(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021893
(43) 공개일자 2024년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6825 (2018.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6825 (2018.05)
C12N 15/635 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7001214
(22) 출원일자(국제) 2022년06월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/033459
(87) 국제공개번호 WO 2022/266117
국제공개일자 2022년12월22일
(30) 우선권주장
63/210,829 2021년06월15일 미국(US)
63/267,177 2022년01월26일 미국(US)

(71) 출원인
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
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
장 카이이
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 70 퍼시픽 스트리트
크라제스키 로한 네일
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 77 메사추세츠 애비뉴, 씨/오 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

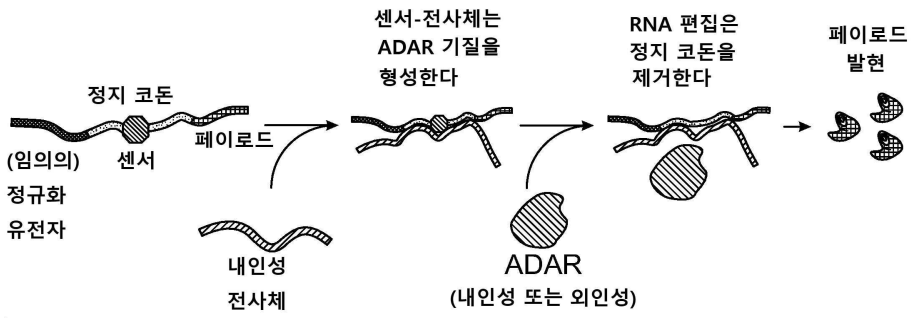
전체 청구항 수 : 총 94 항

(54) 발명의 명칭 **데아미나제 기반 RNA 센서**

(57) 요 약

생체내에서 RNA를 측정하고 특정 세포 유형을 조작하도록 설계된 시스템에 사용하기 위한 RNA 편집 도구가 본원에 개시된다. RNA 센서 시스템은 a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 여기서 상기 센서는 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질은 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하며; 상기 미스페어링은 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하고, 이 편집은 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있다. RNA 센서 시스템을 사용하여 리보핵산(RNA) 수준을 정량화하는 방법도 또한 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/78 (2013.01)
C12Y 305/04004 (2013.01)
(72) 발명자
아부데이예 오마르 오사마
미국, 메사추세츠 02141, 캠브리지, 49 브리스톨 스트리트
구텐베르크 조나단 에스.
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 8 리차드슨 스트리트
장 이판
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 415 메인 스트리트, 씨/오 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
첸, 페이
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 7 고든 플레이스
첸 시
미국, 메사추세츠 02120, 록스버리 크로싱, 9 위글스워스 스트리트
쿱 제레미 지.
미국, 메사추세츠 02145, 서머빌, 22 윌튼 스트리트

명 세 서

청구범위

청구항 1

RNA 센서 시스템(sensor system)으로서,

a) 정지 코돈(stop codon) 및 페이로드(payload)를 포함하는 단일 가닥(single-stranded) RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자(normalizing gene)를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고;

상기 센서가 ssRNA 표적(target)에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질(substrate)이 되는 이중 가닥(double-stranded) RNA(dsRNA) 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있고;

상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링(mispairing)을 포함하고;

상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템.

청구항 2

제1., 상기 미스페어링이 dsRNA 듀플렉스의 아데닌 대 시티딘 미스페어링을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미스페어링이 아데닌 대 시티딘 미스페어링을 포함하고, 상기 ADAR 데아미나제가 dsRNA 듀플렉스의 미스페어링에서 아데닌을 이노신으로 편집하는, RNA 센서 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 미스페어링을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 페이로드가 리포터 단백질(reporter protein), 전사 인자(transcription factor), 효소(enzyme), 유전자도입 단백질(transgene protein), 또는 치료용 단백질(therapeutic protein)을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 페이로드가 형광 리포터(fluorescent reporter)를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 페이로드가 EGFP 리포터 또는 루시퍼라제 리포터를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 페이로드가 카스파제를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 ADAR이 내인성 또는 외인성인, RNA 센서 시스템.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 ADAR이 변형된 ADAR인, RNA 센서 시스템.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 ADAR이 프로그래밍 가능한 A 대 I(G) 대체를 위한 RNA 편집(REPAIR) 분자, Cas13b-ADAR 융합(fusion) 분자, Cas13d-ADAR 융합 분자, Cas7-11-ADAR 융합 분자 및 MS2-ADAR 융합 분자, ADAR2의 데아미나제 도메인, 전장 ADAR2 또는 절단된 ADAR2를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 RNA 센서 시스템이 복수의 RNA 센서를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 13

셀 로직 시스템(cell logic system)으로서,

a) 상이한 ssRNA 표적에 상보적인 다수의 정지 코돈 및 하나 이상의 페이로드를 포함하는 ssRNA 센서를 포함하는 AND 게이트(gate)로서,

상기 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, AND 게이트; 및

b) 하나 이상의 상이한 RNA 표적에 상보적인 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 다수의 독립적인 ssRNA 센서를 포함하는 OR 게이트로서,

각 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, OR 게이트를 포함하는, 셀 로직 시스템.

청구항 14

셀 로직 시스템으로서,

a) 상이한 ssRNA 표적에 상보적인 다수의 정지 코돈 및 하나 이상의 페이로드를 포함하는 ssRNA 센서를 포함하는 AND 게이트로서,

상기 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, AND 게이트; 또는

b) 하나 이상의 상이한 RNA 표적에 상보적인 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 다수의 독립적인 ssRNA 센서를 포함하는 OR 게이트로서,

각 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, OR 게이트를 포함하는, 셀 로직 시스템.

청구항 15

리보핵산(RNA) 수준을 정량화하는 방법으로서,

a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서를 제공하는 단계로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단계; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 첨가하는 단계를 포함하고;

상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, 리보핵산(RNA) 수준을 정량화하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 미스페어링이 dsRNA 듀플렉스의 아데닌 대 시티딘 미스페어링을 포함하는, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 미스페어링이 아데닌 대 시티딘을 포함하고, 상기 ADAR 데아미나제가 dsRNA 듀플렉스에서 아데닌을 이노신으로 편집하는, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 하나 이상의 미스페어링을 포함하는, 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 페이로드가 리포터 단백질, 전사 인자, 효소, 유전자도입 단백질, 치료용 단백질, 또는 진단 검정에 사용하기 위한 항원 또는 에피토프를 포함하는, 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 ADAR이 내인성 또는 외인성인, 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 ADAR이 변형된 ADAR인, 방법.

청구항 22

RNA 센서 시스템으로서,

a) 적어도 제1 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고;

상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 제1 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 단일 가닥 RNA 센서가 하나 이상의 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 단일 가닥 RNA 센서가 제2 정지 코돈을 추가로 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 단일 가닥 RNA 센서가 제3 정지 코돈을 추가로 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 26

제1항 또는 제22항에 있어서, 상기 미스페어링이 표적 가닥 상의 CCA 및 센서 가닥 상의 TAG/UAG를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 27

제1항 또는 제22항에 있어서, 센서 가닥이 TAG/UAG 정지 코돈을 포함하지만, 표적 가닥 상의 CCA 코돈과 불일치하지 않는, RNA 센서 시스템.

청구항 28

제1항 또는 제22항에 있어서, 상기 센서 가닥이 ACA, ACT, ACC, ACG, TCA, TCT, TCC, TCG, GCA, GCT, GCC, GCG, CCA, CCT, CCC 및 CCG로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 표적 가닥 상의 코돈과 일치(match) 또는 불일치(mismatch)를 생성할 수 있는 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 29

RNA 센서 시스템으로서,

a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고;

상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능한 정지 코돈을 포함하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 TAG/UAG 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 31

제30항에 있어서, TAG/UAG 정지 코돈이 화학식 nCn을 갖고, 여기서 n은 임의의 뉴클레오티드이고 C는 시티딘인 코돈에서 ssRNA 표적과 dsRNA 듀플렉스를 형성하는, RNA 센서 시스템.

청구항 32

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 50nt 이상, 100nt 이상, 150nt 이상, 200nt 이상, 250nt 이상, 300nt 이상 또는 500nt 이상인, RNA 센서 시스템.

청구항 33

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 51nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 34

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 81nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 35

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 171nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 36

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 225nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 37

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 279nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 38

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 279nt보다 긴, RNA 센서 시스템.

청구항 39

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 원형 센서(circular sensor)인, RNA 센서 시스템.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 원형 센서가 롤링 서클 번역 센서(Rolling Circle Translation Sensor)인, RNA 센서 시스템.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 원형 센서가 일반 원형 센서(Regular Circular Sensor)인, RNA 센서 시스템.

청구항 42

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 2개의 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 43

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 3개의 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 44

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 2개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화되는, RNA 센서 시스템.

청구항 45

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 3개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화되는, RNA 센서 시스템.

청구항 46

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 적어도 하나의 항원항체결합력 결합 영역(avidity binding region)을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 47

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 적어도 3개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 48

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 적어도 5개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 49

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 적어도 7개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 50

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 7개 이상의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원항체결합력 결합 영역이 MS2 헤어핀(hairpin) 영역에 의해 분리되는, RNA 센서 시스템.

청구항 52

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 Cre 재조합효소(recombinase)를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 53

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 Cas 단백질을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 페이로드가 Cas9를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 55

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 전사 인자를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 56

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 페이로드 ADAR을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 57

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 세포 스트레스 반응(cellular stress response)을 위한 리포터인, RNA 센서 시스템.

청구항 58

제1항, 제22항 또는 제29항 중 어느 한 항의 RNA 센서 시스템, 및 전달 비히클(delivery vehicle)을 포함하는 조성물.

청구항 59

RNA 센서 시스템 및 지질 나노 입자를 포함하는 조성물로서, 상기 RNA 센서 시스템이

a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고;

상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고;

상기 기질이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능한 정지 코돈을 포함하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있고,

상기 RNA 센서 시스템이 지질 나노 입자에 캡슐화되는, 조성물.

청구항 60

특정 세포 또는 세포 유형을 사멸시키는 방법으로서, 상기 방법이 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서 또는 가이드를 공급하는 단계로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단계를 포함하고; 상기 페이로드가 자가 이량체화 카스파제(self-dimerizing caspase)이고, 상기 ssRNA 센서 또는 가이드가 ssRNA 표적에 결합하여 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있고, 상기 ssRNA 표적이 특정 세포 또는 세포 유형의 발현에서 풍부하게 되는, 특정 세포 또는 세포 유형을 사멸시키는 방법.

청구항 61

RNA 센서 시스템으로서,

a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 RNA 센서로서, 임의로 상기 RNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, RNA 센서; 및

b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고;

상기 센서가 RNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스 영역을 형성할 수 있고;

상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고;

상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 RNA 센서가 단일 가닥 RNA인, RNA 센서 시스템.

청구항 63

제61항에 있어서, 상기 RNA 센서가 하나 이상의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 도메인을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 64

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 표적이 단일 가닥 RNA인, RNA 센서 시스템.

청구항 65

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA가 하나 이상의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 도메인을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 66

제61항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 50nt 이상, 100nt 이상, 150nt 이상, 200nt 이상, 250nt 이상, 300nt 이상 또는 500nt 이상인, RNA 센서 시스템.

청구항 67

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 51nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 68

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 81nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 69

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 171nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 70

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 225nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 71

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 279nt인, RNA 센서 시스템.

청구항 72

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 279nt보다 긴, RNA 센서 시스템.

청구항 73

제61항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ssRNA 센서가 원형 센서인, RNA 센서 시스템.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 원형 센서가 롤링 서클 번역 센서(Rolling Circle Translation Sensor)인, RNA 센서 시스템.

청구항 75

제73항에 있어서, 상기 원형 센서가 일반 원형 센서인, RNA 센서 시스템.

청구항 76

제61항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 2개의 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 77

제61항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 3개의 정지 코돈을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 78

제61항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 2개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화되는, RNA 센서 시스템.

청구항 79

제61항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 3개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화되는, RNA 센서 시스템.

청구항 80

제61항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 적어도 하나의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 81

제61항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 적어도 3개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 82

제61항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 적어도 5개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 83

제61항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 적어도 7개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 84

제61항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA 센서가 7개 이상의 항원항체결합력 결합 영역을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 85

제80항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원항체결합력 결합 영역이 MS2 헤어핀 영역에 의해 분리되는, RNA 센서 시스템.

청구항 86

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 Cre 재조합효소를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 87

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 Cas 단백질을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 페이로드가 Cas9를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 89

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 전사 인자를 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 90

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 페이로드 ADAR을 포함하는, RNA 센서 시스템.

청구항 91

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 세포 스트레스 반응을 위한 리포터인, RNA 센서 시스템.

청구항 92

제61항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 센서 시스템, 및 전달 비히클.

청구항 93

제1항, 제22항, 제29항 또는 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ADAR이 ADAR2, ADAR1, ADAR1 p150, ADAR1 p110, ADAR2 R455G, ADAR2 R455G, ADAR2 S486T, ADAR2 T375G E488Q T490A, ADAR2 T375G, ADAR2 T375S, ADAR2 N473D, ADAR2 데아미나제 도메인, ADAR2 T490S, ADAR2 T490A, MCP-ADAR2 데아미나제 도메인, ADAR2 R455E, ADAR2 T375G T490A, ADAR2 E488Q, MCP-ADAR2 데아미나제 도메인 E488Q T490A, ADAR2 R510E, ADAR2 R455S, ADAR2 V351L 및 이들의 유도체 또는 변형된 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, RNA 센서 시스템.

청구항 94

제1항, 제22항, 제29항 또는 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ADAR이 RNA 센서 시스템이 사용될 수 있는 표적 세포에서 내인성으로 발현되는, RNA 센서 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 1월 26일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/267,177 및 2021년 6월 15일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/210,829의 우선권 이점을 주장한다. 이러한 출원 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 연방 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 미국 국립보건원(NIH)이 수여한 보조금 번호 5DP5OD024583하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0005] 핵산을 정밀하고 프로그래밍 가능한 방식으로 편집하는 능력은 최근 몇 년 동안 정교해졌다. 새로운 기술은 생체내에서 이러한 정밀 편집을 가능하게 하여 유전자형 수준에서 환자를 치료할 수 있는 가능성을 열어준다. 그러나, 유전 공학 또는 태깅 없이 생체내에서 RNA 수준을 측정하고 추적하는 실행 가능한 도구는 없다. 유전 공학은 변화를 측정할 수 있는 엄격한 관찰 센서 시스템이라기보다는 종종 게놈의 조작을 필요로 하며, 이는 발현과 전반적인 세포 활성에 대해 예상치 못한 결과를 가질 수 있다. 또한, 센서를 완전히 통합하기 위해 게놈 수준에서 조작은 유전자도입 유기체를 필요로 하며, 이는 많은 시나리오에서 실현 불가능한 접근법이다.

[0006] 최근의 발전으로 수많은 특정 세포 유형을 결정할 수 있게 되었지만, 이러한 세포를 추적하고 조작하는 능력은 여전히 부족하다. 본 개시내용은 생체내에서 RNA를 측정하고 특정 세포 유형을 조작하도록 설계된 시스템에 사용하기 위한 RNA 편집 도구에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시내용은 RNA 센서 시스템(sensor system)에 관한 것이다. 본 개시내용은 a) 정지 코돈(stop codon) 및 페이로드(payload)를 포함하는 단일 가닥(single-stranded) RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자(normalizing gene)를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 상기 센서가 ssRNA 표적(target)에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질(substrate)이 되는 이중 가닥(double-stranded) RNA(dsRNA) 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있고; 상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링(mispairing)을 포함하고; 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거하는, RNA 센서 시스템을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 개시내용은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서와 ssRNA 표적 사이의 미스페어링은 dsRNA 듀플렉스의 아데닌:시티딘 미스페어링을 포함한다.

[0009] 본 개시내용은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서와 ssRNA 표적 사이의 미스페어링은 아데닌:시티딘 미스페어링을 포함하고, ADAR 데아미나제는 dsRNA 듀플렉스의 미스페어링에서 아데닌을 이노신으로 편집한다. 하나의 구현예에서, RNA 시스템은 하나 이상의 미스페어링을 포함한다.

[0010] RNA 센서 시스템의 센서 가닥은 페이로드를 포함할 수 있으며, 여기서 페이로드는 리포터 단백질(reporter protein), 전사 인자(transcription factor), 효소(enzyme), 유전자도입 단백질(transgene protein), 또는 치료용 단백질(therapeutic protein)을 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하고, 여기서 페이로드는 형광 리포터(fluorescent reporter)를 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 페이로드는 EGFP 리포터 또는 루시퍼라제 리포터를 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 페이로드는 카스파제를 포함한다.

[0011] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ADAR은 내인성 또는 외인성이다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ADAR은 변형된 ADAR이다.

[0012] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ADAR은 프로그래밍 가능한 A 대 I(G) 대체를 위한 RNA 편집(REPAIR) 분자, Cas13b-ADAR 융합(fusion) 분자, Cas13d-ADAR 융합 분자, Cas7-11-ADAR 융합 분자, 및 MS2-ADAR 융합 분자, ADAR2의 데아미나제 도메인, 전장 ADAR2 또는 절단된 ADAR2를 포함한다.

[0013] 본 개시내용은 또한 복수의 RNA 센서를 포함하는 RNA 센서 시스템을 제공한다.

[0014] 본 개시내용은 또한 a) 상이한 ssRNA 표적에 상보적인 다수의 정지 코돈 및 하나 이상의 페이로드를 포함하는 ssRNA 센서를 포함하는 AND 게이트(gate)로서, 상기 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대

한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, AND 게이트; 및/또는 b) 다수의 독립적인 ssRNA 센서를 포함하는 OR 게이트로서, 상기 다수의 독립적 ssRNA 센서 각각이 하나 이상의 상이한 RNA 표적에 상보적인 정지 코돈 및 페이로드를 포함하고; 각 ssRNA 센서가 상이한 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, OR 게이트를 포함하는 셀 로직 시스템(cell logic system)을 제공한다. 본 개시내용은 또한 a) 상이한 ssRNA 표적에 상보적인 다수의 정지 코돈 및 하나 이상의 페이로드를 포함하는 ssRNA 센서를 포함하는 AND 게이트로서, 상기 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, AND 게이트; 또는 b) 하나 이상의 상이한 RNA 표적에 상보적인 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 다수의 독립적인 ssRNA 센서를 포함하는 OR 게이트로서, 각 ssRNA 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 각 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 각 정지 코돈 내의 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 하나 이상의 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, OR 게이트를 포함하는 셀 로직 시스템을 개시한다.

[0015] 본 개시내용은 a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서를 제공하는 단계로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단계; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 제공하는 단계를 포함하고; 상기 센서가 관심 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, 리보핵산(RNA) 수준을 RNA 센서 시스템으로 검출하거나 정량화하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 미스페어링은 dsRNA 듀플렉스의 아데닌:시티딘 미스페어링을 포함한다.

[0017] 본 개시내용은 RNA 센서 시스템으로 리보핵산(RNA) 수준을 검출하거나 정량화하는 방법을 제공하며, 여기서 미스페어링은 아데닌 대 시티딘을 포함하고, ADAR 데아미나제는 dsRNA 듀플렉스에서 아데닌을 이노신으로 편집한다. 본 개시내용은 RNA 센서 시스템을 사용하여 리보핵산(RNA) 수준을 검출하거나 정량화하는 방법을 제공하며, 여기서 RNA 센서 시스템은 하나 이상의 미스페어링을 포함한다.

[0018] 본 개시내용은 페이로드를 포함하는 RNA 센서 시스템으로 리보핵산(RNA) 수준을 검출하거나 정량화하는 방법을 제공하며, 여기서 페이로드는 리포터 단백질, 전사 인자, 효소, 유전자도입 단백질, 또는 치료용 단백질로 번역된다.

[0019] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ADAR은 내인성 또는 외인성이다. 일부 구현예에서, ADAR은 변형된 ADAR이다. 일부 구현예에서, ADAR은 센서가 사용될 수 있는 세포 유형에 내인성인 ADAR이다.

[0020] 본 개시내용은 또한 a) 적어도 제1 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 제1 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템을 제공한다.

[0021] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 단일 가닥 RNA 센서는 하나 이상의 정지 코돈을 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 단일 가닥 RNA 센서는 제2 정지 코돈을 추가로 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 단일 가닥 RNA 센서는 제3 정지 코돈을 추가로 포함한다.

[0022] 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 미스페어링은 표적 가닥 상의 CCA 및 센서 가닥 상의 TAG/UAG를 포함한다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 센서 가닥은 TAG/UAG 정지 코돈을 포함하지만 표적 가닥 상의 CCA 코돈과 불일치하지 않는다. 본 개시내용은 또한 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 센서 가닥은 ACA, ACT, ACC, ACG, TCA, TCT, TCC, TCG, GCA, GCT, GCC, GCG, CCA, CCT, CCC 및 CCG로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적 가닥 상의 코돈과 일치(match) 또는 불일치(mismatch)를 생성할 수 있는 정지 코돈을 포함한다.

[0023] 본 개시내용은 또한 a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 상기 센서가 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능한 정지 코돈을 포함하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 TAG/UAG 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, TAG/UAG 정지 코돈은 화학식 nCn을 갖고, 여기서 n은 임의의 뉴클레오티드이고, C는 시티딘인 코돈에서 ssRNA 표적과 dsRNA 듀플렉스를 형성한다.

[0024] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서는 50nt 이상, 100nt 이상, 150nt 이상, 200nt 이상, 250nt 이상, 300nt 이상 또는 500nt 이상이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 51nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 81nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 171nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 225nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 279nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 279nt보다 길다.

[0025] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서는 원형 센서(circular sensor)이다. 일부 구현예에서, 원형 센서는 롤링 서클 번역 센서(Rolling Circle Translation Sensor)이다. 일부 구현예에서, 원형 센서는 일반 원형 센서(Regular Circular Sensor)이다.

[0026] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서는 2개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 ssRNA 센서는 3개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 ssRNA 센서는 2개의 정지 코돈을 포함하고, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화된다. 일부 구현예에서, 상기 ssRNA 센서는 3개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화된다.

[0027] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서는 적어도 하나의 항원항체결합력 결합 영역(avidity binding region)을 포함한다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 적어도 3개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 적어도 5개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 적어도 7개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 7개 이상의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원항체결합력 결합 영역은 MS2 헤어핀 영역(hairpin region)에 의해 분리된다.

[0028] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 페이로드는 Cre 재조합효소(recombinase)를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 전사 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 페이로드 ADAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 세포 스트레스 반응(cellular stress response)을 위한 리포터이다.

[0029] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템, 및 전달 비히클(delivery vehicle)을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 RNA 센서 시스템 및 지질 나노입자를 포함하며, 여기서 상기 RNA 센서 시스템은 a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 상기 센서는 ssRNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 형성할 수 있고; 상기 기질은 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능한 정지 코돈을 포함하고, 이 편집은 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있으며, 상기 RNA 센서 시스템은 지질 나노입자에 캡슐화된다.

[0030] 본 개시내용은 또한 특정 세포 또는 세포 유형을 사멸시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 정지 코돈

및 페이로드를 포함하는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서 또는 가이드로서, 임의로 상기 ssRNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서 또는 가이드를 공급하는 단계를 포함하고; 상기 페이로드는 자가 이량체화 카스파제(self-dimerizing caspase)이고, 상기 ssRNA 센서 또는 가이드는 ssRNA 표적에 결합하여 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있고, 상기 ssRNA 표적은 특정 세포 또는 세포 유형의 발현에서 풍부해진다.

[0031] 본 개시내용은 또한 a) 정지 코돈 및 페이로드를 포함하는 RNA 센서로서, 임의로 상기 RNA 센서가 정규화 유전자를 추가로 포함하는, RNA 센서; 및 b) RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 데아미나제를 포함하고; 상기 센서가 RNA 표적에 결합하여 ADAR 데아미나제에 대한 기질이 되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스 영역을 형성할 수 있고; 상기 기질이 정지 코돈 내에 미스페어링을 포함하고; 상기 미스페어링이 ADAR 데아미나제에 의해 편집 가능하며, 이 편집이 페이로드의 번역 및 발현을 가능하게 하도록 정지 코돈을 효과적으로 제거할 수 있는, RNA 센서 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 단일 가닥 RNA이다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 하나 이상의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 표적은 단일 가닥 RNA이다. 일부 구현예에서, RNA는 하나 이상의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 도메인을 포함한다.

[0032] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 RNA 센서는 50nt 이상, 100nt 이상, 150nt 이상, 200nt 이상, 250nt 이상, 300nt 이상 또는 500nt 이상이다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 51nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 81nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 171nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 225nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 279nt이다. 일부 구현예에서, ssRNA 센서는 279nt보다 길다.

[0033] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 ssRNA 센서는 원형 센서이다. 일부 구현예에서, 원형 센서는 롤링 서클 번역 센서이다. 일부 구현예에서, 원형 센서는 일반 원형 센서이다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 2개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 3개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 2개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화된다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 3개의 정지 코돈을 포함하며, 여기서 하나의 정지 코돈만이 ADAR 편집을 위해 표적화된다.

[0034] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 RNA 센서 시스템을 제공하며, 여기서 RNA 센서는 적어도 하나의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 적어도 3개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 적어도 5개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 적어도 7개의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 7개 이상의 항원항체결합력 결합 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원항체결합력 결합 영역은 MS2 헤어핀 영역에 의해 분리된다.

[0035] 일부 구현예에서, 페이로드는 Cre 재조합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 전사 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 페이로드 ADAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 세포 스트레스 반응을 위한 리포터이다.

[0036] 일부 구현예에서, ADAR은 ADAR2, ADAR1, ADAR1 p150, ADAR1 p110, ADAR2 R455G, ADAR2 R455G, ADAR2 S486T, ADAR2 T375G E488Q T490A, ADAR2 T375G, ADAR2 T375S, ADAR2 N473D, ADAR2 데아미나제 도메인, ADAR2 T490S, ADAR2 T490A, MCP-ADAR2 데아미나제 도메인, ADAR2 R455E, ADAR2 T375G T490A, ADAR2 E488Q, MCP-ADAR2 데아미나제 도메인 E488Q T490A, ADAR2 R510E, ADAR2 R455S, ADAR2 V351L 및 이들의 유도체 또는 변형된 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, ADAR은 RNA 센서 시스템이 사용될 수 있는 표적 세포에서 내인성으로 발현된다

도면의 간단한 설명

[0037] **도 1**은 ADAR 기술을 활용하는 RNA 센서가 어떻게 새로운 유전자 출력을 제공하는지 보여주는 그래픽 도이다. 센서 RNA는 임의의 마커 단백질, 정지 코돈(빨간색 팔각형)이 있는 가이드 RNA 영역, 및 다운스트림 페이로드 단백질을 함유한다. 표적 RNA와의 센서 결합은 A-C 불일치가 있는 듀플렉스를 형성하며, 이는 ADAR 단백질(갈색)에 의한 RNA 편집을 위한 기질 역할을 한다. 예를 들어, RNA 편집은 UAG 정지 코돈을 UIG로 변환하여 페이로드(녹색 단백질)의 번역을 허용할 수 있다.

도 2a는 이중 전사체 ADAR 센서 설계의 그래픽 도이다. 루시퍼라제 이중 전사체 ADAR 센서는 구성적 발현하의

정규화 단백질과 ADAR 센서 제어하의 페이로드 단백질을 함유한다. 비율 배수 변화(ratio fold change)는 정규화된 센서 활성화(gluc/cluc)를 계산한 다음 표적 부재하의 비율 값으로 정규화하여 계산할 수 있다. 표적은 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 외인성 형질감염을 통해 전달될 수 있다. 센서는 내인성 ADAR을 모집하여 표적 EGFP 전사체를 감지하거나 외인성으로 전달된 ADAR을 활용하여 향상된 민감도로 표적 전사체를 감지할 수 있다. **도 2b**는 보충 ADAR의 존재 또는 부재하에 eGFP 플라스미드 또는 대조군 플라스미드뿐만 아니라 eGFP 인식 센서 가닥으로 형질감염된 HEK293FT 세포에서 루시퍼라제 값의 활성화의 배수 증가 비교의 그래픽 도이다. **도 2c**는 보충 ADAR의 존재 또는 부재하에 비표적 센서, 표적 센서 또는 구성적 활성 플라스미드의 루시퍼라제 값을 비교하는 그래픽 도이다. **도 2d**는 표적 센서, 비표적 센서 및 구성적 활성 플라스미드에서 UAG 정지 코돈의 편집을 정량화하는 차세대 서열분석 결과의 그래픽 도이다.

도 3a는 제2 형광 단백질(mNeon)을 제어하는 ADAR 센서 가이드의 상류에 구성적으로 발현되는 정규화 형광 단백질(mCherry)을 함유하는 단일 전사체 설계(single transcript design)를 갖는 형광 ADAR 센서를 보여주는 개략도이다. 단일 전사체에서 이중 형광으로 인해, 비기능적 eGFP는 이 형식으로 사용해야 한다. **도 3b**는 표적 센서 또는 비표적 센서, 비기능적 eGFP로 보충 ADAR의 존재 또는 부재하에 형질감염된 HEK293FT 세포의 일련의 대표적인 이미지이다. **도 3c**는 형광을 측정하여 mNeon 활성화의 배수 증가의 정량화이다. **도 3d**는 비표적 센서와 표적 센서 모두의 보충 ADAR의 존재하에 UAG 중지 코돈의 편집을 정량화하는 차세대 서열분석 결과의 그래픽 도이다.

도 4는 루시퍼라제 발현(**a**)과 HEK293FT 세포에서 음성 대조군과 비교한 루시퍼라제 발현의 배수 증가(**b**)의 그래픽 도이다. 비율 배수 변화는 정규화된 센서 활성화(gluc/cluc)를 계산한 다음 표적의 부재하의 비율 값으로 정규화하여 계산할 수 있다. (**a**) Gluc 루시퍼라제 유전자의 발현은 EGFP 또는 음성 대조군 스크램블 서열(음성 대조군)을 표적으로 하는 두 개의 별개의 가이드 가닥(설계 2 및 설계 4)이 도입된 HEK293FT 세포에서 정량화했다. (**b**) 음성 대조군 가이드 가닥과 비교하여 EGFP 발현의 증가를 정량화했다.

도 5는 내인성 ADAR2(도 3, 파란색 막대), 외인성으로 공급된 ADAR2의 데아미나제 도메인에 의해 보충된 내인성 ADAR2(ADAR2dd; 도 2, 흰색 막대)의 존재하에 또는 ADAR2의 데아미나제 도메인에 융합된 촉매적으로 비활성 Cas13b 효소를 발현하는 융합 작제물(dPspCas13b-ADAR2dd; 도 2, 빨간색 막대)의 존재하에 EGFP 전사체를 표적으로 하는 실험 가이드 가닥 1-4의 루시퍼라제 발현 증가의 그래픽 도이다. 모든 배수 증가는 음성 대조군 역할을 하는 EGFP를 표적으로 하지 않도록 설계된 스크램블 가이드와 관련이 있다.

도 6은 ADAR 변이체와 촉매 도메인 돌연변이 스크린의 시각적 묘사이다. (**a**) 왼쪽에서 오른쪽으로 ADAR1p150, ADAR1p110, ADAR2 및 MS2 코트 단백질(MCP)-ADAR 융합 단백질(MCP-ADAR)을 포함하여 테스트된 상이한 ADAR의 개략도. fl = 전장. DD = 데아미나제 도메인. 촉매 도메인 돌연변이는 개략도에 도시되지 않았으며; 모두 데아미나제 도메인에 있다. (**b**). 외인성으로 형질감염된 iRFP 및 상이한 ADAR 변이체의 존재하에 외인성으로 형질감염된 센서의 활성화를 보여주는 막대 그래프. 표적에 걸쳐 스크리닝을 위해 선택된 ADAR 변이체는 표적의 존재하 및 부재하에 TAG 정지 코돈의 TIG로의 변환을 보여주는 RNA 서열분석 데이터와 함께 빨간색으로 표시된다. 오차 막대는 n = 3 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 eGFP 및 iRFP 표적에 의한 ADAR 센서의 활성화의 그래픽 표현이다. (**a**) 69nt iRFP 센서에서 ADAR 변이체의 테스트. 표시된 배수 변화는 표적 부재하의 비율 값에 의해 나누어진 표적 존재하의 형광 비율 값(mNeon/mCherry)을 나타낸다. (**b**) 도 7a에 표시된 데이터에 대한 비정규화된 mNeon/mCherry 형광 비율 값. (**c**) 51nt eGFP 센서에서 ADAR 변이체의 테스트. 표시된 배수 변화는 표적 부재하의 비율 값으로 나뉘어진 표적 존재하의 형광 비율 값(mNeon/mCherry)을 나타낸다. (**d**) 도 7c에 표시된 데이터에 대한 비정규화된 mNeon/mCherry 형광 비율 값. 오차 막대는 n = 3 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 (**a**) MCP-ADAR2dd 외인성 보충, (**b**) ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, (**c**) ADAR2 외인성 보충 및 (**d**) 외인성 ADAR 보충 없음에 대한 +표적 그룹과 -표적 그룹의 센서 패널의 정지 코돈에서 편집 속도의 그래픽 묘사이다.

도 9는 HEK293FT 세포를 ADAR p150과 표적 전사체 및 표적 감지 ADAR 센서 작제물을 각각 y축과 x축에 표시된 조합으로 발현하는 플라스미드로 형질감염시킨 실험의 결과를 나타내는 히트맵이다. 표시된 데이터는 - 표적(pUC19) 조건으로 나누어진 + 표적에서의 형광 비율(mNeon/mCherry)로서 계산된 배수 변화이다. 모든 조건은 n = 3 기술적 복제본의 데이터를 나타낸다.

도 10(**a**) 각각의 RNA 센서와의 조합으로 4개의 상이한 표적에 대해 스크리닝된 선택된 ADAR 변이체. 히트 맵의

숫자는 비율 배수 변화를 나타낸다. 모든 조건은 n = 3 기술적 복제본으로부터의 데이터를 나타낸다. (**b**) ADAR1 p150에 대한 뉴로펩티드 Y(NPY) 표적에 대한 대표적 이미지가 표시된다. 세포는 이미지 주위에 나열된 조합으로 NPY 센서, ADAR 변이체 및 표적으로 형질감염시켰다. 10배 배율로 HEK293 세포의 공초점 현미경 검사를 통해 수득되고 디지털로 4배 강화된 이미지 데이터.

도 11은 HEK293FT 세포에서 테스트했을 때 표적과 ADAR 센서 조합에 대한 정규화된(**a, c, e, g**) 형광 비율과 비정규화된(**b, d, f, h**) 형광 값의 그래픽 도이다. 테스트된 표적은 iRFP(**a, b**), eGFP(**c, d**), 뉴로펩티드 Y(**e, f**) 및 dCas9(**g, h**)였다. (**a, c, e, g**): 각 표적 및 센서 조합에 대해 - 표적 조건으로 정규화된 + 표적 조건을 나타내는 센서 형광 비율(mNeon/mCherry) 배수 변화. (**b, d, f, h**): 각 센서 및 상이한 ADAR 변이체와의 표적 조합에 대한 비정규화된 mNeon/mCherry 형광 비율. iRFP 및 EGFP 표적의 경우, UAG에서 UIG로의 변환을 위한 RNA 센서의 차세대 서열분석 데이터. 편집 %는 A->I 편집된 판독치 %를 나타낸다. 모든 조건은 n = 3 기술적 복제본의 데이터를 나타낸다.

도 12는 표적 부재하(**도 12a**) 또는 표적 존재하(**도 12b**)에 도 10b에 표시된 ADAR p150 이미지에 대한 삽입물(insets)이 있는 전체 10배 이미지의 대표적 이미지이다. 스케일 막대는 100㎛이다.

도 13은 (**a**) MCP-ADAR2dd 외인성 보충, (**b**) ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, (**c**) ADAR2 외인성 보충 및 (**d**) 외인성 ADAR 보충 없음에 대한 +표적 그룹과 -표적 그룹에서 센서 패널의 정규화된 루시퍼라제 값의 그래픽 비교이다.

도 14는 IL6에서 20ng의 형질감염된 테트라사이클린 유도성 인간 IL6 도입유전자에 대한 외인성 보충 MCP-ADAR2dd 대 IL6 표적 센서의 적정의 히트맵이다. 배수 변화는 +표적 그룹과 -표적 그룹 사이의 정규화된 루시퍼라제 비율을 나타낸다.

도 15는 EGFP를 특이적으로 표적으로 하지 않도록 설계된 스크램블된 가이드 가닥과 비교하여 EGFP로 표적화된 가이드 가닥 1 및 2에 대한 루시퍼라제 발현의 배수 증가의 그래픽 도이다. 각 가이드 가닥을 HEK293T 세포에 도입했다. 그런 다음, 세포를 ADAR2의 데아미나제 도메인(프로그래밍 가능한 A 대 I(G) 대체를 위한 RNA 편집(REPAIR)) 또는 촉매적 비활성 버전(REPAIR K370A)에 융합된 Cas13b 효소를 사용하여 테스트했다. 가이드 가닥은 내인성 ADAR2만을 함유하는 세포(도 15, 파란색 막대), 내인성 ADAR2와 외인성 촉매적 비활성 REPAIR 분자를 함유하는 세포(REPAIR K370A; 도 15, 흰색 막대) 또는 촉매 활성 REPAIR 분자를 함유하는 세포(REPAIR; 도 15, 빨간색 막대)에서 테스트했다.

도 16은 HEK293FT 세포에서 테스트했을 때 루시퍼라제 활성화의 배율 증가를 나타내는 히트맵(흰색, 최저 배수 증가 대 진한 파란색, 최고 배수 증가)이다. y-축은 EGFP를 표적으로 하는 상이한 길이 및 불일치의 여러 가지 상이한 설계를 갖는 가이드 가닥을 나타낸다. x-축은 테스트된 외인성 ADAR 분자를 나타낸다(없음 = 내인성만, ADAR2fl = ADAR2 전장, REPAIR = ADAR2의 데아미나제 도메인에 융합된 Cas13b 효소; MS2-ADAR2dd = ADAR2dd에 융합된 MS2 결합 단백질; dDisCas7-11-ADAR2dd = ADAR2의 데아미나제 도메인에 융합된 촉매적 비활성 Cas7-11).

도 17 (a)는 iRFP 표적 전사체에 대해 스크리닝된 상이한 길이의 센서를 보여주는 개략도이다. **(b)** 센서 길이가 증가함에 따라 증가하는 센서 활성화를 보여주는 막대 그래프. 센서 활성화는 각 센서에 대해 표적 존재하의 정규화된 형광(mNeon/mCherry) 값이 표적 부재하의 정규화된 형광(mNeon/mCherry) 값으로 나뉜다는 것을 나타낸다. **(c)** 분획 mNeon 양성 세포는 사전 정의된 임계값보다 높은 발현을 갖는 세포의 비율을 나타낸다. 모든 조건은 n = 3 기술적 복제본으로부터의 데이터를 나타낸다.

도 18 (a) 가이드 길이 69, 249 및 600nt의 iRFP 표적 ADAR 센서에 대한 형광 세포 분석과 유사한 단일 세포 이미지 분석. 히스토그램은 +iRFP(파란색) 및 -iRFP(분홍색) 표적 조건에 대해 모든 세포에 걸쳐 mNeon 발현의 집단 밀도를 보여준다. 점선은 개별 세포를 mNeon(+) 또는 mNeon(-)으로 게이팅하는 모든 조건에 걸쳐 일정한 강도 임계값을 보여준다. 컬러 상자는 +iRFP(파란색) 및 -iRFP(분홍색) 표적 조건에 대한 % mNeon 양성 세포를 나타낸다. (**b**) (a)에 대한 대표적 이미지가 표시된다. 세포는 이미지 주위에 나열된 조합으로 iRFP 표적, ADAR p150 및 상이한 ADAR 센서 가이드 길이로 형질감염시켰다. 스케일 막대, 100미크론

도 19(a-b)는 도 18b에 도시된 이미지에 대한 삽입물이 있는 전체 10배 이미지의 대표적 이미지이다. 스케일 막대는 100㎛이다.

도 20은 일시적으로 형질감염된 테트라사이클린 유도성 인간 IL6 도입유전자가 있는 IL6 표적 센서에서 상이한

외인성 보충 ADAR 변이체의 그래픽 비교이다.

도 21(a-d)는 **(a)** MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) 외인성 보충, **(b)** ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, **(c)** ADAR2 외인성 보충, **(d)** 외인성 ADAR 보충 없음에 대한 +표적 그룹과 -표적 그룹의 센서 패널의 정규화된 루시퍼라제 값을 나타내는 일련의 그래픽 도이다.

도 22는 HEK293 세포의 내인성 ADAR1, 외인성 보충 ADAR1 p150 이소형, 전장 ADAR2 또는 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)를 갖는 인간 IL6 표적에 대한 정상 가이드를 함유하는 센서와 다중 결합 부위 및 MS2 헤어핀 루프를 함유하는 가이드 사이의 비교 그래픽 도이다. 배수 변화는 -표적 조건에 대한 +표적 조건의 정규화된 루시퍼라제 값(Gluc/Cluc)으로 계산된다.

도 23은 MS2 헤어핀 루프와 결합력 영역이 있는 ADAR 센서 조작의 시각적 표현이다. MS2 헤어핀 루프와 결합력의 첨가는 ADAR 센서의 감도와 동적 범위를 향상시킨다.

도 24는 결합력 가이드 영역 사이에 5nt 간격을 둔 3개의 결합력 ADAR 센서의 단계별 생성의 개략도이다.

도 25 (a)는 표적 영역 외부의 다양한 링커 길이의 개략도이다. **(b)**는 결합력 영역 사이의 링커 길이의 효과의 그래픽 표현이다. IL6에 대한 MS2 헤어핀 연결-5 결합력 센서의 결합력 영역 사이의 5nt, 30nt, 50nt의 링커 길이를 테스트했다.

도 26 (a)는 이중 및 단일 정지 코돈 결합력/MS2 헤어핀 센서의 개략도이다. **(b)**는 일반 MS2 헤어핀 연결된 7개 결합력 센서와 마지막 결합력 영역 내부에 3' 다운스트림 정지 코돈을 삽입한 이중 정지 코돈 7개 결합력 센서 사이의 센서 배수 활성화의 비교이다.

도 27 (a)는 나이브("긴") 센서에 대한 결합력 센서에 대한 배경 대 활성화의 비교이다. **도 27 (b)**는 결합력 센서 대 나이브("긴") 센서에 대한 배수 변화 대 배경 루시퍼라제 값의 산점도(scatter plot)이다.

도 28(a)는 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) 및 ADAR1 p150에 걸쳐 5개의 결합 부위 결합력 센서 대 7개의 결합 부위 결합력 이중 정지 코돈 센서 사이의 비교를 보여주는 막대 플롯이다. **도 28(b)**는 7개 결합 부위 결합력 단일 정지 코돈 대 7개 결합력 이중 정지 코돈 센서의 활성화 및 배경 신호 사이의 비교를 보여주는 막대 플롯이다.

도 29는 나이브 51bp 센서, 3개의 결합력 및 5개의 결합력 센서 설계 사이의 16가지 가능한 불일치 모두에 대한 표적 불일치 허용 오차의 비교이다. (16개의 표적은 일반 CCA로부터 5' 또는 3' 뉴클레오티드 변화를 포함한다). **(a)**는 불일치 허용 오차의 개략적 표현이다. **(b)**는 16개의 표적 불일치(파란색)에 걸쳐 3개의 센서 설계 모두의 로그 배수 활성화와 네이티브 CCA 표적(빨간색)에 대한 상이한 표적 불일치의 정규화된 허용 오차의 log10을 보여주는 히트맵이다.

도 30은 나이브 51bp 센서, 삼중 결합 부위 센서, 및 5개의 결합 부위 센서 사이의 각 표적 불일치 조합 내의 센서 설계의 정규화된 선호도를 나타내는 히트맵이다.

도 31 (a)는 원형 센서의 생성 및 활성화의 시각적 표현이다. 일반 원형 센서는 시험관내 자가 순환을 위해 U6 프로모터에 의해 구동되는 트위스터 리보자임 백본으로 생성된다. 센서-hibit 태그의 자가 순환은 포유류 세포 RtcB 리가제를 활용한다. 원형 센서의 롤링 서클 번역 버전은 hibit 단백질의 C-말단에서 정지 코돈을 결실시키고 T2A 펩티드를 삽입하여 원형 방식으로 리보솜 번역초과(readthrough)를 허용함으로써 만들어진다. **(b)** 50nt 내지 120nt 사이의 다양한 길이의 센서를 유전자도입 표적(인간 IL6) 유도시 센서 활성화 배수 변화에 대해 비교한다.

도 32 (a)는 평가된 RNA 변형의 개략도이다. (b) mRNA 센서 형질감염 24시간 전에 플라스미드 일시적 형질감염에 의해 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)를 보충했을 때 HEK293FT 세포에서 IL6 도입유전자 발현을 검출하는 합성 mRNA ADAR 센서의 상이한 mRNA 변형을 비교한 히트맵. (c) 센서 형질감염시 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) mRNA를 보충했을 때 HEK293FT 세포에서 IL6 도입유전자 발현을 검출하는 합성 mRNA ADAR 센서에 대한 상이한 mRNA 변형을 비교하는 히트맵.

도 33은 HEK293FT 세포에서 EGFP의 발현(도 33a, 6b)과 GFP 발현의 배수 증가(도 33c)를 묘사하는 그래픽 도이다. EGFP 발현은 구성적이었거나 독시사이클린 유도성 EGFP 작제물을 사용하여 구배로서 발현되었다. 그런 다음, HEK203T 세포를 8ng/mL 내지 200ng/mL 범위의 독시사이클린 농도에 노출시켰다.

도 34는 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 있는 EGFP를 표적으로 하는 가이드 가닥 및 전장-ADAR2에 동

시에 노출된 HEK293FT 세포에서 독시사이클린 용량의 함수로서 가이드 가닥 1(a) 및 가이드 가닥 3(b)의 용량 의존적 루시퍼라제 활성을 묘사하는 그래픽 도이다.

도 35는 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 있는 EGFP를 표적으로 하는 가이드 가닥 및 전장-ADAR2에 동시에 노출된 HEK293FT 세포에서 GFP 형광의 함수로서 가이드 가닥 1(a) 및 가이드 가닥 3(b)의 루시퍼라제 활성을 묘사하는 그래픽 도이다.

도 36은 테트라사이클린 유도성 IL6 및 안정한 렌티바이러스 통합의 조합된 치료 결과의 시각적 표현이다. (**b**) 이어서, 이중 정지 코돈 7개 결합력 IL6 센서를 사용하여 IL6의 상대적 발현을 정량화하고, 상응하는 루시퍼라제 배수 변화를 정량적 중합효소 연쇄 반응(QCPR)으로 검출된 IL6 발현의 Cq 값에 대해 플롯팅한다.

도 37은 이중 정지 코돈 7개 결정력 IL6 센서가 광범위한 동적 범위로 IL6의 상대적 발현을 정량화하는 데 유용하다는 것을 나타내는 산점도이다. 표적 발현 범위는 HEK293FT 세포에서 테트라사이클린 유도성 IL6의 일시적 과발현과 안정한 렌티-바이러스 통합된 테트라사이클린-IL6 카세트의 조합을 통해 생성된다. 기저 상태에 대한 ADAR 센서 배수 변화는 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)에 의해 결정된 IL6 유전자 발현 변화에 대해 플롯팅한다.

도 38은 qPCR 검출된 유전자 발현 배수 변화에 대한 센서 활성화 배수 변화에 대한 선형 회귀를 나타내는 산점도이다.

도 39는 도 38과 상이한 IL6 유전자 발현 수준에 걸쳐 센서의 UAG 정지 코돈에서 아데노신의 상응하는 편집이다.

도 40 (a)는 AND 게이트의 개략적 표현이다. (**b**)는 OR 게이트의 개략적 표현이다. (**c**)는 IL6 및 EGFP 표적 유도의 4가지 조합 모두에 걸쳐 나이브 51nt 가이드 AND 게이트 센서와 5개의 결합력 가이드 AND 게이트 센서의 활성화 배수 변화를 비교하는 그래픽 도이다.

도 41 (a)는 4가지 가능한 표적 조합 모두에 걸쳐 EGFP 및 IL6 전사체 입력에 대한 AND 게이트 ADAR 센서의 정규화된 센서 활성화의 그래픽 도이다. (**b**)는 상이한 표적 조합에 걸쳐 EGFP 및 IL6 전사체 입력에 대한 OR 게이트 ADAR 센서의 정규화된 센서 활성화의 그래픽 도이다.

도 42 (a)는 인간 IL6 전사체를 표적으로 하는 5-결합력 센서를 갖는 ADAR 센서를 사용하는 IL6 반응성 카스파제의 개략도이다. 센서 활성화는 FKBP 자가 이량체화 카스파제9를 발현한다. (**b**)는 IL6 전사체 검출에 의한 ADAR 센서 활성화에 대한 반응으로 세포 사멸(아폽토시스)의 배수 변화의 그래픽 도이다. 양성 대조군 센서는 프레임에 정지 코돈이 없는 i카스파제 앞의 스크램블 가이드 서열을 포함한다. 세포 사멸 배수 변화는 -표적 조건과 비교하여 +표적에서 세포 생존력(cell viability)의 배수 변화를 계산하여 결정한다. (**c**)는 +표적 및 -표적 그룹에서 IL6 반응성 i카스파제 ADAR 센서 및 정지 코돈 없는 대조군의 퍼센트 세포 생존 값을 비교하는 막대 플롯이다.

도 43은 열 충격 검정에서 ADAR 센서의 효율성을 조사하는 실험의 시각적 표현이다. (**a**) 42℃에서 Hela 세포의 열 충격을 사용하여 HSP40 및 HSP70 유전자 발현의 상향 조절을 유도한다. HSP70 및 HSP40 표적 센서는 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)와 함께 또는 단독으로 Hela 세포로 형질감염된 후 42℃ 또는 37℃에서 24시간 동안 이어진다. (**b**) 24시간 열 충격 후 상향 조절된 HSP40 및 HSP70 수준의 qPCR 검증. (**c**) 센서 활성화가 42℃ 및 37℃ 그룹 사이에서 계산되고, 단백질 분해 변화를 설명하기 위해 스크램블된 비표적 가이드가 있는 센서로 정규화된다.

도 44는 SERPINA1을 차등적으로 발현하는 세 가지 세포 유형에서 SERPINA1 분석의 시각적 표현이다. (**a**)는 HEK293FT, SERPINA1 및 Hela 세포에 걸쳐 SERPINA1 발현을 비교하는 막대 플롯이다. (**b**) SERPINA1 감지 5개 결합력 센서는 세 가지 상이한 세포 유형(HEK293FT, Hela 및 HepG2 세포)에서 외인성 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)를 포함하거나 포함하지 않고 형질감염된다. (**c**)는 상이한 CCA 부위를 표적으로 하는 SERPINA1 센서에 걸쳐 Hela 세포와 HepG2 세포 사이의 센서 활성화 배수 변화를 비교하는 막대 플롯이다. (**d**) 센서 활성화는 세포 유형 사이의 단백질 생산/분비 및 배경 ADAR 활성 차이를 설명하기 위해 스크램블된 비표적 가이드 센서로 정규화된 SERPINA1 센서의 원시 루시퍼라제 값을 계산한 다음 HEK293FT 세포에서 gluc/cluc 비율로 정규화에 의해 결정된다.

도 45는 상이한 세포 유형(HEK293, Hela 및 HepG2)에서 SERPINA1 5개 결합력 센서에서 편집 속도의 정규화된 배수 변화의 그래픽 표현이다.

도 46은 일시적으로 형질감염된 테트라사이클린 유도성 SERPINA1 발현이 있는 Hepa1-6 세포에서 SERPINA1 전사체 상의 상이한 CCA 부위를 표적으로 하는 mRNA SERPINA1 센서 활성화 배수 변화를 비교하는 막대 플롯이다.

도 47 (a)는 SERPINA1 mADAR 센서 작제물을 사용하는 인간 SERPINA1 전사체의 생체내 감지 실험의 개략도이다. Akaluc 출력을 갖는 SERPINA1 표적 센서 mRNA는 25% 5-메틸시토신과 0% 슈도우리딘으로 시험관내에서 생산된다. 구성적 Akaluc(정지 코돈 없음) 및 비표적 가이드(정지 코돈 포함) 센서 작제물은 동일한 프로토콜로 합성된다. 모든 mRNA는 지질 나노입자로 포장되고, 야생형 마우스 또는 인간 SERPINA1 PiZ 돌연변이체 카세트를 가진 NSG-Piz 마우스에 꼬리 정맥 주입된다. 생체내 센서 활성화는 주사 18시간 후에 측정된다. (**b**)는 다양한 합성 mRNA ADAR 센서 작제물에 대한 센서 활성화의 대표적 이미지를 나타낸다.

도 48 (a)는 간에 대해 계산되고 야생형과 NSG-PiZ 돌연변이체 마우스 사이에 비교한 Akaluc 생성 광도의 그래픽 도이다. NGS-PiZ 마우스와 WT 마우스 사이의 배수 변화는 각 ADAR 센서 작제물에 대해 계산된다. 유의성은 양측 t-검정(two tailed t-test), N = 2 마우스를 통해 결정된다. *, $p<0.05$. 0.05보다 작은 p 값은 통계적 유의성을 위해 별표로 표시된다. (**b**)는 비표적 센서, 구성적 센서, SERPINA1 CCA35 표적 센서 및 SERPINA1 CCA30 표적 센서에 걸쳐 NSG-PiZ 마우스 및 WT 마우스에서 Akaluc 발광 광도를 비교하는 막대 플롯이다.

도 49는 유전자에 따라 조직을 분류하는 데 필요한 최소 유전자 수(**a**)뿐만 아니라 특정 조직에서 풍부하거나 특정 조직에서 강화되거나 낮은 특이성을 갖는 단백질 코딩 유전자 수(**b**)에 대한 인간 단백질 아틀라스 및 GTEX 데이터세트를 사용하여 37개 조직에 대한 차등 유전자 분석의 그래픽 도이다. (**c**)는 34개의 상이한 조직 유형에 걸쳐 조직을 고유하게 정의하는 34개의 mRNA의 상대적 전사체 풍부도를 보여주는 히트맵이다.

도 50은 면역 반응 및 내인성 RNA 녹다운에 관한 RADARS 안전성의 특성을 보여주는 그래픽 도이다. (**a, b**) 선천적 항바이러스 경로에 대한 센서-표적 듀플렉스 형성의 효과. RADARS 센서를 상보적 표적 서열의 존재하 또는 부재하에 형질감염시켰다. 총 RNA를 정량적 PCR(qPCR)을 사용하여 분석하여 MDA5(**a**) 및 IFN-β(**b**)의 상대적 발현 수준을 결정했다. (**c, d**) 내인성 표적 전사체의 풍부도에 대한 센서-표적 듀플렉스 형성의 효과. 상보적 또는 비표적 RADARS 센서의 형질감염시 NEFM 및 PPIP 전사체의 상대적 풍부도는 qPCR로 평가했다. 데이터는 평균 ± s.d.(n = 4); 비쌍화된 양측 스튜던츠의 t-검정, ns, $p > 0.05$로서 제시된다.

도 51은 내인성 표적 녹다운에 상응하는 RADARS 신호의 저하를 보여주는 그래픽 도이다. (**a**) 내인성 전사체의 siRNA 녹다운의 개략도. (**b**) qPCR 및 형광 RADARS는 HEK293FT 세포에서 PPIB 또는 NEFM을 표적으로 하는 siRNA 대 대조군 비표적 siRNA 사이의 발현 차이를 검출했다. RADAR의 경우, 센서 활성화는 표적 siRNA에 대해 계산되고 대조군 siRNA로 정규화된다. 데이터는 기술적 복제본(n≥ 3)의 평균 ± s.d.이다.

도 52는 외인성 보충 ADAR1p150 또는 내인성 ADAR과 함께 사용했을 때 171nt 가이드와 4개의 MS2 루프를 가진 #CCA8 IL6 조작된 가이드 RNA의 배수 활성화의 그래픽 비교이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 53a는 플라스미드 ADAR1p150 형질감염과 함께 IL6 전사체를 검출할 때 mRNA RADARS 센서 활성화 배수 활성화의 그래픽 비교이다. 합성 mRNA 센서는 0 내지 100% 범위의 상이한 혼입 수준에서 화학적으로 변형된 상이한 염기로 합성된다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 53b**는 0 내지 100% 범위의 상이한 혼입 수준에서 화학적으로 변형된 상이한 염기로 합성된 경우 내인성 ADAR을 활용하여 IL6 전사를 검출할 때 mRNA RADARS 활성화 배수 활성화의 그래픽 비교이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 53c**는 mRNA RADARS 형질감염으로 인한 인터페론 베타 반응 유도의 그래픽 비교이다. 합성 mRNA는 상이한 수준의 화학적으로 변형된 염기로 합성되며, 인터페론 반응은 플라스미드(One-Glo 루시퍼라제) 리포터 검정에 의해 측정된다(Gentili et al., 2015).

도 54a는 외인성 ADAR1p150 보충과 함께 사용된 상이한 RADARS 센서 설계의 진화의 시각적 특성화이다. 삽입물은 상이한 RADARS 설계의 백본을 묘사한다. RADARS 배수 활성화는 표적의 부재하의 경우에 대한 IL6 표적의 존재하의 구성적 사이프리디나 루시퍼라제(Cypridina luciferase; Cluc) 발광에 대한 가우시아 루시퍼라제(Gaussia luciferase; Gluc) 발광의 비율(Gluc/Cluc)로서 계산된다(방법 참조). 센서, 표적(IL6) 및 ADAR1p150은 일시적 형질감염을 통해 공동 전달된다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 54b**는 0aa 5' 펩티드 길이를 유지하면서 상이한 길이 및 상이한 MS2 헤어핀 루프를 갖는 조작된 가이드 RNA를 표적으로 하는 IL6 #CCA8에 대한 +표적과 -표적 조건 사이의 Gluc/Cluc 비율의 그래픽 비교이다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. (n=3 기술적 복제본).

도 55a는 5' 펩티드의 길이가 다양한 5개의 결합력 결합 부위(4개의 MS2 루프) 및 9개의 결합력 결합 부위(8개

의 MS2 루프) 조작된 가이드 RNA에 대한 +표적 및 -표적 조건 사이의 Gluc/Cluc 비율의 그래픽 비교이다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. (n=3 기술적 복제본). **도 55b**는 200aa 5' 펩티드 잔기가 있는 5개의 결합력 결합 부위 조작된 가이드 RNA에 대해 프레임 외부 정지 코돈 없음과 프레임 외부 2개의 정지 코돈의 첨가 사이의 Gluc/Cluc 비율의 그래픽 비교이다. 마지막 열은 Ef1-알파 프로모터하에 구동되는 구성적 gluc을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. (n=3 기술적 복제본).

도 56a는 외인성 ADAR1p150 보충으로 IL6, EGFP 및 NPY 표적화 RADARS의 배수 활성화의 그래픽 묘사이다. 각 전사체의 경우, 12개의 조작된 가이드 RNA가 조작되어 전사체에 걸쳐 상이한 CCA 부위를 표적으로 하였다. 묘사된 CCA 부위 번호는 #CCAx가 전사체 코딩 영역의 5' 말단에서 계수되는 CCA 삼중물의 수를 나타낸다는 규칙을 따른다. 각 점은 개별 센서에 대한 세 개의 기술적 복제본의 평균을 나타낸다. 수평 실선은 12개의 조작된 가이드 RNA 모두의 평균을 나타낸다. **도 56b**는 표적 IL6 전사체의 존재하 및 부재하에 RADARSv2 설계를 사용하여 외인성 ADAR1p150 보충으로 IL6 상의 CCA 부위를 타일링하는 비표적 조작된 가이드 RNA 및 14개의 IL6 표적 조작된 가이드 RNA에 대한 UAG 정지 코돈에서 표적 아데노신의 편집 백분율을 그래픽으로 묘사한다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(n=3 기술적 복제본)를 나타낸다.

도 57은 유전자 특이적 siRNA을 통해 상응하는 유전자의 하향 조절을 감지하기 위해 외인성 ADAR1p150 보충 또는 내인성 ADAR과 함께 사용되는 높은 TPM 유전자(RPS5), 낮은 TPM 유전자(KRAS) 또는 비표적 스크램블된 서열을 표적으로 하는 조작된 가이드 RNA를 갖는 RADARSv2의 그래픽 묘사이다. 배수 활성화는 비표적 siRNA 그룹에 대한 온 타겟(on target) siRNA 그룹에서의 페이로드의 활성화에 의해 계산된다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 58a는 mNeon 형광 단백질을 제어하는 RADARS 조작된 가이드 RNA의 상류에 구성적으로 발현된 정규화 형광 단백질(mCherry)을 함유하는 형광 출력 RADARS 작제물을 보여주는 개략도(상단) 및 표적 전사체의 존재하에 mNeon 페이로드만을 발현하는 HEK293FT 세포를 보여주는 형광 RADARS의 이미지(프레임 외부 EGFP)의 시각적 묘사이다. HEK293FT 세포는 표시된 바와 같이(하단) EGFP-표적 RADARS, ADAR1p150 및 ±표적(프레임 외부 EGFP)으로 형질감염된다. 스케일 막대, 100미크론. **도 58b**는 d)에서와 같이 형질감염된 HEK293FT 세포에 대한 mNeon/mCherry 형광 히스토그램을 보여주는 형광 RADARS의 유세포 분석법 분석의 시각적 묘사이며, 베이지색 및 파란색 분포는 각각 표적 부재와 표적 존재를 나타낸다.

도 59a는 HEK293 세포에서 형광 RADARS의 유세포 분석법 분석에 사용되는 게이팅 전략의 시각적 묘사이다. 게이트는 pUC19 플라스미드로 형질감염된 대조군 집단을 사용하여 그려진다. **도 59b**는 EGFP-표적 RADARS, ADARp150 및 pUC19 플라스미드로 형질감염된 세포 집단 위에 중첩된 게이트의 시각적 묘사이다. **도 59c**는 EGFP-표적 RADARS, ADARp150 및 EGFP-표적(프레임-시프트됨) 플라스미드로 형질감염된 세포 집단 위에 중첩된 게이트의 시각적 묘사이다.

도 60a는 log10-log10 스케일에서 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)으로 결정된 IL6 유전자 발현 변화에 대해 플롯팅된 기저 조건(통합된 HEK293FT 세포의 0ng/mL 독시사이클린)에 대한 RADARS 배수 활성화의 시각적 묘사이다. 파란색 점선은 데이터의 선형 회귀 결과를 나타낸다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 60b**는 GAPDH 유전자 Cq 수로 차감하여 정규화된 IL6 도입유전자의 원시 Cq 값 및 RADARS 상응 배수 활성화의 시각적 묘사이다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(n=3 생물학적 복제본)를 나타낸다. **도 60c**는 +표적 조건(gluc/cluc 비율)에서 생성되는 활성화 및 전체 단백질 생산에 대한 최상 IL6 조작된 가이드 RNA RADARS 센서 양을 적정하는 효과의 시각적 묘사이다. 40ng 미만의 조건의 경우, 잔류하는 플라스미드 양을 pUC19 플라스미드로 치환했다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(n=3 기술적 복제본)를 나타낸다.

도 61은 qPCR 발현으로 측정된 10개의 내인성 전사체의 siRNA 녹다운의 검증 실험 결과의 시각적 묘사이다. 배수 변화는 비표적 siRNA 그룹에 대한 온 타겟 siRNA 그룹에서 표적 전사체의 유전자 발현에 의해 계산된다. (n=3 생물학적 복제본).

도 62a(상단)는 10,381 TPM(RSP5) 내지 13 TPM(KRAS) 범위의 10개 유전자에 걸쳐 log 스케일로 표시된 백만당 전사체(TPM)의 유전자 발현의 시각적 묘사이다. 하단: 100nM의 표적 siRNA 풀 또는 비표적 siRNA 풀로 처리된 세포에서 전사체의 RADARSv2 검출. 막대는 표적 RADARS 및 비표적 RADARS 작제물의 배수 활성화(비표적 siRNA 그룹에 대한 표적 siRNA 그룹 내 RADARS의 Gluc/Cluc 비율)를 나타낸다. 유의성은 각 그룹에 대한 개별 분산을 가정하여 웰치(Welch) 보정을 사용하여 표적 및 비표적 RADARS 사이의 비쌍화 t-검정을 통해 결정된다(*, $p<0.05$. **, $p<0.01$. ***, $p<0.001$. ****, $p<0.0001$). **도 62b**는 b로부터의 각 유전자 그룹에서 최상 성능 센서에서 UAG 정지 코돈의 편집 속도의 그래픽 묘사이다. 온 타겟 siRNA 그룹과 비표적 siRNA 그룹 사이에서 수

행된 단측 비쌍화 t-검정. (*, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001. ****, p<0.0001) 오차 막대는 평균의 표준 오차(n=3 기술적 복제본)를 나타낸다.

도 63a는 10개의 내인성 전사체를 표적으로 하는 8개의 무작위로 선택된 조작된 가이드 RNA와 8개의 무작위로 선택된 비표적 조작된 가이드 RNA의 성능의 그래픽 묘사이다. RADARS의 배수 활성화는 비표적 siRNA 그룹에 대한 온 타겟 siRNA 그룹에서 Gluc/Cluc 비율로 계산된다. 각 유전자에 대한 최상 성능 표적 센서는 노란색으로 표지되고 도 63에서 조사된다. 수평 선은 각 그룹의 평균을 나타낸다. **도 63b**는 다양한 siRNA 농도에 걸쳐 이러한 전사체의 발현을 추적하는 RPL41, GAPDH, ACTB, HSP90AA1, PPIB 및 KRAS를 표적으로 하는 RADARSv2의 시각적 묘사이다. 파란색과 베이지색 선은 각각 0nM siRNA에 대한 RADARS(Gluc/Cluc) 비율의 배수 활성화와 qPCR-정량화 발현의 배수 변화를 나타낸다. 회색 선은 비표적 조작된 가이드 RNA(표적 전사체에 비상보적)의 배수 활성화를 나타낸다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. (R 값은 qPCR과 표적 RADARS 사이의 피어슨(pearson) 상관관계를 나타낸다, *, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001).

도 64a는 42℃에서 열 충격 동안 열 충격 단백질 계열 유전자 HSP70 상향 조절의 시각적 개략도이다. **도 64b**는 상이한 CCA 부위를 표적으로 하는 4개의 HSP70-표적 조작된 가이드 RNA 및 스크램블된 비표적(NT) 조작된 가이드 RNA는 모두 외인성 ADAR1p150 보충과 함께 HeLa 세포로 형질감염된 후 42℃ 또는 37℃에서 24시간 동안 이어지는 실험의 결과의 시각적 묘사이다. qPCR 및 RADARSv2는 37℃(대조군)와 42℃(열 충격) 그룹 사이의 HSP70 발현 차이를 검출했다. 센서 활성화는 42℃와 37℃ 그룹 사이에서 계산되고, NT 조건으로 정규화된다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 65a는 RADARS가 있는 두 개의 입력 AND 게이트의 시각적 개략도이다. **도 65b**는 4개의 가능한 표적 조합 모두에 걸쳐 EGFP 및 IL6 전사체 입력에 대한 AND 게이트 RADARS의 정규화된 센서 활성화의 그래픽 묘사이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 66a는 RADARS가 있는 두 개의 입력 OR 게이트 로직의 시각적 개략도이다. **도 66b**는 가능한 모든 EGFP 및 IL6 전사체 입력 조합에 대한 OR 게이트 RADARS의 센서 활성화의 그래픽 묘사이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 67a는 유도성 카스파제9 페이로드가 있는 SERPINA1-표적 RADARS의 개략도이다. **도 67b**는 외인성 ADAR1p150과 함께 SERPINA1 감지 RADARS 발현 i카스파제9의 형질감염 후 A549, Hela 및 HepG2 세포의 세포 생존력의 그래픽 묘사이다. 비표적 대조군 조작된 가이드 RNA는 페이로드 앞에 정지 코돈이 있는 스크램블 서열을 함유한다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 67c**는 MTS 검정을 사용하여 SERPINA1 또는 비표적 RADARS 발현 i카스파제9 작제물 및 ADAR1p150의 형질감염 48시간 후에 측정되고 GFP 발현 플라스미드로만 형질감염된 대조군으로 정규화된 HepG2, Hela 및 A549 세포의 세포 생존력의 그래픽 묘사이다.

도 68은 HSP70 전사체에서 최상 HSP70 표적 RADARS 작제물 및 스크램블된 비표적(NT) RADARS 작제물이 외인성 ADAR 없이 HeLa 세포로 형질감염된 후, 42℃ 또는 37℃에서 24시간까지 이어지는 실험의 결과의 그래픽 묘사이다. qPCR 및 RADARSv2는 37℃(대조군) 및 42℃(열 충격) 그룹 사이의 HSP70 발현 차이를 검출했다. 센서 활성화는 42℃ 및 37℃ 그룹 사이에서 계산되고 NT 조건으로 정규화되ㅁ며 이는 단백질 생산의 변화를 제어하기 위해 스크램블된 비표적 조작된 가이드 RNA(NT)가 있는 센서이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다.

도 69a는 이중 loxP EGFP Cre 리포터와 IL6 RADARS-CRE의 시각적 개략도이다. 오른쪽: IL6 표적을 포함하거나 포함하지 않는 Cre 페이로드에 의한 이중 loxP EGFP 리포터, ADAR1p150 및 IL6 표적 RADARS의 형질전환 48시간 후의 HEK293FT 형광. - 표적 및 + 표적 조건에 대한 이미지가 표시된다. 백색 스케일 막대는 100미크론을 나타낸다. **도 69b**는 도 69a의 세포가 EGFP 발현의 유동 분석을 위해 수거되는 실험의 결과의 시각적 묘사이다.

도 70a는 Cre 페이로드를 갖는 SERPINA1-표적 RADARS 작제물의 시각적 개략도이다. **도 70b**는 외인성 ADAR1p150과 함께 Cre를 발현하는 SERPINA1-표적 RADARS 작제물에 의한 형질감염 48시간 후 Hela, HepG2 및 A549 세포에 대한 유세포 분석법 분석된 퍼센트 GFP+ 세포의 결과의 시각적 묘사이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. **도 70c**는 IL6 표적을 포함하거나 포함하지 않는 Cre 페이로드에 의한 CRE 리포터, ADAR1p150 및 IL6 표적 RADARS의 형질감염 48시간 후에 유세포 분석법으로 정량화된 EGFP 발현의 시각적 묘사이다. EGFP 신호의 분포는 Hela, A549 및 HepG2 세포에 대한 유세포 분석법으로 분석한다. 세 가지 세포 유형 모두의 경우, GFP 양성 세포는 FITC 채널 EGFP 강도가 10^7 이상인 세포 집단으로 정의된다.

도 71a는 다양한 합성 mRNA RADARS 작제물에 대한 센서 활성화의 생물발광 이미지의 시각적 묘사이다. **도 71b**

는 기질 배경, 구성적 센서, SERPINA1 #CCA32 표적 RADARS에 걸쳐 NSG-PiZ 마우스와 NSG-WT 마우스의 간 내 Akaluc 발광 광도의 그래픽 비교이다. 데이터는 기술적 복제본(n=3)의 평균 ± s.e.m.이다. 유의성은 양측 비쌍화 t-검정, N = 3 마우스를 통해 NSG-WT와 NSG-PiZ 샘플 광도 사이에서 결정된다. (NS, p>0.05. **, p<0.01.) **도 71c**는 간에 대해 계산되고 야생형과 NSG-PiZ 돌연변이체 마우스 사이에서 비교되는 Akaluc 생성 광도의 그래픽 비교이다. NGS-PiZ 마우스와 NSG-WT 마우스 사이의 배수 활성화는 각 RADARS 작제물에 대해 계산된다. 유의성은 기질 배경과 비교하여 각 그룹에 대해 양측 비쌍화 t-검정, N = 3 마우스(NS, p>0.05. ***, p<0.001.)를 통해 테스트한다.

도 72a는 qPCR에 의해 정량화된 바와 같이, 외인성 ADAR1p150 보충과 함께 표적 또는 비표적(NT) RADARS 작제물로 형질감염된 HEK293FT 세포로부터 10개의 내인성 유전자의 전사체 발현 수준의 그래픽 묘사이다. 표시된 데이터는 표적 RADARS로 정규화된다. 표적 및 비표적 RADARS 사이의 유의성은 각 그룹에 대한 개별 분산을 가정하는 웰치 보정을 사용한 비쌍화 t-검정을 통해 결정된다(Ns, p>0.05). **도 72b**는 웨스턴 블롯에 의해 정량화된 바와 같이, ACTB/PPIB 표적 RADARS 또는 비표적 RADARS(ADAR1p150 보충 포함)로 형질감염된 HEK293FT 세포에서 내인성 ACTB 및 PPIB의 단백질 발현의 그래픽 묘사이다. 표적 및 비표적 RADARS 사이의 유의성은 각 그룹에 대한 개별 분산을 가정하는 웰치 보정을 사용하는 비쌍화 t-검정으로 결정된다(Ns, p>0.05). **도 72c** 및 **도 72d**는 단백질 생산에 대한 센서-표적 혼성화 효과가 웨스턴 블롯으로 분석된다는 시각적 묘사이다. ACTB(도 72c) 및 PPIB(도 72d) 단백질 수준은 RADARS 혼성화에 대한 반응으로 표시되며, GAPDH는 정규화 단백질 대조군으로 사용된다.

도 73a는 IL6, ACTB, RPS5 또는 PPIB, 비표적(NT) RADARS 및 고분자량 poly(I:C)를 표적으로 하는 RADARS 작제물에 의한 형질감염시 인터페론 베타, OAS1, RIG-1 및 MDA5의 qPCR 검출된 발현 수준의 그래픽 묘사이다. 유의성은 무처리 그룹, RADARS 그룹, 및 poly(I:C) 그룹 사이의 일원 ANOVA 테스트에 의해 결정된다(Ns, p>0.05. ****, p<0.0001). **도 73b**는 정규화 유전자로서 ACTB를 사용하여 HEK293FT 세포에서 RADARS에 반응하는 4가지 dsRNA 반응성 유전자(IFNb, OAS1, MDA5 및 RIG-1)의 qPCR 검출된 유전자 발현 배수 변화의 그래픽 묘사이다. **도 73c**는 정규화 유전자로서 GAPDH를 사용하는 HepG2 세포에서 RADARS 또는 poly(I:C)에 반응하여 4개의 dsRNA 반응성 유전자(IFNb, OAS1, MDA5 및 RIG-1)의 qPCR 검출된 유전자 발현 배수 변화의 그래픽 묘사이다.

도 74a는 ACTB, PPIB 및 NT 조작된 가이드 RNA에 대해 표적 전사체에 대한 RADARS의 200bp 혼성화 영역에서 RNA 편집의 정량화의 시각적 묘사이다. A 대 I(G) 변환은 히트맵에 묘사되어 있다. (NS, p>0.05) **도 74b**는 전사체 전반 오프 타겟(off target) 편집의 산점도 분석이다. 산점도는 (i) PPIB 센서 및 ADAR1p150 과발현 대 비형질감염된 HEK293T 세포(n = 3.17x106 부위); (ii) (i)와 동일하지만 IL6 센서(n = 3.07x106 부위)의 경우; (iii) (i)와 동일하지만 ADAR 과발현이 없고 비표적 RADAR 센서(n = 3.14 x106 부위)의 경우에서 A->G 돌연변이의 대립유전자 분획을 보여준다. 부위는 fdr-보정 p-값(색상 막대 왼쪽)으로 색상이 지정된다. i와 iii의 경우, 실험은 3개의 독립적인 복제본으로부터 생성되었다. **도 74c**는 NCBI Geo 수탁 번호 GSE123905의 데이터세트를 사용하여 MCP-ADAR2(E488Q)를 사용한 전사체 전체 오프 표적 편집의 산점도 분석이다(Katrekar et al., 2019). 산점도는 MCP-ADAR2(E488Q) 과발현 대 비형질감염된 HEK293T 세포(n = 2.35x106 부위)에서 A->G 돌연변이의 대립유전자 분획을 보여준다. 부위는 fdr-보정 p-값(컬러 막대 왼쪽)으로 색상이 지정된다.

도 75a는 전사체 오프 타겟(n=23 부위)과 표적화된 PPIB 상동성 영역 사이의 서열 상동성 분석의 그래픽 묘사이다. 각 오프 타겟 부위를 둘러싸는 200bp와 조작된 가이드 RNA에 의해 표적화된 PPIB 상동성 영역 사이의 국소 정렬(몬테 카를로 순열 검정(Monte Carlo permutation test))의 유의성에 대한 상응하는 fdr-보정 p-값(빨간색 선은 p=0.05를 나타낸다). **도 75b**는 PPIB 표적 RADARS와 함께 ADAR1p150 과발현으로부터 오프 타겟 편집 부위의 서열 로고 분석의 시각적 묘사이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 본 개시내용은 RNA를 검출하고 정량화하기 위한 시스템 및 센서를 제공한다. 본 개시내용은 또한 유전자 편집을 위한 시스템 및 방법을 제공한다. 또한, RNA 발현의 생체내 이미징을 위한 시스템도 개시된다. 본 개시내용은 아데닌을 이노신으로 변환하는 센서 시스템을 제공한다. 이노신은 번역 기계에 의해 구아노신(G)으로 인식된다. 아데닌의 이노신으로의 변환은 가수분해 탈아민화 아데노신의 결과이다(Cox *et al.* Science 358(6366):1019-1027 (2017)). 따라서, 효소의 RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 계열은 전사체 내의 코돈을 변환하여 번역 산물이 기능적으로 변경되도록 할 수 있다. 본 개시내용은 다른 기능적 변경 중에서도 정지 코돈을 제거하여 페이로드의 발현을 가능하게 하는 전사체의 편집을 제공한다.

[0039] **정의**

[0040] 달리 명시되지 않는 한, 본 출원 내에 사용된 용어 및 기술은 당업자에게 일반적으로 공지된 의미를 갖는다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "약"은 지정된 값을 변형하는 것으로 이해된다. 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 용어 "약"은 지정된 값 +/- 10%를 변형하는 것으로 이해된다. 본원에 사용된 바와 같이, 범위에 적용되는 용어 "약"은 범위의 두 종점을 변형한다. 예로서, "약 5 내지 10"의 범위는 "약 5 내지 약 10"을 의미하는 것으로 이해된다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "센서" 및 "센서 가닥"은 상호 교환적으로 사용된다. 본원에서 사용되는 용어 "센서" 또는 "센서 가닥"은 적어도 정지 코돈을 포함하는 단일 가닥 RNA와 관련되는 것으로 이해되며, 여기서 RNA 가닥은 또 다른 RNA 가닥과 혼성화하거나 듀플렉스를 형성할 수 있다. "센서" 및 "가이드" 가닥은 본 개시내용 전반에 걸쳐 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "ADAR", "ADAR 효소" 및 "탈아민화 효소"는 달리 명시적으로 언급되지 않는 한 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 본 개시내용 내에서, "여기서, ADAR 효소는 원핵생물 RNA 편집 효소이다"는 또한 "여기서, 탈아민화 효소는 원핵생물 RNA 편집 효소이다"를 의미하는 것으로 이해된다.

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "RNA 센서 시스템" 또는 "센서 시스템"은 (i) 생성되는 혼성화 RNA가 적어도 하나의 미스페어링 및 적어도 하나의 정지 코돈을 포함하도록 단일 가닥 RNA의 관심 전사체로의 혼성화, (ii) 혼성화된 RNA의 기질로서 의 인식, 및 (iii) 정지 코돈을 제거하기 위해 단일 가닥 RNA의 편집에 필요한 최소 구성 요소를 의미하는 것으로 이해된다.

[0045] 본원에서 사용되는 용어 "셀 로직 시스템" 또는 "로직 시스템"은 다수의 개별 센서 시스템으로 구성된 시스템을 지칭한다. 본 개시내용의 셀 로직 시스템 또는 로직 시스템은 복합 시스템이고, 이는 하나 이상의 개별 RNA 센서 시스템으로 구성될 수 있다. 개별 RNA 센서 시스템은 더 큰 셀 로직 시스템에 통합될 때, 활성화를 위해 동일한 세포의 개별 RNA 센서 시스템에 의존할 수 있다. 대안적으로, 개별 RNA 센서 시스템이 또 다른 시스템에 필요하지 않도록 다수의 개별 RNA 센서 시스템이 세포 로직 시스템에 통합될 수 있다.

[0046] 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "페이로드"는 또 다른 단일 가닥 RNA에 혼성화되거나, 이미 듀플렉스화된 RNA 분자에 대한 침입 가닥이거나, 단백질을 발현하기 위해 번역될 수 있는 단일 가닥 RNA의 일부를 의미하는 것으로 일반적으로 이해된다. 따라서, 본 개시내용의 구현예가, 예로서, "페이로드가 치료용 단백질을 포함한다"고 명시하는 경우, 일반적으로 페이로드는 치료용 단백질을 발현하기 위해 번역될 수 있는 단일 가닥 RNA의 단편 또는 일부인 것으로 이해된다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포 특이적", "세포 유형 특이적" 및 "특정 세포 유형에 의해 활성화 가능한"은 RNA 센서의 활성화가 다른 세포 유형에서보다 실질적으로 더 높은 수준으로 특정 세포 유형에 존재하는 인자의 존재를 필요로 한다는 것을 의미하는 것으로 당업자에 의해 이해될 것이다. 당업자는 이러한 인자의 발현이 다른 세포 유형에서 발생할 수 있고, 이에 따라 RNA 센서의 활성화가 가능할 수 있지만, 그 가능성은 높지 않다는 것을 인식할 것이다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같고 달리 명시되지 않는 한, "결합력 영역" 또는 "결합력 결합 영역"은 표적 전사체에 대한 상보성의 정도를 갖는 가이드 가닥 상의 영역을 기재하기 위해 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 결합력은 가이드 내의 다수의 결합 부위의 설계를 지칭한다. 이러한 결합 부위는 링커에 의해 분리될 수 있다. 결합력 영역은 임의로 헤어핀 구조를 포함한 하나 이상의 2차 구조에 의해 가이드 가닥의 주요 센서 영역으로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 헤어핀 구조는 MS2 헤어핀이다. 결합력 영역은 임의로 ADAR에 의한 편집을 위해 표적화되지 않는 정지 코돈을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합력 영역은 링커 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 결합력 영역은 하나 이상의 링커 서열을 포함한다.

[0049] **RNA에 작용하는 아데노신 데아미나제(ADAR) 및 기타 RNA 편집 효소.**

[0050] ADAR 효소는 동물들 사이에서 진화적으로 보존되어 있다. 포유동물은 세 가지 공지된 ADAR 효소: ADAR1, ADAR2 및 ADAR3을 갖는다. ADAR1 및 ADAR2는 촉매적으로 활성인 것으로 공지되어 있다. 대조적으로, ADAR3은, ADAR2와 상당한 유사성에도 불구하고, 일반적으로 촉매적으로 비활성인 것으로 간주된다(참조: Savva *et al*. Genome Biol. 13(12):252. (2012)). 본 개시내용에서 고려되는 ADAR 효소는 포유류 ADAR 효소 또는 그로부터 유래된 변형된 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 인간 ADAR1이다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 변형된 인간 ADAR1이다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 인간 ADAR2이다. 일부

구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 변형된 인간 ADAR2이다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 변형된 인간 ADAR3이다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 합성 효소이다. 일부 구현예에서, RNA 센서의 ADAR 효소는 비포유류 ADAR 효소이다.

[0051] 본 개시내용의 ADAR 효소는 변형된 효소를 포함한다. 본 개시내용에서 고려되는 ADAR 효소는 센서 가닥에 대한 효소의 친화성을 증가시키도록 변형된 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, ADAR은 추가의 RNA 결합 도메인을 포함하도록 변형되었다. 일부 구현예에서, ADAR은 하나 이상의 비촉매 도메인을 제외하도록 변형되었다. 일부 구현예에서, 센서 시스템의 ADAR 효소는 ADAR2 데아미나제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, ADAR은 ADAR2 데아미나제 도메인으로 구성된다. 일부 구현예에서, ADAR은 MS2 결합 단백질에 융합된 ADAR2 데아미나제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, ADAR은 MS2 결합 단백질에 융합된 ADAR2 데아미나제 도메인으로 구성된다. 일부 구현예에서, ADAR은 CRISPR 관련 단백질(Cas 단백질), 또는 이의 단편 또는 유도체에 융합된다. 일부 구현예에서, ADAR은 변형된 Cas 단백질에 융합된다. 일부 구현예에서, 변형된 Cas 단백질은 촉매 활성이 결여되도록 돌연변이된다. 일부 구현예에서, ADAR은 변형된 Cas13에 융합된다. 일부 구현예에서, ADAR은 K370에 상응하는 아미노산에 돌연변이를 포함하는 Cas13b에 융합된다. 일부 구현예에서, ADAR은 K370A 돌연변이를 포함하는 Cas13b에 융합된다. 일부 구현예에서, ADAR은 변형된 Cas13d에 융합된다. 일부 구현예에서, ADAR은 변형된 Cas7-11에 융합된다.

[0052] 본 개시내용의 ADAR 효소는 센서가 전달되는 세포에 내인성일 수 있다. 본 개시내용에서 고려되는 ADAR 효소는 외인성일 수 있으며, 센서와 동시에 또는 별도로 세포에 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 ADAR은 센서와 별도로 전달된다. 일부 구현예에서, 외인성 ADAR은 센서와 동시에 전달된다. 일부 구현예에서, 외인성 ADAR은 내인성 ADAR을 보충하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 ADAR이 세포에 공급된다.

[0053] **추가의 RNA 편집 효소**

[0054] 추가의 탈아민화 효소는 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 ADAR 효소일 수 있다. 변형된 ADAR 효소는 RESCUE와 같이 증가된 시티딘 탈아민화 활성을 갖도록 변형된 ADAR 효소를 포함할 수 있다(참조: Abudayyeh *et al.*, Science 365, 382-386 (2019)).

[0055] 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 시티딘 대 우라실 편집 효소이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 시티딘 데아미나제의 아포지단백질 B mRNA 편집 효소, 촉매 폴리펩티드 유사(APOBEC) 계열의 구성원일 수 있다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC1이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC2이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3A이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3B이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3C이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3D이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3E이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3F이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3G이다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 변형된 APOBEC3H이다.

[0056] 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 원핵생물 RNA 편집 효소일 수 있다. 일부 구현예에서, 탈아민화 효소는 에쉐리키아 콜리(*Escherichia coli*)(이. 콜리(*E. coli*))로부터 유래된다.

[0057] **센서/센서 가닥**

[0058] 본 개시내용의 센서는 적어도 하나의 정지 코돈을 포함한다. 센서는 페이로드, 정규화 유전자 또는 페이로드와 정규화 유전자 둘 다와 동일한 RNA 가닥 상에 위치될 수 있다. 본 개시내용의 센서는 단일 가닥 RNA(ssRNA) 센서 가닥이 표적 ssRNA 가닥에 결합하여 이중 가닥 RNA(dsRNA) 듀플렉스를 생성할 때, 듀플렉스가 센서 가닥의 정지 코돈에 상응하는 영역 내에 미스페어링을 포함하도록 설계될 수 있다. 개시된 센서는 여러 가지 방식으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 센서는 DNA 주형으로서 세포에 제공되고, 이는 이후에 단일 가닥 RNA 센서 분자로 전사될 수 있다.

[0059] 또한, 하나 이상의 정지 코돈을 포함하는 센서 가닥이 본 개시내용에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 10개 이상의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 2개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 3개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 4개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 5개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 6개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 7개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 8개의 정지

코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 9개의 정지 코돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 10개의 정지 코돈을 포함한다.

[0060] 또한, 하나 이상의 항원항체결합력 결합 영역을 함유하는 센서/가이드 가닥이 본 개시내용에서 제공된다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 3개의 결합력 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 5개의 결합력 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 7개의 결합력 영역을 포함한다. 결합력 영역은 ADAR 편집의 표적이 아닌 정지 코돈을 혼입할 수 있다. 항원항체결합력 결합 영역은 또한 ADAR 편집의 표적인 정지 코돈을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원항체결합력 결합 영역은 ADAR 편집용으로 의도된 정지 코돈을 포함한다.

[0061] 또한, 본 개시내용 내에 하나 이상의 MS2 헤어핀을 혼입하는 센서/가이드 가닥이 제공된다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 2개의 MS2 헤어핀을 포함한다. 일부 구현예에서, 센서 가닥은 3개의 MS2 헤어핀을 포함한다.

[0062] 일부 구현예에서, 센서/가이드 가닥은 결합력 영역과 MS2 헤어핀 영역을 모두 포함한다.

[0063] 일부 구현예에서, 센서/가이드 가닥은 RNA 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 RNA는 5-메티시토신을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 RNA는 슈도우리딘을 포함한다.

[0064] **페이로드**

[0065] 일부 구현예에서, 페이로드는 리포터 전사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 리포터 전사체로 구성된다. 일부 구현예에서, 리포터 전사체는 형광 리포터이다. 일부 구현예에서, 리포터 전사체는 루시퍼라제 전사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 리포터 전사체는 GFP 전사체를 포함한다.

[0066] 본 개시내용의 센서 시스템은 치료용 단백질을 인코딩하는 페이로드를 전달하도록 설계될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료용 단백질은 또 다른 치료제와 함께 사용될 수 있다.

[0067] 일부 구현예에서, 페이로드는 전사 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 유전자도입 단백질을 포함한다.

[0068] 일부 구현예에서, 페이로드는 세포의 게놈을 편집하는 데 사용하기 위한 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 Cas9 단백질을 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, 페이로드는 한 세포 유형을 또 다른 세포 유형으로 전환할 수 있는 단백질을 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 페이로드는 ADAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 양성 피드백 루프를 개시할 수 있는 ADAR을 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, 페이로드는 특정 세포 유형을 사멸시킬 수 있는 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 페이로드는 면역 조절 단백질을 포함한다.

[0072] **로직 게이트(Logic gate)**

[0073] 본 개시내용은 또한 복잡한 다중 센서 리포터 시스템에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 다중 센서 리포터 시스템은 로직 게이트를 사용한다. 이러한 로직 게이트는 동일한 리포터 시스템에서 개별 결정 지점으로서 AND 게이트, OR 게이트 또는 AND OR 게이트로 구성될 수 있다.

[0074] 본 개시내용의 리포터 시스템에서 사용하기 위한 AND 게이트는 동일한 ssRNA 센서에 다수의 가이드 가닥 결합 섹션을 가짐으로써 구현될 수 있다. 이러한 유형의 AND 게이트에서, 각각의 개별 가이드 섹션은 세포에서 별도의 내인성 전사체를 감지한다. 이러한 유형의 게이트에서 AND 게이트의 "활성화"는 전체 ssRNA 센서 가닥의 활성화; 즉, 정지 코돈의 제거 및 말단 페이로드의 발현과 동일하다. 이러한 유형의 로직 게이트는 각 가이드 섹션이 표적 서열 및 ADAR 또는 기타 탈아민화 분자와 상호 작용한다는 것을 필요로 한다. 각 가이드 섹션에서 정지 코돈의 탈아민화는 페이로드의 완전한 발현을 허용할 것이다. 일부 구현예에서, 각 가이드 섹션은 개별 리포터에 의해 추가로 분리된다. 일부 구현예에서, 각 가이드 섹션은 개별적인 별개의 리포터에 의해 추가로 분리된다. 일부 구현예에서, AND 게이트에 사용하기 위한 ssRNA 센서 상의 각 리포터는 별개의 형광 리포터이다.

[0075] 일부 구현예에서, AND 게이트는 순차적인 방식으로 작동할 수 있다. 이러한 유형의 AND 게이트에서, 각각의 다중 가이드 가닥 결합 섹션은 별도의 ssRNA 센서 에 위치한다. 이러한 유형의 AND 게이트에서 게이트의 활성화는 정의된 순서로 다수의 센서의 활성화를 포함한다. 이러한 유형의 AND 게이트에서, 첫 번째 센서의 활성화는

중간 페이로드의 발현을 초래한다. 이 중간 페이로드는 특정 세포 환경에서 두 번째 RNA 센서의 발현을 허용한다. 이러한 시스템에서, RNA 센서 활성화의 캐스케이드는 활성화시, 그리고 특이적으로 결정된 세포 자극의 맥락에서만 발생할 수 있다.

[0076] 본 개시내용의 리포터 시스템에서 사용하기 위한 OR 게이트는 동일한 세포 내의 다수의 독립적인 ssRNA 센서의 사용을 통해 구현될 수 있다. 다수의 독립적인 센서 각각은 또 다른 센서의 활성화 없이 페이로드를 전달할 수 있다.

[0077] **전달 시스템**

[0078] 본 개시내용은 또한 ADAR 센서를 전달하기 위한 시스템을 제공한다.

[0079] 일부 구현예에서, ADAR 센서는 세포에 직접 전달된다. 일부 구현예에서, ADAR 센서는 지질 나노입자에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, ADAR 센서는 바이러스 벡터를 통해 전달된다.

[0080] 일부 구현예에서, ADAR 센서는 원형 RNA이다.

[0081] **개시내용의 방법**

[0082] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 센서 시스템을 사용하는 방법을 제공한다.

[0083] 일부 구현예에서, RNA 센서는 광학적으로 관찰될 수 있는 페이로드를 전달한다. 일부 구현예에서, RNA 센서는 이미징 시스템(imaging system)을 통해 추적된다. 이미징 시스템은 시스템과 호환되는 임의의 적합한 이미징 시스템일 수 있다. 일부 구현예에서, 이미징 시스템은 형광 분자를 사용한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 다수의 형광 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 이미징 시스템은 비침습적이다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting; FACS) 시스템과 호환된다.

[0084] 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 비침습적 이미징 시스템을 통해 추적된다. 일부 구현예에서, 이미징 시스템은 진한 빨간색 루시퍼라제를 추적한다.

[0085] 본 개시내용은 또한 생체내에서 RNA를 정량화하는 방법을 제공한다. 본 개시내용의 정량화 방법은 센서 가닥에 정규화 유전자의 혼입에 의존할 수 있다. 이 정규화 유전자의 번역은 RNA 편집과 무관하게 일어난다. 정규화 유전자의 정량화는 각 개별 세포에 전달된 총 센서 가닥의 참조를 제공한다. 이 정규화 유전자를 참조하면 총 전달된 센서의 백분율로서 활성화된 RNA 센서의 결정을 허용한다.

[0086] 본 개시내용은 또한 살아있는 세포 이미징을 고려한다. 일부 구현예에서, 형광 리포터가 시각화된다. 일부 구현예에서, 다수의 형광 리포터가 추적된다. 본 개시내용은 또한 장기간 세포 계통 추적을 제공한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템의 활성화는 리포터 분자의 발현에 영구적인 변화를 일으켜서 RNA 센서 시스템이 이전에 활성화된 세포가 나중에 식별될 수 있도록 한다.

[0087] 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 특정 세포 유형을 표적으로 하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 특정 세포 유형에 의해 활성화되도록 조작된다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 특정 세포 유형을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 종양 세포를 표적으로 한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 특정 세포 유형을 사멸시키는 페이로드를 전달한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 한 세포 유형을 또 다른 세포 유형으로 변환하는 페이로드를 전달한다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 세포의 게놈을 편집하는 페이로드를 전달한다.

[0088] 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 약물 투여 가능하다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 약물 민감성이다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 단일 약물 또는 화합물의 존재하에서만 활성화된다. 일부 구현예에서, RNA 센서 시스템은 다수의 약물 또는 화합물의 존재하에서만 활성화된다.

[0089] 본 개시내용은 또한 시험관내 진단 검정에 사용하기 위해 본원에 기재된 RNA 센서 시스템의 사용을 고려한다. 예를 들어, RNA 센서 시스템은 진단 검정에 있을 수 있으며, 여기서 페이로드는 형광 단백질, 루시퍼라제 단백질, 항원 또는 에피토프를 포함한다. 일부 구현예에서, 진단 검정은 측방 유동 스트립이다.

[0090] 이제 본 기술을 상세히 기재하였으며, 이는 다음 실시예를 참조함으로써 보다 명확하게 이해될 것이다. 다음의 실시예들은 단지 예시 목적으로 포함되며, 본 기술의 구현예를 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 간행물은 명시적으로 참조로 포함된다.

[0091] **실시예**

[0092] **실시예 1. 실시예의 방법**

[0093] 달리 명시되지 않는 한, 다음 실험 기술이 본원에 제공된 실시예에 사용되었다.

[0094] *루시퍼라제 활성의 측정.*

[0095] 분비된 루시퍼라제를 함유하는 배지는 달리 명시되지 않는 한, 형질감염 48시간 후에 수거했다. 20μL의 배지를 사용하여 주입 프로토콜이 있는 Biotek Synergy 4 플레이트 판독기에서 표적화 시스템 사이프리디니아 및 표적화 시스템 가우시아 루시퍼라제 검정 키트(표적화 시스템)를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정한다. 모든 복제본은 생물학적 복제본으로 수행되었다.

[0096] *형광 센서용 형질감염.*

[0097] 세포를 코닝 96-웰 조직 배양 처리된 플레이트(검은색)에서 형질감염 전날 10K에서 플레이팅하여 형질감염 당일 약 40-50% 컨플루언시를 초래하였다. 모든 형광 센서의 경우, HEK293FT 세포는 제조업체 사양(비율 1μg DNA:3μL 트랜스 시약)에 따라 TransIT-LT1을 사용하여 100ng의 총 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 달리 명시되지 않는 한, ADAR 센서, ADAR 및 표적 플라스미드는 동일한 농도(33.3ng/조건)로 혼합하였으며, 이전 중 하나 이상이 없는 실험의 경우, pUC19를 따라서 치환하여 총 DNA 농도를 100ng로 유지하였다.

[0098] *형광 ADAR 센서의 공초점 현미경 검사*

[0099] 형질감염 후 48시간에, 모든 웰을 다음 설정하에 공초점 현미경 검사를 통해 측정했다. 각 웰의 경우, 10배 배율로 2x2 이미지를 수집하고 중심점 주위에 스티칭했다. 이미지는 488nm(32.8% 전력, 100ms 노출), 561nm(35.2% 전력, 100ms 노출), 640nm(80% 전력, 100ms 노출) 및 명시야 채널(25ms 노출)에서 수집되었다.

[0100] *이미지로부터 형광 신호의 정량화.*

[0101] 이미지를 Matlab에서 개방하고, mCherry 채널의 워터쉐드를 통해 분할되었다. 분할된 각 셀의 경우, 총 픽셀 면적 및 픽셀의 평균 강도를 mNeon(488nM), mCherry(561nM) 및 iRFP(640nM) 채널에 대해 계산하고, 집계된 csv 파일로 출력했다. Csv 파일은 다음 단계에 따라 R에서 일괄 처리하였다: 모든 csv 파일을 병합하고, 집계된 면적이 작은 조건(세포 수가 적거나 센서로 형질감염되지 않음)을 병합하고, 각 채널의 형광 배경을 해당 채널의 모든 조건에서 빼고, 각 조건에 대한 집계된 값을 면적으로 나누어 평균 형광 강도를 수득했다. 표준 편차는 세 가지 기술적 형질감염 복제본의 평균값을 비교하여 계산했다. mNeon/mCherry 비율 값의 경우, 조건에 대한 평균 mNeon 형광 강도를 그 동일한 조건에 대한 평균 mCherry 값으로 나누었다. 형광 비율 값 및 비율 배수 변화 값의 경우, 오차는 다음 식에 따라 전파되었다:

[0102] $$\sigma_{\frac{x}{y}} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_y}{y}\right)^2}$$

[0103] *공초점 이미지에서 mNeon 양성 세포 퍼센트의 정량화.*

[0104] 매우 낮은 수준의 플라스미드 오염(plasmid contamination) 또는 리보솜 미끄러짐(ribosome slippage)으로 인해 형광 센서에서 mNeon의 일부 일관된 누출이 관찰되었다. 따라서, 배경 위 30AU에서 mNeon 양성 세포의 검출을 게이트화하고, 이 임계값보다 높은 mNeon을 발현하는 조건에서 mCherry 양성 세포의 퍼센트를 결정했다. mNeon 값은 도 2e의 플롯을 생성하기 위해 커널 밀도 평활화(kernel density smoothing)를 갖는 히스토그램으로서 밑이 10인 로그로 플롯팅했다.

[0105] *RNA의 추출 및 ADAR 센서의 차세대 서열분석.*

[0106] ADAR SENSOR 센서의 편집 속도를 계산하기 위해, 이미징 후, 형질감염 48시간 후에 세포를 수거했다. 총 RNA는 DNase 처리와 함께 RNeasy 96 키트(Qiagen)를 사용하여 추출했다. cDNA는 SuperScript IV 역전사효소(Invitrogen) 및 센서 특이적 프라이머를 사용하여 제조했다. 센서의 가이드 영역은 Illumina MiSeq 플랫폼에서 증폭, 인덱싱 및 서열분석했다. 판독치를 역다중화하고 각 센서에 정렬시키고, A-대-I 편집 속도는 인-하우스 MATLAB 파이프라인으로 계산하였다.

[0107] *단백질 발현의 정량화.*

[0108] HEK293FT 세포의 형질감염 2일 후, 세포 용해물에서 HiBiT 태그의 정량화를 위해 Nano-Glo HiBiT 용해 검출 시스템(Promega)을 사용했다. Nano-Glo HiBiT 용해 시약의 제조를 위해, Nano-Glo HiBit 용해 완충액(Promega)

을 제조업체의 프로토콜에 따라 Nano-Glo HiBiT 용해 기질(Promega) 및 LgBiT 단백질(Promega)과 혼합했다. 첨가된 Nano-Glo HiBiT 용해 시약의 용적은 각 웰에 존재하는 배양 배지와 동일하였고, 샘플을 600rpm에서 3분 동안 오르비탈 진탕기에 위치시켰다. 실온에서 10분 배양 후, 판독은 플레이트 판독기(Biotek Synergy Neo 2)를 사용하여 125 게인 및 2초 통합 시간으로 수행했다. 대조군 배경은 최종 측정치에서 차감되었다.

[0109] *mRNA 합성.*

[0110] 시험관내 전사 전에, DNA 주형은 T7 프로모터를 함유하는 표적화 정방향 프라이머를 사용하여 PCR로 수득하였다. 센서 mRNA와 MCP-ADAR2dd mRNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 5-메틸-CTP 및 슈도-UTP(Jena Biosciences)의 50% 보충으로 HiScribe™ T7 ARCA mRNA 키트(NEB, E2065S)를 사용하여 전사하고 폴리-A 테일화했다. 그런 다음, mRNA를 MEGAclear™ 전사 클린업 키트(Thermo Fisher, AM1908)를 사용하여 정화시켰다.

[0111] *총 RNA의 수거 및 정량적 PCR.*

[0112] 포유류 세포에서의 유전자 발현 실험을 위해, cDNA 생성을 위한 세포 수거 및 역전사를 형질감염 48시간 후에 상업적 세포-대-Ct 키트(Thermo Fisher Scientific)의 이전에 기재된 변형을 사용하여 수행했다(Joung et al., 2017). 그런 다음, 전사체 발현은 GAPDH 대조군 프로브(Thermo Fisher Scientific)와 함께 급속 진행된 마스터 믹스(Thermo Fisher Scientific) 및 TaqMan qPCR 프로브(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 qPCR로 정량화했다. 모든 qPCR 반응은 384-웰 형식의 2개의 기술적 복제본을 사용하여 10μl 반응으로 수행했으며, LightCycler 480 기기 II(Roche)를 사용하여 판독했다. 다중 표적 반응의 경우, 상이한 표적의 판독은 별도의 웰에서 수행했다. 발현 수준은 총 입력에 대해 정규화하기 위해 표적 Ct 값으로부터 하우스키핑 제어(GAPDH) 사이클 임계(Ct) 값을 빼서 계산하여 △Ct 수준을 초래했다. 상대적 전사체 풍부도는 2-△Ct로 계산되었다. 모든 복제본은 생물학적 복제본으로 수행되었다.

[0113] *결합력 센서의 자동 생성.*

[0114] 결합력 센서는 다음 저장소에서 피톤 스크립트를 사용하여 생성된다. (https://github.com/abugoot-lab/ADAR SENSOR) 2개의 MS2 헤어핀 루프와 가이드 영역(표적 상) 사이의 5nt 간격이 있는 전형적인 3개의 결합력 가이드 ADAR 센서의 생성을 위한 개략도가 도 24에 도시되어 있다.

[0115] *축산업 및 동물 프로토콜.*

[0116] 모든 실험은 음식과 물에 자유롭게 접근하면서 암컷 B6(Cg)-Tyrc-2J/J(Albino B6) 및 NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(SERPINA1*E342K)#Slcw/SzJ (NSG-PiZ)(The Jackson Laboratory) 마우스를 대상으로 수행했다. NSG-PiZ 마우스는 면역 결핍 NOD scid 감마 배경에서 돌연변이체 인간 SERPINA1을 발현한다. 모든 마우스는 온도 제어된 동물 시설(정상적인 12:12시간 명-암 주기)에서 개별적으로 환기되는 케이지에 수용되었으며, MIT의 동물 관리 위원회에 의해 승인된 절차에 따라 사용되었다.

[0117] *RADARSv2 설계*

[0118] 정지 코돈은 모든 프레임에 걸쳐 번역 리보솜을 포획하기 위해 조작된 가이드 RNA 영역에 이어 +1 및 +2 프레임에서 조작하였다. 이러한 프레임 외 정지 코돈 설계는 긴 5' 펩티드와 상승적으로 배경을 크게 감소시켜 약 200배 활성화를 생성했다. 본 발명자들은 향후 센서를 위한 통합 구조로서 구조화된 가이드, 업스트림 펩티드 및 프레임 외 정지 코돈을 통합하는 RADARSv2라고 하는 이 센서 설계를 선택했다(**도 54a**).

[0119] **실시예 2. 루시퍼라제 및 형광 센서의 개발 및 EGFP 전사체의 검출**

[0120] *루시퍼라제 센서의 클로닝*

[0121] 루시퍼라제 센서는 PCR 산물의 깁슨(Gibson) 어셈블리에 의해 클로닝되었다. 센서 백본은 CMV 프로모터의 발현하에 사이프리디니아 루시퍼라제(Cluc)와 EF1-a 프로모터의 발현하에 가우시아 루시퍼라제(Gluc)를 모두 단일 벡터에서 클로닝하여 생성된다. 단일 벡터에서 두 루시퍼라제의 발현은 하나의 루시퍼라제가 다른 루시퍼라제의 녹다운의 정규화를 위한 투여 대조군으로 작용하여 형질감염 조건으로 인한 변이를 제어하도록 했다. 짧은 센서를 프라이머로 주문한 후, T4 PNK를 사용하여 인산화 및 어닐링했다. 어닐링된 올리고는 실온에서 20분 동안 1μL의 T4 DNA 리가제, 30ng의 삽입물, 50ng의 백본 및 1μL의 10x 결찰 완충액과의 전형적 10μL 결찰 반응에서 T4 DNA 리가제(NEB)를 사용하여 백본에 결찰시킨다. 긴 결합력 센서 영역은 통합된 DNA 테크놀로지스(IDT)에서 직접 Eblock으로 주문되었다. PCR 산물을 겔 추출(Monarch 겔 추출 키트, NEB)로 정제하고, 5μL

반응에서 2.5μL의 마스터믹스, 30ng의 백본 및 5ng의 삽입물과 함께 NEB HiFi DNA 어셈블리 마스터 믹스 키트를 사용하여 백본에 조립했다. 반응물을 50도에서 30분 동안 써모사이클러에서 배양하고, 조립된 반응물 2μL를 Mix and Go! 역량 키트(Zymo)로 생성된 20μL의 적격 Stbl3으로 형질전환하여 적절한 항생제가 보충된 한천 플레이트에 플레이팅했다. 37℃에서 밤새 성장 후, 콜로니를 테리픽 브로스(Terrific Broth; TB) 배지(Thermo Fisher Scientific)에 넣고 37℃에서 24시간 동안 진탕시키면서 배양했다. 배양물은 제조업체의 지침에 따라 QIAprep 스핀 미니프렙 키트(Qiagen)를 사용하여 수거했다.

[0122] 이 루시퍼라제 ADAR 센서는 51nt EGFP 전사체 감지 가이드와 가우시아 루시퍼라제(Gluc) 페이로드를 함유한다(도 2a). 구성적 사이프리디나 루시퍼라제(Cluc)가 별도의 전사체에 포함되어 있어 형질감염 분산에 대한 비율계량적 제어를 가능하게 했다. 이 이중 리포터, 이중 전사체 루시퍼라제 리포터 시스템은 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 기능적 eGFP를 표적으로 한다. 본 발명자들은 이 ADAR 센서 설계를 MS2 코트 단백질(MCP-ADAR2dd (E488Q, T490A))에 융합된 과민성 돌연변이 E488Q 및 특이성 돌연변이체 T490A가 있는 외인성 ADAR2 데아미나제 도메인의 존재하 또는 부재하에 스크램블된 가이드 제어와 함께 테스트했다(Kuttan and Bass 2012; Cox et al. 2017). ADAR 센서 발현 플라스미드를 EGFP 발현 플라스미드 또는 대조군 플라스미드를 사용하여 HEK293FT 세포로 공동 형질감염시켰다. 본 발명자들은 내인성 ADAR에만 의존할 때 ADAR 센서가 정규화된 루시퍼라제 값의 최대 5배 증가를 초래하였고, 외인성 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)를 보충했을 때 신호의 51배 활성화(표적의 존재하/표적의 부재하에 루시퍼라제 발현의 배수 변화)를 초래했다는 것을 관찰했다(도 2a). 또한, 본 발명자들은 외인성 ADAR이 보충된 ADAR 센서 유도 동안 루시퍼라제 신호가 업스트림 정지 코돈이 없는 구성적 발현 전사체와 유사하다(약 78%, 도 2c)는 것을 관찰했다. 따라서, ADAR 센서 활성화시 방출된 이러한 높은 단백질 생산은 높은 절대 페이로드 발현을 요구하는 적용에 대해 ADAR 센서를 검증한다. 페이로드 발현이 RNA 편집에 의존한다는 것을 확인하기 위해, 본 발명자들은 세포로부터 RNA를 수거하고 차세대 서열분석으로 편집을 정량화하고, EGFP 표적 센서에서 UAG 정지 코돈의 편집의 약 24배 증가를 관찰했지만 비표적 센서의 편집에서는 무시할 만한 증가를 관찰했다(도 2d).

[0123] *형광 센서의 클로닝*

[0124] 형광 ADAR 센서 모체는 백본으로서 HindIII와 NotI를 갖는 pcDNA3.1(+) 절단을 사용하여 깁슨 어셈블리를 통해 세 조각으로 클로닝되었다. mCherry는 Addgene 벡터 109427에서 증폭되었고, T2A mNeon은 IDT에서 gBlock으로 주문되었다. 모든 형광 ADAR 센서는 효소 Esp3I(BsmBI의 이소스키조머(isoschizomer))를 사용하여 골든 게이트 클로닝을 통해 모체 형광 플라스미드에 하위 클로닝되었다. 삽입물은 오버행이 있는 상보적 가닥으로 주문되고 인산화로 어닐링되거나 PCR을 통해 생산되었다. 골든 게이트 반응은 NEB BsmBIv2 골든 게이트 어셈블리 키트를 사용하거나, 25ng의 벡터와 2μL의 1:200 희석 삽입물(약 5-10ng)을 함유하는 20μL 반응에서 구성 요소별로 조립했다. 반응물은 각각 5분 동안 25℃와 37℃에서 교호하면서 1시간 동안 열순환한 다음, 0.75μL의 반응 혼합물을 12.5μL의 Zymo Mix and Go 적격 세포로 형질전환했다. 형질전환된 세포를 SOC 배지를 사용하여 1:1로 희석하고, 10μL를 50μg/mL 카르베니실린 한천 플레이트에 줄무늬 표시했다. 37℃에서 밤새 배양 후, 단일 콜로니를 50μg/mL 카르베니실린으로 보충된 4mL의 루리아 브로스(LB)에 넣었다. 플라스미드는 루시퍼라제 센서에 대해 상기 기재된 바와 같이 배양물로부터 제조했다.

[0125] 이 이중 리포터, 단일 전사체 형광 센서는 51bp eGFP 센서의 상류에서 구성적으로 mCherry를 발현하는 단일 전사체 형광 리포터를 함유하고, 다운스트림 mNeon 리포터는 표적과 상호작용시에만 활성화된다(도 3a). HEK293 세포는 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 비기능적 eGFP로 형질감염시켰다. 세포는 또한 1μg/mL 독시사이클린의 존재하에 이중 리포터, 단일 전사체 표적 센서 또는 비표적 센서로 형질감염시켰다. 도 3b는 표적 존재 및 부재, 및 외인성 ADAR의 존재 및 부재하의 실험에서 대표적 이미지를 나타낸다. 도 3c는 표적 유도시 EGFP 형광 배수 변화의 정량화를 나타내며; 비율 배수 변화는 ADAR 변이체에 대해 표적 존재하의 mNeon/mCherry 형광 값(형광 비율 값)이 표적 부재하의 형광 비율 값으로 나누어졌다는 것을 나타낸다. 외인성 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)의 존재하에, 표적 ADAR 센서는 활성화의 21배 초과 증가를 나타냈다. 추가로, 표적 ADAR 센서의 부재하에서는 낮은 배경 활성화가 있었다. 센서 TAG 코돈의 TAG->TIG 편집 속도도 또한 표적의 존재하 또는 부재하에 측정되었다. 외인성 ADAR의 존재하에서, 표적 ADAR 센서의 존재하의 UAG 정지 코돈은 9.4%의 비율로 편집된 반면, 표적 ADAR 센서의 부재하에 UAG 정지 코돈은 0.2%의 비율로 편집되어 표적 구동 편집이 형광 페이로드 발현을 유도한다는 것을 시사한다.

[0126] 생물학적 루시퍼라제 센서에 대한 원리의 증명을 추가로 확립하기 위해, 3개의 가이드 가닥을 외인성 EGFP 리포터 전사체와 동시에 HEK293FT 세포에 도입했다. ADAR 센서는 이중 전사체 가우시아 루시퍼라제(Gluc)/사이프리디나 루시퍼라제(Cluc) 전사체여서 형질감염 분산에 대한 비율계량적 제어를 가능하게 했다. 이중 리포터, 이

중 전사체 루시퍼라제 리포터 시스템은 외인성 eGFP 리포터 전사체를 표적으로 했다. 설계 2 및 4는 EGFP 전사체를 표적으로 하는 상이한 가이드이다. 외인성 ADAR은 세포에 도입되지 않았다. 음성 대조군은 EGFP를 인식하지 못하는 가이드 가닥이다. EGFP 발현이 3개의 가이드 가닥의 도입 후 분석된 경우, 설계 2및 설계 4는 모두 루시퍼라제 발현 수준의 유의한 증가를 나타냈다(도 4a). 설계 2 및 설계 4 가이드 가닥은 모두 음성 대조군 스크램블 가이드와 비교하여 루시퍼라제 신호의 유의한 증가를 나타냈다(도 4b).

[0127] **실시예 3. 외인성 ADAR2 투여 후 전사체 발현 증가**

[0128] 추가의 ADAR 분자를 도입하면 루시퍼라제 발현이 증가하는지를 결정하기 위해, 5개의 가이드 가닥을 외인성 EGFP 리포터 전사체와 동시에 HEK293FT 세포에 도입했다. 가이드 1-4는 EGFP 전사체를 표적으로 하는 상이한 가이드이다. 음성 대조군은 EGFP를 인식하지 못하도록 설계된 스크램블된 대조군이다. 각 가이드 가닥은 세 가지 실험 조건으로 테스트했다. 먼저, 각 가이드를 세포에 외인성 ADAR이 도입되지 않은 HEK293FT 세포에 도입했다(도 5, 파란색 막대). 다음으로, 각 가이드를 ADAR2의 데아미나제 도메인(ADARdd)과 동시에 HEK293FT 세포에 도입했다(도 5, 흰색 막대). 마지막으로, 각 가이드를 ADAR2dd 과발현 전사체 dPspCas13b-ADAR2dd와 동시에 HEK293FT 세포에 도입했다(도 5, 빨간색 막대).

[0129] 가이드 가닥 1-4는 음성 대조군으로 정규화될 때 임의의 외인성 ADAR 분자의 첨가 없이 루시퍼라제 발현이 1.5배 내지 2배 증가를 나타냈다(도 5, 파란색 막대). ADAR2의 데아미나제 도메인(ADAR2dd)이 동시에 세포에 도입되었을 때, 가이드 1, 2 및 4는 내인성 ADAR의 존재하에 동일한 가이드와 유사한 루시퍼라제 발현의 증가를 나타냈다(도 5, 흰색 막대). 가이드 가닥 3은 추가의 ADAR2dd 분자의 존재하에 루시퍼라제 발현의 3배 증가를 나타냈다(도 5, 흰색 막대).

[0130] ADAR2dd 과발현 벡터를 가이드 가닥 1-4와 동시에 도입했을 때, 루시퍼라제 발현은 적어도 2배 증가했다(도 5, 빨간색 막대). 구체적으로, 가이드 가닥 3은 음성 대조군과 비교했을 때 루시퍼라제 발현의 4배 증가를 나타냈다. 이 데이터는 센서 기능을 향상시키기 위해 외인성 및 변형된 ADAR 분자를 활용할 수 있는 가능성을 강조한다.

[0131] **실시예 4. ADAR 최적화 및 길이 스크리닝은 표적의 존재하에 배경을 줄이고 ADAR 센서 활성화를 증가시킨다**

[0132] 이러한 ADAR 센서의 검증 동안, 본 발명자들은, 일부 가이드의 경우, 표적 RNA의 부재하에도 불구하고 외인성 ADAR의 존재하에 활성화가 일어날 수 있음을 관찰했다(도 2c, 도 3b). 본 발명자들은 ADAR 활성이 최적화되어 활성화를 증가시키고 배경을 감소시킬 수 있는지를 결정하기 시작했다. ADAR 센서를 최적화하고 이 배경을 최소화하기 위해, 본 발명자들은 프레임 시프트된 EGFP 전사체 또는 iRFP 전사체를 표적으로 하는 69nt 가이드 가이드들과 함께 상이한 ADAR1 및 ADAR2 돌연변이체의 패널을 선택하고 테스트했다(도 6, 도 7). 도 6a는 왼쪽에서 오른쪽으로 ADAR1의 p150 이소형, ADAR1의 p110 이소형, ADAR2 및 MS2 코트 단백질(MCP)-ADAR 융합 단백질(MCP-ADAR)을 포함하여 테스트된 상이한 ADAR의 개략도를 보여준다. fl = 전장. DD = 데아미나제 도메인. 촉매 도메인 돌연변이는 개략도에 표시되지 않았으며; 모두 데아미나제 도메인에 있다.

[0133] 본 발명자들은 비특이적 편집(Cox et al. 2017; Matthews et al. 2016)을 감소시키기 위해 ADAR-dsRNA 상호작용을 불안정하게 하도록 설계된 특정 돌연변이체와 함께 전장 인간 ADAR 이소형(ADAR1 p110, ADAR1 p150 및 ADAR2)(Galipon et al. 2017; Merkle et al. 2019) 및 그들의 촉매 데아미나제 도메인을 스크리닝했다. 본 초기 외인성 ADAR 선택인 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)는 프레임 시프트된 EGFP 전사체에서 최상을 수행하였지만, 본 스크린의 여러 후보들은 표적 공동 혈질감염시 유사한 활성화를 보였으며(도 6b), 두 개의 표적 세트에서 배경이 감소되었다(도 7). 본 발명자들은 또한 다양한 센서를 사용하여 (도 8a) MCP-ADAR2dd 외인성 보충, (도 8b) ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, (도 8c) ADAR2 외인성 보충 및 (도 8d) 외인성 ADAR 보충 없음에 대한 정지 코돈 편집 속도를 조사했다. 이러한 후보들의 편집 속도도 조사했다. 편집 속도는 추가의 스크리닝을 위해 선택된 ADAR 변이체의 표적의 존재하 및 부재하에 UAG 정지 코돈의 UIG로의 변환을 보여주는 RNA 서열분석 데이터를 통해 계산된다(도 8).

[0134] 가이드 선택이 센서의 전반적인 민감도에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 본 발명자들은 직교 패널에서 여러 가이드 서열 및 표적에 대한 상위 ADAR 후보를 스크리닝했다(도 10). 먼저, 본 발명자들은 정확하게 일치된 ADAR 센서 및 표적 전사체에서만 배경 위의 활성화를 관찰했다(도 9). ADAR1 p150은 표적의 부재하에 일반적으로 낮은 전반적인 배경 신호로 구동된 4개의 표적 중 3개에서 최고 배수 활성화를 보인 반면, MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)는 일반적으로 높은 수준의 절대 신호로 인해 EGFP 표적에서 최상으로 수행되었지만 전반적인 활성화를 감소시킨 다른 표적에서 더 높은 배경으로 어려움을 겪었다(도 6, 도 10, 도 11, 도 12).

[0135] 센서 패널의 배경 대 활성화의 분석은 또한 다양한 센서를 사용하여 (도 13a) MCP-ADAR2dd 외인성 보충, (도 13b) ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, (도 13c) ADAR2 외인성 보충 및 (도 13d) 외인성 ADAR 보충 없음에 대해서 수행했다.

[0136] 최적의 외인성 ADAR 양도 또한 조사했다(도 14). 적정 실험에서, HEK293 세포는 표적(IL6)의 양이 20ng로 고정된 테트라사이클린 유도성 IL6 실험에서 10ng에서 100ng까지 다양한 양의 MCP-ADAR2dd뿐만 아니라 10ng에서 100ng까지 다양한 양의 3개 부위 결합 결합력 IL6 센서 가닥으로 형질감염시켰다. 배수 변화는 +표적 그룹과 -표적 그룹 사이의 정규화된 루시퍼라제 비율을 나타낸다.

[0137] **실시예 5. 생물학적 센서를 위한 프로그래밍 가능한 A 대 I(G) 대체를 위한 RNA 편집(REPAIR) 시스템의 사용**

[0138] 다음으로, 프로그래밍 가능한 A 대 I(G) 대체를 위한 RNA 편집(REPAIR) 시스템의 타당성을 이러한 유전자 센서를 트리거하는 메커니즘으로 활용할 수 있는지 여부와 관련하여 평가했다. REPAIR 시스템은 ADAR2 분자의 데아미나제 도메인에 융합된 촉매적 활성 Cas13b 효소의 융합으로 구성된다. K370A 돌연변이를 혼입하는 촉매적 비활성 Cas13b 효소도 또한 ADAR2 분자의 데아미나제 도메인에 융합되어 Cas13b 활성이 없는 융합 단백질(REPAIR K370A)을 형성한다.

[0139] EGFP를 표적으로 하도록 설계된 두 개의 가이드 가닥뿐만 아니라 EGFP를 표적으로 하지 않도록 설계된 음성 대조군을 임의의 외인성 ADAR 분자를 첨가하지 않고 HEK293FT 세포에 도입했다(도 15, 파란색 막대). 가이드 가닥은 또한 REPAIR 분자(도 15, 빨간색 막대)와 동시에 또는 촉매적 비활성 REPAIR K370A 분자(도 15, 흰색 막대)와 동시에 HEK293FT 세포에 도입하였다. Cas13b의 표적이 되도록 설계된 가이드 1 및 2는 내인성 ADAR 발현에만 의존하는 세포와 비교하여 세포에서 루시퍼라제 발현의 증가를 나타내지 않았다. 그러나, Cas13 활성이 꺼진 경우(REPAIR K370A), 가이드 1은 내인성 ADAR 발현에만 의존하는 세포와 비교하여 루시퍼라제 발현의 4배 증가를 나타냈다. 이러한 발현의 증가는 REPAIR 시스템이 이러한 본 개시내용의 유전자 센서와 함께 사용될 수 있는 가능성을 강조한다.

[0140] **실시예 6. 루시퍼라제 발현 증가를 위한 다양한 가이드 가닥 특성의 조사**

[0141] 다음으로, 가이드 가닥 설계의 특성을 변경하여 어느 변수가 유전자 센서의 효율성과 발현을 증가시키기 위해 조정될 수 있는지를 결정하였다. 도 16은 다양한 가이드/ADAR 조합에 대한 배수 루시퍼라제 발현을 나타내는 히트맵을 보여준다. 외인성으로 도입된 전장 ADAR(열 2)은 일관되게 루시퍼라제 발현의 최고 배수 증가 를 나타냈다. 그러나, MS2 작용제로서 설계된 가이드 가닥의 경우에는 그렇지 않았으며, 이는 도입된 ADAR에 관계없이 대체로 일관된 발현을 나타냈다.

[0142] 실시예 4에서 더 낮은 배경 수준을 선택하여, 본 발명자들은 ADAR1 p150 구조로 센서를 더욱 최적화하기 시작했다. 결합 안정성과 표적 검색 시간을 모두 개선하기 위해, 조기 정지 코돈을 중심으로 가이드 길이의 증가(Qu et al. 2019)를 구성적 iRFP 표적에 대해 테스트했다. 가이드 길이가 51nt에서 600nt로 증가함에 따라 센서 활성화는 2.2배 내지 18.22배 개선되었다(도 17b). 추가로, 표적이 존재할 때 모든 가이드 길이에 대해 세포당 mNeon 발현 수준 분포에서 현저한 이동이 관찰되었으며(도 17c, 도 18a), 더 긴 가이드 길이에서 더 실질적인 mNeon(+) 집단이 관찰되었다. 한편, 표적 부재하의 mNeon(+) 세포 퍼센트는 모든 가이드 길이에 대해 일관되게 5% 미만으로 유지되었다. 가이드 길이 600nt에서, 표적 존재하에서 66.7%의 mNeon(+) 세포가, 표적 부재하에서는 1.6%가 관찰되어 표적 mRNA 발현에 기초하여 세포 집단을 분리할 수 있는 강력한 기능을 시사한다.

[0143] 실시예 4에서 두 개의 최상 성능 ADARS인 ADAR1 p150 및 MCP-ADAR2dd(E488Q,T490A)는 배경을 줄이거나 활성화를 증가시킴을 통해 최적의 신호를 달성했다. ADAR 효소를 조작할 때 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)가 루시퍼라제 센서(도 20)로 가장 높은 활성화를 보였기 때문에, 본 발명자들은 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A)와 결합될 때, 배경을 낮추는 가이드 조작 전략이 가장 최적의 센서 활성화를 초래할 것이라는 가설을 세웠다.

[0144] HEK293FT 세포에서 거의 발현되지 않는 전사체인 IL6 mRNA를 표적으로 하는 새로운 센서가 설계되었고(Uhlen et al. 2015) 외인성 형질감염을 통한 IL6 mRNA의 보충 및 dox-유도성 프로모터의 제어하에, IL6 mRNA가 있는 통합 라인의 생성 모두를 가능하게 하여 민감도 테스트를 위해 낮은 수준의 IL6 발현을 조절할 수 있다(도 20 참조).

[0145] 표적의 부재하에 배경 신호의 증가로 인해, 잠재적으로 더 긴 가이드 영역 내에서 정지 코돈의 번역초과로 인해 (도 21 (a) MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) 외인성 보충, (b) ADAR1 p150 이소형 외인성 보충, (c) ADAR2 외인성 보충 및 (d) 외인성 ADAR 보충 없음), 본 발명자들은 MS2 헤어핀 루프를 도입하여 비정상적인 번역을 차단하도록 가이드 영역을 조작하였고(Chao et al. 2008), 이는 가이드:표적 듀플렉스에 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) 단

백질을 모집하는 추가 이점을 제공한다(도 23). 본 발명자들은 IL6 전사체를 표적으로 하는 루시퍼라제 센서로 증가된 가이드 영역에 대한 본 조사를 반복하고, 가이드 가닥에 하나의 결합 부위만이 존재할 때 MCP-ADAR2dd(E488Q, T490A) 작제물(도 22)을 사용하여 81nt 가이드를 지나 ADAR 센서 활성화의 배수 변화의 유의한 감소를 발견했다. 그러나, 센서/가이드 가닥에 MS2 헤어핀 루프와 추가의 조작된 가이드 결합 영역("결합력 결합 영역"이라고 함)의 첨가가 감도를 향상시켰는지를 결정하기 위해 구현된 가이드 가닥 설계에 구조적 첨가 및 변형은 ADAR 센서 활성화의 유의한 증가를 나타냈다(도 22). 도 22는 상이한 형식의 가이드/센서 가닥에 대한 배수 변화를 결정하기 위한 실험의 결과를 나타낸다. HEK293 세포는 (IL6 표적의) 나이브 역보체 및 추가의 결합력 영역을 갖는 MS2 헤어핀을 포함하는 센서(x-축; 51bp 센서, 연속적 171bp 결합 영역을 갖는 센서, 2개의 MS2 헤어핀으로 분리된 171bp 결합력 영역을 갖는 센서, 단일 연속적 225bp 결합 영역을 갖는 센서, 4개의 MS2 헤어핀으로 분리된 225bp 결합 영역을 갖는 센서, 연속적 279bp 결합 영역을 갖는 센서, 6개의 MS2 헤어핀으로 분리된 279bp 결합 영역을 갖는 센서 및 비표적 센서)로 형질감염시켰다(리포펙타민 3000, Thermo Fisher Scientific). MS2 헤어핀에 의한 결합 영역의 분리는 모든 다양한 결합력 영역 길이에서 표적의 발현을 유의하게 증가시켰다. 전장 ADAR 2(ADAR2 FL), ADAR1의 p150 이소형, 내인성 ADAR1, 및 인간 ADAR2의 데아미나제 도메인에 융합된 MS2 코트 결합 단백질의 융합 단백질을 포함한 여러 유형의 ADAR 단백질을 테스트했다. 발현의 배수 변화(y-축)는 -표적 조건에 대한 +표적 조건의 원시 루시퍼라제 값으로 계산된다.

[0146] ADAR 센서 활성화는 5개 부위 결합력 결합 가이드에서 가장 높았으며, 무중단 가이드 설계에 비해 약 70배의 활성화와 상당히 더 낮은 배경을 달성했다(도 27). 결합력 결합 가이드는 모든 외인성 ADAR 작제물에 대한 성능을 개선시켰지만, MCP-ADAR2dd 보충으로 최대 성능 향상을 보여주었다. 5개 또는 7개 결합 부위를 갖는 결합력 결합 가이드는 내인성 ADAR에만 의존하여 검출 가능한 활성화를 생성할 수 있었다. 도 23은 가능한 MS2 헤어핀/결합력 변형의 여러 형식을 나타내고, 도 24는 결합력 센서의 설계 가이드와 입력 표적 서열에 대한 결합력 센서를 자동으로 생성하는 사용하기 쉬운 소프트웨어 프로그램을 제공한다(github.com/abugoot-lab/ADAR SENSOR).

[0147] 본 발명자들은 최고 성능의 IL6 표적 조작된 가이드 RNA가 내인성 ADAR을 활용하여 세포로 형질감염된 합성 IL6 표적을 감지할 수 있는지 여부를 테스트했다. 외인성 ADAR1p150 보충이 RADARSv2의 성능을 향상시켰지만, 본 발명자들은 내인성 ADAR을 사용하여 페이로드의 50배 이상 활성화를 관찰하였다(**도 52**).

[0148] 결합력 결합 가이드 개념을 추가로 탐구하기 위해, 본 발명자들은 결합 부위 사이의 간격(5, 30 및 50nt)을 변경했다. 결합 부위 사이의 길이는 MS2 헤어핀 직전부터 출발하여 상보성의 또 다른 영역까지 가이드 가닥 상의 뉴클레오티드의 수를 나타낸다. 표적 전사체에서 함께 더 가까운 결합 부위는 최고 활성화를 초래했다(도 25).

[0149] 본 발명자들은 또한 결합력 결합 가이드 개선이 직교 방법과 결합되어 추가 정지 코돈과 같은 번역적 번역초과를 차단할 수 있는지를 탐구했다. 본 발명자들은 단일 정지 7개 결합력 영역 센서 또는 이중 정지 7개 결합력 영역 센서를 최종 결합력 영역 중 추가의 정지 코돈과 비교했다(도 26). 도 26b는 단일 및 이중 정지 센서 사이의 루시퍼라제 페이로드의 배수 변화를 나타낸다. 이중 정지 센서는 ADAR에 따라 단일 정지 센서에 비해 배수 변화의 유의한 증가를 나타냈다. 본 발명자들은 추가 정지 코돈이 5-부위 결합력 결합 가이드의 성능을 초과하여 7-부위 결합력 결합 가이드의 배수 활성화를 증가시켰음을 발견했다(도 28a). 이러한 개선은 배경 활성화 속도의 감소와 표적 존재하에 정지 코돈의 편집 속도의 증가 둘 다에 의해 구동되었다(도 28b, 도 8).

[0150] 잠재적 표적 전사체에 CCA 코돈이 풍부함에도 불구하고, 본 발명자들은 결합력 가이드 설계의 점진적 조작이 불일치 허용 오차를 개선하여 표적화 유연성을 증가시킬 수 있는지 탐구했다. 본 발명자들은 또한 나이브 51bp 센서, 3-결합력 센서 및 5-결합력 센서 사이의 16가지 가능한 불일치(일반 CCA로부터)에서 표적 불일치 허용 오차(도 29A)를 테스트했다. 본 발명자들은 5' 시토신 또는 3' 아데노신(nCn)에 대한 모든 뉴클레오티드 변화를 포괄하는 16개의 표적을 설계했다. 이러한 다양한 코돈에 걸쳐 UAG를 함유하는 가이드를 테스트한 결과, 본 발명자들은 구아닌 또는 시토신 불일치가 일반적으로 아데노신 또는 우리딘 불일치보다 더 내성이다는 것을 발견했다(도 29b). 또한, ACA 및 ACU 표적을 제외하고, 5-부위 결합력 결합 가이드 ADAR 센서 설계가 최상의 활성화 배수 변화를 가졌다(도 30).

[0151] 단백질 페이로드의 모듈성은 또한 전사체의 생체내 순환을 허용하는 Hibit 페이로드(Schwinn et al. 2018)와 같은 작은 페이로드를 허용한다. 원형 RNA는 향상된 체류 시간과 최소한의 면역독성을 위한 플랫폼을 제공하며(Katrekar et al. 2019), 본 발명자들은 작은 페이로드를 갖는 ADAR 센서를 원형화하여 이러한 특성을 활용할 수 있다는 가설을 세웠다(도 31a). 두 가지 형태의 짧은 원형 센서가 처음에 개발되었다. 일반 원형 센서는 RtcB 리가제의 존재하에 시험관내에서 원형화되는 U6 프로모터에 의해 구동되는 이중 트위스터 리보자임 시스템

(Litke and Jaffrey 2019) 백본이다. 일반 원형 센서는 또한 Hibit 태그를 함유하며, Hibit의 c-말단 단부에 정지 코돈이 있다. 본 발명자들은 원형 ADAR 센서가 표적(IL6) 특이적 방식으로 Hibit을 발현했음을 발견했다(도 31b). 신호 증폭을 위해, 본 발명자들은 페이로드 뒤의 정지 코돈을 제거하고 Hibit 태그의 어느 하나의 단부에 2A 펩티드를 삽입하여 롤링 서클 번역(RCT)을 통한 발현을 허용함으로써 이러한 원형 ADAR 센서를 무한 ADAR 센서로 증강시켰다(Abe et al. 2015). 이러한 롤링 서클 번역 센서는 Hibit에서 정지 코돈이 제거되고 T2ToA 펩티드가 삽입되어 원형 방식으로 리보솜 번역초과를 허용한다는 점을 제외하고는 일반 원형 센서와 유사하다. 이러한 원형 센서(IL6 표적)를 HEK293 세포로 형질감염시켰으며, 센서 활성화를 위해 다양한 길이의 센서를 비교했다. 더 긴 센서가 센서 활성화 배수 변화를 일관되게 증가시켰다. 본 발명자들은 롤링 서클 센서가 최소한의 배경 누출로 표적 특이적 방식으로 단백질을 발현할 수 있음을 발견했다(도 31b).

[0152] 본 발명자들은 센서 활성화 배수 변화에 대한 mRNA 변형의 효과를 조사했다. 합성 mRNA는 유용한 치료 양식으로 부상했지만, 전사체 특이적 방식으로 페이로드 발현을 제어하는 방법은 없다. 본 발명자들은 마우스 간세포에서 인간 SERPINA1 전사체를 발현하는 마우스 모델에서 전사체 특이적 발현을 위한 합성 mRNA ADAR 센서의 적용을 탐구했다. mRNA를 전달할 때, 숙주 면역 반응을 줄이기 위해 5' 메틸시토신(5mc) 및 슈도우리딘(Ψ)과 같은 염기 변형의 혼입이 필수적이지만(Kauffman et al., 2016), 이러한 변형은 ADAR 활성을 방해하여 mADAR 센서 기능에 영향을 미칠 수 있다.

[0153] 5-메틸시토신과 슈도우리딘의 혼입은 HEK293 세포에서 분석했다. mRNA 형질감염 24시간 전에, HEK293 세포에 MCP-ADAR2dd를 플라스미드로서 또는 직접 mRNA로서 보충했다. 테트라사이클린 유도성 IL6이 있는 IL6 센서도 사용했다. 본 발명자들은 증가된 Ψ의 양이 ADAR 센서의 활성화를 감소시킨 반면, 5mc는 최고 신호 활성화를 갖는 5mc의 25% 혼입으로 더 내성이었음을 발견했다(도 32).

[0154] 센서 활성화를 측정하기 위해 본 유도성 IL6 시스템을 사용하여, 본 발명자들은 외인성 ADAR1p150(**도 53a**) 또는 내인성 ADAR(**도 53b**)로 화학적으로 변형된 염기 및 형질감염된 변형된 IL6 감지 mRNA RADARS의 광범위한 패널의 상이한 수준의 혼입을 위한 mRNA RADARS 활성화에 대한 효과를 추가로 검정했다. 본 발명자들은 테스트된 모든 변형이 아마도 변형된 mRNA를 편집하는 ADAR1p150의 능력에 대한 간섭으로 인해 mRNA RADARS의 활성화를 감소시켰음을 발견했다. 변형 중에서, 본 발명자들은 5-메틸시토신 또는 5-메틸우리딘과 같은 변형된 염기의 50% 혼입이 외인성 ADARp150의 경우 가장 내성이었으며, 5-메틸시토신의 100% 혼입이 내인성 ADAR로 최고 활성화를 보였음을 발견했다. 이러한 수준의 변형이 숙주 면역 반응을 감소시키기에 충분한지를 결정하기 위해, 화학적으로 변형된 mRNA RADARS에 의한 인터페론 베타 관련 유전자의 유도를 검정했다. 본 발명자들은 변형된 염기의 25% 혼입 수준에서도 염증성 유전자의 최소 유도를 달성한다는 것을 관찰했다(**도 53c**).

[0155] 본 발명자들은 형질감염 분산에 대한 비율계량적 제어를 제공하기 위해 별도의 전사체에서 구성적 *사이프리디나 루시퍼라제*(Cluc)와 함께 RADARSv1이라고 하는 *가우시아 루시퍼라제*(Gluc) 페이로드 앞에 51nt IL6 전사체 감지 가이드를 함유하는 센서를 테스트했다(**도 54a**). 이 RADARSv1 설계와 외인성 ADAR1p150과의 공동 형질감염으로, 본 발명자들은 외인성 IL6 표적 발현의 존재하에 Gluc/Cluc 비율의 증가(**도 54b**, 원고의 나머지에서 RADARS 배수 활성화로서 정의된 조건 간 Gluc/Cluc 비율의 변화)로 정량화된 바와 같이, 약 5배 활성화(**도 54a**)를 관찰했다. ADAR1p150은 기질로서 긴 이중 가닥 RNA를 선호하기 때문에, 본 발명자들은 가이드 영역의 길이를 51nt에서 279nt로 적정하여 81nt에서 활성화의 완만한 증가를 초래했으며, 표적 RNA의 부재하에 배경 페이로드 발현의 증가로 인해 더 긴 길이에서는 활성화가 감소했다(**도 54a**, **도 54b**).

[0156] 부분적으로 번역적 번역초과 및 자가 폴딩으로 인해 표적의 부재하에 dsRNA 형성을 방지하기 위해 세 가지 전략을 사용했다. 첫째, 본 발명자들은 가이드 영역에 다수의 MS2 헤어핀 루프 산재 결합 부위를 도입하여 자가 폴딩을 방지하고 다가 결합을 가능하게 하는 2차 구조를 생성했다. 본 발명자들은 가이드의 MS2 루프 및 결합 부위의 수를 변경하여 조직화된 가이드 RNA(조작된 가이드 RNA)라고 하는 이러한 조작된 가이드를 최적화했다. RADARS 활성화는 MS2 헤어핀 루프가 산재된 5개의 결합 부위를 함유하는 조작된 가이드 RNA에서 가장 높았으며, 이는 무중단 가이드 설계와 비교하여 표적의 부재하에 배경 페이로드 발현을 감소시키고 약 20배 활성화를 달성했다(**도 54a**, **도 54b**).

[0157] 둘째, 본 발명자들은 조작된 가이드 RNA 앞에 있는 번역 가능한 개방 판독 프레임(ORF)의 길이를 증가시켜 종결을 촉진하고 리보솜 재개시를 방지했으며, 이는 업스트림 ORF 길이에 따라 달라지는 것으로 공지되어 있다. 본 발명자들은 5' 펩티드 길이를 0, 100 및 200개 잔기에서 테스트했으며, 200개 잔기에서 배경 번역적 번역초과를 크게 감소시켜(**도 55a**) 100배 초과의 활성화를 달성할 수 있었음을 발견했다.

[0158] 마지막으로, 본 발명자들은 모든 프레임에 걸쳐 번역 리보솜을 포획하기 위해 조작된 가이드 RNA 영역을 따라

+1 및 +2 프레임에서 정지 코돈을 조작했다. 이러한 프레임 외 정지 코돈 설계는 긴 5' 펩티드와 상승적으로 배경을 크게 감소시켜 약 200배 활성화를 생성했다. 본 발명자들은 향후 센서를 위한 통합 구조로서 구조화된 가이드, 업스트림 펩티드 및 프레임 외 정지 코돈을 혼입한 RADARSv2라고 하는 이 센서 설계를 선택했다(**도 54a, 도 55b**).

[0159] 본 발명자들은 전사체에 걸쳐 간격을 둔 14개의 CCA 부위에 걸쳐 조작된 가이드 RNA를 타일링하여 외인성으로 발현된 IL6, EGFP 및 뉴로펩티드 Y(NPY) 표적에 걸쳐 본 RADARSv2 설계를 평가했다. 본 발명자들은 RADARS 활성화는 주어진 표적에 대해 선택된 혼성화 부위에 따라 달라지지만, 대부분의 센서가 표적의 존재하에 최대 1,000배 활성화로 상당한 페이로드 활성화를 보였으며, 이는 RADARSv2 설계의 일반화 가능성을 보여준다는 것을 발견했다(**도 56a**). 페이로드 발현이 RNA 편집으로 인한 것임을 확인하기 위해, 본 발명자들은 14개의 IL6 표적 조작된 가이드 RNA의 패널로 형질감염된 세포에서 RNA를 수거하고 차세대 서열분석으로 편집을 정량화했다. 표적 전사체의 존재하에, 14개의 조작된 가이드 RNA 모두가 평균 35.1% +/- 11.4%로 15% 초과의 편집을 보였다. 표적 전사체의 부재하에, 14개의 조작된 가이드 RNA 중 13개가 최소한의 편집(0.32% +/- 0.34%)을 보였다. 본 발명자들은 또한 비표적 센서의 최소한의 편집을 관찰하여 RADARS 센서의 RNA 편집이 특정의 조작된 가이드 RNA 표적 인식을 필요로 한다는 것을 재확인했다(**도 56b**).

[0160] **실시예 7. 유전자 센서의 정량적 및 상관 관계 분석**

[0161] 상기 유전자 센서가 "용량 민감성" 센서로서 정확하게 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, 유도성 EGFP 전사체를 HEK293FT 세포에 도입했다. 이 EGFP 전사체를 독시사이클린 유도성 프로모터의 제어하에 둔 다음, 세포를 0ng/mL, 8ng/mL, 40ng/mL 또는 200ng/mL의 독시사이클린에 노출시켜 EGFP 전사체의 발현을 변화시켰다. 외인성 ADAR이 도입되지 않은 HEK293FT 세포(도 6a)에서는, 어느 가이드 가닥도 루시퍼라제 활성의 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 가이드 가닥 3은 용량 민감도에 대한 경향을 나타냈다(도 33a, 흰색 막대).

[0162] 전장 ADAR2가 가이드 가닥과 동시에 세포에 도입되었을 때(도 33b), 가이드 가닥 3은 명확한 용량 민감도를 나타낸 반면, 가이드 1은 약간의 용량 민감도를 가졌지만 그 정도는 덜했다(도 33b-c, 흰색 막대). 200ng/mL 용량의 독시사이클린이 투여된 세포는 EGFP 전사체를 구성적으로 발현하는 세포와 유사한 루시퍼라제 활성을 보였다. 독시사이클린의 용량이 감소함에 따라, 세포에서 식별된 루시퍼라제 활성의 상응하는 감소가 있었다. 이와 동일한 경향은 전장 ADAR2 및 가이드 가닥 1에 동시에 노출된 세포에서 나타난다(도 33b, 파란색 막대). 도 34는 가이드 가닥 1(도 34a) 및 가이드 가닥 3(도 34b)을 표적으로 하는 EGFP가 세포에 도입되는 경우의 용량 의존적 리포터 발현을 묘사한다. 루시퍼라제의 배수 활성화도 이러한 용량 의존적 궤적을 따른다(도 33c). 도 35는 GFP 형광의 함수로서 루시퍼라제 활성 수준을 묘사한다. 이러한 결과는 이러한 유전자 센서가 단순히 "온-오프" 센서로서가 아니라 전사체 수준의 정량적 센서로서 귀중할 수 있음을 나타낸다.

[0163] 본 발명자들은 외인성 ADAR1p150과 내인성 ADAR 사이에서 RADARSv2의 성능이 어떻게 달라지는지를 비교하기 위해 siRNA 교란 실험으로 백만당 최고 전사체(TPM) 유전자(RPS5)와 최저 발현된 유전자(KRAS)에 대한 표적 발현을 비교했다. 본 발명자들은 두 센서 모두 외인성 ADARp150 보충 없이 siRNA 녹다운을 검출하였지만, RPS5 센서는 외인성 ADAR의 혜택을 더 많이 받았으며(**도 57**), 이는 더 큰 발현 변화가 외인성 ADAR의 혜택을 더 많이 받을 수 있음을 시사한다는 것을 관찰했다.

[0164] ADAR 센서의 정량적 값을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 본 유도성 IL-6 발현 시스템의 형질전환된 버전 및 바이러스 통합 버전 모두로 광범위한 범위의 발현 수준을 생성하고 이중 정지 코돈이 있는 7-부위 결합력 결합 가이드의 루시퍼라제 반응을 측정했다(도 36a). 본 발명자들은 ADAR 센서 루시퍼라제 활성화가 qPCR에 의해 확인된 바와 같이 표적 도입유전자의 농도와 선형으로 상관관계가 있음을 발견했다(도 37, 도 38, R2 = .96). 이에 따라, ADAR 센서 가이드에서 첫 번째 정지 코돈의 RNA 편집은 유전자 발현 수준과 강한 상관관계를 보였으며(도 39), 이는 ADAR 센서가 RNA 편집 및 페이로드 수준 모두에서 전사체를 정량적으로 감지할 수 있음을 보여준다.

[0165] RADARSv2로 단일 세포 측정을 가능하게 하도록, 본 발명자들은 현미경 검사 및 유동 기반 판독을 위한 형광 페이로드를 조작했다(**도 58a**). 본 발명자들은 형광 센서를 업스트림 mCherry 정규화 대조군을 함유하는 단일 전사체로 설계했으며, 최고의 EGFP 표적 조작된 가이드 RNA로부터 자가 절단 펩티드 P2A 서열로 분리한 다음 mNeon 페이로드 앞에서 자가 절단 펩티드 서열 T2A에 의해 분리했다. 본 발명자들은 외인성 ADAR1p150 또는 프레임 시프트된 비형광 EGFP 표적 전사체의 조합을 포함하거나 포함하지 않고 EGFP 표적 RADARS로 HEK293FT 세포를 형질감염시켰다. 본 발명자들은 표적 전사체의 존재하에 현미경 검사로 mNeon 형광 신호를 관찰하고, 표적 전사체의 부재하에 무시할 수 있는 배경을 관찰했다(**도 58a**). 유세포 분석에 의한 형광 신호의 정량화는 표적

전사체의 부재하에 1.00%의 mNeon/mCherry 양성 세포로부터 표적 전사체의 존재하에 56.1%의 mNeon/mCherry 양성 세포로 mNeon/mCherry 비율의 분포에서 이동을 나타냈고, 기하학적 평균의 비율이 38배 증가했다(**도 58b**, **도 59a-c**).

[0166] RADARS의 정량적 정확도를 추가로 탐구하기 위해, 본 발명자들은 테트라사이클린 유도성 IL-6 발현 시스템의 형질감염된 버전 및 바이러스 통합된 버전을 사용하여 광범위한 범위의 발현 수준을 생성하고 최고의 IL-6 감지 조작된 가이드 RNA로 루시퍼라제 반응을 측정했다. RADARS 루시퍼라제 활성화는 정량적이었으며, qPCR에 의해 확인된 바와 같이 표적 도입유전자의 농도와 선형 상관관계를 가졌다(**도 60a**, **도 60b**, R2 = 0.95). 또한, RADARS 활성화는 형질감염된 센서의 양에 대해 불변이었고, 센서 부하의 큰 적정에 걸쳐 강력한 활성화 속도는 전반적인 센서 활성화와 무관하게 총 센서 출력의 조정을 가능하게 했다(**도 60c**).

[0167] 본 발명자들은 또한 검증을 위해 HEK293FT 세포에서 약 10,000에서 약 10까지의 TPM에 이르는 10개의 상이한 전사체의 패널에 대해 센서를 설계했다. 각 전사체에 대해, 본 발명자들은 8개의 상이한 표적 조작된 가이드 RNA와 8개의 비표적 조작된 가이드 RNA를 비교했다. siRNA 형질감염 후, 본 발명자들은 이러한 10개 유전자의 녹다운을 qPCR에 의해 검증했고(**도 61**), 비표적 센서 대조군과 비교하여 각 전사체에 대한 RADARS 신호의 현저한 감소를 관찰했다. 조작된 가이드 RNA 견고성은 발현과 관련이 있었다: 고도로 발현된 유전자의 경우, 8개의 상이한 표적 조작된 가이드 RNA의 대부분은 표적 전사체 녹다운을 검출했지만, 발현 수준이 감소함에 따라 더 적은 조작된 가이드 RNA가 녹다운을 성공적으로 검출했다(**도 63a**). 낮은 TPM에서 RADARS 민감도가 떨어지고 있음에도 불구하고, 테스트된 8개 중 적어도 하나의 조작된 가이드 RNA가 전사체 녹다운을 유의하게 검출할 수 있었다(**도 62a**). 이러한 데이터는 RADARS가 광범위한 발현 수준에 걸쳐 유전자 발현의 상대적 변화에 민감하다는 것을 시사한다. 10개의 표적 전사체 각각에 대해 최상 성능의 센서를 위한 UAG 정지 코돈의 편집 속도를 측정하여(**도 62b**), 본 발명자들은 전반적인 편집 속도는 낮지만 10개의 유전자 모두에 대해 표적이 녹다운되었을 때 편집 속도의 통계적으로 유의한 감소가 있음을 발견했다. RADARS는 턴오버(turn-over) 속도가 낮은 내인성 표적에 비해 과발현되기 때문에, 정지 코돈의 편집 속도는 표적의카피 수 변동에 덜 민감할 것이다.

[0168] 다음으로, 본 발명자들은 내인성 표적의 유전자 발현의 변화를 측정하여 RADARS의 민감도를 결정하고자 했다. 다양한 내인성 전사체 발현 수준에 걸쳐 RADARS를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 센서를 적용하여 siRNA를 통한 전사 하향 조절을 측정하였다(**도 63**). 본 발명자들은 고도로 발현된 유전자 RPL41, GAPDH 및 ACTB와 중간 내지 낮게 발현된 유전자 HSP90AA1, PPIB 및 KRAS로 나뉜 6개의 내인성 유전자를 표적으로 하는 상업적으로 검증된 siRNA 풀을 활용했다. 각 전사체에 대해, 본 발명자들은 먼저 녹다운에 대한 최고 민감도에 대해 8개의 상이한 조작된 가이드 RNA를 비교했다(**도 63a**). 다음으로, 본 발명자들은 siRNA의 양을 적정하여 다양한 발현 수준을 생성하고, 이는 qPCR로 확인하고, 외인성 ADAR1p150이 보충된 최상의 조작된 가이드 RNA를 사용하여 발현 수준의 변화를 추적했다. 본 발명자들은 6개의 유전자 모두에 대해 RADARS가 높은 피어슨 상관관계(R>0.86, **도 61b**)로 qPCR 측정 전사체 수준을 추적한다는 것을 관찰했다. 본 발명자들은 HEK293FT 세포에서 13의 TPM(백만당 전사체)으로 발현되는 KRAS의 경우(Karlsson et al., 2021), 원시 RADARS 활성화 배수 활성화가 아마도 이러한 낮은 발현 수준에서 민감도의 손실로 인해 qPCR 측정된 배수 변화에서 벗어난다는 것을 발견했다. 그러나, RADARS 반응은 여전히 qPCR 결정 KRAS 수준과 높은 상관 관계가 있었다(R=0.93, **도 61b**).

[0169] 다음으로, 본 발명자들은 열 충격 계열 유전자의 상향 조절을 유도하는 세포 열 충격 모델을 사용하여 RADARS가 내인성 전사체의 상향 조절을 감지할 수 있는지 여부를 조사했다. 본 발명자들은 동적 열 충격 반응 단백질인 *HSP70*을 표적으로 하는 RADARSv2 조작된 가이드 RNA를 설계하고, 그들을 외인성 ADAR1p150과 함께 HeLa 세포로 형질감염시킨 후 세포를 42℃에서 열 충격에 노출시켰다(**도 64a**). RADARS는 qPCR과 강한 일치성을 보였고, 최고의 HSP70 표적 조작된 가이드 RNA는 qPCR로 측정된 *HSP70* 전사체 발현 수준의 7.2배 증가에 비해 열 충격에 대한 반응으로 5.9배 활성화를 생성한다(**도 64b**). 이러한 결과는 RADARS가 내인성 전사체의 상향 조절에 민감하며, 높은 충실도로 상대적 유전자 발현 변화를 검출할 수 있음을 시사한다.

[0170] **실시예 8. 로직 게이트**

[0171] 본 발명자들은 또한 본 개시내용의 ADAR 센서가 AND 게이트 및 OR 게이트를 포함할 수 있는 로직 시스템으로 다중화될 수 있는지 여부를 결정하기 위해 착수했다. 이러한 AND OR 접근법은 도 40a(AND) 및 도 40b(OR)에 개략적으로 도시되어 있다. AND 게이트는 두 표적 가닥이 존재하는 경우에만 페이로드를 완전히 전달할 수 있다. 그러나, OR 게이트는 둘 다가 아닌 표적 가닥 중 어느 1개의 존재하에 페이로드를 전달할 수 있다. 기초적인 AND 게이트를 생성하기 위해, 본 발명자들은 각각 EGFP와 IL6을 표적으로 하는 두 개의 단일 51nt 가이드를 MS2 헤어핀 루프와 함께 연결했다. 그러나, 이 설계는 낮은 신호와 배경 번역초과의 조합으로 인해 성능이 좋지 않

았다(도 40a).

[0172] AND 게이트 신호를 개선하기 위해, 본 발명자들은 RADARSv2 설계를 사용했으며, 생성되는 AND 게이트 센서가 표적 특이적 방식으로 작동하여 단일 표적 조건에서 최소한의 누출만으로 두 표적 모두 완전히 활성화되어야 한다는 것을 발견했다(도 65a, 도 65b). AND 로직 가닥은 하나의 표적 RNA만 존재할 때 단지 1.3-1.5배 활성화와 함께 두 표적 전사체의 존재하에서는 36배 활성화를 나타냈다(**도 65b**).

[0173] OR 게이트 로직을 조작하기 위해, 본 발명자들은 EGFP와 IL6을 표적으로 하는 두 개의 5-결합 부위 결합력 센서를 공동 형질감염시켰다. 이러한 센서들은 OR 게이트와 일치하는 방식으로 EGFP 또는 IL6 표적 전사체에 반응했다(도 41b). OR 로직 센서는 개별적으로 각 유전자의 존재하에 현저하게 증가된 배수 변화를 나타냈으나, 두 유전자의 부재하에서는 그렇지 않았다. 전체적으로, 이러한 결과는 ADAR 센서의 모듈성이 살아있는 세포의 mRNA에 대해 논리적인 계산이 수행될 수 있도록 함을 시사한다.

[0174] OR 게이트 로직을 개선하기 위해(**도 66a**), 본 발명자들은 EGFP 및 IL6 전사체를 표적으로 하는 두 개의 조작된 가이드 RNA RADARSv2(업스트림 ORF, 프레임 외 정지 코돈)를 공동 형질감염시키고, 센서가 OR 게이트와 일치하는 방식으로 EGFP 또는 IL6 표적 전사체에 반응한다는 것을 확인했다(**도 66b**).

[0175] **실시예. 9 표적 세포에서 아폽토시스를 유도하기 위한 ADAR 센서의 사용**

[0176] 본 개시내용의 ADAR 센서가 비-리포터 페이로드에 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 ADAR 센서가 표적 세포 그룹에서 아폽토시스 세포 사멸을 유도할 수 있는지를 결정했다. 세포 상태 특이적 사멸를 위해 ADAR 센서를 적용하기 위해, 본 발명자들은 치료적으로 관련된 i카스파제-9로 페이로드를 조작했다(Straathof et al. 2005)(도 42a). i카스파제 페이로드는 인간 IL6을 표적으로 할 수 있는 센서 가닥으로 조작되었다. 포유류 세포를 카스파제 ADAR 센서, 표적 및 MCP-ADAR2dd로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 세포를 신선한 배지에 1:5로 분할하고 +약물 샘플에 10nM의 AP20187(Sigma Aldrich)을 보충했다. 24시간 추가 성장 후, 세포를 CellTiter-Glo 발광 세포 생존력 검정(Promega)으로 생존력에 대해 검정했다. 대조군 카스파제는 스크램블된 센서 영역이 있는 센서 가닥(즉, IL6을 특이적으로 표적으로 하지 않음)과 개입 정지 코돈이 없는 카스파제였다. CellTiter-Glo 검정(Promega)을 사용하여, 세포 사멸을 -표적 그룹에 대한 +표적 그룹의 세포 용해물의 발광 값의 배수 변화로서 측정했다. 본 발명자들은 카스파제 앞에 이중 정지 코돈 7개 결합력 가이드를 사용하여 IL6 센서를 융합하면 IL6 유도의 부재하에 최소 독성으로 IL6 발현 세포를 선택적으로 사멸시켰다는 것을 발견했다(도 42b, c). IL6 반응성 카스파제는 아폽토시스 세포 사멸의 유도에서 현저한 증가를 나타냈고, 이는 ADAR 센서가 표적 세포 그룹에서 세포 사멸을 유도하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다. 도 42b 참조. 표적 전사체가 있는 세포 및 없는 세포에서 IL6 반응성 카스파제로 처리된 세포와 카스파제는 있지만 정지 코돈이 없는 세포의 세포 생존 퍼센트도 분석했다(도 42c).

[0177] 다음으로, 본 발명자들은 조작된 가이드 RNA를 i카스파제-9 페이로드와 결합하여 세포 특이적 사멸을 위해 고도로 특이적인 SERPINA1 표적 조작된 가이드 RNA를 사용했다(**도 67a**)(Straathof et al., 2005). 본 발명자들은 ADARp150을 갖는 SERPINA1-i카스파제9 RADARS를 A549, HeLa 및 HepG2 세포로 공동 형질감염시키고, 형질감염 48시간 후 세포 생존력을 검정했다. 본 발명자들은 SERPINA1-표적 RADARS-i카스파제가 다른 세포 유형에서 최소한의 독성으로 HepG2 세포를 선택적으로 사멸시켰으며, 비표적 음성 대조군은 차별적인 사멸을 나타냈지 않았음을 발견했다(**도 67b**, **도 67c**).

[0178] **실시예 10. 세포 상태 및 세포 유형을 추적하기 위해 ADAR 센서를 사용**

[0179] 개발된 ADAR 센서가 세포 상태를 추적하는 데 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, 먼저 HeLa 세포의 열 충격 반응을 조사했다. 두 세트의 Hela 세포는 HSP70 및 HSP40을 포함한 열 충격 계열 유전자를 표적으로 하도록 설계된 가이드와 함께 ADAR 센서로 형질감염시켰다. HSP70 및 HSP40은 시험관내 열 충격 모델에서 상향 조절될 수 있다(도 43a, b). 5개 부위 또는 7개 부위 결합력 결합 가이드 설계를 갖는 ADAR 센서는 열 충격에 노출된 세포에서 HSP70 및 HSP40 상향 조절을 모두 검출했다(도 43a). HeLa 세포(ATCC CCL-2)를 HSP40 또는 HSP70 ADAR 센서로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 세포의 일부를 42℃(5% CO2)로 24시간 동안 이동시켰다. 배지는 24시간의 열 충격이 끝나면 수거하고, 루시퍼라제 측정을 실시했다. 열 충격의 결과로서 번역으로의 비특이적 변화를 제어하기 위해, 본 발명자들은 스크램블된 비표적 가이드를 형질감염시켰다. 비표적 가이드에 대해 정규화하여 본 발명자들은 열 충격에 대한 반응으로 ADAR 센서의 최대 3배 활성화를 발견했다(도 43c).

[0180] 본 발명자들은 열 충격 실험(**도 64**)을 RADARSv2 설계로 반복하여 ADAR 보충과 설계된 센서 없이 RADARSv2 센서만을 전달했다. 본 발명자들은 최상의 HSP70 센서(CCA42)가 Hela 세포 내부의 내인성 ADAR을 활용하여 열 충격

동안 HSP70의 상향 조절을 추적할 수 있음을 발견했으며(**도 68**), 따라서 내인성 ADAR을 사용하여 배포될 단일 구성 요소 RADARSv2 시스템의 타당성을 입증한다.

[0181] 세포 유형의 차이는 조직에서 유전자 발현의 주요 변이를 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은 ADAR 센서가 세포 유형 차이를 정확하게 추적할 수 있는지를 결정하기 시작했다. 먼저, 세포 유형 구분을 위한 마커 전사체를 식별하기 위해, 본 발명자들은 HEK293, Hela 및 HepG2 세포 간의 차등 유전자 분석을 수행하여(도 44a), 치료적으로 관련된 병원성 변이체(Boelle et al., 2019)가 있는 간 세린 프로테아제 억제제인 SERPINA1을 다른 세포주가 아닌 HepG2 세포에서만 발현되는 마커로서 선택했다(도 44b). 본 발명자들은 SERPINA1을 표적으로 하는 가이드가 있는 ADAR 센서 패널을 설계하고 HepG2와 Hela 세포를 구별하는 능력을 테스트하여, CCA30 가이드 설계가 HepG2와 Hela 세포 사이에서 최고 활성화 배수 변화를 보였음을 발견했다(도 44c). 본 발명자들은 SERPINA1(CCA30) 표적화 센서를 배경 ADAR 편집, 형질감염 분산, 단백질 생산 및 세 가지 세포 유형 간의 분비 차이를 제어하도록 설계된 비표적 스크램블 센서와 함께 세 가지 상이한 세포 유형으로 형질감염시켰다. 각 세포 유형은 MCP-ADAR2dd를 포함하거나 포함하지 않고 5개 결합력 영역에 연결된 MS2 헤어핀을 갖는 CCA30 SERPINA1 센서로 형질감염시켰다. 배수 변화(도 44d)는 세포 유형 간 단백질 생산/분비 및 배경 ADAR 동역학 차이를 설명하기 위해 스크램블 비표적 센서로 정규화된 SERPINA1 센서의 원시 루시퍼라제 값에 의해 계산된 다음, 세포 유형 비교를 위해 HEK 세포의 비율로 정규화된다.

[0182] 세 가지 세포 유형 모두에서 편집 속도의 정규화된 배수 변화는 또한 내인성 ADAR, 보충 ADAR 및 대조군의 존재하에 분석되었다(도 45). SERPINA1 전사체의 다양한 CCA 부위도 또한 표적으로 사용되었다.

[0183] 시험관내에서 간 특이적 세포 표적화를 모델링하기 위해, 본 발명자들은 Hepa-1-6 세포에서 인간 *SERPINA1* 전사체를 발현하고, 상위 CCA *SERPINA1* 센서를 mRNA로서 시험관내 합성하고, mRNA 센서 단독을 Hepa-1-6 세포로 형질감염시켰다. 본 발명자들은 CCA30 및 CCA35를 표적으로 하는 두 *SERPINA1* 센서가 모두 Hepa-1-6 세포에서 내인성 ADAR을 모집하여 *SERPINA1* 전사체의 유도를 감지할 수 있음을 발견했다(도 46).

[0184] 세포 유형 판별을 위한 RADARSv2를 평가하기 위해, 본 발명자들은 먼저 RADARS의 모듈형 특성을 활용하여 세포 집단의 영구적인 유전자 표지를 위한 시스템을 조작했다. 본 발명자들은 Cre 발현시 EGFP가 있는 조건부 영구적 표지 세포를 위한 이중 loxP 시스템을 설계하고, 이 리포터를 HEK293FT 세포에서 Cre 페이로드가 있는 IL6 표적 조작된 가이드 RNA 및 ADAR1p150과 함께 테스트했다. IL6 유도시, 본 발명자들은 표적 RNA의 부재하에 최소한의 신호로 EGFP 단백질의 상당한 생산을 관찰했다(**도 69a**, **도 69b**).

[0185] 그런 다음, 본 발명자들은 RADARSv2 설계를 사용하여 *SERPINA1*을 *SERPINA1* 발현이 없는 두 개의 비-간 세포주인 A549 및 HeLa와 비교하여 간 유래 세포주 HepG2의 차등 발현된 마커 유전자로서 식별했다(Karlsson et al., 2021). SERPINA1 표적 조작된 가이드 RNA를 사용하여 HepG2 세포에서 Cre를 선택적으로 활성화하여(**도 70a**), 본 발명자들은 이 센서를 ADAR1p150 및 Cre loxP 리포터를 사용하여 HepG2, Hela 및 A549 세포로 공동 형질감염시키고, 비표적 RADARS 작제물에 대한 활성화를 벤치마킹했다. 비표적 조작된 가이드 RNA는 임의의 세포 유형에서 리포터 활성화를 나타내지 않은 반면, 표적 조작된 가이드 RNA는 HepG2 세포에서만 유의한 EGFP 리포터 활성화를 보였다(**도 70b**, **도 70c**). 이러한 결과는 RADARS 시스템이 특정 마커를 기반으로 세포 유형을 구별할 수 있으며, 조작된 가이드 RNA 및 페이로드가 다양한 도입유전자의 세포 유형 특이적 발현을 위해 모듈식으로 결합될 수 있음을 확립한다.

[0186] **실시예 11. ADAR 센서의 생체내 사용**

[0187] ADAR 센서가 생체내에서 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 다음으로 마우스에서 SERPINA1 센서를 테스트했다. 본 발명자들은 아칼루시퍼라제(Akalu)를 발현하는 작제물에서 인간 SERPINA1의 CCA30 및 CCA35 부위를 표적으로 하는 ADAR 센서를 합성하였고, 이는 손쉬운 비침습적 발광 이미징을 허용하여 세포 특이적 ADAR 센서 활성화를 확인하도록 한다(Yeh et al. 2019)(도 47). 생물발광 이미징 전에, 8 내지 10주령 알비노(Albino) B6 및 NSG-PiZ 마우스를 3% 이소플루란으로 마취시키고, 생체내-jetRNA 형질감염 시약(Polyplus)을 사용하여 안구뒤 주사(retro-orbital injection)를 통해 5μg의 합성된 mRNA를 주입했다. 주사 후 18시간에, 마우스를 3% 이소플루란으로 다시 마취시키고, 이미징을 위해 100μl의 15mM 아칼루민-HCL(Sigma Aldrich)을 즉시 투여했다. 복부 생물발광 이미지는 IVIS 스펙트럼 생체내 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 획득했다. 이미지 획득을 위해 다음 조건이 사용되었다: 노출 시간 = 60초, 비닝 = 중간: 4, 시야 = 12.5 x 12.5cm, 및 f/정지 = 1. 생물발광 이미지는 Living Image 4.3 소프트웨어(PerkinElmer)를 사용하여 분석했다. 알비노 B6 마우스는 인간 SERPINA1을 발현하지 않기 때문에, 그들은 음성 대조군(CCA30 또는 CCA35 결합을 위한 부위를 갖지 않음)을 나타낸다. 내인성 ADAR 단독이 투여된 ADAR 센서를 편집할 수 있는지를 결정하기 위해,

마우스에게 추가의 ADAR 효소를 투여하지 않았다. SERPINA1-감지 mRNA RADARS 설계는 NSG-WT 마우스에 비해 NSG-PiZ 마우스에서 Akaluc 발현의 유의한 활성화(p = 0.007, N=3 마우스, 일원 ANOVA)를 보였으며, 본 발명자들은 기질 단독 배경 루시퍼라제 및 구성적 Akaluc mRNA RADARS 조건에서 두 균주 간에 유의한 차이가 없음을 관찰했다(**도 71a-c**).

[0188] SERPINA1의 CCA30 및 CCA35 부위를 표적으로 하는 ADAR 센서 이외에, 본 발명자들은 또한 정지 코돈이 결여된 아칼루시퍼라제를 발현하는 구성적 ADAR 센서 또는 스크램블된 비표적 가이드를 사용하여 Akaluc 페이로드를 설계했다(도 47b 참조). 3개의 센서 시스템을 조사했다. SERPINA1-감지 ADAR 센서 설계는 WT 마우스에 비해 NSG-PiZ 마우스에서 Akaluc 발현의 유의한 활성화(p = 0.04, N=2 마우스, 양측 비쌍화 t-검정)를 보였고, 대조군 가이드는 두 균주 간에 유의한 차이가 없었다(도 47b, 도 48). 이 활성화는 ADAR 센서가 합성 mRNA로서 전달되어 내인성 ADAR을 사용하여 생체내에서 세포 상태를 감지할 수 있음을 입증한다.

[0189] *추가 고려 사항*

[0190] 공개 조직 유전자 발현 데이터의 분석(GTEx Consortium 2013)은, 37개 조직 중 34개가 3배 민감도의 센서로 단일 유전자와 구별할 수 있었으며(도 49a), 3개의 추가 조직은 유전자의 조합으로 분류되어 ADAR 센서의 민감도와 논리적 입력 모두에 대한 직접적인 적용을 입증한다는 것을 보여준다(도 49).

[0191] **실시예 12. 오프 타겟 효과 및 일반 세포 공정 중단의 검사**

[0192] RADARSv2 메커니즘이 센서 조작된 가이드 RNA와 표적 전사체 사이에 긴 혼성화 영역의 형성을 포함하기 때문에, 본 발명자들은 이 듀플렉스가 다이서(Dicer) 녹다운 또는 전사체 안정화를 통해 표적 전사체 수준을 교란시키는지 여부를 조사했다. 본 발명자들은 상위 조작된 가이드 RNA 조건과 비표적 조작된 가이드 RNA 센서 사이에서 siRNA를 통해 녹다운된 내인성 전사체 각각에 대한 표적 발현을 비교하여(도 **63a**) 표적 전사체 발현에 유의한 변화가 없음을 발견했다(**도 72a**). 또한, 생성되는 조작된 가이드 RNA-표적 혼성화가 내인성 번역을 방해하지 않았다는 것을 확인하기 위해, 본 발명자들은 HEK293FT 세포를 ADAR1p150과 ACTB 또는 PPIB 표적 조작된 가이드 RNA로 공동 형질감염시키고, 웨스턴 블롯에 의해 표적 단백질 수준을 정량화했다. mRNA 수준과 유사하게, 본 발명자들은 ACTB 및 PPIB의 단백질 수준은 비표적 조작된 가이드 RNA에 비해 표적 조작된 가이드 RNA 조건에서 변하지 않았으며, 이는 RADARS에 의한 표적 발현에 대한 주목할 만한 효과가 없음을 입증한다는 것을 관찰했다(**도 72b, 도 72c-d**).

[0193] 세포에서 dsRNA의 형성은 면역 반응 경로를 활성화할 수 있고, 따라서 본 발명자들은 다음으로 ACTB와 GAPDH를 정규화 유전자로서 사용하여 qPCR에 의해 dsRNA 반응에 관여하는 주요 내인성 선천적 면역 신호전달 경로(IFNB1, MDA5, OAS1 및 RIG-1)의 RADARS 유도 상향 조절을 조사했다(**도 73a, 도 73b**). 양성 대조군과 비교하기 위해, 본 발명자들은 아날로그 dsRNA 역할을 하며 이러한 4개 경로를 활성화하는 고분자량 poly(I:C)와 함께 ACTB, PPIB, RPS5 및 외인성으로 도입된 IL6 도입유전자를 표적으로 하는 RADARS 작제물을 테스트했다. 본 발명자들은 RADARS 작제물이 4개의 dsRNA 반응 전사체 중 어느 것도 유의하게 상향 조절하지 않은 반면, poly(I:C)는 4개 경로 모두의 유의한 활성화를 유발했다는 것을 발견했다(**도 73a**). 세포주 전반에 걸쳐 본 발견을 일반화하기 위해, 본 발명자들은 HepG2 인간 간세포 암종 세포주에서 동일한 RADARS 작제물 세트를 테스트하고, RADARS 센서가 임의의 dsRNA 반응을 유발하지 않았음을 관찰했다(**도 73c**).

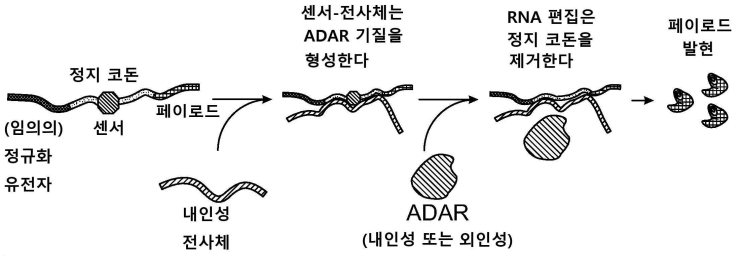
[0194] 마지막으로, 본 발명자들은 ADAR1p150 과발현이 전사체에서 오프 타겟 편집을 생성했는지 여부를 탐구했고, 이는 치료용 ADAR 기반 RNA 편집 접근법으로 관찰되었다(Cox et al., 2017; Qu et al., 2019; Reautschnig et al., 2022). 본 발명자들은 먼저 RADARS 조작된 가이드 RNA를 사용하여 PPIB와 ACTB 전사체의 혼성화 듀플렉스를 둘러싼 영역을 프로파일링하여 센서 혼성화 또는 ADAR1p150 과발현으로 인한 유의한 오프 타겟 편집이 없음을 발견했다(**도 74a**). 편향되지 않은 방식으로 잠재적인 오프 타겟을 조사하기 위해, 본 발명자들은 다음으로 PPIB 센서와 ADAR1p150을 발현하는 세포의 polyA mRNA 서열분석을 수행했다. 본 발명자들은 ADAR1p150 과발현과 PPIB 표적 RADARS의 조합이 모두 10% 미만의 편집으로 전사체에서 23개의 검출 가능한 부위만을 초래하였음을 발견했다(**도 74b**). 또한, 비표적 조작된 가이드 RNA에 의한 ADARp150 과발현의 부재하에, 본 발명자들은 부위의 유의한 편집이 없음을 발견한다. 이와 대조적으로, 본 발명자들이 MCP-ADAR2(E488Q) 데아미나제 도메인 과발현으로부터 공개된 RNA-seq 데이터를 분석했을 때, 유의한 A->I RNA 편집이 있는 10,000개 초과 부위를 검출하여 오프 타겟 프로파일에 대한 데아미나제 작제물 선택의 영향을 강조했다(**도 74c**).

[0195] 본 발명자들은 조작된 가이드 RNA와 오프 타겟 편집 부위를 둘러싼 서열에서 유의한 상동성을 발견하지 못했다(**도 75a**). 동일한 서열분석 및 ADARp150 과발현의 존재하에 외인성 IL6 표적을 표적으로 하는 상이한 조작된

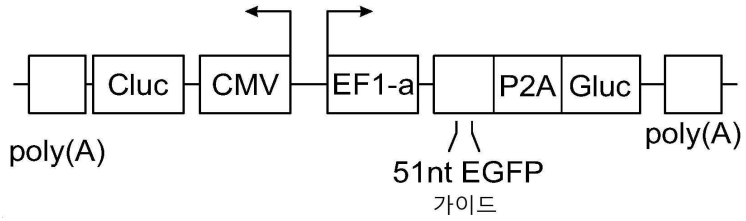
가이드 RNA에 대한 분석을 수행하면 낮은 유의한 오프 타겟 편집 속도를 나타낸다(42개 부위 모두 10% 미만 편집, 도 74b). 중요하게는, 22/23개의 PPIB 오프-타겟 부위가 두 개의 상이한 조작된 가이드 RNA 샘플 간에 공유되었다. 마지막으로, 본 발명자들은 편집 부위를 둘러싼 염기의 서열 모티프가 ADAR1의 바람직한 기질과 매우 유사하다는 것을 발견했다(Eggington et al., 2011)(**도 75b**). 전반적으로, 이러한 관찰은 ADARp150 과발현과 함께 사용될 때 RADARS가 전사체에서 상대적으로 적은 비특이적 RNA 편집을 생성한다는 것을 암시한다.

도면

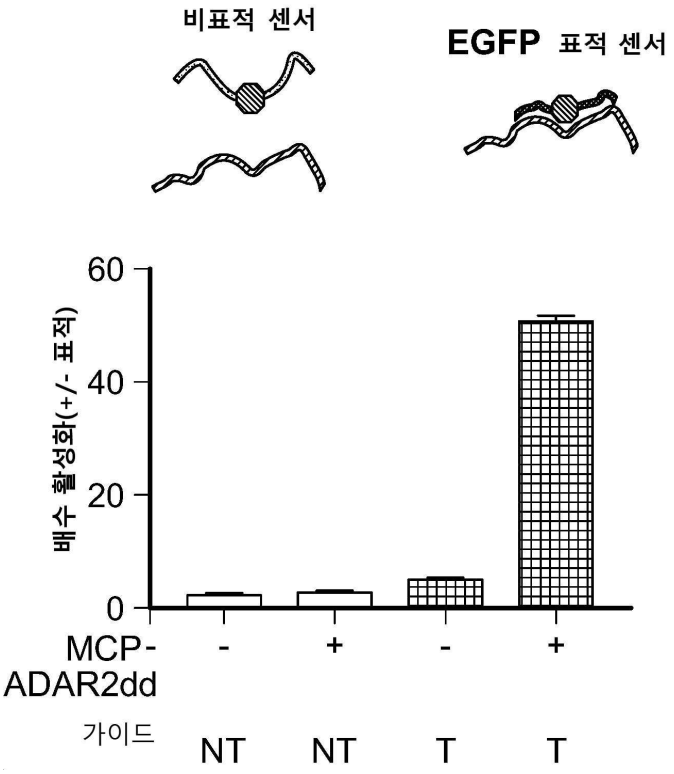
도면1



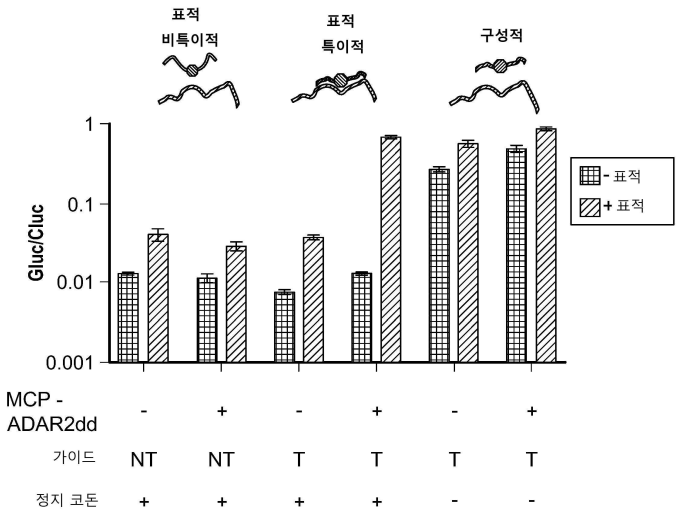
도면2a



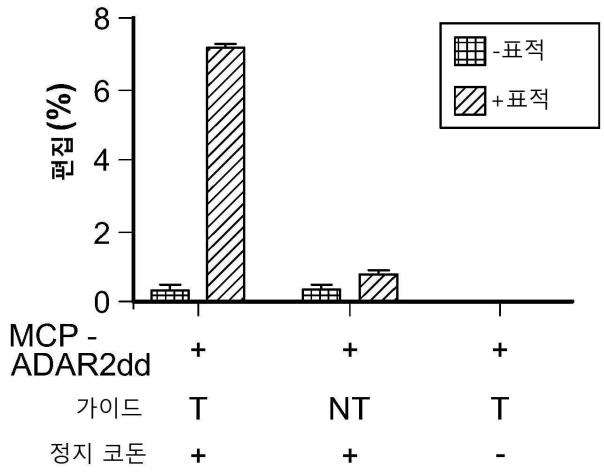
도면2b



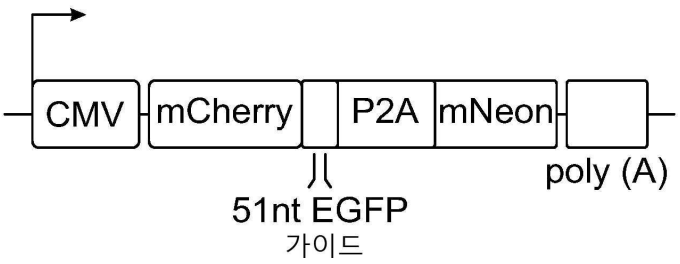
도면2c



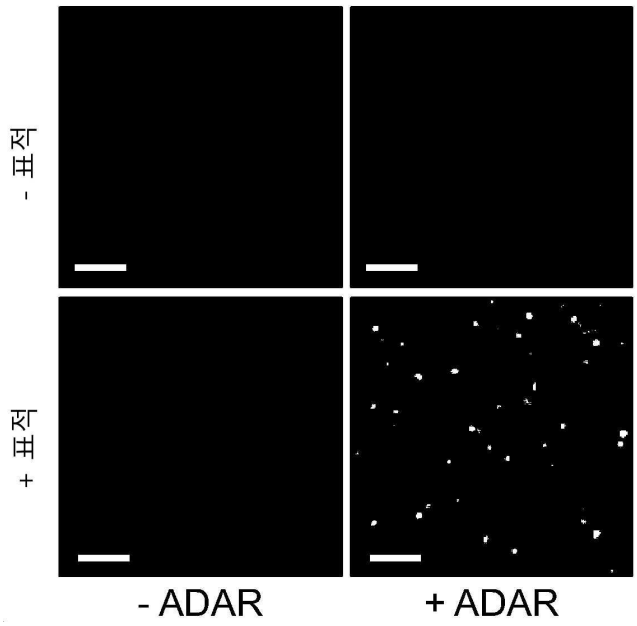
도면2d



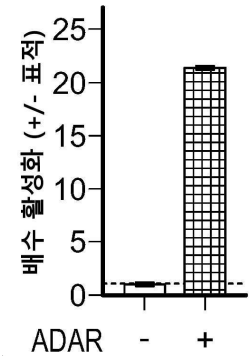
도면3a



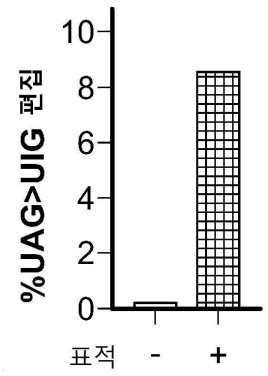
도면3b



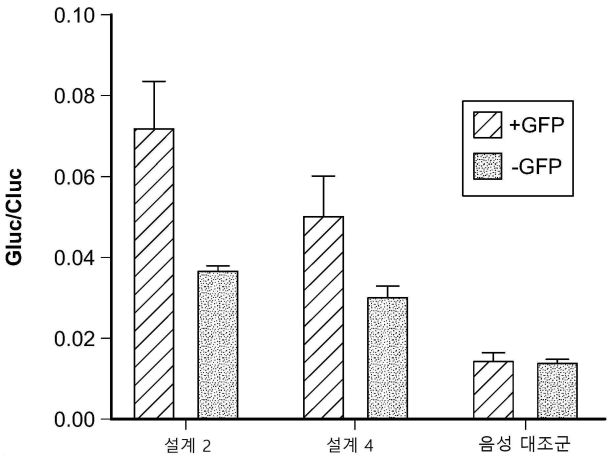
도면3c



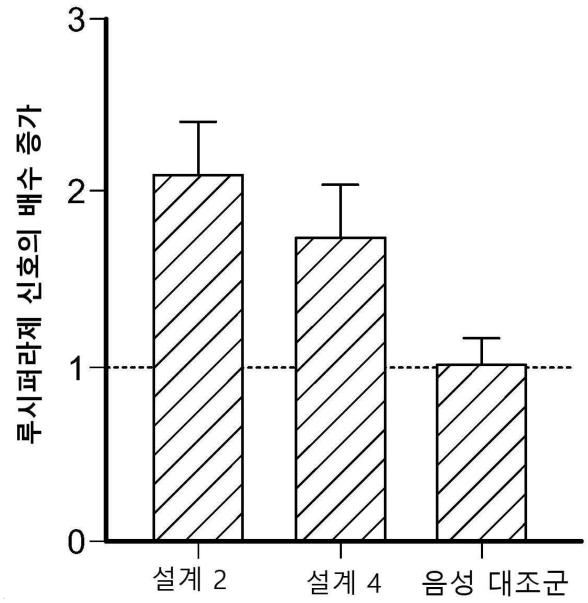
도면3d



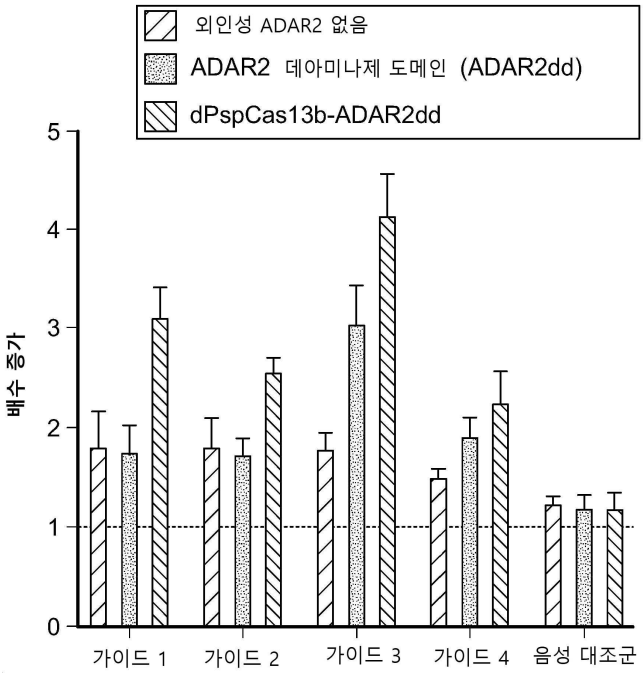
도면4a


0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Gluc/Cluc
+GFP
-GFP
설계 2
설계 4
음성 대조군

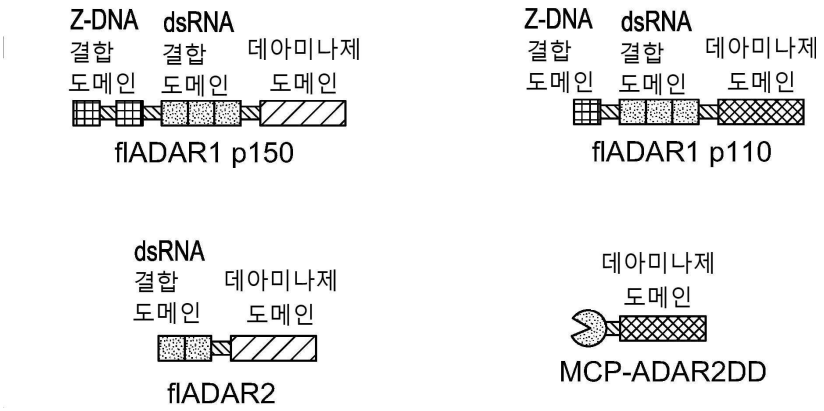
도면4b


3
2
1
0
루시퍼라제 신호의 배수 증가
설계 2
설계 4
음성 대조군

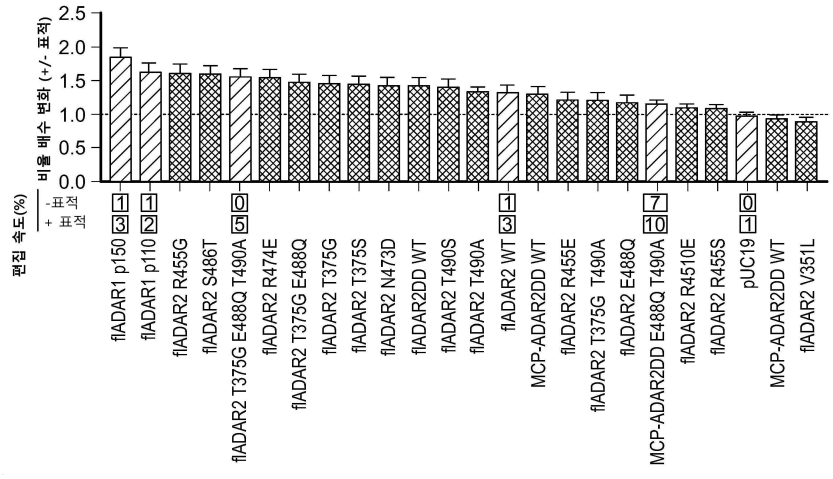
도면5


외인성 ADAR2 없음
ADAR2 데아미나제 도메인 (ADAR2dd)
dPspCas13b-ADAR2dd
배수 증가
0
1
2
3
4
5
가이드 1
가이드 2
가이드 3
가이드 4
음성 대조군

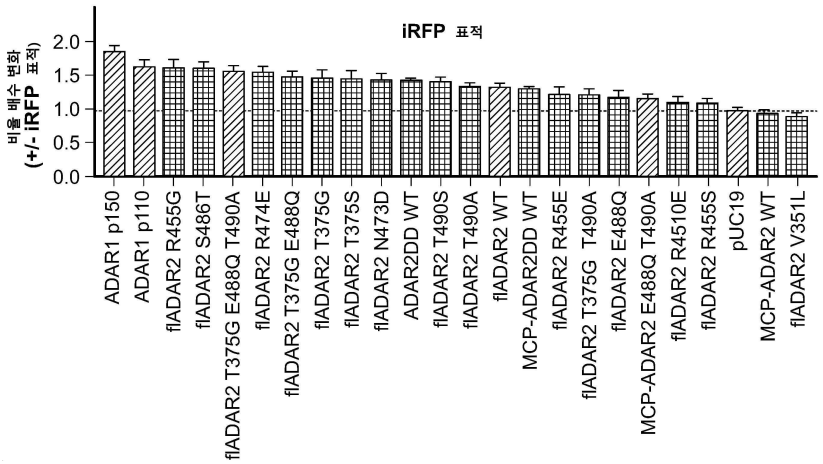
도면6a


ADAR 변이체 및 촉매 부위 돌연변이 스크린 배수 변화
Z-DNA 결합 도메인
dsRNA 결합 도메인
데아미나제 도메인
flADAR1 p150
Z-DNA 결합 도메인
dsRNA 결합 도메인
데아미나제 도메인
flADAR1 p110
dsRNA 결합 도메인
데아미나제 도메인
flADAR2
데아미나제 도메인
MCP-ADAR2DD

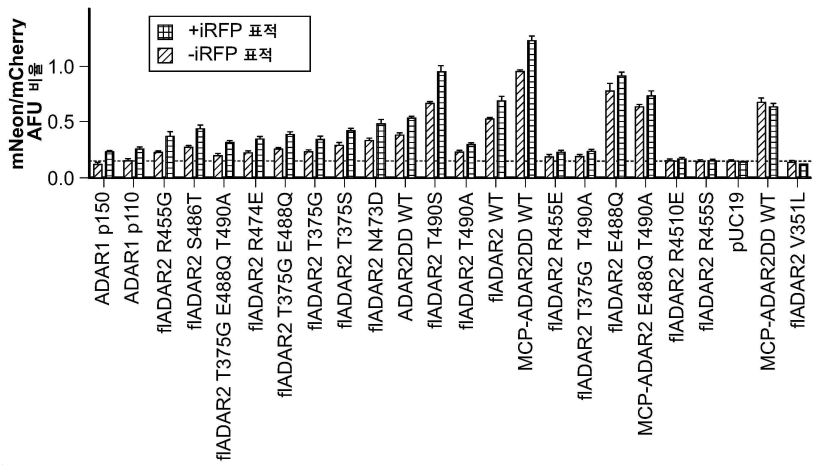
도면6b



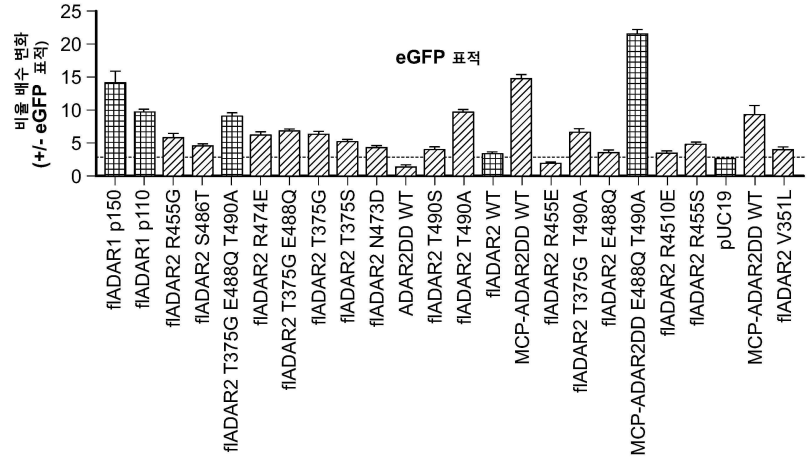
도면7a



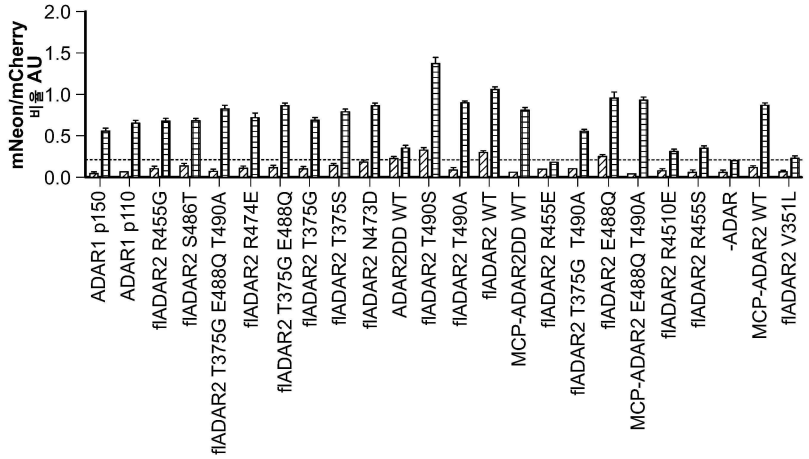
도면7b



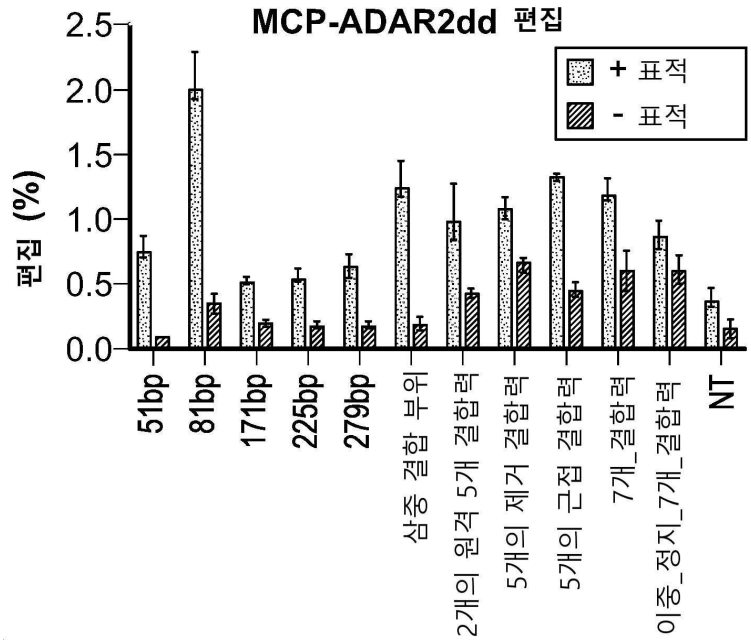
도면7c



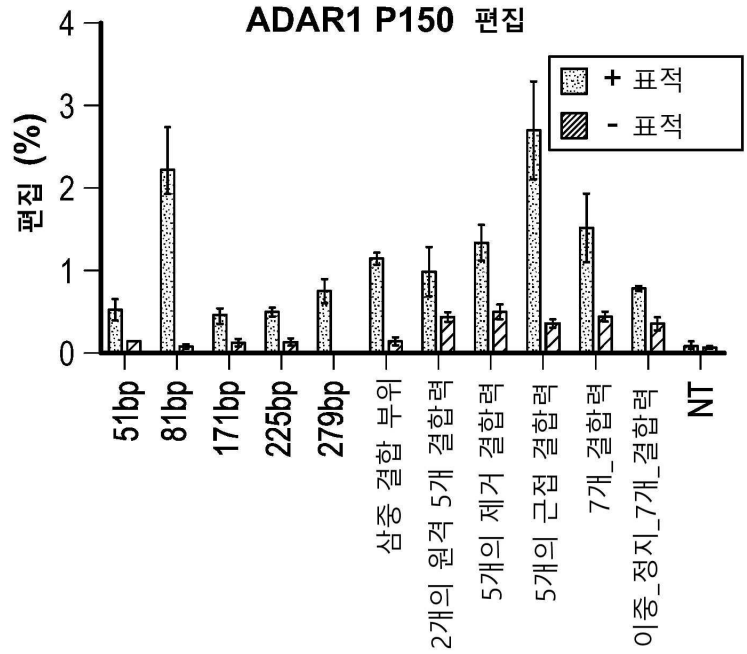
도면7d



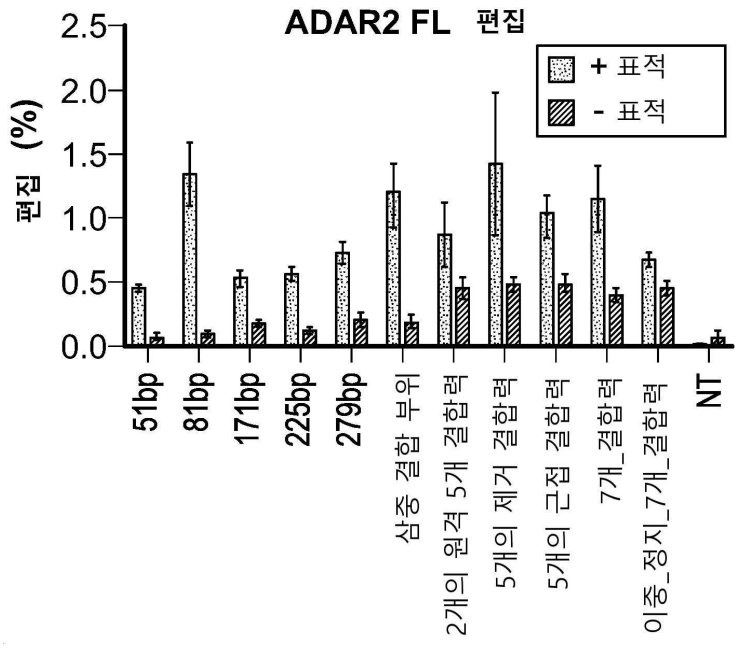
도면8a



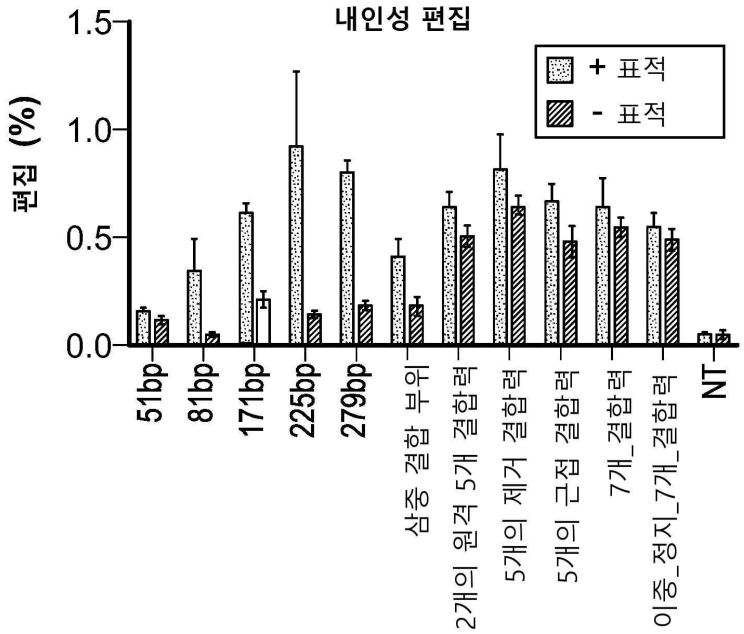
도면8b


ADAR1 P150 편집
편집 (%)
0
1
2
3
4
+ 표적
- 표적
51bp
81bp
171bp
225bp
279bp
삼중 결합 부위
2개의 원격 5개 결합력
5개의 제거 결합력
5개의 근접 결합력
7개_결합력
이중_정지_7개_결합력
NT

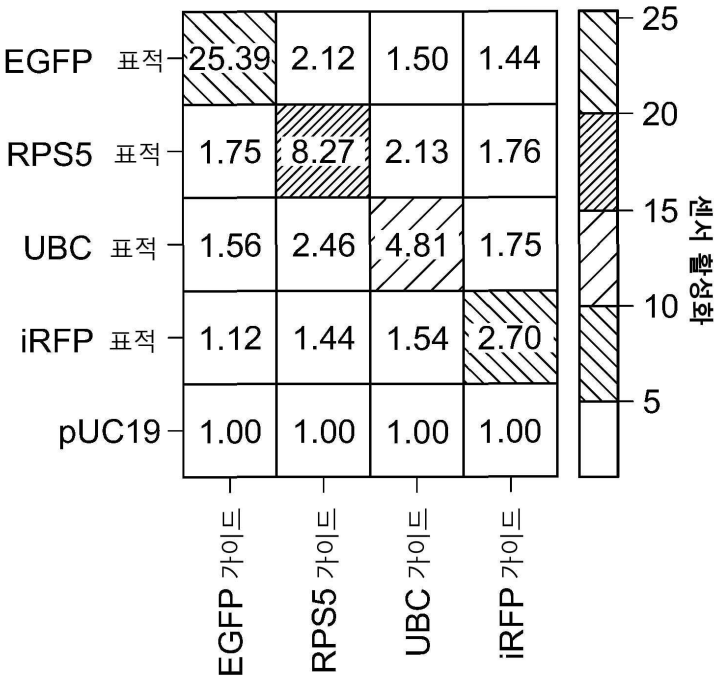
도면8c


ADAR2 FL 편집
편집 (%)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
+ 표적
- 표적
51bp
81bp
171bp
225bp
279bp
삼중 결합 부위
2개의 원격 5개 결합력
5개의 제거 결합력
5개의 근접 결합력
7개_결합력
이중_정지_7개_결합력
NT

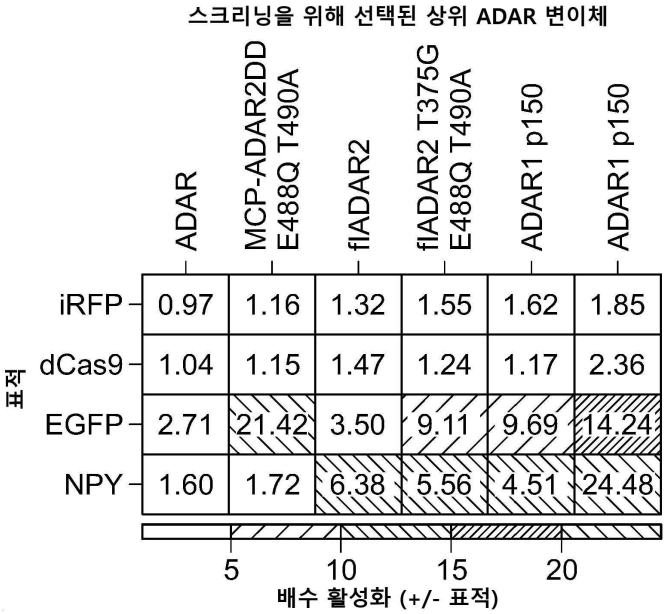
도면8d


내인성 편집
편집 (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
+ 표적
- 표적
51bp
81bp
171bp
225bp
279bp
삼중 결합 부위
2개의 원격 5개 결합력
5개의 제거 결합력
5개의 근접 결합력
7개_결합력
이중_정지_7개_결합력
NT

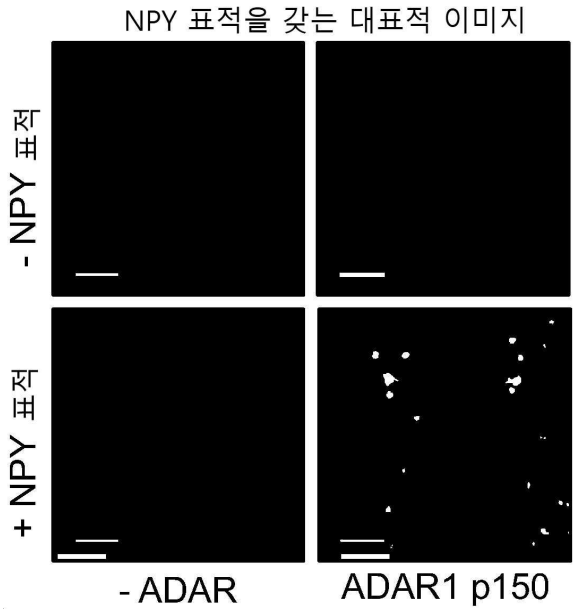
도면9


EGFP 표적 25.39 2.12 1.50 1.44
RPS5 표적 1.75 8.27 2.13 1.76
UBC 표적 1.56 2.46 4.81 1.75
iRFP 표적 1.12 1.44 1.54 2.70
pUC19 1.00 1.00 1.00 1.00
EGFP 가이드
RPS5 가이드
UBC 가이드
iRFP 가이드
25
20
15
10
5
indel 효율성(%)

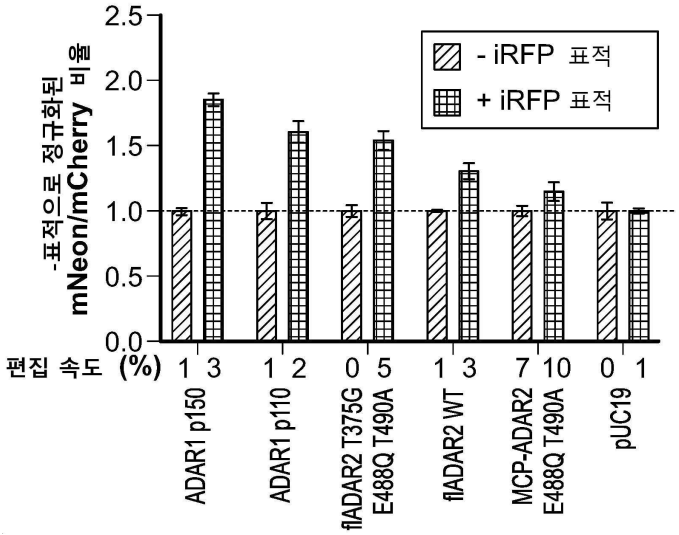
도면10a


스크리닝을 위해 선택된 상위 ADAR 변이체
ADAR
MCP-ADAR2DD E488Q T490A
flADAR2
flADAR2 T375G E488Q T490A
ADAR1 p150
ADAR1 p150
표적
iRFP 0.97 1.16 1.32 1.55 1.62 1.85
dCas9 1.04 1.15 1.47 1.24 1.17 2.36
EGFP 2.71 21.42 3.50 9.11 9.69 14.24
NPY 1.60 1.72 6.38 5.56 4.51 24.48
5
10
15
20
배수 활성화 (+/- 표적)

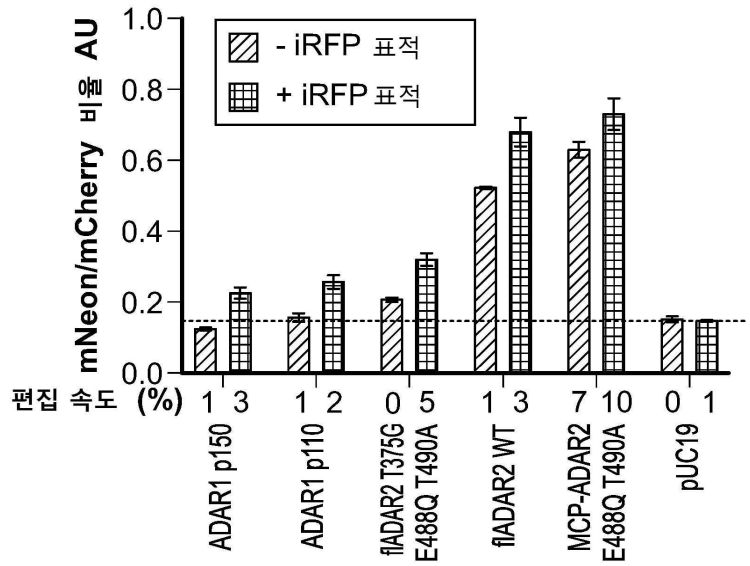
도면10b


NPY 표적을 갖는 대표적 이미지
- NPY 표적
+ NPY 표적
- ADAR
ADAR1 p150

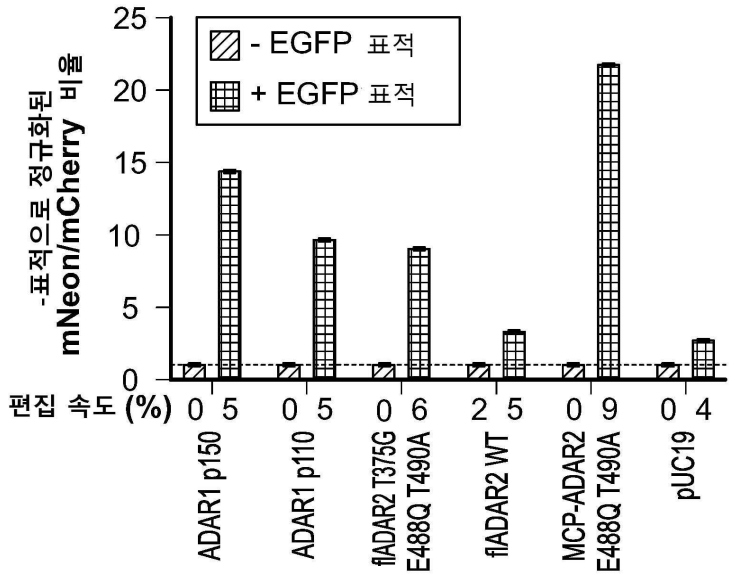
도면11a


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-표적으로 정규화된 mNeon/mCherry 비율
- iRFP 표적
+ iRFP 표적
편집 속도 (%)
1 3
1 2
0 5
1 3
7 10
0 1
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

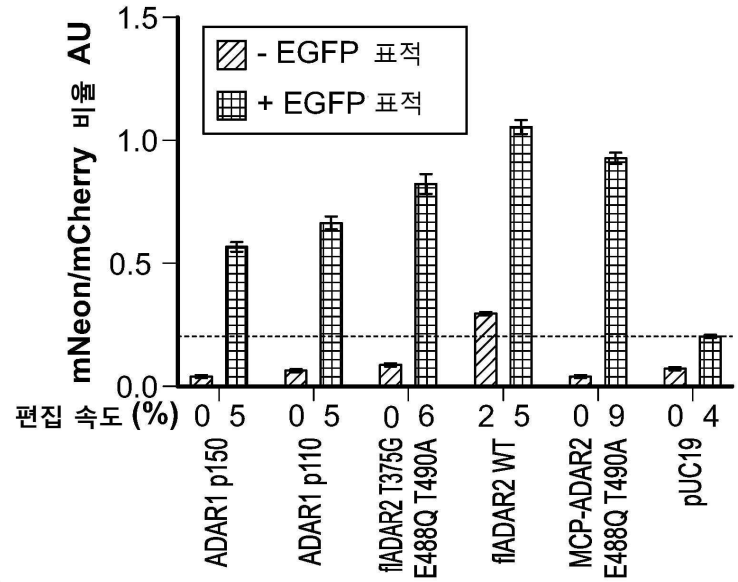
도면11b


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mNeon/mCherry 비율 AU
- iRFP 표적
+ iRFP 표적
편집 속도 (%)
1 3
1 2
0 5
1 3
7 10
0 1
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

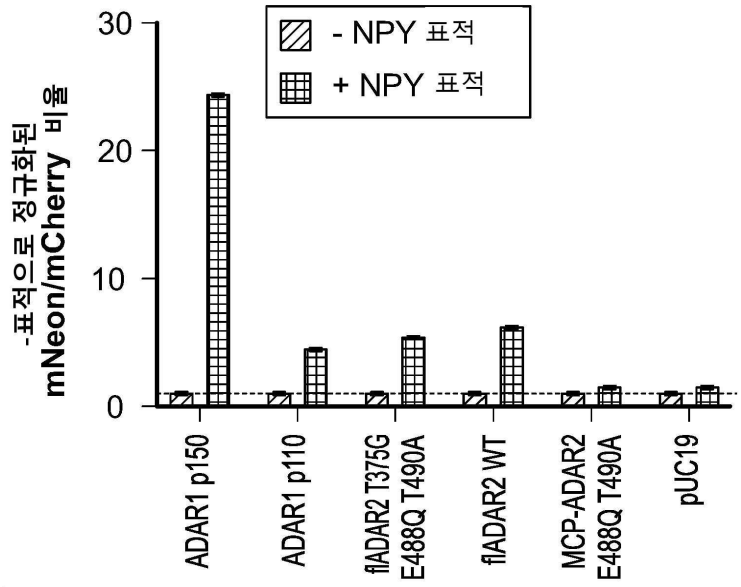
도면11c


25
20
15
10
5
0
- EGFP 표적
+ EGFP 표적
-표적으로 정규화된 mNeon/mCherry 비율
편집 속도 (%)
0 5
0 5
0 6
2 5
0 9
0 4
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

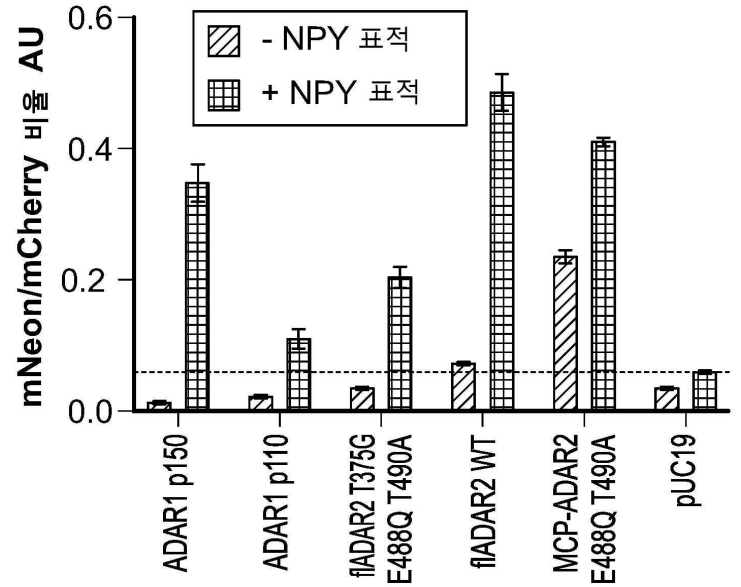
도면11d


1.5
1.0
0.5
0.0
- EGFP 표적
+ EGFP 표적
mNeon/mCherry 비율 AU
편집 속도 (%)
0 5
0 5
0 6
2 5
0 9
0 4
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

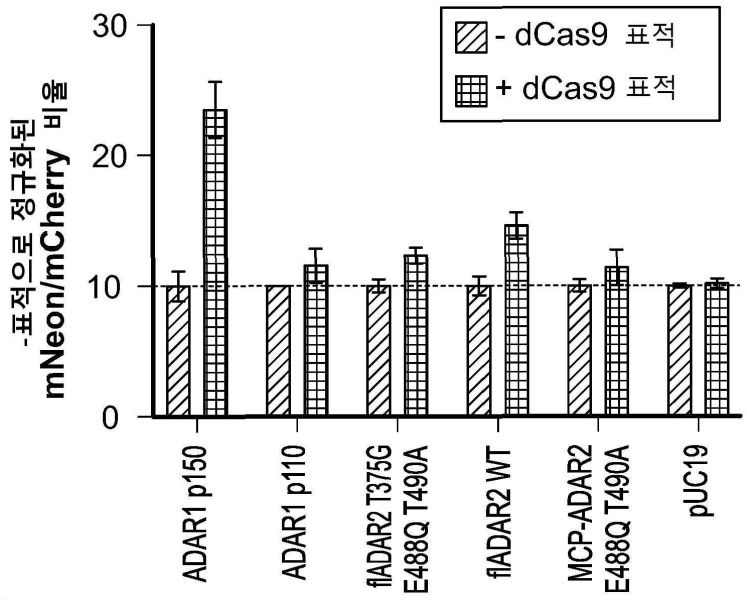
도면11e


- NPY 표적
+ NPY 표적
-표적으로 정규화된 mNeon/mCherry 비율
30
20
10
0
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

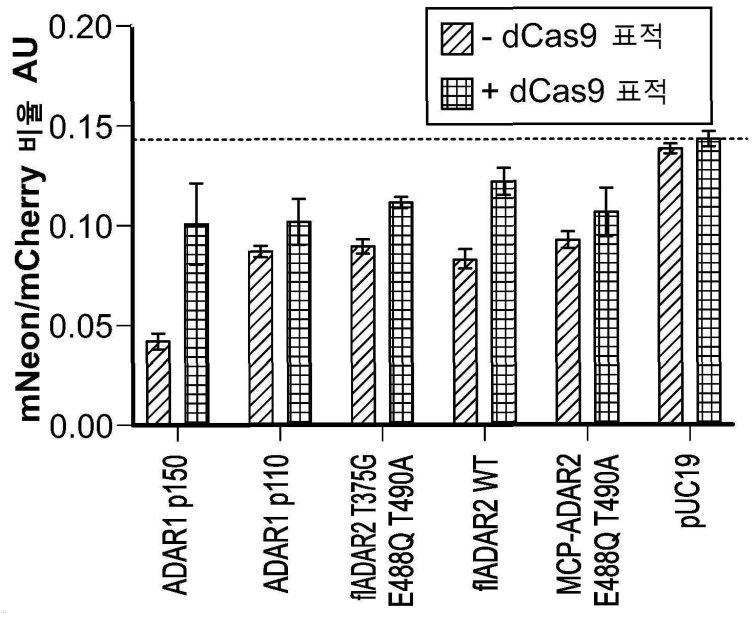
도면11f


- NPY 표적
+ NPY 표적
mNeon/mCherry 비율 AU
0.6
0.4
0.2
0.0
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

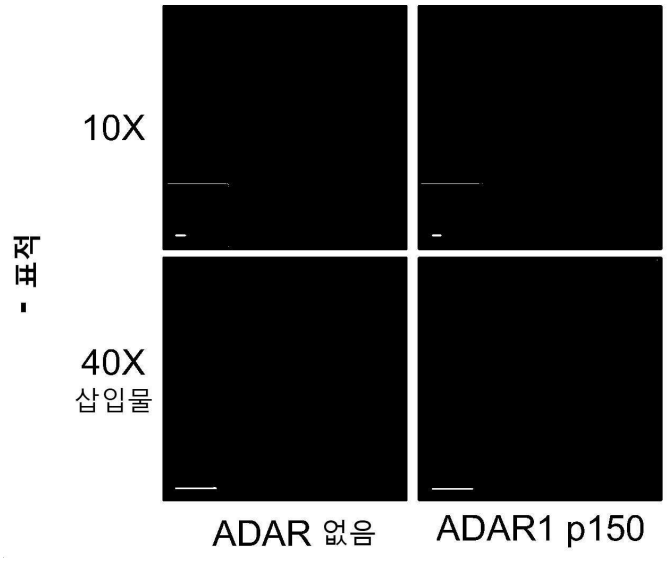
도면11g


- dCas9 표적
+ dCas9 표적
-표적으로 정규화된 mNeon/mCherry 비율
30
20
10
0
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

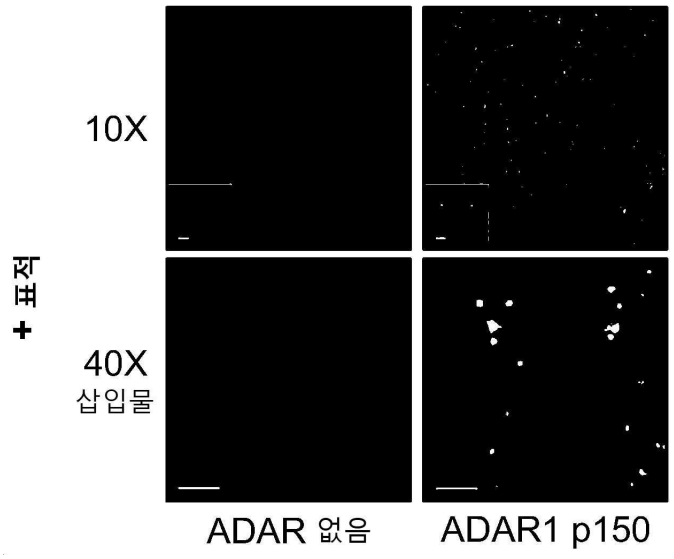
도면11h


- dCas9 표적
+ dCas9 표적
mNeon/mCherry 비율 AU
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
ADAR1 p150
ADAR1 p110
flADAR2 T375G E488Q T490A
flADAR2 WT
MCP-ADAR2 E488Q T490A
pUC19

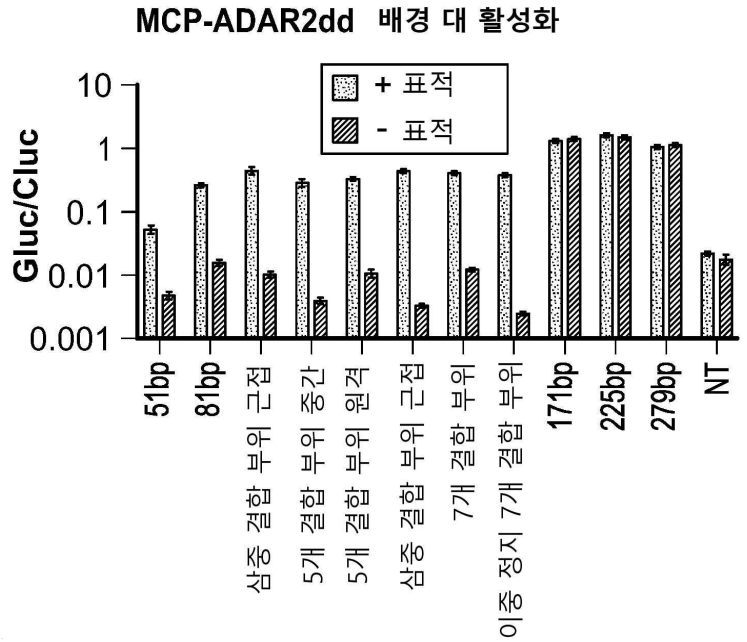
도면12a


10X
40X
삽입물
- 표적
ADAR 없음
ADAR1 p150

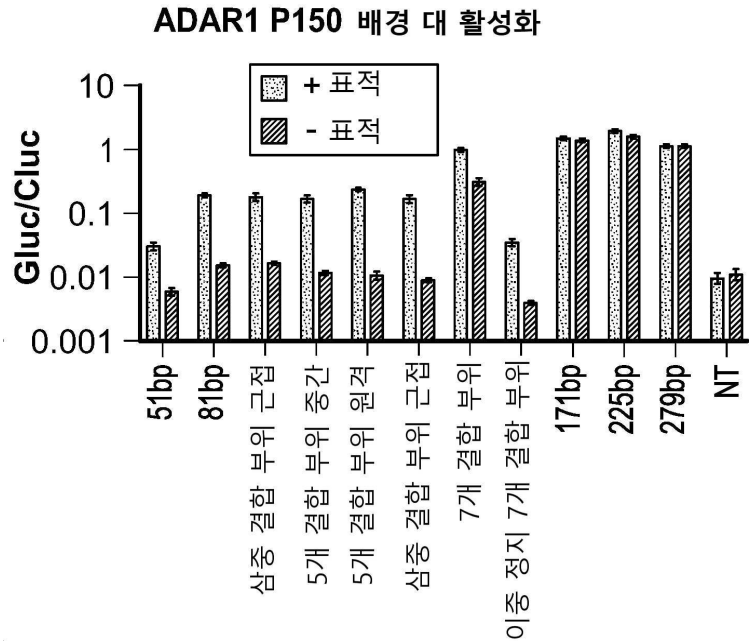
도면12b


10X
40X
삽입물
+ 표적
ADAR 없음
ADAR1 p150

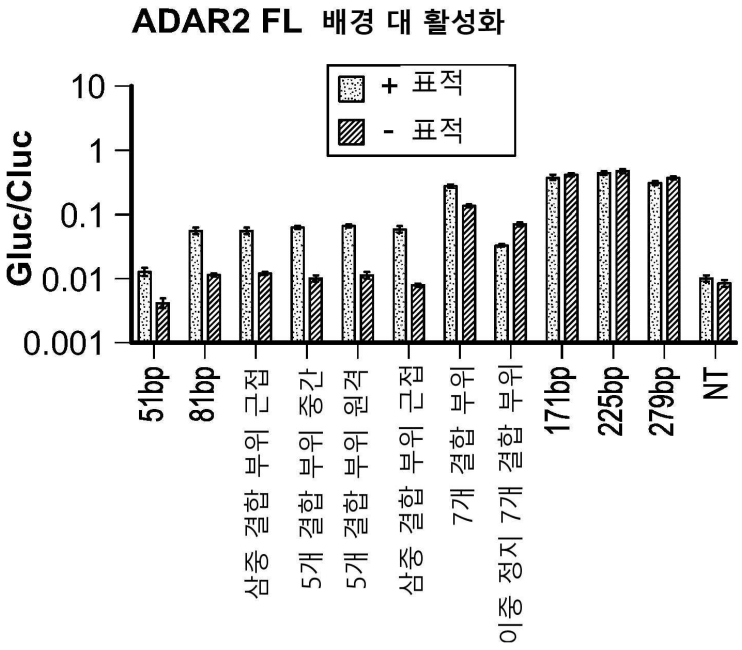
도면13a


MCP-ADAR2dd 배경 대 활성화
Gluc/Cluc
10
1
0.1
0.01
0.001
+ 표적
- 표적
51bp
81bp
삼중 결합 부위 근접
5개 결합 부위 중간
5개 결합 부위 원격
삼중 결합 부위 근접
7개 결합 부위
이중 정지 7개 결합 부위
171bp
225bp
279bp
NT

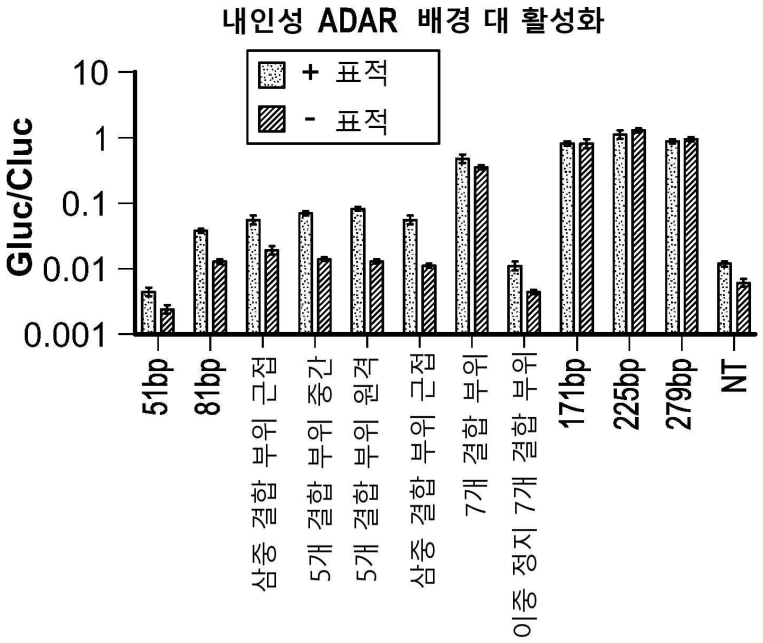
도면13b


ADAR1 P150 배경 대 활성화
Gluc/Cluc
10
1
0.1
0.01
0.001
+ 표적
- 표적
51bp
81bp
삼중 결합 부위 근접
5개 결합 부위 중간
5개 결합 부위 원격
삼중 결합 부위 근접
7개 결합 부위
이중 정지 7개 결합 부위
171bp
225bp
279bp
NT

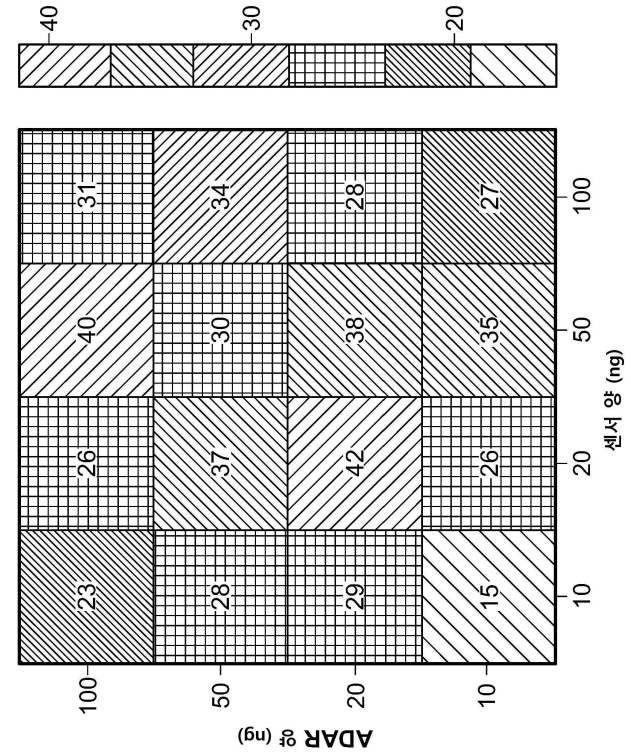
도면13c


ADAR2 FL 배경 대 활성화
+ 표적
- 표적
Gluc/Cluc
10
1
0.1
0.01
0.001
51bp
81bp
삼중 결합 부위 근접
5개 결합 부위 중간
5개 결합 부위 원격
삼중 결합 부위 근접
7개 결합 부위
이중 정지 7개 결합 부위
171bp
225bp
279bp
NT

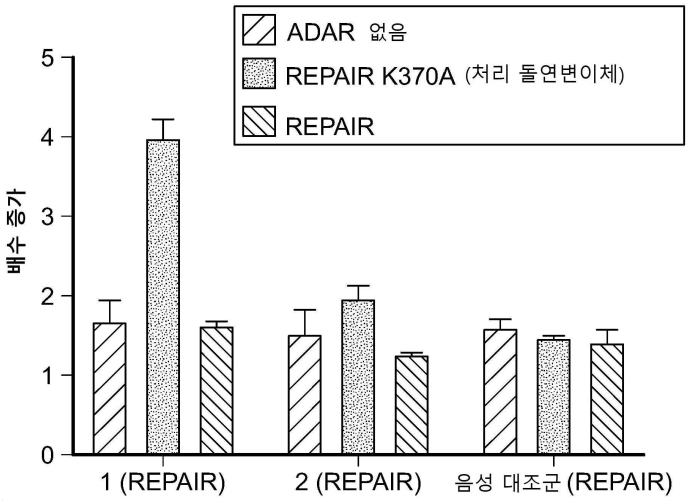
도면13d


내인성 ADAR 배경 대 활성화
+ 표적
- 표적
Gluc/Cluc
10
1
0.1
0.01
0.001
51bp
81bp
삼중 결합 부위 근접
5개 결합 부위 중간
5개 결합 부위 원격
삼중 결합 부위 근접
7개 결합 부위
이중 정지 7개 결합 부위
171bp
225bp
279bp
NT

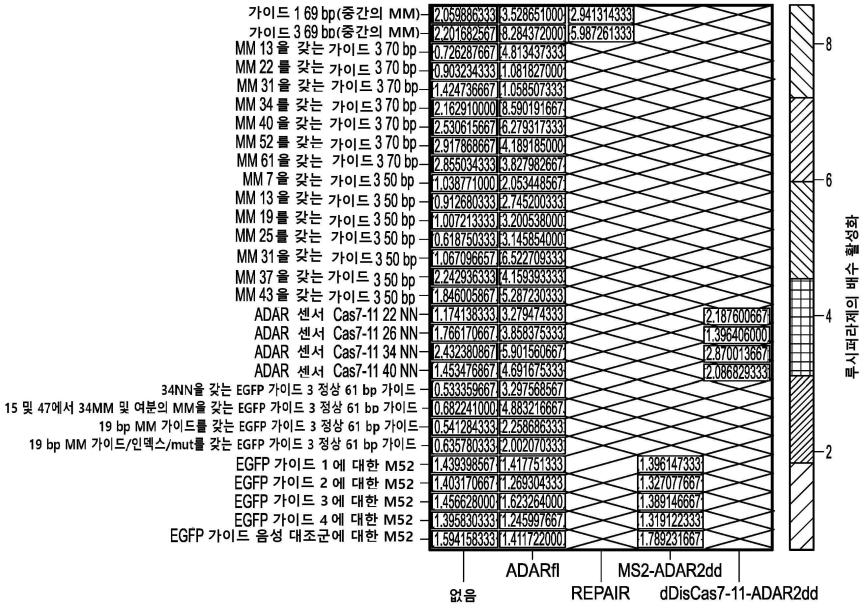
도면14


40
30
20
31
34
28
27
40
30
38
35
26
37
42
26
23
28
29
15
100
50
20
10
센서 양 (ng)
ADAR 양 (ng)

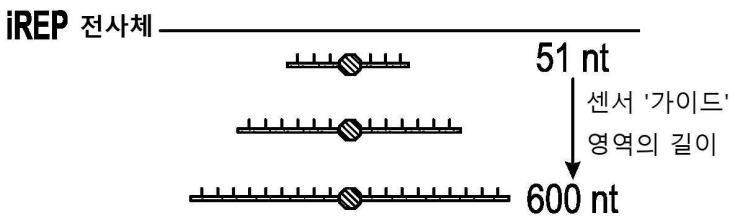
도면15


ADAR 없음
REPAIR K370A (처리 돌연변이체)
REPAIR
배수 증가
0
1
2
3
4
5
1 (REPAIR)
2 (REPAIR)
음성 대조군 (REPAIR)

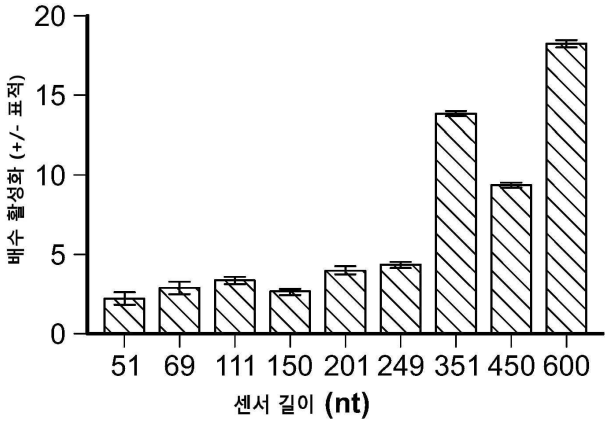
도면16



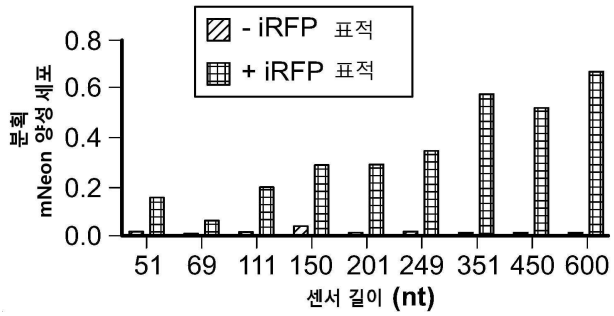
도면17a



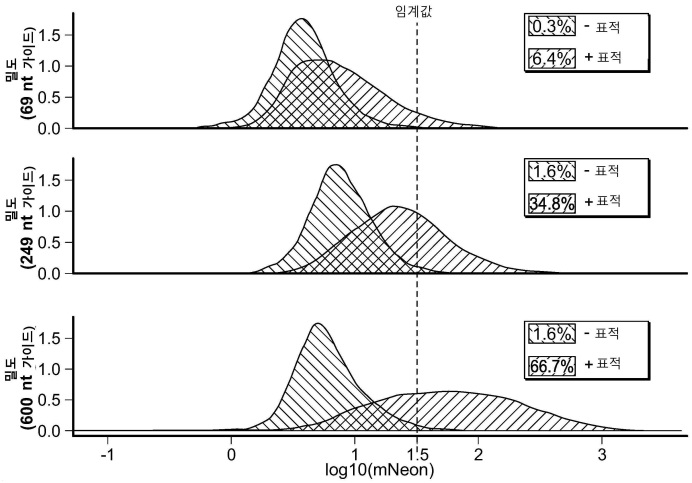
도면17b



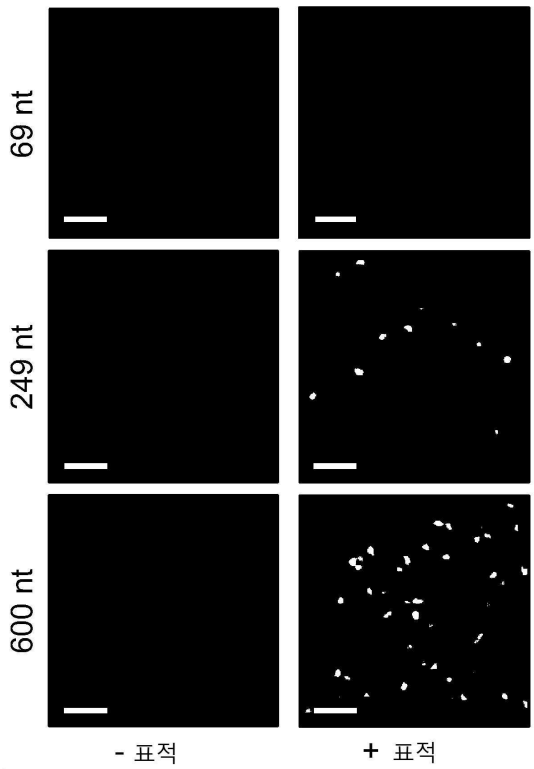
도면17c



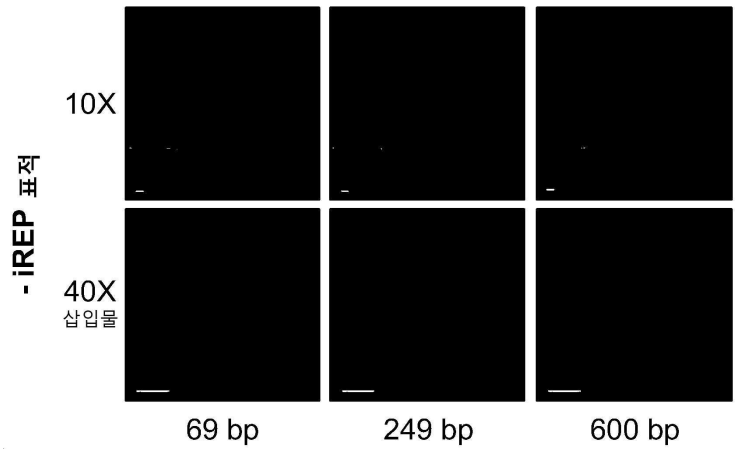
도면18a



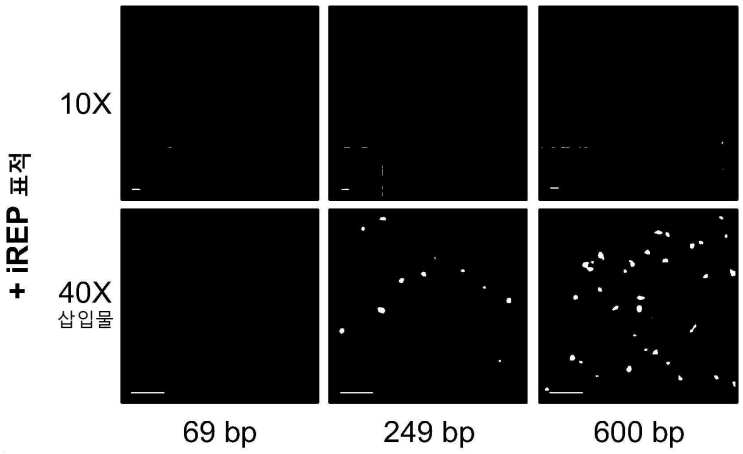
도면18b



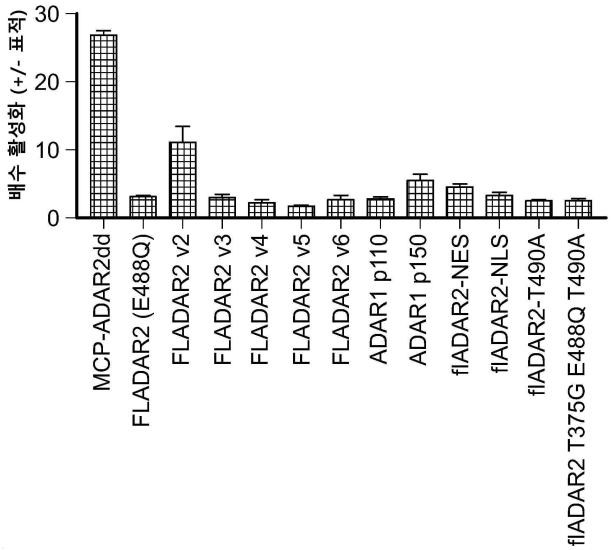
도면19a



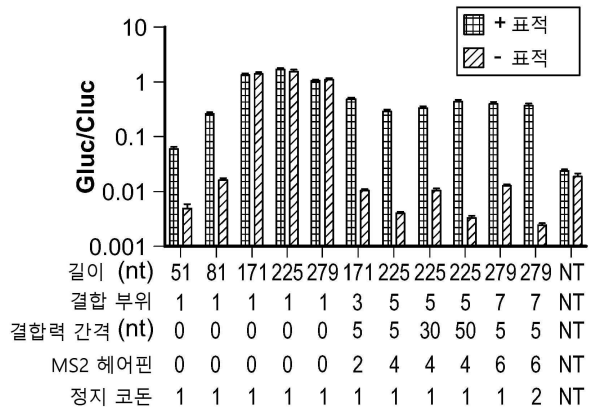
도면19b



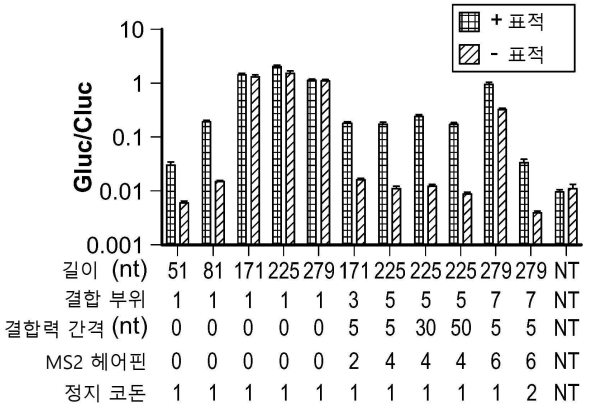
도면20



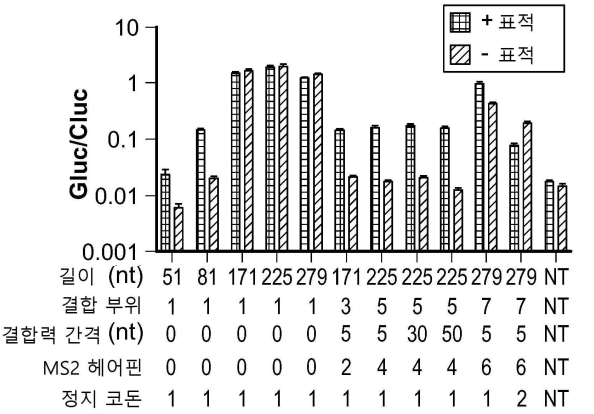
도면21a



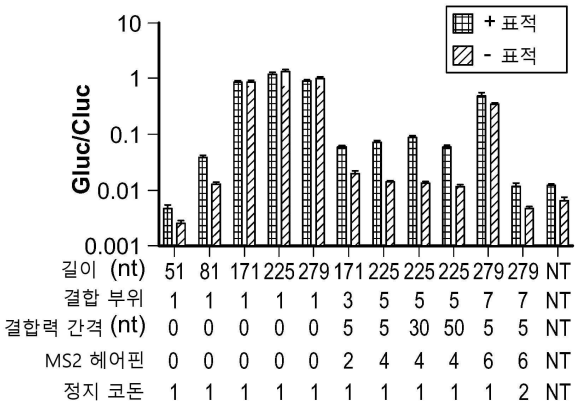
도면21b



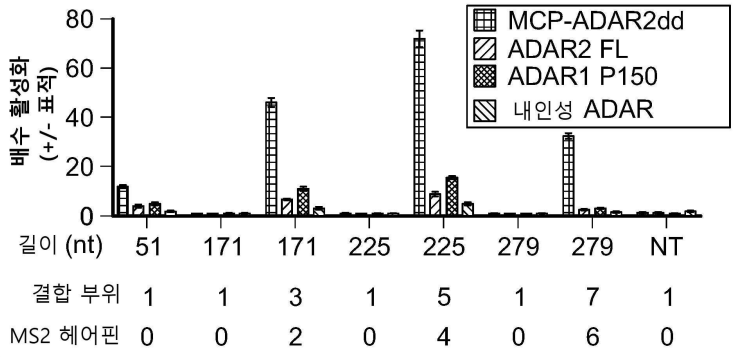
도면21c



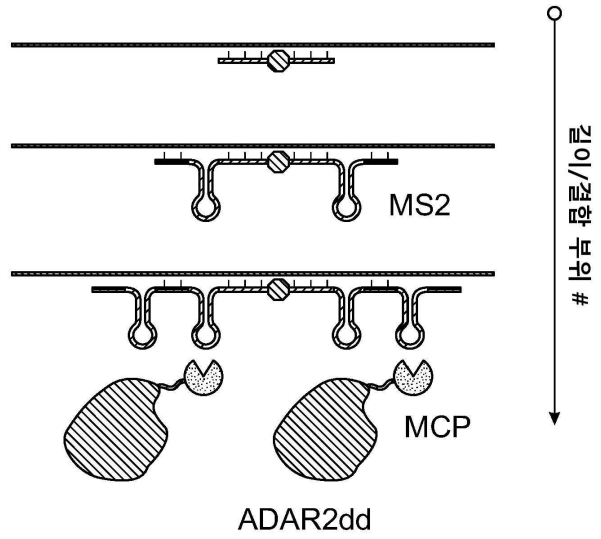
도면21d



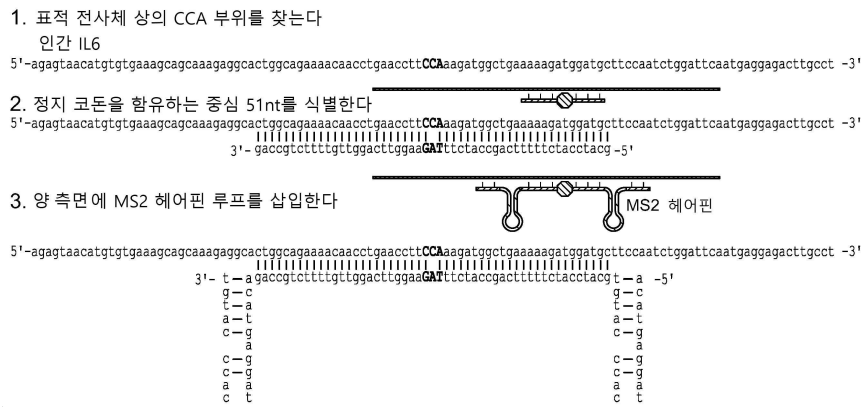
도면22



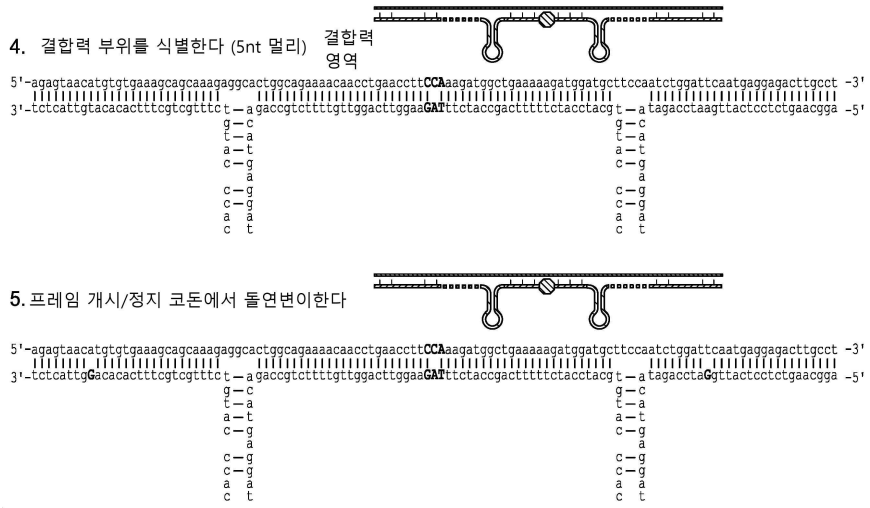
도면23



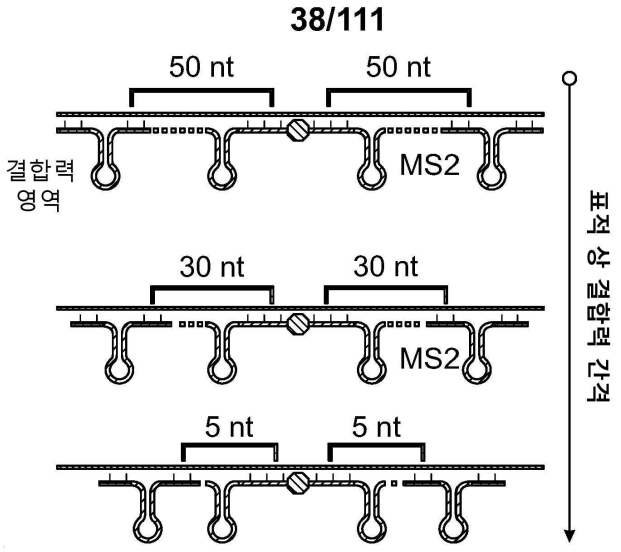
도면24a



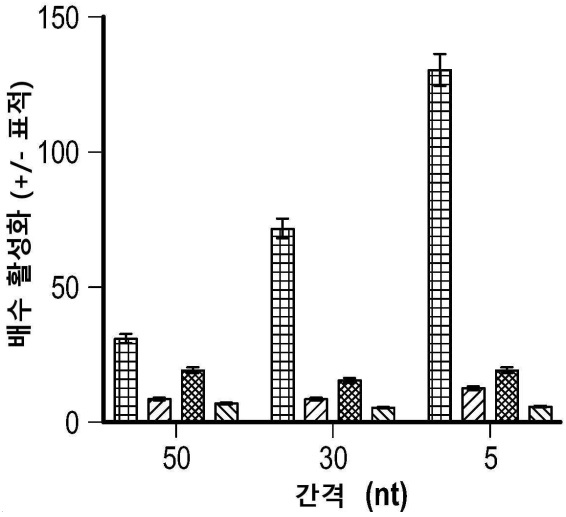
도면24b



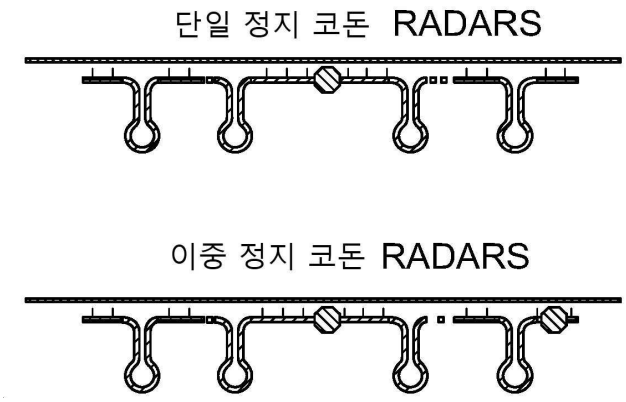
도면25a



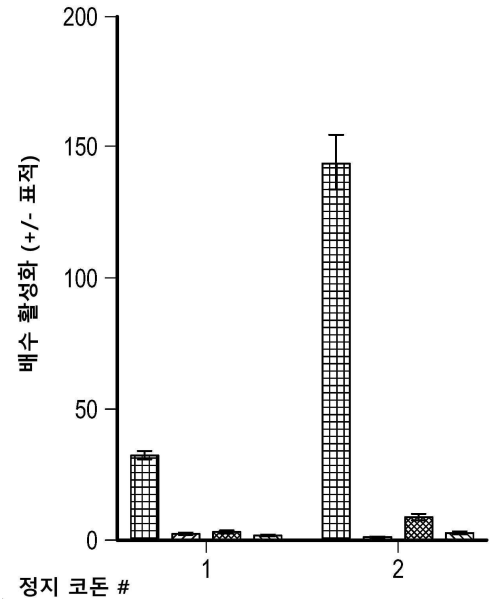
도면25b



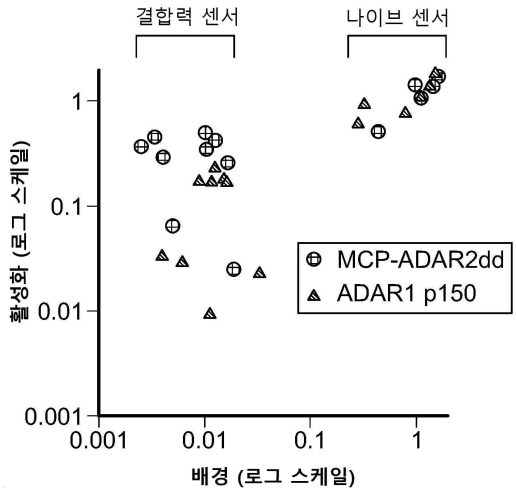
도면26a



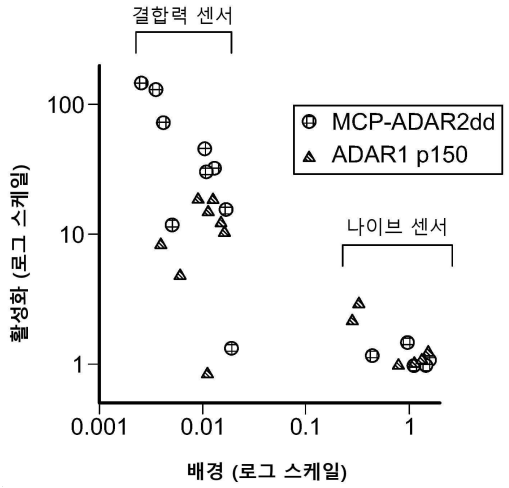
도면26b



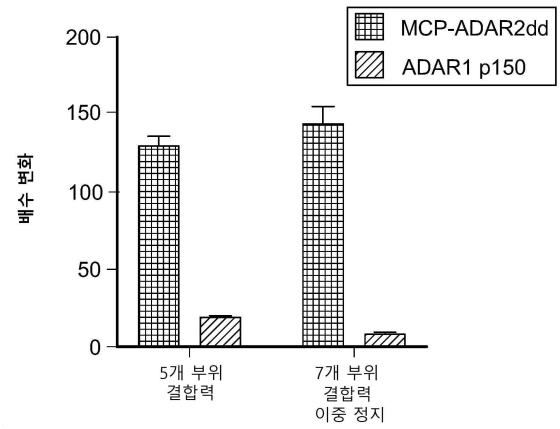
도면27a



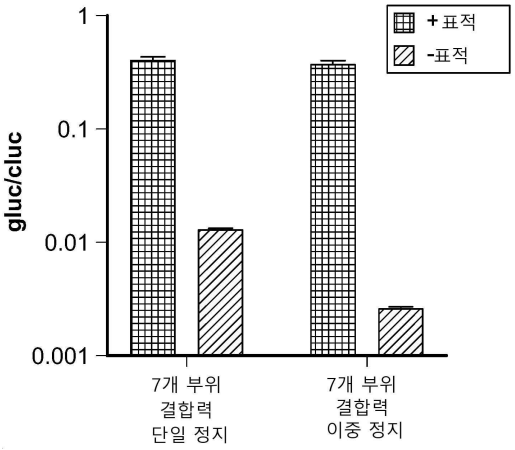
도면27b



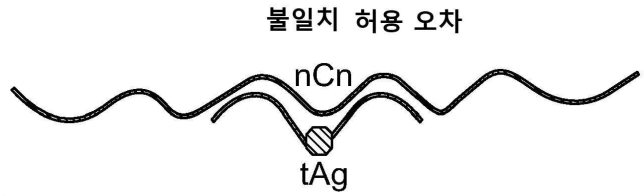
도면28a



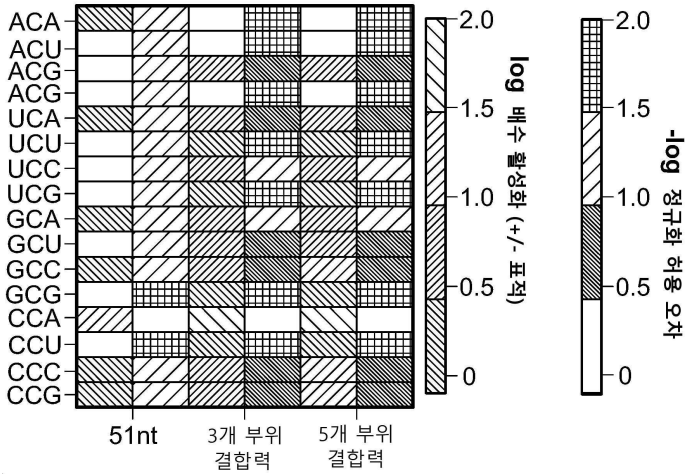
도면28b



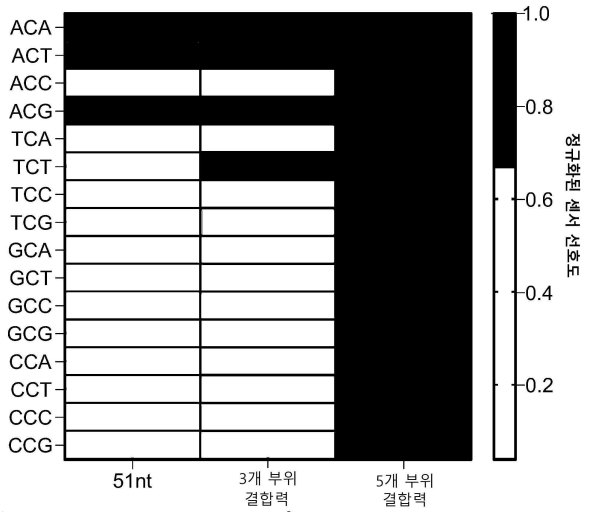
도면29a



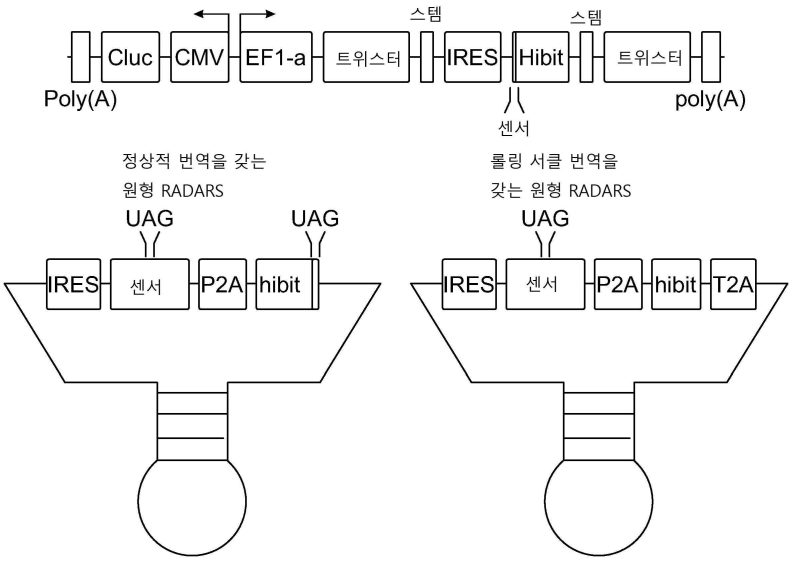
도면29b



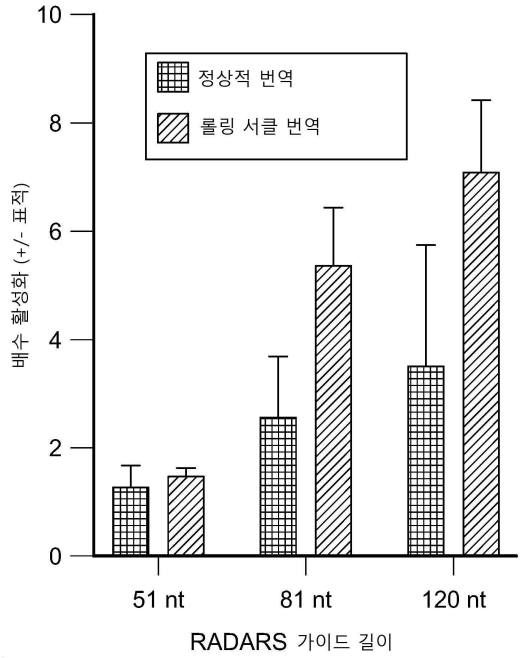
도면30


ACA
ACT
ACC
ACG
TCA
TCT
TCC
TCG
GCA
GCT
GCC
GCG
CCA
CCT
CCC
CCG
51nt
3개 부위 결합력
5개 부위 결합력
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
정규화된 셰서 선호도

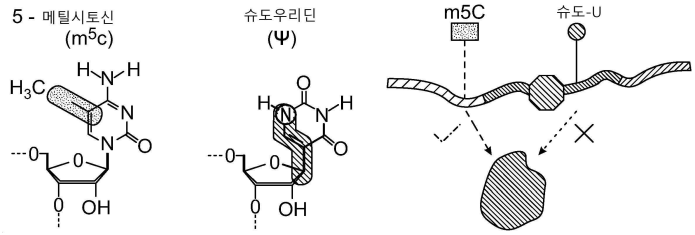
도면31a


Cluc
CMV
EF1-a
트위스터
스템
IRES
Hibit
스템
트위스터
Poly(A)
poly(A)
센서
정상적 번역을 갖는
원형 RADARS
롤링 서클 번역을
갖는 원형 RADARS
UAG
UAG
UAG
IRES
센서
P2A
hibit
IRES
센서
P2A
hibit
T2A

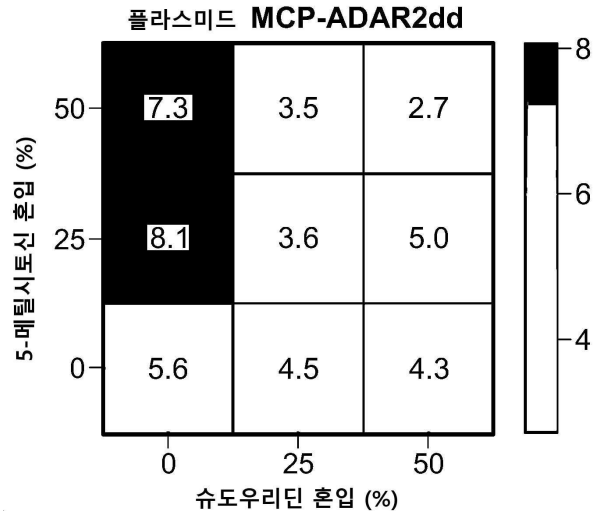
도면31b



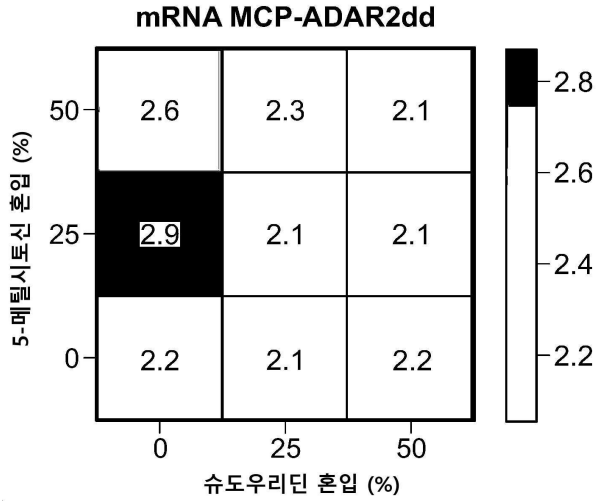
도면32a



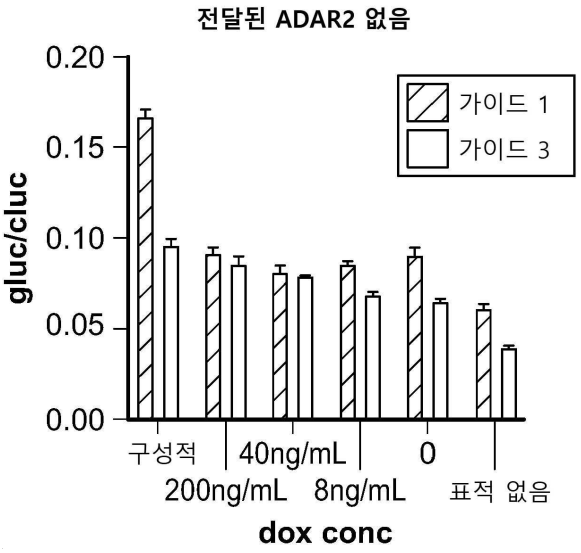
도면32b



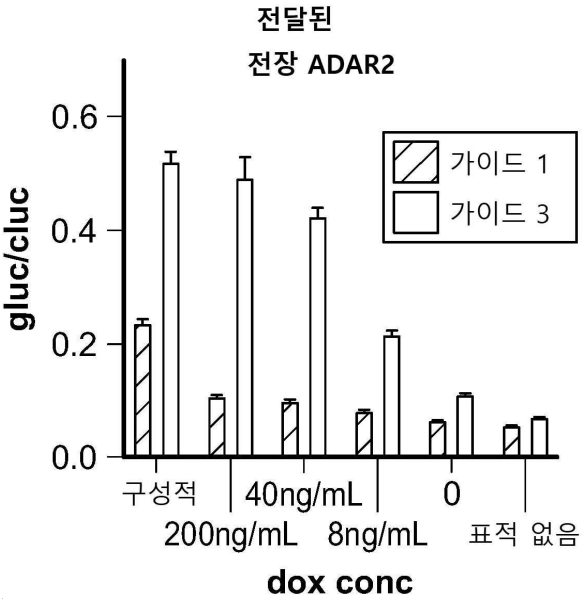
도면32c


mRNA MCP-ADAR2dd
50
25
0
2.6
2.3
2.1
2.9
2.1
2.1
2.2
2.1
2.2
5-메틸시토신 혼입 (%)
0
25
50
슈도우리딘 혼입 (%)
2.8
2.6
2.4
2.2

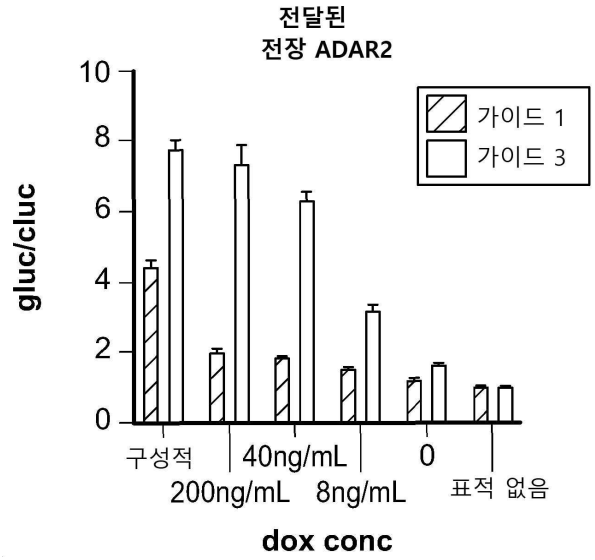
도면33a


전달된 ADAR2 없음
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
gluc/cluc
가이드 1
가이드 3
구성적
200ng/mL
40ng/mL
8ng/mL
0
표적 없음
dox conc

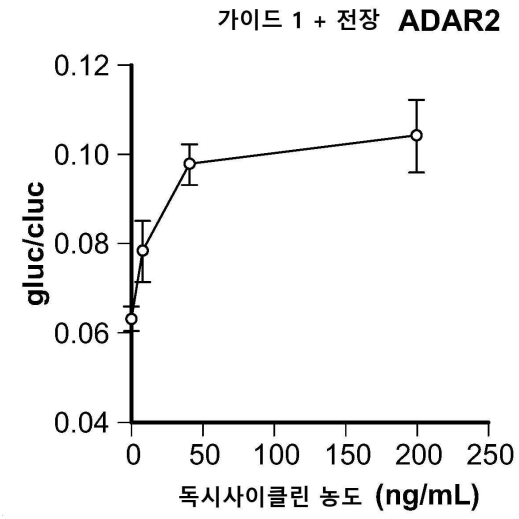
도면33b


전달된
전장 ADAR2
0.6
0.4
0.2
0.0
gluc/cluc
가이드 1
가이드 3
구성적
40ng/mL
0
200ng/mL
8ng/mL
표적 없음
dox conc

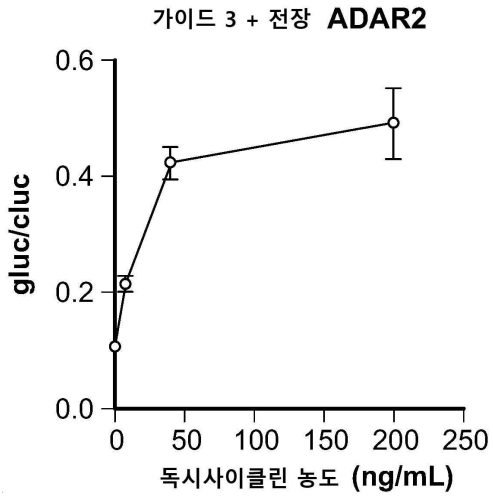
도면33c


전달된
전장 ADAR2
10
8
6
4
2
0
gluc/cluc
가이드 1
가이드 3
구성적
40ng/mL
0
200ng/mL
8ng/mL
표적 없음
dox conc

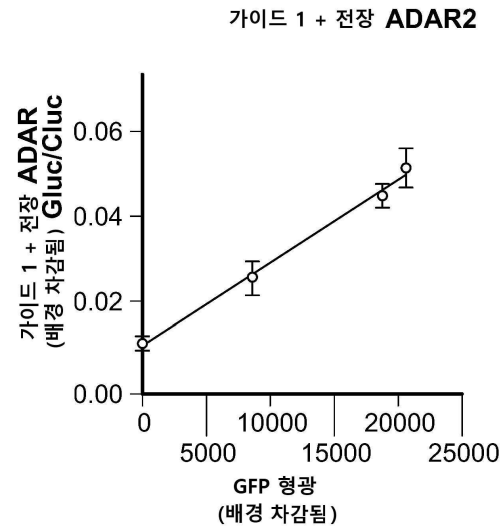
도면34a



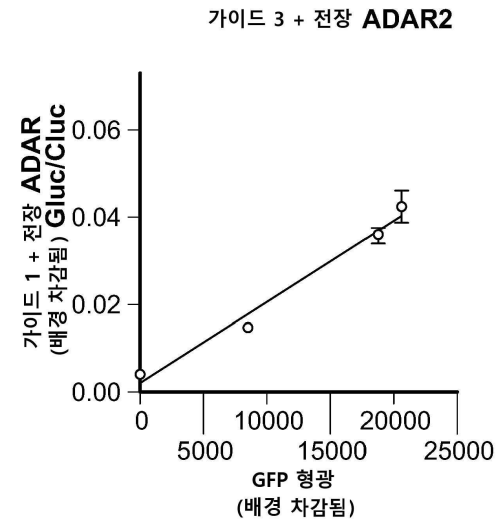
도면34b



도면35a



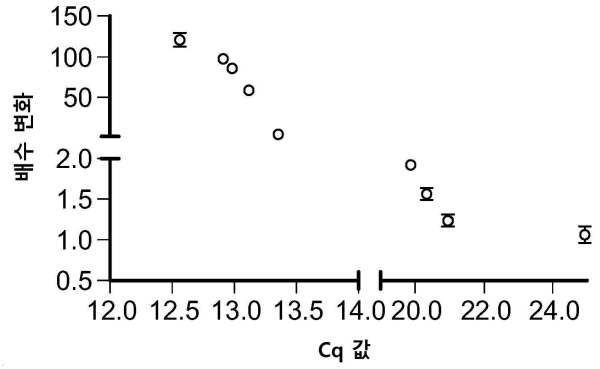
도면35b



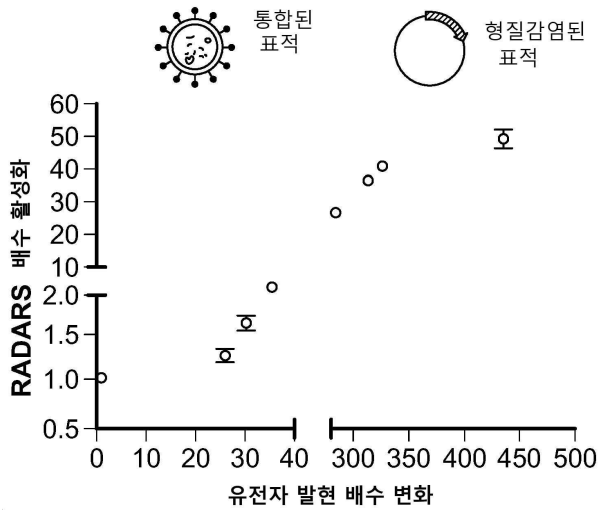
도면36a



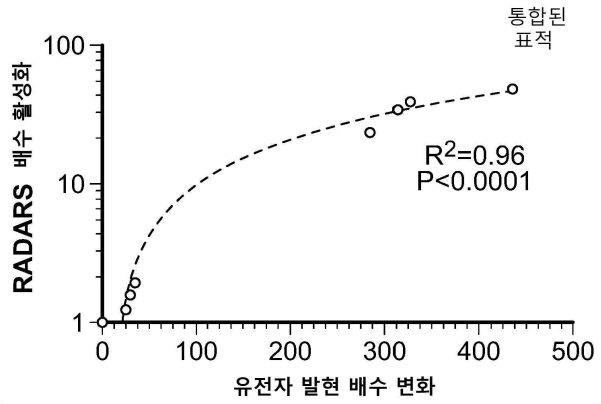
도면36b



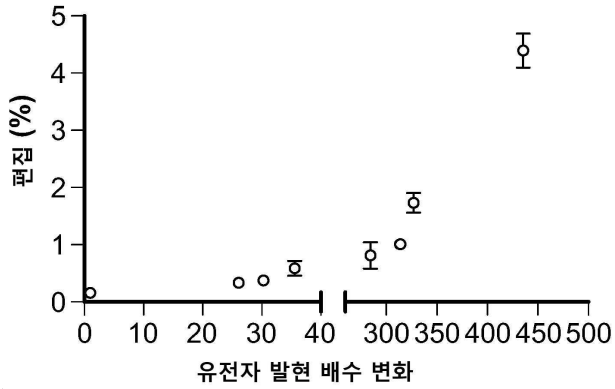
도면37



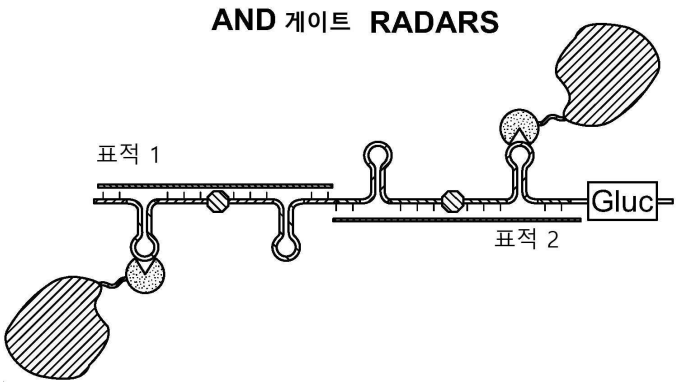
도면38



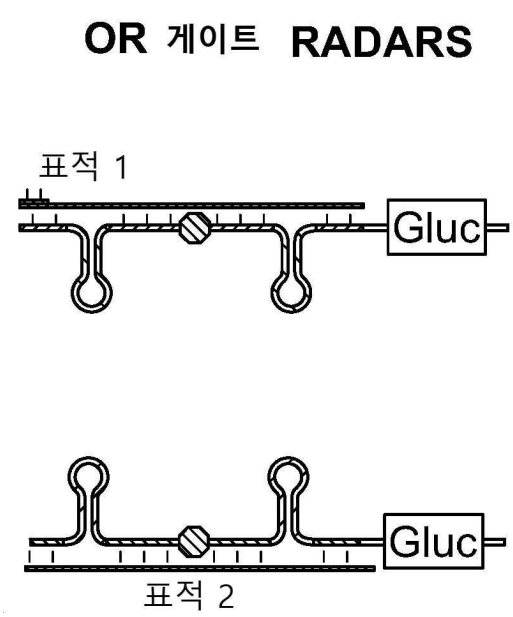
도면39



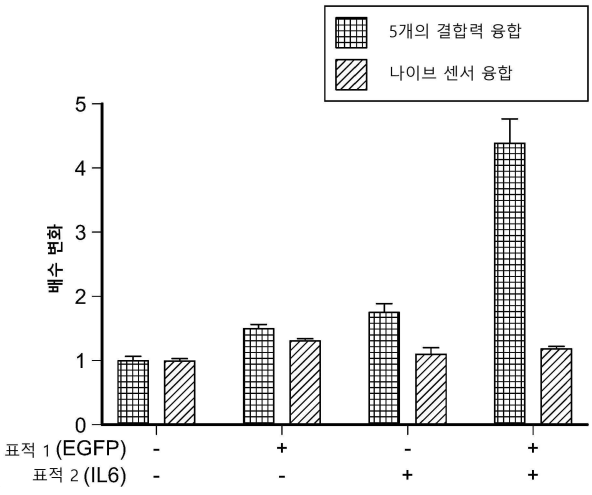
도면40a



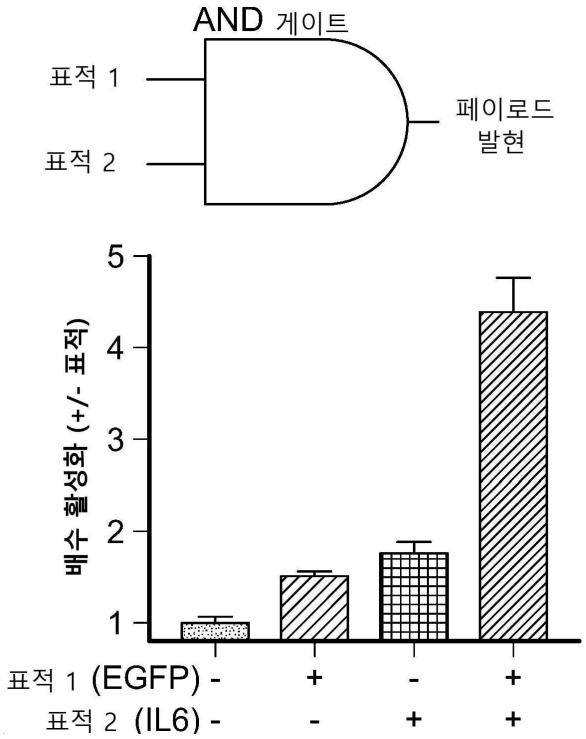
도면40b



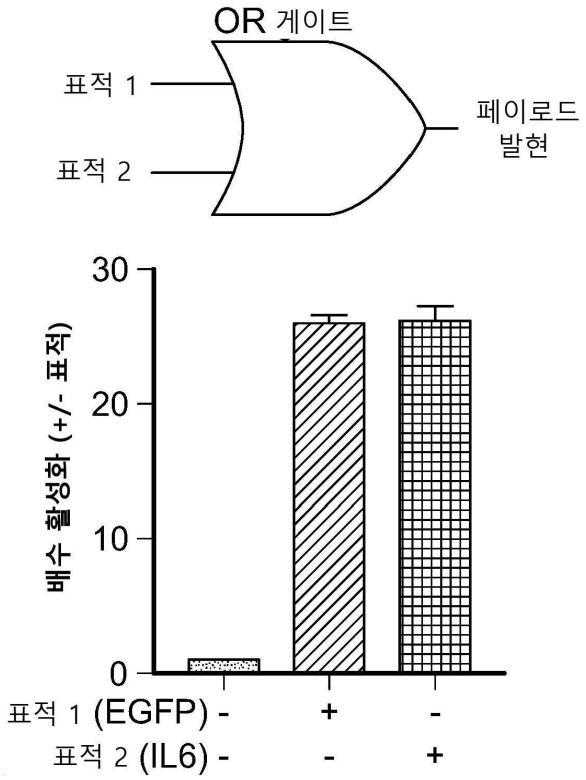
도면40c



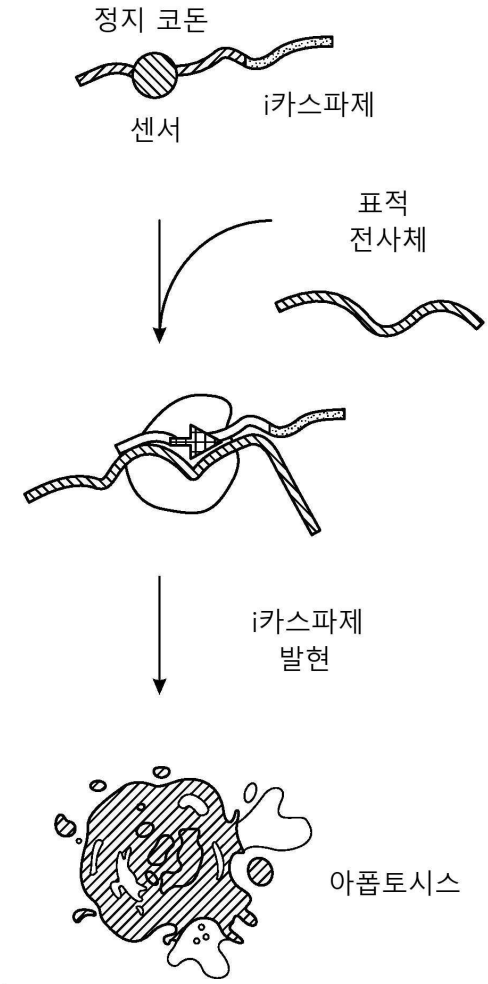
도면41a


AND 게이트
표적 1
표적 2
페이로드
발현
배수 활성화 (+/- 표적)
5
4
3
2
1
표적 1 (EGFP) - + - +
표적 2 (IL6) - - + +

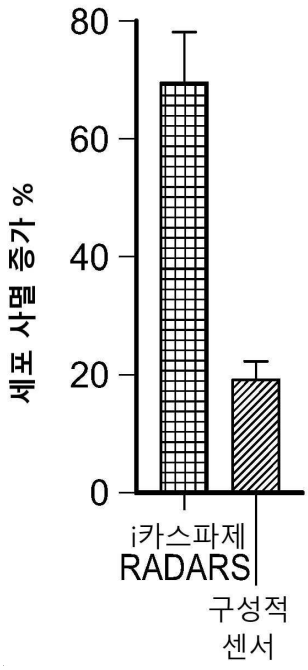
도면41b


OR 게이트
표적 1
표적 2
페이로드
발현
배수 활성화 (+/- 표적)
30
20
10
0
표적 1 (EGFP) - + -
표적 2 (IL6) - - +

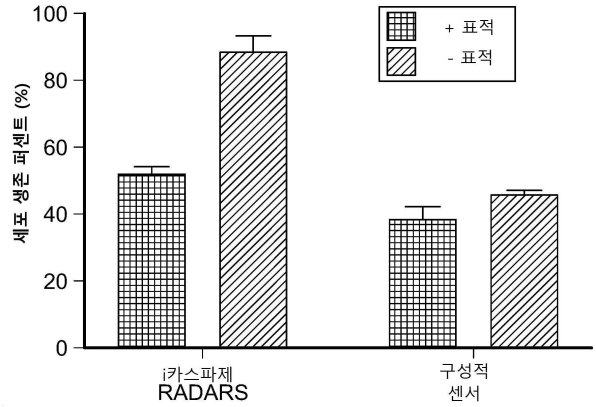
도면42a


정지 코돈
센서
i카스파제
표적
전사체
i카스파제
발현
아폽토시스

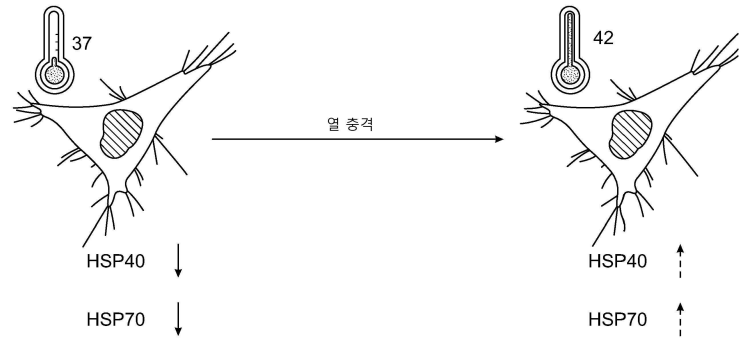
도면42b


80
60
40
20
0
세포 사멸 증가 %
i카스파제
RADARS
구성적
센서

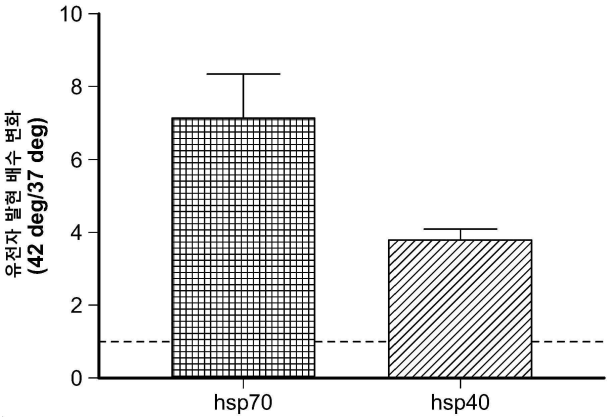
도면42c



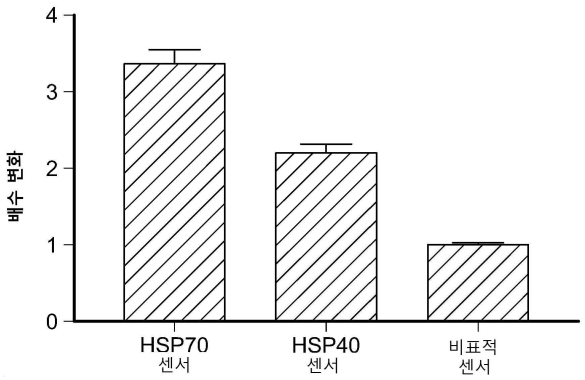
도면43a



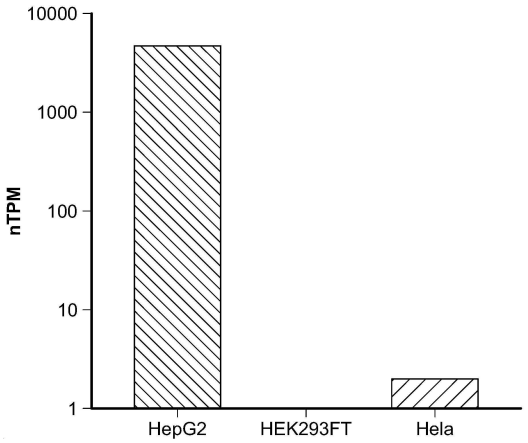
도면43b



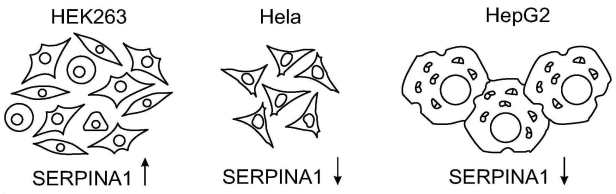
도면43c



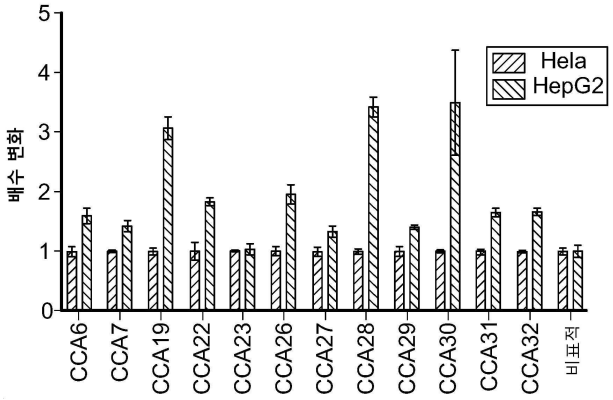
도면44a



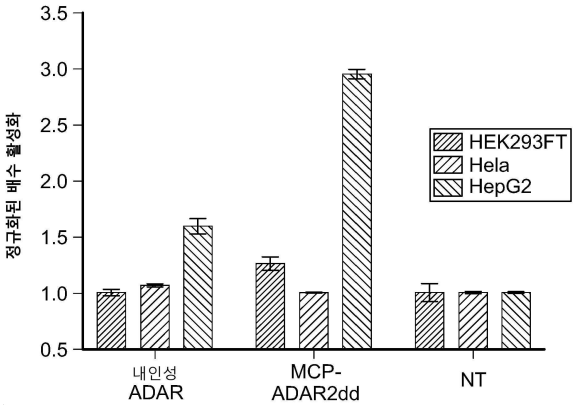
도면44b



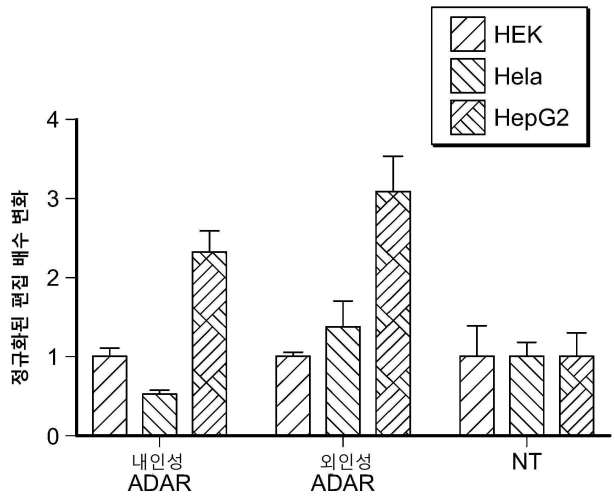
도면44c



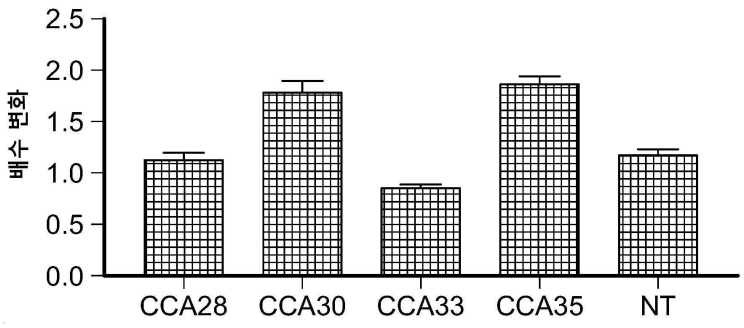
도면44d



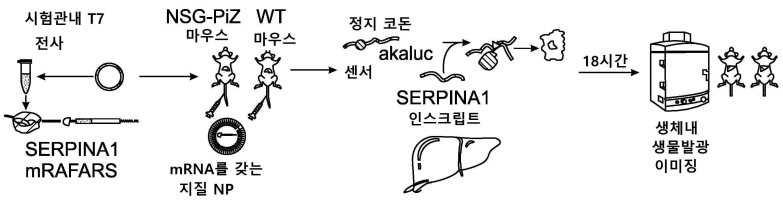
도면45



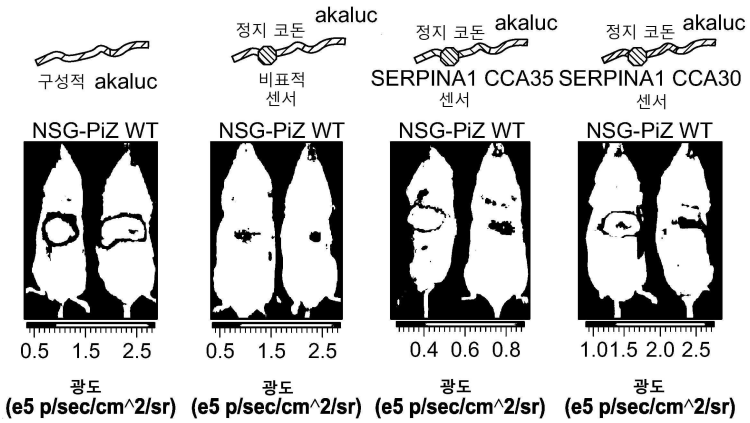
도면46



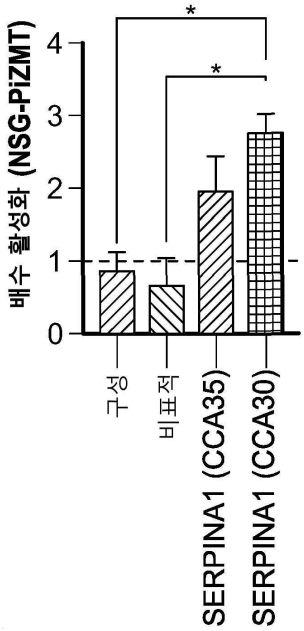
도면47a



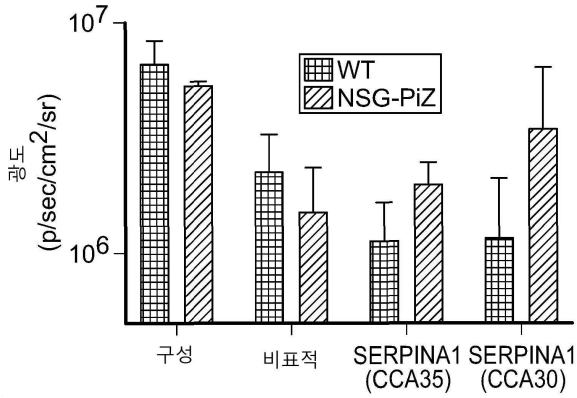
도면47b



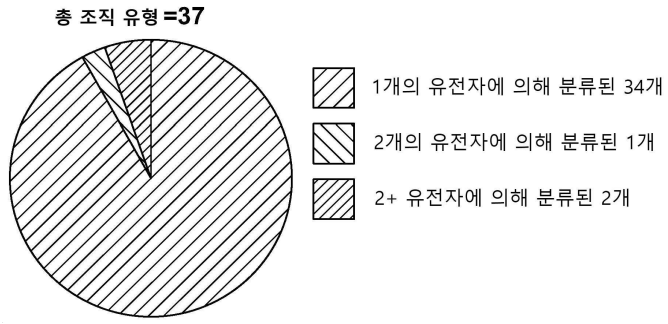
도면48a



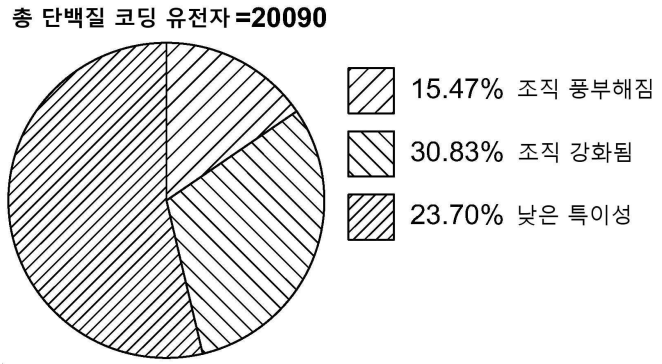
도면48b



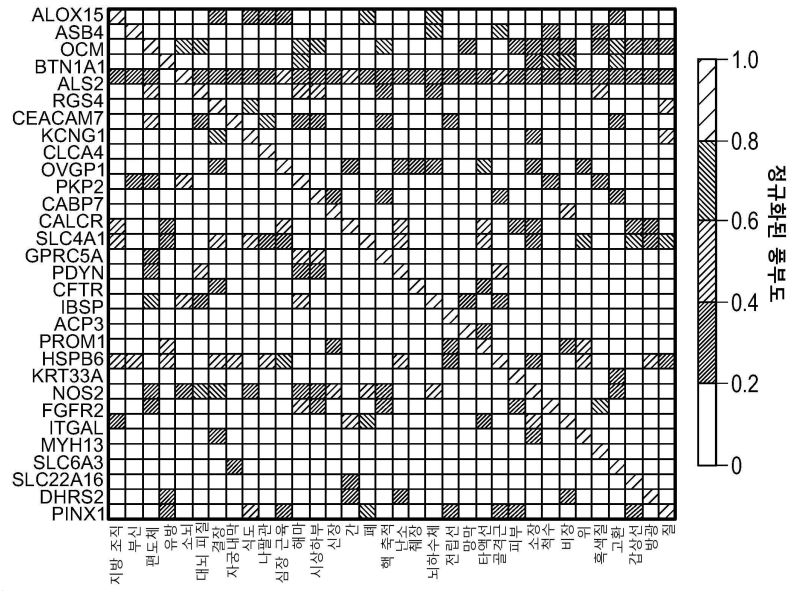
도면49a



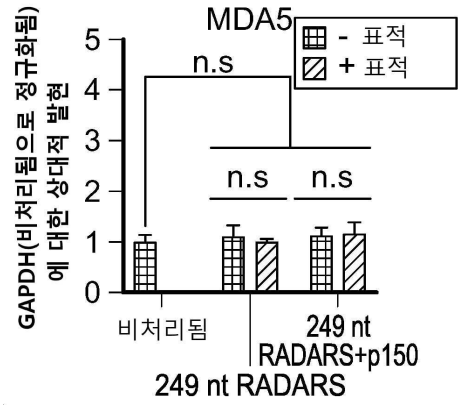
도면49b



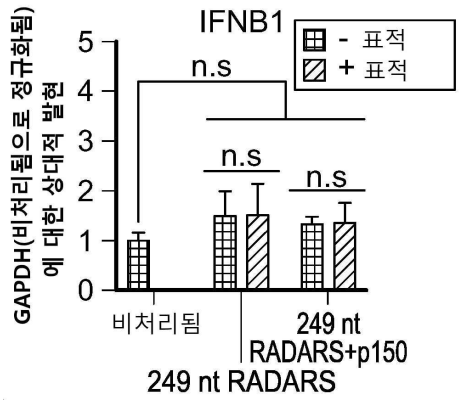
도면49c



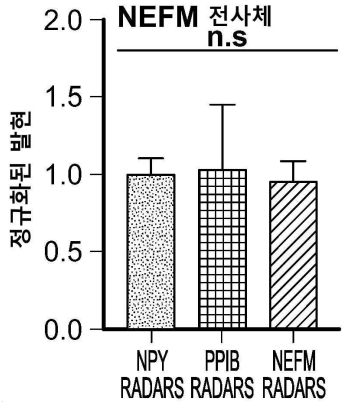
도면50a



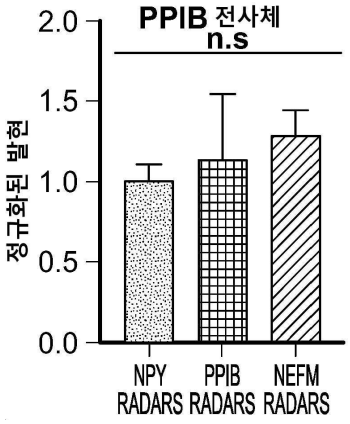
도면50b



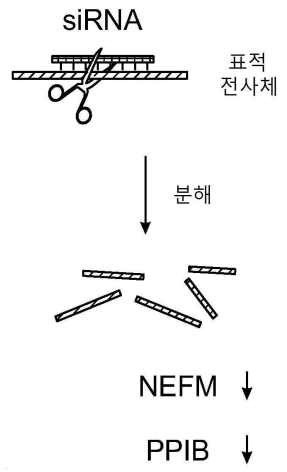
도면50c



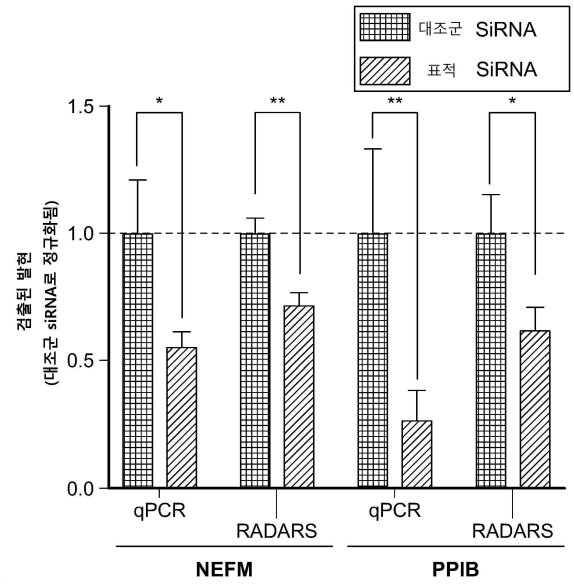
도면50d



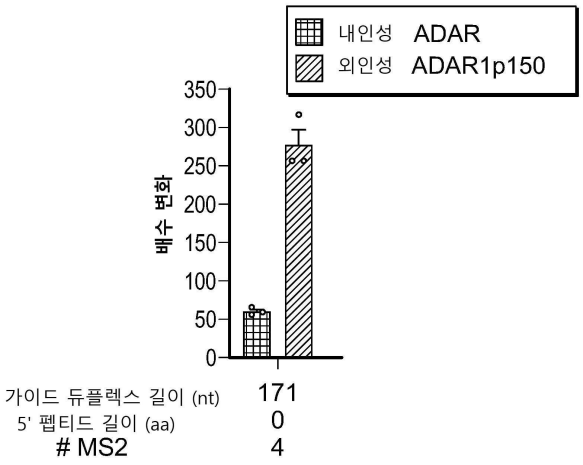
도면51a



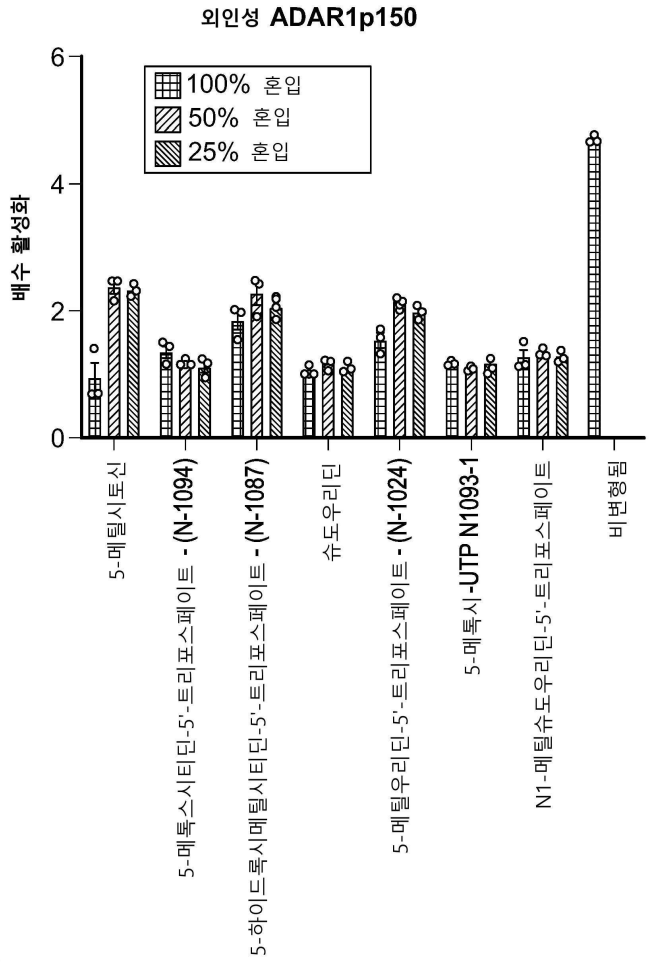
도면51b



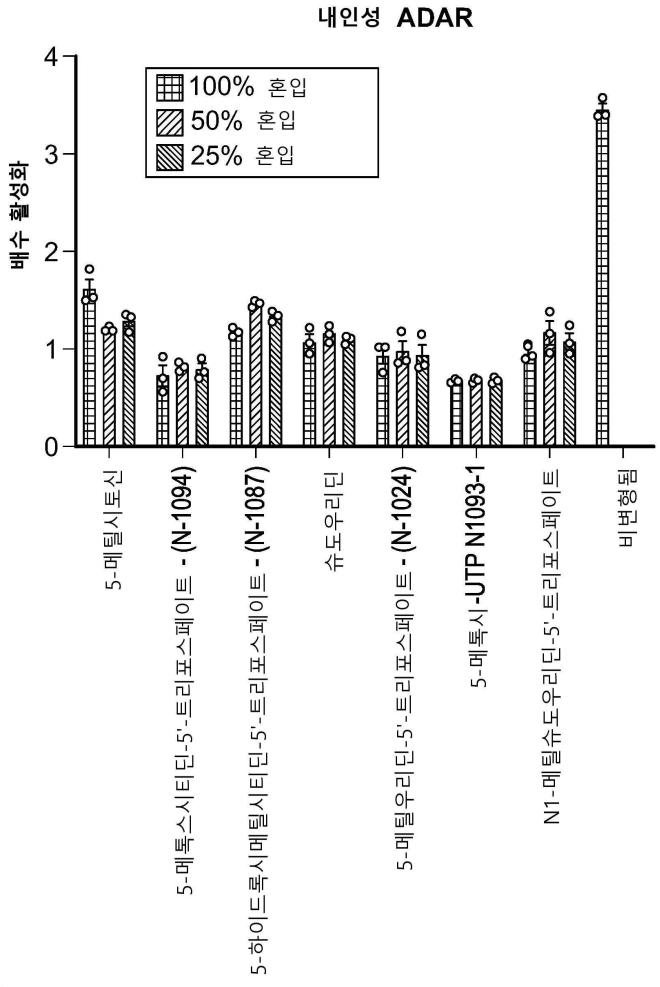
도면52


내인성 ADAR
외인성 ADAR1p150
배수 변화
350
300
250
200
150
100
50
0
가이드 듀플렉스 길이 (nt) 171
5' 펩티드 길이 (aa) 0
MS2 4

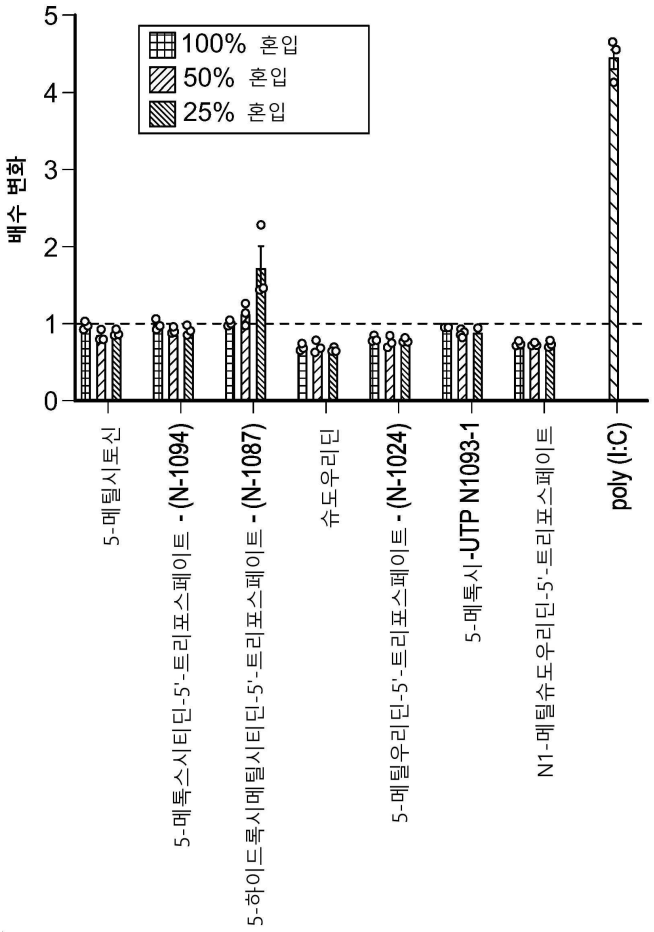
도면53a


외인성 ADAR1p150
100% 혼입
50% 혼입
25% 혼입
배수 활성화
6
4
2
0
5-메틸시토신
5-메톡스시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1094)
5-하이드록시메틸시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1087)
슈도우리딘
5-메틸우리딘-5'-트리포스페이트 - (N-1024)
5-메톡시-UTP N1093-1
N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트
비변형됨

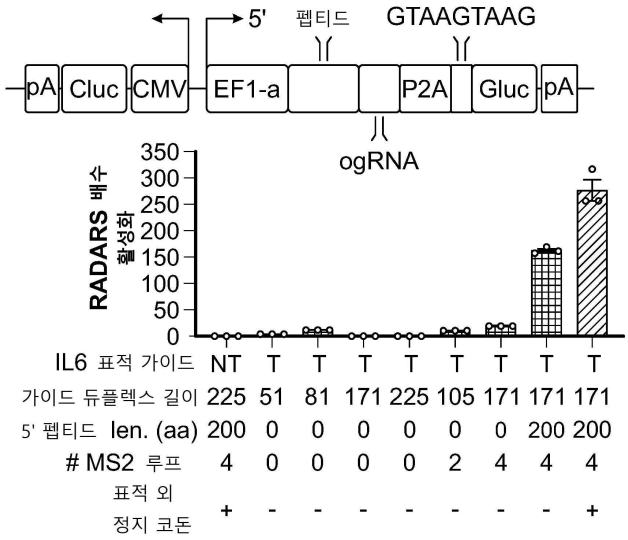
도면53b


내인성 ADAR
100% 혼입
50% 혼입
25% 혼입
배수 활성화
0
1
2
3
4
5-메틸시토신
5-메톡스시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1094)
5-하이드록시메틸시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1087)
슈도우리딘
5-메틸우리딘-5'-트리포스페이트 - (N-1024)
5-메톡시-UTP N1093-1
N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트
비변형됨

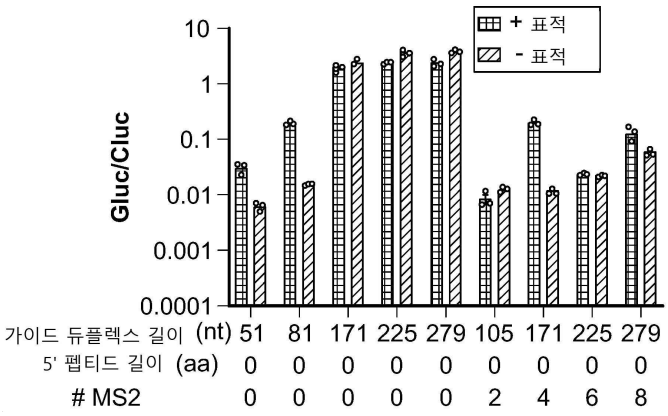
도면53c


100% 혼입
50% 혼입
25% 혼입
배수 변화
5
4
3
2
1
0
5-메틸시토신
5-메톡스시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1094)
5-하이드록시메틸시티딘-5'-트리포스페이트 - (N-1087)
슈도우리딘
5-메틸우리딘-5'-트리포스페이트 - (N-1024)
5-메톡시-UTP N1093-1
N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트
poly (I:C)

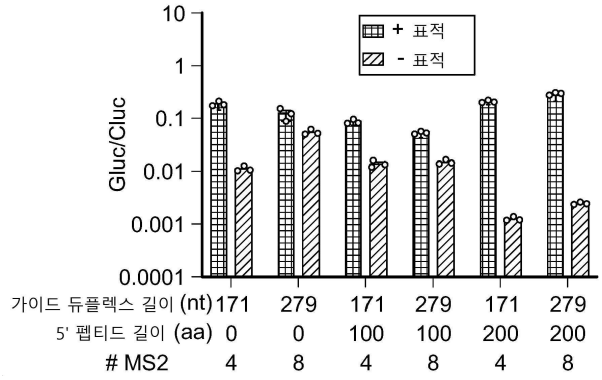
도면54a


5'
펩티드
GTAAGTAAG
pA
Cluc
CMV
EF1-a
P2A
Gluc
pA
ogRNA
RADARS 배수 활성화
350
300
250
200
150
100
50
0
IL6 표적 가이드 NT T T T T T T T T
가이드 듀플렉스 길이 225 51 81 171 225 105 171 171 171
5' 펩티드 len. (aa) 200 0 0 0 0 0 0 200 200
MS2 루프 4 0 0 0 0 2 4 4 4
표적 외 정지 코돈 + - - - - - - - +

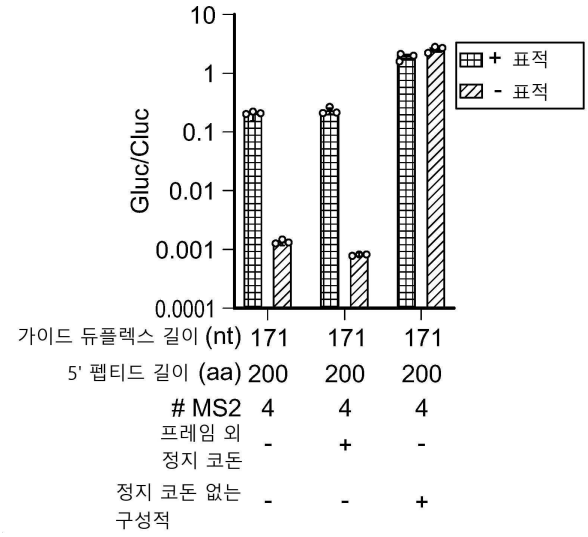
도면54b



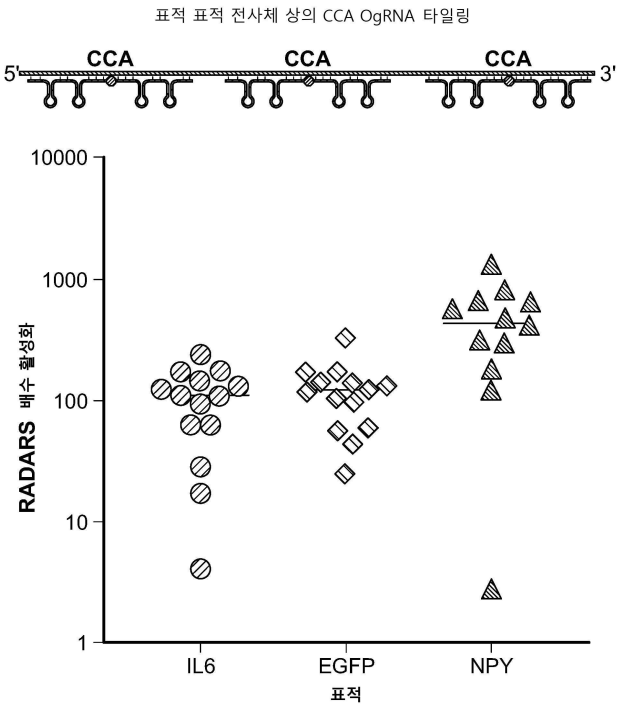
도면55a



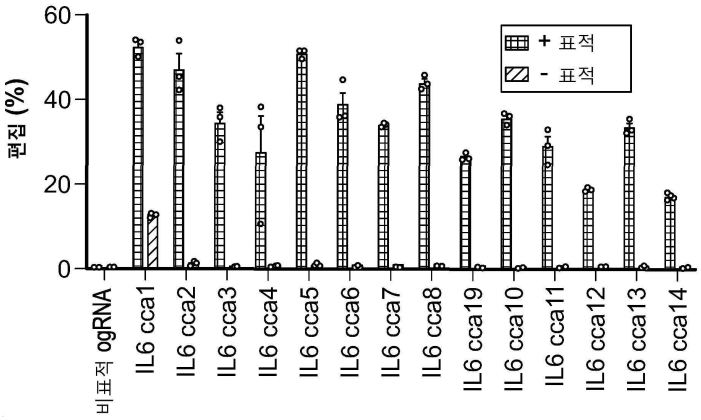
도면55b



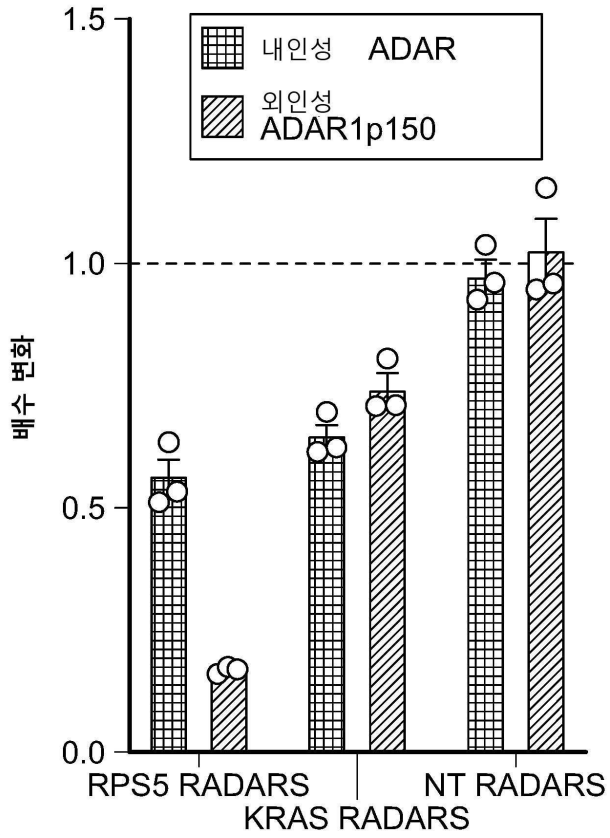
도면56a


표적 표적 전사체 상의 CCA OgRNA 타일링
5'
CCA
CCA
CCA
3'
RADARS 배수 활성화
10000
1000
100
10
1
IL6
EGFP
NPY
표적

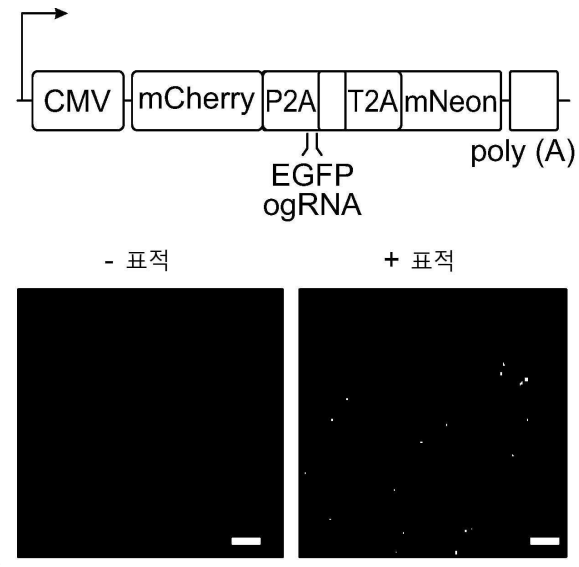
도면56b


편집 (%)
60
40
20
0
+ 표적
- 표적
비표적 ogRNA
IL6 cca1
IL6 cca2
IL6 cca3
IL6 cca4
IL6 cca5
IL6 cca6
IL6 cca7
IL6 cca8
IL6 cca19
IL6 cca10
IL6 cca11
IL6 cca12
IL6 cca13
IL6 cca14

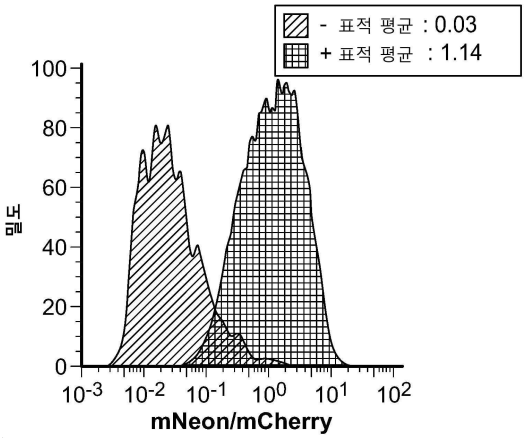
도면57


1.5
1.0
0.5
0.0
내인성 ADAR
외인성 ADAR1p150
배수 변화
RPS5 RADARS
NT RADARS
KRAS RADARS

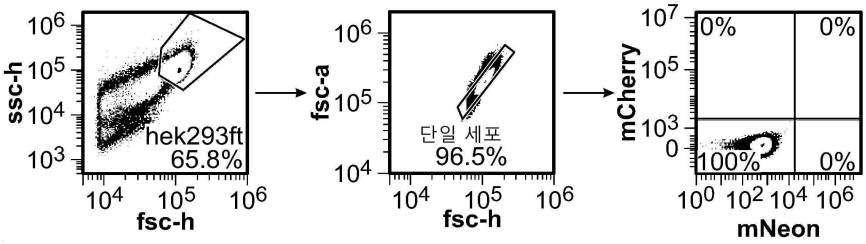
도면58a


CMV
mCherry
P2A
T2A
mNeon
poly (A)
EGFP
ogRNA
- 표적
+ 표적

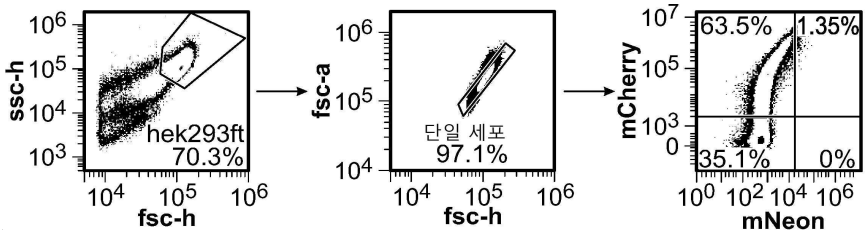
도면58b



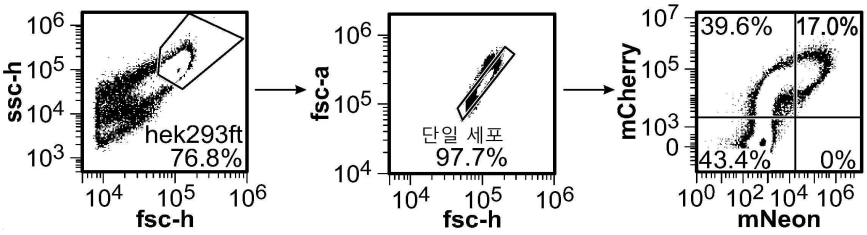
도면59a



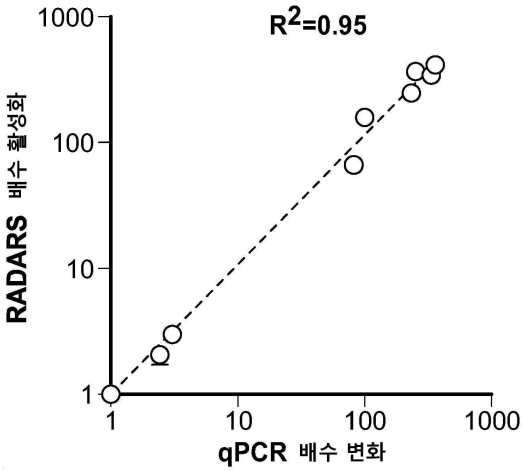
도면59b



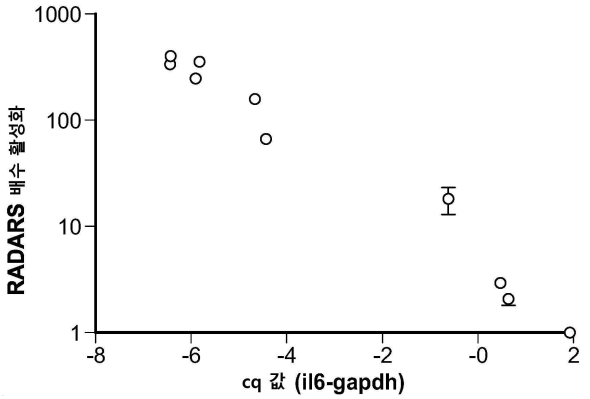
도면59c



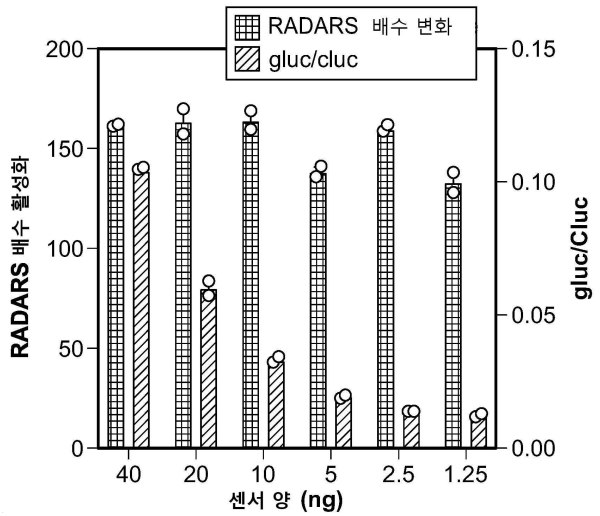
도면60a



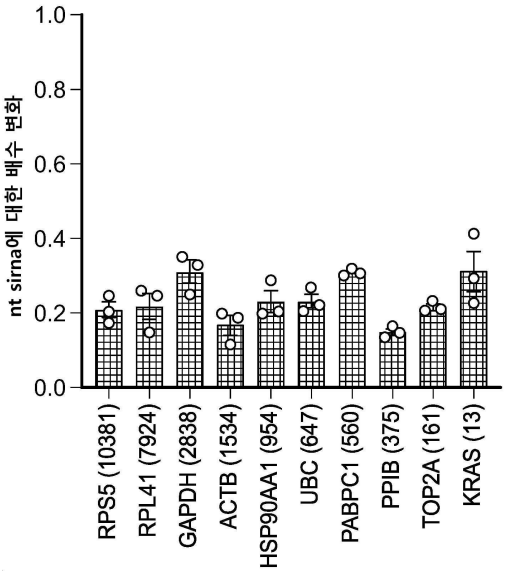
도면60b



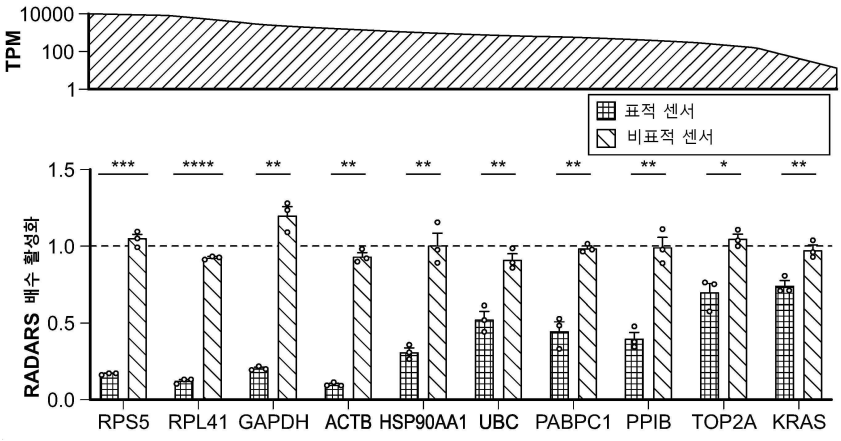
도면60c



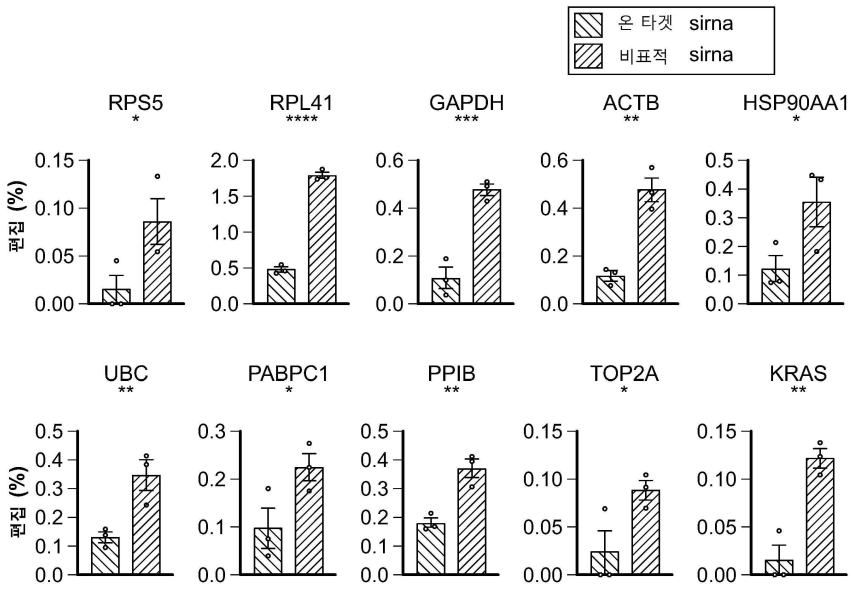
도면61


nt sirna에 대한 배수 변화
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
RPS5 (10381)
RPL41 (7924)
GAPDH (2838)
ACTB (1534)
HSP90AA1 (954)
UBC (647)
PABPC1 (560)
PPIB (375)
TOP2A (161)
KRAS (13)

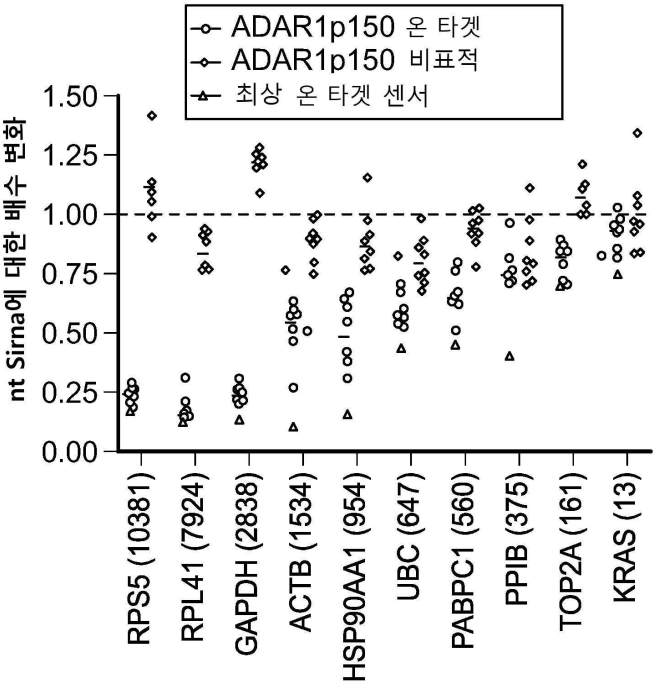
도면62a


TPM
10000
100
1
표적 센서
비표적 센서
RADARS 배수 활성화
1.5
1.0
0.5
0.0
***
****
**
**
**
**
**
**
*
**
RPS5
RPL41
GAPDH
ACTB
HSP90AA1
UBC
PABPC1
PPIB
TOP2A
KRAS

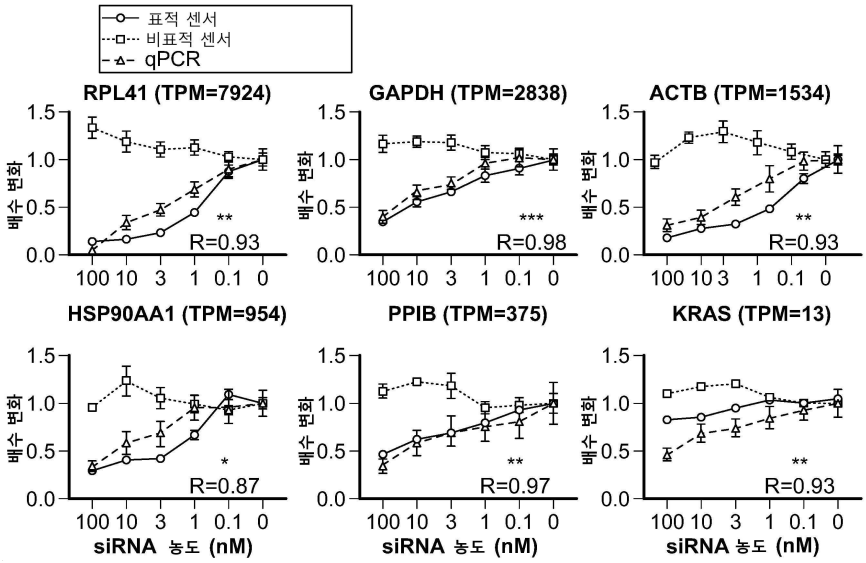
도면62b


온 타겟 sirna
비표적 sirna
RPS5
RPL41
GAPDH
ACTB
HSP90AA1
UBC
PABPC1
PPIB
TOP2A
KRAS
편집 (%)

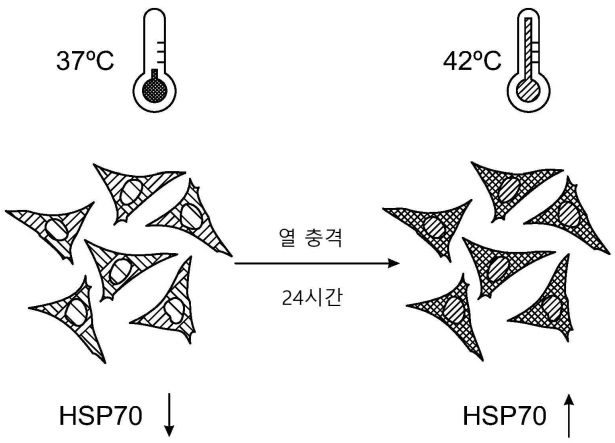
도면63a


ADAR1p150 온 타겟
ADAR1p150 비표적
최상 온 타겟 센서
nt Sirna에 대한 배수 변화
RPS5 (10381)
RPL41 (7924)
GAPDH (2838)
ACTB (1534)
HSP90AA1 (954)
UBC (647)
PABPC1 (560)
PPIB (375)
TOP2A (161)
KRAS (13)

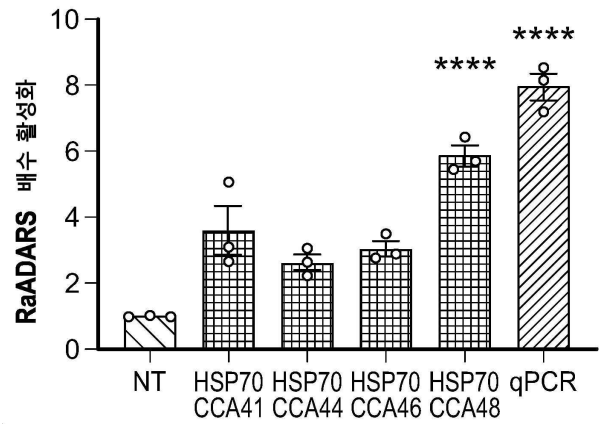
도면63b



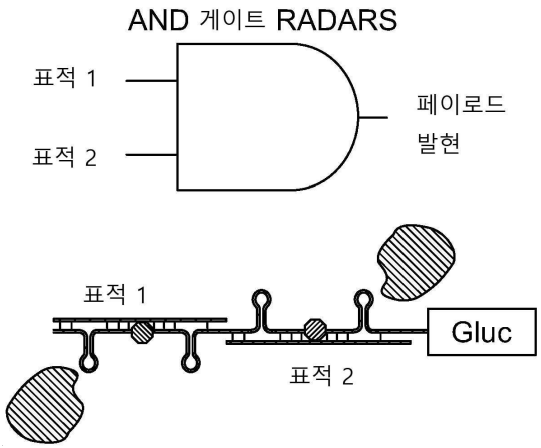
도면64a



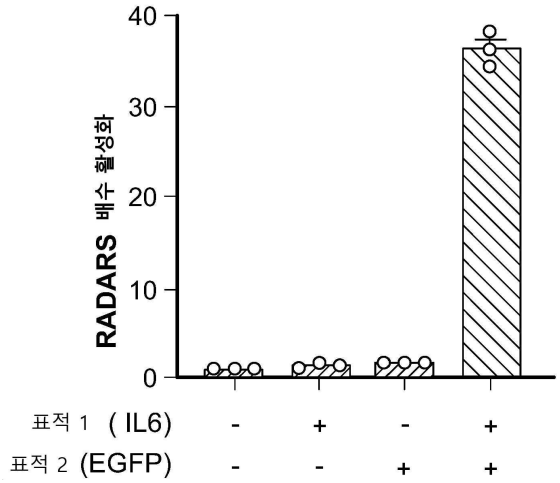
도면64b



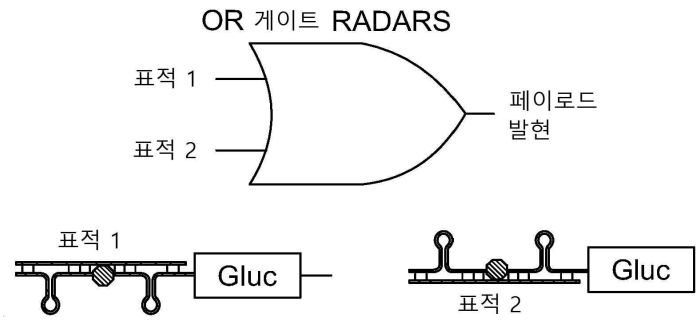
도면65a



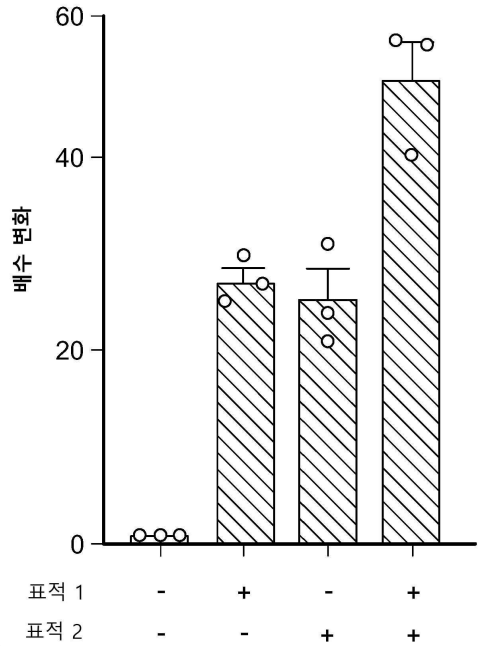
도면65b



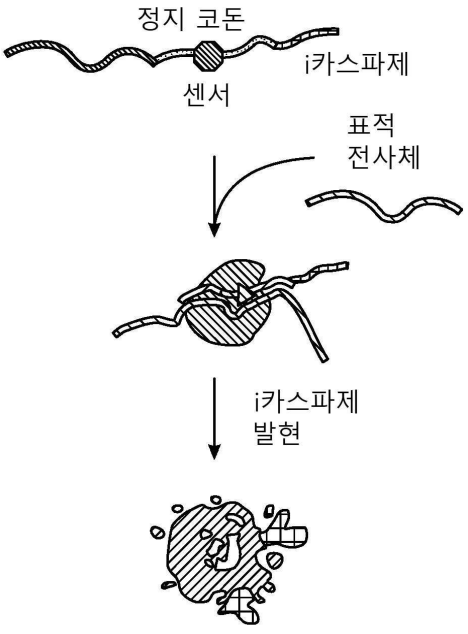
도면66a



도면66b

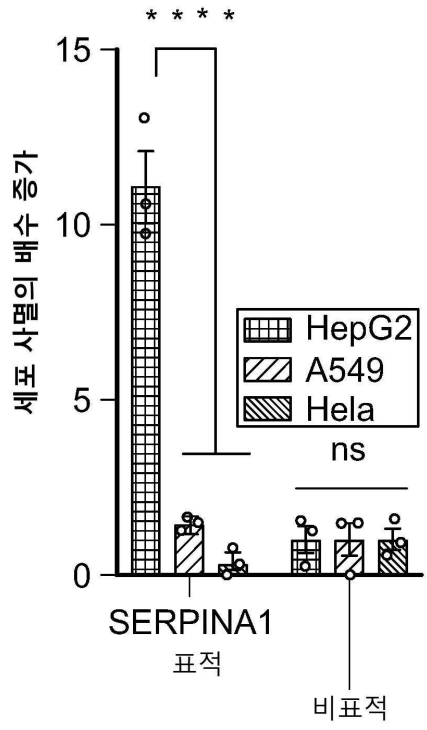


도면67a

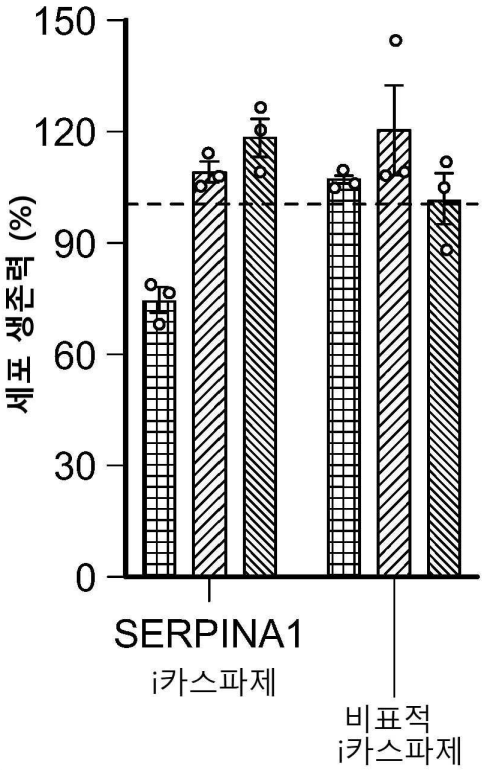


세포 유형 특이적 아폽토시스

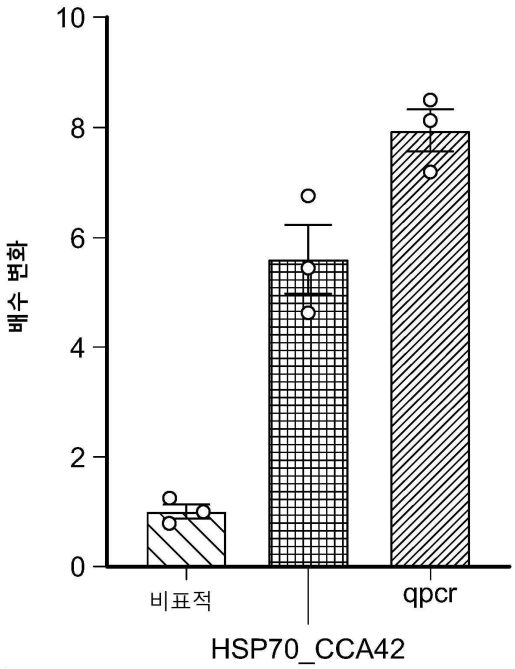
도면67b


* * * *
15
10
5
0
세포 사멸의 배수 증가
HepG2
A549
Hela
ns
SERPINA1
표적
비표적

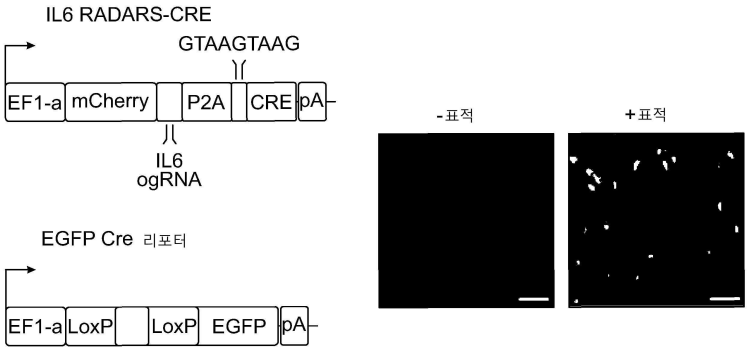
도면67c


150
120
90
60
30
0
세포 생존력 (%)
SERPINA1
i카스파제
비표적
i카스파제

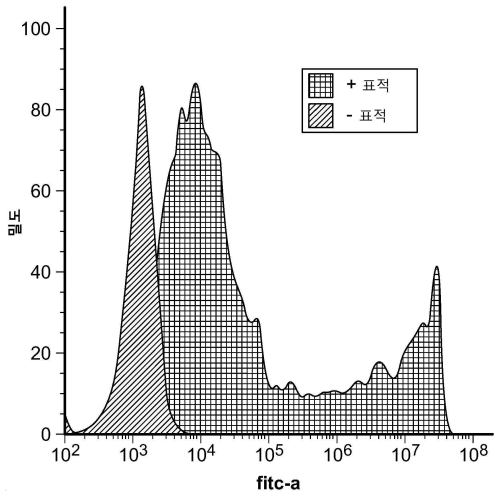
도면68



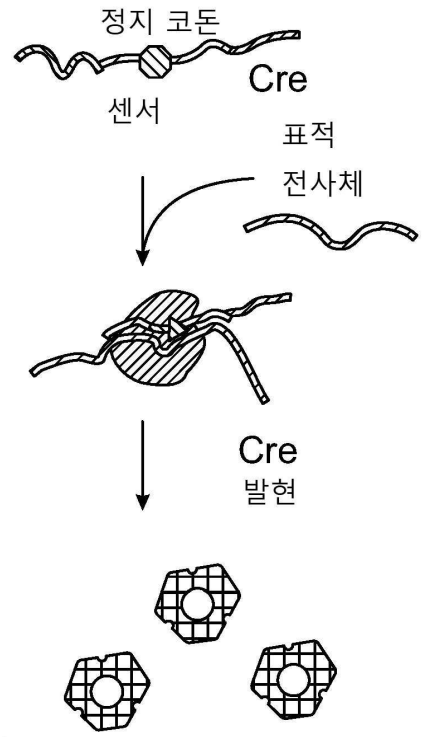
도면69a



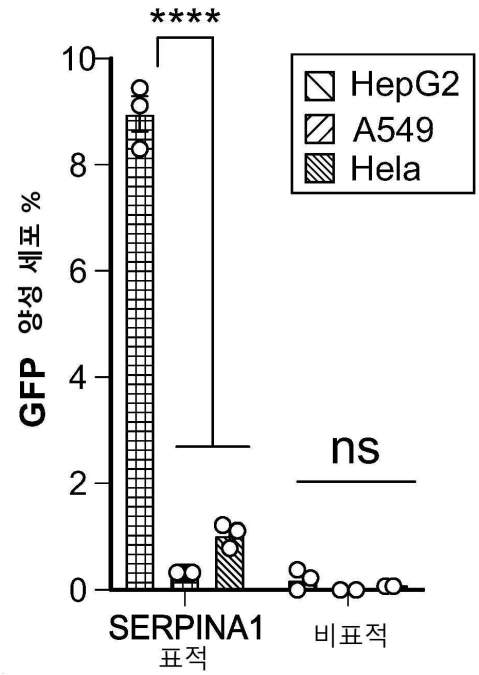
도면69b



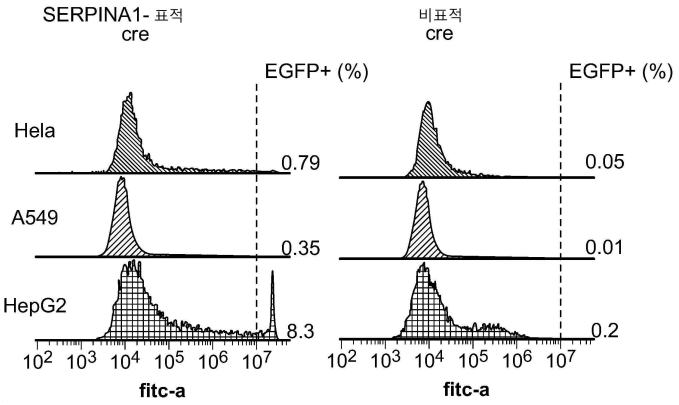
도면70a


정지 코돈
Cre
센서
표적
전사체
Cre
발현

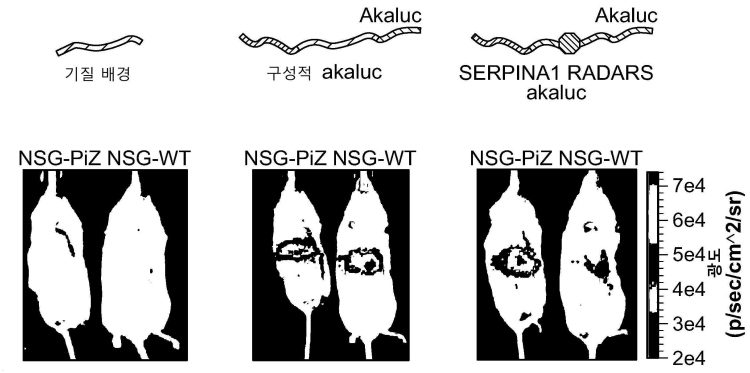
도면70b


****
10
8
6
4
2
0
GFP 양성 세포 %
HepG2
A549
Hela
ns
SERPINA1
표적
비표적

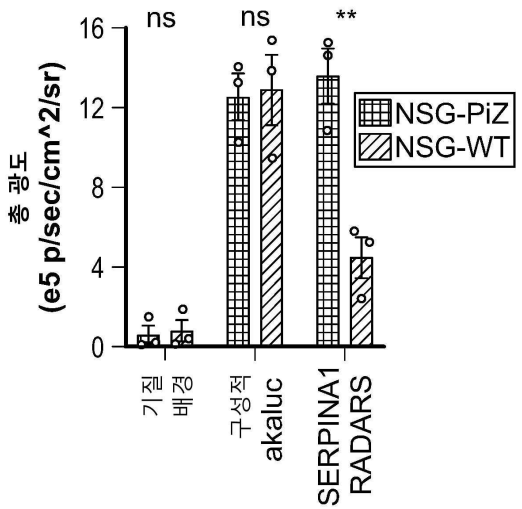
도면70c



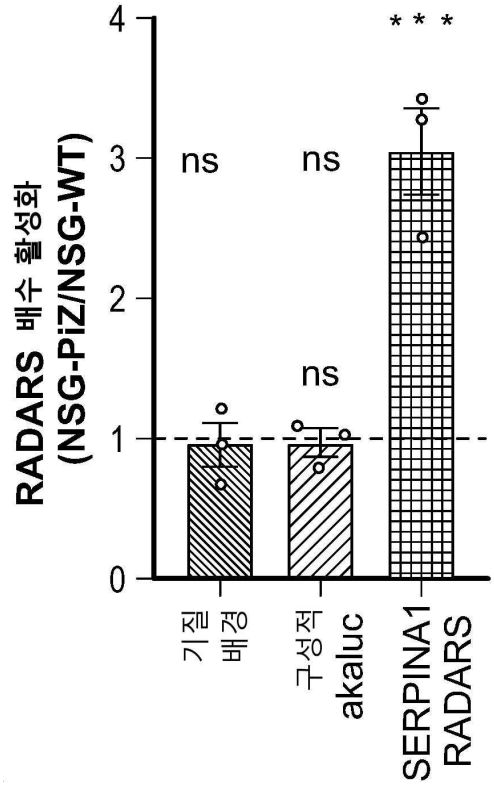
도면71a



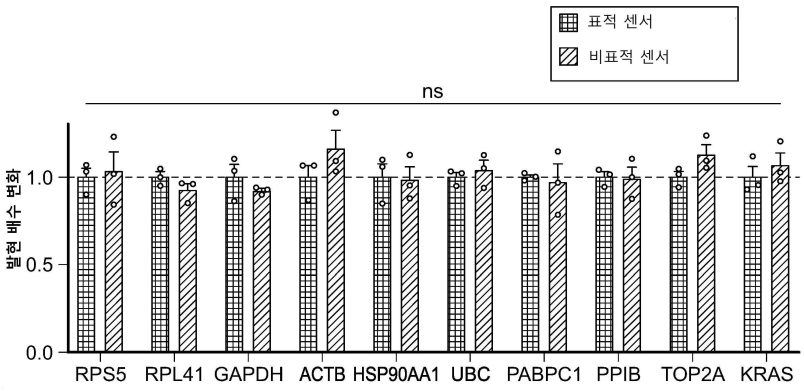
도면71b



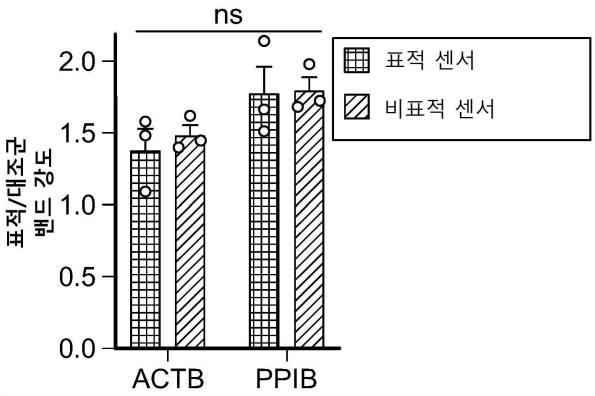
도면71c



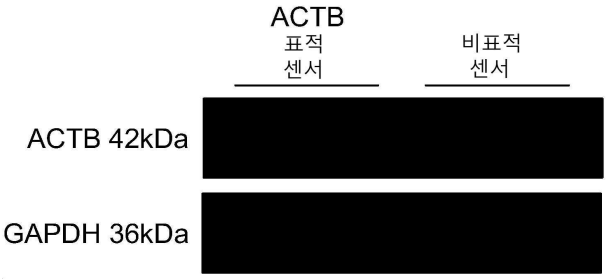
도면72a



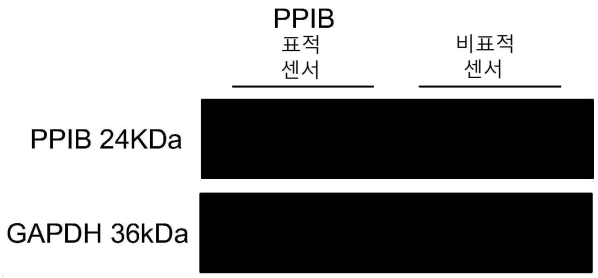
도면72b



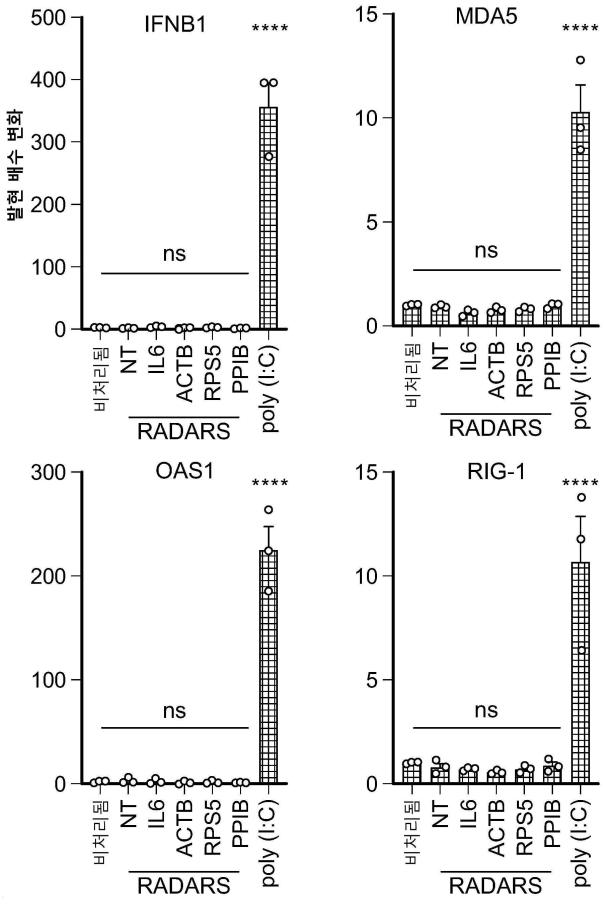
도면72c



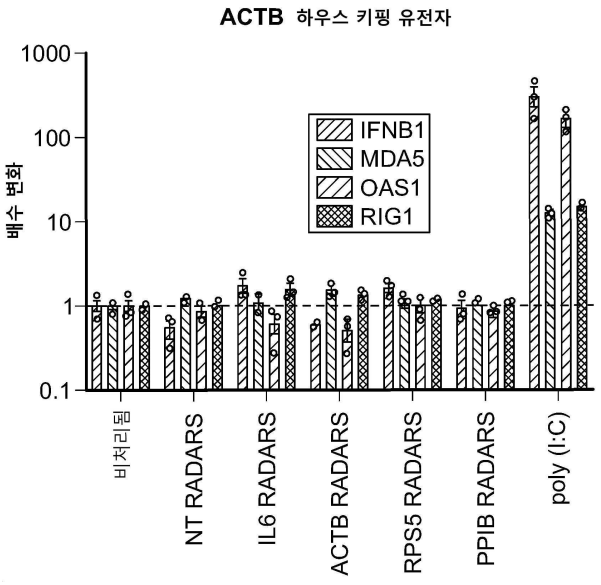
도면72d



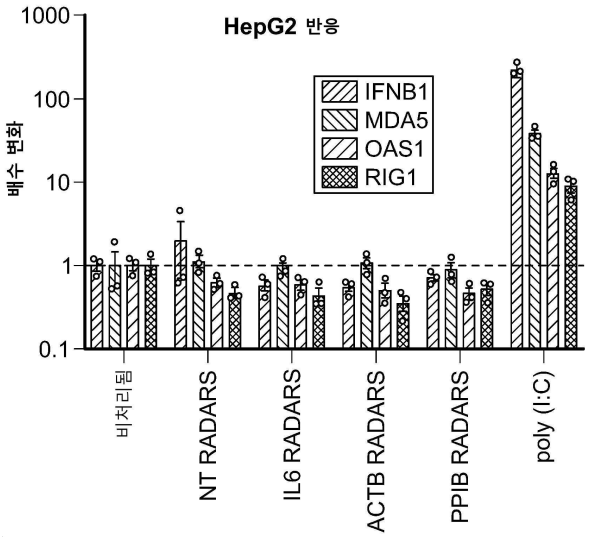
도면73a



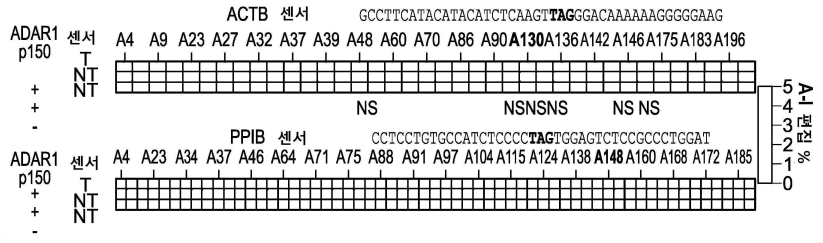
도면73b



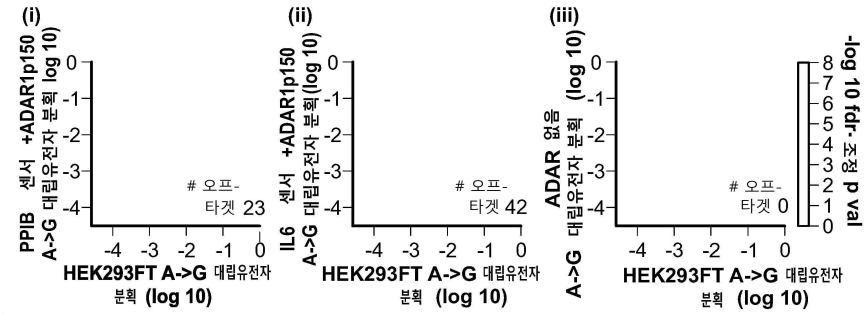
도면73c



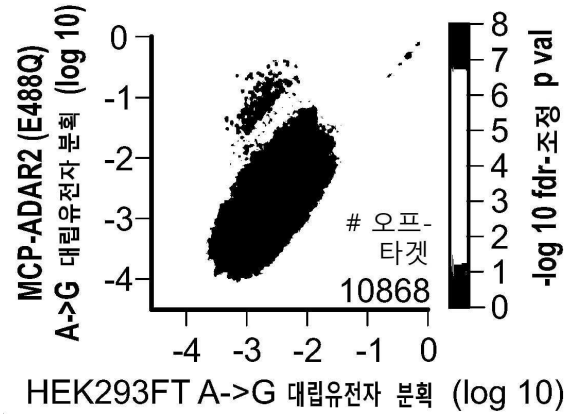
도면74a



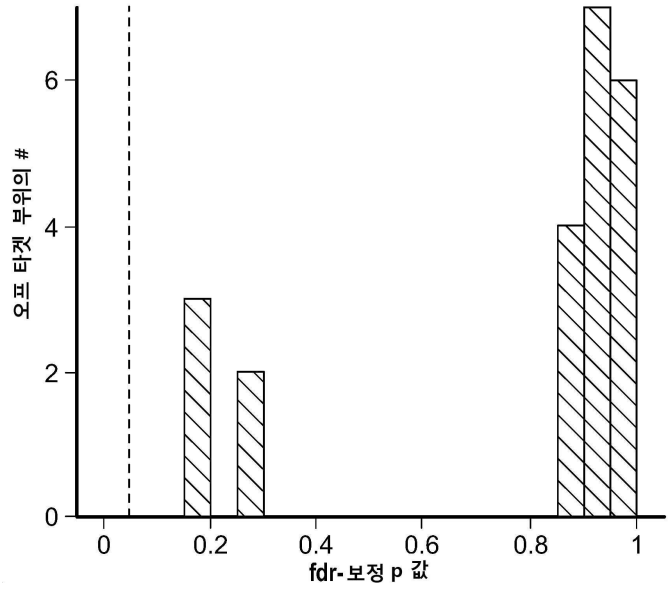
도면74b



도면74c



도면75a



도면75b

