

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2015년 12월 3일 (03.12.2015)



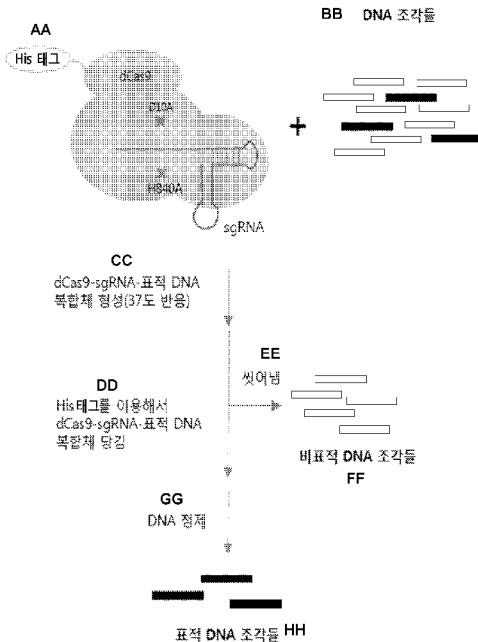
(10) 국제공개번호  
WO 2015/183026 A1

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/005384
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 28일 (28.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0064526 2014년 5월 28일 (28.05.2014) KR
- (71) 출원인: 주식회사 툴젠 (TOOLGEN INCORPORATED) [KR/KR]; 153-783 서울시 금천구 가산디지털2로 184, 1208, Seoul (KR). 기초과학연구원 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) [KR/KR]; 34047 대전광역시 유성구 유성대로 1689 번길 70, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김진수 (KIM, Jin Soo); 151-015 서울시 관악구 관악로 1, 122-205, Seoul (KR). 정의환 (JEONG, Eui Hwan); 151-858 서울시 관악구 신림로 7길 23, 106, Seoul (KR). 김석중 (KIM, Seok Joong); 137-911 서울시 서초구 서초대로 74길 30, 501-1812, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING TARGET DNA USING INACTIVATED TARGET-SPECIFIC NUCLEASE

(54) 발명의 명칭 : 불활성화된 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 분리 방법



AA ... His tag  
 BB ... DNA fragments  
 CC ... Form dCas9-sgRNA-target DNA complex (reaction at 37°C)  
 DD ... Pull dCas9-sgRNA-target DNA complex using His tag  
 EE ... Wash  
 FF ... Non-target fragments  
 GG ... DNA purification  
 HH ... Target DNA fragments

(57) Abstract: The present invention relates to a genotyping method using target-specific nuclease and, specifically, to a method for cancer diagnosis or genotyping by removing wild type DNA or particular genotype DNA using target-specific nuclease or a variant thereof to amplify or concentrate only a small amount of DNA which has a difference in variation, such as mutation, or genotype, and to a method for separating target DNA using target-specific nuclease or a variant thereof. Such methods are novel paradigm methods contrary to existing simple target-specific nuclease for post-PCR recognition of normal genotype and carcinogenic genotype, and can be favorably used in the early diagnosis of cancer or analysis of similar genotypes.

(57) 요약서: 본 발명은 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 유전자형 분석 방법에 관한 것으로, 구체적으로 표적 특이적 뉴클레아제 또는 그 변이체를 이용하여 야생형 DNA 또는 특정 유전자형 DNA를 제거하여 돌연변이 등의 변이 또는 유전자형의 차이가 있는 목적하는 소량의 DNA만을 증폭하거나 농축하여 암의 진단 또는 유전자형 분석을 하는 방법, 및 표적 특이적 뉴클레아제 또는 그 변이체를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 방법에 관한 것이다. 이와 같은 방법은 기존의 단순한 PCR 후 정상 유전형과 발암 유전형을 인식하는 표적 특이적 뉴클레아제와 반대되는 새로운 패러다임의 방법으로 암의 조기 진단 또는 유사한 유전자형의 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2015/183026 A1

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

# 발명의 명칭: 불활성화된 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 분리 방법

### 기술분야

- [1] 본 발명은 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 유전자형 분석 방법에 관한 것으로, 구체적으로 표적 특이적 뉴클레아제 또는 그 변이체를 이용하여 야생형 DNA 또는 특정 유전자형 DNA를 제거하여 돌연변이 등의 변이 또는 유전자형의 차이가 있는 목적하는 소량의 DNA 만을 증폭하거나 농축하여 암의 진단 또는 유전자형 분석을 하는 방법, 및 표적 특이적 뉴클레아제 또는 그 변이체를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 방법에 관한 것이다.

[2]

### 배경기술

- [3] 혈장 DNA는 신체의 여러 세포에서 유래된 DNA 단편들을 가지고 있다. 인간의 모든 세포는 같은 유전정보를 가지고 있지만, 외부의 세포가 가해질 경우 (세포 치료 또는 장기이식 등) 또는 내부의 세포에서 돌연변이가 일어날 경우 비균일한 (heterogeneous) 상태가 될 수 있다.

[4]

- [5] 이러한 상황의 예로는 1) 암 (암은 다양한 돌연변이에 의해 발생) 2) 임신 (태아의 DNA는 모체와 일치하지 않음), 3) 세포 및 장기이식 (공여자의 DNA는 이식 받는 환자의 DNA와 일치하지 않음) 등이 있을 수 있다. 각각의 경우 아주 낮은 비율이라도 같은 유전자에 대한 조금씩 다른 서열의 단편들이 혈장 DNA에 존재할 수 있다. 따라서, 이를 민감하게 분자진단적 방식을 통해 관찰하는 기술이 중요하다.

[6]

- [7] 특히, 이미 발생한 암 환자 내의 혈액 등의 시료 내에는 과량의 정상 DNA와 돌연변이가 유발된 소량의 암 유래 DNA가 혼재하므로, 이를 분석하기 위한 방법이 필요하다. 그러나 기존의 방법들인 PCR-RFLP 등의 진단 방법은 PCR을 통한 시료 DNA를 증폭 후 돌연변이 특이적 제한 효소로 절단하여 절단 여부를 체크하는 방법이 주로 이용되어 왔다 (Hum Mutat. 2003 May;21(5):535-41). 이와 같은 방식은 다양한 진단에 있어서 용이하게 진단이 가능하다는 장점이 있으나, 여전히 암의 초기 진단 등에서는 위양성/음성 등의 검색이 되어 정확한 정보의 제공에는 한계가 있는 단점이 있다.

[8]

- [9] 한편, 기존의 분자진단 방식인 PCR 또는 ICA (isothermal chain amplication) 등은 비슷한 서열을 가진 유사한 종의 유전자형 분석이 어려운 점이 있었다. 예를 들어 병원성 세균/바이러스와 비병원성 세균/바이러스가 매우 유사한 서열을

가진 경우, 한우와 수입소처럼 거의 유사하지만 특정 부위에서 다른 서열을 가진 경우 등 비슷한 종 또는 같은 종 내의 다른 개체의 게놈을 특이적으로 검출하는 방식이 필요하다. 기존의 분자진단 방식이 비슷한 서열을 완벽히 구분하지 못하면 위양성/음성이 발생 가능성이 높기 때문이다.

[10]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[11] 본 발명자들은 보다 정확한 진단 및 유전자형 분석 방법을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 놀랍게도 기존의 진단 또는 유전자형 분석 방법의 패러다임과 반대되게, 표적 특이적 뉴클레아제를 이용하여 목적하지 않는 DNA를 절단하여 미리 제거하거나, 목적 DNA에 대한 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 단백질의 복합체를 이용하여 목적 DNA는 절단으로부터 마스킹 (masking)하여 목적하지 않는 DNA를 절단하여 제거함으로써, 돌연변이 등의 변이 또는 유전자형에 차이가 있는 목적하는 소량의 DNA를 농축할 수 있음을 확인하였다. 또한, 목적 DNA에 대한 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 단백질의 복합체를 이용하여 목적 DNA를 분리 정제함으로써 목적하는 소량의 DNA를 농축할 수 있음을 확인하였다. 특히, 세포 유래 DNA를 대상으로 불활성화된 Cas 단백질 및 가이드 RNA를 이용하여 목적 DNA를 비공유 결합으로 분리할 수 있음을 확인하였다. 이와 같이 농축된 목적하는 DNA를 분자 검출 또는 분리 정제함으로써 암의 진단, 암의 예후 예측, 임신 산전 진단, 세포/장기 이식 등 다양한 분야에 이용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[12]

### 과제 해결 수단

[13] 본 발명의 하나의 목적은 (i) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 특정 유전자형 DNA가 제거된 시료 내에 존재하는 다른 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 하나의 목적은 (i) 특정 유전자형 DNA에 특이적인 가이드 RNA (guide RNA) 및 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질 (dCas)을 이용하여, 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 다른 유전자형 DNA를 인식하는 RGEN의 절단으로부터 마스킹하여 보호하여, 상기 다른 유전자형 DNA를 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 다른 유전자형 DNA가 제거된 시료 내에 존재하는 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 세균 DNA를 포함하는 분리된 시료에 비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA에 특이적인 뉴클레아제를 처리하여

비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA를 절단하여 시료 내에서 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료 내에 병원성 세균 또는 병원성 바이러스 DNA를 포함하는, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공하는 것이다.

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 병원성 세균 DNA 특이적 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질 (dCas)을 이용하여, 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 비병원성 세균 또는 바이러스에 특이적인 RGEN의 절단으로부터 매스킹하여 보호하여, 분리된 시료 내의 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 시료 내에서 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료에서 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 두 종류 이상의 DNA를 포함하는 분리된 시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 유전체 DNA를 포함하는 분리된 시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용해 분리하는 단계; 및 (ii) 상기 분리된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법을 제공하는 것이다.

[20]

### 발명의 효과

- [21] 본 발명은 기존의 유전자형 분석 방법 또는 진단 방법과 전혀 반대되는 개념으로 시료 내의 목적하는 DNA의 증폭 전에 목적하지 않는 DNA, 예컨대 정상 DNA를 표적 특이적 뉴클레아제, 예를 들어 ZFN, TALEN, RGEN을 이용하여 절단하거나, 목적하는 DNA를 불활성화된 Cas9:gRNA 복합체를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 등으로, 목적하는 DNA를 농축함으로써 유전자형 분석 또는 암의 진단을 가져올 수 있다. 본 발명의 방법에서는, 목적 DNA의 검출 전에 이를 농축하는 과정을 거침으로써 위양성/음성의 신호 등을 제거하여 암의 초기에 진단이 가능하게 하는 방법을 제공할 뿐 아니라, 암 환자의 예후 예측에 있어서 정확한 진단이 가능한 새로운 패러다임의 방법을 제공한다. 또한, 이를 통하여 암세포를 조기 진단하거나 암의 예후 예측, 수술 및 항암치료 후 전이암 발생 모니터링 등이 가능하다.

[22]

### 도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 RGEN을 이용하여 표적 DNA를 농축하는 본 발명에 따른 두 가지 방법에 대한 모식도를 나타낸 도이다.
- [24] 도 2는 유전자 가위에 의해 유도된 돌연변이의 비율을 증가시키는 방법의 모식도를 나타낸 도이다.
- [25] 도 3은 0.0054 % 내지 54 %의 돌연변이 비율을 가지고 있는 유전체 DNA 혼합물에서 자르기 전과 자른 후의 돌연변이 비율의 변화를 확인한 도이다.
- [26] 도 4는 암 유전자의 돌연변이 진단을 본 발명의 새로운 패러다임을 적용하여 수행할 수 있는지 여부를 확인하는 방법에 대한 모식도를 나타낸 도이다.
- [27] 도 5는 암유전자 돌연변이에 대한 RFLP용 RGEN의 개발 및 그 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 6은 암유전자 돌연변이에 대한 RFLP용 RGEN을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 7은 CUT-PCR을 이용한 변이 유전자 증폭 및 검출과정의 모식도를 나타낸 도이다.
- [30] 도 8은 플라스미드를 이용한 KRAS 변이 유전자 검출 실험 결과를 나타낸 도이다. 우측의 도는 야생형 및 변이 KRAS를 포함하는 플라스미드를 나타낸다. WT: 야생형 정상유전자, MT: 변이 유전자.
- [31] 도 9는 KRAS 정상 및 변이 유전자의 비율 (왼쪽)과 KRAS 변이 유전자의 비율 증가율 (오른쪽)을 나타낸 도이다.
- [32] 도 10은 다양한 진행단계의 대장암 환자와 정상인의 혈장에서 얻은 세포 유리 DNA (cell-free DNA)를 이용하여 CUT-PCR을 두 차례 진행한 결과를 나타내는 도이다. 혈장에서 얻은 각각의 세포 유리 DNA에 대해서 발생빈도 높은 KRAS의 c.35G>A, c.35G>T 변이 유전자를 각각 타겟하여, 첫 번째 및 두 번째 사이클에 증폭된 변이 유전자 수 (%)를 나타내었다. RGEN 1st: 정상 유전자 특이적인 RGEN을 한 번 처리하고 PCR한 결과, RGEN 2nd: 정상 유전자 특이적인 RGEN을 두 번 처리하고 PCR한 결과.
- [33] 도 11은 dCas9을 이용한 표적 DNA 단편 정제 실험 과정에 대한 모식도를 나타낸 도이다.
- [34] 도 12는 플라스미드 단편을 dCas9을 이용하여 정제하는 실험 과정에 대한 모식도를 나타낸 도이다.
- [35] 도 13은 각각의 표적 DNA를 1 개의 sgRNA 또는 2 개의 sgRNA로 정제한 결과를 나타낸 도이다. Input은 정제 전 플라스미드 DNA를 제한 효소로 자른 샘플이다.
- [36] 도 14는 3 개의 표적 DNA 중 2 개의 표적 DNA를 정제한 결과를 나타낸 도이다. Input은 정제 전 플라스미드 DNA를 제한 효소로 자른 샘플이다.
- [37] 도 15는 표적 DNA 정제 후 관찰되는 각 표적 DNA의 아가로스 젤 밴드의 세기

(%)를 나타낸 도이다.

[38] 도 16은 HeLa 세포와 SW480 세포의 TP53 유전자 엑손 (exon)을 정제하고 Real-Time qPCR을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

[39] 도 17은 유사한 서열의 병원성 세균 DNA를 구분하여 진단 확인하는 방법에 대한 모식도를 나타낸 도이다.

[40]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[41] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를 제거하여, 목적하는 다른 유전자형 DNA를 분석하는 방법을 제공한다.

[42] 구체적으로, 상기 유전자형 분석 방법은 (i) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 목적하는 다른 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법에 의해 수행될 수 있다.

[43] 상기 다른 유전자형 DNA는 PCR에 의한 증폭, 또는 기타 당업계의 공지된 방법으로 검출하는 방법에 의해 확인할 수 있다.

[44] 구체적으로, PCR, 시퀀싱 (예, deep sequencing, Sanger sequencing, NGS), 표적 특이적 뉴클레아제를 이용하는 RFLP (예, RGEN RFLP)를 이용하여 다른 유전자형 DNA를 분석할 수 있다.

[45] 상기 기술된 제거는 특정 유전자형 DNA를 절단하여 PCR 등으로 증폭할 수 없다는 개념을 포함하는 것으로, 시료 내에서의 완전 또는 일부의 제거를 포함하는 개념이다.

[46] 보다 구체적으로, 상기 방법은 (a) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형 특이적인 뉴클레아제를 이용해 절단하여 제거하는 단계; (b) 상기 특정 유전자형 DNA가 제거된 시료 내에 존재하는 다른 유전자형 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 다른 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것인, 유전자형 분석 방법을 제공할 수 있다.

[47] 아울러, 상기 유전자형 분석 방법은 다른 유전자형 DNA가 암 유래 DNA 일 경우, 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 유전자형 분석 방법일 수 있다.

[48] 구체적으로 상기 암의 진단 방법은, 상기 (a) 단계의 특정 유전자형 DNA는 야생형 DNA로서, 분리된 시료 내의 야생형 DNA에 특이적인 뉴클레아제에 의해 상기 야생형 DNA를 절단하여 시료 내에서 제거하는 단계이고; 상기 (b) 단계의 다른 유전자형 DNA는 암 특이적인 돌연변이를 포함하는 DNA로서, 상기 야생형 DNA가 제거된 시료 내의 암 특이적인 돌연변이 DNA를 증폭하는 단계이고; 및 상기 (c) 단계의 서열을 분석하여 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 방법일 수 있다.

- [49] 본 발명자들은 기존 진단 방법 또는 유전자형 분석 방법의 패러다임과 전혀 새로운 방법인 정상 DNA를 표적 특이적 뉴클레아제로 절단하여 시료 내에서 제거한 후, 소량의 암 유래 DNA만을 증폭하여 RFLP 또는 서열 분석을 수행할 경우 위양성/위음성이 없이 진단할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 이와 같이 PCR 등의 증폭 전에 돌연변이 DNA가 아닌 정상 DNA를 절단하여 제거한다는 개념은 본 발명자들에 의해 최초로 개발한 개념이다.
- [50] 본 발명에서 용어, "표적 특이적 뉴클레아제"란 목적하는 게놈상의 DNA의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 뉴클레아제일 수 있다. 상기 뉴클레아제는 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인과 절단하는 도메인이 융합된 뉴클레아제가 포함될 수 있으며, 그 예로 메가뉴클레아제(meganuclease), 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인인 식물 병원성 유전자에서 유래한 TALEN (transcription activator-like effector nuclease)인 TAL 작동자 (transcription activator-like effector) 도메인과 절단 도메인이 융합된 융합 단백질, 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), 또는 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)이 제한 없이 포함될 수 있다. 본 발명의 목적상 RGEN을 이용한 방법은 간단하면서도 보다 바람직한 결과를 수행할 수 있다.
- [51] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 뉴클레아제는 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN)일 수 있다. ZFN은 선택된 유전자 및 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인 내의 표적 부위에 결합하도록 조작된 징크-핑거 단백질을 포함한다. 징크-핑거 결합 도메인은 선택된 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들면, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al, (2001) Nature Biotechnol. 19: 656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416을 참고한다. 자연 발생된 징크 핑거 단백질과 비교하여, 조작된 징크 핑거 결합 도메인은 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작 방법은 합리적 설계 및 다양한 타입의 선택을 포함하나 이에 국한되지는 않는다. 합리적 설계는, 예를 들어 삼중(또는 사중) 뉴클레오티드 서열, 및 개별 징크 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스의 이용을 포함하며, 이때 각 삼중 또는 사중 뉴클레오티드 서열은 특정 삼중 또는 사중 서열에 결합하는 징크 핑거의 하나 이상의 서열과 연합된다.
- [52] 표적 서열의 선택, 융합 단백질(및 그것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드)의 설계 및 구성은 당업자에 공지되어 있으며, 전문이 참고자료로 첨부되는 미국특허출원 공개 2005/0064474 및 2006/0188987에 상세하게 설명된다. 또한, 이러한 참고문헌 및 다른 문헌에 개시된 대로, 징크 핑거 도메인 및/또는 다중-핑거 징크 핑거 단백질들이 임의의 적절한 링커 서열, 예를 들면 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 링커에 의해 함께 연결될 수 있다. 6개 이상의 아미노산 길이의 링커 서열의 예는 미국특허 6,479,626; 6,903,185; 7,153,949을 참고한다. 여기 설명된 단백질들은 단백질의 각 징크 핑거 사이에 적절한 링커의



임의의 조합을 포함할 수 있다.

- [53] 또한, ZFN 및/또는 메가뉴클레아제와 같은 뉴클레아제는 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인을 포함한다. 상기 주지된 대로, 예를 들면 징크 핑거 DNA 결합 도메인과 한 뉴클레아제로부터의 절단 도메인 또는 메가뉴클레아제 DNA 결합 도메인과 상이한 뉴클레아제로부터의 절단 도메인과 같이, 절단 도메인은 DNA 결합 도메인에 이종성일 수 있다. 이종성 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제나 엑소뉴클레아제로부터 얻어질 수 있다. 절단 도메인이 유래할 수 있는 예시적인 엔도뉴클레아제는 제한 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.
- [54] 유사하게, 절단 하프-도메인은, 상기 제시된 바와 같이, 절단 활성을 위하여 이량체화를 필요로 하는 임의의 뉴클레아제 또는 그것의 일부로부터 유래될 수 있다. 융합 단백질이 절단 하프-도메인을 포함하는 경우, 일반적으로 2 개의 융합 단백질이 절단에 필요하다. 대안으로, 2 개의 절단 하프-도메인을 포함하는 단일 단백질이 이용될 수도 있다. 2 개의 절단 하프-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제(또는 그것의 기능적 단편들)로부터 유래할 수도 있고, 또는 각 절단 하프-도메인이 상이한 엔도뉴클레아제(또는 그것의 기능적 단편들)로부터 유래할 수도 있다. 또한, 2 개의 융합 단백질의 표적 부위는, 2 개의 융합 단백질과 그것의 각 표적 부위의 결합에 의해 절단-하프 도메인들이 서로에 대해 공간적으로 배향되어 위치됨으로써, 절단 하프-도메인이, 예를 들어 이량체화에 의해 기능성 절단 도메인을 형성할 수 있도록 하는 관계로 배치되는 것이 바람직하다. 따라서, 일 구현예에서, 5-8 개 뉴클레오티드 또는 15-18 개 뉴클레오티드에 의해 표적 부위의 이웃 가장자리가 분리된다. 그러나, 임의의 정수의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 쌍이 2 개의 표적 부위 사이에 개재될 수 있다(예, 2 내지 50 개 뉴클레오티드 쌍 또는 그 이상). 일반적으로, 절단 부위는 표적 부위 사이에 놓인다.
- [55] 제한 엔도뉴클레아제(제한 효소)는 많은 종에 존재하며, DNA에 서열-특이적으로 결합하여(표적 부위에서), 바로 결합 부위나 그 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 어떤 제한 효소(예, Type IIS)는 인식 부위로부터 제거된 부위에서 DNA를 절단하며, 분리가 가능한 결합과 절단 가능한 도메인을 가진다. 예를 들면, Type IIS 효소 FokI은 한 가닥 상의 인식 부위로부터 9 개 뉴클레오티드에서 그리고 나머지 한 가닥 상의 인식 부위로부터 13 개 뉴클레오티드에서 DNA의 이중가닥 절단을 촉매한다. 따라서, 한 구현예에서, 융합 단백질은 최소 1 개의 Type IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인(또는 절단 하프-도메인)과 하나 이상의 아연-핑거 결합 도메인(조작될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는)을 포함한다.
- [56] 본 발명의 용어 "TALEN"은 DNA의 타겟 영역을 인식 및 절단할 수 있는 뉴클레아제를 가리킨다. TALEN은 TALE 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질을 가리킨다. 본 발명에서, "TAL 이펙터

뉴클레아제" 및 "TALEN"이라는 용어는 호환이 가능하다. TAL 이펙터는 크산토모나스 박테리아가 다양한 식물 종에 감염될 때 이들의 타입 III 분비 시스템을 통해 분비되는 단백질이다. 상기 단백질은 숙주 식물 내의 프로모터 서열과 결합하여 박테리아 감염을 돕는 식물 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있다. 상기 단백질은 34개 이하의 다양한 수의 아미노산 반복으로 구성된 중심 반복 도메인을 통해 식물 DNA 서열을 인식한다. 따라서, TALE는 게놈 엔지니어링의 도구를 위한 신규 플랫폼이 될 수 있을 것으로 사료된다. 다만 게놈-편집 활성을 갖는 기능 TALEN을 제작하기 위해서 다음과 같이 현재까지 알려지지 않았던 소수의 주요 매개변수가 정의되어야 한다. i) TALE의 최소 DNA-결합 도메인, ii) 하나의 타겟 영역을 구성하는 2 개의 절반-자리 사이의 스페이서의 길이, 및 iii) FokI 뉴클레아제 도메인을 dTALE에 연결하는 링커 또는 융합 접합 (fusion junction).

- [57] 본 발명의 TALE 도메인은 하나 이상의 TALE-반복 모듈을 통해 서열-특이적 방식으로 뉴클레오티드에 결합하는 단백질 도메인을 가리킨다. 상기 TALE 도메인은 적어도 하나의 TALE-반복 모듈, 바람직하게는 1 내지 30 개의 TALE-반복 모듈을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, "TAL 이펙터 도메인" 및 "TALE 도메인"이라는 용어는 호환가능하다. 상기 TALE 도메인은 TALE-반복 모듈의 절반을 포함할 수 있다.
- [58] 본 발명에서 용어, "RGEN"은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 및 Cas 단백질로 이루어진 뉴클레아제를 의미한다.
- [59] 본 발명에서 용어, "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템의 주요 단백질 구성 요소로, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)와 복합체를 형성하여 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 nickase를 형성한다.
- [60] 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요젠스 (streptococcus pyogens) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] Cas 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [62] Cas 단백질은 단백질 전달 도메인 (protein transduction domain)과 연결될 수 있다. 상기 단백질 전달 도메인은 폴리-아르기닌 또는 HIV 유래의 TAT 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] Cas 단백질은 목적에 따라 분리 및/또는 정제에 유리한 태그와 연결될 수 있다. 그 예로, His 태그, Flag 태그, S 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그, CBP (chitin binding protein) 태그, Avi 태그, 칼모듈린 (calmodulin) 태그, 폴리글루타메이트 (polyglutamate) 태그, E 태그, HA 태그, myc 태그, SBP 태그, 소프트태그 1 (softag 1), 소프트태그 3 (softag 3), 스트렙 (strep) 태그, TC 태그, Xpress 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 태그,

- 또는 GFP (green fluorescent protein) 태그 등을 목적에 따라 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 본 발명에서 용어, "가이드 (guide) RNA"는 표적 DNA 특이적인 RNA를 의미하며, Cas 단백질과 결합하여 Cas 단백질을 표적 DNA로 인도할 수 있다. 상기 표적 DNA는 목적하는 DNA와 혼용될 수 있다.
- [65] 본 발명에서 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)로 구성될 수 있다. 또는 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분의 융합으로 제조된 sgRNA (single-chain RNA)일 수 있다.
- [66] 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중 RNA (dualRNA) 일 수 있다.
- [67] crRNA는 표적 DNA와 결합할 수 있다.
- [68] RGEN은 Cas 단백질 및 dualRNA로 구성되거나, Cas 단백질 및 sgRNA로 구성될 수 있다. 가이드 RNA는 sgRNA 또는 dualRNA의 crRNA의 5' 말단에 하나 이상의 추가의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [69] 가이드 RNA는 세포 내로 RNA 또는 상기 RNA를 코딩하는 DNA 형태로 전달될 수 있다.
- [70] 상기 암의 진단은 초기 진단일 수 있다.
- [71] 상기 암의 진단은 암의 예후를 예측하는 것인 방법일 수 있다.
- [72] 상기 돌연변이를 포함하는 DNA는 암세포 유래일 수 있다.
- [73] 상기 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료는 암 의심 개체로부터 분리된 혈액 시료일 수 있다.
- [74] 상기 유전자형 분석 방법은 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 예후 예측에 대한 정보를 제공하기 위하여 사용될 수 있으며, 이 경우 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 분리된 시료에서 상기 개체의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 이식된 세포 또는 장기의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 개체의 DNA가 제거된 시료 내에, 이식된 세포 또는 장기의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [75] 상기 유전자형 분석 방법은 또한 범죄 현장에 대한 정보를 수집하기 위하여 사용될 수 있으며, 이 경우 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 피해자의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 범죄현장에서 유래한 분리된 DNA 시료에서 상기 피해자의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 가해자의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 피해자의 DNA가 제거된 시료 내에, 가해자의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 또는, 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 가해자의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 범죄현장에서 유래한

분리된 DNA 시료에서 상기 가해자의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 피해자의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 가해자의 DNA가 제거된 시료 내에, 피해자의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[76]

[77] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 특정 유전자형 DNA에 특이적인 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질 (dCas)을 이용하는, 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[78]

구체적으로, 상기 방법은 (i) 특정 유전자형 DNA에 특이적인 가이드 RNA (guide RNA, gRNA) 및 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질을 이용하여, 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 다른 유전자형 DNA를 인식하는 RGEN의 절단으로부터 매스킹하여 보호하여, 상기 다른 유전자형 DNA를 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 다른 유전자형 DNA가 제거된 시료 내에 존재하는 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법일 수 있다.

[79]

더욱 구체적으로, 상기 방법은 (a) 특정 유전자형 DNA에 특이적인 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질을 이용하여, 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 상기 특정 유전자형 DNA를, 다른 유전자형 DNA를 인식하는 RGEN의 절단으로부터 매스킹하여 보호하여, 상기 다른 유전자형 DNA를 절단하여 제거하는 단계; (b) 상기 다른 유전자형 DNA가 제거된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것인, 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[80]

아울러, 상기 유전자형 분석 방법은 다른 유전자형 DNA가 암 유래 DNA 일 경우, 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 유전자형 분석 방법일 수 있다.

[81]

구체적으로, 상기 암의 진단은, 상기 (a) 단계의 다른 유전자형 DNA는 야생형 DNA이고, 특정 유전자형 DNA는 암 특이적인 돌연변이를 포함하는 DNA로서, 돌연변이를 포함하는 특정 유전자형 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진, 불활성화된 RGEN (dCas9:gRNA 복합체)을 이용하여, 야생형 DNA에 특이적인 RGEN의 절단으로부터 특정 유전자형 DNA를 매스킹하여 보호하여, 분리된 시료 내의 야생형 DNA를 절단하여 제거하는 단계; (b) 상기 야생형 DNA가 제거된 시료 내의 암 특이적 돌연변이를 포함하는 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 돌연변이를 포함하는 DNA를 분석하여 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 방법일 수 있다.

[82]

상기 암의 진단은 암의 초기 진단일 수 있다.

[83]

상기 암의 진단은 암의 예후를 예측하는 것인 방법일 수 있다.

[84]

상기 돌연변이를 포함하는 DNA는 암세포 유래일 수 있다.

- [85] 상기 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료는 암 의심 개체로부터 분리된 시료일 수 있다. 구체적으로 cfDNA를 포함하는 분리된 혈액 시료 또는 cfDNA 시료일 수 있다.
- [86] 본 발명에서 용어, "불활성화된 RGEN"은 뉴클레아제의 기능이 전부 또는 일부 불활성화된 Cas 뉴클레아제 단백질을 포함하는 RGEN을 의미한다. 상기 불활성화된 Cas는 dCas로도 명명된다. 상기 Cas는 Cas9 단백질일 수 있다. 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질의 제조는 뉴클레아제의 활성이 불활성화되는 방법은 제한 없이 포함되나, 그 예로, Cas9 뉴클레아제 단백질에 D10A, H840A 변이를 도입하여 제조할 수 있다. D10A Cas9, H840A Cas9 뉴클레아제 단백질, 즉 Cas9 뉴클레아제 단백질 중 하나의 활성 부위 (active site)에 만 변이를 도입해 만든 Cas9 뉴클레아제 단백질은 가이드 RNA와 결합하였을 때, 니카아제 (nickase)로 작용할 수 있다.
- [87] 이와 같은 nickase는 두 개를 사용할 경우 양쪽 DNA 가닥을 둘 다 잘라 DSB (double strand breakage)를 일으킬 수 있으므로 RGEN의 범주에 포함된다.
- [88] 또 다른 예로 Cas9 뉴클레아제 단백질에 D10A와 H840A 돌연변이를 모두 도입하여 D10A/H840A Cas9 단백질, 즉 Cas9 뉴클레아제의 두 활성부위에 모두 돌연변이를 도입해 만든 dCAS9 단백질은 가이드 DNA와 결합하였을 때 DNA를 절단하지 않는 DNA 결합 복합체로 작용할 수 있다.
- [89] 상기 유전자형 분석 방법은 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 예후 예측에 대한 정보를 제공하기 위하여 사용될 수 있으며, 이 경우 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 세포 또는 장기 이식을 받은 개체의 분리된 시료에서 상기 개체의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 이식된 세포 또는 장기의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 개체의 DNA가 제거된 시료 내에, 이식된 세포 또는 장기의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [90] 상기 유전자형 분석 방법은 또한 범죄 현장에 대한 정보를 수집하기 위하여 사용될 수 있으며, 이 경우 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 피해자의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 범죄현장에서 유래한 분리된 DNA 시료에서 상기 피해자의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 가해자의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 피해자의 DNA가 제거된 시료 내에, 가해자의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 또는, 상기 (i) 단계에서 특정 유전자형 DNA는 가해자의 DNA로서, 상기 (i) 단계는 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 포함된, 범죄현장에서 유래한 분리된 DNA 시료에서 상기 가해자의 DNA를, 이에 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 절단하여 제거하는 단계이고, 상기 (ii) 단계에서 다른 유전자형 DNA는 피해자의 DNA로서, 상기 (ii) 단계는 상기 가해자의 DNA가 제거된 시료 내에,

피해자의 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[91]

[92] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 세균 또는 바이러스 DNA를 포함하는 분리된 시료에 비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA에 특이적인 뉴클레아제를 처리하여 비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA를 절단하여 시료 내에서 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료 내에 병원성 세균 또는 병원성 바이러스 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[93]

구체적으로, 상기 방법은 (a) 세균 또는 바이러스 DNA를 포함하는 분리된 시료에 비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA에 특이적인 뉴클레아제를 처리하여 비병원성 세균 또는 비병원성 바이러스 DNA를 절단하여 시료 내에서 제거하는 단계; (b) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료 내의 병원성 세균 또는 병원성 바이러스 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 병원성 세균 또는 병원성 바이러스 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것인, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[94]

상기 뉴클레아제는 ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease), 및 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)으로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레아제인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[95]

[96]

또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 병원성 세균 또는 바이러스 DNA 특이적 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진 불활성화된 RGEN (dCas9:gRNA 복합체)을 이용하여, 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 비병원성 세균 또는 바이러스에 특이적인 RGEN의 절단으로부터 매스킹하여 보호하여, 분리된 시료 내의 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 시료 내에서 절단하여 제거하는 단계; 및 (ii) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료에서 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[97]

구체적으로, 상기 방법은 (a) 병원성 세균 또는 바이러스 DNA 특이적 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진 불활성화된 RGEN (dCas9:gRNA 복합체)을 이용하여, 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 비병원성 세균 또는 바이러스에 특이적인 RGEN의 절단으로부터 매스킹하여 보호하여, 분리된 시료 내의 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 시료 내에서 절단하여 제거하는 단계; (b) 상기 비병원성 세균 또는 바이러스 DNA가 제거된 시료 내의 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 병원성 세균 또는 바이러스 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것인, 시료 내 DNA의 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[98]

[99]

또 하나의 양태로서, 본 발명은 두 종류 이상의 DNA를 포함하는 분리된

시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법을 제공한다.

- [100] 구체적으로, 상기 목적하는 DNA를 분리하는 방법은 목적하는 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)이 목적하는 DNA와 dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [101] 상기 목적하는 DNA는 PCR에 의한 증폭, 또는 공지의 방법으로 검출하는 방법에 의해 확인할 수 있다.
- [102] 상기 분리 방법은 인 비트로 (*in vitro*)에서 세포-유리 DNA (cell-free DNA)에 적용되는 것일 수 있고, DNA와 gRNA 및 dCas 단백질 간의 가교 공유결합 (cross-link covalent bond)의 형성 없이 수행되는 것일 수 있다.
- [103] 상기 분리 방법은 상기 복합체로부터 목적하는 DNA를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [104] 목적하는 DNA를 분리하기 위해, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 분리를 위한 친화성 태그 (tag)를 포함할 수 있으며, 예를 들어 상기 친화성 태그는 His 태그, Flag 태그, S 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그, CBP (chitin binding protein) 태그, Avi 태그, 칼모듈린 (calmodulin) 태그, 폴리글루타메이트 (polyglutamate) 태그, E 태그, HA 태그, myc 태그, SBP 태그, 소프트태그 1 (softag 1), 소프트태그 3 (softag 3), 스트렙 (strep) 태그, TC 태그, Xpress 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 태그, 또는 GFP (green fluorescent protein) 태그일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 불활성화된 Cas 단백질은 Cas 단백질의 DNA 절단 활성이 결여된 것일 수 있고, 구체적으로 상기 불활성화된 Cas 단백질은 D10A, H840A 또는 D10A/H840A 돌연변이를 가지는 Cas9 단백질 변이체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [106] 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요젠스 (*streptococcus pyogens*) 유래인 것일 수 있다.
- [107] 상기 방법은 상기 태그에 결합하는 친화성 컬럼 또는 자성 비드 (magnetic bead)를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그로서, 상기 His 태그에 결합하는 금속 친화성 컬럼 (metal affinity column) 또는 자성 비드를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것일 수 있고, 상기 자성 비드는 예를 들어, Ni-NTA 자성 비드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [108] 상기 복합체로부터 목적하는 DNA의 분리는 RNase 및 단백질 가수분해효소를 이용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [109] 상기 목적하는 DNA를 분리하는 방법을 이용하여, 두 종류 이상의 유전자형

DNA가 혼합된 분리된 시료에서 특정 유전자형 DNA를 분리할 수 있으며, 두 가지 이상의 목적하는 DNA를 분리할 수도 있다. 두 가지 이상의 목적하는 DNA를 분리하는 경우, 두 가지 이상의 목적하는 DNA 각각에 특이적인 가이드 RNA를 이용하여 목적하는 DNA를 분리할 수 있다.

[110] 상기 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있고, crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중RNA (dualRNA)일 수 있다. 또한, 상기 가이드 RNA는 분리된 RNA 형태이거나, 플라스미드에 코딩되어 있는 형태일 수 있다.

[111]

[112] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 유전체 DNA를 포함하는 분리된 시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법을 제공한다.

[113] 구체적으로, 상기 방법은 목적하는 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)이 목적하는 DNA와 dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계를 포함하여 수행되는 것일 수 있다.

[114] 상기 목적하는 DNA를 분리하는 방법의 각 단계의 구성은 앞서 설명한 바와 같다.

[115]

[116] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용해 분리하는 단계; 및 (ii) 상기 분리된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법을 제공한다.

[117] 구체적으로 상기 분석 방법은 (a) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료에서 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용해 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 특정 유전자형 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것일 수 있다.

[118] 아울러, 상기 유전자형 분석 방법은 특정 유전자형 DNA가 암 유래 DNA 일 경우, 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 유전자형 분석 방법일 수 있다.

[119] 구체적으로 상기 암의 진단 방법은, 상기 특정 유전자형 DNA는 암 특이적인 돌연변이를 포함하는 DNA이며, 상기 특정 유전자형 DNA를 분석하여 암의 진단을 위한 정보를 제공하기 위한, 방법일 수 있다.

[120] 본 발명자들은 특정 유전자형에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 특정 유전자형 DNA를 정제한 후, 소량의 암 유래 DNA만을 증폭하여 RFLP 또는 서열 분석을 수행할 경우 위양성/위음성이 없이 진단할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[121] 상기 뉴클레아제는 예를 들어, ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription



activator-like effector nuclease), 또는 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[122] 상기 암의 진단은 암의 초기 진단일 수 있고, 암의 예후를 예측하는 것일 수 있다.

[123] 상기 방법은 구체적으로, (i) 특정 유전자형 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)을 상기 시료에 처리하여 dCas-gRNA-특정 유전자형 DNA의 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계; (ii) 상기 복합체로 분리된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[124] 상기 불활성화된 Cas 단백질은 분리를 위한 친화성 태그 (tag)를 포함할 수 있으며, 이의 예는 앞서 설명한 바와 같다.

[125] 상기 불활성화된 Cas 단백질은 Cas 단백질의 절단 활성이 결여된 것일 수 있으며, 이에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[126] 상기 방법은 상기 태그에 결합하는 친화성 컬럼 또는 자성 비드 (magnetic bead)를 이용하여 특정 유전자형 DNA를 분리하는 것일 수 있다.

[127] 상기 복합체로부터 특정 유전자형 DNA의 분리는 RNase 및 단백질 가수분해효소를 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

[128]

### 발명의 실시를 위한 형태

[129] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[130]

[131] **실시예 1: 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 농축 확인**

[132]

[133] 표적 특이적 뉴클레아제를 이용한 표적 DNA의 농축이 가능한지 확인하기 위하여, 표적 특이적 뉴클레아제의 대표적인 예인 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)을 이용하여 표적 DNA의 농축을 확인하였다.

[134] 이의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[135]

[136] 즉, 도 1에 나타낸 바와 같이, 정상 DNA가 아닌 돌연변이된 DNA 서열 (박스로 표시된 부분)을 포함하는 게놈을 하기 두 방법에 의해 표적 DNA를 농축하는 것을 확인한다:

[137] 1) 돌연변이된 DNA를 매스킹 (masking) 하여 포획하는 방법:

[138] 표적 서열 특이적 가이드 RNA (guide RNA, gRNA) 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질 (dead Cas9 단백질 또는 inactivated Cas9 단백질)로 이루어진 RGEN을 이용하여, 돌연변이된 DNA를 무작위 절단효소의 절단으로부터

마스킹하여 보호하거나, 포획하여 표적 DNA를 증폭하여 농축하는 방법.

[139] 2) 정상 DNA를 제거한 후 증폭하는 방법:

[140] 정상 DNA를 비표적 서열 특이적 가이드 RNA 및 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진 RGEN으로 절단하여 제거 후, 표적 DNA를 증폭하여 농축하는 방법.

[141]

[142] 실시예 2: 유전자 가위에 의해 유도된 극소량의 돌연변이 관측

[143]

[144] RGEN에 의해서 세포 내의 표적, 또는 표적의 유사서열에 유도된 돌연변이의 비율이 매우 낮을 때, 이를 관찰 하기 위해서는 정상 DNA에 대한 돌연변이 DNA의 비율을 증가시키는 과정이 필요하다. 이를 위해 RGEN이 처리된 세포에서 유전체 DNA를 분리한 뒤, 표적의 정상 서열만을 인식하는 RGEN을 처리하여 돌연변이가 있는 유전체 DNA는 남기고 정상 유전체 DNA 만을 잘라내었다 (도 2). 그 후, PCR을 통해 표적 주변의 서열을 증폭시키면 잘리지 않은 돌연변이 유전체 DNA로부터 증폭된 PCR 산물의 비율이 잘려나간 정상 유전체 DNA로부터 증폭된 PCP 산물보다 상대적으로 늘어나게 된다.

[145]

[146] 구체적으로, VEGFA 유전자를 자르는 RGEN을 세포 내에 처리하여 돌연변이를 유도한 뒤, 이 세포의 유전체 DNA를 분리하고 돌연변이를 관측하고자 하는 표적 유사서열에 대한 각각의 RGEN을 이용하여 정상 DNA를 잘라주었다. 그 후 잘린 서열 주변을 PCR로 증폭시킨 뒤 시퀀싱 (Sequencing) 기계로 서열을 읽어내어 정상 DNA와 돌연변이 DNA의 비율을 관찰하였다. 그 결과, RGEN으로 자르지 않은 경우와 비교했을 때, 최고 1.4~30배 정도의 돌연변이 비율의 증가가 관찰되었다 (표 1).

[147]

[148] 표 1

[Table 1]

서열번호	RGEN 표적서열	표적 이름	Mock_uncut 돌연변이 (%)	Mock_cut 돌연변이 (%)	RGEN_uncut 돌연변이 (%)	RGEN_cut 돌연변이 (%)	돌연변이 증가율
서열번호 1	GGGGAGGGGAAGTTTGCTCCTGG	VEGFA_Off 3	0.04%	0.00%	69.15%	95.04%	1.4
서열번호 2	CGGGGAGGGAGTTTGCTCCTGG	VEGFA_Off 5	0.00%	0.01%	2.20%	35.10%	26.9
서열번호 3	GGAGGAGGGAGTCTGCTCCAGG	VEGFA_Off 27	0.00%	0.00%	5.99%	79.88%	13.3
서열번호 4	GGTGGGGTGGTTTGCTCCTGG	VEGFA_Off 16	0.00%	0.00%	1.16%	29.98%	29.7
서열번호 5	GAGTGGGTGGAGTTTGCTACAGG	VEGFA_Off 15	0.00%	0.00%	2.30%	17.12%	7.4
서열번호 6	AAGTAAGGGGAAGTTTGCTCCTGG	VEGFA_Off 72	0.00%	0.00%	2.92%	54.73%	18.7

[149] (Mock\_uncut : 정상 세포의 gDNA를 자르지 않은 샘플; Mock\_cut : 정상 세포의 gDNA를 자른 샘플; RGEN\_uncut : RGEN에 의한 돌연변이가 유도된 세포의 gDNA를 자르지 않은 샘플; RGEN\_cut : RGEN에 의한 돌연변이가 유도된 세포의 gDNA를 자른 샘플)

[150]

- [151] 다음으로, 매우 적은 돌연변이 비율에서 얼마만큼의 돌연변이 서열의 증가를 볼 수 있을지 확인하기 위해서, *FANCF* 유전자에 대한 RGEN을 세포에 처리하고 54%의 돌연변이를 포함하는 유전체 DNA 혼합물을 얻었다.
- [152] 그 다음, 상기 돌연변이 유전체 DNA 혼합물에 정상 유전체 DNA의 양을 10배씩 늘려가며 섞어 주어 0.0054%부터 54%까지의 비율로 돌연변이가 섞여있는 유전체 DNA 혼합물을 얻었고, 이를 다시 상기 *FANCF* 유전자의 정상서열만을 자르는 RGEN으로 잘라주었다. 그 결과, 모든 돌연변이 비율 범위에서, 자르고 난 뒤의 돌연변이의 비율이 증가하였고, 최대 520 배 (2.8% / 0.0054%) 증가되는 효과를 확인하였다 (도 3).
- [153]
- [154] 상기 실험에 사용된 RGEN의 표적 염기서열 및 sgRNA 서열은 표 2에 정리하였다.
- [155]
- [156] 표 2

[Table 2]

표적 이름	표적 염기서열	RNA 염기서열 (5'→3')
VEGF-A_ Off3	GGGGAGGGGAAGTTTG CTCCTGG(서열번호 7)	5'GGGGAGGGGAAGTTTGCTCCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 15)
VEGF-A_ Off5	GGAGGAGGGGAGTCTG CTCCAGG(서열번호 8)	5'GGAGGAGGGGAGTCTGCTCCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 16)
VEGF-A_ Off27	GGTGGGGGTGGGTTTGC TCCTGG(서열번호 9)	5'GGTGGGGGTGGGTTTGCCTCCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 17)
VEGF-A_ Off16	GAGTGGGTGGAGTTTGC TACAGG(서열번호 10)	5'GAGTGGGTGGAGTTTGCCTACGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 18)
VEGF-A_ Off15	AGGTGGTGGGAGCTTGT TCCTGG(서열번호 11)	5'GAGGTGGTGGGAGCTTGTTCGGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (서열번호 19)
VEGF-A_ Off56	GGGCAAGGGGAGGTTG CTCCTGG(서열번호 12)	5'GGGCAAGGGGAGGTTGCTCCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 20)
VEGF-A_ Off72	AAGTAAGGGAAGTTTG CTCCTGG(서열번호 13)	5'GAAGTAAGGGAAGTTTGCTCCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG

		CUUUUU 3' (서열번호 21)
FANCF	GGAATCCCTTCTGCAGC ACCTGG(서열번호 14)	5'GGAATCCCTTCTGCAGCACCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUUU 3' (서열번호 22)

[157]

[158] **실시예 3: 암 유전자 (Oncogene)에 높은 빈도로 발생하는 돌연변이의 진단 확인**

[159]

[160] 일반적인 암 유전자 (Oncogene)들은 야생형인 정상 DNA와 달리 돌연변이를 갖고 있다. 이와 같은 암 유전자들의 돌연변이를 갖고 있는 단편은 시료 내에 1% 이하, 일반적으로는 0.01%~0.1% 이하로 섞여 있어서 관찰이 어려워서 초기 암 진단에 어려움이 있다.

[161] 이에, 이와 같은 암 유전자의 돌연변이 진단을 본 발명의 새로운 패러다임을 적용하여 수행할 수 있는지 여부를 확인하는 방법을 도 4에 모식도로 나타내었다.

[162]

[163] 즉, 검진 환자 혈장 DNA 내의 돌연변이가 존재하는 암 유전자의 존재를 확인하는 방법에 있어서, 본 발명의 새 패러다임의 방법의 우수성을 확인하기 위해서 정상 DNA를 절단하지 않은 대조구 (농축 전) 및 정상 DNA를 RGEN을 이용해 절단 후, 돌연변이가 존재하는 암 유전자 절편만을 증폭한 실험구 (농축 후)를 이용하여 각각 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 및 서열분석을 시행한 결과, RFLP 분석 시 대조군은 1% 이하로 섞여 있는 표적 DNA 절편의 관찰이 어려운 것을 확인할 수 있다. 그러나, 실험구는 표적 DNA 절편인 돌연변이 암 유전자를 용이하게 확인할 수 있다.

[164] 아울러, 서열분석 결과도 대조구는 0.01%~0.1% 이하로 섞여있는 표적 DNA 단편의 관찰은 어려우나, 실험구는 정확히 표적 DNA만을 대상으로 서열분석을 할 수 있으므로 관찰이 용이한 것을 확인할 수 있다.

[165]

[166] **실시예 4: 암 유전자 돌연변이에 대한 RFLP용 RGEN 제조**

[167]

[168] 본 발명자들은 암유전자 돌연변이에 대한 RFLP용 RGEN을 제조하고자 하였다.

[169] 예를 들어 다양한 암에서 높은 빈도로 돌연변이가 발생하는 K-Ras 암 유전자의 돌연변이 핫스팟 (hotspot)인 12번째 아미노산 위치에 대한 돌연변이 (G12S) 특이적 또는 정상 DNA 특이적 RGEN을 개발하였다 (도 5).

[170]

[171] 이에 이와 같은 K-Ras G12S 돌연변이를 포함한 암환자의 혈장 DNA로부터 상기 실시예 1의 두 가지 방법이 적용되는지 실험을 통해 확인한 결과를 도 6에 나타냈다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 위음성 등이 없이 K-RAS G12S 돌연변이를 정확하게 확인할 수 있음을 확인할 수 있다.

[172]

[173] **실시예 5: RGEN을 이용한 극소량의 ctDNA 돌연변이 고감도 관측기술 개발**

[174]

[175] 다음으로 암특이적 마커인 ctDNA (circulating tumor DNA)를 표적하여 암을 조기에 진단하고자 하였다. 조기 암환자의 ctDNA는 정상 유전자에 섞여서 혈액 안에 굉장히 소량으로 존재하기 때문에, 채액 안에 순환하는 세포 유리 DNA (cell-free DNA) 중에 극소량으로 존재하는 ctDNA를 증폭하여 검출하게 된다. 발암유전자 중에 빈번하게 발생하는 변이를 포함한 DNA를 남기고, 정상유전자에만 특이적으로 작동하는 RGEN (RNA Guided Endonuclease)을 제작, 처리하여 정상유전자만 잘라서 변이 유전자가 PCR을 통해 정상유전자 대비 상대적으로 증폭되게 된다. 이후 Index PCR과 표적화된 딥 시퀀싱 (targeted deep sequencing)을 진행해서 얻은 염기서열 정보로 정상 유전자에 비해 증가된 변이 유전자의 비율을 산출할 수 있다 (도 7).

[176]

[177] 먼저 높은 농도의 정상유전자와 섞인 변이 유전자 검출 가능여부를 CUT-PCR로 확인하기 위해서 대장암에서 발생빈도 높은 유전자 (KRAS)의 변이 유전자 (KRAS c.35G>A, c.35G>T)와 정상유전자 (KRAS c.35G)를 포함하는 플라스미드를 각각 만들어 다양한 비율로 섞어서, 변이 유전자가 정상 유전자에 비해 적은 비율 (1/1000 수준까지)로 희석된 상태에서 CUT-PCR (정상 유전자 특이적 RGEN 처리후 PCR)을 실시하였다. KRAS 정상 유전자를 자르고, Internal control 대비 KRAS 정상 유전자가 증폭된 비율을 산출하였다. 또한, 발생빈도가 높은 암 유발 변이 유전자를 정상 유전자로 1/1000 희석한 농도에서 CUT-PCR을 통해 변이 유전자가 증가되는 배율을 산출하였다. 상기 정상유전자 특이적 RGEN의 표적 염기 서열 및 sgRNA 염기서열은 하기 표 3에 나타내었다.

[178]

[179] 표 3

[Table 3]

표적 이름	표적 염기서열	RNA 염기서열 (5'→3')
KRAS wild-type	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG (서열번호 23)	5'GGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUU 3' (서열번호 24)

[180]

[181] 그 결과 대조군 프라이머로 증폭된 산물에 비해 KRAS 유전자를 증폭하였을 때, 정상유전자 특이적으로 제작된 RGEN이 정상유전자에 제대로 작동하는 것을 확인하였다 (도 8). 나아가, 증폭된 산물의 변이가 일어난 부분을 딥 시퀀싱 (deep sequencing)으로 분석하였을 때, KRAS 변이 유전자가 정상유전자에 1/1000 희석된 정도에서 최대 30 내지 40 배 가량 증폭되어 정확하게 검출됨을 보였다 (도 9, 표 4).

[182]

[183] 표 4

[Table 4]

RGEN 처리 전, 후의 변이 비율(%) 비교

RGEN 표적서열	변이 종류	변이 유전자 (%) RGEN처리 전	변이 유전자 (%) RGEN처리 후	변이 증가율
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTGG(서열번호 25)	KRAS wild-type	0%	0%	~
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTGA(서열번호 26)	KRAS c.35G>A	0.27%	8.02%	13.71
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTGT(서열번호 27)	KRAS c.35G>T	0.14%	8.53%	14.64
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTTG(서열번호 28)	KRAS c.34G>T	0.96%	21.19%	35.78
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTGC(서열번호 29)	KRAS c.35G>C	0.62%	15.08%	26.69
AAACTTGTGGTAGTTGG AGCTCG(서열번호 30)	KRAS c.34G>C	0.93%	21.57%	37.41

[184]

[185] <대장암 변이 중에서 발생빈도가 가장 높은 다섯개의 단일염기 치환 변이들의 염기서열 정보와, PAM으로 인식되는 영역의 변이를 이용해 정상 유전자만 자를수 있는 sgRNA의 표적 염기서열 정보를 나타내었다. 정상유전자 특이적 RGEN 처리 전, 후 각각의 변이들의 증가율을 산출하였다. 굵은 색 글씨: PAM 염기서열, 밑줄로 표시된 부분: 치환으로 생긴 변이>

[186]

[187] 상기 플라스미드 검증 이후, 인체의 혈장에서 얻은 세포 유리 DNA (cfDNA) 에서도 암특이적인 유전자 변이를 포함하고 있는 ctDNA 검출실험을 진행하였다. 혈장안에 ctDNA가 극소량이 포함되어 있기 때문에 CUT-PCR (정상유전자에 특이적인 RGEN 처리 (표 5)와 PCR 증폭)과정을 반복 진행하면서 변이 유전자를 증폭시켰다. 그 결과 정상인 샘플보다 대장암 환자군에서 얻어진 샘플에서 발생빈도가 높은 KRAS 변이들(c.35G>A (최대 192배), c.35G>T (최대 79배))이 관측되었다 (도 10). CUT-PCR로 증폭된 결과는 기존의 파이로시퀀싱 (pyrosequencing)으로 측정된 결과보다 현저히 증가된 민감도를 보여준다 (표 5).

[188]

[189] 표 5



[Table 5]

샘플 번호	ID 번호	유형	질병 단계	검출된 변이유형 (CUT-PCR)	검출된 변이유형 (Pyrosequencing)
1	01-140707-1	대장암	IIIB	GGT>GTT:p.G12V	Wild-Type GGT
2	01-140707-3	대장암	I	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	Wild-Type GGT
3	01-140708-5	대장암	IIIA	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	Wild-Type GGT
4	01-140717-2	대장암	IIIB	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	GGT>GCT:p.G12A
5	01-140718-1	대장암	IIIC	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	Wild-Type GGT
6	01-140827-3	대장암	IIIB	GGT>GTT:p.G12V	Wild-Type GGT
7	01-140811-3	대장암	IIIB	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	Wild-Type GGT
8	01-140812-5	대장암	IIA	Wild-Type GGT	Wild-Type GGT
9	01-141016-1	정상인	없음	Wild-Type GGT	Wild-Type GGT
10	01-141016-9	정상인	없음	Wild-Type GGT	Wild-Type GGT

[190]

[191] **실시예 6: dCAS9:gRNA 복합체를 이용한 표적 DNA의 농축**

[192]

[193]

본 발명에서는 특정 유전자형의 DNA를 정제하기 위하여 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 (nuclease) 단백질로 이루어진 불활성화된 RGEN (dCas9:gRNA 복합체)을 이용하였다. 상기 dCas9 단백질에는 정제를 위한 히스티딘 태그 (His tag)가 달려 있어, His tag과 선택적으로 결합하는 Ni-NTA 자석 비드를 이용하여 dCas9 단백질만을 선택적으로 정제할 수 있다. 또한, DNA의 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레아제 활성이 없는 dCas9-단백질-sgRNA 복합체의 성질을 이용하여 원하는 표적 DNA만을

선택적으로 정제할 수 있다 (도 11).

[194]

[195] 실시예 6-1. 플라스미드 조각의 선택적 분리

[196]

[197] 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진 불활성화된 RGEN (dCas9:gRNA 복합체)을 통해서 원하는 표적 DNA만 분리 가능한지를 확인하기 위하여, 먼저 플라스미드 (Plasmid, pUC19)를 크기로 구분이 가능하도록 제한효소 (SpeI, XmaI, XhoI)로 잘라, 각각 4134 bp, 2570 bp, 및 1263 bp 크기의 플라스미드 DNA 단편을 제조하였다 (도 12).

[198] 그 다음, 상기 과정에서 제한효소로 잘린 각각의 플라스미드 DNA 단편에 대한 sgRNA를 2 개씩 제작하고 (4134bp\_sg#1, 4134bp\_sg#2, 2570bp\_sg#1, 2570bp\_sg#2, 1263bp\_sg#1, 및 1263bp\_sg#2), 각 표적 DNA에 대응하는 각각의 sgRNA 또는 이들의 조합 (4134bp\_sg#1+2, 2570bp\_sg#1+2, 및 1263bp\_sg#1+2)을 이용하여 정제 과정을 수행하였다. 각각의 sgRNA 염기 서열은 하기 표 6과 같다.

[199]

[200] 표 6

[Table 6]

sgRNA	표적 염기서열	PAM 염기서열
4134bp_sg#1	GAGAACCAGACCACCCAGAA (서열번호 31)	GGG
4134bp_sg#2	GGCAGCCCCGCCATCAAGAA(서열번호 32)	GGG
2570bp_sg#1	GTAAGATGCTTTTCTGTGAC(서열번호 33)	TGG
2570bp_sg#2	GATCCTTTGATCTTTTCTAC(서열번호 34)	GGG
1270bp_sg#1	GCCTCCAAAAAGAAGAGAA(서열번호 35)	AGG
1270bp_sg#2	TGACATCAATTATTATACAT(서열번호 36)	CGG

[201] \* sgRNA 서열은 표적 염기서열과 동일하며, 다만, T는 U임.

[202]

[203] 그 다음, DNA : dCas9 단백질 : sgRNA = 1 : 20 : 100의 몰 농도 비율로 총 200  $\mu$ l의 혼합 용액을 제조하고 섞어준 뒤, 37 °C에서 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 그 다음 상기 용액을 히스티딘 태그와 특이적으로 결합할 수 있는 Ni-NTA 자석 비드 50  $\mu$ l와 섞어주고, 200  $\mu$ l 세척 완충액으로 2 회 세척한 뒤 200  $\mu$ l 용출 완충액 (Bioneer, K-7200)을 이용하여 dCas9-sgRNA-표적 DNA 복합체를 정제하였다.

[204] 그 다음, RNase A (Amresco, E866)를 0.2 mg/ml 농도로 첨가하여 37 °C에서 2 시간 동안 반응시키고, 분해단백질 가수 분해효소 K (Bioneer, 1304G)를 0.2 mg/ml 농도로 첨가하여 55 °C에서 45 분 동안 반응시켜 sgRNA 및 dCas9

단백질을 제거한 후, 에탄올 정제를 통해 표적 DNA만을 정제하였다.

[205]

[206] 그 결과, sgRNA 각각 또는 표적 단백질에 대한 sgRNA 2 종류를 혼합하여 사용한 경우 모두에서, 3 개의 DNA 단편으로부터, 각 크기별로 원하는 표적 DNA 단편만 분리되어 나오는 것을 확인할 수 있었다 (도 13).

[207] 또한, 2 종류의 표적 DNA에 대하여 sgRNA를 각각 2 개씩 사용, 총 4 개의 sgRNA를 이용하여 한 번에 여러 표적 DNA를 정제하였을 때, 사용된 sgRNA에 대한 표적 DNA들이 혼합되어 정제되는 것을 확인하였다 (도 14).

[208] 각각의 플라스미드 DNA 단편을 정제한 결과를 도 15에 나타내었다. 이를 통해 각각의 표적 DNA가 95 % 이상 순수한 상태로 정제되는 것을 확인할 수 있었다.

[209]

[210] 실시예 6-2. 표적 엑손 (exon)의 선택적 분리 확인

[211]

[212] 다음으로 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질로 이루어진 불활성화된 RGEN (dCas9:sgRNA 복합체)을 통해서 실제 세포의 유전체 DNA (gDNA) 상의 엑손 (exon)을 정제할 수 있는지 확인해보기 위해, HeLa 세포와 SW480 세포의 gDNA를 추출하고 400 bp 크기의 단편으로 자른 뒤, 표적 엑손을 정제하는 실험을 수행하였다.

[213]

[214] 구체적으로, 암세포의 TP53 유전자의 엑손을 표적으로 하였고, 각 표적 엑손별로 3 개의 sgRNA를 사용하였으며, 각각의 sgRNA의 서열은 하기 표 7에 나타내었다. 상기 실시예 6-1과 동일한 조건에서 표적 DNA를 정제하였다.

[215]

[216] 표 7

[Table 7]

sgRNA	표적 염기서열	PAM
Exon1_sg#1	GGGACACTTTGCGTTCGGGC (서열번호 37)	TGG
Exon1_sg#2	AACTCTAGAGCCACCGTCCA (서열번호 38)	GGG
Exon1_sg#3	AGCGCCAGTCTTGAGCACAT (서열번호 39)	GGG
Exon2&3_sg#1	GATCCACTCACAGTTTCCAT (서열번호 40)	AGG
Exon2&3_sg#2	GTGGGAAGCGAAAATTCCAT (서열번호 41)	GGG
Exon2&3_sg#3	CTCAGAGGGGGCTCGACGCT (서열번호 42)	AGG
Exon4_sg#1	CTTCCCACAGGTCTCTGCTA (서열번호 43)	GGG
Exon4_sg#2	TGGTGGGCCTGCCCTTCCAA (서열번호 44)	TGG
Exon4_sg#3	CTTCCGGGTCCTGCCATGG (서열번호 45)	AGG
Exon5_sg#1	AGAGTTGGCGTCTACACCTC (서열번호 46)	AGG
Exon5_sg#2	GAATCAACCCACAGCTGCAC (서열번호 47)	AGG
Exon5_sg#3	CGGCACCCGCGTCCGCGCCA (서열번호 48)	TGG
Exon6_sg#1	CTCGGATAAGATGCTGAGGA (서열번호 49)	GGG
Exon6_sg#2	CACTTTTCGACATAGTGTGG (서열번호 50)	TGG
Exon6_sg#3	AAATTTGCGTGTGGAGTATT (서열번호 51)	TGG
Exon7_sg#1	GGAGTCTTCCAGTGTGATGA (서열번호 52)	TGG
Exon7_sg#2	CATGTAGTTGTAGTGGATGG (서열번호 53)	TGG
Exon7_sg#3	GCATGGGCGGCATGAACCGG (서열번호 54)	AGG
Exon8_sg#1	ACTGGGACGGAACAGCTTTG (서열번호 55)	AGG
Exon8_sg#2	GATTCTCTTCCTCTGTGCGC (서열번호 56)	CGG
Exon8_sg#3	GGTGAGGCTCCCCTTTCTTG (서열번호 57)	CGG
Exon9_sg#1	GTGAAATATTCTCCATCCAG (서열번호 58)	TGG
Exon9_sg#2	GGGAGAGGAGCTGGTGTGTG (서열번호 59)	TGG
Exon10_sg#1	TCTCGAAGCGCTCACGCCCA (서열번호 60)	CGG
Exon10_sg#2	GAACTCAAGGATGCCAGGC (서열번호 61)	TGG
Exon11_sg#1	CAATCAGCCACATTCTAGGT (서열번호 62)	AGG

Exon11_sg#2	CTAGAACTTGACCCCCTTGA (서열번호 63)	GGG
Exon11_sg#3	GATGAAATCCTCCAGGGTGT (서열번호 64)	GGG

[217] \* sgRNA 서열은 표적 염기서열과 동일하며, 다만, T는 U임.

[218]

[219] 그 다음, 표적 엑손이 정제되었는지 확인하기 위해, 샘플 속 표적 DNA의 양을 측정할 수 있는 Real-time quantitative PCR을 수행하였으며, 그 결과 각 엑손이 실제로 증폭되었음을 확인하였으며, 표적 엑손 부위가 다른 엑손에 비하여 2 내지 20 배 가량 증폭된 것을 확인할 수 있었다 (도 16).

[220]

[221] **실시예 7: 유사한 서열의 병원성 세균 DNA를 구분하여 진단 확인**

[222]

[223] 기존 분자 진단 방식에 의해 구분하여 진단하기 어려운 높은 동등성 서열을 본 발명의 방법에 의해 구분이 가능한 지 여부를 확인하고자 하였다. 예를 들어 병원성 세균/바이러스와 비병원성 세균/바이러스는 매우 유사한 서열을 갖고 있으므로, 이와 같은 병원성 및 비병원성 세균을 구분한 진단을 본 발명의 새로운 패러다임을 적용하여 수행할 수 있는지 여부를 확인하는 방법을 도 17에 모식도로 나타내었다.

[224]

[225] 즉, 비병원성 세균 DNA 및 병원성 세균 DNA를 단순히 증폭하면 서열 유사성에 의해 비특이적 증폭이 일어나 비병원성 세균 DNA 및 병원성 세균 DNA를 구분할 수 없다 (도 17의 위).

[226]

그러나, 개체에 정상적인 반응을 일으키는 비병원성 세균 DNA 특이적 가이드 RNA 및 Cas9 뉴클레아제 단백질을 이용하여 절단하여 증폭하고, 병원성 세균 DNA 특이적 가이드 RNA 및 불활성화된 Cas9 뉴클레아제 단백질 (dead Cas9 단백질)로 이루어진 RGEN을 이용하여, 병원성 세균 DNA를 포획하여 분리하여 증폭을 수행할 경우, 유사한 서열로 구분이 용이하지 않은 병원성 세균만을 특이적으로 증폭할 수 있음을 확인할 수 있다 (도 17의 아래).

[227]

[228] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 새로운 유전자형 분석 방법인 표적 특이적 뉴클레아제, 특히 RGEN을 기존의 유전자형 분석 방법과 달리 시료 내의 정상 DNA를 절단하여 제거 후, 표적 DNA 만을 증폭하거나 또는 표적 DNA만을 포획하여 증폭시킬 경우 기존 PCR 방법 등과 달리 위양성/음성 등이 없이 정확히 분석할 수 있는 것을 시사하는 것이다.

[229]

[230] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시

예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[231]

## 청구범위

- [청구항 1] 두 종류 이상의 DNA를 포함하는 분리된 시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 방법은 목적하는 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)이 목적하는 DNA와 dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은 인 비트로 (*in vitro*)에서 세포-유리 DNA (cell-free DNA)에 적용되는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은 목적하는 DNA와 gRNA 및 dCas 단백질 간의 가교 공유결합 (cross-link covalent bond)의 형성 없이 수행되는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 복합체로부터 목적하는 DNA를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 분리를 위한 친화성 태그 (tag)를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그, Flag 태그, S 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그, CBP (chitin binding protein) 태그, Avi 태그, 칼모듈린 (calmodulin) 태그, 폴리글루타메이트 (polyglutamate) 태그, E 태그, HA 태그, myc 태그, SBP 태그, 소프트태그 1 (softag 1), 소프트태그 3 (softag 3), 스트렙 (strep) 태그, TC 태그, Xpress 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 태그, 및 GFP (green fluorescent protein) 태그로 이루어진 군에서 선택되는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 Cas 단백질의 DNA 절단 활성이 결여된 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 D10A, H840A 또는 D10A/H840A 돌연변이를 가지는 Cas9 단백질 변이체인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요젠스 (*streptococcus pyogens*) 유래인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.

- [청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 방법은 상기 태그에 결합하는 친화성 컬럼 또는 자성 비드 (magnetic bead)를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 방법에서 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그로서, 상기 His 태그에 결합하는 금속 친화성 컬럼 (metal affinity column) 또는 자성 비드를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서 상기 자성 비드는 Ni-NTA 자성 비드인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 14] 제5항에 있어서, 상기 복합체로부터 목적하는 DNA의 분리는 RNase 및 단백질 가수분해효소를 이용하여 수행되는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 방법은 두 종류 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료에서 특정 유전자형 DNA를 분리하기 위한, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 방법은 두 가지 이상의 목적하는 DNA를 분리할 수 있는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 두 가지 이상의 목적하는 DNA의 분리는 두 가지 이상의 목적하는 DNA 각각에 특이적인 가이드 RNA를 이용하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 18] 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA)인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 19] 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중RNA (dualRNA)인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 20] 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 분리된 RNA 형태이거나, 플라스미드에 코딩되어 있는 형태인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 21] 유전체 DNA를 포함하는 분리된 시료에서 목적하는 DNA를, 상기 목적하는 DNA에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용하여 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 방법은 목적하는 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)이 목적하는 DNA와 dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 23] 제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 방법은 인 비트로 (*in vitro*)에서 세포-유리 DNA (cell-free DNA)에 적용되는 것인, 목적하는



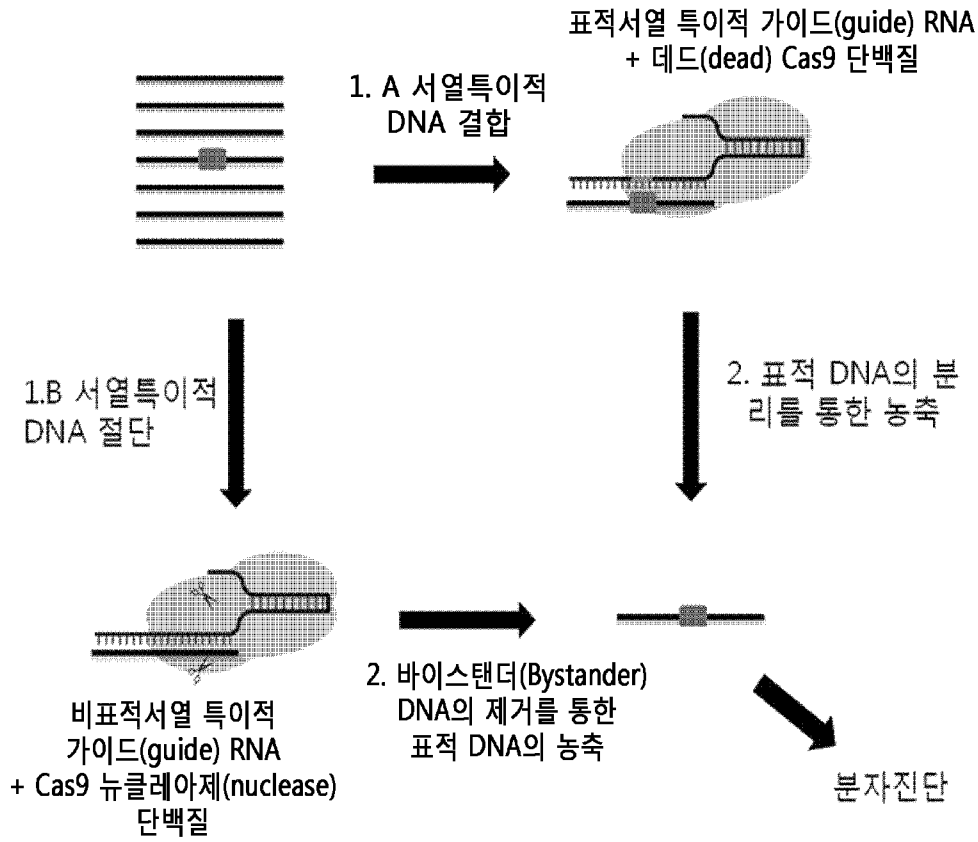
- DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 24] 제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 방법은 목적하는 DNA와 gRNA 및 dCas 단백질 간의 가교 공유결합 (cross-link covalent bond)의 형성 없이 수행되는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 25] 제22항에 있어서, 상기 방법은 상기 복합체로부터 목적하는 DNA를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 26] 제22항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 분리를 위한 친화성 태그 (tag)를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그, Flag 태그, S 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그, CBP (chitin binding protein) 태그, Avi 태그, 칼모듈린 (calmodulin) 태그, 폴리글루타메이트 (polyglutamate) 태그, E 태그, HA 태그, myc 태그, SBP 태그, 소프트태그 1 (softag 1), 소프트태그 3 (softag 3), 스트렙 (strep) 태그, TC 태그, Xpress 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 태그, 및 GFP (green fluorescent protein) 태그로 이루어진 군에서 선택되는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 28] 제22항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 Cas 단백질의 DNA 절단 활성이 결여된 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 D10A, H840A 또는 D10A/H840A 돌연변이를 가지는 Cas9 단백질 변이체인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 30] 제29항에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요젠스 (*streptococcus pyogens*) 유래인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 31] 제26항에 있어서, 상기 방법은 상기 태그에 결합하는 친화성 컬럼 또는 자성 비드 (magnetic bead)를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 32] 제31항에 있어서, 상기 방법에서 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그로서, 상기 His 태그에 결합하는 금속 친화성 컬럼 (metal affinity column) 또는 자성 비드를 이용하여 목적하는 DNA를 분리하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 33] 제32항에 있어서 상기 자성 비드는 Ni-NTA 자성 비드인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 34] 제25항에 있어서, 상기 복합체로부터 목적하는 DNA의 분리는 RNase 및 단백질 가수분해효소를 이용하여 수행되는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.

- [청구항 35] 제22항에 있어서, 상기 방법은  
상기 시료에서 목적하는 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)이 목적하는 DNA와 dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체를 형성하는 단계;  
dCas-gRNA-목적하는 DNA의 복합체가 형성된 상기 시료에 뉴클레아제를 처리하는 단계; 및  
상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계를 포함하는, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 36] 제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 유전체 DNA를 포함하는 시료는, 가이드 RNA와 불활성화된 Cas 단백질과의 반응 이전에 뉴클레아제를 처리하여 유전체 DNA가 절단된 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 37] 제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 방법은 유전체 DNA에서 둘 이상의 목적하는 DNA 부위를 분리할 수 있는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 38] 제37항에 있어서, 상기 둘 이상의 목적하는 DNA 부위의 분리는 두 가지 이상의 목적하는 DNA 각각에 특이적인 가이드 RNA를 이용하는 것인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 39] 제22항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA) 또는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중RNA (dualRNA)인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 40] 제22항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 분리된 RNA 형태이거나, 플라스미드에 코딩되어 있는 형태인, 목적하는 DNA를 분리하는 방법.
- [청구항 41] (i) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료 내의 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형에 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용해 분리하는 단계; 및  
(ii) 상기 분리된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 42] 제41항에 있어서, 상기 분석 방법은  
(a) 두 가지 이상의 유전자형 DNA가 혼합된 분리된 시료에서 특정 유전자형 DNA를, 상기 특정 유전자형 특이적인 불활성화된 뉴클레아제를 이용해 분리하는 단계;  
(b) 상기 분리된 특정 유전자형 DNA를 증폭하는 단계; 및  
(c) 상기 증폭된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하여 수행하는 것인, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 43] 제42항에 있어서,  
상기 특정 유전자형 DNA는 암 특이적인 돌연변이를 포함하는

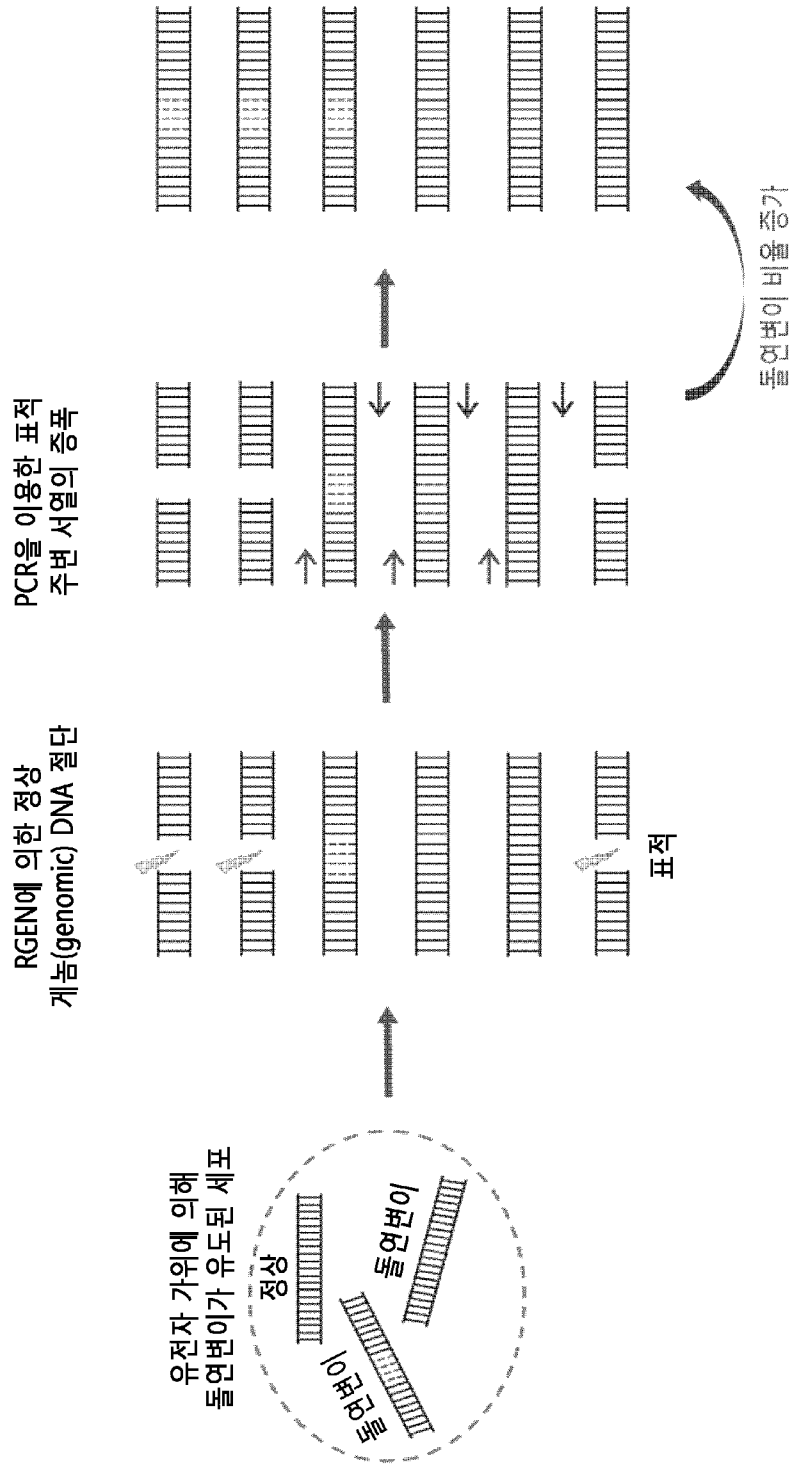
- DNA이며, 상기 특정 유전자형 DNA를 분석하여 암의 진단을 위한, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 44] 제41항에 있어서, 상기 뉴클레아제는 ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease), 및 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)으로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레아제인 유전자형 분석 방법.
- [청구항 45] 제43항에 있어서, 상기 암의 진단은 암의 초기 진단인 것인 유전자형 분석 방법.
- [청구항 46] 제43항에 있어서, 상기 암의 진단은 암의 예후를 예측하는 것인 유전자형 분석 방법.
- [청구항 47] 제41항에 있어서, 상기 방법은  
 (i) 특정 유전자형 DNA에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA (gRNA) 및 불활성화된 Cas 단백질 (dCas)을 상기 시료에 처리하여 dCas-gRNA-특정 유전자형 DNA의 복합체를 형성하고 상기 복합체를 상기 시료로부터 분리하는 단계; 및  
 (ii) 상기 복합체로 분리된 특정 유전자형 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 48] 제47항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 분리를 위한 친화성 태그 (tag)를 포함하는, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 49] 제48항에 있어서, 상기 분리를 위한 친화성 태그는 His 태그, Flag 태그, S 태그, GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그, CBP (chitin binding protein) 태그, Avi 태그, 칼모듈린 (calmodulin) 태그, 폴리글루타메이트 (polyglutamate) 태그, E 태그, HA 태그, myc 태그, SBP 태그, 소프트태그 1 (softag 1), 소프트태그 3 (softag 3), 스트렙 (strep) 태그, TC 태그, Xpress 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein) 태그, 및 GFP (green fluorescent protein) 태그로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 50] 제47항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 Cas 단백질의 절단 활성이 결여된 것인, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 51] 제47항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 D10A/H840A 돌연변이를 가지는 Cas9 단백질 변이체인, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 52] 제51항에 있어서, 상기 불활성화된 Cas 단백질은 스트렙토코커스 피요젠스 (streptococcus pyogens) 유래인 것인, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 53] 제48항에 있어서, 상기 방법은 상기 태그에 결합하는 친화성 컬럼 또는 자성 비드 (magnetic bead)를 이용하여 특정 유전자형 DNA를 분리하는 것인, 유전자형 분석 방법.
- [청구항 54] 제47항에 있어서, 상기 상기 복합체로부터 특정 유전자형 DNA의

분리는 RNase 및 단백질 가수분해효소를 이용하여 수행되는 것인,  
유전자형 분석 방법.

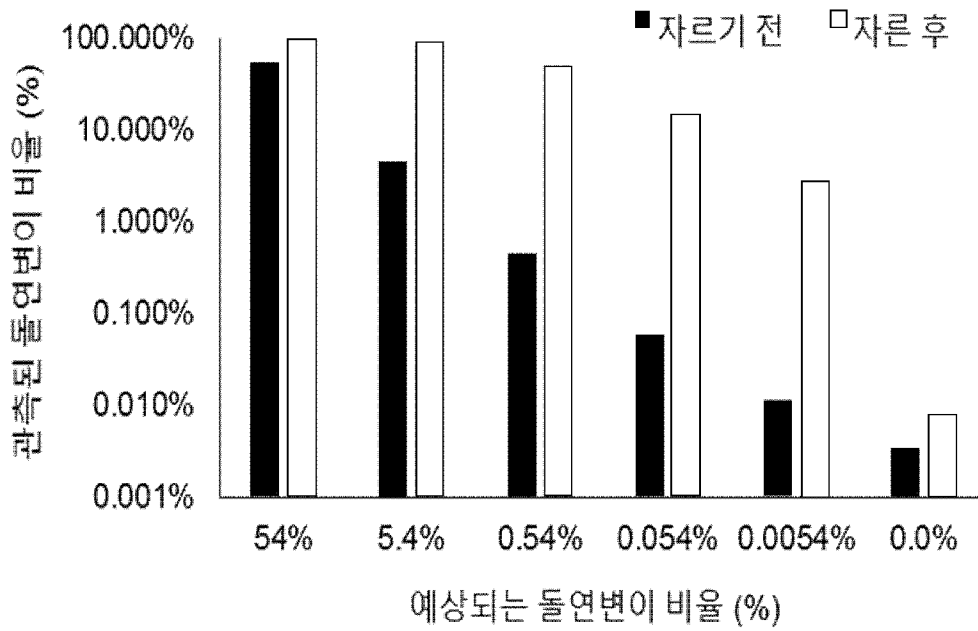
[Fig. 1]



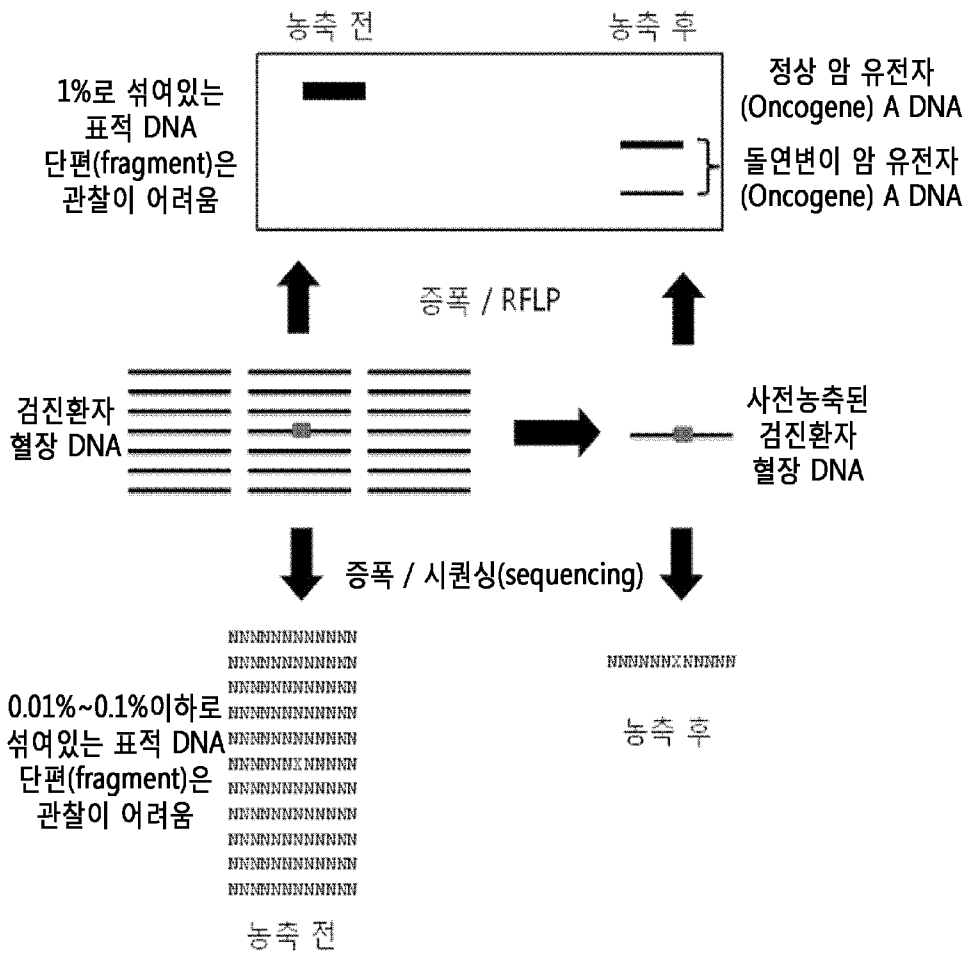
[Fig. 2]



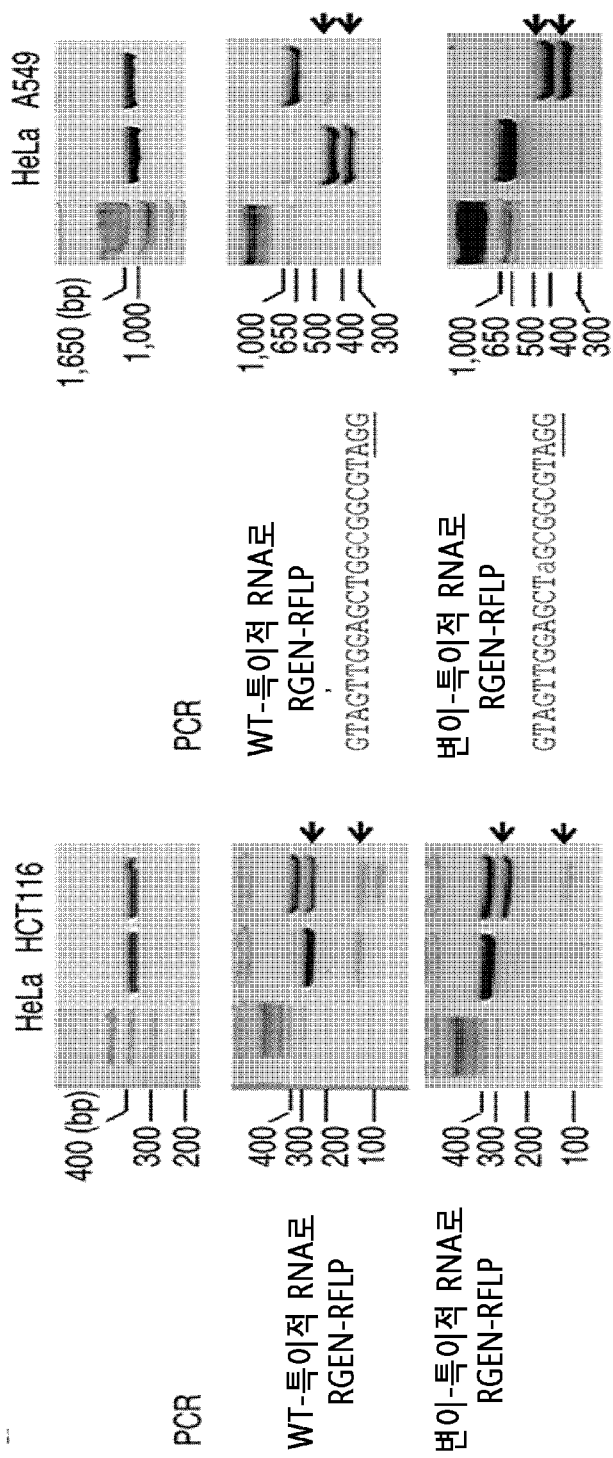
[Fig. 3]



[Fig. 4]



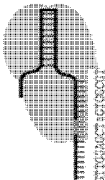
[Fig. 5]





[Fig. 6]

K-RAS G12S 돌연변이 특이적 dRGEN에 의한 K-RAS G12S DNA 단편의 분리

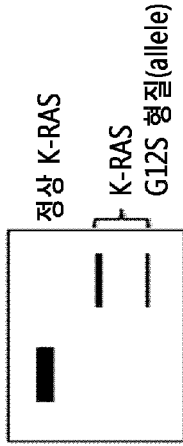


K-RAS G12S 돌연변이를 포함한 암환자의 혈장 DNA

GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT  
GTACTTGAACTGATGGCGT

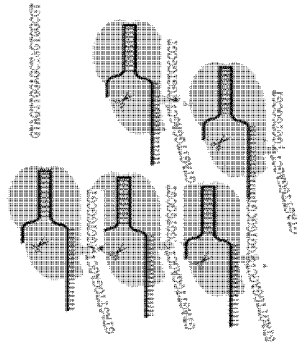
증폭 후 RFLP  
1%이하로 섞여있는 돌연변이 DNA는 관찰이 어려움

증폭 전 증폭 후



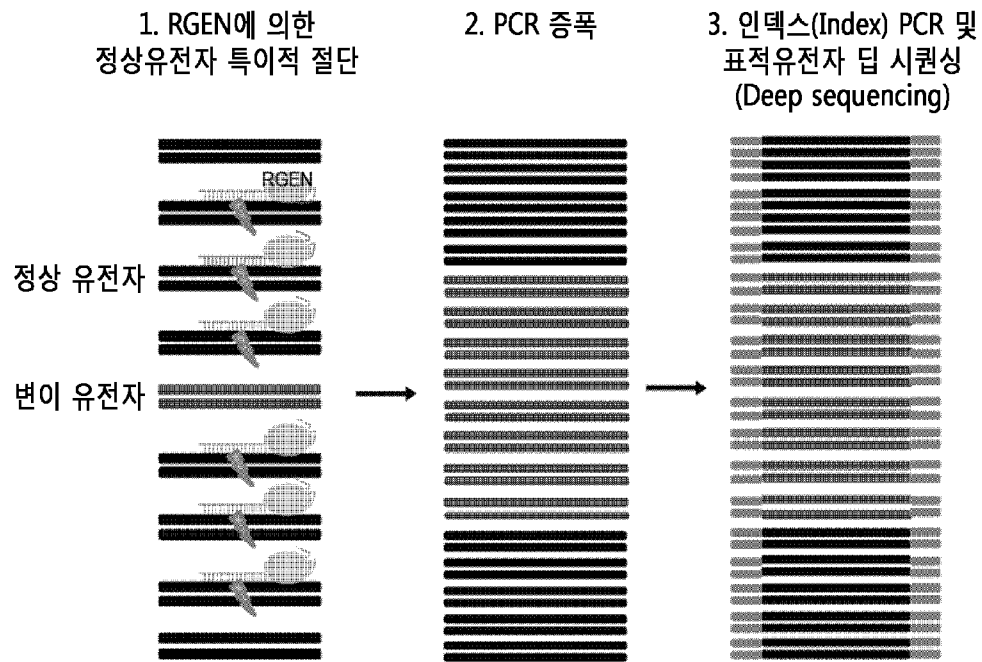
증폭된 K-Ras G12S DNA

정상 K-RAS 특이적 dRGEN에 의한 K-RAS DNA 단편의 제거

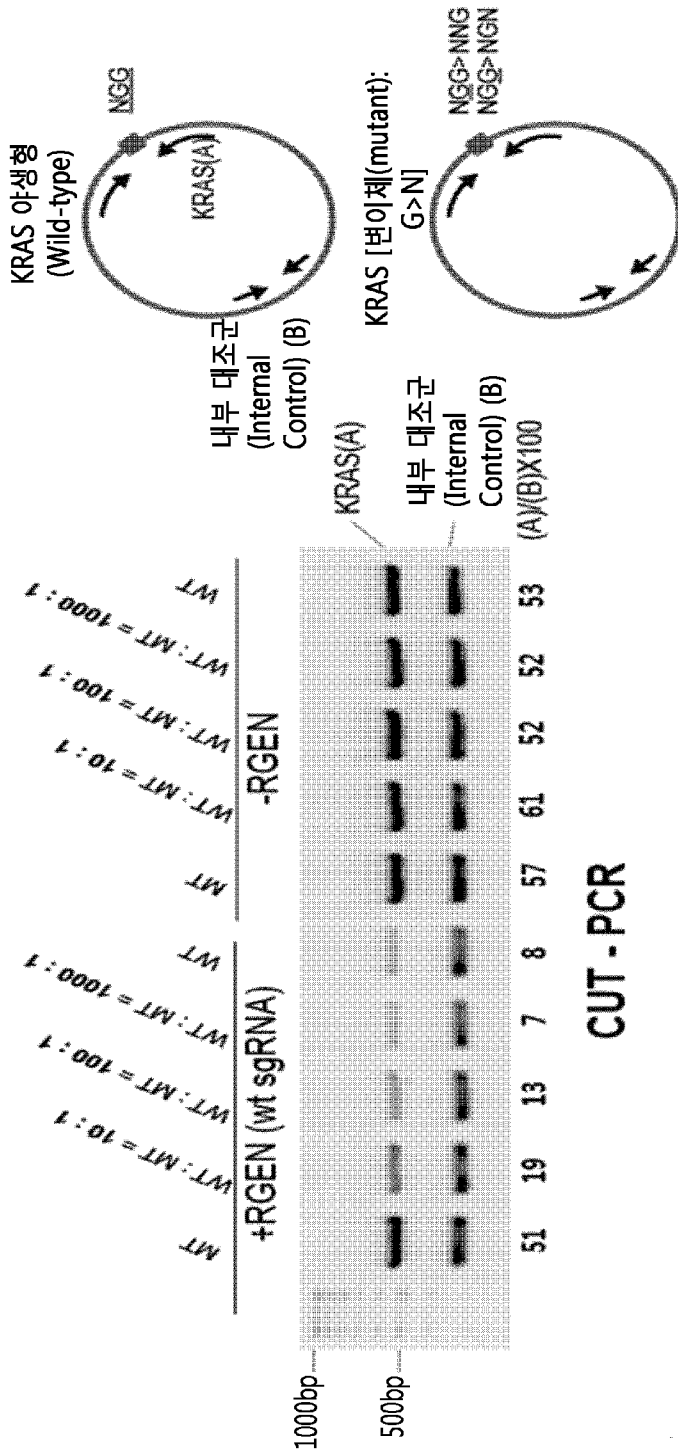


증폭 후 서열분석 딥 시퀀싱 (deep sequencing), NGS, Sanger sequencing 등 0.01~0.1%이하로 섞여있는 돌연변이 DNA는 관찰이 어려움

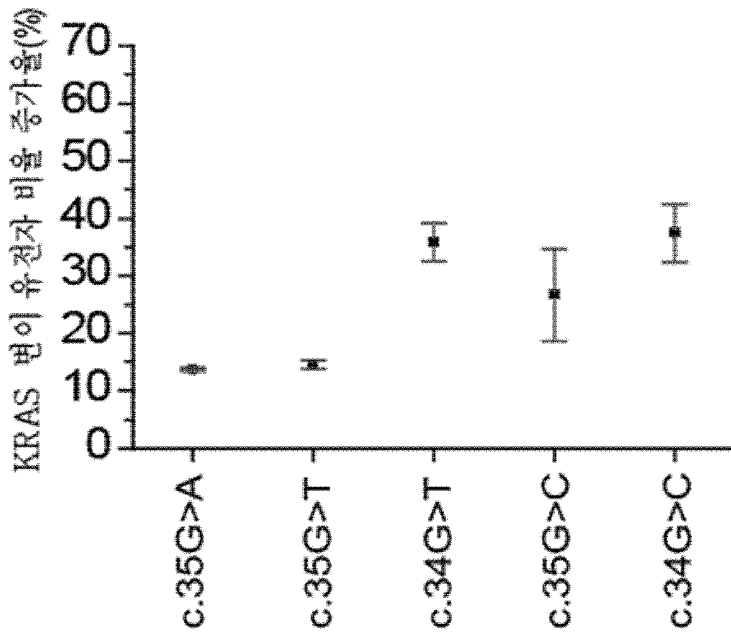
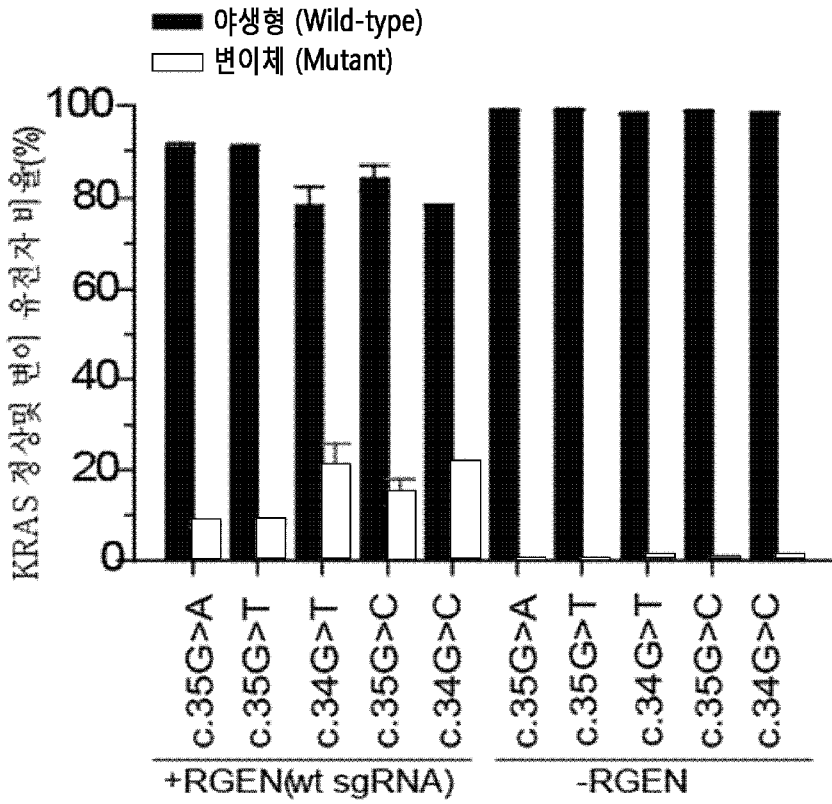
[Fig. 7]



[Fig. 8]

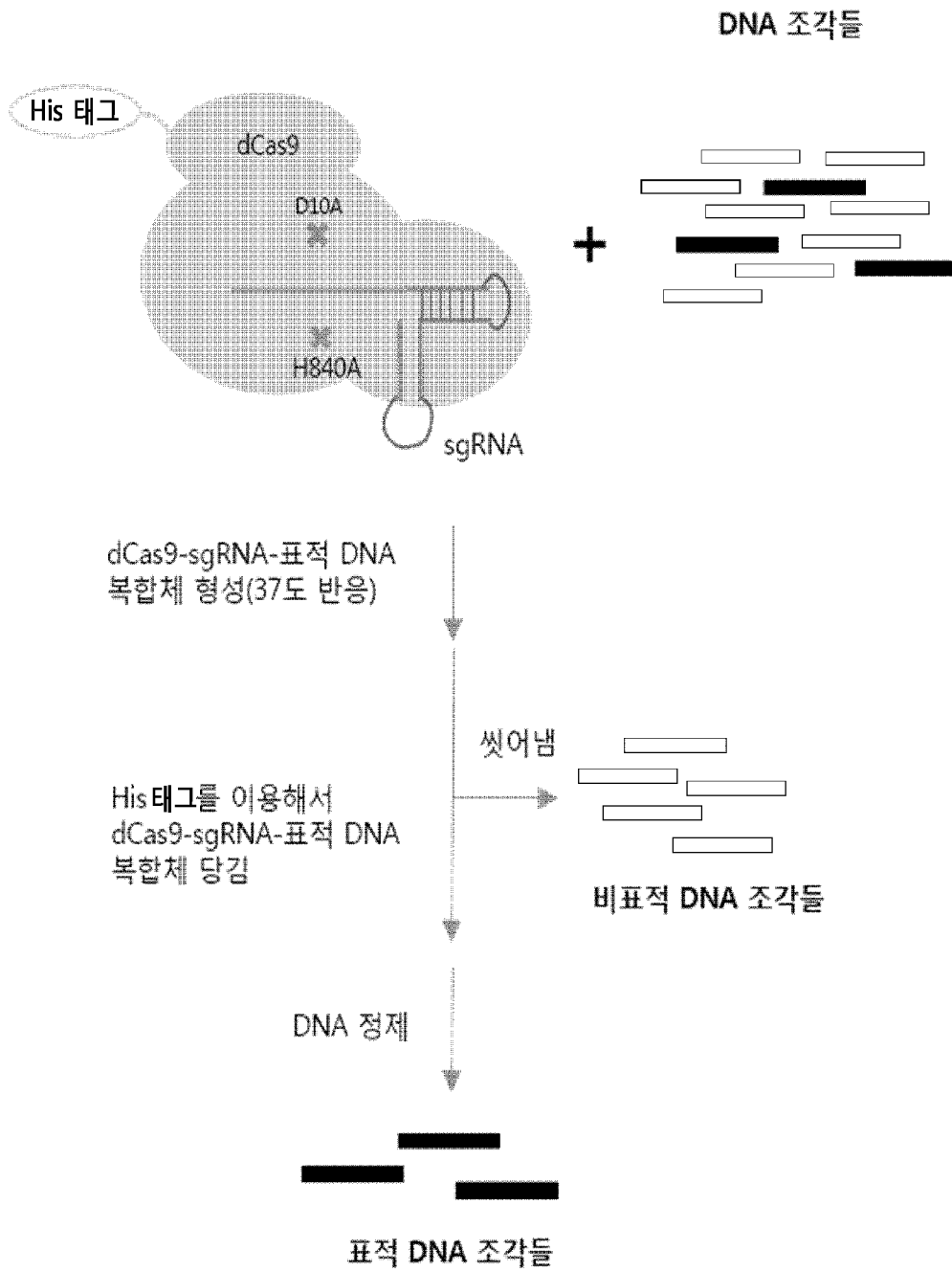


[Fig. 9]

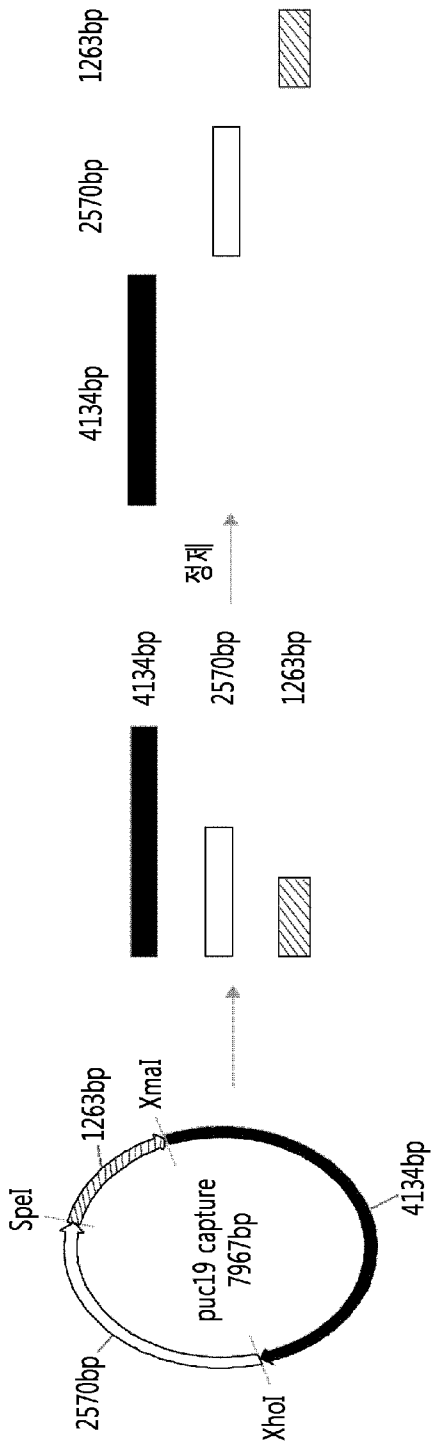




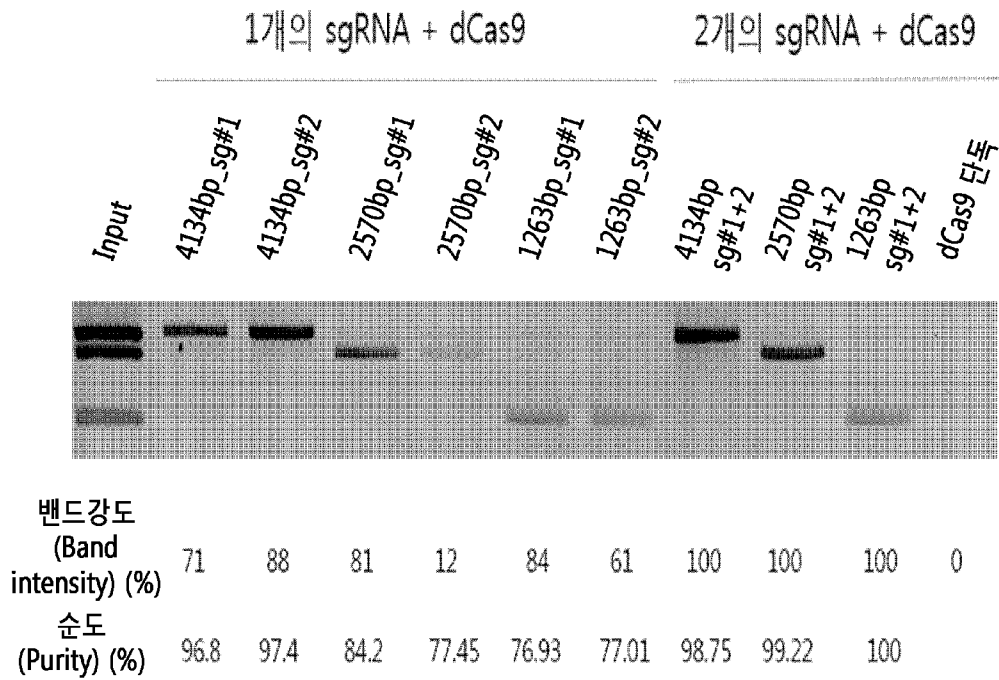
[Fig. 11]



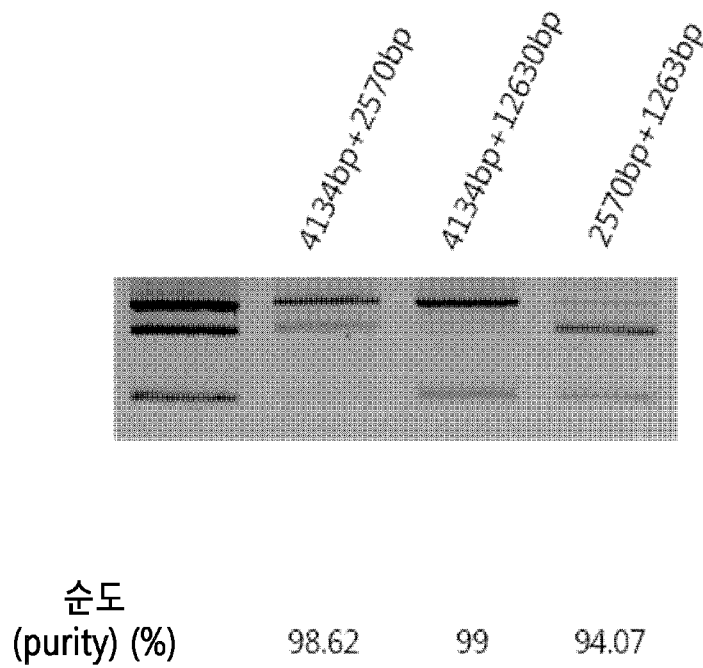
[Fig. 12]



[Fig. 13]



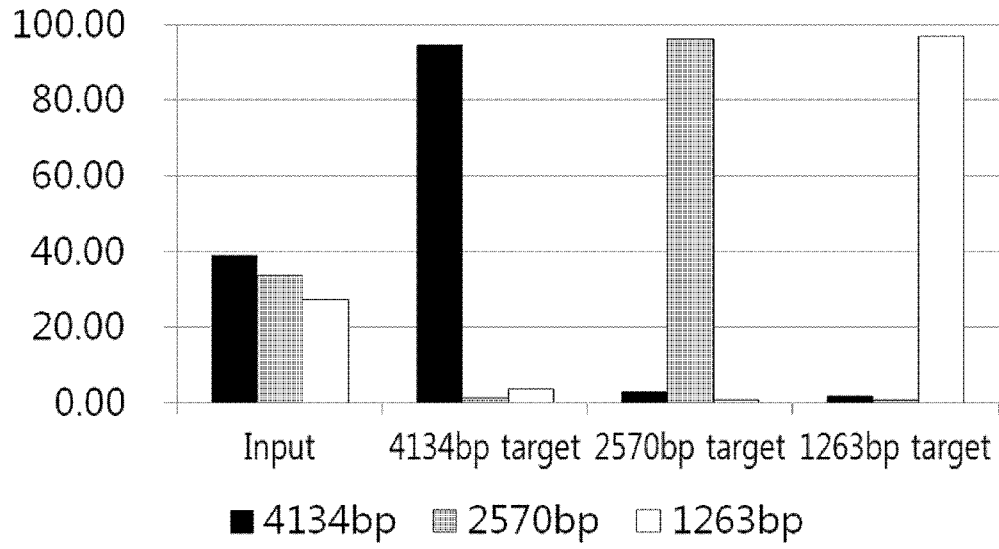
[Fig. 14]



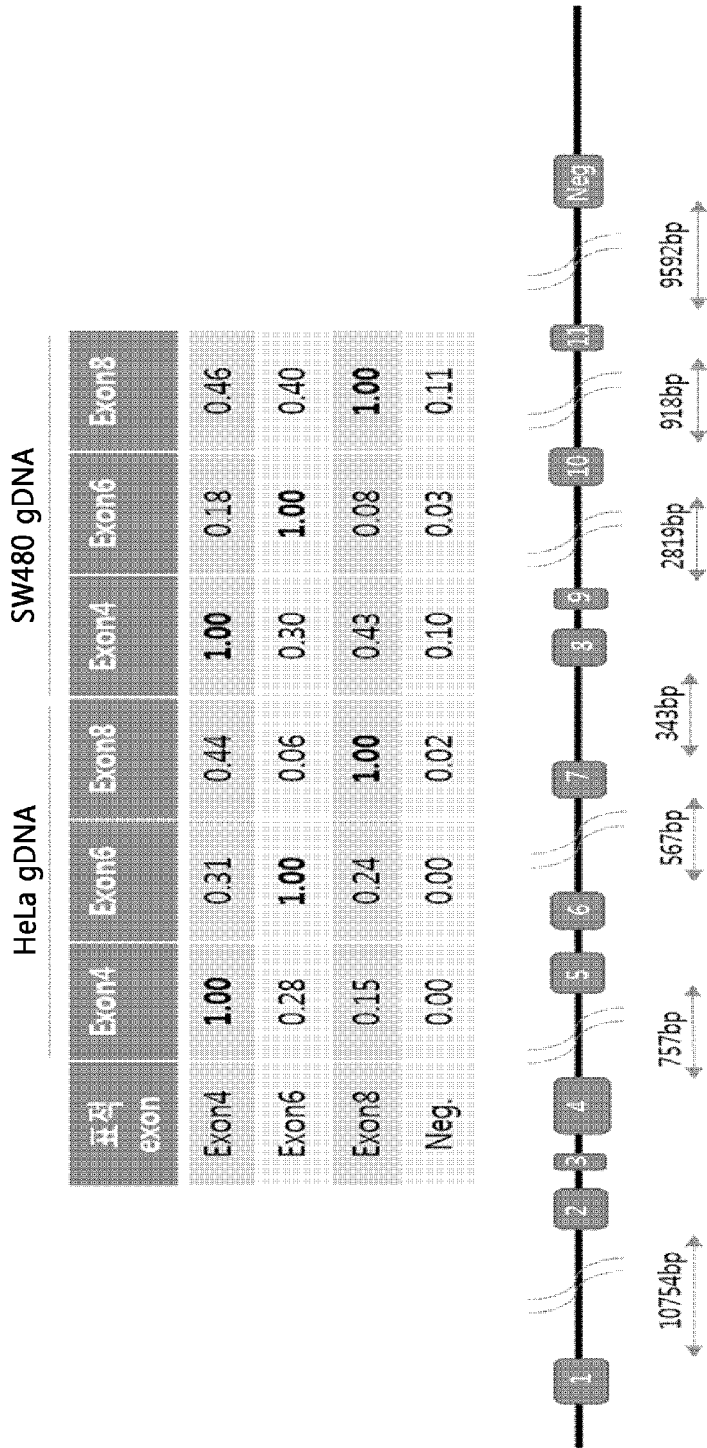


[Fig. 15]

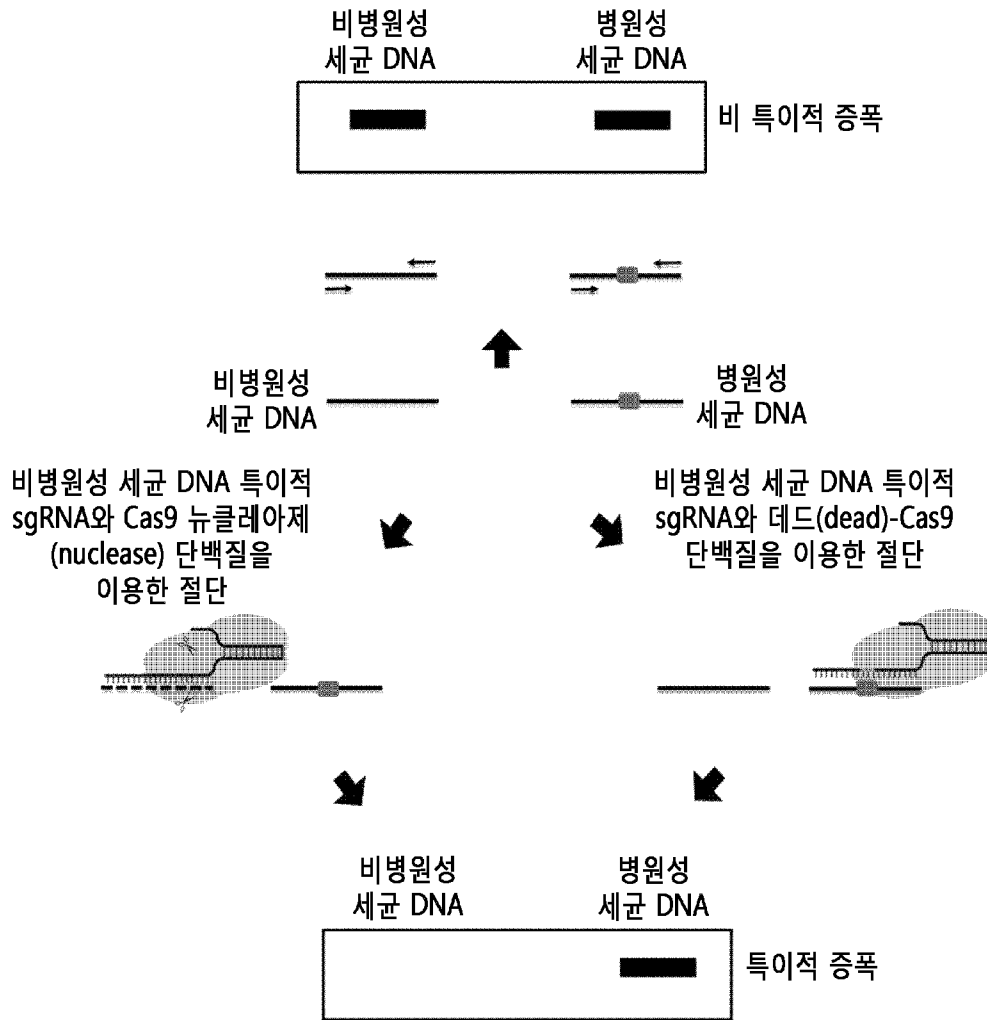
### 표적 DNA 정제 %



[Fig. 16]



[Fig. 17]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/005384**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; C12N 15/11; G01N 33/574; G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: RGEN, Cas, guide RNA, gene analysis, cancer diagnosis, DNA separation

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM et al., "Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases" Nature Communications, vol. 5, Thesis Number 3157, pages 1-7 (20 January 2014) See abstract; pages 2-6; and figure 6.	1-54
A	PEREZ-PINERA et al., "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors" Nature Methods, vol. 10, no. 10, pages 973-976 (2013) See the entire document.	1-54
A	WO 2014-065596 A1 (TOOLGEN INCORPORATED) 01 May 2014 See abstract; and claims 1-22.	1-54
A	RAN et al., "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity" Cell, vol. 154, no. 6, pages 1380-1389 (2013) See the entire document.	1-54
A	WU et al., "Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells" Nature Biotechnology, vol. 32, no. 7, pages 670-676 (20 April 2014) See the entire document.	1-54

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	


Date of the actual completion of the international search

04 AUGUST 2015 (04.08.2015)

Date of mailing of the international search report

04 AUGUST 2015 (04.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR


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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

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

International application No.

**PCT/KR2015/005384**

<b>Patent document cited in search report</b>	<b>Publication date</b>	<b>Patent family member</b>	<b>Publication date</b>
WO 2014-065596 A1	01/05/2014	AU 2013-335451 A1	01/05/2014

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
**C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**  
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
 C12Q 1/68; C12N 15/11; G01N 33/574; G01N 33/53

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: RGEN, Cas, 가이드 RNA, 유전자 분석, 압 진단, DNA 분리

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM 등, 'Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases' Nature Communications, 5권, 논문번호 3157, 내부페이지 1-7 (2014.01.20) 요약; 페이지 2-6; 및 도면 6 참조.	1-54
A	PEREZ-PINERA 등, 'RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors' Nature Methods, 10권, 10호, 페이지 973-976 (2013) 전체 문헌 참조.	1-54
A	WO 2014-065596 A1 (TOOLGEN INCORPORATED) 2014.05.01 요약; 및 청구항 1-22 참조.	1-54
A	RAN 등, 'Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity' Cell, 154권, 6호, 페이지 1380-1389 (2013) 전체 문헌 참조.	1-54
A	WU 등, 'Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells' Nature Biotechnology, 32권, 7호, 페이지 670-676 (2014.04.20) 전체 문헌 참조.	1-54

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

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌      "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌      "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌      "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌      "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌  
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2015년 08월 04일 (04.08.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 08월 04일 (04.08.2015)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-065596 A1	2014/05/01	AU 2013-335451 A1	2014/05/01