

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0077053

(43) 공개일자 2022년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/78 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)

C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/78 (2013.01)

C12N 15/102 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0061099

(22) 출원일자 2021년05월12일

심사청구일자 2021년05월12일

(30) 우선권주장

1020200166028 2020년12월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한양대학교 산학협력단

서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

배상수

서울특별시 성동구 왕십리로 222, 자연과학대학 316호(사근동)

정유경

서울특별시 성동구 왕십리로 222, 자연과학대학 316호(사근동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 8 항

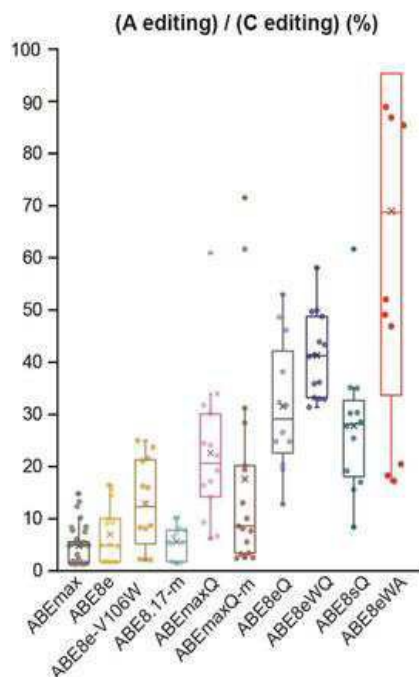
(54) 발명의 명칭 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위, 상기 아데닌 염기교정 유전자가위 및 sgRNA를 포함하는 아데닌 염기교정용 조성물, 아데닌 염기교정 방법 및 아데닌 염기교정용 키트에 관한 것이다. 본 발명에서는 사이토신 염기교정 효율을 감소시켜 아데닌 교정에 대한 특이성을 증가시키는 아데노신 탈아미노

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5c



화 효소 내 4가지 돌연변이 (V106W, D108Q, F148A, F149A)를 확인하였고, ABE_{max} 보다 더욱 개량된 버전의 다양한 ABEs에 상기 각 돌연변이가 도입된 ABE 변이체를 제작하여 테스트한 결과 상기 돌연변이들이 사이토신 교정 효과를 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 아데닌 염기교정 유전자가위는 더욱 정교한 아데닌의 교정이 가능한바, 상기 유전자가위와 sgRNA를 포함하는 아데닌 염기교정용 조성물은 인간, 식물, 박테리아를 포함한 모든 생명체에서 아데닌만을 정확하게 교정해야 하는 유전자 치료 분야 또는 새로운 작물 개발 분야 등에서 유용하게 활용 가능할 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/90 (2013.01)

C12Y 305/04004 (2013.01)

우재성

서울특별시 성북구 고려대로 108, 고려대학교 생명과학부

(72) 발명자

이석훈

서울특별시 성동구 왕십리로 222, 자연과학대학
316호(사근동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105660
과제번호	2018M3A9H3022412
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 / 바이오·의료기술개발사업 / KOREA BIO GRAND CHALLENGE
연구과제명	차세대 유전자 편집기술을 이용한 질환치료 플랫폼 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아데노신 탈아미노화 효소 (Adenosine deaminase) 변이체 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질이 융합된, 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)로서,

상기 효소 변이체는 V106W, D108Q, F148A 및 F149A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 ABE_{max}, ABE_{max}-m, ABE_{8e}, ABE_{8e}-V106W 및 ABE_{8.17}-m으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 돌연변이가 도입된 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전자가위는 아데닌 염기교정에 대한 특이성이 향상된 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유전자가위는 RNA 교정 활성이 감소된 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위.

청구항 5

제1항의 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor); 및

가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)를 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염기교정용 조성물은 아데닌 (A)을 구아닌 (G), 사이토신 (C) 및 티민 (T)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기로 치환하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제6항의 아데닌 염기교정용 조성물을 *in vitro*에서 표적 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정 방법.

청구항 8

제6항의 아데닌 염기교정용 조성물을 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위, 상기 유전자가위 및 가이드 RNA를 포함하는 아데닌 염기교정용 조성물, 아데닌 염기교정 방법 및 아데닌 염기교정용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine base editors; ABE)는 DNA 이중가닥 절단 (DSB)을 생성하거나 공여체 DNA 주형을 필요로 하지 않고 A/T 쌍을 G/C 쌍으로 변환할 수 있는 효과적인 유전자 교정 도구이다. 이러한 기술은 세포 단계에서만 아니라 식물이나 동물 개체에서도 염기를 교정할 때 사용되고 있으며, 유전자 치료에 이용될 수 있도록 검증과 개발이 활발히 이루어지고 있다. ABE의 초기 실용적 버전 (ABE7.10)은 3개의 융합된 요소로 구성된다. 구체적으로, 부분적으로 불활성의 Cas 핵산분해효소 (Cas nickase 또는 nCas) 및 아데노신 탈아미노화 효소 (adenosine deaminases) 쌍으로 구성된다 (*Escherichia coli* (wtTadA) 유래의 TadA인 야생형 tRNA-특이적 아데노신 탈아미노화 효소, 및 RNA 대신 DNA에 작동하도록 진화된 TadA7.10인 조작된 TadA (eTadA)). 그러나 최근 아데닌 염기교정 유전자가위에서, 게놈 차원의 단일 가이드 RNA (sgRNA) 의존적 오프-타겟 DNA 편집, 전사체 차원의 sgRNA 독립적 오프-타겟 RNA 편집 및 오프-타겟 위치에서 ABE 매개 사이토신 탈아미노화 효과 등이 보고되었다. 상기 첫 번째 오프-타겟 효과는 Cas 핵산분해효소의 불완전한 표적 특이성에 의해 야기되는 것이고, 나머지 두 가지 오프-타겟 효과는 아데노신 탈아미노화 효소의 DNA/RNA-결합 특성에 의한 것이다. 그러므로 아데노신 탈아미노화 효소에 의해 매개되는 문제점을 해결하기 위해서는 TadA7.10에 대한 추가적인 엔지니어링이 요구된다.

[0003] 현재까지 몇몇 연구 그룹에서 RNA에 대한 오프-타겟 효과를 감소시키기 위해 추가 돌연변이를 도입한 새로운 버전의 ABE를 개발하였다. 예컨대, wtTadA와 TadA7.10 모두에서 F148A 돌연변이를 추가하면 무작위적인 RNA 탈아미노화 활성이 감소한다고 보고하였다. 다른 그룹에서는 독립적으로 ABE7.10의 wtTadA가 RNA 탈아미노화 활성에 주로 영향을 미친다는 결과를 발표하였으며, 반면에 wtTadA가 존재하지 않을 경우 DNA 교정 활성에 영향을 미치지 않음을 발견하였다. 따라서 E59A 돌연변이를 도입함으로써 wtTadA를 비활성화 시켰고, TadA7.10에서의 추가 돌연변이 (V106W)는 DNA 표적 활성을 감소시키지 않고 RNA에 대한 오프-타겟 효과를 감소시킨다는 것을 발견하였다. 또 다른 그룹은 wtTadA를 완전히 제거하고 TadA7.10 (K20A/R21A 또는 V82G)에 몇 가지 돌연변이를 추가하여 RNA 오프-타겟 효과를 감소시켰다 (Nat Biotechnol 37, 1041-1048 (2019)). 그러나 상기와 같이 많은 연구 그룹들에서 ABE 매개 RNA 탈아미노화 활성을 감소시키는데에 주로 초점을 맞추어 연구들을 진행하여 왔으며, ABE 매개 사이토신 촉매 효과에 대해서는 연구가 깊게 이루어지지 않았다. 따라서 사이토신 편집 활성을 감소시킬 수 있는 돌연변이 및 이러한 돌연변이가 적용된 ABE 변이체에 대해서도 거의 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 조작된 eTadA 효소가 아데닌과 사이토신 모두에 대해 공통적인 촉매 부위를 가지고 있기 때문에 활성 부위 및 주변의 추가 돌연변이가 아데닌 교정 활성을 감소시키지 않고 사이토신 교정 활성을 감소시킬 수 있을 것이라고 가정하였고, 이에 수십 개의 TadA 변이체를 합리적으로 설계하고 테스트하여 사이토신 편집 활성을 제거하는 주요 돌연변이를 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0005] 이에, 본 발명은 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)를 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 아데닌 염기교정용 조성물을 *in vitro*에서 표적 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 아데닌

(A) 염기교정 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 아데닌 염기교정용 조성물을 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아데노신 탈아미노화 효소 (Adenosine deaminase) 변이체 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질이 융합된, 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)로서,

[0012] 상기 효소 변이체는 V106W, D108Q, F148A 및 F149A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일구현예로, 상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 ABE_{max}, ABE_{max}-m, ABE8e, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 돌연변이가 도입된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 유전자가위는 아데닌 염기교정에 대한 특이성이 향상된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 유전자가위는 RNA 교정 활성이 감소된 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)를 포함하는, 아데닌 염기교정용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일구현예로, 상기 염기교정용 조성물은 아데닌 (A)을 구아닌 (G), 사이토신 (C) 및 티민 (T)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기로 치환하는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정용 조성물을 *in vitro*에서 표적 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정용 조성물을 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에서는 사이토신 염기 교정 효율을 감소시켜 아데닌 교정에 대한 특이성을 증가시키는 아데노신 탈아미노화 효소 내 4가지 돌연변이 (V106W, D108Q, F148A, F149A)를 확인하였고, ABE_{max} 보다 더욱 개량된 버전의 다양한 ABEs에 상기 각 돌연변이가 도입된 ABE 변이체를 제작하여 테스트한 결과 상기 돌연변이들이 사이토신 교정 효과를 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 아데닌 염기교정 유전자가위는 더욱 정교한 아데닌의 교정이 가능한바, 상기 아데닌 염기교정 유전자가위와 sgRNA를 포함하는 아데닌 염기교정용 조성물은 인간, 식물, 박테리아를 포함한 모든 생명체에서 아데닌만을 정확하게 교정해야 하는 유전자 치료 분야 또는 새로운 작물 개발 분야 등에서 유용하게 활용 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 ABE의 촉매 활성에 의해 매개되는 표적 아데닌 교정 및 사이토신 교정의 개략도를 그림으로 도시한 것이다.

도 2는 다양한 아데닌 염기교정용 유전자가위에 포함된 아데노신 탈아미노화 효소 (좌측) 및 FANCF 및 RNF2 위치에서 ABE의 각 A4 및 C6의 염기 교정 효율을 보여주는 그래프이다 (우측).

도 3은 아데노신 탈아미노화 효소 (TadA)의 아미노산 서열 및 이의 구조를 분석한 결과로서, 도 3a는 다양한 종 유래 wtTadA, TadA7.10 TadA8e, saTadA 및 10 TadA 상동단백질의 서열을 정렬하여 나타낸 결과이고, 도 3b는 *E. coli* (녹색; PDB 코드 1Z3A) 유래 apo 구조를 RNA에 결합된 saTadA의 홀로 구조 (분홍색과 회색; PDB 코드 2B3J) 위에 겹쳐 놓은 구조를 나타낸 결과이다.

도 4는 FANCF 및 RNF2 위치에서 33개의 ABE 변이체에 의해 유도된 아데닌 및 사이토신 교정을 분석한 히트맵 결

과 (좌측) 및 아데닌 교정에 대한 특이성을 분석한 결과이다 (우측).

도 5는 D108Q 또는 F149A 돌연변이를 도입하여 제조한 다양한 ABE 변이체를 HEK293T 세포로 형질감염시킨 후 4개의 내인성 FANCF, RNF2, ABLIM3 및 CSRNP3 유전자 내 표적 부위에서 아데닌 및 사이토신 교정 효율을 측정된 결과로서, 도 5a 및 도 5b는 10개의 ABE 변이체의 아데닌 교정 효율 (도 5a) 및 사이토신 교정 효율 (도 5b)을 측정된 결과이고, 도 5c는 상기 도 5a 및 도 5b의 모든 표적에서 아데닌 교정 효율을 사이토신 교정 효율로 나눈 정확도 값을 비교한 그래프 결과이다.

도 6은 eTadA에서 사이토신 표적 모티프 결합 영역에 대한 개략도이다.

도 7은 도 5에 개시된 10개 ABE 변이체 각각을 처리 한 후 4개의 mRNA 전사체에서 A에서 I로의 평균적 전환 빈도를 나타낸 결과이다.

도 8은 본 발명의 ABE 변이체 중, ABE8e, ABE8eW, ABE8eWQ, ABE8s 및 ABE8sQ를 세포에 각각 처리한 다음 전체 mRNA 시퀀싱 분석을 수행한 결과이다.

도 9는 본 발명의 ABE 변이체 중, ABE8eWQ, ABE8eWA 및 ABE8eW의 아데닌 교정수준을 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 ABE 변이체 중, ABE8eWQ, ABE8eWA 및 ABE8eW의 사이토신 교정수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명자들은 사이토신 교정 활성을 감소시킨 주요 돌연변이를 확인하였고, 아데노신 탈아미노화 효소에 상기 돌연변이를 도입시켜 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위를 제작하였다.
- [0024] 본 발명은 아데노신 탈아미노화 효소 (Adenosine deaminase) 변이체 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질이 융합된, 사이토신 교정 활성이 제거된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)로서, 상기 효소 변이체는 V106W, D108Q, F148A 및 F149A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아데닌 염기교정 유전자가위를 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "염기교정 유전자가위 (Base Editors, BEs)"는 단일 염기의 교정 수단으로서, 보다 구체적으로 아데노신 탈아미노화 효소 또는 사이토신 탈아미노화 효소를 Cas9 니카아제 (nickase)의 N-말단에 융합시킴으로써 구축되며, 각각 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editors; ABEs) 및 사이토신 염기교정 유전자가위 (Cytosine Base Editors; CBEs)로 명명된다. 상기 BEs는 이중 가닥 절단을 일으키지 않으면서, ABEs는 특정 부위에서 아데닌을 구아닌으로 교정하며 CBEs는 특정 부위에서 사이토신을 티민으로 교정한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editors; ABEs)"는 아데닌을 구아닌으로 교정하기 위해, 임의의 자연유래 탈아미노화 효소 (ecTadA) 및/또는 아데노신 탈아미노화 효소 변이체 (ecTadA*)를 Cas9 니카아제 (nickase)의 N-말단에 융합시킴으로써 구축되며, ABEs의 종류로는 아데노신 탈아미노화 효소의 종류 또는 변이에 따라 ABE6.3, ABE7.8, ABE7.9, ABE 7.10, ABE_{max}, ABE_{max-m}, SECURE-ABE, ABE8e, ABE8e-V106W, ABE8.17-m 등의 버전이 있으나 이에 제한되지 않고, "ABEs"로 지칭할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 아데닌 염기교정에 대한 특이성 또는 정확도가 향상되어 정밀한 아데닌 염기의 교정이 가능한 유전자가위를 의미하는 것으로, 사이토신 염기교정 활성 및 RNA 오프-타겟 활성이 감소 또는 제거된 것을 특징으로 한다. 상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 바람직하게 ABE_{max}, ABE_{max-m}, ABE8e, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 돌연변이가 도입된 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 ABE_{max}, ABE_{max-m}, ABE8e, ABE8e-V106W 또는 ABE8.17-m의 아데노신 탈아미노화 효소 내에 V106W, D108Q, F148A 및 F149A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이가 도입된 것일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 D108Q 또는 F149A이 도입된 것일 수 있고, 더더욱 바람직하게는 ABE8e-V106W에 D108Q 또는 F149A이 도입된 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 ABE8e-V106W에 D108Q이 도입된 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "아데노신 탈아미노화 효소 (adenosine deaminase)"는 아데닌에서 아미노기를 제거하고 히포크산틴 (hypoxanthine)의 생성에 관여하는 효소이다. 상기 효소는 고등 동물에는 거의 발견되지 않으나 암소의 근육 내, 우유, 쥐의 혈액에 조금 존재하며 가재의 내장 및 곤충 등에서는 많이 존재한다고 보고된다. 아데노신 탈아미노화 효소는 ecTadA와 같은 자연유래 아데노신 탈아미노화 효소 또는 ecTadA의 돌연변이 (ecTadA*)와 같은 아데노신 탈아미노화 효소의 변이체를 포함할 수 있으며, 바람직하게 상기 변이체는

TadA7.10, TadA8e, TadA8s, TadA8.20 또는 TadA8.17 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어, “Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질”은 DNA 바이러스에 대한 특정 박테리아의 면역학적 방어에서 중요한 역할을 하는 단백질로 유전자 공학 응용에 많이 사용되는데, 상기 단백질의 주요 기능이 DNA를 절단하는 것이기 때문에 세포의 게놈을 변형하는 데에 적용할 수 있다. 구체적으로, CRISPR-Cas9은 3세대 유전자가위로써 이용하고자 하는 특정 염기서열을 인식하여 절단하고 편집하며, 게놈의 목적 장소에 특정 유전자를 삽입하거나 특정 유전자의 활동을 정지시키는 조작을 간단하고 신속하고 효율성 있게 실시하는데 유용하다. Cas9 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, Cas9 단백질은 그 목적에 따라 당업자가 추가적인 도메인을 적절하게 연결할 수 있다. 본 발명에 있어서, Cas9 단백질은 야생형 Cas9 뿐만 아니라, 유전자 편집을 위한 핵산분해효소의 기능을 갖는 것이라면 Cas9의 변이체를 모두 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 Cas9 단백질은 그 유래가 제한되지 않으며, 비제한적인 예시로서 스트렙토코커스 피요제네스 (*Streptococcus pyogenes*), 프란시셀라 노비시다 (*Francisella novicida*), 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*), 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*), 리스테리아 이노큐아 (*Listeria innocua*), 또는 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*) 유래일 수 있으나, 바람직하게는 스트렙토코커스 피요제네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래일 수 있다.
- [0031] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 아데닌 염기교정 유전자가위에서 사이토신 교정 활성이 제거되고 아데닌 교정에 대한 특이성이 향상된 것을 확인하였다.
- [0032] 보다 구체적으로, 본 발명의 일실시예에서는 이전 연구에서 확인된 결과를 바탕으로 ABE7.10 보다 더욱 개량된 버전의 ABEs에서도 사이토신 탈아미노화 활성이 나타나는지 조사한 결과, 테스트한 모든 ABEs에서 여전히 아데닌 교정 활성 외에도 사이토신 교정이 유도되는 것을 확인하였다 (실시예 2 참조).
- [0033] 본 발명의 다른 실시예에서는 아데노신 탈아미노화 효소에서 아데닌과 사이토신 사이의 구별을 통해 사이토신 교정 활성을 제거하는데 영향을 미칠 수 있는 돌연변이를 조사하기 위해 TadA의 상동단백질의 서열 및 3차 구조 분석 결과를 기반으로 다양한 후보 돌연변이가 각각 ABE_{max} 또는 ABE_{max}-m의 TadA7.10에 도입된 변이체들을 제작하여 HEK293T 세포 내 표적 부위에서 아데닌 및 사이토신의 교정 효율을 분석하였다. 그 결과 아데닌 교정 효율은 유지되거나 약간 감소하였으나 사이토신 교정 효율이 실질적으로 감소하여 결과적으로 아데닌 교정에 대한 특이성을 향상시킨 4개의 돌연변이 (즉, V106W, D108Q, F148A 및 F149A)를 발견하였다. 나아가 추가 테스트를 통해 TadA7.10에 대하여 D108Q 돌연변이가 아데닌 교정에 대한 선택성을 가장 높은 수준으로 향상시킨다는 것을 확인하였다 (실시예 3 참조).
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 TadA7.10 보다 아데닌 교정 활성을 향상시키기 위해 개발된 TadA8e 및 TadA8.17를 이용하여, 구체적으로 ABE8e, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m에 D108Q 돌연변이를 도입하여 ABE8e-D108Q, ABE8e-V106W/D108Q 및 ABE8.17-D108Q-m를 제조 (ABE8eQ, ABE8eWQ, 및 ABE8sQ로 명명)하고, 가장 최신 버전인 ABE8e-V106W에 F149A를 도입 (ABE8eWA로 명명)한 후 상기와 동일한 방법으로 아데닌 및 사이토신 교정 효율을 분석하였다. 그 결과 ABE8eQ, ABE8eWQ, ABE8sQ 및 ABE8eWA 모두 향상된 아데닌 교정 및 감소된 사이토신 교정 효율을 나타내었고, ABE8eWQ과 ABE8eWA의 경우 교정 효율과 특이성이 매우 높게 나타났다. 또한, 상기와 동일한 ABE 변이체들에 대하여 RNA 오프-타겟 교정 효율 감소 효과를 평가하였으며, ABE8eQ, ABE8eWQ 및 ABE8sQ는 RNA 오프-타겟 효과가 크게 감소하였다. 상기 결과로부터, D108Q 돌연변이가 RNA 탈아미노화 활성을 효과적으로 감소시킨다는 것을 확인하였으며, ABE8e-V106W/D108Q이 가장 정확하게 아데닌을 교정함을 알 수 있었다 (실시예 4 참조).
- [0035] 상기 결과들은 본 발명에 따른 아데닌 염기교정 유전자가위의 매우 정교한 아데닌 염기교정 효과 및 이의 용도를 입증하는 것이다.
- [0036] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)를 포함하는, 아데닌 염기교정용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 아데닌 염기교정용 조성물은 아데닌 (A)을 구아닌 (G), 사이토신 (C) 및 티민 (T)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기로 치환하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 아데닌을 구아닌으로 치환하는 것일 수 있다.
- [0038] 상기 “가이드 RNA(guide RNA; gRNA)”란 교정하고자 하는 표적 DNA의 위치를 찾아내어 Cas 단백질을 표적 DNA

로 인도하는 역할을 하는 단일 가닥의 RNA로서, 상기 가이드 RNA는 PAM(protospacer adjacent motif) 자리와 인접하며, 편집하려는 DNA의 10~25bp의 염기 서열과 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정용 조성물을 *in vitro*에서 표적 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정 방법을 제공한다.

[0040] 본 발명에 따른 염기교정 방법에 있어서, 상기 타겟 서열은 교정하고자 하는 표적 염기를 포함하는 것일 수 있고, 상기 교정하고자 하는 표적 염기는 질병 또는 질환과 연관된 아데닌을 제외한 다른 염기, 바람직하게는 구아닌이 아데닌으로 점 돌연변이된 염기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 아데닌 염기교정용 조성물을 포함하는, 아데닌 (A) 염기교정용 키트를 제공한다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 상기 염기교정용 조성물과 함께 버퍼 (buffer) 및 데옥시리보뉴클레오티드-5-트리포스페이트 (dNTP)와 같은 염기교정을 실시하는데 필요한 물질 (시약)을 모두 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트의 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0046] 실시예 1. 실험재료 및 실험방법

[0047] 1-1. ABE 변이체 발현용 플라스미드 구축

[0048] 본 발명자들은 pCMV_ABE_{max}_P2A_GFP (Addgene # 112101), pCMV-ABE_{max} (TadA E59A) (Addgene # 125648), pCMV-ABE_{max} (TadA, eTadAE59A) (Addgene # 125662), pCMV-ABE_{max}(TadA E59A, eTadAR47Q) (Addgene #125657), pCMV-ABE_{max}(TadA E59A, eTadAD108Q) (Addgene #125655), pCMV-ABE_{max}AW (Addgene #125647), ABE8e (Addgene #138489), ABE8e(TadA-8e V106W) (Addgene #138495), 또는 ABE8.17-m (Addgene #136298)을 기반으로 ABE 변이체 발현 플라스미드를 구축하였다. ABE 발현용 벡터를 얻기 위해, pCMV_ABE_{max}_P2A_GFP 1 μg, NotI-HF 1 unit (New England Biolabs, catalog number: R3189L) 및 BglIII 1 unit (Enzymomics, catalog number: R010S)을 최종 50 μl 부피에서 혼합하였다. 이어서 상기 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 배양하여 절단 반응을 유도한 다음, 전기영동을 수행하여 절단된 산물을 크기에 따라 분리하고 겔 추출 키트인 Expin™ Gel SV mini (GeneAll, catalog number: 102-102)를 사용하여 정제하였다. 2U T5 엑소뉴클레아제 (exonuclease)(New England Biolabs, catalog number: M0363S), 12.5U Phusion DNA 중합효소 (Polymerase)(Thermo Fisher Scientific, catalog number: F530L), 2kU Taq DNA 리가아제 (ligase)(New England Biolabs, catalog number: M0208S), 0.2M Tris-HCl (pH 7.5), 0.2M MgCl₂, 2mM dNTPs, 0.2M dithiothreitol, 25% PEG-8000, 및 1mM NAD를 포함하여 최종 10 μl 부피로 혼합하였고, 여기에 상기 정제된 산물과 확인하고자 하는 변이체를 포함하는 합성된 PCR 산물을 넣고 혼합하고, 50℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 산물을 100 μl의 DH5α competent 세포로 형질전환시켰다. 형질전환된 단일 콜로니를 항생제가 함유된 LB 배지에 접종하였고, DNA prep 키트 (Enzymomics, EP101-200N)를 사용하여 세포로부터 플라스미드를 분리하였다.

[0050] 1-2. 리포솜을 이용한 형질감염

[0051] HEK293T (ATCC®CRL-3216™) 세포는 10% FBS, 1% 암피실린 (ampicillin)이 보충된 DMEM 배지에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건 하에 배양되었다. 세포 밀도는 혈구계수기 및 현미경 관찰을 통해 추정하였다. 형질감염 전, HEK293T 세포를 24-웰 플레이트에 웰 당 1×10⁵ 세포 밀도로 분주하고 24시간 동안 배양하였으며, lipofectamine® 2000 시약 (Thermo Fisher Scientific, 11668019) 2 μL, 플라스미드 DNA 1 μL (ABE 발현 플라스미드 750ng 및 sgRNA 발현 플라스미드 250ng) 및 무혈청 배지의 혼합액을 세포에 처리하였다. 다음으로 형질감염 72시간 후에 genomic DNA를 분리하였다.

[0053] 1-3. 전기천공법을 통한 형질감염

[0054] NeonTM Transfection System 10 μ L 키트 (Thermo Fisher Scientific, MPK1025)를 이용하여 2×10^5 세포 내로 The ABEmax 발현 플라스미드 (500ng) 및 sgRNA 발현 플라스미드 (170ng)를 전기천공법을 이용하여 도입하였다. 적절한 전기천공 매개변수 (HEK293T 세포의 경우 1,500V-20ms-2pulses)는 제조사의 프로토콜을 준수하여 진행하였다. 또한 형질감염 72시간 후에 genomic DNA를 분리하였다.

[0056] 1-4. TadA 상동단백질의 서열 정렬

[0057] 미국 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information; NCBI)의 Protein BLAST를 사용하여 TadA 상동단백질 (orthologs)을 검색하였다. *E. coli* wtTadA 서열 (GenBank ID : WP_001297409.1)을 입력 서열로 사용하고 ~ 40% 서열 동일성을 나타내는 10개의 상동단백질을 선택하였다. 선택된 서열에 대한 accession number 및 종 (species)은 다음과 같다: vsTadA, WP_127165941.1, *Veillonella* sp. CHU732; ssTadA, WP_105128341.1, *Streptococcus suis*; asTadA, WP_067866801.1, *Acinetobacter* sp. SFB; bfTadA, WP_073388705.1, *Butyrivibrio fibrisolvens*; sxTadA, WP_107541930.1, *Staphylococcus xylosus*; cbTadA, WP_111988333.1, *Cellvibrionaceae bacterium* AOL6; dfTadA, WP_117494436.1, *Dorea formicigenerans*; ocTadA, WP_047980683.1, *Ornithinibacillus contaminans*; osTadA, WP_077602817.1, *Oceanobacillus sojae*; pgTadA, WP_026908502.1, *Paucisalibacillus globulus*.

[0059] 1-5. 표적 심층 서열분석 (Targeted deep sequencing)

[0060] HEK293T 세포를 원심분리하고, 세포 펠릿을 100 μ l의 Proteinase K 추출 완충액 [40mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Tween-20, 0.2 μ M EDTA, 10mg Proteinase K, 0.2% Nonidet P-40]에 재현탁한 다음, 60°C에서 15분 동안 배양한 후 98°C에서 5분 동안 배양하였다. HEK293T 세포에서 분리된 게놈 DNA는 KOD-Multi & Epi (TOYOBO, KME-101)를 사용하여 증폭시켰고, 생성된 PCR 산물은 Illumina Mini-Seq 기기를 사용하여 분석하였다. Mini-seq 결과는 BE-Analyzer (<http://www.rgenome.net/be-analyzer/>)를 이용하여 분석하였다.

[0062] 1-6. 표적 RNA 서열분석 (Targeted RNA sequencing)

[0063] 24-웰 플레이트에서, HEK293T 세포에 500ng의 ABE 발현 플라스미드와 170ng의 sgRNA를 전기천공법을 통해 형질 감염시켰고, 24시간 후 세포를 DPBS로 세척하였다. RNA는 제조업체의 지침에 따라 NucleoSpin® RNA Plus 키트 (MACHEREY-NAGEL, 740984, 250)를 사용하여 분리하였고, ReverTra Ace- α -TM (TOYOBO, FSK-101)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 역전사를 통한 cDNA 합성을 수행하였다. cDNA 증폭을 위해 KOD-Multi & Epi (TOYOBO, KME-101)로 PCR을 수행하였고, Illumina Mini-Seq 기기를 사용하여 PCR 산물을 분석하였다. 아데노신에서 이노신으로 편집된 비율을 구하기 위해, 산물에서 아데노신에서 구아노신으로 변환된 수를 총 아데노신 수로 나누었다.

[0065] 실시예 2. 다양한 ABE 변이체에서 사이토신 탈아미노화 활성 측정

[0066] 본 발명자들은 이전 연구에서 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine base editors; ABE)인 ABE7.10은 도 1에 도시된 바와 같이 선호하는 모티프 (TC * N)의 좁은 작동범위 (Cas9 표적 범위의 5' 말단으로부터 5~7번째)에서 원래의 표적 염기인 아데닌을 교정하는 것 이외에도 TC 표적 모티프가 있는 경우에 사이토신 탈아미노화 (cytosine deamination)를 촉매하여 사이토신을 치환할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 사이토신 탈아미노화 촉매에 의한 사이토신 염기 치환은 ABE7.10뿐만이 아니라 이의 이전 버전 (ABE6.3, ABE7.8 및 ABE7.9) 및 더욱 최적화된 버전 (ABEmax)에서도 나타나는 것을 확인하였다.

[0067] 이에, 본 발명자들은 최근 들어 다양한 목적에 따라 아데노신 탈아미노화 효소인 TadA를 다양하게 개량하여 개발된 ABE 변이체들에서도 사이토신 탈아미노화 활성이 나타나는지 여부를 조사하고자 하였다. 본 실험에서 사용한 ABE 변이체 종류는 다음과 같으며, 각 변이체에 포함된 구체적인 TadA 정보는 도 2에 나타내었다: 1) ABE 매개 RNA 오프-타겟 효과를 감소시키기 위한 목적으로 개발된 버전 (i.e., ABEmax-F148A, ABEmax-AW, 및 SECURE-ABEs), 2) 증가된 탈아미노화 활성을 나타내는 TadA8e 변이체를 포함하는 버전 (i.e., ABE8e 및 ABE8e-V106W),

및 3) 향상된 편집 활성을 나타내는 TadA8s를 포함하는 버전 (i.e., ABE8.17-m).

[0068] 이를 위해, 인간 HEK293T 세포에서 교정 작동범위 내에 아데닌 잔기 및 사이토신 표적 모티프를 모두 포함하는 두 가지 대표적 내인성 표적 (FANCF 및 RNF2)을 대상으로 모든 ABE 변이체를 테스트하였고, 고 처리량 염기서열 분석을 실시하여 하기와 같은 결과를 얻었다.

[0069] 첫째, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 테스트된 상기 모든 ABE 변이체는 여전히 아데닌 교정 외에도 사이토신 교정을 유도하는 것으로 나타났으나, ABE_{max}-F148A 및 ABE_{max}-AW의 경우 사이토신 교정 효율이 약간 감소되어 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 eTadA의 추가 엔지니어링이 사이토신 탈아미노화 활성을 제거하거나 최소화할 수 있다는 본 발명자들의 가설을 뒷받침하는 것이라고 판단하였다.

[0070] 둘째, 모든 ABE8 변이체가 이전 버전에 비해 크게 증가한 아데닌 교정 효율을 보였지만 사이토신 교정 효율 또한 증가한 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고 ABE8e-V106W의 경우에는 ABE8e에 비해 사이토신 교정 효율이 감소된 것을 확인하였다.

[0071] 셋째, wtTadA의 비활성화 또는 제거가 DNA 교정 활성을 방해하지 않는 것을 알 수 있었으며, 오히려 wtTadA가 없는 ABE_{max} 버전 (ABE_{max}-m)은 원래의 ABE_{max} 보다 더 높은 DNA 교정 활성을 나타내었다.

[0073] 실시예 3. 사이토신 교정 효율에 중요한 영향을 미치는 TadA 내 돌연변이 확인

[0074] 본 발명자들은 아데노신 탈아미노화 효소인 TadA에서 아데닌과 사이토신 사이의 구별을 촉진하는 주요 돌연변이를 확인하고자 하였으며, TadA 상동단백질의 일부가 이미 사이토신 교정을 회피하도록 진화하였을 수 있다고 생각하였다. 따라서 이를 위해 다양한 종에서 유래된 TadA 상동단백질의 아미노산 서열을 조사하였다.

[0075] 그 결과, 도 3a에서 볼 수 있는 바와 같이 각 TadA 상동단백질들의 정렬된 아미노산 서열과 도 3b의 tRNA 단편에 결합된 *Staphylococcus aureus* TadA (saTadA)의 3차 구조를 기반으로, 실질적으로 상동단백질 사이에서 활성 부위 안팎의 여러 잔기가 다양하게 변이되어 있음을 발견하였다. 예를 들어, *E. coli* wtTadA의 P48은 TadA 상동단백질의 대부분에서 아르기닌 (arginine)으로 치환되고, D108은 다른 상동단백질에서 아스파라긴 (asparagine), 글루탐레이트 (glutamate) 또는 세린 (serine)으로 치환되어 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 도 3b의 saTadA 구조는 아데닌보다 작은 사이토신의 탈아미노화에 필요한 RNA 기질의 구조적 변화에 대한 통찰력을 제공하였다. 아데닌 탈아미노화 활성을 위해, 아데닌의 육각형 고리는 포켓에 퓨린 염기가 결합된 saTadA 구조에서 보이는 것과 유사하게 아데닌 결합 포켓 안쪽 깊숙이 위치해야 한다. 그러나 사이토신 탈아미노화를 위해서는 피리미딘 고리가 구조에서 퓨린 염기의 육각형 고리와 동일한 위치에 있어야하므로 결과적으로 당-인산 백본이 포켓 가장자리로 이동해야 한다. 따라서 본 발명자들은 DNA 백본이 포켓 테두리에 접근하는 것을 방지할 수 있는 더 큰 잔기로 P48과 D108을 치환하기로 결정하였다. 또한 아데닌 결합 포켓에 위치한 V30 및 F84를 많은 TadA 상동단백질의 해당 위치에서 발견되는 이소류신 (isoleucine) 및 류신 (leucine)으로 치환시켰다. 더욱이, DNA on-target 편집 활성을 유지하는 R47Q 돌연변이, 및 시험관 내에서 RNA 편집 활성을 감소시키는 D53E 돌연변이와 같이 이전에 테스트되어 RNA 편집 활성을 불완전하게 감소시키는 것으로 나타난 돌연변이를 함께 도입하였다.

[0076] 다음으로, ABE의 사이토신 교정 효과에 영향을 미칠만한 상기 각 후보 돌연변이를 ABE_{max} 또는 ABE_{max}-m의 TadA7.10에 도입한 다음, HEK293T 세포에 형질감염시켜 FANCF 및 RNF2 유전자 내 표적 부위에서 각 ABE 변이체의 뉴클레오티드 전환 활성을 테스트하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 ABE 변이체의 아데닌 및 사이토신 교정 효율을 ABE_{max}의 효율로 보정 (normalization) 하였을 때, 대부분의 돌연변이에서 아데닌 및 사이토신 교정 효율이 동시에 증가 또는 감소하였다는 것을 확인하였다. 단, 오른쪽에 아데닌 교정 효율을 사이토신 교정 효율로 나눈 정확도 값을 그래프로 나타낸 결과, 4개의 돌연변이 (즉, V106W, D108Q, F148A 및 F149A)에서 사이토신 교정 효율이 실질적으로 감소하면서도 아데닌 감소 효율을 유지하거나 약간 감소하여 결과적으로 아데닌 교정에 대한 특이성이 더욱 높아진 것을 발견하였다. 이에, 본 발명자들은 두 가지 추가적인 내인성 유전자의 표적 부위에 대하여 상기에서 발견한 4개 돌연변이를 포함하는 ABE 변이체의 활성을 테스트하였고, TadA7.10-D108Q (이하, ABE_{max}Q-m)를 포함하는 ABE_{max}-m이 아데닌 교정에 대해 가장 높은 특이성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

[0078] 요약하면, 상기 결과를 통해 각각 아데닌 또는 사이토신 교정에 대한 향상된 선택성을 나타낸 TadA7.10 변이체인 TadA7.10-D108Q를 발견하였다.

[0080] 실시예 4. 사이토신 교정 활성이 제거된 최적의 아데닌 염기교정 유전자가위 선별

[0081] 상기 실시예 3에서 ABE_{max}Q-m의 경우 사이토신 교정 효과가 크게 감소했지만, ABE_{max}에 비해 아데닌 교정 효율 역시 감소하는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 아데닌에 대한 이러한 낮은 교정 효율을 보완하기 위하여, TadA7.10 대신 교정 활성을 향상시키기 위한 목적으로 개발된 TadA8e 및 TadA8.17을 이용하여 테스트를 진행하였다. 구체적으로 ABE8e, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m에 상기 실시예 3에서 확인된 D108Q 돌연변이를 도입하여 ABE8e-D108Q, ABE8e-V106W/D108Q 및 ABE8.17-D108Q-m을 제조하였고, 각각 ABE8eQ, ABE8eWQ, 및 ABE8sQ로 명명하였다. 이에 더하여 가장 최신 버전인 ABE8e-V106W에는 F149A 돌연변이를 도입하여 ABE8e-V106W/F149A를 제조하고 ABE8eWA로 명명하였다. 상기 제조된 모든 ABE 변이체들을 이용하여 총 4개의 내인성 표적 부위(FANCF, RNF2, ABLIM3 및 CSRN3P3에서)에 대하여 테스트를 진행한 후 고 처리량 염기서열 분석을 진행하였다.

[0082] 그 결과, 각각 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이 ABE8eQ, ABE8eWQ, ABE8sQ 및 ABE8eWA 변이체 모두 향상된 아데닌 교정 및 감소된 사이토신 교정 효율을 나타내었다. 특히, 도 5c의 모든 ABE 변이체 각각에 대하여 아데닌 교정 효율을 사이토신 교정 효율로 나눈 정확도 값을 비교한 그래프에서 볼 수 있는 바와 같이 ABE8eWQ와 ABE8eWA의 경우 교정 효율과 특이성 매우 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 도 6에 도시된 바와 같이 상기 변이체의 TadA8e가 갖는 V106W 및 D108Q 돌연변이가 시너지 효과를 발휘하여 D108Q 돌연변이가 TadA 단백질이 TC 모티프와 결합하는 것을 방해하는데에 큰 역할을 함을 나타낸다.

[0083] 다음으로, 모든 ABE 변이체의 ABE 매개 RNA 오프-타겟 교정 효율을 평가하였다. 이를 위해, 각 ABE 변이체를 HEK293T 세포로 형질감염시키고 4개의 대표적인 RNA 전사체 (CCNB1IP1, AARS1, PERP 및 TOPRS)에서 A에서 I로의 전환 빈도를 측정하고 고 처리량 염기서열 분석을 실시하였다.

[0084] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 이전에 개발된 ABE8e 및 ABE8.17-m 버전이 ABE_{max}에 비해 RNA 오프-타겟 효과가 높게 나타났으며, ABE8eW가 이전에 보고된 바와 같이 ABE8e에 비해 감소된 RNA 오프-타겟 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 ABE8eWA의 경우에는 RNA 오프-타겟 효과가 ABE8e와 유사한 정도로 나타났다.

[0085] ABE8eQ, ABE8eWQ 및 ABE8sQ는 RNA 오프-타겟 효과가 크게 감소하였으며, 이는 D108Q 돌연변이가 RNA 탈아미노화 활성을 효과적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다. D108Q는 RNA에 대한 TadA8e의 결합 친화도를 감소시킬 수 있지만 DNA에 대해서는 그렇지 않은데, D108의 카르복실기는 saTadA-RNA 구조에서 결합된 RNA의 2' 히드록실기와 수소 결합을 형성하기 때문이다.

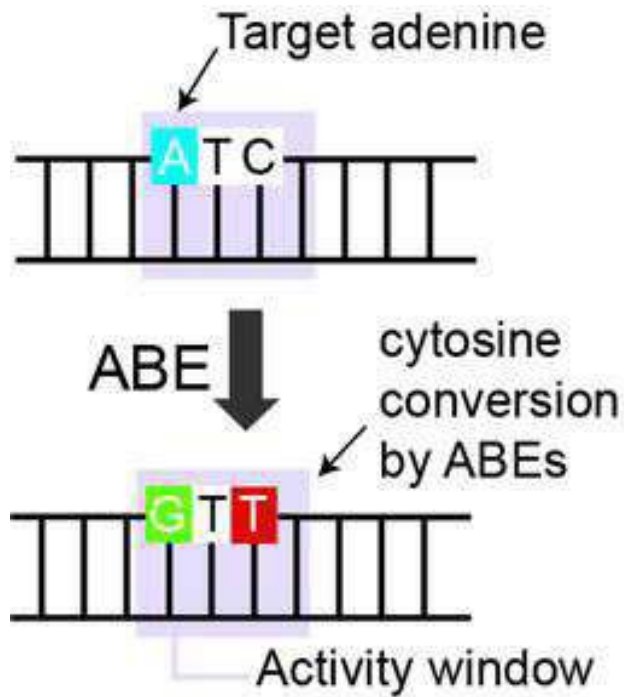
[0086] 종합하면, 상기 결과들은 D108Q가 사이토신 교정 및 RNA 탈아미노화 교정 효율을 모두 감소시키는 매우 중요한 돌연변이이며, ABE8eQ, ABE8eWQ 및 ABE8sQ가 ABE의 최적화된 버전이고, 이들 중 ABE8eWQ가 가장 효과적인 최적의 버전임을 보여준다.

[0087] 상기와 같은 결론을 뒷받침하기 위하여, 대조군 (nCas 처리군)과 본 발명의 ABE 변이체 중, ABE8e, ABE8eW, ABE8eWQ, ABE8s 및 ABE8sQ를 세포에 각각 처리한 다음 전체 mRNA 시퀀싱 분석을 수행한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, ABE8eWQ가 대조군과 가장 유사한 수준의 RNA deamination 효과를 보여주는 것을 확인하였으며, 본 발명의 변이체 중, ABE8eWQ, ABE8eWA 및 ABE8eW의 위치에 따른 아데닌 (도 9) 또는 사이토신 (도 10)의 교정 효과를 확인해본 결과, ABE8eWQ, ABE8eWA는 사이토신 교정 효과를 보이지 않으면서도, ABE8eW와 유사한 수준의 아데닌 교정효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

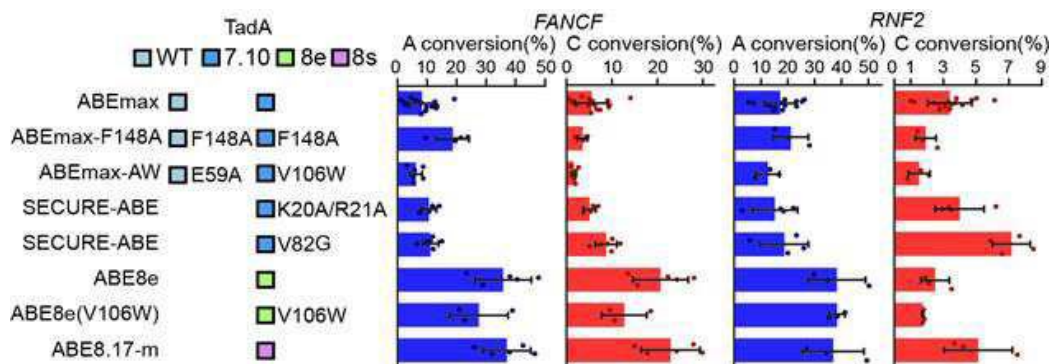
[0089] 상기와 같은 실험 결과를 통해 본 발명의 발명자들은 ABE8eWA의 경우 ABE8eWQ와 동일하게 가장 최신 버전인 ABE8e-V106W를 기반으로 제작된 것이지만 ABE8eWQ에 비해 아데닌 교정 효율은 가장 높으나 사이토신 교정 효율이 약간 남아있고 RNA 오프-타겟에 대한 효과도 여전히 남아있어, 가장 정확한 아데닌 염기교정 유전자기위는 ABE8eWQ인 것으로 판단하였다.

도면

도면1



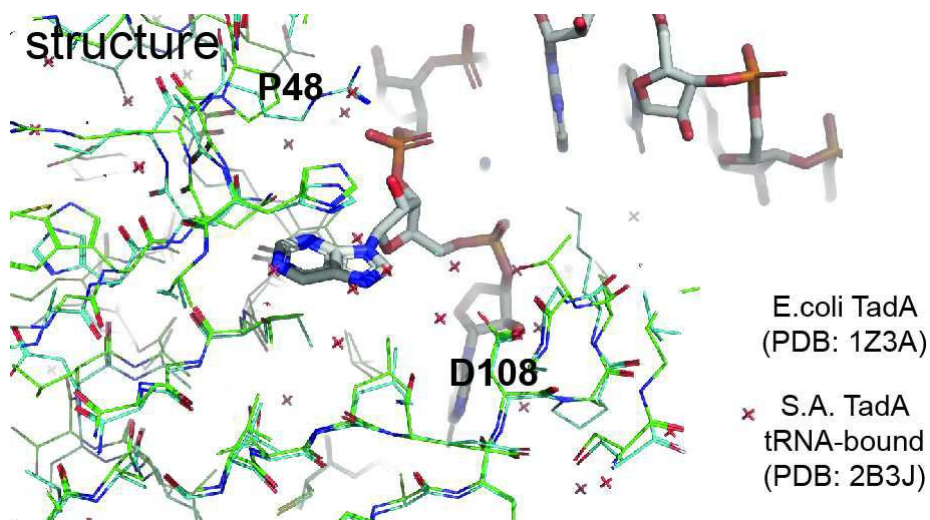
도면2



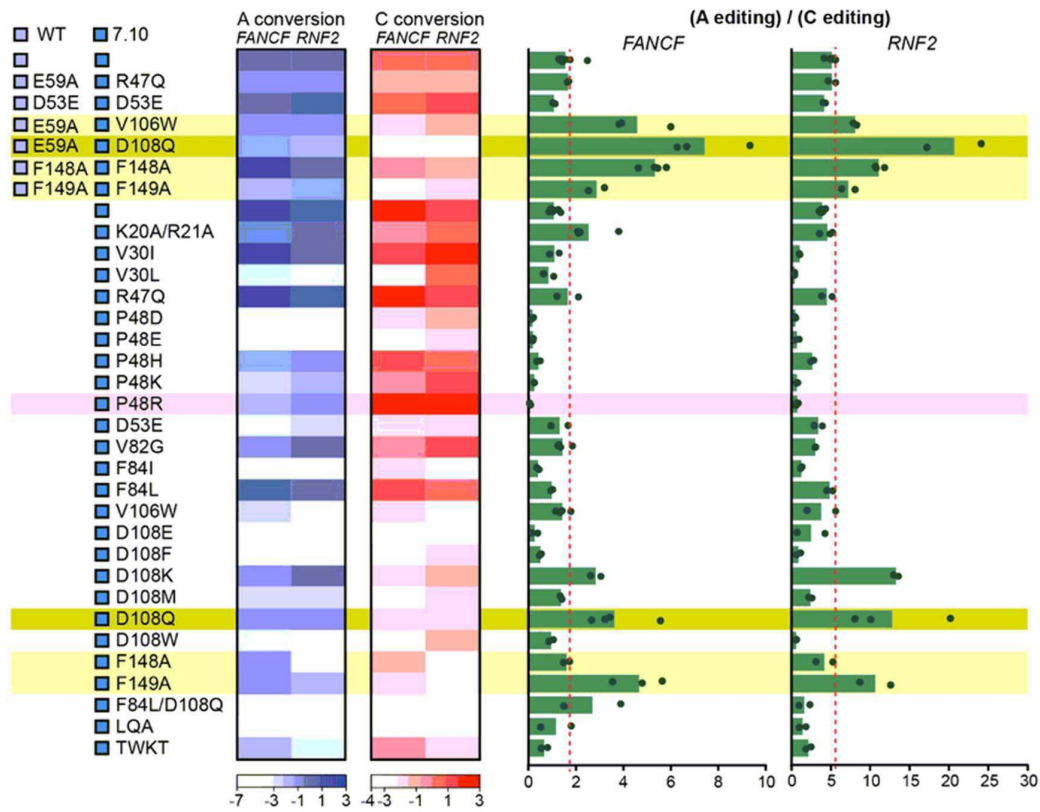
도면3a

		P48		D108	
TadA8e	40	IGEGWNRAIGLHD	--//--	VVFGVFN SKRGAA	114
TadA7.10	40	IGEGWNRAIGLHD	--//--	VVFGVFN AKTCAA	114
wtTadA	40	IGEGWNRPIGRHD	--//--	VVFGARD AKTCAA	114
saTadA	36	IARAHNLRETLLQ	--//--	VVYGADDPKGCCS	110
osTadA	42	IGKGFNLRRESIQT	--//--	VVYGASDPKAGCA	116
vsTadA	35	ISRHHNRREIDHD	--//--	VVYGSSDYKGCAY	109
cbTadA	52	IAEAANAPITHCD	--//--	VVFGATEPKAGML	126
asTadA	41	IGAGYNAPISLND	--//--	VVFGATEPKAGSL	116
ocTadA	35	VGTGYNVRELTQQ	--//--	VVFGADDPKAGCA	109
dfTadA	36	IARGYNRRRTIDKN	--//--	VVVGCMNPKAGCA	110
sxTadA	36	IARAHNLRESKKD	--//--	VVYGAKDPKGCCA	110
bfTadA	44	IGRGYNRRNTDKS	--//--	VVIGSRSQKSGCG	118
pgTadA	42	IASGENVREKSQE	--//--	VVYGATDPKAGCA	116
ssTadA	40	IGRGHAREELNQ	--//--	VVYGAAQKFCAA	114

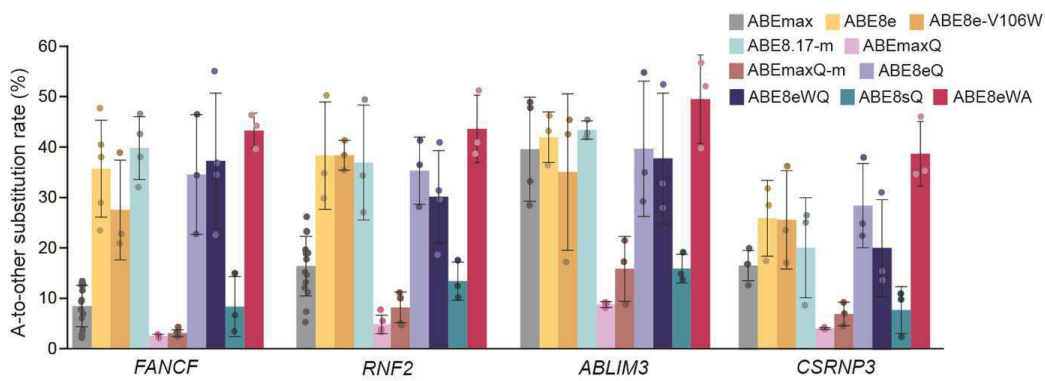
도면3b



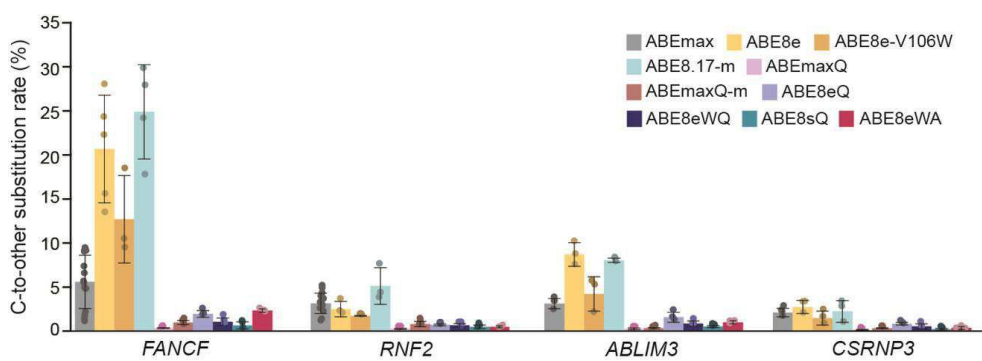
도면4



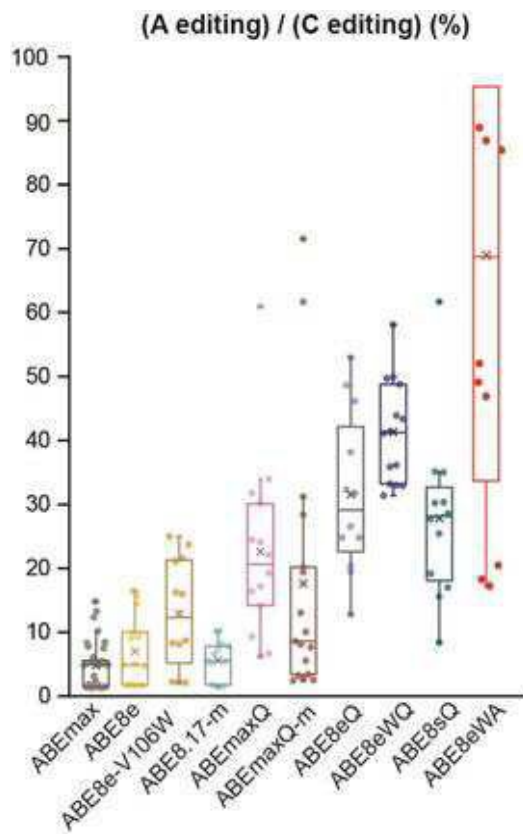
도면5a



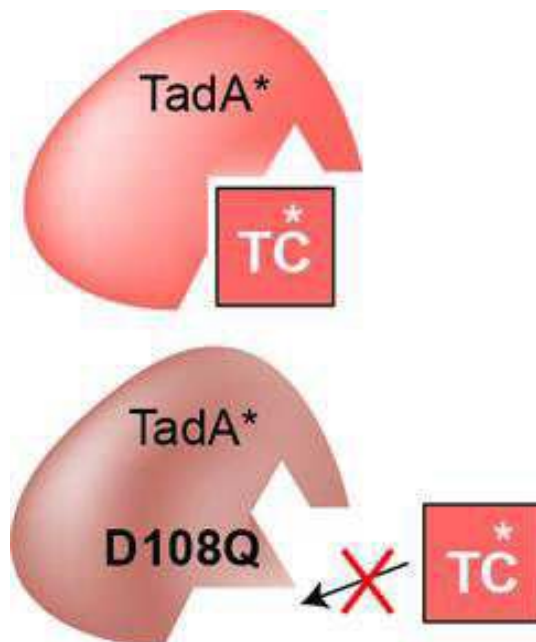
도면5b



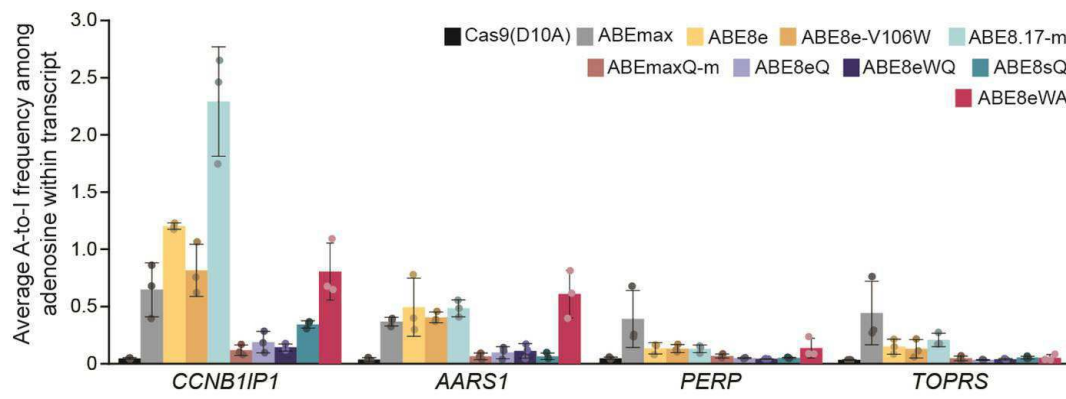
도면5c



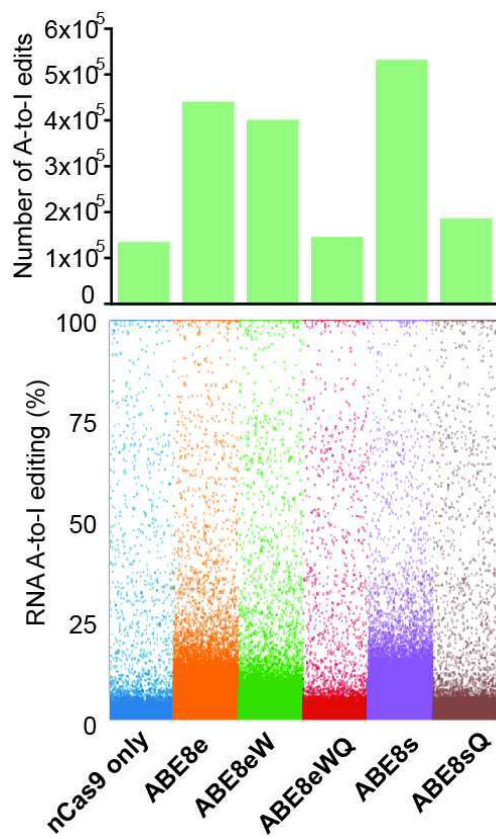
도면6



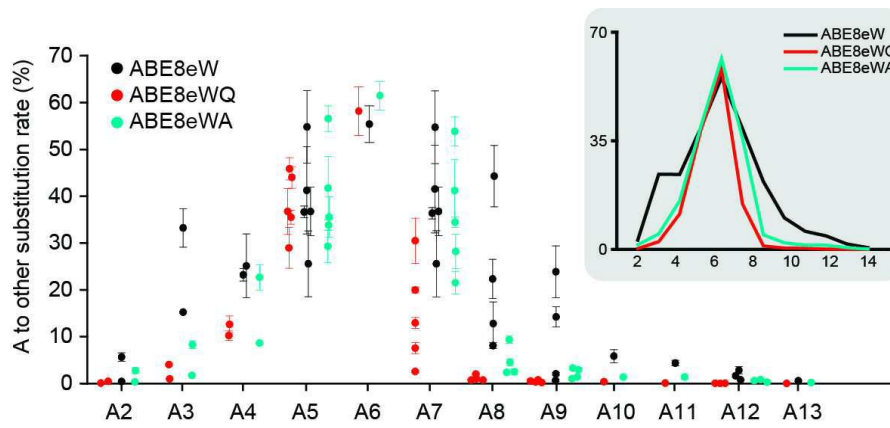
도면7



도면8



도면9



도면10

