT
FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD
ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG
GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE
TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP
GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA
DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ
RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF

[0278]

DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE
RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL
VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT
QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG
FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL
VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN
LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKK
KRKV* (SEQ ID NO: 192)

ABE6.4: ecTadA(야생형)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2-

ecTadA(H36L_P48S_R51L_L84F_A106V_D108N_H123Y_A142N_S146C_D147Y_E155

V_I156F_K157N)-(SGGS)2-XTEN-(SGGS)2_nCas9_SGGS_NLS

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDER
EVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRSIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYV
TFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILA
DECNALLCYFFRMRRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS
GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK
HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI
EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ

[0279]

LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSP
KKKRKV (SEQ ID NO: 180)

ABEmax

MKRTADGSEFESPKKKRKVMSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLV
HNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCA
GAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSD
FFRMRRQEIKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSH
EYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMAL
RQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLM
DVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGG
SSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV
LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKA
DLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQ
LSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE
KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE
KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT
NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL
FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLI
NGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA
NLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERM
KRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV
DHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR
EVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEF
VYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN
GETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARK
KDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPID
FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLY
LASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN
KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITG
LYETRIDLSQLGGDKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 193)

ABE8e (단량체)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGL
AIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKR
TARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVD
EVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFG
NLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNL

[0280]

SDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS
KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH
QIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSE
ETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKV
KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF
DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHD
DSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY
YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNV
PSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQ
ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH
AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFY
SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKK
TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGK
SKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR
MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE
IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF
DTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKK
KRKV (SEQ ID NO: 194)

ABE8e (이량체)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHN
NRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFR
MRRQEIKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEY
WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQ
GGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNV
LNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSG
SETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN
TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD
SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL
IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI
LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD
TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE
HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKI
LTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDK
NLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENED
ILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD
KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAG
SPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP

[0281]

KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAK
GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
EKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRD
KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETR
IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 195)

SaABE8e

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSGKRNYILG
LAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQR
VKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNE
VEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEA
KQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGH
CTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKK
PTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAK
ILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDN
QIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDII
IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGK
CLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQY
LSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTR
YATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDA
LIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIK
DFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLI
NKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGP
VIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNL
DVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLL
NRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQI
IKKGSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 196)

SpCas9NG-ABE8e (“ABE8e-NG”)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMI
HSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMP
RQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGT
NSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR
RYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY
HEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFI
QLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIAL
SLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL
LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGY
AGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLG
ELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE
GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA
SLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKV
MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF

[0282]

KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE
MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN
GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV
VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV
AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY
LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNF
FKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFS
KESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE
LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARFLQ
KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAFKYFDTTIDRKVYR
STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID
NO: 197)

SaKKH-ABE8e (“ABE8e-KKH”)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSGKRNYILG
LAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQR
VKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNE
VEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEA
KQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGH
CTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKK
PTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAK
ILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDN
QIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDII
IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGK
CLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQY
LSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTR
YATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDA
LIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIK
DFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLI
NKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGP
VIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNL
DVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLL
NRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQ
IIKKGSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 198)

ABE8-NRTH: NLS, TadA, 링커, TadA, NRTH

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*SEVEFSHEY*
WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLV
MQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNH
*RVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN*SGGSSGGSSGSETPGTSESATP
ESSGGSSGGS*DKKYSIGLTIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF*

[0283]

DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP
DNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF
GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD
AILLSDILRVNTEITKAPLSASMVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAI
LRRQGDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD
KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE
QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK
DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSR
KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSCQGDSLHEHIA
NLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE
EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG
GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRK
DFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMP
QVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTVAYSVLVVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRM
LASASVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSSEDNKQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE
FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGASAAFKYFDTTIGRKLYTS
*TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 199)

ABE8-NRRH: NLS, TadA, 링커, TadA, NRRH

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*SEVEFSHEY*
WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLV
MQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNH
*RVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN*SGGSSGGSSGSETPGTSESATP
ESSGGSSGGS*DKKYSIGLTIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF*
DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP
DNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF
GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDA
ILLSDILRVNTEITKAPLSASMVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAIL
RRQGDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDK
GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK
KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL
DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLIN
GIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSCQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL
SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDF
QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGK

[0284]

*ATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVN IVKKTEVQTGGFSKESILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTAAYSVLVVAKVEKGKS KKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGVPAAFKYFDTTIDKKRYTSTK EVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 200)

xCas9(3.7)-ABE(7.10): (ecTadA(wt)–링커(32 aa)–ecTadA*(7.10)–링커(32 aa)–

nxCas9(3.7)–NLS):

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTD SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDERE VPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT FEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILAD ECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSG GSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG DLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDTKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKLYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEKVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGDQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN RNFIQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQ LQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSD KNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFI KRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIG KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF ELENGRKRMLASAGVLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE QHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLG APAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDEGADKRTAD GSEFESPKKKRKV (SEQ ID NO: 201)

ABE8-VRQR: NLS, TadA, 링커, TadA, SpCas9-VRQR

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA MIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS*SEVEFSHEY*

[0285]

WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLV
MQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHR
*VEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN*SGGSSGGSSGSETPGTSESATPE
SSGGSSGGS*DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD*
SGETAEATRLKRTARRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD
NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFG
NLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGY
IDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR
RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKG
ASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK
AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLD
NEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL
GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSI
DNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL
DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFY
KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKL
KSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAREL
QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL
ADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLD
*ATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 202)

ABE8e(TadA-8e V106W)

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLN
NRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGA
MIHSRIGRVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFY
RMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGL
AIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKR
TARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVD
EVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFG
NLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNL
SDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS
KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH
QIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSE
ETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKV
KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF
DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHD
DSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY
YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNV
PSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQ
ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH

[0286]

AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFY
SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKK
TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGK
SKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR
MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE
IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF
DTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKK
KRKV (SEQ ID NO: 203)

[0287]

[0288] **핵 국소화 서열 (NLS)**

[0289] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 하나 이상의 핵 국소화 서열 (NLS)을 포함할 수 있으며, 이는 세포 핵으로 단백질의 전좌를 촉진시키는데 도움이 된다. 이러한 서열은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 하기 예가 포함될 수 있다:

[0290]

설명	서열	SEQ ID NO:
SV40 대형 T-Ag의 NLS	PKKKRKV	204
NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV	205
NLS	MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC	206
뉴클레오플라스민의 NLS	AVKRPAATKKAGQAKKKKLD	207
EGL-13의 NLS	MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN	208
c-MYC의 NLS	PAAKRVKLD	209
TUS-단백질의 NLS	KLKIKRPVK	210
폴리오마 대형 T-Ag의 NLS	VSRKRPRP	211
D형 간염 바이러스 항원의 NLS	EGAPPAKRAR	212
뮤린 p53의 NLS	PPQPKKKPLDGE	213
PE1 및 PE2의 NLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV	214
이분절 sv40 nls	KRTADGSEFESPKKKRKV	215

[0291] 상기 NLS의 예는 비제한적이다. 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 [Cokol *et al.*, "Finding nuclear localization signals," *EMBO Rep.*, 2000, 1(5): 411-415 및 Freitas *et al.*, "Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins," *Current Genomics*, 2009, 10(8): 550-7] (이들 각각은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 임의의 것들을 비롯하여 임의의 공지된 NLS 서열을 포함할 수 있다.

[0292] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 융합 단백질, 융합 단백질을 코딩하는 구축물, 및 BE-VLP는 하나 이상의, 바람직하게는 적어도 2개의 핵 국소화 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 적어도 2개의 NLS를 포함한다. 적어도 2개의 NLS를 갖는 실시양태에서, NLS는 동일한 NLS일 수 있거나, 또는 이들은 상이한 NLS일 수 있다. 일부 실시양태에서, NLS 중 하나 이상은 이분절 NLS ("bpNLS")이다. 특정 실시양태에서, 개시된 융합 단백질은 2개의 이분절 NLS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개시된 융합 단백질은 2개 초과의 이분절 NLS를 포함한다.

[0293] NLS 융합의 위치는 융합 단백질의 N-말단, C-말단 또는 서열 내에서 (예를 들어, 코딩된 napDNAbp 성분 (예를 들어, Cas9)과 데아미나제 도메인 (예를 들어, 아데노신 또는 시토신 데아미나제) 사이에 삽입됨) 있을 수 있다.

[0294] NLS는 관련 기술분야에 공지된 임의의 NLS 서열일 수 있다. NLS는 또한 핵 국소화를 위해 추후에 발견될 임의의 NLS일 수 있다. NLS는 또한 임의의 천연 발생 NLS 또는 임의의 비-천연 발생 NLS (예를 들어, 하나 이상의 원하는 돌연변이를 갖는 NLS)일 수 있다.

[0295] 용어 "핵 국소화 서열" 또는 "NLS"는 예를 들어 핵 수송에 의해 세포 핵으로 단백질의 유입을 촉진시키는 아미노산 서열을 지칭한다. 핵 국소화 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 숙련된 기술자에게 자명할 것이다. 예를 들어, NLS 서열은 2000년 11월 23일에 출원된 플랭크(Plank) 등의 국제 PCT 출원 PCT/EP2000/011690 (2001년 5월 31일에 WO/2001/038547로 공개됨)에 기재되어 있으며, 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, NLS는 아미노산 서열 PKKKRKV (서열식별번호: 204), MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC (서열식별번호: 206), KRTADGSEFESPKKKRKV (서열식별번호: 215), 또는 KRTADGSEFEPKKKRKV (서열식별번호: 216)을 포함한다. 다른 실시양태에서, NLS는 아미노산 서열 NLSKRPAAIKKAGQAKKKK (서열식별번호: 217), PAAKRVKLD (서열식별번호: 209), RQRRNELKRSF (서열식별번호: 218), 또는 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (서열식별번호: 219)를 포함한다.

[0296] 본 개시내용의 한 측면에서, 염기 편집기 또는 다른 융합 단백질은 하나 이상의 핵 국소화 서열 (NLS), 바람직하게는 적어도 2개의 NLS에 의해 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 2개 이상의 NLS에 의해 변형된다. 본 개시내용은 본원의 개시 시점에 관련 기술분야에 공지된 임의의 핵 국소화 서열, 또는 본원의 출원 시점 이후에 최신 기술에서 확인되거나 또는 달리 이용가능한 임의의 핵 국소화 서열의 사용을 고려한다. 대표적인 핵 국소화 서열은 서열이 발현되는 세포의 핵으로 단백질을 안내하는 펩티드 서열이다. 핵 국소화 신호는 주로 염기성이고, 단백질의 아미노산 서열 거의 어디에서나 위치할 수 있고, 일반적으로 4개 아미노산 ([Autieri & Agrawal, (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 14731-37], 본원에 참조로 포함됨) 내지 8개 아미노산의 짧은 서열을 포함하며, 전형적으로 리신 및 아르기닌 잔기가 풍부하다 ([Magin *et al.*, (2000) *Virology* 274: 11-16], 본원에 참조로 포함됨). 핵 국소화 서열은 종종 프롤린 잔기를 포함한다. 다양한 핵 국소화 서열이 확인되었고, 생물학적 분자를 세포질에서 세포 핵으로 수송하기 위해 사용되어 왔다. 예를 들어, [Tinland *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7442-46; Moede *et al.*, (1999) *FEBS Lett.* 461:229-34]를 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 전좌는 현재 핵공 단백질을 수반하는 것으로 여겨진다.

[0297] 대부분의 NLS는 3가지 일반적인 그룹으로 분류될 수 있다: (i) SV40 대형 T 항원 NLS (PKKKRKV (서열식별번호:

204))로 예시되는 단일분절 NLS; (ii) 다양한 수의 스페이서 아미노산에 의해 분리된 2개의 염기성 도메인으로 이루어지고, 크세노푸스 뉴클레오플라스민(*Xenopus nucleoplasmin*) NLS (KRXXXXXXXXXXKKKL (서열식별번호: 220))로 예시되는 이분절 모티프; 및 (iii) 비정규 서열, 예컨대 hnRNP A1 단백질, 인플루엔자 바이러스 핵단백질 NLS, 및 효모 Gal4 단백질 NLS의 M9 (Dingwall and Laskey 1991).

[0298] 핵 국소화 서열은 단백질의 아미노산 서열의 다양한 지점에서 나타난다. NLS는 단백질의 N-말단, C-말단 및 중심 영역에서 확인되었다. 따라서, 본 개시내용은 융합 단백질의 C-말단 및/또는 N-말단에서 뿐만 아니라 내부 영역에서 하나 이상의 NLS에 의해 변형될 수 있는 융합 단백질을 제공한다. 성분 NLS 잔기로서 기능하지 않는 더 긴 서열의 잔기는 예를 들어 강장적으로 또는 입체적으로 핵 국소화 신호 자체를 방해하지 않도록 선택되어야 한다. 따라서, NLS-포함 서열의 조성에 엄격한 제한이 없지만, 실제로 이러한 서열은 길이 및 조성에 있어서 기능적으로 제한될 수 있다.

[0299] 본 개시내용은 융합 단백질이 하나 이상의 NLS를 포함하도록 변형시키는 임의의 적합한 수단을 고려한다. 한 측면에서, 융합 단백질은 그의 N-말단 또는 그의 C-말단 (또는 둘 다)에서 하나 이상의 NLS에 번역적으로 융합되는 융합 단백질을 발현하도록, 즉, 염기 편집기-NLS 융합 구축물을 형성하도록 조작될 수 있다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질-코딩 뉴클레오티드 서열은 코딩된 염기 편집기의 내부 영역에서 하나 이상의 NLS를 코딩하는 리딩 프레임을 혼입하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 또한, NLS는 염기 편집기와 N-말단, C-말단 또는 내부-부착된 NLS 아미노산 서열 사이에, 예를 들어 단백질의 중심 영역에서 코딩된 다양한 아미노산 링커 또는 스페이서 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 다른 성분들 중에서 염기 편집기 및 하나 이상의 NLS를 포함하는 융합 단백질을 발현하기 위한 뉴클레오티드 구축물, 벡터, 및 숙주 세포를 제공한다.

[0300] 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 또한 하나 이상의 링커, 예를 들어 중합체, 아미노산, 핵산, 다당류, 화학물질 또는 핵산 링커 요소를 통해 염기 편집기에 연결된 핵 국소화 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 고려 범주 내에 있는 링커는 임의의 제한을 갖는 것으로 의도되지 않으며, 임의의 적합한 유형의 분자 (예를 들어, 중합체, 아미노산, 다당류, 핵산, 지질, 또는 임의의 합성 화학적 링커 도메인)일 수 있고, 염기 편집기와 하나 이상의 NLS 사이에 결합 (예를 들어, 공유 연결, 수소 결합)을 형성하는 임의의 적합한 전략에 의해 염기 편집기에 연결될 수 있다.

[0301] **핵 유출 서열 (NES)**

[0302] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 하나 이상의 핵 유출 서열 (NES)을 포함할 수 있으며, 이는 세포 핵 밖으로 단백질의 전좌를 촉진시키는데 도움이 된다. 핵 유출 서열 (또는 핵 유출 신호)은 핵 국소화 신호 (NLS)와 반대인 기능을 갖는다. 이러한 서열은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며 (예를 들어, [Xu et al., "Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database," Mol. Biol. Cell, 2012, 23(18): 3677-3693], 그의 내용은 본원에 참조로 포함됨), 하기 예가 포함될 수 있다:

[0303]

서열:	SEQ ID NO:
MEELSQALASSFSV	221
PLQLPPLERLTL	222
NELALKLAGLDI	223
ERFEMFRELNEALEL	224
DHAEKVAEKLEALSV	225
QLVEELLKIICAFQL	226
TNLEALQKKLEELEL	227
DVKEEMTSALATMRV	228
STNGSLAAEFRHLQL	229
PSVQELTEQIHRLLM	230
MNFKELKDFLKELNI	231
ENFEILMKLKESLEL	232
FETVYELTKMCTIR	233
SGKASSSLGLQDFDL	234
PKYSDIDVDGLCSEL	235
VDLACTPTDVRDVDI	236
YGEKTTQRDLTELEI	237
RRIYDITNVLEGIGL	238
AKIIPYSGLLLVITV	239
LRSEEVHWLHVDMGV	240
LQSEEVHWLHLDMGV	241
LQVRKYSLDLASLIL	242
AGVEAIIRILQQLLF	243
TGVEALIRILQQLLF	244
IVLNQLCVRFFGLDL	245
SLGGFEITPPVVLRL	246
EAIQDLCLAVEEVSL	247
DELLQVLRMMVGVNI	248
SVMLAVQEGIDLLTF	249
LSSHFQELSI	250
QSTHVDIRTLEDLLM	251
ESSAEDLRTLQQLFL	252
EFSLPTHHTVRLIRV	253
MSSGYYLGEILRLAL	254
DTVLDILRDFFELRL	255
NSVNEILSEFYYVRL	256
CAFLSVKKQFEELTL	257
ISPEHVIQALESLGF	258
AHWMRQLVSFQKLKL	259
ATRELDELMASLSDF	260
YQNIELITFINALKL	261
FNATAVVRHMRKLQL	262
SGIFGLVTNLEELEV	263
EESYTLNSDLARLGV	264

EESYDLTSHLARLGV	265
GIQQAHAEQLANMRI	266
DVKEEMTSALATMRV	228
AAEPVILDLRDLFQL	267
MEGCVSNLMV	268
EGCVSNLMV	269
DMDFLRNLFSQTLSL	270
EQLLEIVHDLENLSL	271
NVMKYFTDLFDYLPL	272
KVYPIILRLGSNLSL	273
YAGFSLPHAILRIDL	274
EIVRDIKEKLCYVAL	275
EAINKLESNLRELQI	276
EAINKLENNLRELQI	277
SDQKQEQLLLKKMYL	278
KQVLWDRTFSLFQQL	279
AQLQNLTKRIDSLPL	280
NDENEHQLSLRTVSL	281
ISFTEFVKVLEKVDV	282
MESAITLWQFLLQL	283
VPKELMQQIENFEKI	284
QARFILEKIDGKIII	285
QVKFIKMIIEKELTV	286
NHRMKNLREISQLGI	287
NHRVKKLNEISKLGI	288
TEKHLQKYLRQDLRL	289
RQERKRPLLDLHIEL	290
ANMRIQDLKVSLKPL	291
ATMRVDYEQIKIKKI	292
LQGEEFVCLKSIILL	293
THYGQKAILFLPLPV	294
PSAHEITGLADSLQL	295
VRLHDVLHSDKKLTL	296
LINRNGELKLANFGL	297
LEPLKKLECLKSLDL	298

[0304]

[0305] 상기 NES의 예는 비제한적이다. 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 [Xu, D. *et al.* Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Mol. Biol. Cell.* 2012, *23(18)*, 3677-3693; Fung, H. Y. J. *et al.* Structural determinants of nuclear export signal orientation in binding to exportin CRM1. *eLife.* 2015, 4:e10034; 및 Kosugi, S. *et al.* Nuclear Export Signal Consensus Sequences Defined Using a Localization-based Yeast Selection System. *Traffic*. 2008, *9(12)*, 2053-2062] (이들 각각은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 임의의 것들을 비롯하여 임의의 공지된 NES 서열을 포함할 수 있다.

[0306] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 융합 단백질, 융합 단백질을 코딩하는 구축물, 및 BE-VLP는 하나 이상의, 바람직하게는 적어도 3개의 핵 유출 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 적어도 3개의 NES를 포함한다. 적어도 3개의 NES를 갖는 실시양태에서, NES는 동일한 NES일 수 있거나, 또는 이들은 상이한 NES일 수 있다. 특정의 다른 실시양태에서, 융합 단백질, 융합 단백질을 코딩하는 구축물, 및 BE-VLP는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개 이상의 NES를 포함할 수 있다. 일반적으로, 하나 이상의 NES는 생산자 세포의 세포질에서 각각 검출 가능한 양으로 BE-VLP 단백질 (예를 들어, gag-카고)의 축적을 유도하기에 충분한 강도를 갖는다.

[0307] NES 융합의 위치는 융합 단백질의 N-말단, C-말단 또는 서열의 내부에서 (예를 들어, 코딩된 napDNAbp 성분 (예를 들어, Cas9)과 gag 뉴클레오캡시드 단백질 사이에 삽입됨) 있을 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, NES (또는 다중 NES, 예를 들어 3개의 NES)는 napDNAbp와 gag 뉴클레오캡시드 단백질 사이에 위치하여, 융합 단백질을 표적 세포에 전달 시 이들이 napDNAbp로부터 절단될 수 있게 한다. NES 서열은 바람직하게는 절단가능한 링커, 예컨대 프로테아제-절단가능한 링커 (예를 들어, Gag-Pro-Pol)를 통해 융합 단백질에 연결될 수 있다. 이러한 방식으로, 본원에 기재된 4세대 eVLP에서 나타나는 바와 같이, VLP 성숙 후에 NES가 카고 단백질 (예를 들어, BE 또는 napDNAbp)로부터 절단되어, 수용자 세포에 전달 시 BE 및/또는 napDNAbp 카고가 핵으로 자유롭게 전좌될 수 있게 한다.

[0308] NES는 관련 기술분야에 공지된 임의의 NES 서열이다. NES는 또한 핵 유출을 위해 추후에 발견될 임의의 NES일 수 있다. NES는 또한 임의의 천연 발생 NES 또는 임의의 비-천연 발생 NES (예를 들어, 하나 이상의 원하는 돌연변이를 갖는 NES)일 수 있다.

[0309] 용어 "핵 유출 서열" 또는 "NES"는 예를 들어 핵 수송에 의해 세포 핵으로부터 단백질의 유출을 촉진시키는 아미노산 서열을 지칭한다. 핵 유출 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 숙련된 기술자에게 자명할 것이다.

[0310] 본 개시내용의 한 측면에서, 염기 편집기 또는 다른 융합 단백질은 하나 이상의 핵 유출 서열 (NES), 바람직하게는 적어도 3개의 NES에 의해 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 2개 이상, 3개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 10개 이상의 NES에 의해 변형된다. 본 개시내용은 본원의 개시 시점에서 관련 기술분야에 공지된 임의의 핵 유출 서열, 또는 본원의 출원 시점 후에 최신 기술에서 확인되거나 또는 달리 이용가능한 임의의 핵 유출 서열의 사용을 고려한다. 대표적인 핵 유출 서열은 서열이 발현되는 세포의 핵 밖으로 단백질을 안내하는 펩티드 서열이다. NES는 일반적으로 서열 LXXXLXXLXL에서 소수성 아미노산 잔기를 함유하며, 여기서 L은 소수성 잔기 (빈번하게는 류신)이고, X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 핵 유출 서열은 종종 류신 잔기를 포함한다.

[0311] 본원에 기재된 BE-VLP에 의해 전달되는 융합 단백질은 또한 하나 이상의 링커, 예를 들어 중합체, 아미노산, 핵산, 다당류, 화학물질 또는 핵산 링커 요소를 통해 염기 편집기에 연결되는 핵 유출 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 고려 범주 내에 있는 링커는 임의의 제한을 갖는 것으로 의도되지 않으며, 임의의 적합한 유형의 분자 (예를 들어, 중합체, 아미노산, 다당류, 핵산, 지질, 또는 임의의 합성 화학적 링커 도메인)일 수 있고, 염기 편집기와 하나 이상의 NES 사이에 결합 (예를 들어, 공유 연결, 수소 결합)을 형성하는 임의의 적합한 전략에 의해 염기 편집기에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 NES와 염기 편집기를 연결하는 링커는 본원에서 추가로 기재되는 절단가능한 링커이며, 이로써 하나 이상의 NES는 예를 들어 염기 편집기를 표적 세포에 전달 시 염기 편집기로부터 절단될 수 있다.

[0312] 다양한 실시양태에서, 예를 들어 단백질 카고 (예를 들어, Gag-BE)가 생산자 세포에서 VLP 생성 과정 동안에 (핵이 아니라) 세포질에서 축적된다는 것을 확인하기 위해, 세포질 및/또는 핵에서 BE-VLP 단백질의 축적을 모니터링하는 것이 유용할 수 있다. 다른 실시양태에서, 예를 들어 BE 전달을 위해 eVLP를 수용하는 수용자 세포에서 전달된 BE가 실제로 뉴클레아제로 수송되어, 거기서 DNA를 편집할 수 있다는 것을 확인하기 위해, 핵 및/또는 뉴클레아제에서 BE-VLP 단백질의 축적을 모니터링하는 것이 유용할 수 있다. 핵 또는 세포질에서 축적의 검출은 경우에 따라 임의의 적합한 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 세포 내의 위치가 시각화될 수 있도록, 예컨대 핵의 위치를 검출하기 위한 수단 (예를 들어, 핵에 특이적인 염색, 예컨대 DAPI)과 조합되어, 검출가능한 마커가 BE에 융합될 수 있다. 검출가능한 마커의 예에는 형광 단백질 (예컨대 녹색 형광 단백질, 또는 GFP; RFP; CFP), 및 에피토프 태그 (HA 태그, 플래그 태그, SNAP 태그)가 포함된다. 세포 핵은 또한 세포로부터 단리될 수 있으며, 그의 내용물은 단백질 검출을 위한 임의의 적합한 과정, 예컨대 면역조직화학, 웨스턴 블롯, 또는 효소 활성 검정에 의해 분석될 수 있다.

[0313] **링커**

[0314] 본원에 기재된 융합 단백질 및 BE-VLP는 하나 이상의 링커를 포함할 수 있다. 상기 정의된 바와 같이, 본원에 사용된 용어 "링커"는 2개의 분자 또는 모이어티, 예를 들어 뉴클레아제의 결합 도메인 및 절단 도메인을 연결하는 화학적 기 또는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 링커는 RNA-프로그래밍가능한 뉴클레아제의 gRNA 결합 도메인과 데아미나제 (예를 들어, 시토신 데아미나제 또는 아데노신 데아미나제)의 촉매적 도메인을 연결한다. 일부 실시양태에서, 링커는 dCas9와 데아미나제를 연결한다. 전형적으로, 링커는 2개의 기, 분자 또는 다른 모이어티 사이에 위치하거나 또는 그들에 의해 플랭킹되고, 공유 결합을 통해 각각에 연결되어, 둘을 연결시킨다. 일부 실시양태에서, 링커는 1개의 아미노산 또는 복수개의 아미노산 (예를 들어, 펩티드 또는 단백질)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 유기 분자, 기, 중합체, 또는 화학적 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 링커는 5-100개 아미노산 길이, 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150 또는 150-200개 아미노산 길이이다. 더 길거나 또는 더 짧은 링커 또한 고려된다.

[0315] 링커는 공유 결합만큼 단순할 수 있거나, 또는 여러 원자 길이의 중합체성 링커일 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 폴리펩티드 또는 아미노산-기반이다. 다른 실시양태에서, 링커는 펩티드-유사가 아니다. 특정 실시양태에서, 링커는 공유 결합 (예를 들어, 탄수-탄소 결합, 디술피드 결합, 탄소-헤테로원자 결합 등)

이다. 특정 실시양태에서, 링커는 아미드 연결의 탄소-질소 결합이다. 특정 실시양태에서, 링커는 시클릭 또는 아시클릭, 치환된 또는 비치환된, 분지형 또는 비분지형 지방족 또는 헤테로지방족 링커이다. 특정 실시양태에서, 링커는 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아미드, 폴리에스테르 등)이다. 특정 실시양태에서, 링커는 아미노알칸산의 단량체, 이량체 또는 중합체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 아미노알칸산 (예를 들어, 글리신, 에탄산, 알라닌, 베타-알라닌, 3-아미노프로판산, 4-아미노부탄산, 5-펜탄산 등)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 아미노헥산산 (Ahx)의 단량체, 이량체 또는 중합체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 카르보시클릭 모이어티 (예를 들어, 시클로펜탄, 시클로헥산)를 기반으로 한다. 다른 실시양태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 링커는 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 페닐 고리를 기반으로 한다. 링커는 펩티드로부터 링커로 친핵체 (예를 들어, 티올, 아미노)의 부착을 용이하게 하기 위해 관능화된 모이어티를 포함할 수 있다. 임의의 친전자체가 링커의 일부로 사용될 수 있다. 예시적인 친전자체에는 활성화된 에스테르, 활성화된 아미드, 마이클(Michael) 수용자, 알킬 할라이드, 아릴 할라이드, 아실 할라이드, 및 이소티오시아네이트가 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0316] 일부 다른 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 $(GGGGS)_n$ (서열식별번호: 299), $(G)_n$ (서열식별번호: 300), $(EAAAK)_n$ (서열식별번호: 301), $(GGS)_n$ (서열식별번호: 302), $(SGGS)_n$ (서열식별번호: 303), $(XP)_n$ (서열식별번호: 304), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하며, 여기서 n은 독립적으로 1 내지 30의 정수이고, X는 임의의 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 $(GGS)_n$ (서열식별번호: 302)을 포함하며, 여기서 n은 1, 3 또는 7이다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGSETPGTSESATPES (서열식별번호: 305)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS (서열식별번호: 306)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGGSGGSGGS (서열식별번호: 307)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGGS (서열식별번호: 303)을 포함한다. 다른 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGGSSGGS (서열식별번호: 308, 60AA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 GGS (서열식별번호: 302), GGSGGS (서열식별번호: 309), GGSGGSGGS (서열식별번호: 310), SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS (서열식별번호: 311), SGSETPGTSESATPES (서열식별번호: 305), 또는 SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGGSSGG S (서열식별번호: 312)를 포함한다.

[0317] 특정 실시양태에서, 링커는 본 발명의 임의의 펩티드 또는 펩티드 도메인 또는 모이어티를 연결시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 데아미나제 도메인에 연결되거나 또는 융합된 napDNAbp, 및/또는 하나 이상의 NES에 연결된 napDNAbp). 본원에 기재된 융합 단백질의 임의의 도메인은 또한 본원에 기재된 임의의 링커를 통해 서로 연결될 수 있다.

[0318] 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능한 링커 (예를 들어, 임의의 수단에 의해 분할 또는 절단될 수 있는 링커)이다. 절단가능한 링커는 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 융합 단백질 및 BE-VLP의 하나 이상의 NES와 napDNAbp 사이의 링커는 절단가능한 링커를 포함한다. 절단가능한 링커는 자가-절단 펩티드 (예를 들어 2A 펩티드, 예컨대 EGRGSLLTCGDVEENPGP (서열식별번호: 9), ATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열식별번호: 10), QCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열식별번호: 11), 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열식별번호: 12))를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 프로테아제와 접촉한 후에 절단되는 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용은 아미노산 서열 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1), PRSSLYPALTP (서열식별번호: 2), VQALVLTQ (서열식별번호: 3), PLQVLTLNIERR (서열식별번호: 4), 또는 서열식별번호: 1-4 중 어느 하나와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열의 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단가능한 링커의 사용을 고려한다. 특정 실시양태에서, 절단가능한 링커는 MMLV 프로테아제 절단 부위 또는 FMLV 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 융합 단백질 및 BE-VLP는 하나 이상의 NES와 napDNAbp를 연결하는 절단가능한 링커 TSTLLMENSS (서열식별번호: 1)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 BE-VLP/융합 단백질을 표적 세포에 전달 시 절단되어, 표적 세포의 핵으로 전좌될 수 있는 유리 염기 편집기를 방출시킨다.

[0319] 상응하는 프로테아제가 eVLP에 공동-패키징되어 성숙 eVLP 입자 내에서 성숙 후 절단을 가능하게 하는 한, 프로테아제 절단 부위는 관련 기술분야에 공지된 임의의 서열 또는 아직 발견되지 않은 임의의 서열일 수 있다. 이러한 절단 부위 및 그들의 상응하는 프로테아제에는 하기가 포함되나 이로 제한되지 않는다: (a) ASPRAGGK (서열식별번호: 5)를 포함하는 서열을 인식하고 절단하는 그랜자임 A, (b) YEADSLEE (서열식별번호: 6)을 포함하는

서열을 인식하고 절단하는 그랜자임 B, (c) YQYRAL (서열식별번호: 7)을 포함하는 서열을 인식하고 절단하는 그랜자임 K, (d) LGVLIV (서열식별번호: 8)을 포함하는 서열을 인식하고 절단하는 카텝신 D. eVLP 제조 과정 동안에 특이적 프로테아제를 공동-패키징함으로써 특이적 프로테아제 및 프로테아제 절단 부위의 여러 다른 조합이 본 개시내용과 관련하여 사용될 수 있다. 이러한 프로테아제에는 비제한적으로 Arg-C 프로테이나제, Asp-N 엔도펩티다제, 카스파제 1, 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 4, 카스파제 5, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 카스파제 10, 키모트립신, 클로스트리파인, 엔테로키나제, 인자 Xa, 글루타밀 엔도펩티다제, 그랜자임 B, 호중성 엘라스타제, 펩신, 프롤릴-엔도펩티다제, 프로테이나제 K, 스타필로코쿠스 펩티다제 I, 써몰리신, 트롬빈, 및 트립신이 포함될 수 있다. 임의의 세린 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 아스파르트산 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 글루탐산 프로테아제, 메탈로프로테아제, 또는 아스파라긴 펩티드 리아제 (공지된 프로테아제의 주요 부류를 구성함)를 비롯하여 동족 인식 서열과 쌍을 형성하는 임의의 프로테아제가 본 개시내용의 프로테아제-민감성 링커에서 사용될 수 있다. 상기 효소에 대한 특이적 프로테아제 절단 부위는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 프로테아제-민감성 링커를 제공하기 위해 본원의 링커에서 활용될 수 있다.

[0320] **그룹-특이적 항원 (gag) 단백질 및 바이러스 외피 당단백질**

[0321] 본원에 기재된 BE-VLP는 본원에 기재된 염기 편집기 융합 단백질을 캡슐화하고 전달하기 위해 사용되는 다양한 바이러스 외피 및 캡시드 성분을 포함한다. 핵산 및 단백질 전달을 위한 바이러스 외피 및 캡시드 성분의 사용은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 BE-VLP에서 이들 성분을 사용하거나 또는 대체할 수 있는 관련 기술분야에 공지된 다양한 옵션을 쉽게 이해할 것이다. 핵산 및/또는 단백질 전달 (예를 들어, Cas9의 전달)을 위해 이러한 바이러스 성분의 사용은 예를 들어 [Mangeot *et al.*, *Nat. Commun.* 10, 45 (2019); Gutkin, *et al. Nat. Biotechnol.* (2021); 및 Hamilton, J. R. *et al. Cell Reports* 35(9), 109207 (2021)]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0322] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 BE-VLP는 BE-VLP의 최외층으로서 바이러스 외피 당단백질 층을 포함한다. 바이러스 외피 당단백질은 바이러스 외피, 즉, 숙주 세포 사이를 이동할 때 바이러스 유전 물질을 보호하는 여러 유형의 바이러스의 최외층의 일부를 형성하는 올리고당류-함유 단백질이다. 바이러스 외피가 막과 융합하여, 바이러스 입자의 내용물 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 BE-VLP에서 융합 단백질을 포함할 수 있음)이 숙주 세포에 유입되도록, 당단백질은 표적 세포 막 상의 수용체를 인식하여 그에 결합하는 것을 보조할 수 있다.

[0323] 본 개시내용의 BE-VLP에 사용되는 바이러스 외피 당단백질은 외피 바이러스로부터의 임의의 당단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 아데노바이러스 외피 당단백질, 아데노-연관된 바이러스 외피 당단백질, 레트로바이러스 외피 당단백질, 또는 렌티바이러스 외피 당단백질이다. 특정 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 (VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질 (BaEVRless), FuG-B2 외피 당단백질, 또는 동종지향성 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) 외피 당단백질이다.

[0324] 임의의 공지된 바이러스 외피 당단백질은 본 개시내용의 eVLP에서 사용될 수 있다. 추후에 발견되거나 또는 특징분석되는 임의의 바이러스 외피 당단백질 또한 본 개시내용의 eVLP에서 사용될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 eVLP에서 사용될 수 있는 추가의 바이러스 외피 당단백질을 쉽게 찾을 수 있을 것이다. 예를 들어, 바이러스 외피 당단백질은 [Banerjee, V. and Mukhopadhyay, S. *VirusDisease* (2016), 27(1), 1-11 및 Li, Y. *et al. Front. Immunol.* (2021), *12*, 1-12]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0325] 본원에 기재된 VLP에서 사용되는 바이러스 외피 당단백질은 또한 VLP를 특정한 세포 유형 (예를 들어, 면역 세포, 신경 세포, 망막 색소 상피 세포 등)에 표적화시킬 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 eVLP에서 상이한 외피 당단백질을 사용하면 그들의 세포 친화성이 변경되어, eVLP가 특이적 세포 유형에 표적화되게 할 수 있다. 외래 바이러스 외피 단백질과 조합된 바이러스 벡터를 생성하는 방법은 위형화로 공지되어 있다. 위형화를 이용하여, 외래 바이러스 외피 당단백질을 사용하여 VLP의 세포 친화성을 변경시킬 수 있다. VLP에 도입된 외피 당단백질은 상응하는 숙주 수용체를 갖는 상이한 세포 유형에 쉽게 유입될 수 있게 한다. 바이러스 벡터 시스템의 위형화는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 추가로 예를 들어 [Hamilton, J. R. *et al.* Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Reports.* 2021, *35*, 109207; Kato, S. *et al.* Selective Neural Pathway Targeting Reveals Key Roles of Thalamostriatal Projection in the Control of Visual Discrimination. *J. Neurosci.* 2011, *31(47)*, 17169-17179; 및 Kato, S. *et al.* A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with

fusion envelope glycoprotein. *Human Gene Ther.* 2011, *22(2)*, 197-206]에 기재되어 있고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0326] 따라서, 본원에 기재된 VLP에서 상이한 당단백질의 사용은 그들의 세포 친화성을 변경시키기 위해 사용될 수 있다. 레트로바이러스 친화성은 상이한 외피 당단백질을 갖는 비리온을 위형화시킴으로써 쉽게 조절될 수 있고, 이는 VLP를 특이적 세포 유형에 표적화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 VSV-G 단백질이고, VSV-G 단백질은 VLP를 망막 색소 상피 (RPE) 세포에 표적화시킨다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 HIV-1 외피 당단백질이고, HIV-1 외피 당단백질은 VLP를 CD4+ 세포에 표적화시킨다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 FuG-B2 외피 당단백질이고, FuG-B2 외피 당단백질은 VLP를 뉴런에 표적화시킨다.

[0327] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 VLP를 특정한 세포 유형에 표적화시키기 위해 사용될 수 있는 예시적인 바이러스 외피 당단백질에는 하기 아미노산 서열의 당단백질이 포함되나 이로 제한되지 않는다:

[0328]

HIV-1 외피 당단백질	MRVKEKYQHLWRWGWKWGIMLLGILMICSATENLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAK AYDTEVHNVCATHACVPTDPNPQEVILVNVTENFDMWKNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCV KLTPLCVNLKCTDLKNDTNTNSSNGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRNKVQKEYAFFYKLDIRPI DNTTYRLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDKTFNGTGPCTNVSTVQCTHGI RPVVSTQLLLNGSLAEEEGVIRSANFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKSIRIQRGPGR AFVTIGKIGNMRQAHCNISRAKWMSTLKQIASKLREQFGNNKTVIFKQSSGGDPEIVTHSFNC GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISG QIRCSSNITGLLLTRDGGKNTNESEVFRPGGGDMRDNWRSELYKYKVVKIETLGVAPTKAKR RVVQREKRAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQH LLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQFWNN MTWMEWDREINNYTSLIHSLIDESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKIFIM IVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPNRGGPDRPEGIEEEGGERDRDRSVRLVNG SLALIWDDLRSLCLFSYHRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVS LLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGAYRAIRHIPRRIRQGLERIL (SEQ ID NO: 313)
FuG-B2 외피 당단백질	MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPIYTIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYME LKVGYISAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMAGDP RYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSPVFPGGNCSGVAVSSTYCS TNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLCGVL GLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPGQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKREECLDALESIMTT KSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPSKGCLRVGGRCHPHV NGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELLVSSVIPLMHPLADPSTVFKNGDEAEDFVEV HLPDVHERISGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCWRVGIHLCIKLKHTKKRQIYT DIEMNRLGK (SEQ ID NO: 314)
VSV-G 단백질	MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMP KSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNP GFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS DYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVR LPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAG LPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTERELWDD WAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDE SLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKLKHTKKRQIYTDI EMNRLGK (SEQ ID NO: 315)

[0329] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 eVLP는 바이러스 캡시드로부터의 성분을 포함하는 내부 캡슐화 층을 추가로 포함한다. 이들 성분은 본원에 기재된 바와 같이 gag-pro 폴리단백질 (예를 들어, 그에 연결된 바이러스 프로테아제를 추가로 포함하는 gag 뉴클레오캡시드 단백질) 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 (예를 들어, 여러 바이러스의 내부 쉘의 코어 구조 성분을 구성하고, gag-pro 폴리단백질의 프로테아제가 결여된 단백질)을 포함한다.

[0330] Gag-Pro 폴리단백질은 원형질 막으로부터 비리온의 방출 동안에 또는 직후에 Gag 및 Gag-Pol 폴리단백질 또는 뉴클레오캡시드 단백질의 단백질 분해 절단을 매개한다. 본원에 기재된 eVLP에서, gag-pro 폴리단백질의 프로테아제는 BE-VLP를 표적 세포에 전달한 후 염기 편집기를 방출시키기 위해 융합 단백질의 절단가능한 링커를 절단하는 것을 담당한다. 일부 실시양태에서, gag-pro 폴리단백질은 MMLV gag-pro 폴리단백질 또는 FMLV gag-pro 폴리단백질이다.

[0331] 본 개시내용의 eVLP에서 사용되는 gag 뉴클레오캡시드 단백질은 MMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질, FMLV gag 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 이러한 단백질을 생성하는 임의의 다른 바이러스로부터의 뉴클레오캡시드 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, gag 뉴클레오캡시드 단백질은 (예를 들어, 염기 편집기의 일부로서) napDNAbp에 융합된다. 일부 실시양태에서, 융합은 본원에 기재된 바와 같이 NES를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, gag 뉴클레오캡시드 단백질 및 NES는 본원에 기재된 바와 같이 절단가능한 링커의 한 쪽에 위치하고, napDNAbp 또는 염기 편집기는 절단가능한 링커의 다른 쪽에 위치하여, BE-VLP가 표적 세포에 전달된 후 gag-pro 폴리단백질의 프로테아제에 의해 절단가능한 링커의 절단 시 염기 편집기가 gag 뉴클레오캡시드 단백질로부터 방출될 수 있다.

[0332] 도 1에 도시된 바와 같이, gag-pro 폴리단백질 및 gag 뉴클레오캡시드 단백질 둘 다는 본원에 기재된 eVLP의 내부 캡슐화 층을 형성한다. 본 개시내용의 eVLP에서 gag-pro 폴리단백질 대 gag 뉴클레오캡시드 단백질 (즉, 본

원에 기재된 융합 단백질의 일부로서)의 임의의 비가 고려된다. 일부 실시양태에서, gag-pro 폴리단백질 대 gag 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 융합 단백질의 비는 대략 10:1, 대략 9:1, 대략 8:1, 대략 7:1, 대략 6:1, 대략 5:1, 대략 4:1, 대략 3:1, 대략 2:1, 대략 1.5:1, 대략 1:1, 또는 대략 0.5:1이다. 특정 실시양태에서, 상기 비는 대략 3:1이다.

[0333] **eVLP를 생성하는 방법**

[0334] 한 측면에서, **도 16**에 예시된 바와 같이, 본 개시내용은 본원에 기재된 eVLP를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 eVLP를 생성하는 방법은 eVLP의 모든 성분을 함께 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 복수개의 폴리뉴클레오티드, 또는 본원에 기재된 임의의 벡터)를 생산자 세포에 형질감염시키거나, 형질도입시키거나, 전기천공시키거나 또는 달리 삽입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생산자 세포에 형질감염되거나, 형질도입되거나, 전기천공되거나 또는 달리 삽입된 폴리뉴클레오티드는 하기를 포함한다: (i) 바이러스 외피 당단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드; (ii) 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드; (iii) 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 제3 폴리뉴클레오티드: (a) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질; (b) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp); (c) 절단가능한 링커; 및 (d) 핵 유출 서열 (NES); 및 (iv) 가이드 RNA (gRNA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 gRNA는 제3 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 융합 단백질의 napDNAbp에 결합하는 것인 제4 폴리뉴클레오티드. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 복수개의 폴리뉴클레오티드 중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두를 포함하는 하나 이상의 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 각각의 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리뉴클레오티드는 별도의 벡터 상에 있다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상은 동일한 벡터 상에 있다.

[0335] 일부 실시양태에서, 생산자 세포가 폴리뉴클레오티드를 발현하면, eVLP의 다양한 성분이 생산자 세포 내에서 자발적으로 자가-조립된다. eVLP의 조립은 상기 기재된 바와 같이 폴리뉴클레오티드에 코딩된 gag 폴리단백질의 다량체화에 의존한다. gag 폴리단백질 (일부는 유전자 편집제, 예컨대 Cas9 단백질 또는 염기 편집기에 융합됨)은 생산자 세포의 세포 막에서 다량체화되고, 후속적으로 생산자 세포 상청액으로 자발적으로 방출된다. 따라서, BE-eVLP는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 생산자 세포 (예를 들어, 게시클(Gesicle) 생산자 293T 세포)의 일시적인 형질감염에 의해 생성될 수 있다. eVLP의 생성에 필요한 모든 폴리뉴클레오티드를 생산자 세포에 동시에 형질감염시킬 수 있거나, 또는 필요한 각각의 폴리뉴클레오티드를 한번에 하나씩 형질감염시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 eVLP를 생성하는데 필요한 모든 성분을 코딩한다. 생산자 세포의 형질감염 및 인큐베이션 후에 (예를 들어, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 15시간, 약 24시간, 약 36시간, 약 48시간, 또는 48시간 초과 동안), 생산자 세포 상청액을 수확하고, 그로부터 eVLP를 정제할 수 있다.

[0336] 외래 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있는 임의의 세포를 사용하여 본원에 기재된 eVLP를 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 eVLP의 생성을 위해 본원에서 키트 및 세포 섹션에 나열된 임의의 세포, 또는 외래 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 세포의 사용을 고려한다.

[0337] eVLP의 다양한 자가-조립 성분를 코딩하는 발현 플라스미드의 세트를 사용하여 생산자 세포에서의 BE RNP를 포함하는 eVLP (예를 들어, BE-VLP)의 제조 실시양태의 개요: (a) Gag-BE 융합 단백질 (예를 들어, 레트로바이러스 Gag, MMLV-Gag-BE 융합 단백질)을 코딩하는 플라스미드; (b) Gag-Pro-Pol 단백질 (예를 들어, 레트로바이러스 단백질, 예컨대 MMLV 프로테아제 전구체)을 코딩하는 플라스미드; (c) BE sgRNA를 코딩하는 플라스미드; 및 (d) 외피 당단백질 (예를 들어, 수포성 구내염 바이러스 (VSV-G)의 스파이크 당단백질)을 코딩하는 플라스미드. 플라스미드는 일시적으로 생산자 세포에 동시 형질감염되고, 코딩된 단백질 및 sgRNA 생성물이 코딩된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 4세대 eVLP와 같이, 본 발명자들은 VLP로 패키징되는데 이용되는 Gag-카고의 양과 VLP 성숙을 위해 필요한 레트로바이러스 프로테아제 (Gag-Pro-Pol 융합에서 "Pro")의 양 사이에 균형을 이루는 Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 화학량론 비를 발견하였다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합 단백질의 최적화된 비는 생산자 세포에 일시적으로 전달되는 각각의 성분을 코딩하는 플라스미드의 적절한 비에 의해 달성된다. 한 실시양태에서, Gag-카고 융합 대 Gag-Pro-Pol 융합의 화학량론을 조절하기 위해, VLP 생성을 위해 형질감염되는 Gag-카고를 코딩하는 플라스미드 (예를 들어, Gag-3xNES-ABE8e) 대 야생형 MMLV gag-pro-pol 플라스미드의 비를 변화시켰다. gag-카고 플라스미드의 양을 v3.4 BE-eVLP를 생성하기 위해 사용되는 원래의 비율보다 높게 증가시키면 (38% Gag-카고 플라스미드 및 62% gag-pro-pol 플라스미드) 편집 효율이 개선되지 않는다는 것이 발견되었다 (**도 2g**). gag-카고 플라스미드의 비율을 38%에서 25%로

감소시키면 편집 효율이 적당히 개선되었다 (**도 2g**). 그러나, gag-카고 플라스미드의 비율을 25% 아래로 추가로 감소시키면 편집 효율이 감소되었다 (**도 2g**). 이들 결과는 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 gag-카고의 양과 VLP 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 모델과 일치한다. 한 실시양태에서, 최적화의 이러한 최종 라운드 결과를 통해 4세대 (v4) BE-eVLP 제형이 밝혀졌고 (**도 2g**), 이는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론 (25% gag-BE)과 v3.4 BE-eVLP 아키텍처를 조합한다.

[0338] **도 16**에 도시된 바와 같이, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이 eVLP (예를 들어, BE-VLP) 자가-조립 성분을 코딩하는 복수개의 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 복수개의 폴리뉴클레오티드를 제공한다: (i) 바이러스 외피 당단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드); (ii) 그룹-특이적 항원 (gag) 프로테아제 (pro) 폴리단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드); (iii) 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, , 여기서 융합 단백질은 하기를 포함하는 것인 제3 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드): (a) 그룹-특이적 항원 (gag) 뉴클레오캡시드 단백질; (b) 핵산 프로그래밍가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp); (c) 절단가능한 링커; 및 (d) 핵 유출 서열 (NES); 및 (iv) 가이드 RNA (gRNA)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제4 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 플라스미드). 일부 실시양태에서, gRNA는 제3 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 융합 단백질의 napDNAbp에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비는 대략 10:1, 대략 9:1, 대략 8:1, 대략 7:1, 대략 6:1, 대략 5:1, 대략 4:1, 대략 3:1, 대략 2:1, 대략 1.5:1, 대략 1:1, 또는 대략 0.5:1이다. 특정 실시양태에서, 제2 폴리뉴클레오티드 대 제3 폴리뉴클레오티드의 비는 대략 3:1이다.

[0339] **제약 조성물**

[0340] 본 개시내용의 다른 측면은 본원에 기재된 임의의 eVLP, 융합 단백질, 및 폴리뉴클레오티드/복수개의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "제약 조성물"은 제약학적 용도로 제형화된 조성물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 (예를 들어, 특이적 전달, 반감기 증가, 또는 다른 치료용 화합물을 위해) 추가의 작용제를 포함한다.

[0341] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 화합물을 신체의 한 부위 (예를 들어, 전달 부위)에서 또 다른 부위 (예를 들어, 장기, 조직 또는 신체 일부)로 운반하거나 또는 수송하는데 관여하는 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제 (예를 들어, 윤활제, 활석 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 용매 캡슐화 물질을 의미한다. 제약상 허용가능한 담체는 제형의 다른 성분과 상용성이고, 대상체의 조직을 손상시키지 않는다는 관점에서 "허용가능한" 것이다 (예를 들어, 생리학적 상용성, 멸균성, 생리학적 pH 등). 제약상 허용가능한 담체의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예에는 하기가 포함된다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 그의 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말형 트래거캔쓰; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 술페이트 및 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제용 왁스; (9) 오일, 예컨대 낙화생유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충화제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원-무함유 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충된 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 및/또는 폴리무수물; (22) 벌크화제, 예컨대 폴리펩티드 및 아미노산; (23) 혈청 성분, 예컨대 혈청 알부민, HDL 및 LDL; (22) C2-C12 알콜, 예컨대 에탄올; 및 (23) 제약 제형에서 사용되는 다른 무독성 상용성 물질. 습윤제, 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 향미제, 향료, 보존제, 및 항산화제 또한 제형에 존재할 수 있다. "부형제", "담체", "제약상 허용가능한 담체" 등과 같은 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0342] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 예를 들어 유전자 편집을 위해 대상체에게 전달된다. 본원에 기재된 제약 조성물의 적합한 투여 경로에는 비제한적으로 국소, 피하, 경피, 피내, 병변내, 관절내, 복강내, 방광내, 경점막, 치은, 치아내, 와우내, 경고막, 장기내, 경막외, 척수강내, 근육내, 정맥내, 혈관내, 골내, 안구주위, 종양내, 대뇌내, 및 뇌실내 투여가 포함된다.

[0343] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 발병 부위 (예를 들어, 종양 부위)에 국소적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 주사에 의해, 카테터에 의해, 좌제에 의해, 또는 이식편에 의해 대상체에게 투여되며, 이식편은 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴성 물질, 예컨대 막, 예컨대 시알라스틱 막, 또는 섬유이다.

[0344] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 제어된 방출 시스템으로 전달된다. 한 실시양태에서, 펌프가 사용될 수 있다 (예를 들어, [Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC *Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574] 참조). 또 다른 실시양태에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있다. (예를 들어, [*Medical Applications of Controlled Release* (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61] 참조. 또한 [Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105] 참조). 다른 제어된 방출 시스템은 예를 들어 상기 랭어(Langer)의 문헌에서 논의된다.

[0345] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 대상체, 예를 들어 인간에게 정맥내 또는 피하 투여하기에 적합한 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제형화된다. 일부 실시양태에서, 주사에 의한 투여를 위한 제약 조성물은 멸균성 등장성 수성 완충제 중의 용액이다. 필요에 따라, 제약 조성물은 또한 주사 부위의 통증을 완화시키기 위해 가용화제 및 국소 마취제, 예컨대 리그노카인을 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분들은 예를 들어 활성 작용제의 양을 나타내는 밀봉된 컨테이너, 예컨대 앰풀 또는 샤쉐 중의 건식 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 단위 투여 용기에서 별도로 또는 함께 혼합되어 공급된다. 제약 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 이는 멸균성 제약학적 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 주입 보틀에 의해 분배될 수 있다. 제약 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰풀이 제공될 수 있다.

[0346] 전신 투여를 위한 제약 조성물은 액체, 예를 들어 멸균성 식염수, 젖산 링거 또는 행크 용액일 수 있다. 또한, 제약 조성물은 고체 형태일 수 있고, 사용 직전에 재용해 또는 현탁될 수 있다. 동결건조된 형태 또한 고려된다.

[0347] 제약 조성물은 지질 입자 또는 소포, 예컨대 리포솜 또는 미세결정 내에 함유될 수 있으며, 이는 비경구 투여에 또한 적합하다. 입자는 조성물이 그 안에 함유되는 한 임의의 적합한 구조, 예컨대 단층 또는 복수층일 수 있다. 화합물은 융합성 지질 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 낮은 수준 (5-10 mol%)의 양이온성 지질을 함유하고, 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 코팅에 의해 안정화된 "안정화된 플라스미드-지질 입자" (SPLP)에 포획될 수 있다 (Zhang Y. P. *et al.*, *Gene Ther.* 1999, 6:1438-47). 양으로 하전된 지질, 예컨대 N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸-암모늄메틸술페이트, 또는 "DOTAP"가 이러한 입자 및 소포에 특히 바람직하다. 이러한 지질 입자의 제조는 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,880,635; 4,906,477; 4,911,928; 4,917,951; 4,920,016; 및 4,921,757을 참조하며; 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0348] 본원에 기재된 제약 조성물은 예를 들어 단위 용량으로 투여되거나 또는 패키징될 수 있다. 용어 "단위 용량"은 본 개시내용의 제약 조성물과 관련하여 사용될 때 대상체에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 필요한 희석제; 즉, 담체 또는 비히클와 함께 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 활성 물질의 미리 결정된 양을 함유한다.

[0349] 추가로, 제약 조성물은 (a) 본 발명의 화합물을 동결건조된 형태로 함유하는 컨테이너 및 (b) 주사용 제약상 허용가능한 희석제 (예를 들어, 멸균수)를 함유하는 제2 컨테이너를 포함하는 제약학적 키트로서 제공될 수 있다. 제약상 허용가능한 희석제는 본 발명의 동결건조된 화합물의 재구성 또는 희석을 위해 사용될 수 있다. 임의적으로 이러한 컨테이너(들)은 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지서와 연관될 수 있으며, 통지서는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0350] 또 다른 측면에서, 상기 기재된 질환의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 포함된다. 일부 실시양태에서, 제조 물품은 컨테이너 및 표지를 포함한다. 적합한 컨테이너에는 예를 들어 보틀, 바이알, 시린지, 및 시험관이 포함된다. 컨테이너는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 컨테이너는 질환 치료에 효과적인 조성물을 담으며, 멸균성 접근 포트를 가질 수 있다. 예를 들어, 컨테이너는 피하 주사 니들로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다. 조성물 중의 활성 작용제는 본 발명의 화합물이다. 일부 실시양태에서, 컨테이너 상의 또는 그와 연관된 표지는 조성물이 선택된

질환을 치료하기 위해 사용됨을 나타낸다. 제조 물품은 제약상 허용가능한 완충제, 예컨대 인산염-완충된 식염수, 링거 용액, 또는 덱스트로스 용액을 함유하는 제2 컨테이너를 추가로 포함할 수 있다. 이는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예컨대 다른 완충제, 희석제, 여과기, 니들, 시린지, 및 사용 지침을 갖는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0351] **키트 및 세포**

[0352] 본 개시내용의 융합 단백질, eVLP 및 조성물은 키트로 조립될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 eVLP의 발현 및 조립을 위한 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시양태에서, 키트는 적절한 가이드 뉴클레오티드 서열, 또는 이러한 가이드 뉴클레오티드 서열의 발현을 위한 핵산 벡터를 추가로 포함하여, eVLP에 의해 전달되는 염기 편집기의 Cas9 단백질을 원하는 표적 서열에 표적화시킨다.

[0353] 본원에 기재된 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 성분들을 하우징하는 하나 이상의 컨테이너, 및 임의적으로 사용 지침을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 키트는 본원에 기재된 염기 편집 방법을 수행하기 위해 필요한 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 키트의 각각의 성분은 적용가능한 경우 액체 형태 (예를 들어, 용액) 또는 고체 형태 (예를 들어, 건조 분말)로 제공될 수 있다. 특정 경우에, 성분들 중 일부는 예를 들어 키트와 함께 제공되거나 또는 제공되지 않을 수 있는 적합한 용매 또는 다른 종 (예를 들어, 물)의 첨가에 의해 (예를 들어, 활성 형태로) 재구성가능하거나 또는 달리 가공가능할 수 있다.

[0354] 일부 실시양태에서, 키트는 임의적으로 제공된 성분의 사용에 대한 지침 및/또는 홍보를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "지침"은 지침 및/또는 홍보의 성분을 정의하고, 전형적으로 본 개시내용의 패키징 상의 또는 그와 연관된 서면 지침을 수반한다. 지침은 또한 사용자가 지침이 키트와 연관되어 있음을 명확하게 인식하도록 하는 임의의 방식으로 임의의 구두 또는 전자 지침, 예를 들어 시청각 자료 (예를 들어, 비디오테이프, DVD 등), 인터넷, 및/또는 웹-기반 통신 등을 포함할 수 있다. 서면 지침은 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태일 수 있고, 이는 또한 동물 투여에 대한 제조, 사용 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "홍보"에는 교육 방법, 병원 및 다른 임상 지침, 과학적 조사, 약물 발견 또는 개발, 학술 연구, 의약품 판매를 비롯한 제약 산업 활동, 및 임의의 형태의 서면, 구두 및 전자 통신을 비롯한 다른 홍보 활동을 비롯하여 본 개시내용과 연관된 모든 사업 수행 방법이 포함된다. 추가로, 키트는 본원에 기재된 바와 같이 특정한 적용에 따라 다른 성분을 포함할 수 있다.

[0355] 키트는 하나 이상의 컨테이너에서 본원에 기재된 성분 중 임의의 하나 이상을 함유할 수 있다. 성분은 멸균으로 준비되고, 시린지에 패키징되고, 냉장 배송될 수 있다. 대안적으로, 이들은 보관을 위해 바이알 또는 다른 컨테이너에 하우징될 수 있다. 제2 컨테이너는 멸균으로 준비된 다른 성분을 가질 수 있다. 대안적으로, 키트는 바이알, 튜브, 또는 다른 컨테이너에서 미리 혼합되고 배송되는 활성 작용제를 포함할 수 있다.

[0356] 키트는 다양한 형태, 예컨대 블리스터 파우치, 수축-포장 파우치, 진공 밀봉가능한 파우치, 밀봉가능한 열성형된 트레이, 또는 유사한 파우치 또는 트레이 형태일 수 있으며, 부속품은 파우치, 하나 이상의 튜브, 컨테이너, 박스, 또는 백 내에 느슨하게 패키징된다. 키트는 부속품이 첨가된 후에 멸균될 수 있으며, 이로써 컨테이너의 개별 부속품은 달리 풀 수 있게 된다. 키트는 임의의 적절한 멸균 기술, 예컨대 방사선 멸균, 열 멸균, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 멸균 방법을 이용하여 멸균될 수 있다. 키트는 또한 특정한 적용에 따라 다른 성분, 예를 들어 컨테이너, 세포 배지, 염, 완충제, 시약, 시린지, 니들, 소독제를 바르거나 또는 제거하기 위한 패브릭, 예컨대 거즈, 일회용 장갑, 투여 전 작용제를 위한 지지체 등을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 일부 측면은 본원에 기재된 eVLP의 다양한 성분 (예를 들어, napDNAbp, 데아미나제 도메인, gag 단백질, gRNA, 및 바이러스 외피 당단백질을 비롯하여 이로 제한되지 않음)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 구축물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열(들)은 BE-VLP 시스템 성분의 발현을 유도하는 이종성 프로모터 (또는 1개 초과의 단일 프로모터)를 포함한다.

[0357] 본 개시내용의 다른 측면은 본원에 기재된 BE-VLP 시스템의 다양한 성분을 코딩하는 하나 이상의 핵산 구축물, 예를 들어 염기 편집기를 표적 세포에 전달할 수 있는 BE-VLP 시스템의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열은 BE-VLP 시스템 성분의 발현을 유도하는 이종성 프로모터를 포함한다.

[0358] 본원에 기재된 임의의 eVLP, 융합 단백질, 및 조성물을 함유할 수 있는 세포에는 원핵생물 세포 및 진핵생물 세포가 포함된다. eVLP의 생성과 관련된 다양한 측면에서, 본 개시내용은 VLP-생산자 세포주, 즉, 다양한 실시양

태에서 eVLP의 단백질 및 핵산 성분을 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질전환되는 세포주로서 사용하기 위한 임의의 적합한 세포를 제공한다. eVLP의 적용과 관련된 다양한 다른 측면에서, 본 개시내용은 임의의 적합한 표적 또는 수용자 세포, 예를 들어 BE-VLP에 의해 전달되는 염기 편집에 의한 치료를 필요로 하는 대상체에서 발병 세포 또는 조직을 제공한다. 본원에 기재된 방법은 진핵생물 세포 (예를 들어, 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포)에 염기를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관내에 있다 (예를 들어, 배양된 세포). 일부 실시양태에서, 세포는 생체내에 있다 (예를 들어 대상체, 예컨대 인간 대상체). 일부 실시양태에서, 세포는 생체외에 있다 (예를 들어, 대상체로부터 단리되고, 동일한 또는 상이한 대상체에게 다시 투여될 수 있음).

[0359] 전형적으로, 진핵생물 세포는 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포, 닭 세포 또는 곤충 세포이다. 적합한 포유동물 세포의 예에는 HEK-293T 세포, COS7 세포, Hela 세포 및 HEK-293 세포가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 적합한 곤충 세포의 예에는 High5 세포 및 Sf9 세포가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 곤충 세포에는 바람직하지 않은 인간 단백질이 없고, 그들의 배양은 동물 혈청을 필요로 하지 않는다.

[0360] 본 개시내용의 포유동물 세포에는 인간 세포, 영장류 세포 (예를 들어, vero 세포), 래트 세포 (예를 들어, GH3 세포, OC23 세포) 또는 마우스 세포 (예를 들어, MC3T3 세포)가 포함된다. 비제한적으로 인간 배아 신장 (HEK) 세포, HeLa 세포, 국립 암 연구소의 60가지 암 세포주 (NCI60)로부터의 암 세포, DU145 (전립선암) 세포, Lncap (전립선암) 세포, MCF-7 (유방암) 세포, MDA-MB-438 (유방암) 세포, PC3 (전립선암) 세포, T47D (유방암) 세포, THP-1 (급성 골수성 백혈병) 세포, U87 (교모세포종) 세포, SHSY5Y 인간 신경모세포종 세포 (골수종으로부터 클로닝됨) 및 Saos-2 (골암) 세포를 비롯한 다양한 인간 세포주가 있다. 일부 실시양태에서, eVLP는 인간 배아 신장 (HEK) 세포 (예를 들어, HEK 293 또는 HEK 293T 세포)에 전달된다. 일부 실시양태에서, eVLP는 줄기 세포 (예를 들어, 인간 줄기 세포), 예를 들어 다능성 줄기 세포 (예를 들어, 인간 유도 다능성 줄기 세포 (hiPSC)를 비롯한 인간 다능성 줄기 세포)에 전달된다. 줄기 세포는 배양 시 무기한 분열하여 특수화된 세포를 생성하는 능력을 가진 세포를 지칭한다. 다능성 줄기 세포는 유기체의 모든 조직으로 분화할 수 있지만, 단독으로는 완전한 유기체 발달을 유지할 수 없는 유형의 줄기 세포를 지칭한다. 인간 유도 다능성 줄기 세포는 배아 줄기 세포의 정의 성질을 유지하는데 중요한 유전자 및 인자를 발현하도록 강제됨으로써 배아 줄기 세포-유사 상태로 프로그래밍된 체세포 (예를 들어, 성숙 또는 성체)를 지칭한다 (예를 들어, [Takahashi and Yamanaka, *Cell* 126 (4): 663-76, 2006]를 참조하며, 본원에 참조로 포함됨). 인간 유도 다능성 줄기 세포 세포는 줄기 세포 마커를 발현하고, 3가지 배엽층 (외배엽, 내배엽, 중배엽) 모두의 세포 특징을 생성할 수 있다.

[0361] 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 세포주의 추가의 비제한적인 예에는 293-T, 293-T, 3T3, 4T1, 721, 9L, A-549, A172, A20, A253, A2780, A2780ADR, A2780cis, A431, ALC, B16, B35, BCP-1, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C2C12, C3H-10T1/2, C6, C6/36, Cal-27, CGR8, CHO, CML T1, CMT, COR-L23, COR-L23/5010, COR-L23/CPR, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, E14Tg2a, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, Hepa1c1c7, High Five 세포, HL-60, HMEC, HT-29, HUVEC, J558L 세포, Jurkat, JY 세포, K562 세포, KCL22, KG1, Ku812, KYO1, LNCap, Ma-Mel 1, 2, 3....48, MC-38, MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDCK II, MG63, MONO-MAC 6, MOR/0.2R, MRC5, MTD-1A, MyEnd, NALM-1, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NW-145, OPCN/OPCT Peer, PNT-1A/PNT 2, PTK2, Raji, RBL 세포, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, S2, Saos-2 세포, Sf21, Sf9, SiHa, SKBR3, SKOV-3, T-47D, T2, T84, THP1, U373, U87, U937, VCaP, WM39, WT-49, X63, YAC-1, 및 YAR 세포가 포함된다.

[0362] 본 개시내용의 일부 측면은 본원에 개시된 임의의 구축물을 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 일시적으로 또는 비-일시적으로 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체에서 천연 발생하는 것과 같이 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 형질감염된 세포를 대상체로부터 채취한다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체로부터 채취한 세포, 예컨대 세포주로부터 유래된다. 조직 배양을 위한 매우 다양한 세포주가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 세포주의 예에는 C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEKn, HEKa, MiaPaCell, Panc1, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388D1, SEM-K2, WEHI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, BS-C-1 원숭이 신장 상피, BALB/3T3 마우스 배아 섬유모세포, 3T3 Swiss, 3T3-L1, 132-d5 인간 태아 섬유모세포; 10.1 마우스 섬유모세포, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A 172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16,

B35, BCP-1 세포, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293. BxPC3. C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1, CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr -/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepa1c1c7, HL-60, HMEC, HT-29, Jurkat, JY 세포, K562 세포, Ku812, KCL22, KG1, KYO1, LNCap, Ma-Mel 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK 11, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1A, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, OPCN/OPCT 세포주, Peer, PNT-1A/PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, Saos-2 세포, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, THP1 세포주, U373, U87, U937, VCaP, Vero 세포, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR, 및 이들의 트랜스제닉 변종이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0363] 세포주는 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 다양한 공급원으로부터 입수가능하다 (예를 들어, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC) (버지니아주 마나사스) 참조). 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 형질감염된 세포를 사용하여, 하나 이상의 벡터-유래된 서열을 포함하는 새로운 세포주를 확립한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CRISPR 시스템의 성분으로 일시적으로 형질감염되고 (예컨대 하나 이상의 벡터의 일시적인 형질감염, 또는 RNA에 의한 형질감염), CRISPR 복합체의 활성을 통해 변형된 세포를 사용하여, 변형을 함유하는 세포를 포함하지만 임의의 다른 외인성 서열이 결여된 새로운 세포주를 확립한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터로 일시적으로 또는 비-일시적으로 형질감염된 세포, 또는 이러한 세포로부터 유래된 세포주는 하나 이상의 시험 화합물을 평가하는데 사용된다.

[0364] **실시예**

[0365] ***실시예 1. 조작된 DNA-무함유 바이러스-유사 입자 (eVLP)를 사용하여 최소 표적-이탈 활성으로 치료적 생체내 염기 편집***

[0366] 염기 편집기 (BE)는 살아있는 유기체의 게놈 DNA에서 병원성 점 돌연변이의 치료적 교정을 가능하게 한다. 생체내에서 BE를 전달하기 위해 다양한 전략이 이용되었지만, BE 리보핵단백질 (RNP)을 동물의 조직에 전달하는 방법은 DNA 또는 mRNA를 전달하는 기존 접근법에 비해 중요한 안전성 이점을 제공할 것이다. DNA 전달 또는 원치않는 DNA 통합 가능성이 없이 BE 또는 Cas9 RNP를 효율적으로 패키징하고 전달하는 바이러스-유사 입자인 조작된 VLP (eVLP, 본원에서 BE-VLP로도 지칭됨)의 광범위한 조작 및 적용이 본원에서 보고된다. 카고 패키징, 방출, 및 국소화 병목 현상을 극복하기 위해 VLP 아키텍처를 반복적으로 조작함으로써, 표적-이탈 편집의 검출을 최소화하면서 다양한 세포 유형 및 내인성 게놈 로커스에 걸쳐 시험관내에서 효율적인 표적-적중 염기 편집을 매개할 뿐만 아니라, 1세대 VLP와 비교하여 Cas9 뉴클레아제 전달 후 4.7배 더 높은 편집을 나타내는 최적화된 4세대 eVLP가 생성되었다. eVLP에서 상이한 당단백질을 사용하면 그들의 세포 친화성이 변경된다. 최적화된 eVLP는 또한 마우스에게 단일 주사 후 다중 장기에서 생체내 염기 편집을 지원하여, 이전에 기재된 VLP 아키텍처에 비해 간에서 26배 더 높은 편집 효율 및 혈청 Pcsk9 수준의 78% 녹다운 뿐만 아니라, 유전적 실명의 마우스 모델에서 시각 기능의 부분적인 복원을 일으켰다. eVLP로 처리 후 표적-이탈 편집 빈도는 플라스미드 DNA 또는 AAV에 의한 염기 편집기 전달에 비해 배양된 세포 및 생체내 둘 다에서 실질적으로 더 낮았다. eVLP는 세포 생존력에 영향을 미치지 않거나 또는 검출된 간 병리학을 유발하지 않는다. eVLP의 세포-유형 친화성은 상이한 외피 당단백질에 의한 위형화에 의해 제어될 수 있다. 이들 결과는 표적-이탈 편집 또는 DNA 통합의 위험을 최소화하는 생체내 치료적 염기 편집을 위한 유망한 방법으로서 eVLP를 확립한다.

[0367] 세포를 감염시킬 수 있지만 바이러스 유전 물질이 결여된 바이러스 단백질의 조립체인 바이러스-유사 입자 (VLP)는 RNP로서 유전자 편집제를 전달하기 위한 잠재적으로 유망한 비히클로 부상하였다 (Campbell *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2016; Gee *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2021; Indikova and Indik, 2020; Lyu *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Mangeot *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). RNP 카고를 전달하는 VLP는 바이러스 전달의 효율 및 조직 표적화 이점을 활용하지만, 바이러스 게놈 통합 및 편집제의 연장된 발현과 연관된 위험을 피한다. 그러나, 유전자 편집제 RNP를 전달하기 위한 기존의 VLP-매개된 전략은 지금까지 생체내에서 낮은 내지 중간 정도의 편집 효율 또는 그들의 치료 효능의 제한된 검증을 지원한다 (Campbell *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2016; Gee *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2021; Indikova and Indik, 2020; Lyu *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Mangeot *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). 실제로, RNP-패키징 VLP를 사용하는 산후 생체내 유전자 편집의 치료 수준은 이전에 보고된 적이 없다.

[0368] 시험관내에서 및 생체내에서 Cas9 뉴클레아제 및 염기 편집기를 포함하는 치료적 RNP를 패키징하고 전달하기 위한 조작된 VLP 플랫폼인 eVLP의 개발 및 적용이 본원에 기재되며, 이는 바이러스 및 비-바이러스 전달 전략 둘

다의 주요 이점을 제공한다. 광범위한 VLP 아키텍처 조작은 이전에 보고된 VLP를 기반으로 하는 초기 설계와 비교하여 평균 16배 더 많은 BE RNP를 패키징하는 4세대 eVLP를 생성하였다 (Mangeot *et al.*, 2019). 이들 eVLP는 다중 불멸화된 세포주, 일차 인간 및 마우스 섬유모세포, 및 일차 인간 T 세포를 비롯한 다양한 세포 유형에서 최소 표적-이탈 편집으로 고도로 효율적인 염기 편집을 가능하게 할 뿐만 아니라, 이전에 보고된 Cas9-VLP와 비교하여 Cas9 뉴클레아제-매개된 indel 형성을 4.7배 개선시켰다. 마우스에게 eVLP의 단일 생체내 주사는 다중 장기에서 다양한 표적 유전자의 효율적인 염기 편집을 매개하였고, 혈청 Pcsk9 수준을 강력하게 녹다운시켰으며, 유전적 실명의 마우스 모델에서 시각 기능을 부분적으로 복원시켰다. 이들 결과는 치료적 관련 효율, 및 표적-이탈 편집 또는 DNA 통합의 최소 위험으로 생체내에서 유전자 편집제 (예를 들어, BE)를 일시적으로 전달하는데 유용한 플랫폼으로서 eVLP를 확립하고, 본원에 기재된 eVLP는 다른 단백질 및 RNP의 생체내 전달을 유사하게 개선시킬 수 있다.

[0369] **결과**

[0370] *레트로바이러스 스캐폴드는 효율적인 염기 편집기 VLP를 지원한다*

[0371] 레트로바이러스가 염기 편집기 VLP (BE-VLP, 일명 "eVLP")를 조작하기 위한 매력적인 스캐폴드인 것으로 가정하였다. 레트로바이러스 캡시드에는 일반적으로 여러 비-외피 20면체 바이러스의 엄격한 대칭 요건이 없으며 (Zhang *et al.*, 2015), 이는 비-천연 단백질 카고를 혼입시키기 위한 구조적 융통성의 증가를 시사한다. 추가로, 레트로바이러스 친화성은 상이한 외피 당단백질을 갖는 비리온을 위형화시킴으로써 쉽게 조절될 수 있으며, 이는 eVLP를 특이적 세포 유형에 표적화하는 것을 가능하게 할 수 있다 (Cronin *et al.*, 2005). 이전의 작업은 원하는 단백질 카고를 레트로바이러스 gag 폴리단백질의 C-말단에 융합시키는 것이 레트로바이러스 입자 내에서 해당 카고 단백질의 직접적인 패키징에 충분하다는 것을 입증하였다 (Kaczmarczyk *et al.*, 2011; Voelkel *et al.*, 2010). 더욱 최근에, 레트로바이러스 입자 내에서 Cas9 RNP를 패키징하기 위해 유사한 전략이 적용되었다 (Hamilton *et al.*, 2021; Mangeot *et al.*, 2019). 따라서, 레트로바이러스 스캐폴드가 BE 활성을 보존하는 방식으로 효율적인 BE-VLP 형성을 지원할 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0372] 초기 (v1) BE-VLP 설계로서, 고활성 아데닌 염기 편집기인 ABE8e (Richter *et al.*, 2020)는 입자 성숙 시 FMLV 프로테아제에 의해 절단되는 링커 펩티드를 통해 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스 (FMLV) gag 폴리단백질의 C-말단에 융합되었다 (**도 1a**). FMLV-기반 VLP는 이전에 Cas9 RNP를 패키징하고 전달하기 위해 성공적으로 사용되었다 (Mangeot *et al.*, 2019). eVLP는 이러한 FMLV gag-ABE8e 융합 구축물, 야생형 FMLV gag-pro-pol 폴리단백질, VSV-G 외피 당단백질, 및 HEK293T 세포 게놈 부위 2 또는 부위 3 (이후 *HEK2* 또는 *HEK3*으로 지칭됨)을 표적화하는 sgRNA를 발현하는 플라스미드로 게시클 293T 생산자 세포를 형질감염시킴으로써 생성되었다.

[0373] 생산자 세포 상청액으로부터 eVLP를 수확한 후에, 시험관내에서 HEK293T 세포에 농축된 eVLP를 형질도입시켰다. 고무적으로, v1 eVLP는 분류되지 않은 세포에서 가장 높은 용량에서 >97%의 효율로 HEK2 및 HEK3 게놈 로커스를 강력하게 편집하였다 (**도 1b**). 이들 eVLP가 Cas9, MLV 캡시드, 및 VSV-G 단백질을 함유한다는 것을 이뮤노블롯팅을 통해 확인하였다 (**도 8a**). 이들 관찰은 FMLV 레트로바이러스 스캐폴드가 BE-VLP 형성을 지원하고, v1 eVLP가 시험관내에서 HEK293T 세포를 효율적으로 형질도입시키고 편집할 수 있음을 나타낸다.

[0374] *VLP 성숙 후 카고 방출의 개선*

[0375] v1 eVLP가 HEK293T 세포에서 *HEK2* 및 *HEK3* 로커스를 강력하게 편집하지만, 일반적으로 사용되는 이들 시험 로커스는 특히 유전자 편집에 용이하고, 치료적 관련성이 부족하다 (Anzalone *et al.*, 2020). eVLP의 치료 잠재성 평가를 시작하기 위해, β-헤모글로빈병증의 치료를 위해 확립된 염기 편집 전략인 적혈구에서 태아 헤모글로빈의 발현을 상향조절하는 *BCL11A* 적혈구-특이적 인핸서에 돌연변이를 설치하는 그들의 능력 (Richter *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020)을 평가하였다. v1 eVLP가 고용량에서 HEK293T 세포의 *BCL11A* 인핸서 로커스에서 73% 편집 효율을 달성하였지만, 용량이 감소함에 따라 편집 수준이 급격히 떨어지는 것으로 관찰되었다 (**도 8b**). 이들 결과는 v1 BE-VLP 활성이 개선될 수 있음을 나타내었다.

[0376] 유리 ABE8e RNP를 유리시키기 위해 입자 성숙 후 MLV 프로테아제에 의한 gag-ABE8e 링커의 절단이 필요하다. 링커 절단 효율이 BE-VLP 편집에 병목 현상을 일으킬 수 있다고 추론되었다 (**도 2a**). 이 가설을 시험하기 위해, MLV gag와 ABE8e 사이에 다양한 프로테아제-절단가능한 링커 서열을 함유하는 일련의 2세대 (v2) 조작된 BE-eVLP를 구축하였다 (**도 8c**). 먼저, 레트로바이러스 스캐폴드는 프렌드 MLV에서 몰로니 MLV (MMLV) (프로테아제 기질 특이성이 광범위하게 특징분석되어 있는 유사한 MLV 균주임)로 전환되었다 (Feher *et al.*, 2006). 이어서, MMLV 프로테아제에 의해 다양한 효율로 절단되는 것으로 공지된 4가지 상이한 링커 서열을 스크리닝하

고, v1 eVLP에 비해 편집 효율을 개선시킨 여러 새로운 gag-ABE8e 링커를 확인하였다 (**도 2b**). 구체적으로, v2.4 BE-eVLP는 v1 eVLP에 비해 시험한 모든 용량에서 1.2-1.5배 더 높은 편집 효율을 나타내었다 (**도 2b**). v2.1-v2.4 BE-eVLP에서 링커 서열의 절단 효율을 조사하기 위해, 웨스턴 블롯을 수행하여, 정제된 eVLP에 존재하는 전장 gag-ABE8e에 대한 절단된 ABE8e의 분율을 결정하였다. 이 분석을 통해, v2.4 링커가 v2.1 및 v2.2 링커에 비해 더 효율적으로 절단되지만, v2.3 링커에 비해서는 덜 효율적으로 절단된다는 것이 밝혀졌다 (**도 8d-8e**).

[0377] 이들 발견은 v2.4 BE-eVLP에서 링커 서열이 VLP 성숙 후에 ABE8e RNP의 효율적인 방출을 지원하지만, VLP로 그의 혼입 전에는 ABE8e RNP의 조기 방출을 방지하는 최적의 속도로 절단되는 모델을 뒷받침한다. 이들 발견은 gag-카고 단백질 링커 서열이 VLP 아키텍처의 중요한 파라미터이고, 이들 두 제한 사이에서 링커 절단 동역학의 균형을 이루기 위해 이 서열을 최적화하면 eVLP 활성을 개선시킬 수 있음을 입증한다.

[0378] *eVLP로의 카고 국소화 및 로딩의 개선*

[0379] 이전에 최적화된 BE는 그들의 N- 및 C-말단에서 이분절 핵 국소화 신호 (NLS)에 융합되고, 이는 BE의 핵 유입을 촉진시키고, 게놈 DNA에 대한 그들의 접근을 증강시킨다 (Koblan *et al.*, 2018). 그러나, gag-BE 융합체는 형성될 때 VLP에 혼입되기 위해 생산자 세포의 세포질 및 외부 막에 국소화되어야 한다 (**도 2c**). gag-BE 융합체 내에 2개의 NLS의 존재는 외부 막으로 gag-BE 국소화를 저지하고, VLP로 BE의 혼입을 방해할 수 있다.

[0380] 생산자 세포에서의 세포질 gag-카고 국소화를 장려하기 위해, NLS 외에도 핵 유출 신호 (NES)를 함유하는 3세대 (v3) eVLP 아키텍처를 설계하였다. 이전의 작업을 통해, MLV-기반 VLP가 gag 단백질 내의 다중 위치에서 NES 첨가를 용인할 수 있음이 입증되었다 (Wu and Roth, 2014). v3 설계에서, NES가 VLP 성숙 후 카고로부터 절단되어 (**도 2d** 및 **9b**), 이로써 형질도입된 세포의 핵으로 효율적으로 유입될 수 있는 NLS-플랭킹된 카고 단백질을 유리시키는 것을 보장하기 위해, MMLV 프로테아제-절단가능한 링커 서열은 NES 옆의 위치에 배치되었다.

[0381] 모든 v3 BE-eVLP 아키텍처는 v2.4 BE-eVLP로부터의 최적의 gag-ABE8e 링커 서열을 함유하였다. BE-eVLP v3.1, v3.2 및 v3.3은 추가의 MMLV 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 ABE8e의 C-말단에서 융합된 3xNES 모티프를 보유하고, v2.4 BE-eVLP에 필적하는 또는 그보다 낮은 효율을 나타내었다 (**도 2e**). 그러나, v2.4 최적화된 절단가능한 링커 서열 바로 앞에서 MMLV gag의 C-말단에 3xNES 모티프를 함유하는 v3.4 BE-eVLP는 v2.4 BE-eVLP에 비해 시험한 모든 용량에서 *BCL11A* 인핸서 로커스에서 편집 효율의 1.1-2.1배 개선을 나타내었다 (**도 2e**). 특히, v3.1, v3.2, 및 v3.3 BE-eVLP에는 2가지 별개의 절단 이벤트가 필요한데 반해, v3.4 BE-eVLP는 NLS-플랭킹된 NES-무함유 BE를 유리시키기 위해 단일 바이러스 프로테아제 절단 이벤트만을 필요로 하며 (**도 2d** 및 **9b**), 이는 그들의 우수한 효율을 설명할 수 있다. gag-ABE 국소화에 대한 NES 첨가의 효과를 추가로 조사하기위해, v3.4 gag-3xNES-ABE 구축물 또는 v2.4 gag-ABE 구축물로 형질감염된 생산자 세포의 면역형광 현미경 검사를 수행하였다. 이 분석을 통해, v2.4-형질감염된 생산자 세포에 비해 v3.4-형질감염된 생산자 세포에서 검출된 ABE 단백질의 세포질 국소화의 1.3배 증가가 밝혀졌다 (**도 10c** 및 **10d**). 이들 결과는 형질도입된 세포로 방출된 BE의 핵 국소화를 유지하면서, 생산자 세포에서의 gag-BE 융합체의 핵외 국소화를 촉진시킴으로써 BE-eVLP 활성이 개선될 수 있음을 입증한다.

[0382] *eVLP의 성분 화학량론의 개선*

[0383] 최종적으로, v3.4 eVLP의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 최적화되었다. 최적의 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 Gag-카고의 양과 VLP 성숙을 위해 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 것으로 가정하였다 (**도 2f**). 이 화학량론을 조절하기 위해, VLP 생성을 위해 형질감염되는 gag-3xNES-ABE8e 대 야생형 MMLV gag-pro-pol 플라스미드의 비를 변화시켰다. gag-BE 플라스미드의 양을 v3.4 BE-eVLP를 생성하기 위해 사용되는 원래의 비율보다 높게 증가시키면 (38% gag-BE 플라스미드 및 62% gag-pro-pol 플라스미드) 편집 효율이 개선되지 않는다는 것이 발견되었다 (**도 2g**). gag-BE 플라스미드의 비율을 38%에서 25%로 감소시키면 편집 효율이 적당히 개선되었다 (**도 2g**). 그러나, gag-BE 플라스미드의 비율을 25% 아래로 추가로 감소시키면 편집 효율이 감소되었다 (**도 2g**). 이들 결과는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론이 VLP로 패키징되는데 이용되는 gag-BE의 양과 VLP 성숙에 필요한 MMLV 프로테아제 (gag-pro-pol에서 "pro")의 양 사이에 균형을 이루는 모델과 일치한다.

[0384] 최적화의 이러한 최종 라운드 결과를 통해 4세대 (v4) BE-eVLP 제형이 밝혀졌고 (**도 2g**), 이는 최적의 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론 (25% gag-BE)과 v3.4 BE-eVLP 아키텍처를 조합한다. v4 BE-eVLP를 투과 전자 현미경 검사에 의해 시각화하였고, 그들의 구형 형태학 및 100-150 nm의 대략적인 입자 직경을 확인하였다 (**도 10a**).

[0385] 다음으로, BE-eVLP의 단백질 함량에 대한 이러한 아키텍처 조작의 효과를 결정하였다. v1 내지 v4 BE-eVLP에 존재하는 BE 분자 및 p30 (MLV 캡시드) 분자의 수를 정량화하기 위해 항-Cas9 및 항-MLV(p30) ELISA를 수행하였다 (**도 10b-10c**). 이들 실험을 통해, v2.4, v3.4 및 v4 BE-eVLP가 v1 eVLP와 비교하여 각각 입자당 1.8배, 19.2배 및 11배 더 많은 BE 카고 단백질 분자를 함유한다는 것이 밝혀졌다 (**도 3a**). 입자당 BE 단백질 함량의 이러한 증가는 용해된 VLP의 표적화된 RT-qPCR에 의해 측정되는 바와 같이 입자당 sgRNA의 상대적인 양의 증가와 상관관계가 있다 (**도 3b**). 흥미롭게도, v4 BE-eVLP는 v3.4 BE-eVLP에 비해 입자당 더 적은 BE 단백질 분자를 함유하지만, 동일한 양의 sgRNA 분자를 함유하며, 이는 v3.4 및 v4 BE-eVLP가 입자당 유사한 양의 활성 BE RNP를 함유할 수 있음을 시사한다. 추가로, v4 BE-eVLP는 v3.4 BE-eVLP에 비해 더 높은 역가로 생성된다 (**도 10c**).

[0386] 이들 결과는 입자당 활성 BE RNP 분자의 수가 BE-eVLP 편집 효율을 개선시킬 수 있는 모델을 뒷받침한다. 그러나, 입자당 BE 분자의 수가 특정 임계치를 넘어서 증가하는 것은 해로울 수 있는데, 이는 이들 추가의 BE 분자가 sgRNA와 복합체화되지 않을 것으로 보이기 때문이며, VLP당 혼입된 카고 분자의 수와 전체 VLP 역가 사이에 명백한 상호 절충 관계가 있다. 함께, 이들 결과를 통해 eVLP 효율에 영향을 미치는 추가의 중요한 파라미터가 밝혀졌고, 이는 gag-카고 국소화 및 gag-BE:gag-pro-pol 화학량론을 조절함으로써 이들 파라미터가 어떻게 개선될 수 있는지를 입증한다.

[0387] *v4 eVLP는 강력한 고효율 유전자 편집을 지원한다*

[0388] 상기 기재된 연속적인 VLP 조작 노력은 HEK293T 세포의 *BCL11A* 인핸서 로커스에서 v4 BE-eVLP의 편집 효율을 최대 용량에서 95%까지 실질적으로 개선시켰다 (**도 3c**). v4 BE-eVLP는 단위 부피당 편집 효율을 v1 eVLP와 비교하여 5.6배 개선시키고, v2.4 BE-eVLP와 비교하여 2.2배 개선시킨다 (**도 3c**). 또한, v4 BE-eVLP가 HEK293T 세포에서 바이러스 입자당 염기 편집 활성의 8.5배 개선을 나타내는 것으로 관찰되었다 (**도 10d**). v4 VLP 조작이 하나의 특정한 게놈 로커스 또는 표적 세포주로 제한되지 않는 일반적인 염기 편집 개선을 지원한다는 것을 확인하기 위해, 3T3 마우스 섬유모세포의 *Dnmt1* 로커스를 표적화하는 v1, v2.4, v3.4 및 v4 BE-eVLP를 시험하였다. 4가지 eVLP 아키텍처의 편집 효율에서 매우 유사한 경향이 관찰되었고, 3T3 세포에서 v1 eVLP와 비교하여 v4 eVLP의 단위 부피당 편집 효율이 8.6배 개선되었다 (**도 3d**). 추가로, v4 eVLP에 의한 처리는 HEK293T 또는 3T3 세포의 생존력에 부정적인 영향을 미치지 않았다 (**도 10e**). v4 BE-eVLP는 HEK293T 세포에서 *BCL11A* 인핸서 및 *HEK2* 게놈 로커스의 강건한 멀티플렉스 편집을 지원하였다 (**도 3e**). 이들 결과는 v4 eVLP가 시험 세포에 대한 교란을 최소화하면서 고효율 염기 편집을 매개함을 나타낸다.

[0389] 조작된 v4 eVLP 아키텍처가 염기 편집기 외에도 다른 단백질의 VLP-매개된 전달을 유사하게 개선시킬 수 있다고 가정하였다. 이 가능성을 시험하기 위해, Cas9 뉴클레아제 (Cas9-VLP), 및 *EMX1* 게놈 로커스를 표적화하는 sgRNA를 패키징하는 v1 및 v4 VLP를 구축하였다. HEK293T 세포에서 v1 Cas9-VLP와 비교하여 v4 Cas9-eVLP에 의해 생성된 단위 부피당 indel 빈도의 4.7배 개선이 관찰되었다 (**도 10f**). 이 관찰은 최적화된 v4 eVLP 아키텍처가 염기 편집기로 제한되지 않는 단백질의 VLP-매개된 전달에 대한 일반화가능한 개선을 제공한다는 것을 시사한다.

[0390] eVLP의 매력적인 특징은 그들의 세포 친화성이 원칙적으로 상이한 외피 당단백질을 사용하여 그들을 생성함으로써 조절될 수 있다는 것이다. Cas9-VLP의 친화성을 조절하기 위해 유사한 전략이 이전에 이용되었다 (Hamilton *et al.*, 2021). eVLP가 특정 세포 유형을 표적화하도록 프로그래밍될 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 FuG-B2 외피 당단백질에 의해 위형화된 v4 eVLP를 생성하였다 (Kato *et al.*, 2011). FuG-B2는 광견병 바이러스 외피 당단백질의 세포외 및 막횡단 도메인 및 VSV-G의 세포질 도메인을 함유하는 조작된 외피 당단백질이며, 뉴런-특이적 형질도입을 위해 렌티바이러스 벡터를 위형화시키기 위해 사용될 수 있다 (Kato *et al.*, 2011). 실제로, FuG-B2-위형화된 v4 BE-eVLP가 Neuro-2a 세포 (마우스 신경모세포종 세포주)를 효율적으로 형질도입시키고 편집하지만, 마우스 3T3 섬유모세포에 대해서는 그렇지 않은 것으로 관찰되었다 (**도 3f** 및 **10g**). 이들 결과는 eVLP의 조직 특이성이 다른 당단백질, 예컨대 특이적 세포 집단을 형질도입시키도록 렌티바이러스를 위형화시키기 위해 사용되는 것들을 교환함으로써 표적화될 수 있음을 검증한다.

[0391] 종합적으로, 이들 발견은 VLP 활성에 영향을 미치는 인자를 식별하고, 프로테아제-절단가능한 링커 서열, gag-카고 국소화, 및 gag-카고:gag-pro-pol 화학량론의 광범위한 조작이 VLP 효능을 제한하는 병목 현상을 극복할 수 있음을 입증한다. 이들 결과를 통해, 배양된 세포에서 BE RNP를 전달하기 위한 강건한 방법으로서 VLP 활성에 영향을 미치고 v4 BE-eVLP를 확립하는 인자에 대한 신규한 통찰력 또한 밝혀진다.

[0392] *v4 BE-eVLP는 최소 표적-이탈 편집 또는 DNA 통합을 나타낸다*

[0393] v4 BE-eVLP가 다중 세포 유형의 몇몇 내인성 게놈 로커스에서 강건한 표적-적중 염기 편집을 나타낸다는 점을 고려하여, 다음으로 그들의 표적-이탈 편집 프로파일을 평가하였다. BE는 Cas9 표적-이탈 결합 부위의 하위 집합에서 Cas-의존성 표적-이탈 편집 뿐만 아니라, 게놈 전체에 걸쳐 낮은 수준으로 Cas-독립적인 표적-이탈 편집을 매개할 수 있다 (Anzalone *et al.*, 2020). HEK293T 세포에서 ABE8e 플라스미드 형질감염에 비해 v4 BE-eVLP에 의한 Cas-의존성 표적-이탈 편집을 평가하기 위해, *HEK2*, *HEK3*, 및 *BCL11A* 인핸서 로커스를 표적화하는 3가지 상이한 sgRNA와 연관된 공지된 Cas9 표적-이탈 부위의 표적화된 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였다. v4 eVLP가 이들 3가지 게놈 로커스에서 플라스미드 형질감염과 비교하여 v4 BE-eVLP로부터 필적하거나 또는 그보다 높은 표적-적중 편집 효율을 나타내지만, v4 BE-eVLP와 비교하여 12 내지 900배 더 낮은 Cas-의존성 표적-이탈 편집을 나타내는 것으로 관찰되었다 (**도 3g**).

[0394] Cas-독립적인 표적-이탈 DNA 편집을 평가하기 위해, 직교식 R-루프 검정을 수행하였고, 이는 전체 게놈을 시퀀싱할 필요없이 가이드되지 않는 방식으로 염기 편집기가 DNA를 탈아미노화시키는 능력을 평가하는 전략으로서 이전에 검증되었다 (Doman *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). 동일한 BE를 코딩하는 DNA 플라스미드의 형질감염과 비교하여, v4 BE-eVLP는 사실상 검출되지 않는 수준까지 Cas-독립적인 표적-이탈 편집에서 >100배 감소를 나타내었다 (**도 3h, 도 11b**). 이들 결과는 고도로 활성인 BE에 의한 표적-이탈 편집이 RNP 전달에 의해 실질적으로 최소화될 수 있다는 이전의 발견을 확인하고 확장시키며 (Doman *et al.*, 2020; Jang *et al.*, 2021; Lyu *et al.*, 2021; Newby *et al.*, 2021; Rees and Liu, 2018; Richter *et al.*, 2020; Yeh *et al.*, 2018), 최소 표적-이탈 편집으로 고도로 효율적인 표적-적중 염기 편집을 지원하는 eVLP의 능력을 강조한다.

[0395] eVLP의 DNA-무함유 성질은 원칙적으로 형질도입된 세포의 게놈으로 DNA 통합 가능성을 피하고, 이는 기존 바이러스 전달 방식에 비해 중요한 안전성 이점이다 (David and Doherty, 2017; Milone and O'Doherty, 2018). qPCR을 이용하여, 정제된 v4 BE-eVLP가 VLP당 < 0.03개 분자의 BE-코딩 DNA를 함유한다는 것을 검증하였다 (**도 3i**). 추가로, BE-코딩 플라스미드로 형질감염된 HEK293T 세포로부터의 세포 용해물에서 상당량 (8.7 ng/μL)의 BE-코딩 DNA가 검출되었지만, v4 BE-eVLP-처리 HEK293T 세포로부터의 세포 용해물에서는 BE-코딩 DNA가 비처리 세포로부터의 샘플에서의 백그라운드 수준보다 높게 검출되지 않았다 (< 0.02 ng/μL) (**도 3j**). 이들 결과는 BE-eVLP가 형질도입된 세포를 염기 편집기를 코딩하는 DNA의 검출된 수준에 노출되지 않으며, 이로써 카고 DNA의 게놈 통합 가능성이 최소화된다는 것을 입증한다.

[0396] *v4 BE-eVLP는 일차 인간 및 마우스 세포를 효율적으로 편집한다*

[0397] v4 BE-eVLP의 유용성을 추가로 탐구하기 위해, 생체외에서 다양한 일차 인간 또는 마우스 세포를 표적화하고 편집하는 그들의 능력을 평가하였다. 일차 인간 환자-유래된 섬유모세포에서 열성 이영양성 수포성 표피박리증 (RDEB)을 유발하는 *COL7A1*의 넌센스 돌연변이의 ABE-매개된 교정이 이전에 입증되었다 (Osborn *et al.*, 2020). 동형접합성 *COL7A1*(R185X) 돌연변이를 보유하는 일차 섬유모세포를 v4 BE-eVLP로 형질도입시킨 후, >95% 편집이 표적 아데닌 염기에서 관찰되었고, VLP-처리 및 비처리 세포 사이에 세포 생존력 차이는 없었다 (**도 4a** 및 **도 11c**). 추가로, 이전에 식별된 10개의 표적-이탈 부위에서 최소 Cas-의존성 표적-이탈 편집이 관찰되었다 (Osborn *et al.*, 2020) (**도 11d**). 점액다당류증 유형 IH의 마우스 모델로부터 유래된 일차 섬유모세포에서 넌센스 돌연변이를 교정하는 v4 BE-eVLP의 능력 (Wang *et al.*, 2010) 또한 평가하였다. 또한, v4 BE-eVLP 형질도입 후 *Idua*(W392X) 돌연변이의 >95% 교정이 관찰되었다 (**도 4b**). 이들 결과는 BE-VLP 활성이 불멸화된 세포주에 제한되지 않음을 검증하고, 일차 인간 및 마우스 섬유모세포에서 v4 BE-eVLP가 100%에 가까운 염기 편집 수준을 달성할 수 있음을 입증한다.

[0398] 다음으로, 일차 인간 T 세포에서 BE-eVLP-매개된 편집을 조사하였다. MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II를 비롯하여 T 세포의 표면 상에서 면역조절 단백질의 발현을 감소시키는 유전자 편집 전략은 "기성품" 동종이계 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포를 가능하게 함으로써 T-세포 요법을 발전시킬 수 있다. 이전의 보고는 *B2M* 및 *CIITA* 유전자에서 스플라이스 부위를 파괴하면 일차 인간 T 세포에서 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 발현이 감소되는 것으로 나타났다 (Gaudelli *et al.*, 2020; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2004; Serreze *et al.*, 1994). 일차 인간 T 세포를 v4 BE-eVLP로 처리하면 *B2M* 및 *CIITA* 스플라이스 부위의 45-60%가 파괴되었다 (**도 4c**). 종합적으로, 이들 결과는 eVLP가 생체외에서 임상적으로 관련된 일차 인간 세포 유형을 효율적으로 편집할 수 있고, 일차 인간 T 세포에서 BE-VLP 편집 효율의 추가의 최적화를 위한 기반을 마련할 수 있음을 확인시킨다.

[0399] *eVLP에 의해 CNS에서 생체내 염기 편집*

[0400] 생체외에서 eVLP의 강건한 활성은 이들이 생체내에서 BE RNP를 전달하기 위한 유망한 비히클일 수 있음을 시사하였다. 그들의 생체내 효능 평가를 시작하기 위해, 먼저 마우스 중추 신경계 (CNS) 내에서 염기 편집을 가능하게 하는 eVLP의 능력을 조사하였다. 생체내에서 뉴클레아제-매개된 indel 형성 및 아데닌 염기 편집이 가능한 것으로 공지된 게놈 로커스에 마우스 *Dnmt1*에서의 침묵 돌연변이를 설치하는 v4 BE-eVLP를 생성하였다 (Levy *et al.*, 2020; Swiech *et al.*, 2015). BE-eVLP를 CNS에 전달하기 위해, 척수 근위축증을 가진 환자에서 누시네르센을 전달하기 위해 현재 이용되는 척수강내 주사와 유사하게, 혈액-뇌 장벽을 우회하는 뇌척수액으로 직접 주사하는 신생아 뇌실 (P0 ICV) 주사를 수행하였다 (*Mercuri et al.*, 2018).

[0401] v4 BE-eVLP는 핵 막-국소화된 Klarsicht/ANC-1/Syne-1 상동성 (KASH) 도메인에 융합된 EGFP를 코딩하는 VSV-G-위형화된 렌티바이러스와 함께 각각의 반구에 공동-주사되었다 (**도 5a**). 이 전략이 eVLP에 노출된 세포를 풍부하게 하는 방식으로 GFP-양성 핵의 단리를 가능하게 할 것이라고 추론되었다. 이 접근법은 여러 세포가 접근할 수 없는 뇌에 주사 후 편집 효율을 결정하는데 특히 유용하다. 주사 3주 후에, 피질 및 중뇌 조직으로부터 분류되지 않은 벌크 (모든 핵) 및 GFP-양성 핵을 분석하였고, 고처리량 시퀀싱에 의해 염기 편집을 평가하였다 (**도 5a**).

[0402] 피질 및 중뇌 조직 둘 다에서 GFP-양성 핵의 빈도는 낮았고 (**도 13b**), 이는 마우스 뇌에 주사된 VSV-G-위형화된 렌티바이러스에 의해 형질도입된 세포가 주사 부위 근처에 국소화된다는 이전의 보고와 일치하며 (Humbel *et al.*, 2021; Parr-Brownlie *et al.*, 2015), 이는 가능하게는 뇌 세포외 공간의 너비보다 ~3배 더 큰 평균 직경을 갖는 바이러스 입자의 크기 (Thorne and Nicholson, 2006)가 벌크 뇌 조직을 통한 확산을 방해할 수 있기 때문이다. 고무적으로, GFP-양성 피질 및 중뇌 세포에서 각각 53% 및 55% 편집이 관찰되었고, 이는 벌크 피질 및 중뇌의 6.1% 및 4.4% 편집에 상응한다 (**도 5b**). 이들 데이터는 형질도입 이벤트마다 강건한 수준의 활성 BE RNP를 전달하는 CNS 염기 편집 적용을 위한 새로운 비-바이러스 전달 시스템으로서 BE-eVLP를 확립시키지만, 벌크 뇌 조직에서 높은 수준의 편집을 달성하기 위해 형질도입 효율의 개선이 필요하다.

[0403] *eVLP에 의한 생체내 간 염기 편집은 Pcsk9를 효율적으로 녹다운시킨다*

[0404] 생체내에서 BE-eVLP의 유용성을 추가로 탐구하기 위해, 성체 동물에서 치료적 염기 편집을 매개하는 그들의 능력을 조사하였다. 먼저, 콜레스테롤 항상성에 관여하는 치료 관련 유전자인 프로프로테인 컨버타제 서브틸리신/켁신 유형 9 (*Pcsk9*) (Abifadel *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2014)가 표적화되었다. 기능 상실 *PCSK9* 돌연변이는 건강상 명백히 불리한 결과없이 천연적으로 발생한다 (Abifadel *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2018). 이들 개체는 혈중 저밀도 지단백질 (LDL) 콜레스테롤의 수준이 낮고, 죽상동맥경화성 심혈관 질환의 위험이 감소되며, 이는 *PCSK9* 유전자를 파괴하는 것이 가족성 고콜레스테롤혈증의 치료를 위한 유망한 전략일 수 있음을 시사한다 (Musunuru *et al.*, 2021; Rothgangl *et al.*, 2021). 최적화된 v4 BE-VLP 아키텍처는 동일한 용량의 v4 eVLP에 비해 26배 더 적은 1.5% 편집만을 매개하는 이전에 기재된 VLP 아키텍처 (v1 BE-VLP)에 비해 간에서 훨씬 더 강건한 편집을 지원하였다 (도 6b).

[0405] 마우스 간에서 *Pcsk9* 녹다운에 대해 이전에 확립된 염기 편집 전략인 *Pcsk9* 엑손 1 및 인트론 1의 경계에서 스플라이스 공여자를 표적화하고 파괴하는 BE-eVLP (Musunuru *et al.*, 2021; Rothgangl *et al.*, 2021)를 설계하고 생성하였다. 6 내지 7주령의 성체 C57BL/6 마우스에게 eVLP의 전신 (안구 후방) 주사를 수행하였고, 주사 1주일 후에 벌크 간에서 염기 편집을 측정하였다 (**도 6a**). 가장 높은 용량 ($7x10^{11}$ eVLP)의 v4 BE-eVLP로 처리 후 벌크 간에서 63% 편집 효율이 관찰되었고 (**도 6b**), 이는 최적화된 최신 기술 AAV-기반 전달 방식 및 지질 나노입자 (LNP)-기반 mRNA 전달 시스템에 의해 이 부위에서 전형적으로 달성되는 편집 효율에 필적한다 (Musunuru *et al.*, 2021; Rothgangl *et al.*, 2021). 조작된 v4 BE-eVLP 아키텍처는 동일한 용량에서 이전에 보고된 설계 (v1 BE-VLP)를 기반으로 하는 VLP 아키텍처에 비해 간에서 26배 더 높은 편집 수준을 지원하였다 (**도 6b**). 이들 결과는 마우스 간의 치료 관련 로커스에서 RNP에 의한 효율적인 염기 편집을 확립한다.

[0406] 가장 높은 용량의 v4 BE-eVLP로 처리된 마우스에서, 염기 편집 효율을 심장, 골격근, 폐, 신장 및 비장을 비롯하여 간이 아닌 조직에서도 평가하였다. 비장에서 4.3% 염기 편집이 관찰되었고, 폐, 신장, 심장 및 근육에서는 백그라운드 수준보다 높은 편집이 관찰되지 않았다. 조직에 걸쳐 이러한 편집 패턴은 정맥내 투여된 VSV-G-위형화된 입자의 이전에 특징분석된 조직 친화성과 일치한다 (Pan *et al.*, 2002).

[0407] BE-eVLP에 의한 처리가 간 조직에서 Cas-의존성 표적-이탈 편집을 초래하는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 CIRCLE-seq를 수행하여 (Tsai *et al.*, 2017), 잠재적인 표적-이탈 로커스를 지정하였다. 지정된 로커스로

부터, 14개의 후보 표적-이탈 부위를 선택하고, 프로토스페이서의 PAM-근위 영역 근처에서 상동성을 기반으로 하는 표적화된 고처리량 시퀀싱에 의해 실험하였다. $7x10^{11}$ v4 BE-eVLP로 처리된 마우스의 간으로부터 단리된 게놈 DNA의 임의의 이들 로커스에서 백그라운드 수준보다 높은 검출가능한 표적-이탈 편집은 관찰되지 않았다 (**도 6d**). 대조적으로, ABE8e 및 동일한 *Pcsk9*-표적화 sgRNA를 코딩하는 이중 AAV8 벡터 ($1x10^{11}$ 바이러스 게놈)로 처리된 마우스의 간으로부터 단리된 게놈 DNA의 이들 3개의 로커스에서 낮지만 검출가능한 (0.1-0.3%) 수준의 표적-이탈 편집이 관찰되었다 (**도 6d**). 이들 결과는 v4 BE-eVLP가 생체내에서 필적하는 표적-적중 편집, 그러나 최소 표적-이탈 편집을 제공할 수 있음을 입증하며, 이는 기존 바이러스 기반 전달 접근법에 비해 개선된 것이다.

[0408] 주사 1주일 후에 수행한 표현형 분석을 통해, 비처리 마우스와 비교하여 $7x10^{11}$ v4 BE-eVLP로 처리된 마우스에서 혈청 Pcsk9 단백질 수준의 78% 감소가 밝혀졌다 (**도 6e**). 전신 투여된 eVLP의 잠재적인 독성을 평가하기 위해, $7x10^{11}$ v4 BE-eVLP의 주사 1주일 후에, 간세포 손상의 중요한 바이오마커인 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 아스파르테이트 트랜스아미나제 (AST) 수준 (Meunier and Larrey, 2019)을 평가하였다. 모든 마우스는 정상 범위 내의 AST 및 ALT 수준을 나타내었고, 비처리 마우스와 BE-eVLP-처리 마우스 사이에 식별가능한 차이는 없었다 (**도 14a**). 추가로, eVLP-처리 및 비처리 마우스로부터의 샘플에 대해 간 조직학을 수행하였고, BE-VLP 처리로 인한 뚜렷한 형태학적 차이는 발견되지 않았다 (**도 14b-14c**). 함께, 이들 결과는 v4 BE-eVLP가 명백한 불리한 결과 없이 표적-이탈 편집의 검출 없이 마우스 간에서 효율적인 치료 관련 염기 편집을 매개할 수 있음을 입증한다.

[0409] *v4 BE-eVLP는 유전적 실명의 마우스 모델에서 시각 기능을 복원시킨다*

[0410] 최종적으로, 유전적 망막 장애가 있는 성체 마우스 모델에서 질환-유발 점 돌연변이를 교정하기 위해 BE-eVLP를 적용하였다. 다중 유전자에서 기능 상실 돌연변이는 망막 변성, 조기 발병 시각 손상, 및 최종 실명을 수반하는 단일 유전성 망막 장애의 계열인 다양한 형태의 레버(Leber) 선천성 흑내장 (LCA)과 연관이 있다 (Cideciyan, 2010; den Hollander et al., 2008). 유전자 편집 접근법은 선천성 실명을 치료 및 치유할 가능성이 있고; 진행 중인 임상 실험 (NCT03872479)은 희귀 레버 선천성 흑내장 10 (LCA10)과 연관된 *CEP290*의 비정상적인 스플라이스 부위를 파괴하기 위해 AAV-전달된 Cas9 뉴클레아제를 사용한다. 레티노이드 아이소머히드롤라제 *RPE65*를 비롯하여 다른 유전자에서 기능 상실 돌연변이 또한 정밀 유전자 편집제를 사용하는 생체내 교정을 위한 후보이다 (Sodi *et al.*, 2021; Suh *et al.*, 2021).

[0411] v4 BE-eVLP가 LCA의 마우스 모델에서 시각 기능을 복원할 수 있는지 여부를 조사하였다. *rd12* 마우스는 시각 기능의 거의 완전한 상실을 유발하는 *Rpe65*의 엑손 3에서 넌센스 돌연변이 (c.130C > T; p.R44X)를 보유한다 (Pang *et al.*, 2005; Suh *et al.*, 2021). LCA를 담당하는 상동성 돌연변이가 최근에 사람에서 확인되었고 (Zhong *et al.*, 2019), 이는 *rd12* 모델의 임상적 관련성을 강조한다.

[0412] ABE8e-NG RNP, 및 *Rpe65*(R44X) 돌연변이를 표적화하는 sgRNA (**도 7a**)를 캡슐화하는 v4 BE-eVLP (이후 ABE8e-NG-eVLP로 지칭됨)를 설계하고 생성하였다. 망막 색소 상피 (RPE) 세포를 효율적으로 형질도입할 수 있게 하도록 ABE8e-NG-eVLP를 VSV-G에 의해 위형화시켰다 (Puppo *et al.*, 2014; Suh *et al.*, 2021). ABE8e-NG-eVLP를 4주령의 *rd12* 마우스에게 망막하로 주사하였다. 별도의 코호트에서, 동일한 ABE8e-NG 및 sgRNA 구축물을 코딩하는 복제-불능성 렌티바이러스 (ABE8e-NG-LV) 또한 망막하로 주사하였다. ABE의 렌티바이러스 전달이 *rd12* 마우스에서 시각 기능을 성공적으로 복원시킬 수 있음이 이전에 보고되었다 (Suh *et al.*, 2021).

[0413] 주사 5주 후에, RPE 조직을 수확하고, RPE 게놈 DNA의 고처리량 시퀀싱을 수행하였다 (**도 7b**). 고무적으로, 시퀀싱 분석을 통해, ABE8e-NG-VLP 및 ABE8e-NG-LV가 프로토스페이서의 위치 A_6에서 각각 R44X 돌연변이의 21% 및 11.5% 교정을 성공적으로 매개하였음이 밝혀졌다 (**도 7c**). 특히, BE-VLP 전달이 일시적임에도 불구하고, ABE8e-NG-VLP는 ABE8e-NG-LV와 비교하여 표적 염기에서 1.8배 더 높은 편집을 달성하였다. 이들 결과는 eVLP가 마우스 RPE에서 병원성 돌연변이의 고도로 효율적인 교정을 가능하게 한다는 것을 입증한다.

[0414] 표적 돌연변이의 고도로 효율적인 교정이 관찰되었지만, ABE8e-NG의 넓은 편집 윈도우로 인해 ABE8e-NG-eVLP 및 ABE8e-NG-LV 둘 다 상당한 수준의 방관자 편집을 유도하는 것 또한 관찰되었으며 (**도 7c**) (Richter *et al.*, 2020), 따라서 편집된 대부분의 대립 유전자는 A_6 단독과는 대조적으로 A_3, A_6 및/또는 A_8에서 전환을 함유하였다 (**도 7d**). 위치 A_3 및 A_8에서 방관자 편집은 각각 *Rpe65* 미스센스 돌연변이 C45R 및 L43P를 유도하였다. L43P 돌연변이가 *Rpe65* 효소를 불활성화시키는 것으로 이전에 나타났다 (Suh *et al.*, 2021). 실제로, 망막 세

포 반응을 평가하기 위해 암소시 망막전위도검사 (ERG)를 수행한 후, ABE8e-NG-eVLP-주사된 및 ABE8e-NG-LV-주사된 눈 둘 다에서 시각 기능의 최소 구제가 관찰되었다 (**도 7e**). 이들 결과는 ABE8e-NG의 넓은 염기 편집 윈도우가 *Rpe65*(R44X) 돌연변이를 정밀하게 교정하는데 적합하지 않음을 시사하였다.

[0415] 이러한 제한을 다루기 위해, ABE8e-NG에 비해 더 좁은 편집 윈도우를 나타내는 ABE7.10-NG를 캡슐화하는 v4 BE-eVLP (Huang *et al.*, 2019; Richter *et al.*, 2020)를 설계하고 생성하였다. 성체 *rd12* 마우스에게 ABE7.10-NG-eVLP의 망막하 주사는 사실상 방관자 편집없이 RPE 게놈 DNA에서 R44X 돌연변이의 12% 교정을 일으켰다 (**도 7f**). 구체적으로, ABE7.10-NG-eVLP 처리가 방관자 편집없이 11%의 완벽한 R44X 교정을 초래하는 것으로 관찰되었고, 이는 ABE8e-NG-eVLP 처리에 비해 완벽한 교정의 9배 개선이다 (**도 7g**). 추가로, ABE7.10-NG-eVLP에 의한 처리는 동일한 ABE7.10-NG 및 sgRNA 구축물을 코딩하는 렌티바이러스인 ABE7.10-NG-LV에 의한 처리에 비해 방관자-무함유 교정에서 1.4배 개선을 나타내었고, v4 BE-eVLP 일시적인 전달이 렌티바이러스 BE 전달과 비교하여 그에 필적하거나 또는 그보다 높은 편집 효율을 달성할 수 있음이 추가로 입증되었다 (**도 7g**).

[0416] 웨스턴 블롯을 통해, ABE7.10-NG-eVLP 처리가 Rpe65 단백질의 발현을 복원시킨다는 것이 확인되었다. 특히, ABE7.10-NG-LV-처리된 눈은 주사 5주 후에 BE 단백질을 여전히 발현한 반면에, ABE7.10-NG-eVLP-처리된 눈은 그렇지 않았으며 (**도 7i**), 이는 생체내에서 eVLP를 사용하여 전달된 염기 편집기에 대한 세포의 일시적인 노출을 입증한다. 중요하게는, ABE7.10-NG-eVLP는 처리된 눈의 ERG에 의해 측정되는 바와 같이 ABE7.10-NG-LV에 비해 유사한 수준으로 시각 기능을 성공적으로 구제하였다 (**도 7h** 및 **7j**). 이러한 수준의 ERG 구제가 시각 발색단의 복원 및 시각 피질 반응의 회복을 비롯하여 시각 기능의 다른 개선에 상응하는 것으로 이전에 나타났다 (Suh *et al.*, 2021). 이들 결과는 eVLP가 질환 표현형의 호전과 함께 마우스 RPE에서 병원성 돌연변이의 효율적인 교정을 매개할 수 있음을 입증한다.

[0417] 편집 결과를 추가로 분석하기 위해, 처리된 눈으로부터 RNA를 추출하고, 특이적 cDNA의 표적화된 고처리량 시퀀싱을 수행하였다. 예상되는 바와 같이, eVLP 처리된 눈에서, 표적-적중 *Rpe65* 전사체에서 표적 아데닌 (A_6)의 A·T에서 G·C로의 최대 64% 전환이 관찰되었다 (**도 15a**). *Rpe65* 게놈 로커스와 비교하여 교정된 *Rpe65* 전사체의 더 높은 비율은 교정되지 않은 mRNA의 넌센스-매개된 붕괴를 잠재적으로 반영한다.

[0418] BE는 낮은 수준의 전사체 전체 Cas-독립적인 표적-이탈 RNA 편집을 나타내는 것으로 공지되어 있다 (Anzalone *et al.*, 2020). 이 가능성을 조사하기 위해, 처리된 눈으로부터의 *Mcm3ap* 및 *Perp* 전사체를 시퀀싱함으로써 ABE-eVLP 및 ABE-LV에 의한 표적-이탈 RNA 편집을 평가하였으며, 상기 두 전사체는 이전에 천연 TadA 데아미나제 기질에 대한 그들의 서열 유사성을 기반으로 하여 표적-이탈 RNA 편집을 위한 잠재적인 후보로서 식별되었다 (Jo *et al.*, 2021). 상기 두 전사체에서 ABE8e-NG-LV에 의한 RNA 표적-이탈 편집 및 *Perp*의 1개 아데닌에서 ABE7.10-NG-LV에 의한 낮지만 검출가능한 RNA 표적-이탈 편집이 관찰되었다 (**도 15b-15c**). 대조적으로, ABE8e-NG-eVLP 또는 ABE7.10-NG-eVLP에 의해 이들 두 전사체에서 백그라운드보다 높은 임의의 RNA 표적-이탈 편집은 검출되지 않았다 (**도 15b-15c**). 종합적으로, 이들 발견은 높은 표적-적중 편집 및 최소 표적-이탈 편집으로 생체내에서 BE RNP를 일시적으로 전달하기 위한 DNA-무함유 방법으로서 eVLP의 치료적 유용성을 강조한다.

[0419] **논의**

[0420] 치료 관련 생체외 및 생체내 적용을 위해 RNP를 안전하게 전달할 수 있는 효율적인 조작된 VLP 플랫폼이 본원에 제시된다. VLP 전달 효율에 대한 3가지 뚜렷한 병목 현상을 식별하고 조작하는 해결을 통해, 이전에 보고된 VLP 스캐폴드를 기반으로 하는 초기 설계와 비교하여 v4 eVLP 내에서 단백질 로딩이 평균 16배 개선되었고, 염기 편집 효율이 평균 8배 개선되었다. 이들 발견은 v4 eVLP가 매우 다재다능하고, 광범위한 생체외 및 생체내 염기 편집 적용 둘 다에 적합함을 시사한다. 또한 eVLP 아키텍처가 BE 및 뉴클레아제 외에도 다른 관심 단백질 또는 RNP를 전달하기 위한 모듈식 플랫폼의 역할을 할 것으로 예상된다.

[0421] 본원에 제시된 결과는 유전자 편집제를 위한 전달 플랫폼을 추가로 진보시키기 위해 합리적인 조작을 이용하는 잠재적인 치료 이익을 강조한다. Cas9 뉴클레아제 RNP를 전달하기 위해 VLP가 이전에 사용되었고 (Campbell *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2016; Gee *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2021; Indikova and Indik, 2020; Lyu *et al.*, 2019; Mangeot *et al.*, 2019), 최근의 연구에서 본원에 기재된 eVLP보다 낮은 효율로 BE RNP를 HEK293T 세포에 전달하기 위해 VLP가 사용되었지만 (Lyu *et al.*, 2021), RNP-전달 VLP를 사용하는 임의의 유형의 산후 생체내 유전자 편집의 치료 수준은 이전의 연구에서 보고되지 않았다. 이 작업에서 개발된 eVLP 플랫폼은 증가된 양의 카고를 패키징하고 입자 역가를 개선시키도록 맞춤화된 합리적으로 조작된 아키텍처를 사용한다. 이들 eVLP는 마우스에서 다중 장기 및 투여 경로에 걸쳐 치료 수준의 생체내 염기 편집을 매개할 수 있으

며, 이는 지금까지 보고된 RNP를 사용하는 산후 생체내 유전자 편집의 가장 높은 수준을 달성한다.

[0422] eVLP의 단일 정맥내 주사는 >60%의 효율로 마우스 간에서 *Pcsk9*의 염기 편집을 매개하였고, 이는 BE-코딩 DNA의 AAV-매개된 전달 (Rothgangl *et al.*, 2021) 및 BE-코딩 mRNA의 LNP-매개된 전달 (Musunuru *et al.*, 2021; Rothgangl *et al.*, 2021)을 비롯하여 현재 최신 기술 BE 전달 방법에 의해 동일한 표적에서 달성되는 것에 필적한다. 그러나, eVLP는 AAV-매개된 DNA 전달 및 LNP-매개된 mRNA 전달 전략 둘 다에 비해 주요 이점을 제공한다. AAV-매개된 전달은 형질도입된 세포의 게놈으로 검출가능한 수준의 바이러스 게놈 통합을 일으킬 수 있고, 이는 종양 형성을 일으킬 수 있는 반면에 (Chandler *et al.*, 2017; Koblan *et al.*, 2021), eVLP에는 DNA가 결여되어 있어서, 삽입 돌연변이 유발의 가능성을 피한다. 추가로, 시험관내 및 생체내 둘 다에 의해 나타난 바와 같이, AAV-매개된 전달은 카고 발현을 연장시켜, 표적-이탈 편집의 빈도를 증가시키지만, BE RNP의 일시적인 eVLP-매개된 전달은 표적-이탈 편집에 대한 기회를 크게 감소시킨다 (**도 3g**, **3h** 및 **6d**). BE-코딩 mRNA의 LNP-매개된 전달 또한 일시적이지만, 각각의 카피가 mRNA의 수명 전체에 걸쳐 세포 RNP를 생성하는 mRNA와 비교하여 세포에서 RNP의 수명이 더 짧기 때문에, BE RNP의 전달은 편집제에 대한 훨씬 더 짧은 노출 및 더 낮은 표적-이탈 편집 기회를 제공한다 (Newby *et al.*, 2021).

[0423] LNP가 mRNA를 효율적으로 패키징할 수 있지만, LNP 내에서 유전자 편집제 RNP의 패키징은 실질적으로 더 어렵다 (Wei *et al.*, 2020). eVLP가 간에서 이들 다른 전략에 필적하는 수준의 편집을 달성할 수 있지만, 상기 언급된 중요한 이점을 갖기 때문에, 이들은 유전성 간 질환을 치료하는 생체내 편집 접근법을 위한 치료 방식으로서 추가의 개발에 대해 특히 매력적인 옵션이다. v4 eVLP 아키텍처는 마우스 간에서 강건한 편집을 달성하는데 중요하였고, 이전에 보고된 (v1) VLP 설계와 비교하여 생체내 편집 효율을 26배 개선시켰으며 (**도 6b**), 이는 생체내 편집을 위한 VLP 아키텍처 조작의 중요성을 강조한다. v4 BE-eVLP에 의해 이 *Pcsk9* 스플라이스 공여자에서 관찰된 염기 편집 정도 (>60%)는 혈청 LDL의 감소 및 고콜레스테롤혈증의 치료에 충분한 것으로 생각된다 (Musunuru *et al.*, 2021).

[0424] LCA의 마우스 모델에서 v4 BE-eVLP의 단일 망막하 주사는 질환-유발 점 돌연변이를 효율적으로 교정하였고, 시각 기능을 복원시켰다. 이 모델에서, 다시 한번, eVLP는 렌티바이러스 BE 전달 (Suh *et al.*, 2021) 및 AAV-매개된 BE 전달 (Jo *et al.*, 2021)을 비롯하여 바이러스 전달 방법을 이용하는 이전에 달성된 것들에 필적하거나 또는 그보다 높은 편집 효율 및 구제 수준을 달성하였다. 눈의 접근성 및 그들의 면역-특권 상태 (Taylor, 2009)는 새로운 전달 방식을 전임상 및 임상 연구로 전환시키는 것을 더 쉽게 가능하게 할 수 있다. 이들 데이터는 안구 장애를 유발하는 병원성 점 돌연변이를 교정하기 위한 수단으로서 BE-eVLP의 치료적 잠재성의 증거를 제공한다.

[0425] 본원에서 보고된 개발은 유전자 편집제의 일회성 치료 잠재성과 RNP의 일시적인 성질을 조합하여, 바이러스 형질도입의 효율적인 조직-표적화된 성질과 함께 원치않는 표적-이탈 편집 또는 DNA 통합에 대한 기회를 최소화한다. 따라서, 이들 발견은 eVLP가 치료적으로 관심의 대상인 염기 편집기, 뉴클레아제 및 다른 단백질의 생체내 또는 생체외 전달을 위한 다른 전달 전략에 대한 매력적인 대안임을 시사한다.

[0426] **방법**

[0427] *물질 입수가능성*

[0428] 이 실시예에서 생성된 플라스미드는 애드진(Addgene)으로부터 입수가능하다 (추가의 상세한 내용은 표 1에 제공됨).

[0429] **표 1**. 주요 자원

시약 또는 자원	공급원	식별자
항체		
마우스 항-Cas9 모노클로날 항체	써모 피셔 사이언티픽	Cat#MA5-23519
마우스 항-MLV p30 모노클로날 항체	압캠	Cat#ab130757
마우스 항-VSVG 모노클로날 항체	시그마-알드리치	Cat#V5507
IRDye 680RD 염소 항-마우스 항체	리-코르	Cat#926-68070
마우스 항-Rpe65 모노클로날 항체	(Golczak et al., 2010)	
염소 항-마우스 IgG-HRP 항체	셀 시그널링 테크놀로지	Cat#7076S
마우스 항-Cas9 모노클로날 항체	인비트로젠	Cat#MA523519
토끼 항-β-액틴 폴리클로날 항체	셀 시그널링 테크놀로지	Cat#7076S
염소 항-토끼 IgG-HRP 항체	셀 시그널링 테크놀로지	Cat#7074S
박테리아 및 바이러스 균주		
원 샷 Mach1 T1 파지-내성 화학적 적격성 *이. 콜라이*	써모 피셔 사이언티픽	Cat#C862003
NEB 안정한 적격성 *이. 콜라이*	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#C3040H
화학물질, 펩티드, 및 재조합 단백질		
USER 효소	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#M5505S
DpnI	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#R0176S
KLD 효소 믹스	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#M0554S
리포펙타민 2000	써모 피셔 사이언티픽	Cat#11668019
제트프라임 형질감염 시약	폴리플러스	Cat#114-75
퓨진 HD 형질감염 시약	프로메가	Cat#E2312
PEG-it 바이러스 침전 용액	시스템 바이오사이언시스	Cat#LV825A-1
재조합 Cas9 (*에스. 피오게네스*) 뉴클레아제	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#M0386
SYBR 녹색 염료	론자	Cat#50512
프로테이나제 K	써모 피셔 사이언티픽	Cat#EO0492
프로테이나제 K	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#P8107S
인간 AB 혈청	벨리 바이오메디컬	Cat#HP1022HI
N-아세틸-L-시스테인	시그마-알드리치	Cat#A7250-100G
재조합 인간 IL-2	페프로테크	Cat#200-02
재조합 인간 IL-7	페프로테크	Cat#200-07
재조합 인간 IL-15	페프로테크	Cat#200-15
레트로넥틴®	클론테크/다카라	Cat#T100A/B
다이나비즈™ 인간 T-확장기 CD3/CD28비드	써모 피셔 사이언티픽	Cat#1161D
퀵익스트랙트™ DNA 추출 용액	루시젠	Cat#QE09050
염 활성 뉴클레아제	아크틱자임스	Cat#70910-202
BSA	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#B9000S
0.9% NaCl	프레제니우스 카비	Cat#918610
중요한 상업적 검정		
퓨전 U 멀티플렉스 PCR 마스터 믹스	써모 피셔 사이언티픽	Cat#F562L
퓨전 고충실도 DNA 폴리머라제	뉴잉글랜드 바이오랩스	Cat#M0530S
퀴아퀵 PCR 정제 키트	퀴아젠	Cat#28104
퀴아퀵 겔 추출 키트	퀴아젠	Cat#28704
퀴아젠 플라스미드 *플러스* 미디 키트	퀴아젠	Cat#12943
퀴아젠 플라스미드 *플러스* 맥시 키트	퀴아젠	Cat#12963

[0430]

패스트스캔™ Cas9 (*에스. 피오게네스*) ELISA 키트	셀 시그널링 테크놀로지	Cat#29666C
MuLV 코어 항원 ELISA 키트	셀 바이오랩스	Cat#VPK-156
QIAmp 바이러스 RNA 미니 키트	퀴아젠	Cat#52904
슈퍼스크립트™ III 제1-가닥 합성 슈퍼믹스	써모 피셔 사이언티픽	Cat#18080400
이지셉 인간 T 세포 단리 키트	스템셀 테크놀로지즈	Cat#17951
AAVpro 적정 키트 버전 2	클론테크/다카라	Cat#6233
아젠코트 디앤에이드팬스 키트	베크만	Cat#V10309
총 콜레스테롤 시약	써모 피셔 사이언티픽	Cat#TR13421
마우스 프로프로테인 컨버타제 9/PCSK9 콴티킨 ELISA 키트	알앤디 시스템즈	Cat#MPC900
퀵타이터™ 렌티바이러스 역가 키트	셀 바이오랩스	Cat#VPK-107-5
올프렙 DNA/RNA 미니 키트	퀴아젠	Cat#80284
MiSeq 시약 키트 v2 (300-주기)	일루미나	Cat#MS-102-2002
MiSeq 시약 마이크로 키트 v2 (300-주기)	일루미나	Cat#MS-103-1002
수탁된 데이터		
표적화된 앰플리콘 시퀀싱 데이터	본 연구	PRJNA768458
실험 모델: 세포주		
인간: HEK293T	ATCC	Cat#CRL-3216
인간: 게시클 생산자 293T	다카라	Cat#632617
마우스: NIH/3T3	ATCC	Cat#CRL-1658
마우스: Neuro-2a	ATCC	Cat#CCL-131
실험 모델: 유기체		
적시 임신한 C57BL/6J 마우스	찰스 리버 래보러토리즈	Cat#027
C57BL/6J 마우스	잭슨 래보러토리	Cat#000664
rd12 마우스	잭슨 래보러토리	Cat#005379
재조합 DNA		
pCMV-VSV-G	애드진	8454
psPAX2	애드진	12260
pBS-CMV-gagpol	애드진	35614
BIC-Gag-Cas9	애드진	119942
lentiCRISPRv2	애드진	135955
v4 BE-VLP	애드진 (본 연구)	TBA
소프트웨어 및 알고리즘		
CRISPResso2	(Clement et al., 2019)	github.com/pinellolab/CRISPResso2
프리즘	그래프패드	graphpad.com

[0431]

[0432] *데이터 및 코드 입수가능성*

[0433] 이 실시예에서 생성된 시퀀싱 데이터는 PRJNA768458 하에 NCBI 서열 판독 아카이브 데이터베이스에 기탁된다. 데이터 가공 및 분석에 사용되는 코드는 github.com/pinellolab/CRISPResso2에서 입수가능하다.

[0434] **실험 모델 및 대상체 세부사항**

[0435] *세포 배양 조건*

[0436] HEK293T 세포 (ATCC; CRL-3216), 게시클 생산자 293T 세포 (다카라(Takara); 632617), 3T3 세포 (ATCC; CRL-1658), 및 Neuro-2a 세포 (ATCC; CCL-131)를 10% (v/v) 태아 소 혈청으로 보충된 DMEM + 글루타맥스(GlutaMAX) (라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))에 유지시켰다. 일차 인간 및 마우스 섬유모세포를 20% (v/v) FBS, 2 mM 글루타맥스 (써모 피셔(Thermo Fisher); 35050061), 1 % 페니실린 및 스트렙토마이신 (써모 피셔; 15070063), 1X 비필수 아미노산 (써모 피셔; 11140050), 1X 항산화 보충제 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich); A1345), 10 ng/mL 뮤린 악하선으로부터의 표피 성장 인자 (시그마 알드리치; E4127) 및 0.5 ng/mL 섬유모세포 성장 인자 (시그마 알드리치; F3133)를 함유하는 MEM 알파 배지 (써모 피셔; 12571063)에서 유지시켰다. 세포를 37℃에서 5% 이산화탄소 하에 배양하였고, 마이코얼러트(MycoAlert) (론자 바이올로직스(Lonza Biologics)) 에 의해 시험함으로써 마이코플라즈마에 대해 음성인 것으로 확인되었다.

[0437] *일차 인간 T 세포의 단리*

[0438] 일차 인간 T 세포를 이전에 기재된 바와 같이 단리하였다 (Chen *et al.*, 2021). 버피 코트는 메모리얼 블러드 센터 (Memorial Blood Centers, 미네소타주 세인트 폴)로부터 수득하였고, 셉메이트(SepMate) 튜브 (스템셀 테크놀로지즈(STEMCELL Technologies); 85450)를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포를 단리하였다. 이지셉(EasySep) 인간 T-세포 단리 키트를 사용하여 T-세포를 농축시킨 다음, 장기간 보관을 위해 냉동시켰다.

[0439] **방법 세부사항**

[0440] *클로닝*

[0441] 이 실시예에서 사용된 모든 플라스미드는 이전에 기재된 바와 같이 USER 클로닝 또는 KLD 클로닝을 이용하여 클로닝되었다 (Doman *et al.*, 2020). 퓨전(Phusion)U 그린 멀티플렉스 PCR 마스터 믹스 (써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 DNA를 PCR-증폭시켰다. Mach1 (써모 피셔 사이언티픽) 화학적 적격

성 이. 콜라이가 플라스미드 증식을 위해 사용되었다.

[0442] *BE-eVLP 생성 및 정제*

[0443] 도 16의 실시양태에 도시된 바와 같이, BE-eVLP는 게시클 생산자 293T 세포의 일시적인 형질감염에 의해 생성되었다. 게시클 세포를 플라스크당 5 × 10^6 세포의 밀도로 T-75 플라스크 (코닝(Corning))에 시딩하였다. 20-24시간 후, 제조자의 프로토콜에 따라 제트프라임(jetPRIME) 형질감염 시약 (폴리플러스(Polyplus))을 사용하여 세포를 형질감염시켰다. v1-v3 BE-eVLP를 생성하기 위해, T-75 플라스크당 VSV-G (400 ng), MLVgag-pro-pol (2,800 ng), MLVgag-ABE8e (1,700 ng), 및 sgRNA (4,400 ng)를 발현하는 플라스미드의 혼합물을 공동-형질감염시켰다. MLVgag-ABE8e:MLVgag-pro-pol 화학량론 최적화를 위해, 이들 두 성분에 대한 플라스미드 DNA의 총량은 4,500 ng으로 고정되었고, 각각의 상대적인 양은 변하였다. v4 BE-eVLP를 생성하기 위해, T-75 플라스크당 VSV-G (400 ng), MMLVgag-pro-pol (3,375 ng), MMLVgag-3xNES-ABE8e (1,125 ng), 및 sgRNA (4,400 ng)를 발현하는 플라스미드의 혼합물을 공동-형질감염시켰다. 예시적인 BE-eVLP 구축물 단백질 서열은 표 4에 제공된다.

[0444] 형질감염 40-48시간 후에, 생산자 세포 상청액을 수확하고, 500 g에서 5분 동안 원심분리하여, 세포 잔해를 제거하였다. 정화된 eVLP-함유 상청액을 0.45 μm PVDF 여과기를 통해 여과하였다. 세포 배양에 사용된 BE-eVLP의 경우, 달리 명시되지 않는다면, 제조자의 프로토콜에 따라 여과된 상청액을 PEG-it 바이러스 침전 용액 (시스템 바이오사이언시즈(System Biosciences); LV825A-1)을 사용하여 100배 농축시켰다. 마우스에게 주사된 BE-eVLP의 경우, 여과된 상청액을 PBS 중 20% (w/v) 수크로스의 쿠션을 사용하여 초원심분리에 의해 1000-3000배 농축시켰다. 초원심분리는 옵티마(Optima) XPN 초원심분리 (베크만 쿨터(Beckman Coulter))의 SW28 로터 또는 소발(Sorvall) WX+ 초원심분리 (써모 피셔 사이언티픽)의 AH-629 로터를 사용하여 26,000 rpm에서 2시간 동안 (4℃) 수행하였다. 초원심분리 후, BE-eVLP 펠렛을 저온 PBS (pH 7.4)에 재현탁시키고, 1,000 g에서 5분 동안 원심분리하여, 잔해를 제거하였다. BE-eVLP를 1℃/분의 속도로 냉동시키고, -80℃에서 보관하였다. 사용하기 직전에 eVLP를 얼음 상에서 해동시켰다.

[0445] *세포 배양에서 BE-eVLP 형질도입 및 게놈 DNA 단리*

[0446] 형질도입을 위해 세포를 48-웰 플레이트 (코닝)에서 30,000-40,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 20-24시간 후, 각각의 웰의 배양 배지에 BE-eVLP를 직접 첨가하였다. 형질도입 48-72시간 후, 세포 게놈 DNA를 이전에 보고된 바와 같이 단리하였다 (Doman *et al.*, 2020). 간략히, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 150 μL의 용해 완충제 (10 mM 트리스-HCl pH 8.0, 0.05% SDS, 25 μg mL^{-1} 프로테이나제 K (써모 피셔 사이언티픽)) 중에서 37℃에서 1시간 동안 용해시킨 후, 80℃에서 30분 동안 열 불활성화시켰다.

[0447] *게놈 DNA의 고처리량 시퀀싱*

[0448] 게놈 DNA를 상기 기재된 바와 같이 단리하였다. 게놈 DNA 단리 후, 1 μL의 단리된 DNA (1-10 ng)를 2회 PCR 반응 중 첫번째를 위해 투입하였다. 퓨전U 폴리머라제 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 게놈 로커스를 PCR1에서 증폭시켰다. 게놈 로커스에 대한 PCR1 프라이머는 표 3에서 HTS_fwd 및 HTS_rev 열 아래에 나열된다. PCR1은 다음과 같이 수행되었다: 95℃에서 3분 동안; 95℃에서 15초 동안, 61℃에서 20초 동안, 및 72℃에서 30초 동안의 30-35 주기; 72℃에서 1분 동안. PCR1 생성물을 1% 아가로스 겔 상에서 확인하였다. 이어서, 1 μL의 PCR1을 PCR2를 위한 투입으로 사용하여, 일루미나(Illumina) 바코드를 설치하였다. 퓨전 HS II 키트 (라이프 테크놀로지즈)를 사용하여 9 주기의 증폭을 위해 PCR2를 수행하였다. PCR2 후, 샘플을 풀링하고, 퀴아퀵(Qiaquick) 겔 추출 키트 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 1% 아가로스 겔에서 겔 정제하였다. 라이브러리 농도는 큐빗(Qubit) 고감도 검정 키트 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 정량화하였다. 일루미나 MiSeq 300 v2 키트 (일루미나)를 사용하여 일루미나 MiSeq 장비 (페어드-엔드 판독, 판독 1: 200-280 주기, 판독 2: 0 주기) 상에서 샘플을 시퀀싱하였다.

[0449] *고처리량 시퀀싱 데이터 분석*

[0450] MiSeq 리포터 소프트웨어 (일루미나)를 사용하여 시퀀싱 판독을 디멀티플렉싱하고, CRISPResso2 (Clement *et al.*, 2019)를 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다 (Doman *et al.*, 2020). 모든 경우에 배치 분석 모드 (각각의 고유의 앰플리콘 및 sgRNA 조합에 대해 하나의 배치가 분석됨)를 이용하였다. 분석하기 전에 최소 평균 품질 점수 (Q > 30)에 의해 판독을 필터링하였다. 하기 정량화 윈도우 파라미터를 이용하였다: -w 20 -wc -10. 염기 편집 효율은 특이적 위치에서 주어진 염기 전환을 함유하는 시퀀싱 판독의 백분율로 보고된다. 프리즘(Prism) 9 (그래프패드(GraphPad))를 이용하여, 도트 플롯 및 막대 플롯을 생성하였다.

[0451] *BE-eVLP 단백질 함량의 이뮤노블롯 분석*

[0452] 95℃에서 15분 동안 가열함으로써 BE-eVLP를 래믈리(Laemmli) 샘플 완충제 (50 mM 트리스-HCl pH 7.0, 2% 나트륨 도데실 술페이트 (SDS), 10% (v/v) 글리세롤, 2 mM 디티오트레이톨 (DTT)) 중에서 용해시켰다. 용해된 BE-eVLP를 건조 니트로셀룰로스 막 (써모 피셔 사이언티픽) 상에 스폿팅하고, 30분 동안 건조시켰다. 막을 차단 완충제 중에서 흔들면서 실온에서 1시간 동안 차단시켰다: TBST 중 1% 소 혈청 알부민 (BSA) (150 mM NaCl, 0.5% 트윈-20, 및 50 mM 트리스-HCl). 차단 후, 막을 차단 완충제 중에 희석된 하기 일차 항체 중 하나와 함께 4℃에서 밤새 흔들면서 인큐베이션하였다: 마우스 항-Cas9 (써모 피셔; MA5-23519, 1:1000 희석), 마우스 항-MLV p30 (압캠(Abcam); ab130757, 1:1500 희석), 또는 마우스 항-VSV-G (시그마 알드리치; V5507, 1:50000 희석). 막을 1xTBST (트리스-완충된 식염수 + 0.5% 트윈-20)로 실온에서 각각 10분씩 3회 세척한 다음, 염소 항-마우스 항체 (리-코르(LI-COR) IRDye 680RD; 926-68070, 차단 완충제 중에서 1:10000 희석)와 함께 실온에서 1시간 동안 흔들면서 인큐베이션하였다. 막을 이전과 같이 세척하고, 오디세이(Odyssey) 영상화 시스템 (리-코르)을 이용하여 영상화하였다.

[0453] *BE-eVLP 단백질 함량의 웨스턴 블롯 분석*

[0454] BE-eVLP를 상기 기재된 바와 같이 용해시켰다. 단백질 추출물을 NuPAGE 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제 (써모 피셔 사이언티픽)에서 NuPAGE 3-8% 트리스-아세테이트 겔 (써모 피셔 사이언티픽) 상에서 45분 동안 150 V에서 전기영동에 의해 분리하였다. PVDF 막으로의 전달은 아이블롯(iBlot) 2 겔 전달 기기 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 20 V에서 7분 동안 수행하였다. 막을 차단 완충제 중에서 실온에서 1시간 동안 흔들면서 차단시켰다: TBST 중 1% 소 혈청 알부민 (BSA) (150 mM NaCl, 0.5% 트윈-20, 및 50 mM 트리스-HCl). 차단 후, 막을 마우스 항-Cas9 (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology); 14697, 1:1000 희석)와 함께 밤새 4℃에서 흔들면서 인큐베이션하였다. 막을 1xTBST로 실온에서 각각 10분씩 3회 세척한 다음, 염소 항-마우스 항체 (리-코르 IRDye 680RD; 926-68070, 차단 완충제 중에서 1:10000 희석)와 함께 실온에서 1시간 동안 흔들면서 인큐베이션하였다. 막을 이전과 같이 세척하고, 오디세이 영상화 시스템 (리-코르)을 이용하여 영상화하였다. 절단된 ABE 및 전장 gag-ABE의 상대적인 양은 이미지제이(ImageJ)를 사용하여 농도계에 의해 정량화하고, 전체 (절단 + 전장) ABE에 비해 절단된 ABE의 분율을 계산하였다.

[0455] *생산자 세포의 면역형광 현미경 검사*

[0456] 게시클 생산자 293T 세포를 폴리-D-리신으로 코팅된 페노플레이트(PhenoPlate)™ 96-웰 마이크로플레이트 (퍼킨엘머(PerkinElmer))에서 15,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 제조자의 프로토콜에 따라 제트프라임 형질감염 시약 (폴리플러스)을 사용하여 세포를 1 ng의 v2.4 또는 v3.4 BE-VLP 플라스미드, 40 ng의 마우스 *Dnmt1*-표적화 sgRNA 플라스미드, 및 40 ng의 pUC19 플라스미드로 공동-형질감염시켰다. 40시간 후, 32% 수성 파라포름알데히드 (일렉트론 마이크로스코피 사이언시즈(Electron Microscopy Sciences))를 4% 파라포름알데히드의 최종 농도로 세포 배지에 직접적으로 적가하였다. 후속적으로 세포를 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 1xPBST (PBS + 0.1% 트리톤 X-100)로 실온에서 30분 동안 투과화시켰다. 이어서, 세포를 차단 완충제 (1xPBST 중 3% w/v BSA) 중에서 실온에서 30분 동안 차단시켰다. 차단 후, 세포를 차단 완충제 중에 희석된 마우스 항-Cas9 (셀 시그널링 테크놀로지; 14697, 1:250 희석) 및 토끼 항-튜불린 (압캠; 52866, 1:400 희석)과 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 세포를 1xPBST로 4회 세척한 다음, 차단 완충제 중에 희석된 염소 항-마우스 알렉사플루오르(AlexaFluor)® 647-접합된 항체 (압캠; 150115, 1:500 희석), 염소 항-토끼 알렉사플루오르® 488-접합된 항체 (압캠; 150077, 1:500 희석), 및 1 μM DAPI와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1xPBST로 3회 및 PBS로 2회 세척한 후, 오페라 피닉스(Opera Phenix) 고함량 스크리닝 시스템 (퍼킨엘머)을 사용하여 영상화하였다. 영상은 공초점 모드에서 20x 수침 대물렌즈를 사용하여 획득하였다. 하모니(Harmony) 소프트웨어 (퍼킨엘머)를 사용하여 자동화된 영상 분석을 수행하였다. 세포당 Cas9 신호의 평균 세포질 강도 대 세포당 튜불린 신호의 평균 세포질 강도의 비를 계산함으로써 정규화된 세포질 강도를 결정하였다.

[0457] *음성-염색 투과 전자 현미경 검사*

[0458] 음성-염색 TEM은 MIT의 코흐 나노기술 물질 핵심 시설(Koch Nanotechnology Materials Core Facility)에서 수행하였다. BE-eVLP를 15,000 g에서 5분 동안 원심분리하여, 잔해를 제거하였다. 정화된 상청액으로부터, 10 μL의 샘플 및 완충제 함유 용액을 연속 탄소 필름으로 코팅된 200 메쉬 구리 그리드에 첨가하였다. 샘플을 60초 동안 흡착시킨 후, 과량의 용액을 킴와이프로 제거하였다. 1% 수성 인텅스텐산을 함유하는 10 μL의 음성

염색 용액을 TEM 그리드에 첨가하고, 킴와이프로 염색을 즉시 블롯팅하였다. 이어서, 그리드를 화학 후드에서 실온에서 공기 건조하였다. 이어서, TEM 컬럼 내에 구비된 JEOL 단일 틸트 홀더 상에 그리드를 장착하였다. 시편을 액체-질소로 냉각시킨 다음, 10,000-60,000의 배율로 200kV에서 JEOL 2100 FEG 현미경을 사용하여 관찰하였다. 가탄(Gatan) 2kx2k 울트라스캔(UltraScan) CCD 카메라를 사용하여 영상을 촬영하였다.

[0459] *BE-eVLP 단백질 함량 정량화*

[0460] 단백질 정량화를 위해, 상기 기재된 바와 같이 BE-eVLP를 래믈리 샘플 완충제에 용해시켰다. 정제된 BE-eVLP 중 BE 단백질의 농도는 제조자의 프로토콜에 따라 패스트스캔(FastScan)™ Cas9 (에스. 피오게네스) ELISA 키트 (셀 시그널링 테크놀로지; 29666C)를 사용하여 정량화하였다. 재조합 Cas9 (에스. 피오게네스) 뉴클레아제 단백질 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs); M0386)을 사용하여, 정량화를 위한 표준 곡선을 생성하였다. 정제된 BE-eVLP 중 MLV p30 단백질의 농도는 제조자의 프로토콜에 따라 MuLV 코어 항원 ELISA 키트 (셀 바이오랩스(Cell Biolabs); VPK-156)를 사용하여 정량화하였다. VLP-연관된 p30 단백질의 농도는 MLV 입자에 대해 이전에 보고된 바와 같이 용액에서 관찰된 p30 중 20%가 eVLP와 연관이 있다는 가정 하에 계산되었다 (Renner *et al.*, 2020). VLP당 BE 단백질 분자의 수는 MLV 입자에 대해 이전에 보고된 바와 같이 eVLP당 p30 분자의 카피 수를 1800개로 가정하여 계산되었다 (Renner *et al.*, 2020). 모든 치료 적용 실험에 대해 동일한 분석을 이용하여 VLP 역가를 계산하였다. 모든 치료 적용 실험에 대해 동일한 분석을 이용하여 eVLP 역가를 계산하였다.

[0461] *BE-eVLP sgRNA 추출 및 정량화*

[0462] 제조자의 프로토콜에 따라 QIAmp 바이러스 RNA 미니 키트 (퀴아젠; 52904)를 사용하여 BE-eVLP로부터 RNA를 추출하였다. 제조자의 프로토콜에 따라 슈퍼스크립트(SuperScript)TM III 제1-가닥 합성 슈퍼믹스 (써모 피셔 사이언티픽; 18080400) 및 sgRNA-특이적 DNA 프라이머 (표 2)를 사용하여 추출된 RNA를 역전사시켰다. SYBR 녹색 염료 (론자; 50512)와 함께 CFX96 터치(Touch) 실시간 PCR 검출 시스템 (바이오-라드(Bio-Rad))을 사용하여 qPCR을 수행하였다. cDNA 투입량은 MLV p30 함량에 대해 정규화되었고, eVLP당 sgRNA 존재비는 v1 eVLP에 비한 $\log_2$[배수 변화] (ΔC_q)로 계산되었다.

[0463] *세포 생존력 검정*

[0464] 세포 생존력은 프로메가(Promega) 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 발광 세포 생존력 키트 (프로메가; G7570)를 사용하여 정량화하였다. 웰당 $4x10^4$ 세포 (HEK293T 및 NIH 3T3의 경우) 및 $2.5x10^4$ 세포 (RDEB 환자 섬유모세포의 경우)를 250 μL의 배지에 시딩하였다. BE-eVLP로 처리하기 전에 16-18시간 동안 세포가 부착되게 하였다. 형질도입 48시간 후, 100 μL의 셀타이터-글로 시약을 어두운 곳에서 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 80 μL의 용액을 검은색 96-웰 편평 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner Bio-one); 655096)로 옮기고, 1초 통합 시간으로 M1000 프로 마이크로플레이트 판독기 (테칸(Tecan)) 상에서 발광을 측정하였다. 옵티-MEM(Opti-MEM)으로 처리된 세포는 100% 생존성인 것으로 정의되었다. BE-eVLP 처리된 웰에서 생존성 세포의 백분율은 각각의 처리 웰로부터 판독한 발광을 PBS 처리된 세포의 발광에 대해 정규화함으로써 계산되었다.

[0465] **표 2**

[0466]

설명	정방향 프라이머 서열	역방향 프라이머 서열
sgRNA의 qPCR 검출	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTTTATCACAGGCTCCAGGAAG (SEQ ID NO: 316)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAAC (SEQ ID NO: 318)
BE-코딩 DNA의 qPCR 검출	ACGAGCACATTGCCAATCTG (SEQ ID NO: 317)	GCCATTTCGATCACGATGTTC (SEQ ID NO: 319)

[0467] *세포 배양에서 BE-VLP 형질도입 및 게놈 DNA 단리*

[0468] 형질도입을 위해 세포를 48-웰 플레이트 (코닝)에서 30,000-40,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 20-24시간 후, 각각의 웰의 배양 배지에 eVLP를 직접 첨가하였다. 형질도입 48-72시간 후, 세포 게놈 DNA를 이전에 보고된 바와 같이 단리하였다 (Doman *et al.*, 2020). 간략히, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 150 μL의 용해 완충제 (10 mM 트리스-HCl pH 8.0, 0.05% SDS, 25 μg mL^{-1} 프로테이나제 K (써모 피셔 사이언티픽)) 중에서 37℃에서 1시간 동안 용해시킨 후, 80℃에서 30분 동안 열 불활성화시켰다.

[0469] *플라스미드 형질감염*

[0470] 플라스미드 형질감염을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Doman *et al.*, 2020). 내독소 제거와 함께 플라스미드플러스(PlasmidPlus) 미디 키트 (퀴아젠)를 사용하여 형질감염을 위한 플라스미드를 제조하였다. 형질감염을 위해 HEK293T 세포를 48-웰 플레이트 (코닝)에서 40,000 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 20-24시간 후, 제조자의 프로토콜에 따라 웰당 1.5 μL의 리포펙타민 2000 (써모 피셔 사이언티픽)을 사용하여 1 μg 총 DNA로 세포를 형질감염시켰다. 달리 명시되지 않는다면, 웰당 750 ng의 염기 편집기 플라스미드 및 250 ng의 가이드 RNA 플라스미드를 공동-형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에 상기 기재된 바와 같이 형질감염된 세포로부터 게놈 DNA를 단리하였다.

[0471] *게놈 DNA의 고처리량 시퀀싱*

[0472] 게놈 DNA를 상기 기재된 바와 같이 시퀀싱하였다. 게놈 DNA 단리 후, 1 μL의 단리된 DNA (1-10 ng)를 2회 PCR 반응 중 첫번째를 위해 투입하였다. 퓨전U 폴리머라제 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 게놈 로커스를 PCR1에서 증폭시켰다. 게놈 로커스에 대한 PCR1 프라이머는 표 3에서 HTS_fwd 및 HTS_rev 열 아래에 나열된다. PCR1은 다음과 같이 수행되었다: 95℃에서 3분 동안; 95℃에서 15초 동안, 61℃에서 20초 동안, 및 72℃에서 30초 동안의 30-35 주기; 72℃에서 1분 동안. PCR1 생성물을 1% 아가로스 겔 상에서 확인하였다. 이어서, 1 μL의 PCR1을 PCR2를 위한 투입으로 사용하여, 일루미나 바코드를 설치하였다. 퓨전 HS II 키트 (라이프 테크놀로지즈)를 사용하여 9 주기의 증폭을 위해 PCR2를 수행하였다. PCR2 후, 샘플을 풀링하고, 퀴아퀵 겔 추출 키트 (퀴아젠)를 사용하여 1% 아가로스 겔에서 겔 정제하였다. 라이브러리 농도는 큐빗 고감도 검정 키트 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 정량화하였다. 일루미나 MiSeq 300 v2 키트 (일루미나)를 사용하여 일루미나 MiSeq 장비 (페어드-엔드 판독, 판독 1: 200-280 주기, 판독 2: 0 주기) 상에서 샘플을 시퀀싱하였다.

[0473] **표 3**

명칭	프로토스페이서 서열	HTS_fwd	HTS_rev	앰플리콘
HEK2	GAACACAAAGCATAGACTGC (SEQ ID NO: 320)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCAGCCCCATCTGTCAAACT (SEQ ID NO: 356)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAATGGATTCCTTGGAAACAATGA (SEQ ID NO: 394)	TGAATGGATTCCTTGGAAACAATGATAACAAGACCTGGCTGAGCTAACTGTGACAGCATGTGGTAATTTTCCAGCCCGCTGGCCCTGTAAAGGAAACTGGAACACAAAGCATAGACTGCGGGGCGGGCCAGCCTGAATAGCTGCAAACAAGTGCAGAATATCTGATGATGTCATACGCACAGTTTGACAGATGGGGCTGG (SEQ ID NO: 432)
HEK3	GGCCCAGACTGAGCACGTGA (SEQ ID NO: 321)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATGTGGGCTGCCTAGAAAGG (SEQ ID NO: 357)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAGCCAAACTTGTCAACC (SEQ ID NO: 395)	ATGTGGGCTGCCTAGAAAGGCATGGATGAGAGAAGCCTGGAGACAGGGATCCCAGGGAAACGCCCATGCAATTAGTCTATTTCTGCTGCAAGTAAGCATGCATTTGTAGGCTTGATGCTTTTTTTCTGCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACGTGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGGCGTCGCAGGACAGCTTTTCCTAGACAGGGGCTAGTATGTGCAGCTCCTGCACCGGGATACTGGTTGACAAGTTTGGCTGGG (SEQ ID NO: 433)
BCL11A 인핸서	TTTATCACAGGCTCCAGGAA (SEQ ID NO: 322)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCCAGAAAAGAGATATGGCATC (SEQ ID NO: 358)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAGAGCCTTCCGAAAGAGG (SEQ ID NO: 396)	GCCAGAAAAGAGATATGGCATCTACTCTTAGACATAACACACCAGGGTCAATACAACTTTGAAGCTAGTCTAGTGCAAGCTAACAGTTGCTTTTATCACAGGCTCCAGGAAGGGTTTGGCCTCTGATTAGGGTGGGGGCGTGGGTGGGGTAGAAGAGGACTGGCAGACCTCTCCATCGGTGGCCGTTTGCCCAGGGGGGCCTCTTTCGGAAGGCTCTCT (SEQ ID NO: 434)
mDnmt1	AACAGCTCTGAACGAGACCC (SEQ ID NO: 323)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCTTCGGGCATAGCATGGTC (SEQ ID NO: 359)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATATGCCTCGGCATCGGTCC (SEQ ID NO: 397)	TATATGCCTCGGCATCGGTCCCGCCCCTCACCCCCACCCTGCGTGGCACCTACCGCCTGCGGACATGGTCCGGGAGCGAGCCTGCCGGGGAGGCAAGCGCAGGCACTCGGGCTGGAGCTGTTCGCGCTGGCATCTTGCAGGTTGCAGACGACAGAACAGCTCTGAACGAGACCCCGGCTTTTTCGCGCGCGCGGAAACCAATTGGGAGGGGGCGGCGCAAGCGGAAGCAGCATGTACCACACAGGGCAAGAGAGTGGGGGAAGACCATGCTATGCCCGAAGG (SEQ ID NO: 435)
BCL11A 표적-이탈 1	CCTATCACTGGCTCCAGGAA (SEQ ID NO: 324)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACCTGTGGGCATCCTGAGTTGC (SEQ ID NO: 360)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACGGCCCCACTCCTCTCA (SEQ ID NO: 398)	ACCTGTGGGCATCCTGAGTTGCTTCTGATGTCCCACCCATCACCTTGACCTGCTCAGAGCAGAGCATTGTTCTGAAATCTGAGGCATTGTCCTGCCCACTGGCCTATCACTGGCTCCAGGAAGGGCCTAGTGTCTCTGACCAGCTCTAGATCACCTCCTCCTCCTCCTGAGCCCTGTACGTTGCCAGGCTGATGAGAGGAGTGGGGCCGTGA (SEQ ID NO: 436)
BCL11A 표적-이탈 2	CTTATCATAGGCCCC	ACACTCTTTCCCTACA	TGGAGTTCAGACGTGTGCTC	CTTGGCGCAGTTCCTGTGTATGGATATTCTTACAGAATCGCTACTCTCCCTCTCCTTTGAG

[0474]

	AGGAA (SEQ ID NO: 325)	CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCTTG GCGCAGTT CCTGTGTAT G (SEQ ID NO: 361)	TTCCGATCTTA CATGCTGTGA GAAAATGAAG TGT (SEQ ID NO: 399)	CTGGCCTAGCTTTGGCTTATCATAGGCCCC AGGAAAGGCCAGGGGACTGGGGTACCGGT TAGAGGGATATAAAAGTTCATTCTGCCTTG TACGTATGTTTAATTGATTAGAACACTTCAT TTTCTCACAGCATGTA (SEQ ID NO: 437)
HEK2 표적-이탈 1	GAACACA ATGCATA GATTGC (SEQ ID NO: 326)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGTGT GGAGAGTG AGTAAGCC A (SEQ ID NO: 362)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAC GGTAGGATGA TTTCAGGCA (SEQ ID NO: 400)	GTGTGGAGAGTGAGTAAGCCAGAACACAA TGCATAGATTGCCGGTAAATAGGTTTAGATT CATCCATTTTTAAAAAATGGTGTGGGAGCA TTAAATATGTATATAGTAGATATGGAAAAAT GATTCTCATAATAACTGACATTTCTGTTTCA CAAGAAAATTATTTTACATTATATGTATATTT TACATAAATTATACATAGTCATTTAAAAAGC TCAAATAGTGCAAAAACAATATGGAGAATT GCCTGAAATCATCCTACCGT (SEQ ID NO: 438)
HEK3 표적-이탈 1	CACCCAG ACTGAGC ACGTGC (SEQ ID NO: 327)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTCCC CTGTTGAC CTGGAGAA (SEQ ID NO: 363)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCA CTGTACTTGCC CTGACCA (SEQ ID NO: 401)	TCCCCTGTTGACCTGGAGAAGCATGAACC AGTCAAAAAGTTTAAAGACAAGAGCATTA ACTGCACCAGTGGGCAGCTCAGCTCAGAC ACCAGTAGCGTGGGCACCCAGACTGAGCA CGTGCTGGAGCCCAAGAAATGCAGAGACC TGTGCACCTCTGGTCAGGGCAAGTACAGT G (SEQ ID NO: 439)
HEK3 표적-이탈 2	GACACAG ACTGGGC ACGTGA (SEQ ID NO: 328)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTTGG TGTTGACA GGGAGCAA (SEQ ID NO: 364)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCT GAGATGTGGG CAGAAGGG (SEQ ID NO: 402)	TTGGTGTTGACAGGGAGCAACTTCACAGT CCCAGGCATCAGGACACAGACTGGGCACG TGAGGGAAGCCCAAGGGAGAGGACTGGT GTAATCGAGGCTGACTCCACTTTTAATGTT TGACTGATGATAGGTTTCAAGTCTCACTAA GTCTCCTTCCCCTTCTGCCCACATCTCAG (SEQ ID NO: 440)
HEK3 표적-이탈 3	AGCTCAG ACTGAGC AAGTGA (SEQ ID NO: 329)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTGAG AGGGAACA GAAGGGCT (SEQ ID NO: 365)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTGT CCAAAGGCCC AAGAACCT (SEQ ID NO: 403)	TGAGAGGGAACAGAAGGGCTAAGACTAA AAGGAACAGAGGAGTTCATAGTGAGCGGT AAAGAGCTCAGACTGAGCAAGTGAGGGG CTCAGCCTCCCATGGAGGACAGGGGGCTG GGGCCCCTGGCTGATGTCTGGACTGAAGC CCCCACGCCCAGAGGTTCTTGGGCCTTTG GAC (SEQ ID NO: 441)
dSaCas9 R-루프 1	GTGGTAG ACAGCAT GTGTCCT A (SEQ ID NO: 330)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTGCA GTCTCCTG CTTCTCTG (SEQ ID NO: 366)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATTGGT GGAGTGCTCT GTGTTTG (SEQ ID NO: 404)	TGGTGGAGTGCTCTGTGTTTGTCTTTATAA ACCCAGATGAGAGGATGAAGGCAACAAGC TTCTGTACCAACATACATGCCCCTTTGCCTC AAGTCTGGTTATTTTAGGGGGATGCTAGGT TGCTTTGGGTCTACCTTACTGAGAAAATGG CCCCAGGTCATTGTCATGTCCAGTTGTGGT AGACAGCATGTGTCCTAAAGGGTATATTCA CATGCATGTGCAAAAATACAGGGGTCCTTC TAACCCTATCACAGAGAAGCAGGAGACTG C (SEQ ID NO: 442)
dSaCas9 R-루프 2	ATTTACA GCCTGGC CTTTGGG G (SEQ ID NO: 331)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGGAC ATTTCCACC	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATGCTA CAGAAAGGTC AGCAGC (SEQ ID NO: 405)	GCTACAGAAAGGTCAGCAGCTATATTTAAC CTCAGACCAGGGTGCGGTGGGAGATCTGG TTTCCGGAAGACGGAATGGGGAGAAGGGC AGGTTCCCCGAGGCGCCCAGACACCCAAT CCTCCCGGTGACATTTACAGCCTGGCCTTT GGGGTCGGGTCAACGCTAGGCTGGCAGGG

[0475]

		GCAAAATG (SEQ ID NO: 367)		GAAGGGCGGGGCCGTGAGGTGAGCCGGC GCTGCAGGAAGGGGCCACCACCAGAGGG GCCATTTTGCGGTGGAAATGTCC (SEQ ID NO: 443)
dSaCas9 R-루프 3	GTGTCAG GTAATGT GCTAAAC A (SEQ ID NO: 332)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCTGC ACCTAGCC TCCATGTC (SEQ ID NO: 368)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTGC TGTGGCATCC AGAGACAT (SEQ ID NO: 406)	AAGTGTTCAGCTGCTTTTCTTTCATTTATTC CACATATAATTACTATAATTGCTAAACATTT ATTTAGTGTCAGGTAATGTGCTAAACAGAG AGTTACTGCTCAGACATGTAATAATAATAA ATAACACATCAAATAACCATACCATTTTAAG CTGTAGTATTATGAAGGGAAATCTGGAGCA AAGAGAATAGACTGTAGGGAAACCAGTTA AGAAATAGGACATGGAGGCTAGGTGCAG (SEQ ID NO: 444)
dSaCas9 R-루프 4	GGTGGAG GAGGGTG CATGGGG T (SEQ ID NO: 333)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGGAG GTGGAGAG AGGATGT (SEQ ID NO: 369)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTTC CTGAGGTCTA GGAACCCG (SEQ ID NO: 407)	TTTGCTTATCCAGAAAAGGGAGTGATTGCT TCCAGGGGCCTCAGGGGAATAAATCATAG AATCCTGGACAAGGTTTGAAGGACAGGTA GGATTTGGGTGGGTGGAGGAGGGTGCATG GGGTCAGAATTGTAACCGAAAACTCATTCC AGGTGGATAGAGAAAATTTCTAGTGTTGTT GTTTTTAAACTATTTGGGGGACTGGCACAG ACCCTTTTTGAATACCTGATGGGCTCACAT TTCTGTCGAATCCCAG (SEQ ID NO: 445)
dSaCas9 R-루프 5	TCTGCTT CTCCAGC CCTGGC (SEQ ID NO: 334)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNATGT GGGCTGCC TAGAAAGG (SEQ ID NO: 357)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCC CAGCCAAACT TGTCAACC (SEQ ID NO: 395)	ATGTGGGCTGCCTAGAAAGGCATGGATGA GAGAAGCCTGGAGACAGGGATCCCAGGG AAACGCCCATGCAATTAGTCTATTTCTGCT GCAAGTAAGCATGCATTTGTAGGCTTGATG CTTTTTTTCTGCTTCTCCAGCCCTGGCCTG GGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCAC GTGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTT CCTCCAGAGGGCGTCGCAGGACAGCTTTT CCTAGACAGGGGCTAGTATGTGCAGCTCCT GCACCGGGATACTGGTTGACAAGTTTGGCT GGG (SEQ ID NO: 433)
dSaCas9 R-루프 6	GATGTTC CAATCAG TACGCA (SEQ ID NO: 335)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCATT GCAGAGAG GCGTATC (SEQ ID NO: 370)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTG GGGTCCCAGG TGCTGAC (SEQ ID NO: 408)	CATTGCAGAGAGGCGTATCATTTCGCGGAT GTTCCAATCAGTACGCAGAGAGTCGCCGT CTCCAAGGTGAAAGCGGAAGTAGGGCCTT CGCGCACCTCATGGAATCCCTTCTGCAGCA CCTGGATCGCTTTTCCGAGCTTCTGGCGGT CTCAAGCACTACCTACGTCAGCACCTGGG ACCCC (SEQ ID NO: 446)
COL7A1 (R185X)	CAACTCA CTTCAGC TCCTCA (SEQ ID NO: 336)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCTGG TGGACACA GCTG (SEQ ID NO: 371)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAG CAGTCGTGCA CAC (SEQ ID NO: 409)	CTCTCCGGGAAACGAGGGGCAGTAGTGTC CTCAAGATGCTGAAGTCATTGACGAAGAA GAAGAAGTCACTGGTGGGCTGTGAGGCAA CTCACTTCAGCTCCTCAGGGTCAGCATTCT TGATCCCTGAAGTGACGACCCATCAGGAC TCAGTCACCCACATGCTCTCTGACTGCCCC CACCCCCCAGCTGACCTGTCACTCCTGCTC GGTCCTTACCCACAGCAAATAGCTTGACCC CCTGCCCCTTCAGCCTTTGGGCAGCTGTGT CCACCAG (SEQ ID NO: 447)
Idua (W392X)	ACTCTAG GCAGAG GTCTCAA (SEQ ID NO: 337)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTTAG GGTAGGAA GCCAGATG CTA (SEQ ID	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTGT GTGCGTGGGT GTCATC (SEQ ID NO: 410)	TTAGGGTAGGAAGCCAGATGCTAGGTATGA GAGAGCCAACAGCCTCAGCCCTCTGCTTG GCTTATAGATGGAGAACAACTCTAGGCAGA GGTCTCAAAGGCTGGGGCTGTGTTGGACA GCAATCATACAGTGGGTGTCCTGGCCAGCA CCCATCACCCTGAAGGCTCCGCAGCGGCC TGGAGTACCACAGTCCTCATCTACACTAGT GATGACACCCACGCACAC (SEQ ID NO: 448)

[0476]

		NO: 372)		
B2M	CTTACCCCACTTAACTATCT (SEQ ID NO: 338)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCT (SEQ ID NO: 373)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTCATTCAGGGTAGTATGGC (SEQ ID NO: 411)	GGGACTCATTCAGGGTAGTATGGCCATAGACCTTTTTTATATCAAAGCAGCTTTATGATATGACTACTCATACACAACTTTCAGCAGCTTACAAAAGAATGTAAGACTTACCCCACTTAACTATCTTGGGCTGTGACAAAGTCACATGGTTCACACGGCAGGCATACTCATCTTTTTCAGTGGGGGTGAATTCAGTGTAGTACAAGAGATAGAAAGACCAGTCCTTGCTGAAAGACA (SEQ ID NO: 449)
CIITA	CACTCACCTTAGCCTGAGCA (SEQ ID NO: 339)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAGGCATGCAAGTTTGGTCCTGA (SEQ ID NO: 374)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCTGCAGCCAGCACGATGT (SEQ ID NO: 412)	CCCTGCAGCCAGCACGATGTGGGTTCCCTGCGCTCTGCAGCCCCCCAGCTCAGCACCTGACCGGTATCCGGGGCCCCACTCACCTTAGCCTGAGCAGGGATGCAGCGAGCGAAGGCAGGGCCTCGGCGAGTTTGTAGGCACCCAGGTCAGTGATGTTGTTCTGGGACAGACTGCGGGGACACAGTGAGGGGGAGGGCTCAGGACCAAACTTGCATGCCT (SEQ ID NO: 450)
mPcsk9	CCCATACCTTGGAGCAACGG (SEQ ID NO: 340)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGGCTGCACTTAGAGACCACC (SEQ ID NO: 375)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAAGAGCTGATGCTCGCC (SEQ ID NO: 413)	GGCTGCACTTAGAGACCACCAGACGGCTAGATGAGCAGAGAAGACCCCCGAAGAGCATCACCCCAACCCCAAAGCAACGCCGTTGCCTGGCACCCATACCTTGGAGCAACGGCGGAAGGTGGCGGTGGCCACATGTGCGGCCTCATCAGCCAGGCCATCCTCCTGGGACGGGAGGGCGAGCATCAGCTCTTCAT (SEQ ID NO: 451)
mPcsk9 OT1	CCCCTACCTTGGGGCAACAG (SEQ ID NO: 341)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAAGTATGTTGGGACCCTTGGCTGG (SEQ ID NO: 376)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGCCTGTTCTACTGACTATGGGG (SEQ ID NO: 414)	AAGTATGTTGGGACCCTTGGCTGGGCTTCTTGCCCTCTCTAGAACCAAGATGTCACTTCTGCACACCAAGAGCTACCCCTACCTTGGGGCAACAGTGGAAGCCATGGCTGGAGAAAGCAAACAATTCCTGAAGGTGACAGATTCTCCTGGGAAGGGACTTAGCCCCATAGTCAGTAGAACAGGCCA (SEQ ID NO: 452)
mPcsk9 OT2	ACCATACCTAAGAGCAAACT (SEQ ID NO: 342)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGACAGACACAGGGAAGCCTTGGG (SEQ ID NO: 377)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACCTTCCAGGAGAGAAAACCTGT (SEQ ID NO: 415)	GACAGACACAGGGAAGCCTTGGGGAGCCGGAGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGGGTCCCTGGGCAGATGCTCACACTGGGCAGAAGGTCACACCATACCTAAGAGCAAACTGGGGCCCAAACGACTGAGTGTTGCTGAGAGCCATCCTTGGCTCATTCTCAAAAAACAGGTTTCTCTCTCCTGGAAGGTT (SEQ ID NO: 453)
mPcsk9 OT3	CCCACCCTTTGGAGAACGG (SEQ ID NO: 343)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGGCAAGGGACAGGGTCAGC (SEQ ID NO: 378)	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCTGGTGGCAGAGGTGTGG (SEQ ID NO: 416)	TGGCAAGGGACAGGGTCAGCTCTTCACTCCCATTCCATCTGGGGCAGCTCACCTGCATCCAAGCCAATAGAGACAGCCCTACTGTGTTGCTCAGTTGAGGTACGGGGCCCCACCCTTTGGAGAACGGTGGGGGTGGGAGCTATGCCAACACTTCTGCTCTAACACCCTCACAGCTAGCTCACCCACACCTCTGCCACCAGCT (SEQ ID NO: 454)
mPcsk9 OT4	CCCAGCCTTGGGGCAACGG (SEQ ID NO: 344)	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTCA	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCACCACCCAGCAGCTTTATTG	TTCAAGCAATCACGAGACACTCAGTTTGGATCCCCAGAGCCCACATAAAAGATCAGACACAGAGTGCATGCCTGTAACCCCAGCCTTGGGGCAACGGAGGCTCTGAAGCTCGTCGGTTAGCCAGCTGAAGCATATCCATGAGGTTTA

[0477]

		AGCAATCA CGAGACAC TCAG (SEQ ID NO: 379)	(SEQ ID NO: 417)	GTGTTGGAGCCTGTCTCAATAAAGCTGCTG GGTGGTGGG (SEQ ID NO: 455)
mPcsk9 OT5	CACATAT CTAGGAG CAAGG (SEQ ID NO: 345)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTCTC AGGCGACC TGGTTTCT GC (SEQ ID NO: 380)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTTC TGCCAGATGC GTCCGATCA (SEQ ID NO: 418)	TCTCAGGCGACCTGGTTTCTGCAAAGGGC AGGGTTGGCTTTATGCTGAGTCCTACAGAT CTTAGACCCCCCCCCCCAAACTTAAACACA TATCTAGGAGCAAGGAGGGGTCATGAAAA GATAGAGCCTGCTTTGGCAGACTATAGAAC AGAACACTAAGGATTTAACTTACTAGTGAA ATGATCGGACGCATCTGGCAGA (SEQ ID NO: 456)
mPcsk9 OT6	CCCACAC CCGGAGC AACGG (SEQ ID NO: 346)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGCCA GCCCTGCC TGGAAGTT AG (SEQ ID NO: 381)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTTG ACCTCCGGGA TTCTCAGCCC (SEQ ID NO: 419)	GCCAGCCCTGCCTGGAAGTTAGCCATGGA GGATGGAGCTGAACTTGACCTTTGCGGTTC ACAGCCCACACCCGGAGCAACGGGGAGG TCGTCGTGAGCCCAGTCAGTCGTTTGGTTG CAAAGAACTTTTTAATAAGGGAAGTTTTCA GTCATGGAATGAGAGGTGAGGTGAAGTGG GCTGAGAATCCCGGAGGTCA (SEQ ID NO: 457)
mPcsk9 OT7	TCCATAC CCGGAGC AACGA (SEQ ID NO: 347)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGCTT CCTGTCTG CAATTGGG GTCT (SEQ ID NO: 382)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAG TAGGTTGCGG GGCTCAGGA (SEQ ID NO: 420)	GCTTCCTGTCTGCAATTGGGGTCTTTGTTG TCCTTCTGGCTGTCCTTCTCCTCTTCATCAA CAAGAAGCTATGCTCTGAAAACCTAAGAG GGCATCCATACCCGGAGCAACGAGGGAAG AGAAAGCACTCGAGAGACAAGACTGGAG GCCACACAGGAACTGGTAAGCACCATGCT TTATGTTTTCCTGAGCCCCGCAACCTACT (SEQ ID NO: 458)
mPcsk9 OT8	TTCATCC TTGGAGC AACGG (SEQ ID NO: 348)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCCAG CAGGTCCC CAGTGACG (SEQ ID NO: 383)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTTA CCCACCTGGG TGTGTCCA (SEQ ID NO: 421)	CCAGCAGGTCCCCAGTGACGCAAGCCAGC AGGGGGTGGGAAGCTTCAGGAGAAAAGG ACATGGAGCAGTAGGGTATGACATTCAAA GCCTGACAGCGTCTCTACCAGCCCTTCATC CTTGGAGCAACGGTGAGATGAACATTTATG TTCATACTGCAGAGTTGAACAGAATCCAGA ACAGCCAGCCTTTTGAGCTACATAACAAA AGTATCATGTGCACATGTGGACACACCCAG GTGGGTA (SEQ ID NO: 459)
mPcsk9 OT9	TCTGTAC CATGGAG CAAAGG (SEQ ID NO: 349)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNAACC TCCACGGG GGTATCTG AGG (SEQ ID NO: 384)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAC CTGGCAAGTG GGGTACTGG (SEQ ID NO: 422)	AACCTCCACGGGGGTATCTGAGGTCTTCTG CTGTAGTGTGTCCTTTCAGTCATCAATAAC ATGGGCAGGTACCATCCCCTCCGATGTGGG CGAGTACCACAAGTTTGCAAGGTCACAGG GCTGCTCTGTACCATGGAGCAAAGGCGGA AAGGAAACCTTGGGTGTCTGATGCATTGG AACCCAGTACCCCACTTGCCAGGT (SEQ ID NO: 460)
mPcsk9 OT10	ACCATAA CCAAGAG CAACAG (SEQ ID NO: 350)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGTCT AAATGGGC AAGCAATC CCCT (SEQ ID NO: 385)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCC AGGATCCCAC AGGGTCCTTC T (SEQ ID NO: 423)	GTCTAAATGGGCAAGCAATCCCCTGTCCAG GGTCGATTCAGGGCTGTCTGTGAGAAGTC TCGGTGTCTTATGGAGGATTTCTACTGATG AGTAAAACACCATAACCAAGAGCAACAGG GGAGGGAAGGGTCTCCTGCAGCTTACATC TGACAGTCATCCAGGGTAGTCAGTGAAGG GACTCTCTCAGAAGGACCCTGTGGGATCC TGG (SEQ ID NO: 461)
mPcsk9 OT11	TCCATAA CTCAGAG	ACACTCTT TCCCTACA	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC	TCCCCAGAGCCCAGGGAATATCATGGGGG AATATAAGAGCTATAGGATGAGAATTGGTG

[0478]

	CAACAG (SEQ ID NO: 351)	CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTCCC CAGAGCCC AGGGAATA TCA (SEQ ID NO: 386)	TTCCGATCTTG TTGCTCCGAT GGAAGGATGG G (SEQ ID NO: 424)	CTACAGAATGCTGTTTGTGGATAAGACATG GCTGATGCATCCATAACTCAGAGCAACAGT GGTGACTTGCTCAAGACCTTCACAAGACT GAGCTGTCAACCTTCTACCCTGGATGGAAG ACGGGATGGTAAGATCCCATCCTTCCATCG GAGCAACA (SEQ ID NO: 462)
mPcsk9 OT12	GCCATAC CCTGGGG CAGCAG (SEQ ID NO: 352)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTGTG GAACCCAC CCCCGATA CA (SEQ ID NO: 387)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAG TGCTGATGGG CAAGGCATTT G (SEQ ID NO: 425)	TGTGGAACCCACCCCCGATACACACACAC CTTAAGTCGTACCTCTCTCAACATGTCTGC TGAAGCCACCTGCCCCGCGAGAGTAAGCA GGCGCCATACCCTGGGGCAGCAGTGGAGG CTATGATTTAGAATAACTGTGGTCCGGTCTC TCTAACATTTGCCGCTGTATTCATTCTAAGT TTAATGAGGGACAAATGCCTTGCCCATCAG CACT (SEQ ID NO: 463)
mPcsk9 OT13	GCAACAC CTTGGAG CAACTG (SEQ ID NO: 353)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNCCAC CAGAAGCG CCCCAGAA (SEQ ID NO: 388)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTG GGGAATCGCC TCCACTGCC (SEQ ID NO: 426)	CCACCAGAAGCGCCCCAGAACTCCTTGCT GGCTAGTTGGCCTCTCATCAGCTCAGCCTG CCCAACTCAGCGTGGGGCTGTAGGTGCAA CACCTTGGAGCAACTGAGGTATCAACAGC AGAGATAGAGATGGAGGAAGCTGCAGCAA CAGAGGCAGTGGAGGCGATTCCCC (SEQ ID NO: 464)
mPcsk9 OT14	GACATCC TTGGAGC AACTG (SEQ ID NO: 354)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGTTC TTATTGGCC AGGGAGCC TT (SEQ ID NO: 389)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCT CCCCAAGTGA CAGGAACCAC G (SEQ ID NO: 427)	GTTCTTATTGGCCAGGGAGCCTTTCTGCAG TTCTTTGTAAATCCAGCTAAAATGCAAACA CTGACATCAATCATTTGAAATGAGGTGGCT GTCAGGTCCTCAGACATCCTTGGAGCAAC TGTGGGTGAGTATTCCTGATGGGAATTTTC TCTCTTCATCCAGGAGTGAGGGCTCACTTG GTGCCCAACCTACAGGCTGGGTGGAGGGC TGGGCACCACGTGGTTCCTGTCACTTGGG GAG (SEQ ID NO: 465)
Rpe65 (R44X) gDNA	ACATCAG AGGAGA CTGCCAG (SEQ ID NO: 355)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNAGCT GACAAATA ACAAATAG GCACA (SEQ ID NO: 390)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTG GCTCTACTCTG GTGAGGTCAG (SEQ ID NO: 428)	GGCTCTACTCTGGTGAGGTCAGTCATGGAC TTACCTTCTGTGGTATGTGACATGGCCCTC CTTGAAGTCAAACTTGTGCAAAAGGGCTT GTCCATCAAACAGGTGATAGAAAGGCTCA GATCCAACTTCAAAGAGCCCTGGCCCACA TCAGAGGAGACTGCCAGTGAGCCAGAGG GGAATCCTGCCTGCAGCAAAGTGAGATATC AGGTGGTACTACTTACTAGATTTTCTATGTG CCTATTTGTTATTTGTCAGCT (SEQ ID NO: 466)
Rpe65 (R44X) cDNA	ACATCAG AGGAGA CTGCCAG (SEQ ID NO: 355)	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNTGTC CTCACCAC TAACAGCT (SEQ ID NO: 391)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCT TCTCAGTCATT GCTCGAACA (SEQ ID NO: 429)	CTTCTCAGTCATTGCTCGAACATAAGCATC AGTGCGGATGAATCTTCTGTGGTATGTGAC ATGGCCCTCCTTGAAGTCAAACTTGTGCAA AAGGGCTTGTCCATCAAACAGGTGATAGA AAGGCTCAGATCCAACTTCAAAGAGCCCT GGCCCACATCAGAGGAGACTGCCAGTGAG CCAGAGGGGAATCCTGCCTGTGACATGAG CTGTTAGTGGTGAGGACA (SEQ ID NO: 467)
Mcm3ap cDNA	n/a	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGCTT CCAAAGCC TGCGCCTG	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTCC ATGGAAACTT CCTCAGCGGC (SEQ ID NO: 430)	GCTTCCAAAGCCTGCGCCTGTGTACTCTGA CTCGGACCTGGTACAGGTGGTGGACGAGC TCATCCAGGAGGCTCTGCAAGTGGACTGT GAGGAAGTCAGCTCCGCTGGGGCAGCCTA CGTAGCCGCAGCTCTGGGCGTTTCCAATGC TGCTGTGGAGGATCTGATTACTGCTGCGAC CACGGGCATTCTGAGGCACGTTGCCGCTG

[0479]

		(SEQ ID NO: 392)		AGGAAGTTTCCATGG (SEQ ID NO: 468)
Perp cDNA	n/a	ACACTCTT TCCCTACA CGACGCTC TTCCGATCT NNNNGCCA TCGCCTTC GACATCAT (SEQ ID NO: 393)	TGGAGTTCAG ACGTGTGCTC TTCCGATCTAA CAAGCATCTG GGGTCCAC (SEQ ID NO: 431)	GCCATCGCCTTCGACATCATCGCGCTGGCC GGCCGCGGCTGGCTGCAGTCTAGCAACCA CATCCAGACATCGTCGCTTTGGTGGAGGTG TTTCGACGAGGGCGGCGGCAGCGGCTCCT ACGACGATGGCTGCCAGAGCCTCATGGAG TACGCATGGGGACGAGCAGCTGCAGCCAC GCTTTTCTGTGGCTTTATCATCCTGTGCATC TGCTTCATTCTCTCGTTCTTCGCCCTGTGTG GACCCCAGATGCTTGTT (SEQ ID NO: 469)

[0480]

[0481] *고처리량 시퀀싱 데이터 분석*

[0482] MiSeq 리포터 소프트웨어 (일루미나)를 사용하여 시퀀싱 판독을 디멀티플렉싱하고, CRISPResso2 (Clement *et al.*, 2019)를 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다 (Doman *et al.*, 2020). 모든 경우에 배치 분석 모드 (각각의 고유의 앰플리콘 및 sgRNA 조합에 대해 하나의 배치가 분석됨)를 이용하였다. 분석하기 전에 최소 평균 품질 점수 (Q > 30)에 의해 판독을 필터링하였다. 하기 정량화 윈도우 파라미터를 이용하였다: -w 20 -wc -10. 염기 편집 효율은 특이적 위치에서 주어진 염기 전환을 함유하는 시퀀싱 판독의 백분율로 보고된다. 프리즘 9 (그래프패드)를 이용하여, 도트 플롯 및 막대 플롯을 생성하였다.

[0483] *HEK293T 세포에서 표적-이탈 DNA 염기 편집의 평가*

[0484] 상기 기재된 바와 같이 HEK293T 세포를 v4 BE-eVLP로 형질도입시키거나 또는 BE-코딩 플라스미드로 형질감염시켰다. Cas-의존성 표적-이탈 편집을 평가하기 위해, 세포를 동일한 날에 1 μL의 v4 BE-eVLP로 형질감염 또는 형질도입시키고, 두 경우 모두 처리 72시간 후에 게놈 DNA를 단리하였다. 상기 기재된 바와 같이 표적-적중 및 표적-이탈 로커스를 증폭시키고 시퀀싱하였다. 직교식 R-루프 검정을 이전에 기재된 바와 같이 수행하여 (Doman *et al.*, 2020) Cas-독립적인 표적-이탈 편집을 평가하였다. 플라스미드 형질감염 후 SaCas9의 발현 및 표적-이탈 R-루프의 형성을 위한 시간을 허용하기 위해, dSaCas9- 및 직교식 sgRNA-코딩 플라스미드로 형질감염 24시간 후에 세포를 1 μL의 PEG-농축된 v4 BE-eVLP로 형질도입시켰다. 상기 기재된 바와 같이 형질감염 72시간 후 (형질도입 48시간 후) 게놈 DNA를 단리하고 시퀀싱하였다. 실험 개략도에 대해서는 도 12a 또한 참조한다. 실험 개략도에 대해서는 도 11a 또한 참조한다.

[0485] *BE-코딩 DNA의 정량화*

[0486] BE-eVLP 제제에서 BE-코딩 DNA의 양을 정량화하기 위해, v4 BE-eVLP를 상기 기재된 바와 같이 용해시키고, 용해물을 BE-특이적 프라이머와 함께 qPCR 반응에 대한 투입으로 사용하였다 (표 2). eVLP-형질도입된 대 플라스미드-형질감염된 HEK293T 세포에서 BE-코딩 DNA의 양을 정량화하기 위해, 세포 용해물로부터 DNA를 상기 기재된 바와 같이 단리하고, BE-특이적 프라이머와 함께 qPCR 반응에 대한 투입으로 사용하였다 (표 2). 두 경우 모두, 공지된 농도의 BE-코딩 플라스미드 표준을 사용하여 표준 곡선을 생성하였고, 원래의 샘플에 존재하는 BE-코딩 DNA의 양을 추론하기 위해 사용하였다.

[0487] *T 세포의 형질도입 및 게놈 DNA 제조*

[0488] 10% AB 인간 혈청 (밸리 바이오메디컬(Valley Biomedical); HP1022), 2 mg/mL N-아세틸-시스테인 (시그마 알드리치; A7250), 300 IU/mL 재조합 인간 IL-2 (페프로테크(Peprotech); 200-02) 및 5 ng/mL 재조합 인간 IL-7 (페프로테크; 200-07) 및 5 ng/mL IL-15 (페프로테크; 500-P15)를 갖는 X-VIVO™ 15 혈청-무함유 조혈 세포 배지 (론자; BE02-0606F)로 구성된 기본 T-세포 배지에서 해동된 세포 (0일차)를 24시간 동안 휴지시켰다. 1일차에, 50 μL의 T-세포 배지 중 50,000개 세포를 10 μg/cm^2 렉트로넥틴(RectroNectin)® (클론테크(Clontech)/다카라; 카탈로그 번호 T100A/B)으로 코팅된 96-웰-플레이트에 플레이팅하였다. 1일차에 5 μL (3.0x10^{10} eVLP)의 초원심분리-정제된 v4 BE-eVLP를 이용하여 세포를 형질도입시키고, 2일차에 세포를 다이나비즈(Dynabeads)™ 인간 T-확장기 CD3/CD28 비드 (써모 피셔; 11161D)로 자극하였다. 비드를 3:1의 비드 대 세포 비에서 50 μL의 부피로 첨가하였다. 3일차에, 200 μL의 총 배지 부피에서 5 μL (3.0x10^{10} eVLP)의 v4 BE-eVLP에 의해 세포를 두번째로 형질도입시켰다. 24시간 후 (4일차), 세포를 1 mL의 신선한 T-세포 배지에 재현탁시키고, 48 웰 플레이트의 웰에 다시 플레이팅하였다. 6일차에, 세포를 수확하고, 퀵익스트랙트(QuickExtract)™ DNA 추출 용액 (루시젠(Lucigen); QE09050)을 이용하여 게놈 DNA를 단리하였다.

[0489] *렌티바이러스 벡터 클로닝 및 생성*

[0490] 렌티바이러스 벡터는 lentiCRISPRv2 백본 (애드진 #135955)으로의 USER 클로닝을 통해 구축하였다. 렌티바이러스 전달 벡터는 NEB 안정한 적격성 이. 콜라이 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)에서 증식시켰다. HEK293T/17 (ATCC CRL-11268) 세포를 10% 태아 소 혈청 (v/v)으로 보충된 항생제-무함유 DMEM에서 유지시켰다. 1일차에, 5 x 106 세포를 T75 플라스크에서 10 mL의 배지 중에 플레이팅하였다. 다음 날, 1,500 μL 옵티-MEM과 70 μL의 퓨진(FuGENE)으로 희석된 6 μg의 VSV-G 외피 플라스미드, 9 μg의 psPAX2 (바이러스 패키징 단백질을 코딩하는 플라스미드) 및 9 μg의 전달 벡터 플라스미드 (관심 유전자를 코딩하는 플라스미드)로 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 2일 후, 배지를 500 g에서 5분 동안 원심분리하고, 0.45-μm PVDF 진공 여과기를 사용하여 여과한 후에 세포 잔해를 제거하였다. eVLP 생성을 위해 상기 기재된 바와 같이 20% (w/v) 수크로스 쿠션을 사용하여 초원심분리함으로써 렌티바이러스를 추가로 농축시켰다.

[0491] *AAV 생성*

[0492] AAV 생성은 일부 변경을 통해 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다 (Deverman *et al.*, 2016; Levy *et al.*, 2020). HEK293T/17 세포를 150-mm 디쉬에서 항생제없이 10% 태아 소 혈청을 갖는 DMEM (써모 피셔 사이언티픽; 157150)에서 유지시키고, 2-3일마다 계대시켰다. 생성을 위한 세포는 폴리에틸렌이민 형질감염 하루 전에 1:3으로 분할되었다. 이어서, 플레이트당 5.7 μg AAV 게놈, 11.4 μg p헬퍼 (클론테크), 및 22.8 μg AAV8 rep-cap 플라스미드를 형질감염시켰다. 형질감염 다음 날, 배지를 5% 태아 소 혈청을 갖는 DMEM으로 교환하였다. 형질감염 3일 후, 세포를 고무 세포 스크레이퍼 (코닝)로 긁어내고, 2,000 g에서 10분 동안 원심분리

하여 펠렛화하고, 플레이트당 500 μl 고장성 용해 완충제 (40 mM 트리스 염기, 500 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ 및 100 U mL^{-1} 염 활성 뉴클레아제 (아크틱자임스(ArcticZymes); 70910-202)) 중에 재현탁시키고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 세포를 용해시켰다. 배지를 경사분리하고, 2.5 M NaCl 중 40% 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)의 5X 용액과 합하고 (최종 농도: 8% PEG/500 mM NaCl), 얼음 상에서 2시간 동안 인큐베이션하여 PEG 침전을 용이하게 하고, 3,200 g에서 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 펠렛을 플레이트당 500 μL 용해 완충제 중에 재현탁시키고, 세포 용해물에 첨가하였다. 조 용해물을 4℃에서 밤새 인큐베이션하거나 또는 초원심분리를 위해 직접 사용하였다.

[0493] 세포 용해물을 2,000 g에서 10분 동안 원심분리함으로써 정화시키고, 16-게이지 5" 일회용 니들 (에어-타이트(Air-Tite) N165)을 통해 베크만 퀵-실(Quick-Seal) 튜브에 첨가하였다. 순차적으로 층을 부유시킴으로써 불연속적인 아이오딕사놀 구배가 형성되었다: 500 mM NaCl 및 1x PBS-MK (1x PBS + 1 mM $MgCl_2$ 및 2.5 mM KCl) 중 9 mL 15% 아이오딕사놀, 1x PBS-MK 중 6 mL 25% 아이오딕사놀, 및 1x PBS-MK 중 각각 5 mL의 40 및 60% 아이오딕사놀. 1 μg mL^{-1} 최종 농도의 페놀 레드를 15, 25 및 60% 층에 첨가하여, 식별을 용이하게 하였다. 58,600 rpm에서 2시간 15분 동안 18℃에서 옵티마 XPN-100 초원심분리 (베크만 쿨터)에서 Ti 70 로터를 사용하여 초원심분리를 수행하였다. 초원심분리 후, 18-게이지 니들을 통해 40-60% 아이오딕사놀 계면으로부터 3 mL의 용액을 빼내고, 100-kD MWCO 컬럼 (이엠디 밀리포어(EMD Millipore))을 사용하여 0.001% F-68을 함유하는 PBS로 투석하였다. 농축된 바이러스 용액을 0.22-μm 여과기를 사용하여 멸균 여과하였다. 최종 AAV 제제를 qPCR (AAVpro 적정 키트 버전 2; 클론테크)을 통해 정량화하고, 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다.

[0494] *동물*

[0495] P0 연구를 위해 적시 임신한 C57BL/6J 마우스를 찰스 리버 래보러토리즈(Charles River Laboratories) (027)로부터 구입하였다. 야생형 성체 C57BL/6J 마우스 (000664) 및 착색된 *rd12* 마우스 (005379)를 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory)로부터 구입하였다. 모든 마우스를 표준 설치류 식이 및 물에 자유롭게 접근가능하여 12시간 명암 주기로 유지되는 방에 하우징하였다. 동물을 다양한 실험 그룹으로 무작위로 배정하였다.

[0496] *P0 뇌실 주사*

[0497] P0 뇌실 주사를 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Levy *et al.*, 2020). 드러몬드(Drummond) PCR 피펫 (5-000-1001-X10)을 셔터(Sutter) P1000 마이크로피펫 풀러 상에서 경사 시험 값으로 잡아 당기고, 킴와이프에 3회 통과시켜, ~100 μm의 팁 크기를 생성하였다. 소량의 패스트 그린(Fast Green)을 BE-eVLP 주사 용액에 첨가하여, 뇌실 표적화를 평가하였다. 포함된 드러몬드 플런저를 사용하여 전면 충전을 통해 주사 용액을 로딩하였다. P0 새끼가 움직이지 않고 발가락 핀치에 반응하지 않을 때까지 2-3분 동안 얼음 상에 놓고 마취시켰다. 이어서, 2 μL의 주사 믹스 (총 3.2 pmol의 BE 단백질을 캡슐화하는 $2.6x10^{10}$ eVLP를 함유함)를 각각의 뇌실에 손으로 주사하였다. 뇌실 표적화는 머리의 투과조명을 통해 뇌실 전체에 걸쳐 패스트 그린의 확산에 의해 평가하였다.

[0498] *핵 단리 및 분류*

[0499] 이전에 기재된 바와 같이 피질 및 중뇌로부터 핵을 단리하였다 (Levy *et al.*, 2020). 간략히, 유리 다운스(Dounce) 균질화기 (시그마-알드리치; D8938)를 사용하여 2 mL의 빙냉 EZ-PREP 완충제 (시그마-알드리치; NUC-101) 중에서 절개된 피질 및 중뇌를 막자 A에 의해 20회 스트로크, 이어서 막자 B에 의해 20회 스트로크하여 균질화시켰다. 이어서, 얼음 상에서 추가 2 mL의 EZ-PREP 완충제를 함유하는 새로운 튜브로 샘플을 경사분리하였다. 5분 후, 균질화된 조직을 500 g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하였다. PBS 중 100 μg/mL BSA (NEB; B9000S) 및 3.33 μM 바이브란트(Vybrant) 다이사이클 루비 (써모 피셔; V10309)로 이루어진 4 mL의 빙냉 핵 현탁 완충제 (NSB) 중에 핵 펠렛을 재현탁시킨 후, 500 g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 상청액을 제거하고, 핵을 1-2 mL의 NSB 중에 재현탁시키고, 35-μm 세포 스트레이너에 통과시킨 후, 브로드 인스티튜트(Broad Institute) 유세포 분석 코어에서 소니(Sony) MA900 세포 분류기 (소니 바이오테크놀로지(Sony Biotechnology))를 사용하여 유동 분류하였다. 예를 들어 FACS 게이팅에 대해서는 도 13a를 참조한다. 핵을 디앤에이드밴스(DNAdvance) 용해 완충제에 분류하고, 제조자의 프로토콜 (베크만 쿨터; A48705)에 따라 게놈 DNA를 정제하였다

[0500] *안구-후방 주사*

[0501] 50 μL의 VLP ($4x10^{11}$ 또는 $7x10^{11}$ VLP를 함유함)를 15,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 잔해를 제거하였다. 주사 직전에 정화된 상청액을 0.9% NaCl (프레세니우스 카비(Fresenius Kabi); 918610)에서 120 μL로 희석하였다. 주사 직전에 $1x10^{11}$ 바이러스 게놈 (vg)의 총 AAV를 0.9% NaCl (프레세니우스 카비; 918610)에서 120 μL로 희석하였다. 4% 이소플루란에 의해 마취를 유도하였다. 유도 후, 양측 발가락 핀치에 대한 무반응에 의해 측정되는 바와 같이, 피부에 가벼운 압력을 가하여 오른쪽 눈을 돌출시키고, 경사면이 눈으로부터 멀리 향하도록 하여 인슐린 시린지를 안구후동으로 전진시켰고, 여기서 VLP 또는 AAV 믹스가 천천히 주입되었다. 이어서, 진통제로서 프로파라카인 히드로클로라이드 점안액 (패터슨 베터러너리(Patterson Veterinary); 07-885-9765) 한 방울을 눈에 적용하였다. 제조자의 지침에 따라 아젠코트 디앤에이드밴스 키트 (베크만 쿨터; A48705)를 사용하여 다양한 조직으로부터 게놈 DNA를 정제하였다.

[0502] *조직학 및 염색*

[0503] 간 조직을 밤새 4℃에서 4% PFA에 고정시켰다. 다음 날, 고정된 간을 10 mM 글리신을 갖는 1x PBS로 옮겨서, 적어도 24시간 동안 유리 알데히드를 켄칭시킨 후, 하버드 의과 대학의 설치류 조직병리학 코어(Rodent Histopathology Core of Harvard Medical School)에서 파라핀화하였다. 이어서, 간 파라핀 블록을 5 μm 섹션으로 절단한 후, 조직병리학 실험을 위해 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

[0504] *알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 검정*

[0505] 주사 7일 후에 악하 출혈을 통해 혈액을 수집하고, 실온에서 1시간 동안 응고시켰다. 이어서, 2000 g에서 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하고, 분석을 위해 아이덱스 바이오어낼리틱스(IDEXX Bioanalytics, 메사추체츠 주)로 보냈다.

[0506] *혈청 Pcsk9 측정*

[0507] Pcsk9의 혈청 수준을 추적하기 위해, 혈청 분리기 튜브에서 악하 출혈을 이용하여 혈액을 수집하였다. 2000 g에서 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하고, -80℃에서 보관하였다. Pcsk9 수준은 제조자의 지침에 따라 마우스 프로프로테인 컨버타제 9/PCSK9 콴티킨(Quantikine) ELISA 키트 (알앤디 시스템즈(R&D Systems); MPC900)를 사용하여 ELISA에 의해 결정되었다.

[0508] *CIRCLE-seq*

[0509] 이전에 기재된 바와 같이 하기 변형을 제외하고 시퀀싱에 의한 절단 효과의 시험관내 보고를 위한 순환화 (Circularization for *In vitro* Reporting of Cleavage Effects by sequencing; CIRCLE-seq)를 수행하고 분석하였다 (Tsai *et al.*, 2017): Cas9 절단 단계의 경우, 가이드 변성, 인큐베이션, 및 프로테이나제 K 처리는 CHANGE-seq 프로토콜에 기재된 더 효율적인 방법을 이용하여 수행하였다 (Lazzarotto *et al.*, 2020). 구체적으로, 가이드 서열 "GCCCATACCTTGGAGCAACGG" (서열식별번호: 496)을 갖는 sgRNA를 그들의 표준 화학적 변형인 처음 3개 및 마지막 3개 염기에 대한 2'O-메틸 및 처음 3개와 마지막 2개 염기 사이의 포스포로티오에이트 결합과 함께 신테고(Synthego)에서 주문하였다. 5' "G" 뉴클레오티드가 20-뉴클레오티드 특이적 가이드 서열에 포함되어, VLP로 발현되고 패키징되는 서열을 재연하였다. sgRNA를 뉴클레아제-무함유 물에서 9 μM로 희석하고, 90℃에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 0.1℃/초의 경사 속도에서 25℃까지 천천히 어닐링함으로써 다시 폴딩시켰다. 5 μL의 10x Cas9 뉴클레아제 반응 완충제 (뉴클레아제와 함께 제공됨), 4.5 μL의 1 μM Cas9 뉴클레아제 (1x Cas9 뉴클레아제 반응 완충제에서 20 μM 스톡으로부터 희석됨), 및 1.5 μL의 9 μM 어닐링된 sgRNA를 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 인큐베이션함으로써 sgRNA를 Cas9 뉴클레아제 (NEB; M0386T)와 복합체화시켰다. 마우스 N2A 세포로부터의 원형 DNA를 125 ng의 총 질량으로 첨가하고, 50 μL의 최종 부피로 희석하였다. 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 프로테이나제 K (NEB; P8107S)를 물에서 4배 희석하고, 5 μL의 희석된 혼합물을 절단 반응에 첨가하였다. 37℃에서 15분 동안 프로테이나제 K로 처리한 후, CIRCLE-seq 프로토콜에 기재된 바와 같이, DNA에 A-테일을 부착하고, 어댑터 라이게이션하고, USER-처리하고, PCR-증폭시켰다 (Tsai *et al.*, 2017). PCR 후, 샘플을 제조용 1% 아가로스 겔 상에 로딩하고, DNA를 300bp 내지 1kb 범위에서 추출하여, 일루미나 MiSeq 상에서 시퀀싱하기 전에 프라이머 이량체를 제거하였다. CIRCLE-seq 분석 파이프라인을 이용하여 데이터를 가공하고, 하기 파라미터를 이용하여 인간 게놈 Hg19 (GRCh37)에 대해 정렬시켰다: "판독_임계치: 4; 윈도우-크기: 3; mapq_임계치: 50; 시작_임계치: 1; 갭_임계치: 3; 미스매치_임계치: 6; 병합된_분석: 사실".

[0510] *CIRCLE-seq에 의해 지정된 표적-이탈 부위의 앰플리콘 시퀀싱*

[0511] CIRCLE-seq에 의해 지정된 ABE8e 표적-이탈 부위를 철저하게 평가하였을 때, 표적-이탈 편집 효율이 CIRCLE-seq

판독 카운트에 의해 잘 추적되지 않는 것으로 이전에 관찰되었다 (Newby *et al.*, 2021). 그러나, 편집이 관찰된 지정된 표적-이탈 부위는 일부 눈에 띄는 유사성을 공유하였다. 즉, 검증된 표적-이탈 편집을 갖는 54개의 표적-이탈 부위 중 90.7% 초과가 PAM에 가까운 9개의 뉴클레오티드에서 가이드에 대해 0개의 미스매치 또는 1개의 미스매치를 가졌다. 이 영역에서 1개 초과의 미스매치를 갖는 몇몇 부위는 모두 낮은 효율로 편집되었다 (편집 효율에 의해 순위를 매겼을 때 하위 절반인 부위). 이러한 지식을 기반으로 하여, PAM에 가까운 프로토스페이서의 9개의 뉴클레오티드에서 1개 이하의 미스매치를 나타내는 CIRCLE-seq 목록에서 평가하기 위해 14개의 표적-이탈 부위를 선택하여, 진정한 표적-이탈 부위가 시퀀싱될 가능성을 증가시켰다 (표 5).

[0512] *마우스 망막하 주사*

[0513] 인산염-완충된 식염수 중 20 mg/mL 케타민 및 1.75 mg/mL 크실라진으로 이루어진 칵테일을 20 g 체중당 0.1 mL의 용량으로 복강내 주사하여 마우스를 마취시키고, 1% 트로피카미드 점안액 (아코른(Akorn); 17478-102-12)의 국소 투여에 의해 그들의 동공을 확장시켰다. 안과 수술용 현미경 (자이쓰(Zeiss)) 하에서 망막하 주사를 수행하였다. 25-게이지 니들을 사용하여 코쪽 가장자리에 인접한 각막을 통해 절개하였다. 실플렉스(SilFlex) 튜브 (월드 프리시젼 인스트루먼츠(World Precision Instruments); 실플렉스-2)에 의해 RPE-KIT (월드 프리시젼 인스트루먼츠, 번호 RPE-KIT)에 연결된 34-게이지 평활-말단 니들 (월드 프리시젼 인스트루먼츠; NF34BL-2)을 각막 절개를 통해 수정체를 피하면서 삽입하고, 망막을 통해 전진시켰다. 각각의 마우스의 눈당 1 μL의 실험 시약 (렌티바이러스 또는 eVLP)을 주사하였다. 퀵타이터(QuickTiter)TM 렌티바이러스 역가 키트 (셀 바이오랩스; VPK-107-5)에 의해 측정 시 렌티바이러스 역가는 >1x10^{9} TU/mL이었다. BE-eVLP를 3 pmol/μL의 캡슐화된 BE 단백질 함량에 상응하는 4x10^{10} eVLP/μL의 역가에 대해 정규화하였다. 주사 후, 젠틸(GenTeal) 중증 윤활제 아이 겔 (0.3% 히프로멜로스, 알콘(Alcon))을 적용하여 동공을 수화시키고, 회복을 위해 두었다.

[0514] *RPE 해리 및 게놈 DNA 및 RNA 제조*

[0515] 광학 현미경 하에, 마우스 눈을 절개하여, 망막 및 전안부로부터 후방 아이컵 (RPE, 맥락막 및 공막을 함유함)을 분리하였다. 각각의 후방 아이컵을 올프렙(AllPrep) DNA/RNA 미니 키트 (퀴아젠; 80284)에 제공된 350 μl의 RLT 플러스 조직 용해 완충제에 즉시 담궜다. 1분 동안 인큐베이션한 후, RPE 세포를 용해 완충제 중에서 부드럽게 피펫팅하면서 후방 아이컵으로부터 탈착시킨 후, 나머지 후방 아이컵을 제거하였다. RPE 세포를 함유하는 용해 완충제는 DNA 및 RNA 추출을 위해 올프렙 DNA/RNA 미니 키트 프로토콜을 이용하여 추가로 가공하였다. 최종 DNA 및 RNA를 각각 30 μL 및 15 μL 물에서 용리시켰다. 슈퍼스크립트™ III 제1-가닥 합성 슈퍼믹스 (써모 피셔; 18080400)를 사용하여 cDNA 합성을 수행하였다.

[0516] *마우스 RPE 조직 추출물의 웨스턴 블롯 분석*

[0517] 마우스 RPE 조직으로부터 단백질 용해물을 제조하기 위해, RPE, 맥락막 및 공막으로 이루어진 절개된 마우스 아이컵을 프로테아제 억제제를 갖는 30 μL의 RIPA 완충제를 함유하는 미세원심분리 튜브로 옮기고, 모터 조직 그라인더 (피셔 사이언티픽; K749540-0000)에 의해 균질화시키고, 20,000 g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 생성된 상청액을 다이나비즈 단백질 G (써모 피셔; 10003D)에 의해 미리 정화시켜, 겔 로딩 전에 혈액으로부터 오염물을 제거하였다. NuPAGE LDS 샘플 완충제 (써모 피셔; NP0007) 및 NuPAGE 샘플 환원제 (써모 피셔; NP0004)와 미리 혼합된 20 μL의 RPE 용해물을 NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔 (써모 피셔; NP0321BOX)의 각각의 웰에 로딩하고, 130 V에서 1시간 동안 분리하고, PVDF 막 (밀리포어; IPVH00010)으로 옮겼다. 0.1% (v/v) 트윈-20을 함유하는 PBS (PBS-T) 중 5% (w/v) 무지방 우유에서 1시간 동안 차단시킨 후, 막을 일차 항체, 마우스 항-RPE65 모노클로날 항체 (1:1,000; 자체 생성)와 함께 인큐베이션하고 (Golczak *et al.*, 2010), PBS-T 중 1% (w/v) 무지방 우유에서 4℃에서 밤새 희석하였다. 밤새 인큐베이션한 후, 막을 PBS-T로 각각 5분씩 3회 세척한 다음, 염소 항-마우스 IgG-HRP 항체 (1:5,000; 셀 시그널링 테크놀로지; 7076S)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 PBS-T로 각각 5분씩 3회 세척한 후, 슈퍼시그널 웨스트 피코(SuperSignal West Pico) 화학발광 기질 (써모 피셔; 34580)에 노출시킨 후 단백질 밴드를 시각화하였다. 동일한 프로토콜에 따라 마우스 항-Cas9 모노클로날 항체 (1:1,000; 인비트로젠(Invitrogen); MA523519) 및 토끼 항-β-액틴 폴리클로날 항체 (1:1,000; 셀 시그널링 테크놀로지; 4970S)를 사용하여 ABE 및 β-액틴 발현을 위해 막을 스트립핑하고 다시 프로빙하였다. 상응하는 이차 항체는 염소 항-마우스 IgG-HRP 항체 (1:5,000; 셀 시그널링 테크놀로지; 7076S) 및 염소 항-토끼 IgG-HRP 항체 (1:5,000; 셀 시그널링 테크놀로지; 7074S)이었다.

[0518] *망막전위도검사*

[0519] 기록하기 전에, 마우스를 24시간 동안 밤새 암순응시켰다. 안전한 조명 하에, 인산염-완충된 식염수 중 20 mg/mL 케타민 및 1.75 mg/mL 크실라진으로 이루어진 칵테일을 20 g 체중당 0.1 mL의 용량으로 복강내 주사하여 마우스를 마취시키고, 수화를 위해 1% 트로피카미드 점안액 (아코른; 17478-102-12)에 이어서 2.5% 히프로멜로스 (아코른; 9050-1)를 국소 투여하여 그들의 동공을 확장시켰다. 마우스를 가열된 다이아그노시스 셀레리스 (Diagnosys Celeris) 설치류 ERG 기기 (다이아그노시스 엘씨씨(Diagnosys LCC))에 두었다. 안구 전극을 각막에 배치하고, 참조 전극을 귀 사이의 피하에 위치시켰다. -0.3 log (cd·s/m^2)의 녹색 광 (피크 방출 544 nm, 밴드 폭 ~160 nm) 자극에 의해 눈을 자극하였다. 자극간 10초 간격으로 10회 자극에 대한 반응을 함께 평균하고, 평균 ERG 파형으로부터 a- 및 b-파 진폭을 획득하였다. ERG를 셀레리스 설치류 전기생리학 시스템 (다이아그노시스 엘엘씨)에 의해 기록하고, 에스피온(Espion) V6 소프트웨어 (다이아그노시스 엘엘씨)에 의해 분석하였다.

[0520] **정량화 및 통계 분석**

[0521] 데이터는 평균 및 평균의 표준 오차 (s.e.m.)로 제시된다. 샘플 크기를 미리 결정하기 위해 통계 방법을 이용하지 않았다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 수행되었다. 사용된 샘플 크기 및 통계 시험은 도면 범례에 기재되어 있다.

[0522] **추가의 서열**

[0523] **표 4.**

설명	단백질 서열
v1 BE-VLP	MGQAVTTPLSLTLDHWKDVERTAHNLSVEVRKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NPDIITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEAIAVDPPPWVRPFVHPKPPLSLPPSAPSLP PEPPLSTPPQSSLYPALTSPLNTKPRPQVLPDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPGPPSPDGNGDS GEVAPTEGAPDPSPMVSRLRGRKEPPVADSTTSQAFPLRLGGNGQYQYWPFSSSDLYN WKNNNPSFSEDPAKLTALIESVLLTHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAVR GEDGRPTQLPNDINDAFPLERPDWDYNTQRGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLA KVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVAMSFIWQSAPDIGRKLER LEDLKSKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRAEDVQREKERDRRR HREMSKLLATVVSGQRQDRQGGERRRPQLDHDQCAYCKEKGHWARDCPKKPRGPRG PRPQASLLTRSSLYPALTPTGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWM RHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLV MQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGM NHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSES ATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLV EEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG HFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLI AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFA WMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEI SGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFK TEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFS KESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELL GITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 470)
v2.1 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDPRSSLYPALTPGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYP GMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT SESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ

[0524]

[0525]

	LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 471)
v2.2 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDVQALVLTQGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYW MRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGL VMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPG MNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTS ESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 472)
v2.3 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV

	RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDPLQVLTLNIERRGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHE YWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQG GLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNY PGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPG TSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIK KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLE NLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQI GDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSR FAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDA YLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNF FKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGG FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL ADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKE VLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 473)
v2.4 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDTSTLLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYP GMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT SESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS

[0526]

	EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 474)
v3.1 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDTSTLLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYP GMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT SESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVSGGSMSKLLATV VSSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL (SEQ ID NO: 475)
v3.2 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDTSTLLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYP GMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT

[0527]

	SESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVSGGSPLQVLTNIE RRSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL (SEQ ID NO: 476)
v3.3 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDTSTLLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYP GMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT SESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKK NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY LNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGF SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILA

[0528]

	DANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVSGGSIRKIFLDGSG GSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL (SEQ ID NO: 477)
v3.4/v4 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMEN SSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVP VGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPC VMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAAL LCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYS IGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKR TARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEV AYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLF IQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSL GLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIK DKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYG DYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 478)
v4 BE-VLP (ABE8e-NG)	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMEN SSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVP VGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPC VMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAAL LCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYS IGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKR TARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEV AYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLF IQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSL GLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI

[0529]

	LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIK DKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYG DYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPRAFKYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 479)
v4 BE-VLP (ABE7.10-NG)	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTF NRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLP LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDGN GGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLY NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNL AKVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLE RLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRR HREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRG PRPQTSLLTLDDSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMEN SSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVP VGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPC VMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAAL LSDFFRMRRQEIKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSEVEFS HEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALR QGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVL HYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSET PGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALV RQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD SVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFM QLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGR HKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNV PSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHD AYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARFLQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL ADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAFKYFDTTIDRKVYRSTKE VLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (SEQ ID NO: 480)

[0530]

[0531] **표 5.**

설명	스페이서	SEQ ID NO:	유전자
표적-적중	CCCATACCTTGGAGCAACGG *CGG*	481	Pcsk9
OT1	***GA***CATACCTT**AA**AGCAA**A**GG *AGG*	482	인트론; *ELP3*
OT2	CCC**C**TACCTTGG**G**GCAAC**A**G *TGG*	483	유전자간
OT3	CCCA**CC**C**T**TTGGAG-AACGG *TGG*	484	LncRNA; LINC02006
OT4	CCCA**G**-CCTTGG**G**GCAACGG *AGG*	485	유전자간
OT5	C**A**CATA**T**CT**A**GGAGCAA-GG *AGG*	486	유전자간
OT6	CCCA**C**ACCC-**G**GAGCAACGG *GGA*	487	인트론; *DDX6*
OT7	***T***CCATACC**C**-GGAGCAACG**A** *GGG*	488	LncRNA; RP11-314D7.4
OT8	***TT***CAT-CCTTGGAGCAACGG *TGA*	489	LncRNA; FAM66D
OT9	***T***C**TG**TACC**A**TGGAGCAA**A**GG *CGG*	490	LncRNA; RIKEN cDNA 4933424G05 유전자
OT10	***A***CCATA**AC****CAA**GAGCAACA**G** *GGG*	491	인트론; *Klhl3*
OT11	***T***CCATA**A**CT**CA**GAGCAACA**G** *TGG*	492	유전자간
OT12	***G***CCATACC**C**TGG**G**GCA**G**C**A**G *TGG*	493	인트론; *NCAM1*
OT13	***G***C**A**A**C**ACCTTGGAGCAAC**T**G *AGG*	494	인트론; *SNRNP40*
OT14	***GA***CAT-CCTTGGAGCAAC**T**G *TGG*	495	인트론; *Fry*

**미스매치는 굵은 이탤릭체로 표시됨.*

[0532]

참고문헌

Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., *et al.* (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34, 154-156.

Akcakaya, P., Bobbin, M.L., Guo, J.A., Malagon-Lopez, J., Clement, K., Garcia, S.P., Fellows, M.D., Porritt, M.J., Firth, M.A., Carreras, A., *et al.* (2018). *In vivo* CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature* 561, 416-419.

Alanis-Lobato, G., Zohren, J., McCarthy, A., Fogarty, N.M.E., Kubikova, N., Hardman, E., Greco, M., Wells, D., Turner, J.M.A., and Niakan, K.K. (2021). Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.

Anzalone, A.V., Koblan, L.W., and Liu, D.R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 38, 824-844.

Campbell, L.A., Coke, L.M., Richie, C.T., Fortuno, L.V., Park, A.Y., and Harvey, B.K. (2019). Gesicle-Mediated Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex for Inactivating the HIV Provirus. *Mol Ther* 27, 151-163.

Chandler, R.J., Sands, M.S., and Venditti, C.P. (2017). Recombinant Adeno-Associated Viral Integration and Genotoxicity: Insights from Animal Models. *Hum Gene Ther* 28, 314-322.

Chen, P.J., Hussmann, J.A., Yan, J., Knipping, F., Ravisankar, P., Chen, P.F., Chen, C., Nelson, J.W., Newby, G.A., Sahin, M., *et al.* (2021). Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell 184*, 5635-5652 e5629.

Choi, J.G., Dang, Y., Abraham, S., Ma, H., Zhang, J., Guo, H., Cai, Y., Mikkelsen, J.G., Wu, H., Shankar, P., *et al.* (2016). Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther* 23, 627-633.

Cideciyan, A.V. (2010). Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 29, 398-427.

Clement, K., Rees, H., Canver, M.C., Gehrke, J.M., Farouni, R., Hsu, J.Y., Cole, M.A., Liu, D.R., Joung, J.K., Bauer, D.E., *et al.* (2019). CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol* 37, 224-226.

Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K., and Hobbs, H.H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 37, 161-165.

[0533]

Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Jr., and Hobbs, H.H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 354, 1264-1272.

Cronin, J., Zhang, X.Y., and Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-398.

David, R.M., and Doherty, A.T. (2017). Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci* 155, 315-325.

Davis, K.M., Pattanayak, V., Thompson, D.B., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2015). Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol* 11, 316-318.

den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.

Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., *et al.* (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 34, 204-209.

Doman, J.L., Raguram, A., Newby, G.A., and Liu, D.R. (2020). Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat Biotechnol* 38, 620-628.

Doudna, J.A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578, 229-236.

Feher, A., Boross, P., Sperka, T., Miklossy, G., Kadas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T., and Tozser, J. (2006). Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Gen Virol* 87, 1321-1330.

Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulga-Morskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, B.R., Sutherland, J.E., Hutabarat, R.M., Clausen, V.A., Karsten, V., Cehelsky, J., *et al.* (2014). Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 383, 60-68.

Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464-471.

[0534]

Gaudelli, N.M., Lam, D.K., Rees, H.A., Sola-Esteves, N.M., Barrera, L.A., Born, D.A., Edwards, A., Gehrke, J.M., Lee, S.J., Liquori, A.J., *et al.* (2020). Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat Biotechnol* 38, 892-900.

Gee, P., Lung, M.S.Y., Okuzaki, Y., Sasakawa, N., Iguchi, T., Makita, Y., Hozumi, H., Miura, Y., Yang, L.F., Iwasaki, M., *et al.* (2020). Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun* 11, 1334.

Giannoukos, G., Ciulla, D.M., Marco, E., Abdulkerim, H.S., Barrera, L.A., Bothmer, A., Dhanapal, V., Gloskowski, S.W., Jayaram, H., Maeder, M.L., *et al.* (2018). UDiTaS, a genome editing detection method for indels and genome rearrangements. *BMC Genomics* 19, 212.

Golczak, M., Kiser, P.D., Lodowski, D.T., Maeda, A., and Palczewski, K. (2010). Importance of Membrane Structural Integrity for RPE65 Retinoid Isomerization Activity. *Journal of Biological Chemistry* 285, 9667-9682.

Hamilton, J.R., Tsuchida, C.A., Nguyen, D.N., Shy, B.R., McGarrigle, E.R., Sandoval Espinoza, C.R., Carr, D., Blaeschke, F., Marson, A., and Doudna, J.A. (2021). Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Rep* 35, 109207.

Hooper, A.J., Marais, A.D., Tanyanyiwa, D.M., and Burnett, J.R. (2007). The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* 193, 445-448.

Huang, T.P., Zhao, K.T., Miller, S.M., Gaudelli, N.M., Oakes, B.L., Fellmann, C., Savage, D.F., and Liu, D.R. (2019). Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol* 37, 626-631.

Humbel, M., Ramosaj, M., Zimmer, V., Regio, S., Aeby, L., Moser, S., Boizot, A., Sipion, M., Rey, M., and Deglon, N. (2021). Maximizing lentiviral vector gene transfer in the CNS. *Gene Ther* 28, 75-88.

Indikova, I., and Indik, S. (2020). Highly efficient 'hit-and-run' genome editing with unconcentrated lentivectors carrying Vpr.Prot.Cas9 protein produced from RRE-containing transcripts. *Nucleic Acids Res* 48, 8178-8187.

[0535]

Jang, H.K., Jo, D.H., Lee, S.N., Cho, C.S., Jeong, Y.K., Jung, Y., Yu, J., Kim, J.H., Woo, J.S., and Bae, S. (2021). High-purity production and precise editing of DNA base editing ribonucleoproteins. *Sci Adv* 7.

Jo, D.H., Jang, H.-K., Cho, C.S., Han, J.H., Ryu, G., Jung, Y., Bae, S., and Kim, J.H. (2021). Therapeutic adenine base editing corrects nonsense mutation and improves visual function in a mouse model of Leber congenital amaurosis. bioRxiv.

Johnson, S., Wheeler, J.X., Thorpe, R., Collins, M., Takeuchi, Y., and Zhao, Y. (2018). Mass spectrometry analysis reveals differences in the host cell protein species found in pseudotyped lentiviral vectors. *Biologicals 52*, 59-66.

June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S., and Milone, M.C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 359, 1361-1365.

Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Young, H.A., Hughes, S.H., and Chatterjee, D.K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16998-17003.

Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., and Kobayashi, K. (2011). Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J Neurosci 31*, 17169-17179.

Koblan, L.W., Doman, J.L., Wilson, C., Levy, J.M., Tay, T., Newby, G.A., Maianti, J.P., Raguram, A., and Liu, D.R. (2018). Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol* 36, 843-846.

Koblan, L.W., Erdos, M.R., Wilson, C., Cabral, W.A., Levy, J.M., Xiong, Z.M., Tavarez, U.L., Davison, L.M., Gete, Y.G., Mao, X., *et al.* (2021). *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 589, 608-614.

Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424.

Kosicki, M., Tomberg, K., and Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36, 765-771.

Lazzarotto, C.R., Malinin, N.L., Li, Y., Zhang, R., Yang, Y., Lee, G., Cowley, E., He, Y., Lan, X., Jividen, K., *et al.* (2020). CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR–Cas9 genome-wide activity. *Nature Biotechnology* 38, 1317-1327.

[0536]

Leibowitz, M.L., Papathanasiou, S., Doerfler, P.A., Blaine, L.J., Sun, L., Yao, Y., Zhang, C.Z., Weiss, M.J., and Pellman, D. (2021). Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Genet* 53, 895-905.

LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34, 1513-1525.

Levy, J.M., Yeh, W.H., Pendse, N., Davis, J.R., Hennessey, E., Butcher, R., Koblan, L.W., Comander, J., Liu, Q., and Liu, D.R. (2020). Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses. *Nat Biomed Eng* 4, 97-110.

Lyu, P., Javidi-Parsijani, P., Atala, A., and Lu, B. (2019). Delivering Cas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) by lentiviral capsid-based bionanoparticles for efficient 'hit-and-run' genome editing. *Nucleic Acids Res* 47, e99.

Lyu, P., Lu, Z., Cho, S.I., Yadav, M., Yoo, K.W., Atala, A., Kim, J.S., and Lu, B. (2021). Adenine Base Editor Ribonucleoproteins Delivered by Lentivirus-Like Particles Show High On-Target Base Editing and Undetectable RNA Off-Target Activities. *CRISPR J* 4, 69-81.

Mangeot, P.E., Dollet, S., Girard, M., Ciancia, C., Joly, S., Peschanski, M., and Lotteau, V. (2011). Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles. *Mol Ther 19*, 1656-1666.

Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massourides, E., Sohier, T.J.M., Corbin, A., *et al.* (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat Commun* 10, 45.

Mercuri, E., Darras, B.T., Chiriboga, C.A., Day, J.W., Campbell, C., Connolly, A.M., Iannaccone, S.T., Kirschner, J., Kuntz, N.L., Saito, K., *et al.* (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 378, 625-635.

Meunier, L., and Larrey, D. (2019). Drug-Induced Liver Injury: Biomarkers, Requirements, Candidates, and Validation. *Front Pharmacol* 10, 1482.

Milone, M.C., and O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32, 1529-1541.

[0537]

Musunuru, K., Chadwick, A.C., Mizoguchi, T., Garcia, S.P., DeNizio, J.E., Reiss, C.W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., *et al.* (2021). *In vivo* CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature* 593, 429-434.

Newby, G.A., and Liu, D.R. (2021). *In vivo* somatic cell base editing and prime editing. *Mol Ther*.

Newby, G.A., Yen, J.S., Woodard, K.J., Mayuranathan, T., Lazzarotto, C.R., Li, Y., Sheppard-Tillman, H., Porter, S.N., Yao, Y., Mayberry, K., *et al.* (2021). Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature* 595, 295-302.

Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M. Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., *et al.* (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353.

Osborn, M.J., Newby, G.A., McElroy, A.N., Knipping, F., Nielsen, S.C., Riddle, M.J., Xia, L., Chen, W., Eide, C.R., Webber, B.R., *et al.* (2020). Base Editor Correction of COL7A1 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patient-Derived Fibroblasts and iPSCs. *J Invest Dermatol* 140, 338-347 e335.

Pan, D., Gunther, R., Duan, W., Wendell, S., Kaemmerer, W., Kafri, T., Verma, I.M., and Whitley, C.B. (2002). Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol Ther* 6, 19-29.

Pang, J.J., Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Li, J., Noorwez, S.M., Malhotra, R., McDowell, J.H., Kaushal, S., *et al.* (2005). Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* 11, 152-162.

Parr-Brownlie, L.C., Bosch-Bouju, C., Schoderboeck, L., Sizemore, R.J., Abraham, W.C., and Hughes, S.M. (2015). Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front Mol Neurosci* 8, 14.

Puppo, A., Cesi, G., Marrocco, E., Piccolo, P., Jacca, S., Shayakhmetov, D.M., Parks, R.J., Davidson, B.L., Colloca, S., Brunetti-Pierri, N., *et al.* (2014). Retinal transduction profiles by high-capacity viral vectors. *Gene Ther* 21, 855-865.

Rao, A.S., Lindholm, D., Rivas, M.A., Knowles, J.W., Montgomery, S.B., and Ingelsson, E. (2018). Large-Scale Phenome-Wide Association Study of PCSK9 Variants Demonstrates Protection Against Ischemic Stroke. *Circ Genom Precis Med* 11, e002162.

[0538]

Rees, H.A., Komor, A.C., Yeh, W.H., Caetano-Lopes, J., Warman, M., Edge, A.S.B., and Liu, D.R. (2017). Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun* 8, 15790.

Rees, H.A., and Liu, D.R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* 19, 770-788.

Renner, T.M., Tang, V.A., Burger, D., and Langlois, M.A. (2020). Intact Viral Particle Counts Measured by Flow Virometry Provide Insight into the Infectivity and Genome Packaging Efficiency of Moloney Murine Leukemia Virus. *J Virol* 94.

Richter, M.F., Zhao, K.T., Eton, E., Lapinaite, A., Newby, G.A., Thuronyi, B.W., Wilson, C., Koblan, L.W., Zeng, J., Bauer, D.E., *et al.* (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol.*

Rothgangl, T., Dennis, M.K., Lin, P.J.C., Oka, R., Witzigmann, D., Villiger, L., Qi, W., Hruzova, M., Kissling, L., Lenggenhager, D., et al. (2021). *In vivo* adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol* 39, 949-957.

Serreze, D.V., Leiter, E.H., Christianson, G.J., Greiner, D., and Roopenian, D.C. (1994). Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulitis resistant. *Diabetes* 43, 505-509.

Sodi, A., Banfi, S., Testa, F., Della Corte, M., Passerini, I., Pelo, E., Rossi, S., Simonelli, F., and Italian, I.R.D.W.G. (2021). RPE65-associated inherited retinal diseases: consensus recommendations for eligibility to gene therapy. *Orphanet J Rare Dis* 16, 257.

Song, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, M., Sui, T., Lai, L., and Li, Z. (2020). Large-Fragment Deletions Induced by Cas9 Cleavage while Not in the BEs System. *Mol Ther Nucleic Acids* 21, 523-526.

Stadtmauer, E.A., Fraietta, J.A., Davis, M.M., Cohen, A.D., Weber, K.L., Lancaster, E., Mangan, P.A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., *et al.* (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 367.

Suh, S., Choi, E.H., Leinonen, H., Foik, A.T., Newby, G.A., Yeh, W.H., Dong, Z., Kiser, P.D., Lyon, D.C., Liu, D.R., *et al.* (2021). Restoration of visual function in adult mice with an inherited retinal disease via adenine base editing. *Nat Biomed Eng* 5, 169-178.

Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., and Zhang, F. (2015). *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 33, 102-106.

[0539] Taylor, A.W. (2009). Ocular immune privilege. *Eye (Lond)* 23, 1885-1889.

Thorne, R.G., and Nicholson, C. (2006). *In vivo* diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5567-5572.

Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Malagon-Lopez, J., Topkar, V.V., Aryee, M.J., and Joung, J.K. (2017). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 14, 607-614.

Turchiano, G., Andrieux, G., Klermund, J., Blattner, G., Pennucci, V., El Gaz, M., Monaco, G., Poddar, S., Mussolino, C., Cornu, T.I., et al. (2021). Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq. *Cell Stem Cell 28*, 1136-1147 e1135.

Voelkel, C., Galla, M., Maetzig, T., Warlich, E., Kuehle, J., Zychlinski, D., Bode, J., Cantz, T., Schambach, A., and Baum, C. (2010). Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7805-7810.

Wang, D., Shukla, C., Liu, X., Schoeb, T.R., Clarke, L.A., Bedwell, D.M., and Keeling, K.M. (2010). Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab* 99, 62-71.

Wang, D., Zhang, F., and Gao, G. (2020). CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and *In Vivo* Delivery by AAV Vectors. *Cell* 181, 136-150.

Webber, B.R., Lonetree, C.L., Kluesner, M.G., Johnson, M.J., Pomeroy, E.J., Diers, M.D., Lahr, W.S., Draper, G.M., Slipek, N.J., Smeester, B.A., *et al.* (2019). Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors. *Nat Commun* 10, 5222.

Wei, T., Cheng, Q., Min, Y.L., Olson, E.N., and Siegwart, D.J. (2020). Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat Commun* 11, 3232.

Wheeler, J.X., Jones, C., Thorpe, R., and Zhao, Y. (2007). Proteomics analysis of cellular components in lentiviral vector production using Gel-LC-MS/MS. Proteomics Clin Appl 1, 224-230.

Wu, D.T., and Roth, M.J. (2014). MLV based viral-like-particles for delivery of toxic proteins and nuclear transcription factors. *Biomaterials* 35, 8416-8426.

[0540]

Yao, X., Lyu, P., Yoo, K., Yadav, M.K., Singh, R., Atala, A., and Lu, B. (2021). Engineered extracellular vesicles as versatile ribonucleoprotein delivery vehicles for efficient and safe CRISPR genome editing. *J Extracell Vesicles* 10, e12076.

Yeh, W.H., Chiang, H., Rees, H.A., Edge, A.S.B., and Liu, D.R. (2018). *In vivo* base editing of post-mitotic sensory cells. *Nat Commun* 9, 2184.

Yeh, W.H., Shubina-Oleinik, O., Levy, J.M., Pan, B., Newby, G.A., Wornow, M., Burt, R., Chen, J.C., Holt, J.R., and Liu, D.R. (2020). *In vivo* base editing restores sensory transduction and transiently improves auditory function in a mouse model of recessive deafness. *Sci Transl Med* 12.

Yu, Y., Leete, T.C., Born, D.A., Young, L., Barrera, L.A., Lee, S.J., Rees, H.A., Ciaramella, G., and Gaudelli, N.M. (2020). Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity. *Nat Commun* 11, 2052.

Zeng, J., Wu, Y., Ren, C., Bonanno, J., Shen, A.H., Shea, D., Gehrke, J.M., Clement, K., Luk, K., Yao, Q., *et al.* (2020). Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med* 26, 535-541.

Zhang, W., Cao, S., Martin, J.L., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2015). Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys* 2, 343-369.

Zhong, Z., Rong, F., Dai, Y., Yibulayin, A., Zeng, L., Liao, J., Wang, L., Huang, Z., Zhou, Z., and Chen, J. (2019). Seven novel variants expand the spectrum of RPE65-related Leber congenital amaurosis in the Chinese population. *Mol Vis* 25, 204-214.

[0541]

[0542] **등가물 및 범주**

[0543] 청구항에서 단수 형태는 다르게 나타내거나 또는 문맥상 달리 명백하지 않다면 1개 또는 1개 초과를 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은, 다르게 나타내거나 또는 문맥상 달리 명백하지 않다면 그룹 구성원 중 1개, 1개 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나 또는 달리 관련이 있는 경우 충족된 것으로 고려된다. 본 발명은 정확하게 1개의 그룹 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나 또는 달리 관련이 있는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 그룹 구성원 중 1개 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나 또는 달리 관련이 있는 실시양태를 포함한다.

[0544] 추가로, 본 발명은 나열된 청구항 중 하나 이상으로부터 하나 이상의 제한, 요소, 조항 및 설명 용어가 또 다른 청구항에 도입되는 것인 모든 변화, 조합 및 순열을 포함한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속된 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속된 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 예를 들어 마쿠쉬 그룹 포맷으로 목록으로 제시되는 경우, 요소의 각각의 하위 그룹 또한 개시되며, 임의의 요소(들)이 그룹으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특징을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 발명 또는 본 발명의 측면의 특정 실시양태는 이러한 요소 및/또는 특징으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진다는 것을 이해해야 한다. 단순화를 위해, 이들 실시양태는 본원에서 이들 단어로 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"이 개방적인 것으로 의도되고, 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용한다는 점을 유의한다. 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 추가로, 달리 나타내거나 또는 문맥상 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 달리 명백하지 않다면, 범위로 표현된 값은 문맥상 달리 명확하게 명시되지 않는다면 범위의 하한 단위의 1/10까지 본 발명의 상이한 실시양태에서 명시된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위 그룹을 가정할 수 있다.

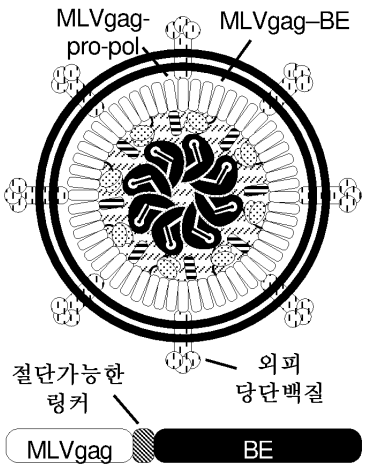
[0545] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 저널 기사 및 다른 간행물을 참조하며, 모두 본원에 참조로 포함된다. 포함된 임의의 참고문헌과 본 명세서 사이에 상충되는 내용이 있는 경우, 본 명세서가 우선한다. 또한, 선행 기술 내에 속하는 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 청구항 중 임의의 하나 이상으로부터 명시적으로 제외될 수 있다. 이러한 실시양태가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 심지어 제외에 대해 본원에서 명시적으로 제시되지 않더라고 이들은 제외될 수 있다. 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 선행 기술의 존재와 관련이 있는지 여부와 상관없이 어떠한 이유로든 임의의 청구항으로부터 제외될 수 있다.

[0546] 관련 기술분야의 기술자는 단지 일상적인 실험만을 이용하여 본원에 기재된 구체적인 실시양태에 대한 여러 등

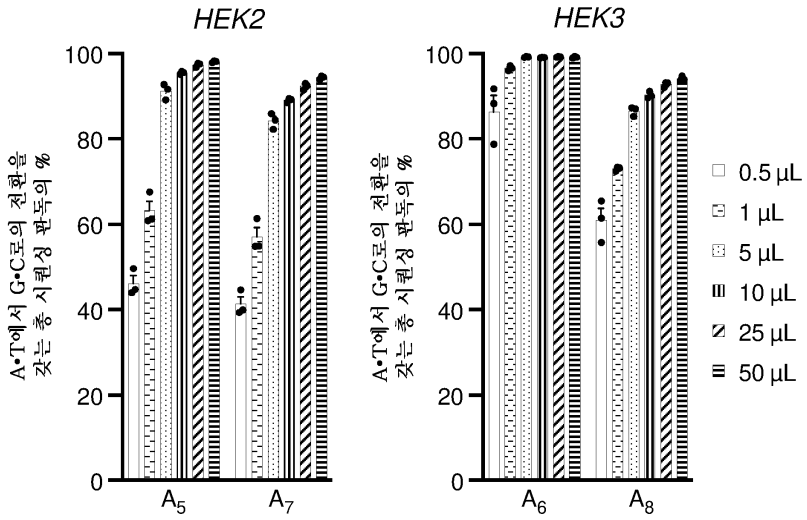
가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 실시양태의 범주는 상기 설명으로 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구항에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 하기 청구항에 정의된 본 발명의 개념 또는 범주를 벗어나지 않으면서 본 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

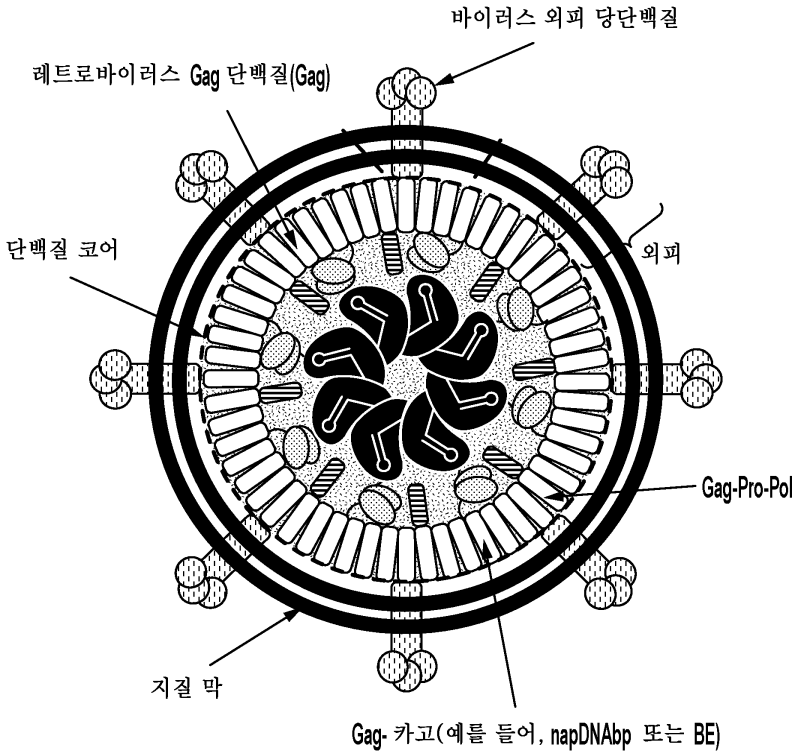
도면1a



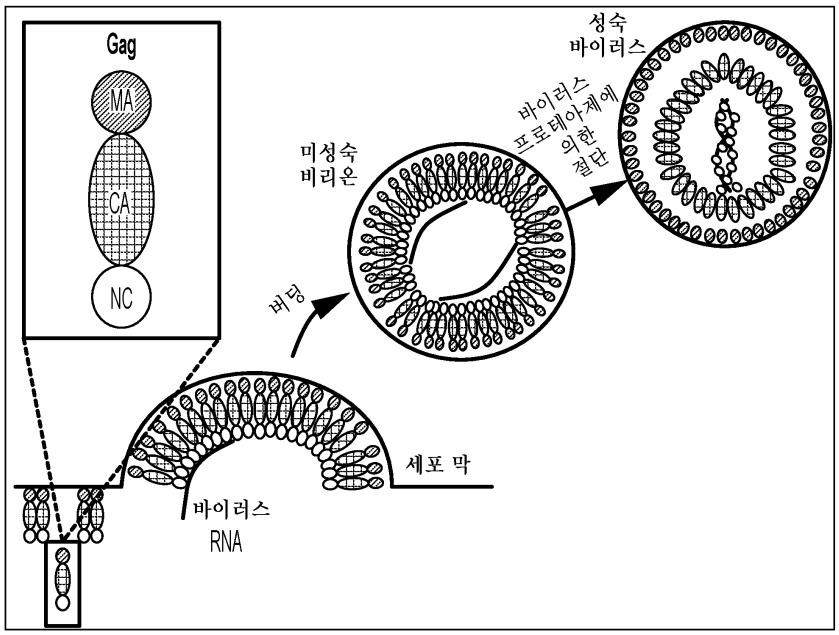
도면1b



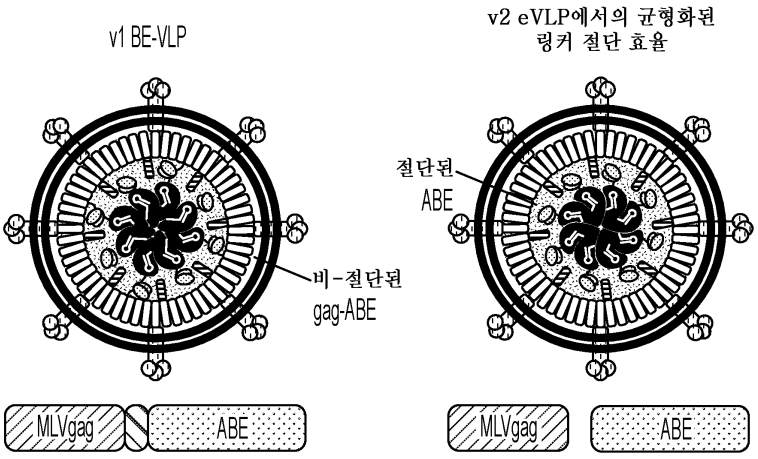
도면1c


바이러스 외피 당단백질
레트로바이러스 Gag 단백질(Gag)
단백질 코어
외피
Gag-Pro-Pol
지질 막
Gag- 카고(예를 들어, napDNAbp 또는 BE)

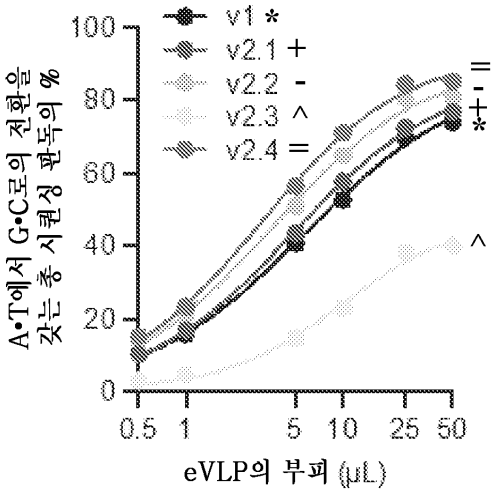
도면1d


Gag
MA
CA
NC
성숙
바이러스
바이러스
프로테아제에
의한
절단
미성숙
비리온
버딩
세포 막
바이러스
RNA

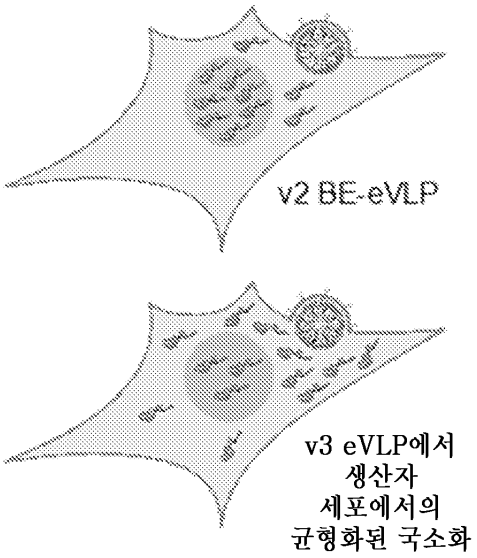
도면2a


v1 BE-VLP
v2 eVLP에서의 균형화된
링커 절단 효율
비-절단된
gag-ABE
절단된
ABE
MLVgag
ABE
MLVgag
ABE

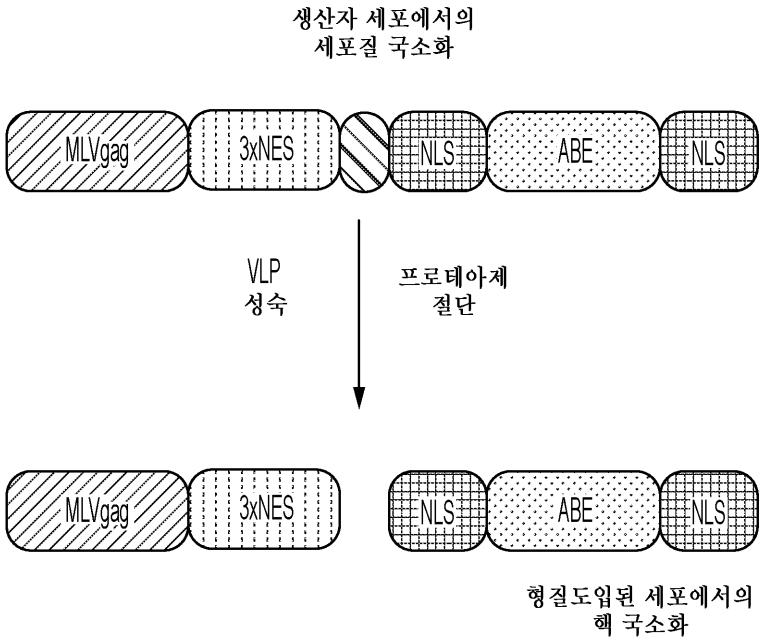
도면2b


v1 *
v2.1 +
v2.2 -
v2.3 ^
v2.4 =
A•T에서 G•C로의 전환을
갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
0.5
1
5
10
25
50
eVLP의 부피 (μL)

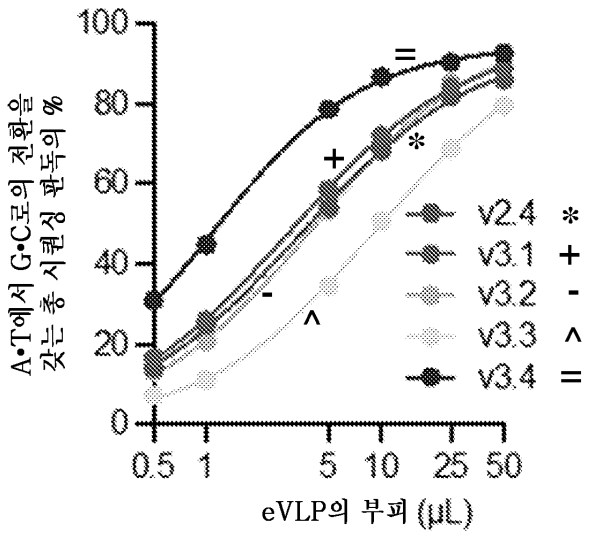
도면2c


v2 BE-eVLP
v3 eVLP에서
생산자
세포에서의
균형화된 국소화

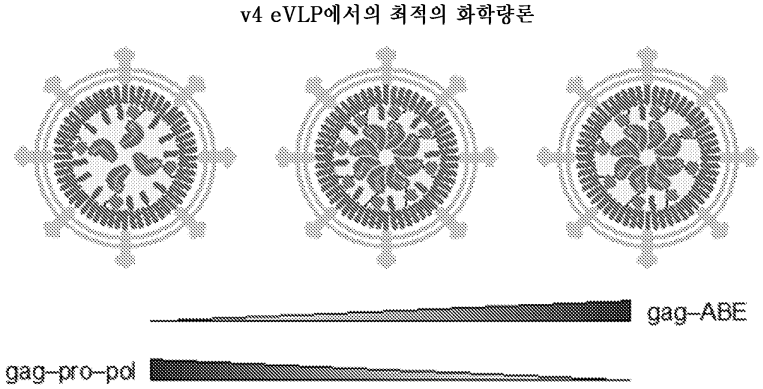
도면2d


생산자 세포에서의
세포질 국소화
MLVgag
3xNES
NLS
ABE
NLS
VLP
성숙
프로테아제
절단
MLVgag
3xNES
NLS
ABE
NLS
형질도입된 세포에서의
핵 국소화

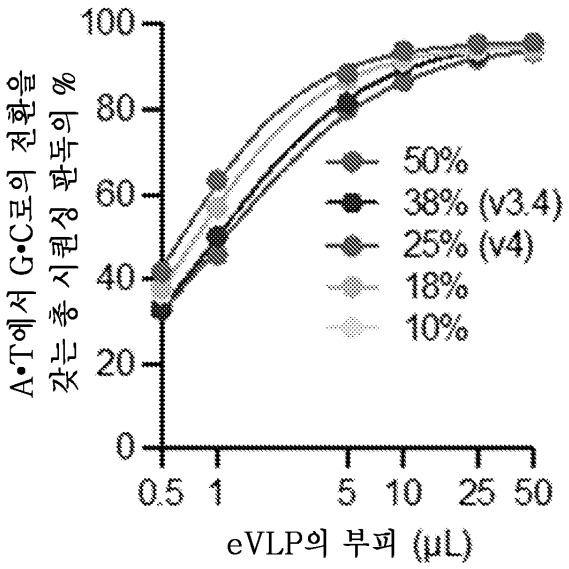
도면2e


100
80
60
40
20
0
A•T에서 G•C로의 전환을
갖는 총 시퀀싱 판독의 %
0.5
1
5
10
25
50
eVLP의 부피 (μL)
=
+
*
-
^
v2.4 *
v3.1 +
v3.2 -
v3.3 ^
v3.4 =

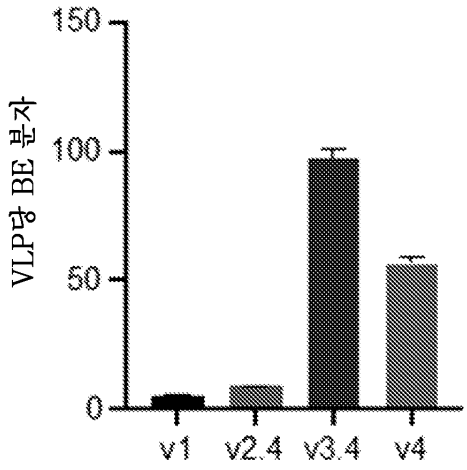
도면2f


v4 eVLP에서의 최적의 화학량론
gag-ABE
gag-pro-pol

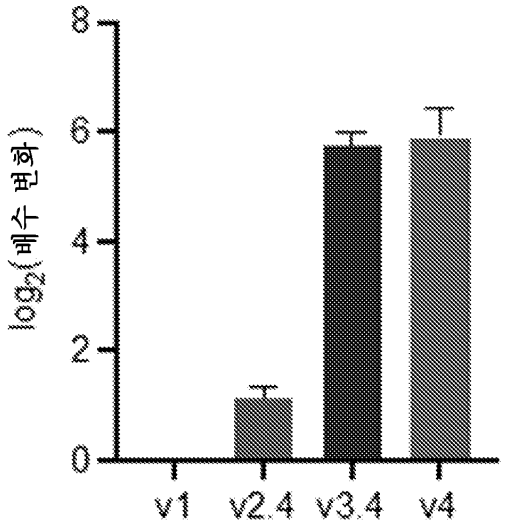
도면2g


100
80
60
40
20
0
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
50%
38% (v3.4)
25% (v4)
18%
10%
0.5
1
5
10
25
50
eVLP의 부피 (μL)

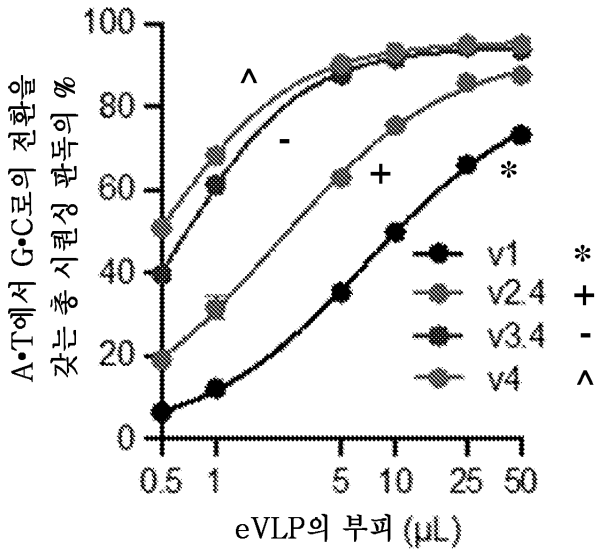
도면3a


150
100
50
0
VLP당 BE 분자
v1
v2.4
v3.4
v4

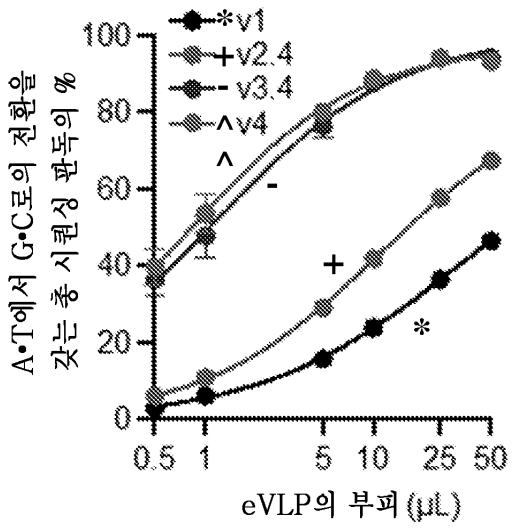
도면3b


8
6
4
2
0
log2(배수 변화)
v1
v2.4
v3.4
v4

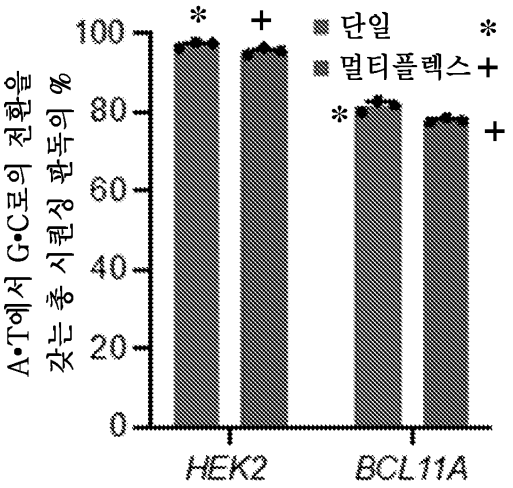
도면3c


100
80
60
40
20
0
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
0.5
1
5
10
25
50
eVLP의 부피 (μL)
^
-
+
*
v1
v2.4
v3.4
v4

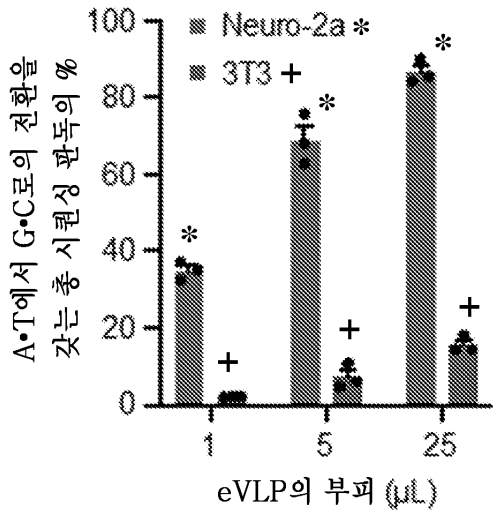
도면3d


*v1
+v2.4
- v3.4
^v4
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
0.5
1
5
10
25
50
eVLP의 부피 (μL)

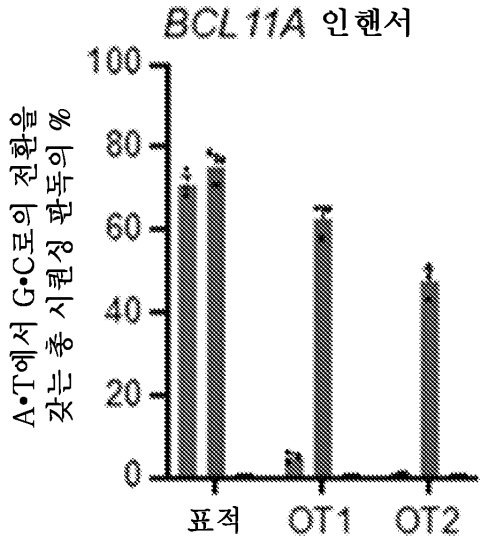
도면3e


단일
멀티플렉스
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
HEK2
BCL11A

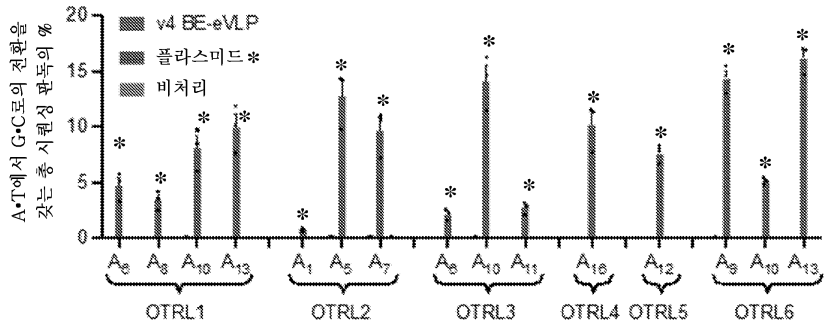
도면3f



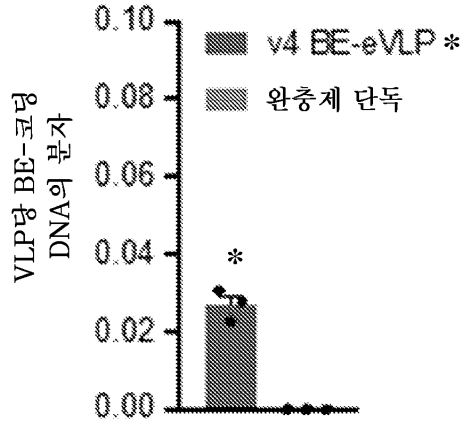
도면3g



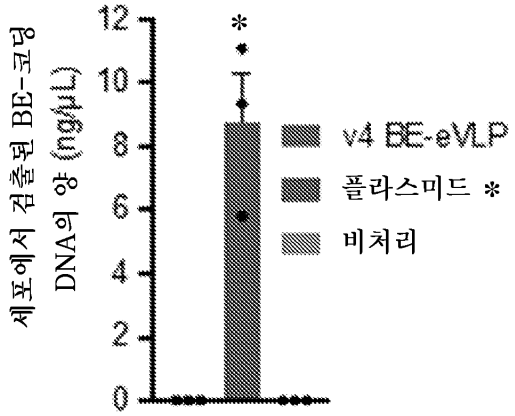
도면3h



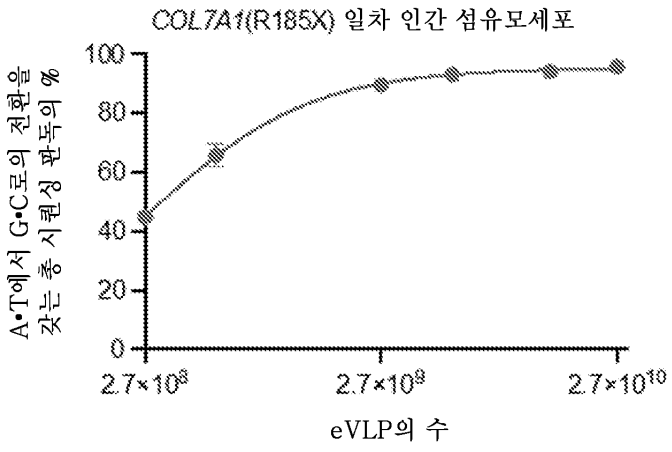
도면3i



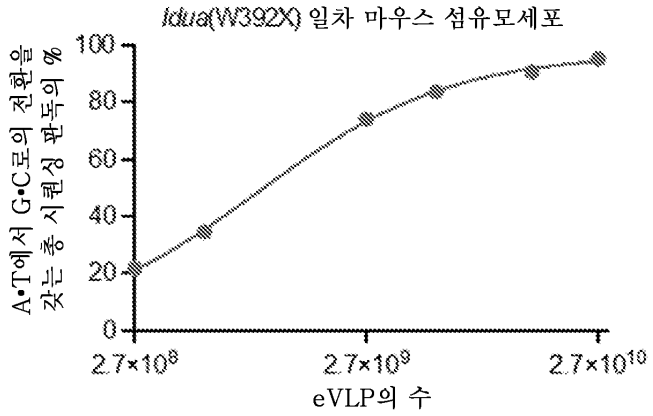
도면3j



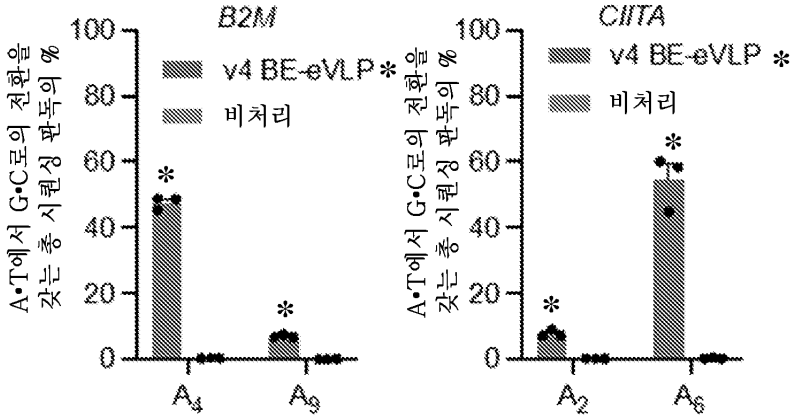
도면4a



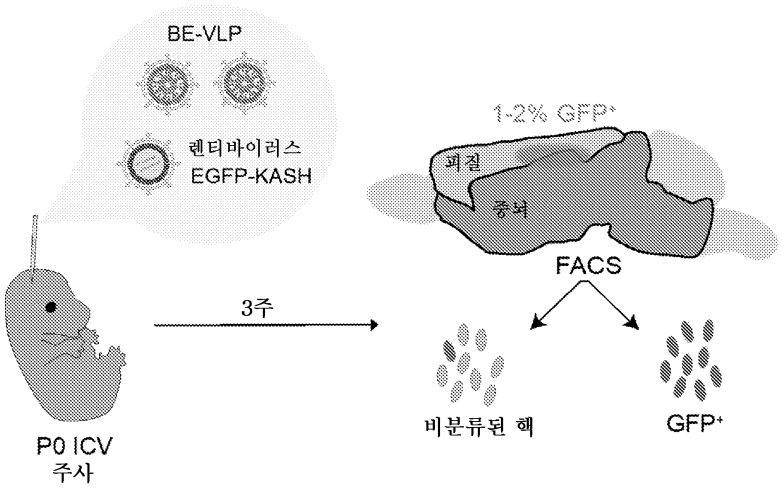
도면4b



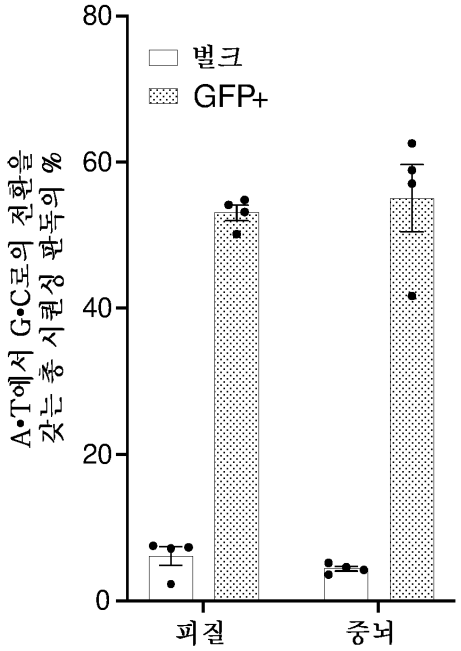
도면4c



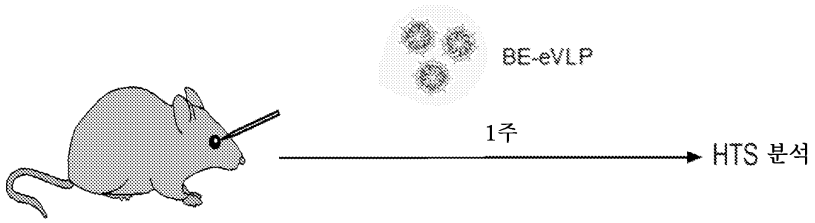
도면5a



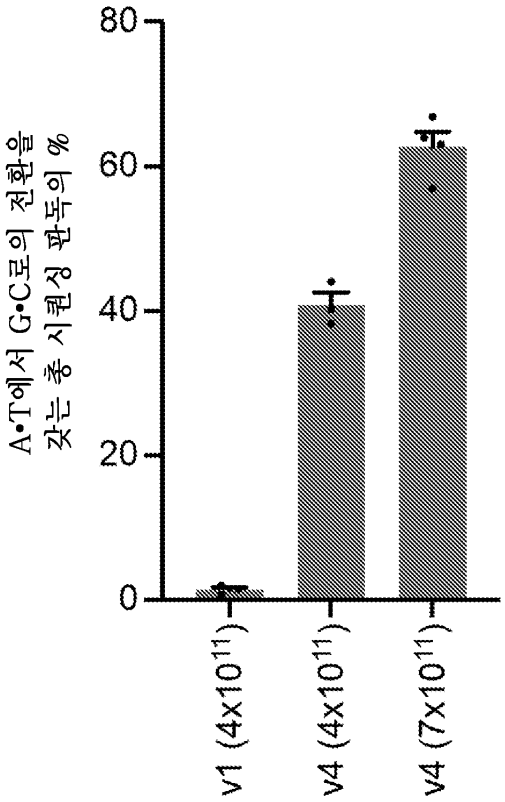
도면5b


80
60
40
20
0
벌크
GFP+
A•T에서 G•C로의 전환을
갖는 총 시퀀싱 판독의 %
피질
중뇌

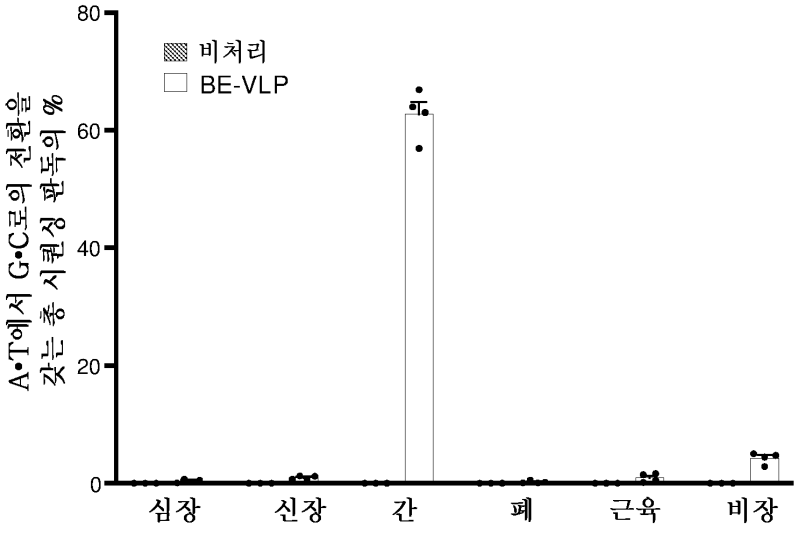
도면6a


BE-eVLP
1주
HTS 분석

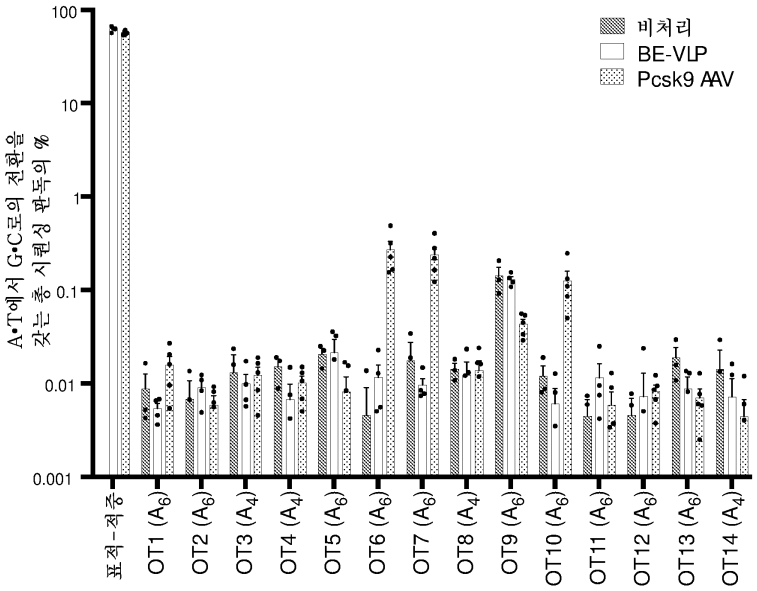
도면6b


A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
80
60
40
20
0
v1 (4x10^11)
v4 (4x10^11)
v4 (7x10^11)

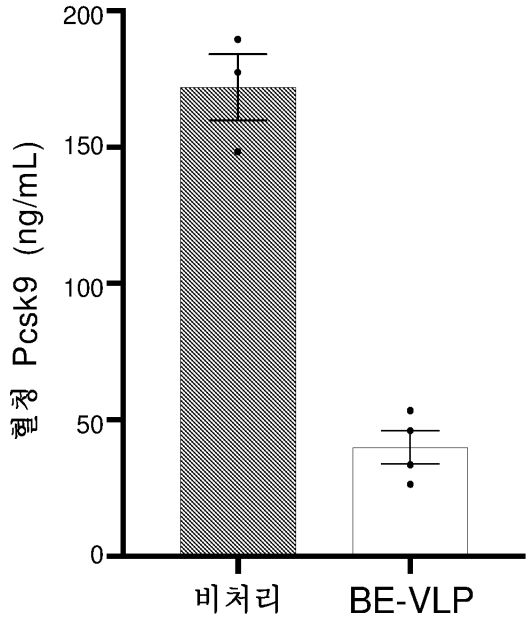
도면6c


A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
80
60
40
20
0
비처리
BE-VLP
심장
신장
간
폐
근육
비장

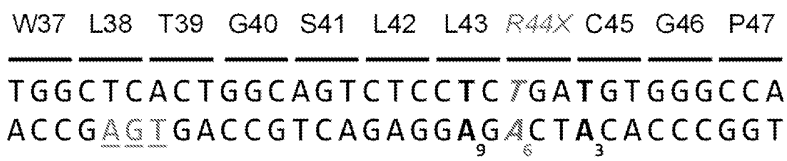
도면6d



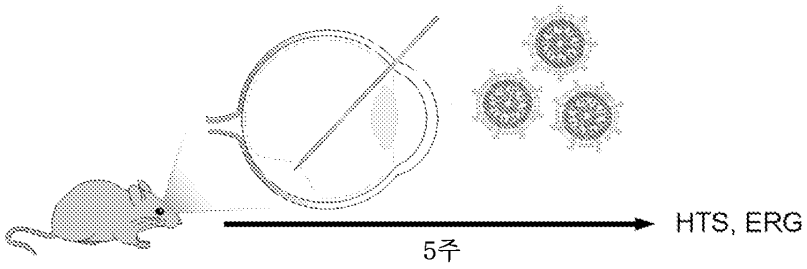
도면6e



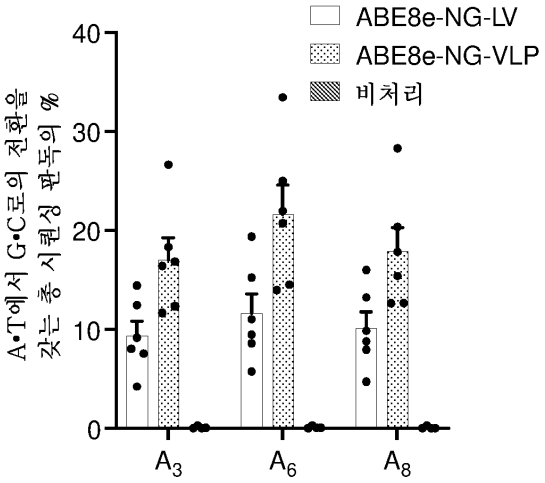
도면7a



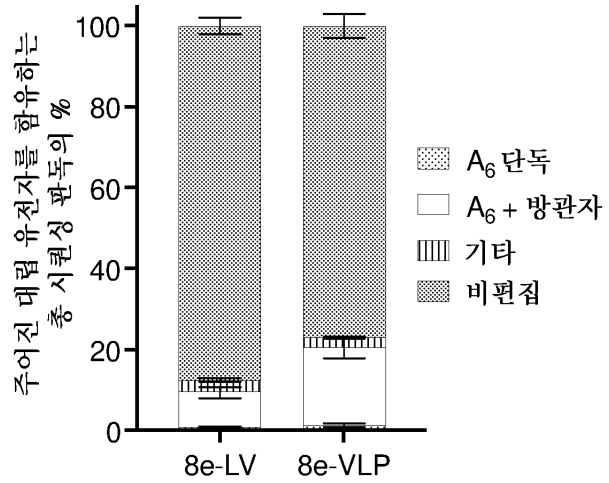
도면7b



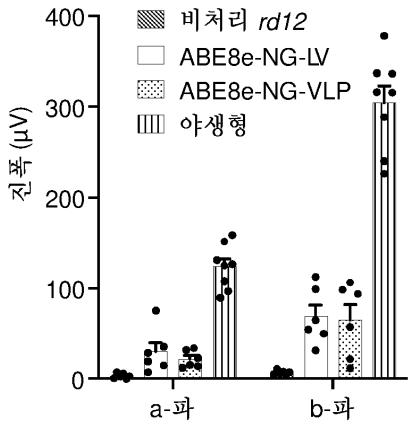
도면7c



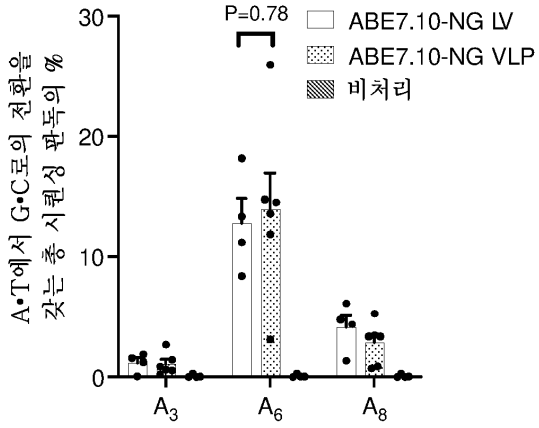
도면7d



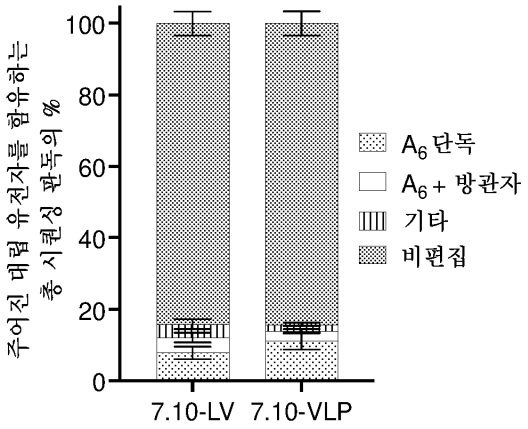
도면7e



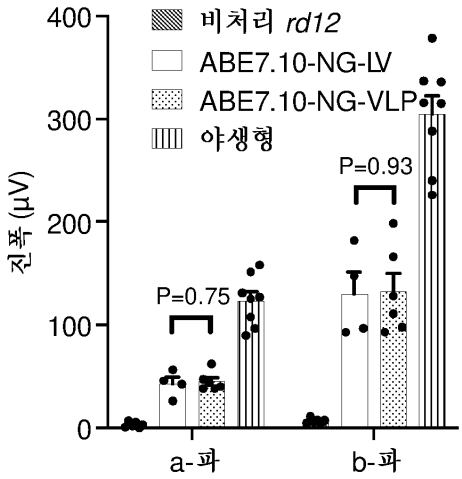
도면7f



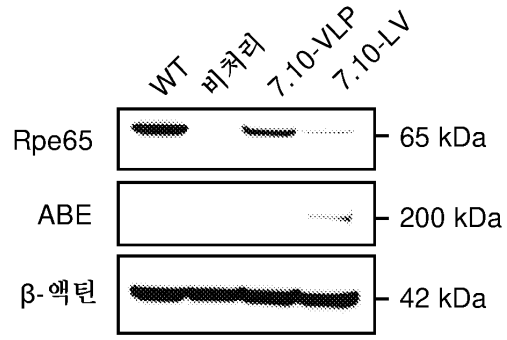
도면7g



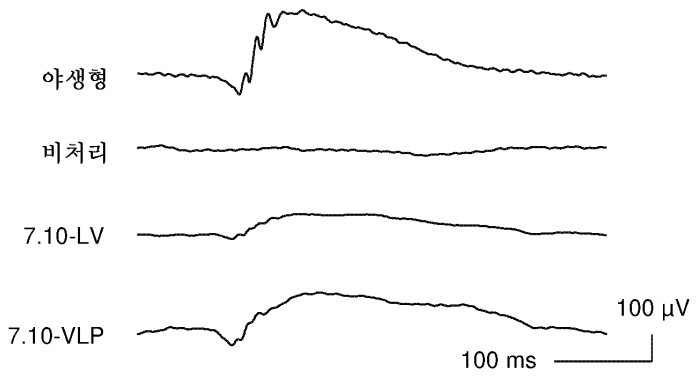
도면7h



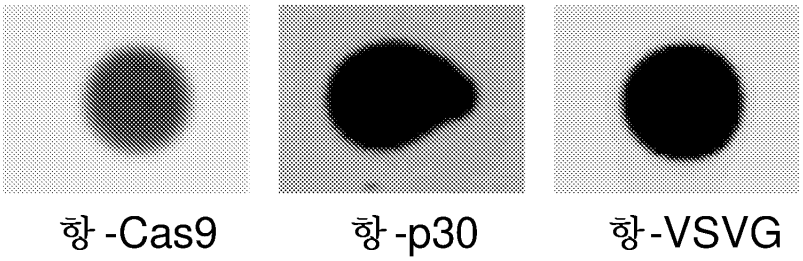
도면7i



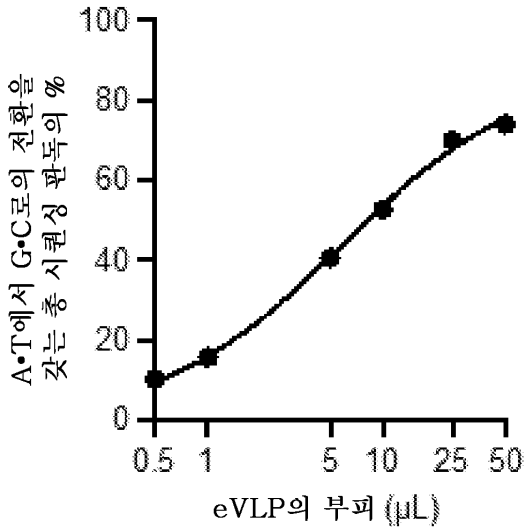
도면7j



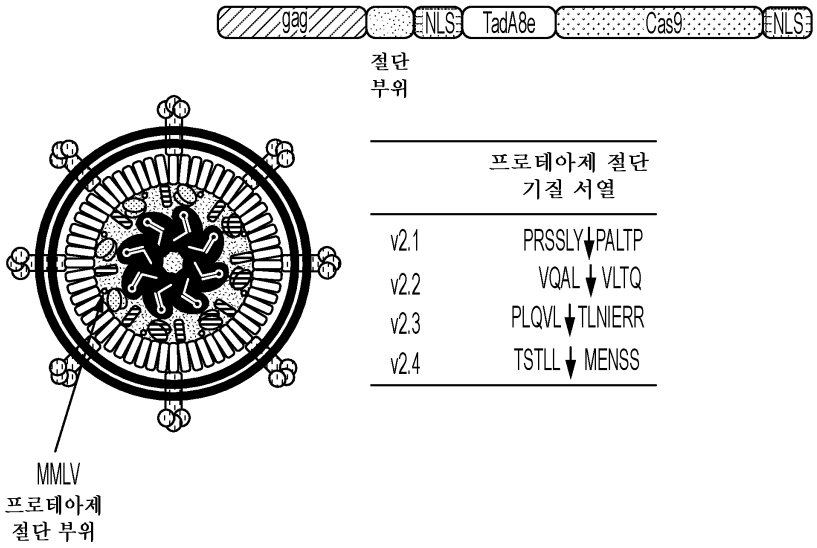
도면8a



도면8b

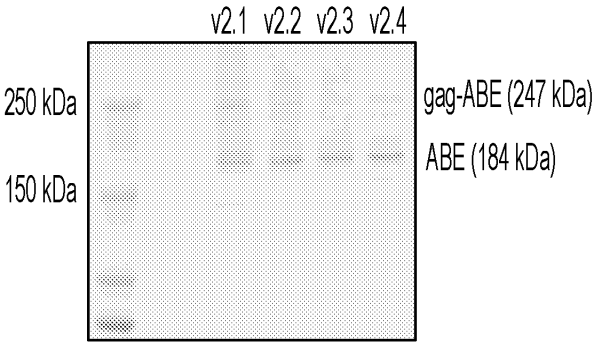


도면8c

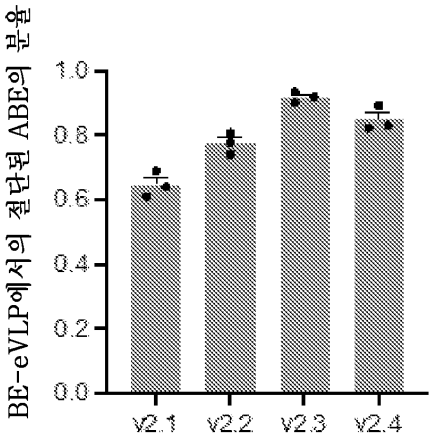


	프로테아제 절단 기질 서열
v2.1	PRSSLY↓PALTP
v2.2	VQAL↓VLTQ
v2.3	PLQVL↓TLNIERR
v2.4	TSTLL↓MENSS

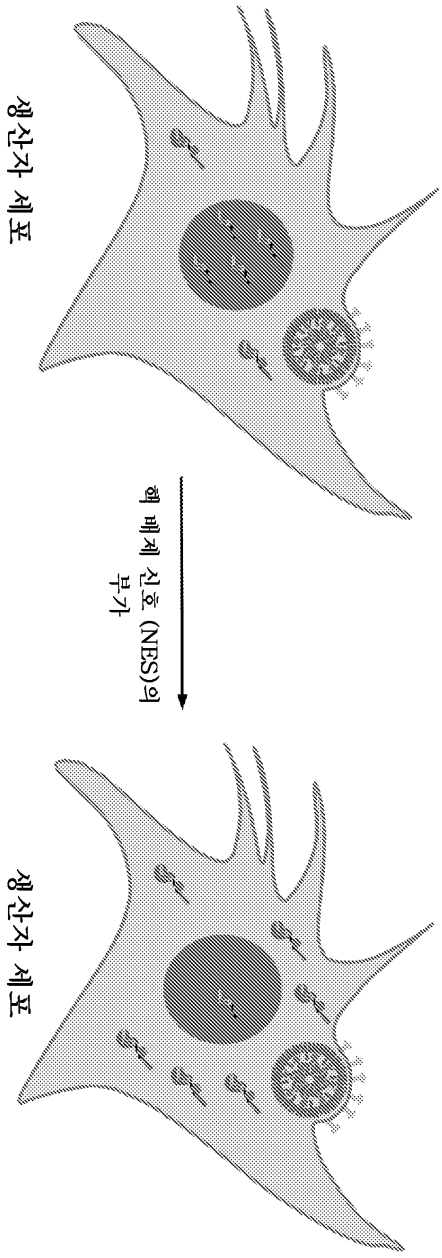
도면8d


v2.1 v2.2 v2.3 v2.4
250 kDa
150 kDa
gag-ABE (247 kDa)
ABE (184 kDa)

도면8e


BE-eVLP에서의 절단된 ABE의 분율
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
v2.1
v2.2
v2.3
v2.4

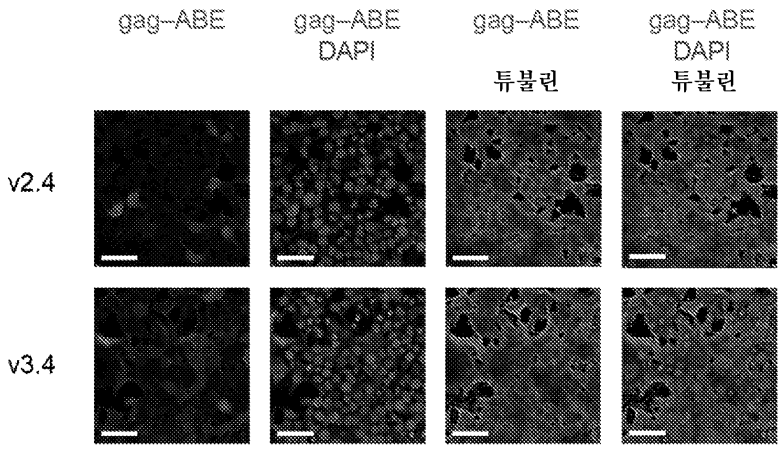
도면9a



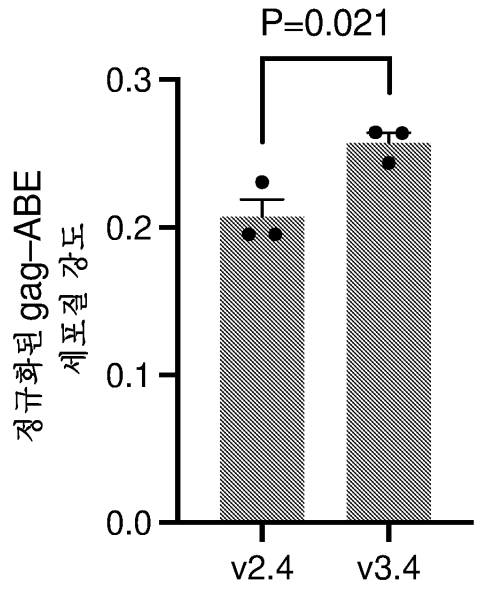
도면9b

절단 부위
부위 A
부위 B
아키텍처
v2.4
TSTLL
MENSS
gag
NLS
TadA8e
Cas9
NLS
절단
부위 A
v3.1
TSTLL
MENSS
MSKLL
ATVVS
gag
NLS
TadA8e
Cas9
NLS
3x NES
절단
부위 A
절단
부위 B
v3.2
TSTLL
MENSS
PLQVL
TLNIERR
gag
NLS
TadA8e
Cas9
NLS
3x NES
절단
부위 A
절단
부위 B
v3.3
TSTLL
MENSS
IRKIL
FLDG
gag
NLS
TadA8e
Cas9
NLS
3x NES
절단
부위 A
절단
부위 B
v3.4
TSTLL
MENSS
gag
3x NES
NLS
TadA8e
Cas9
NLS
절단
부위 A

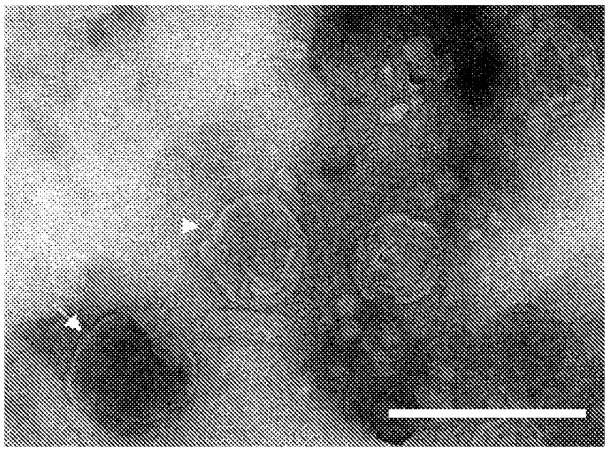
도면9c



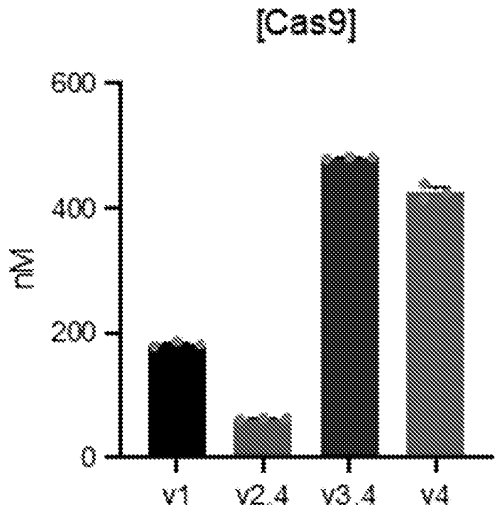
도면9d



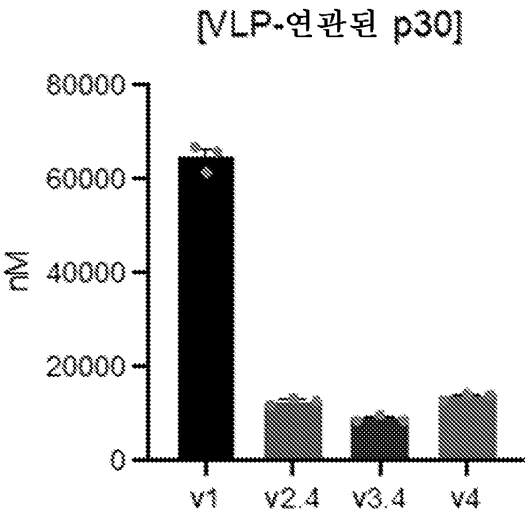
도면10a



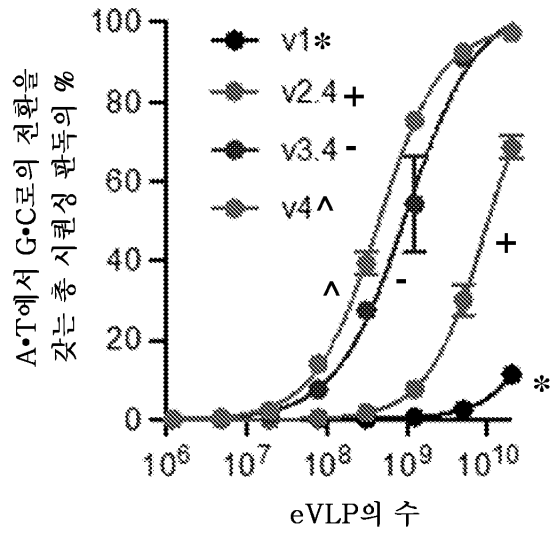
도면10b


[Cas9]
600
400
200
0
nM
v1
v2.4
v3.4
v4

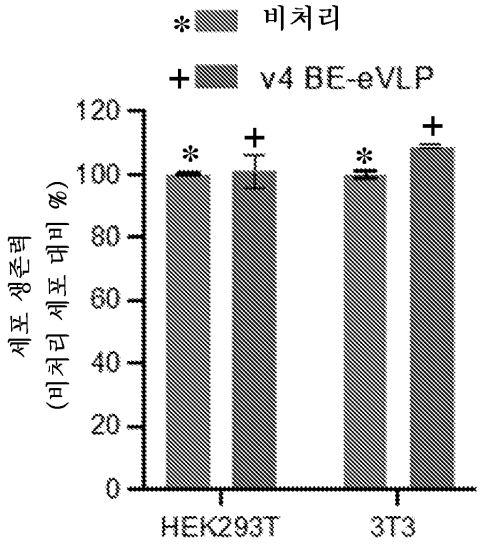
도면10c


[VLP-연관된 p30]
80000
60000
40000
20000
0
nM
v1
v2.4
v3.4
v4

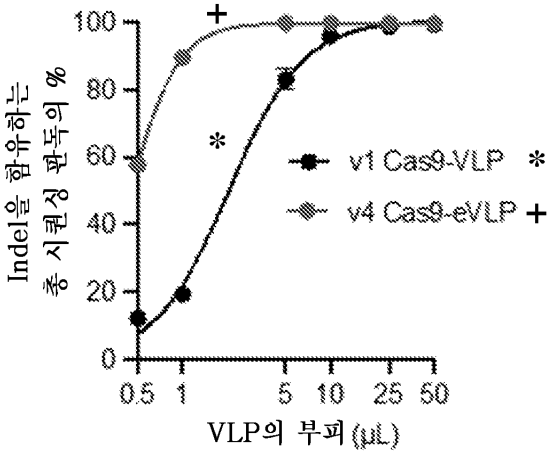
도면10d


A•T에서 G•C로의 전환을
갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
v1*
v2.4 +
v3.4 -
v4 ^
^
-
+
*
10^6
10^7
10^8
10^9
10^{10}
eVLP의 수

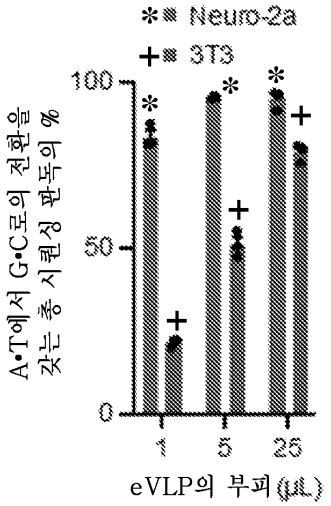
도면10e


* 비처리
+ v4 BE-eVLP
세포 생존력
(비처리 세포 대비 %)
120
100
80
60
40
20
0
*
+
*
+
HEK293T
3T3

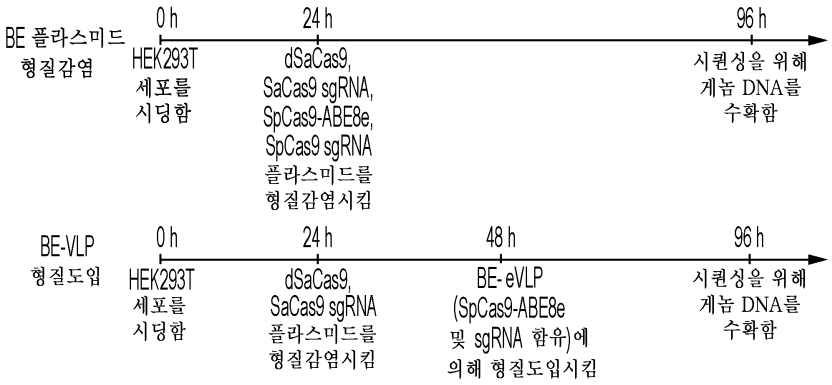
도면10f



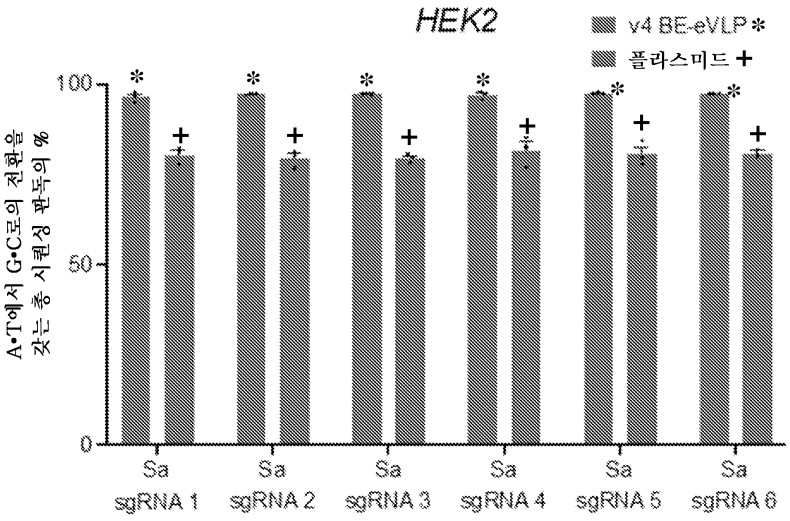
도면10g



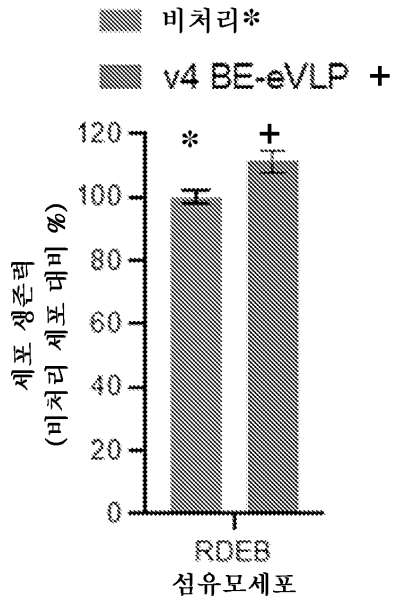
도면11a



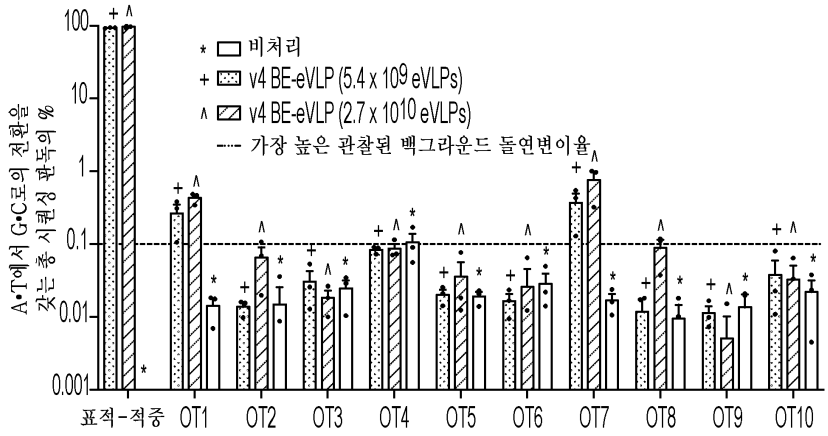
도면11b


HEK2
v4 BE-eVLP *
플라스미드 +
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
50
0
Sa sgRNA 1
Sa sgRNA 2
Sa sgRNA 3
Sa sgRNA 4
Sa sgRNA 5
Sa sgRNA 6

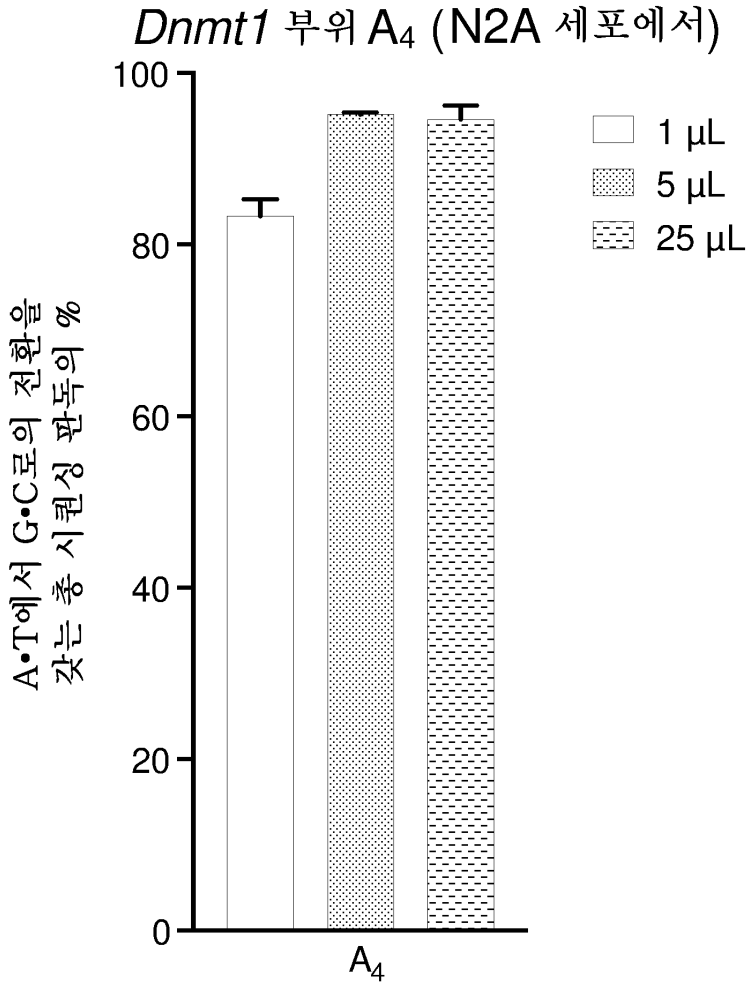
도면11c


비처리*
v4 BE-eVLP +
세포 생존력 (비처리 세포 대비 %)
120
100
80
60
40
20
0
RDEB 섬유모세포

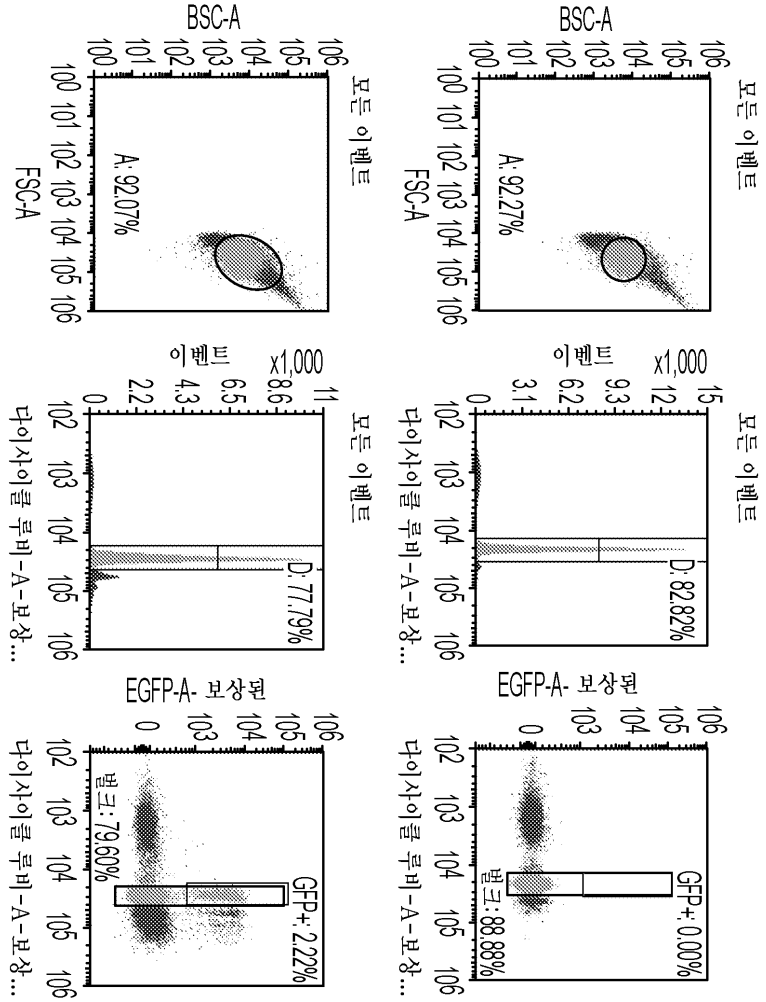
도면11d


비처리
v4 BE-eVLP (5.4 x 10^9 eVLPs)
v4 BE-eVLP (2.7 x 10^10 eVLPs)
가장 높은 관찰된 백그라운드 돌연변이율
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
10
1
0.1
0.01
0.001
표적-적중
OT1
OT2
OT3
OT4
OT5
OT6
OT7
OT8
OT9
OT10

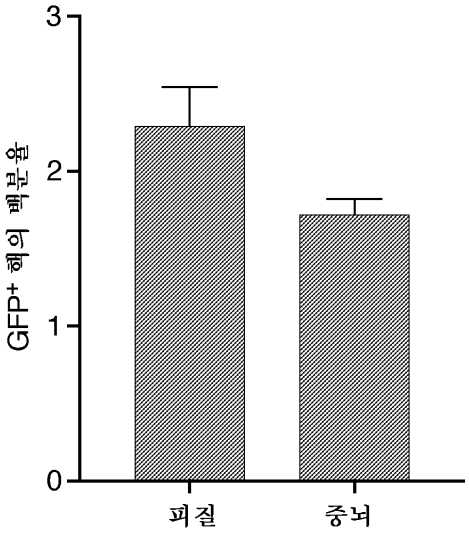
도면12


Dnmt1 부위 A4 (N2A 세포에서)
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
A4
1 µL
5 µL
25 µL

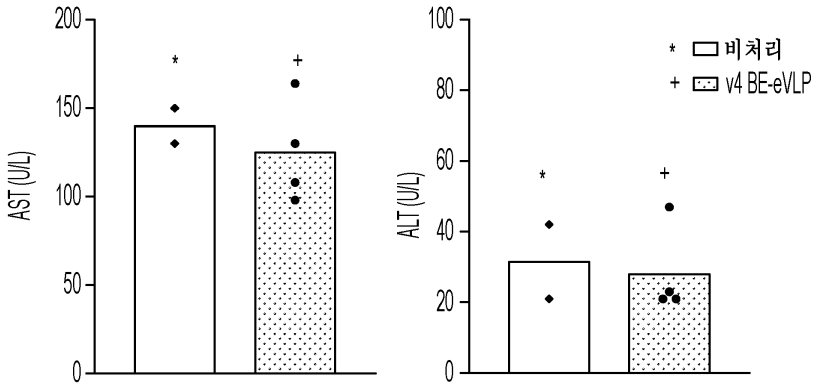
도면13a


BSC-A
FSC-A
A: 92.07%
A: 92.27%
모든 이벤트
이벤트
x1,000
다이사이클 루비-A-보상...
D: 77.79%
D: 82.82%
EGFP-A- 보상됨
벌크: 79.60%
벌크: 88.88%
GFP+: 2.22%
GFP+: 0.00%

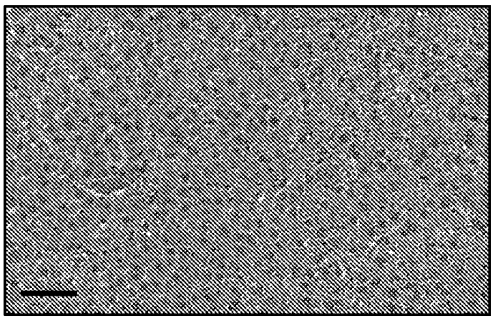
도면13b


GFP+ 빈도 평균
피질
중뇌

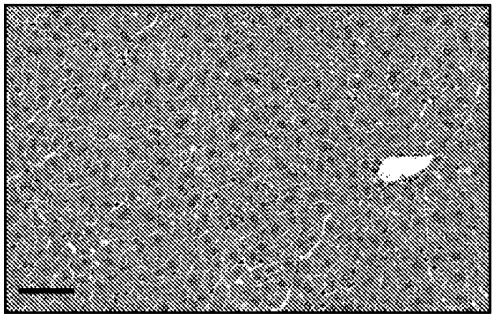
도면14a



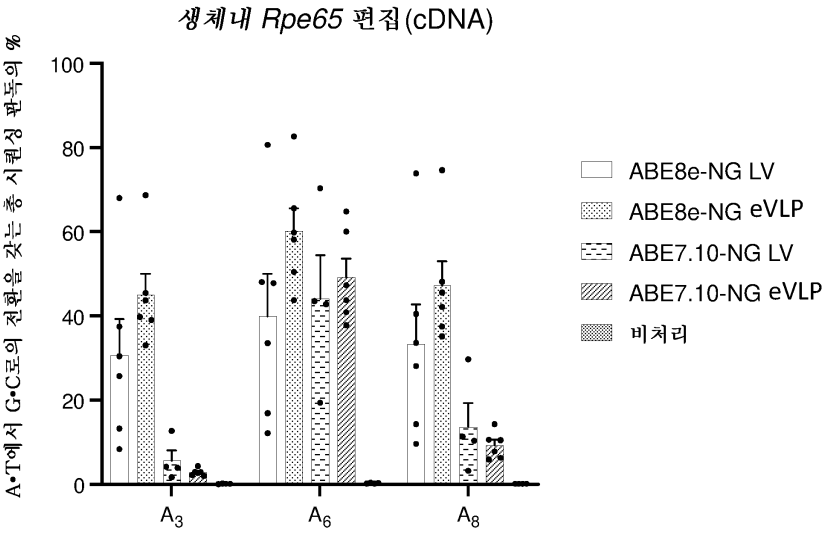
도면14b



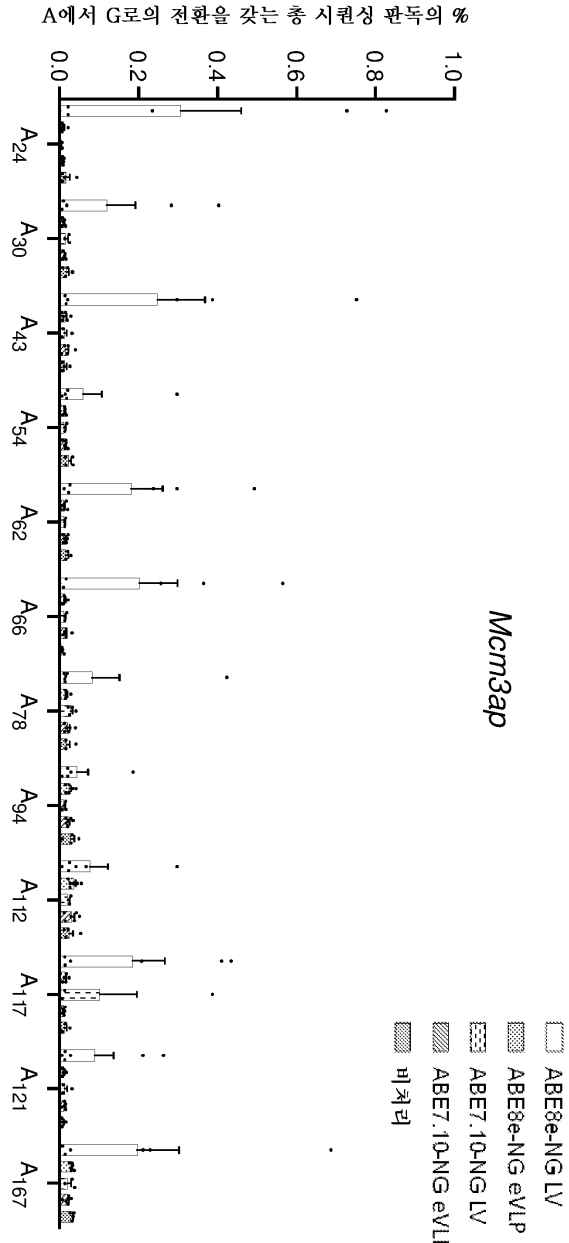
도면14c



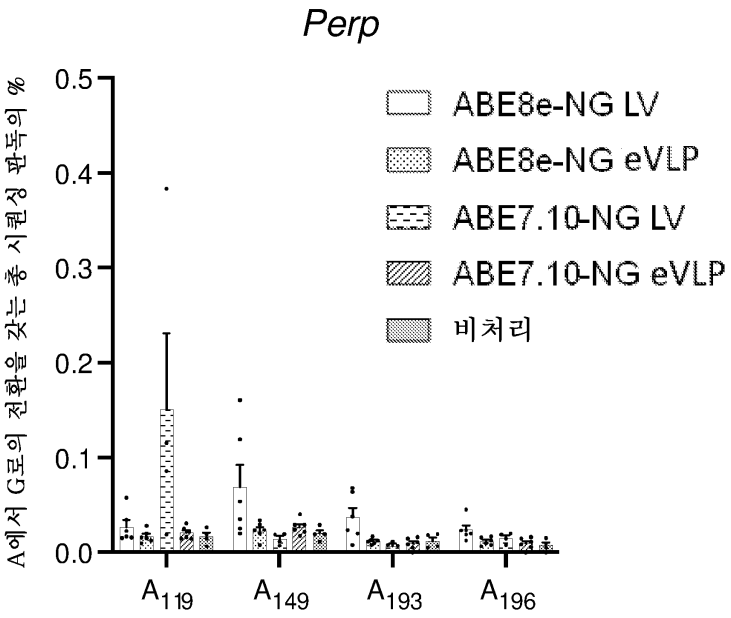
도면15a


생체내 Rpe65 편집(cDNA)
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
A3
A6
A8
ABE8e-NG LV
ABE8e-NG eVLP
ABE7.10-NG LV
ABE7.10-NG eVLP
비처리

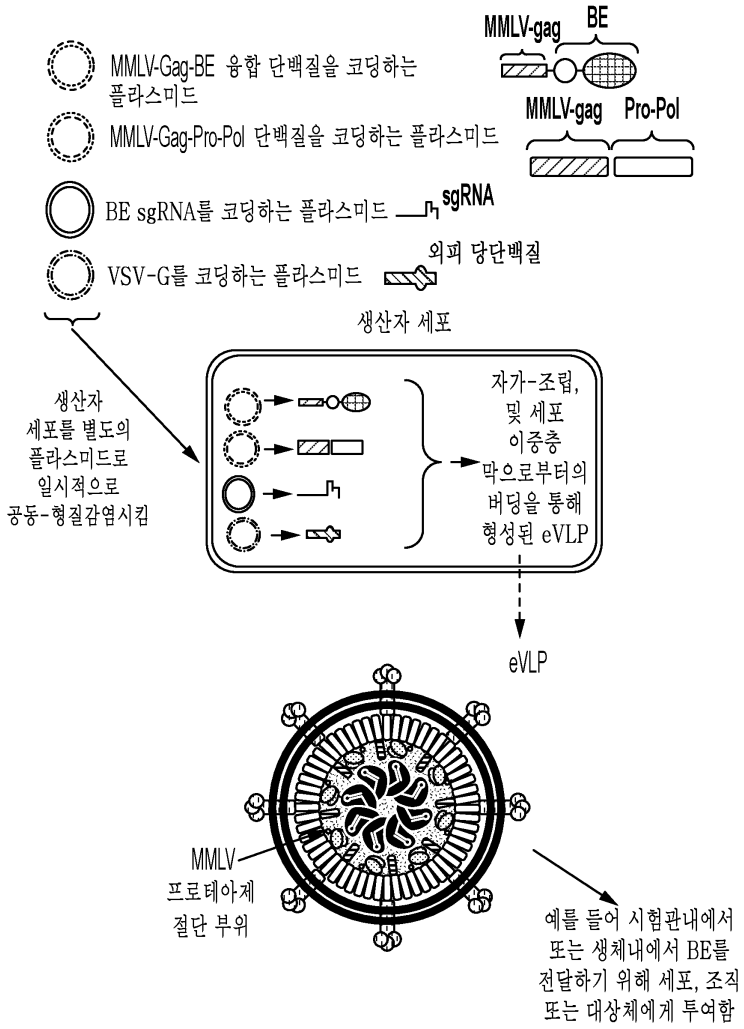
도면15b


A에서 G로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
A24
A30
A43
A54
A62
A66
A78
A94
A112
A117
A121
A167
Mcm3ap
ABE8e-NG LV
ABE8e-NG eVLP
ABE7.10-NG LV
ABE7.10-NG eVLP
비처리

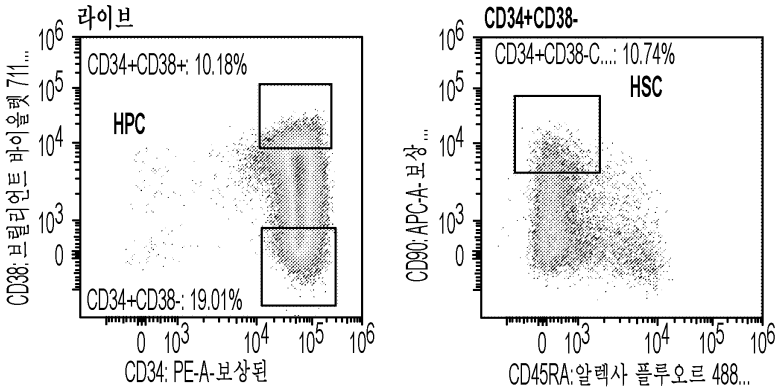
도면15c


Perp
A에서 G로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ABE8e-NG LV
ABE8e-NG eVLP
ABE7.10-NG LV
ABE7.10-NG eVLP
비처리
A119
A149
A193
A196

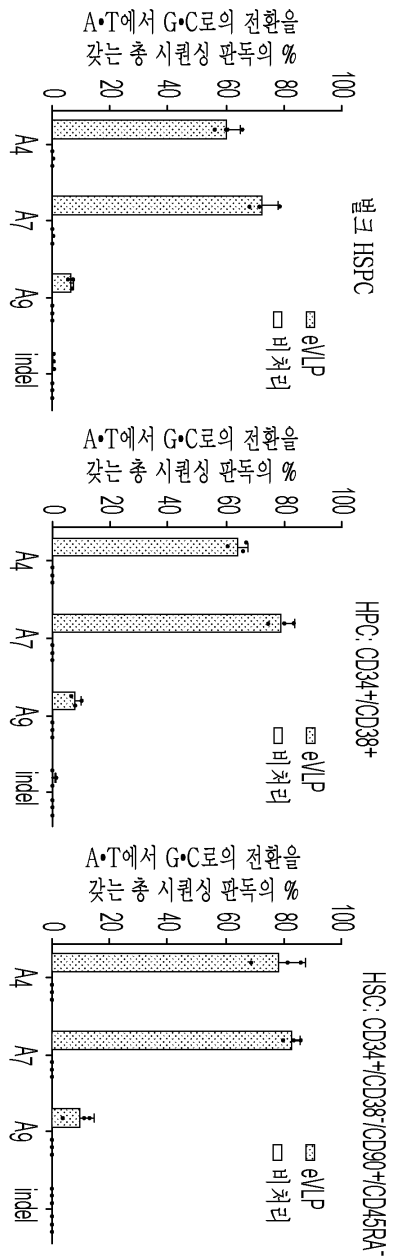
도면16


MMLV-Gag-BE 융합 단백질을 코딩하는 플라스미드
MMLV-Gag-Pro-Pol 단백질을 코딩하는 플라스미드
BE sgRNA를 코딩하는 플라스미드
VSV-G를 코딩하는 플라스미드
MMLV-gag
BE
MMLV-gag
Pro-Pol
sgRNA
외피 당단백질
생산자 세포
생산자 세포를 별도의 플라스미드로 일시적으로 공동-형질감염시킴
자가-조립, 및 세포 이중층 막으로부터의 버딩을 통해 형성된 eVLP
eVLP
MMLV 프로테아제 절단 부위
예를 들어 시험관내에서 또는 생체내에서 BE를 전달하기 위해 세포, 조직 또는 대상체에게 투여함

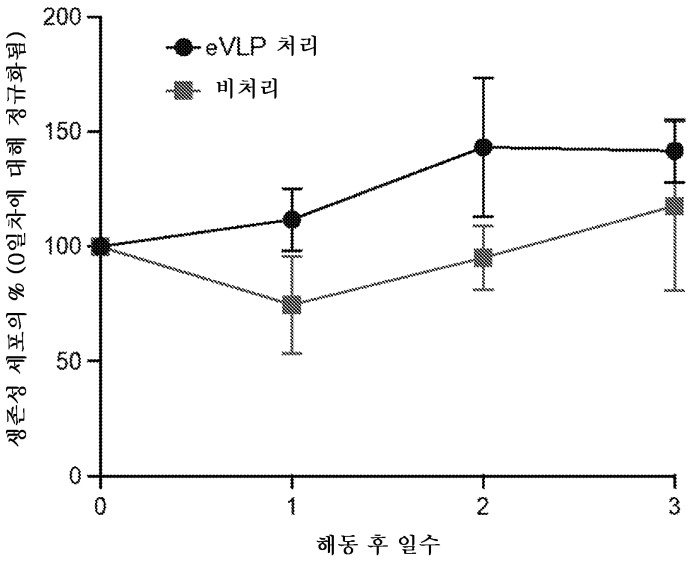
도면17a


라이브
CD34+CD38+: 10.18%
HPC
CD34+CD38-: 19.01%
CD38: 브릴리언트 바이올렛 711...
CD34: PE-A-보상된
CD34+CD38-
CD34+CD38-C...: 10.74%
HSC
CD90: APC-A-보상...
CD45RA: 알렉사 플루오르 488...

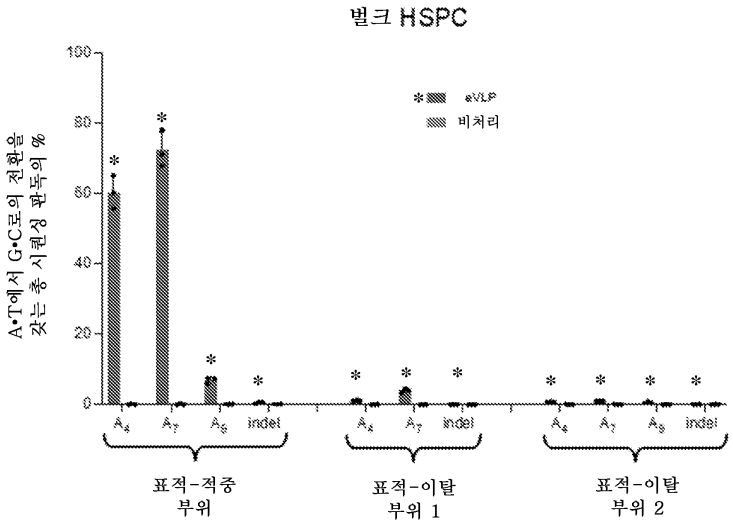
도면17b


A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
0
20
40
60
80
100
A4
A7
A9
indel
eVLP
비처리
벌크 HSPC
HPC: CD34+/CD38+
HSC: CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-

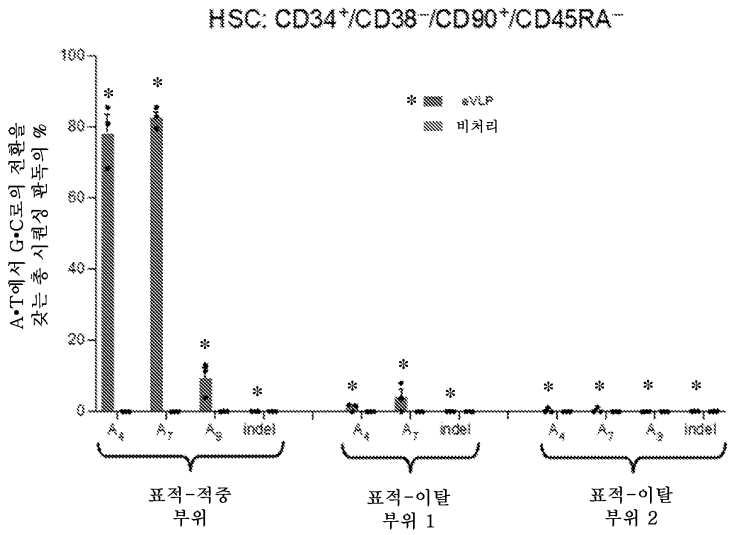
도면18


200
150
100
50
0
eVLP 처리
비처리
생존성 세포의 % (0일차에 대해 정규화됨)
0
1
2
3
해동 후 일수

도면19a


벌크 HSPC
eVLP
비처리
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
A4
A7
A8
indel
표적-적중 부위
표적-이탈 부위 1
표적-이탈 부위 2

도면19b


HSC: CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-
eVLP
비처리
A•T에서 G•C로의 전환을 갖는 총 시퀀싱 판독의 %
100
80
60
40
20
0
A4
A7
A9
indel
표적-적중 부위
표적-이탈 부위 1
표적-이탈 부위 2

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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