

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 12월 28일 (28.12.2023) WIPO | PCT



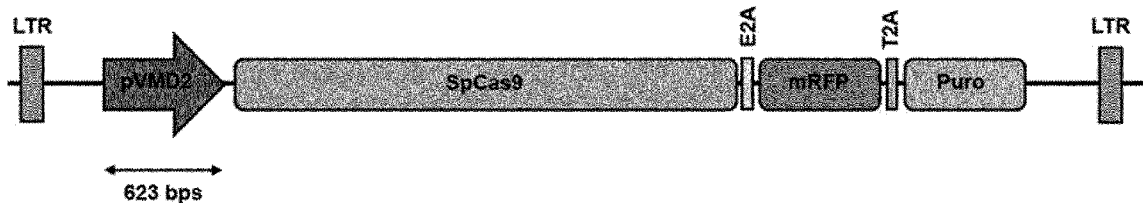
(10) 국제공개번호

WO 2023/249475 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/095023
- (22) 국제출원일: 2023년 6월 22일 (22.06.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2022-0077483 2022년 6월 24일 (24.06.2022) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울특별시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이준원 (LEE, Junwon); 06215 서울특별시 강남구 역삼로 307 204동 1203호, Seoul (KR). 변석호 (BYEON, Suk Ho); 06005 서울특별시 강남구 압구정로 29길 57, 현대아파트 203동 1202호, Seoul (KR). 최강 (CUI, Gang); 03788 서울특별시 서대문구 연세로13길 21, 에스빌 404호, Seoul (KR). 박진규 (PARK, Jin Kyu); 13119 경기도 성남시 수정구 복정로32번길 36, 202호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 파도특허법인유한회사 (PADO IP LAW PLLC); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 노벨빌딩 9층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING RETINAL DISEASES COMPRISING AS ACTIVE INGREDIENT CRISPR/CAS COMPLEX THAT OPERATES SPECIFICALLY ON RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

(54) 발명의 명칭: 망막색소상피에 특이적으로 작동하는 CRISPR/CAS 복합체를 유효성분으로 포함하는 망막질환 치료용 약학조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating retinal diseases, comprising a CRISPR/Cas complex as an active ingredient. The present invention is research for developing a technology for targeting target cells to be treated, to fundamentally treat retinal diseases, specifically age-related macular disease (AMD), and Cas9 expressed under the human VMD2 promoter was constructed to induce retinal pigment epithelium (RPE)-specific expression, and it was confirmed that pVMD2-Cas9 was specifically expressed and operated in RPE cells in both in-vivo mouse and in-vitro human retinal organism models. By using this, gene editing (correction) restricted to RPE cells is possible, which is expected to be greatly used in the fundamental treatment of various hereditary and non-hereditary eye diseases related to RPE cells.

(57) 요약서: 본 발명은 CRISPR/Cas 복합체를 유효성분으로 포함하는, 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다. 본 발명은 망막질환, 구체적으로 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발을 위한 연구로서, 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 유기체 모델 모두에서 RPE 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인하였다. 이를 이용하여, RPE 세포에 국한되어 유전자 편집(교정)이 가능한 것이며, 이는 RPE 세포와 연관된 다양한 유전성, 비유전성 안질환의 근본적인 치료에 크게 이용될 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

WO 2023/249475 A1

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 망막색소상피에 특이적으로 작동하는 CRISPR/CAS 복합체를 유효성분으로 포함하는 망막질환 치료용 약학조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 망막색소상피에 특이적으로 작동하는 CRISPR/Cas 복합체를 유효성분으로 포함하는 망막질환 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] CRISPR/Cas 시스템은 게놈의 정확한 편집을 가능하게 하는 박테리아 방어 메커니즘으로, 기존의 게놈 변형 기술보다 훨씬 더 정밀하게 게놈의 특정 위치에서 DNA 서열을 선택적으로 변형하는 유전자 편집 도구로 사용되는 강력한 기술이다. CRISPR-Cas 시스템은 단백질과 RNA의 두 가지 구성 요소로 구성되고, 단백질인 Cas9는 핵산내 가수분해효소이며, 유도 RNA(Guide RNA; gRNA)에 의해 유도되는 게놈에서 부위별 이중 가닥 파괴(Double-Strand DNA Breaks; DSB)를 만들 수 있다. 각각의 DNA 표적 부위를 수정하기 위해 상당한 단백질 공학을 필요로 하는 아연 손가락 핵산분해효소(ZFNs)와 전사 활성화제 유사 이펙터 핵산분해효소(TALENs)와 대조적으로, CRISPR-Cas9 시스템은 gRNA 서열의 변화만 필요로 한다. 이러한 이유로, CRISPR-Cas9 기술은 다양한 세포와 유기체의 게놈을 표적화, 편집 또는 수정하기 위해 과학계에 빠르고 널리 채택되어 왔다.
- [3] CRISPR-Cas9 뉴클레아제를 이용한 RNA 유도 유전체 교정(RNA-guided genome surgery 또는 RNA-guided genome editing)은 다양한 유전 질환의 치료에 도움이 될 것으로 기대되지만, 비유전 질환에의 CRISPR-Cas9 뉴클레아제의 치료 효과는 밝혀진 바가 제한적이다. 비유전 질환의 일 예로 황반변성(예컨대, 노인성 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)을 들 수 있다. AMD는 선진국의 고령 인구에서의 주요한 실명 원인이다. 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization; CNV)은 신생 혈관성 AMD의 주요 병리학적 특징이며, 주로 혈관 내피 성장 인자 A(Vascular endothelial growth factor A; VEGFA)와 같은 혈관신생 사이토카인(angiogenic cytokines)에 의해 유발된다. 지금까지는, 황반변성의 치료제로서 VEGFA를 표적으로 하는 단클론 항체 또는 압타머가 주로 개발되어 왔다. 그러나, VEGFA가 망막 세포에서 연속적으로 발현되고 분비되기 때문에, 효과 기간이 제한적인 이들 항-VEGFA 제제가 반복적으로 투여되어야 하며, 1년에 평균 7회 이상 투여되게 된다.
- [4] 치료 목적으로 CRISPR/Cas9 시스템을 사용할 때, 수정해야 할 질병 관련 표적 세포가 있을 수 있다. 그러나, CRISPR/Cas9 시스템이 모든 유형의 세포에서 작동하면 원치 않는 세포에서도 유전자 교정이 일어나는 문제가 발생할 수 있어, 이에 대한 기술개발이 요구되고 있다.

- [5] 따라서, 본 발명은 안질환, 구체적으로 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발로서, 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소상피(RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 오가노이드 모델 모두에서 RPE 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인하였다. 이를 이용하여, RPE 세포에 국한되어 유전자 편집(교정)이 가능할 것이며, 이는 RPE 세포와 연관된 다양한 유전성, 비유전성 안질환의 근본적인 치료에 크게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발을 위 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소상피(Retinal pigment epithelium; RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 오가노이드 모델 모두에서 RPE 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 따라서 본 발명의 목적은 CRISPR/Cas9 복합체를 유효성분으로 포함하는, 망막 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데 있다.
- [8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [10] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [11] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [12] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 VMD2 프로모터와 혈관 내피 성장인자 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) 유전자를 포함하는 가이드 RNA(Guide RNA)을 제공한다.
- [13] 본 발명자들은 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발을 위 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 유기체 모델 모두에서 망막 색소 상피 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인하였다.
- [14] 본 명세서에서 용어 "프로모터(Promoter)"는 DNA에서 RNA를 합성하는 단계인 전사의 시작에 관여하는 유전자의 상류 영역을 의미한다. 즉, RNA 중합 효소(RNA Polymerase)가 결합하는 DNA 가닥의 한 부위 또는 DNA 한 가닥에 상보적인 RNA를 합성, 즉 전사가 시작되는 부위를 말한다.
- [15] 본 발명에 따르면, VMD2 프로모터는 인간 VMD2 프로모터를 이용한 것이다. 구체적으로, 인간 VMD2의 서열순서 -585 ~ +38에 위치한 623 bps 크기의 VMD2 프로모터를 이용한 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [16] 본 명세서에서 용어 "혈관 내피 성장 인자(Vascular endothelial growth factor; VEGF)"는 혈관 형성을 자극하는 많은 세포에서 생성되는 신호 단백질을 의미한다. 혈관 내피 성장인자는 성장 인자의 서브패밀리, 시스틴 매듭 성장 인자의 혈소판 유래 성장 인자 패밀리로, 배아 순환계의 새로운 형성을 하는 혈관신생 및 기존 혈관계로부터 혈관의 성장을 하는 혈관신생에 관여하는 중요한 신호 단백질이다.
- [17] 본 명세서에서 용어 "가이드 RNA(Guide RNA; gRNA)"는 RNA 또는 DNA 표적화 효소의 가이드 역할을 하는 RNA 조각을 의미하며, RNA와 복합체를 형성한다. 높은 빈도로 이 효소는 표적 RNA 또는 DNA를 삭제, 삽입 또는 변경을 한다. 자연적으로 발생하여 중요한 기능을 제공하지만 CRISPR-Cas9 및 CRISPR-Cas12와 같은 대상 편집에 사용하도록 설계할 수도 있다.
- [18] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 혈관 내피 성장인자는 혈관 내피 성장 인자 A(Vascular endothelial growth factor A; VEGFA), 태반 형성 인자(Placental growth factor; PGF), 혈관 내피 성장 인자 B(Vascular endothelial growth factor B; VEGFB), 혈관 내피 성장 인자 C(Vascular endothelial growth factor C; VEGFC), 저산소증 유발 인자 1-알파(Hypoxia-inducible factor 1-alpha; Hif1 α), 및 혈관 내피 성

장 인자 D(Vascular endothelial growth factor D; VEGFD)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 가이드 RNA(Guide RNA)이다. 구체적으로는 혈관 내피 성장 인자 A일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [19] 본 명세서에서 용어 "혈관 내피 성장 인자 A(Vascular endothelial growth factor A; VEGFA)"는 인간에서 혈관 내피 성장 인자 A 유전자에 의해 암호화되는 이량체 당단백질을 의미한다. 혈관 내피 성장 인자 A는 상처 치유, 종양 혈관 신생, 당뇨병성 망막병증 및 연령 관련 황반 변성과 같은 혈관과 관련된 질병 및 기관 리모델링 동안 성인에게 필수적이다. 척추동물의 발달 초기에 혈관 형성이 일어나 내피가 혈관으로 응축되게 되는데, 내피 세포의 분화는 혈관 내피 성장 인자 A의 발현에 의존하며 발현이 중단되면 배아가 사망할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자 A는 대체 스플라이싱의 결과로 3개의 주요 이소형 그룹에 의해 생성되며, 3개의 이소형이 생성되는 경우(VEGFA120, VEGFA164 및 VEGFA188) 이는 마우스에서 혈관 결함 및 전체 혈관 내피 성장 인자 A 녹아웃의 사망을 초래하지 않는다. 혈관 내피 성장 인자 A는 혈관 공급이 필요하기 때문에 뉴런의 역할에 필수적이며 신경 전구 세포에서 혈관 내피 성장 인자 A의 발현을 제거하면 뇌 혈관 형성 및 뉴런 세포 사멸의 결함이 발생할 수 있다. 항-VEGFA 요법은 암 및 안과 질환에서 바람직하지 않은 혈관 신생 및 혈관 누출이 있는 환자를 치료하는 데 사용할 수 있고, 신경 발생 및 신경 보호의 억제를 초래할 수도 있다.
- [20] 본 명세서에서 용어 "태반 형성 인자 (Placental growth factor; PGF)는 인간에서 태반 형성 인자 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 의미한다. 태반 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자 서브패밀리의 구성원이며, 특히 배아 발생 동안 혈관형성 및 혈관형성의 핵심 분자이다. 임신 중 태반 형성 인자의 주요 공급원은 태반 영양막이고, 태반 형성 인자는 용모 영양막을 포함한 많은 다른 조직에서도 발현된다.
- [21] 본 명세서에서 용어 "저산소증 유발 인자 1-알파(Hypoxia-inducible factor 1-alpha; Hif1A)"는 HIF1A 유전자에 의해 암호화되는 이종이량체 전사 인자 저산소증 유발 인자 1(HIF-1)의 하위 단위를 의미한다. HIF1A는 단백질을 포함하는 기본 나선 루프 나선 PAS 도메인이며 저산소증에 대한 세포 및 발달 반응의 마스터 전사 조절자로 역할을 하며, 저산소증 또는 유전적 교대에 의한 HIF1A의 조절 장애 및 과발현은 암 생물학뿐만 아니라 특히 혈관 형성 및 혈관 신생, 에너지 대사, 세포 생존 및 종양 침습 영역에서 많은 다른 병태 생리학에 크게 관련되어 있다.
- [22] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VMD2 프로모터와 혈관 내피 성장인자 유전자를 포함하는 가이드 RNA, 및 Cas(CRISPR associated protein) 핵산분해 효소를 포함하는, CRISPR/Cas 복합체를 제공한다.
- [23] 본 명세서에서 용어 "핵산 분해 효소(Nuclease)"는 핵산의 뉴클레오타이드 사이의 인산다이에스터 결합을 절단할 수 있는 효소를 의미한다. 뉴클레이스, 핵산 가수분해효소라고도 한다. 핵산 분해 효소는 표적 분자에서 단일 및 이중 가닥 파괴에 다양한 영향을 미친다.

- [24] 본 명세서에서 용어 "CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas"는 미생물의 적응면역 현상에서 기인한 유전자 편집 기술을 의미한다. 타겟(target) DNA를 정밀하게 잘라낸 다음 자연적으로 DNA가 복구되도록 함으로써 보다 간단하고 효율적으로 유전자 조작을 가능하게 한다. 이 시스템은 가이드 RNA(guide RNA; gRNA)와 Cas nuclease로 구성되며, RNA 유전자가 위(RNA-guided engineered nucleases, RGENs) 기술이라고도 한다. gRNA는 target 서열에 상보적으로 결합하는 crRNA와 Cas-binding을 위한 tracrRNA로 구성되고, gRNA는 Cas를 target 부분으로 안내하는 역할을 하며, target DNA 서열과 상보적으로 결합한다. Target DNA 서열 3' 말단에는 PAM (Protospacer adjacent motif) 서열이 있어야 한다. gRNA가 Cas nuclease와 복합체를 형성하고 target 서열에 특이적으로 결합하면, Cas nuclease는 PAM 서열을 인식하고 PAM의 3 bp upstream 부분에 이중 가닥 손상(Double Strand Break, DSB)을 일으키게 된다.
- [25] 본 발명에 따르면, 상기 Cas는 Cas9, Cas12, Cas13, 및 Cas14로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, CRISPR/Cas 복합체이다. 구체적으로는 Cas9일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 본 명세서에서 용어 "Cas9(CRISPR associated protein 9)"은 DNA 바이러스 및 플라스미드에 대한 특정 박테리아의 면역 방어에 중요한 역할을 하는 160 킬로달톤 단백질을 의미한다. 유전 공학 응용 분야에서 많이 활용되며, 주요 기능은 DNA를 절단하여 세포의 게놈을 변경하는 것이다.
- [27] 본 명세서에서 용어 "Cas12"는 일부 박테리아에서 CRISPR 시스템의 일부를 형성하는 RNA 유도 엔도뉴클레아제를 의미한다. Cas12는 프로토스페이서의 인식에 따른 표적 유전자 절단 외에도 표적이 아닌 주변의 단일가닥 DNA(single stranded, ssDNA)의 부수적 절단을 유발한다. Cas12는 부수적인 절단 기능을 이용하여 다양한 휴대용 진단 기술의 개발에 활용된다. Cas12acrRNA복합체는 부수적으로 단일 가닥 DNA를 분해하는데, 표적 이중 가닥 DNA에 결합을 하면 1초에 대략 1250회의 부수적 절단을 일으키기 때문에, 핵산 검출 및 신호 증폭을 동시에 할 수 있는 효소로서 Cas12a를 주목하고 있다. Cas12는 5'-(T)TTN-3'의 PAM 서열을 가지는 이중가닥구조의 서열을 특이적으로 인식하는데, 일반적으로 사용되는 Cas12는 Cas12a와 Cas12b이다. 표적이 단일가닥 DNA인 경우에는 PAM의 서열이 100% 일치하지 않고, 변화가 있더라도 효소적 절단을 하는 것으로 알려져 있다.
- [28] 본 명세서에서 용어 "Cas13"은 RNA로 유도된 RNA 엔도뉴클레아제를 의미하며, DNA는 절단하지 않고 단일 가닥 RNA만 절단한다. Cas13 그룹은 표적 유전자를 인식할 수 있는 28-30 bp의 스페이서로 이루어진 gRNA와 리보핵단백질을 형성한다. Cas13 단백질은 DNA 분해 효소가 아닌 RNA 분해 효소로 작용을 하며, Cas13은 DNA를 부수적으로 절단하는 Cas12와는 달리 RNA를 부수적으로 절단한다. Cas13 그룹 중에는 이전에는 C2C2로 알려졌던 Cas13a가 가장 먼저 핵산 검출에 활용되었다. Cas13a는 crRNA에 맞는 프로토스페이서를 가진 단일 가닥

RNA 표적을 분해시킨다. 단일 가닥 RNA에 한 번 결합을 하면, Cas13a 단백질은 비특이적 RNA 분해효소로 작용을 하여 주변에 있는 RNA가 표적 RNA가 아니더라도 분해를 시킨다. 한 번의 표적 인식으로 최소 104회의 부수적 절단을 일으키는 것으로 보고되어 있다. 표적 유전자에 대한 절단과 비특이적인 주변 RNA 서열의 절단 2가지 방식의 효소적 절단을 하는 것이다. Cas13는 상보적인 프로토스페이서를 절단하는 것이 아니고, 그 주변을 절단하기 때문에, 프로토스페이서가 온전히 유지되기 때문에 결합을 절단을 여러 차례 할 수도 있어 증폭효과를 나타내므로 민감한 검출에 활용될 수 있다. Cas13 단백질은 PAM 서열을 필요로 하지 않으나 protospacer flanking site(PFS)라고 해서 염기 구아닌이 프로토스페이서 옆에 있어야 한다. 생명공학 및 진단 분야에서 가장 널리 사용되는 Cas13 단백질은 Cas13a와 Cas13b인데, Cas13b는 세포 유전자 조작에 더욱 안정적인 것으로 알려져 있다.

- [29] 본 명세서에서 용어 "cas14"는 Cas14는 단일가닥 DNA의 프로토스페이서를 인식할 수 있는 RNA 엔도뉴클레아제를 의미한다. 하링톤(Harrington)그룹은 Cas14-DETECTR를 개발하여 단일 염기 변이를 검출하였다. 그러나 Cas14는 단일 가닥 DNA의 식별을 통해 부수적 절단이 활성화되기 때문에 이중 가닥 DNA를 검출해야 하는 경우, 이중 가닥 DNA를 단일 가닥 DNA로 변성을 시켜야 하는 과정상의 복잡함이 있다. Cas14는 가장 최근에 발견되었고 Cas14a, Cas14b, Cas14c로 구분되는데, 이는 PAM의 서열과 무관하게 단일가닥 핵산을 절단한다. 그러나 이중가닥의 표적 유전자의 절단을 위해서는 염기서열 T가 다량 함유된 PAM 서열이 필요한 것으로 보고되었다. Cas12a가 유사한 단일가닥 서열 구분에 문제가 있는 것과는 달리 Cas14a는 단일가닥 표적 유전자의 차이가 하나인 경우에도 식별을 할 수 있다. 이는 PAM 서열이 없이도 단일가닥서열의 SNP를 식별하는 데에 사용될 가능성을 보여준다.
- [30] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CRISPR/Cas 복합체는 망막 색소 상피(Retinal pigment epithelium; RPE)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현을 억제하고, 신경망막(Neural retina; NR)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현은 억제하지 않는 것인, CRISPR/Cas 복합체이다.
- [31] 본 명세서에서 용어 "망막 색소 상피(Retinal pigment epithelium; RPE)"는 망막 시각 세포에 영양을 공급하는 신경 감각 망막 바로 바깥쪽에 있는 색소 세포층을 의미하며, 밑에 있는 맥락막과 그 위에 있는 망막 시각 세포에 단단히 부착되어 있다. 망막 색소 상피는 빛 흡수, 상피 수송, 공간 이온 완충, 시각 주기, 식균 작용, 분비 및 면역 조절과 같은 여러 기능을 가지고 있다.
- [32] 본 명세서에서 용어 "망막(Retina)"은 대부분의 척추동물과 일부 연체동물의 눈 조직에서 가장 안쪽에 있는 빛에 민감한 층을 의미한다. 눈의 광학은 망막에 시각적 세계의 초점이 맞춰진 2차원 이미지를 생성하고, 이 이미지를 뇌에 대한 전기적 신경 자극으로 변환하여 시각적 인식을 생성하며, 카메라의 필름이나 이미

지 센서와 유사한 기능을 한다. 신경망막(Neural Retina)은 시냅스로 연결된 여러 층의 뉴런으로 구성되며 착색된 상피세포의 외층에 의해 지지된다.

- [33] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VMD2 프로모터와 혈관 내피 성장인자 유전자를 포함하는 가이드 RNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 복합체를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [34] 본 발명에서 상기 "벡터"는 어떤 핵산 분자가 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 상기 핵산 분자이다. 벡터의 한 가지 유형은, 추가적인 DNA 세그먼트가 결합될 수 있는 원형 이중가닥 DNA를 가리키는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스성 벡터로, 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 어떤 벡터들은 그들이 유입된 숙주세포에서 자율적인 복제를 할 수 있다(예컨대, 박테리아성 벡터는 박테리아성 복제 기원을 갖는 에피솜 포유류 벡터). 기타 벡터(예컨대, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주세포에 유입되면서 숙주세포의 게놈에 통합될 수 있고, 이를 통해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 뿐만 아니라, 어떤 벡터는 이들이 작동차원에서 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이와 같은 벡터는 본원에서 "제조합 발현 벡터" 또는 단순히 "발현 벡터"라 명명된다. 일반적으로 제조합 DNA 기법에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는 벡터 중에서 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에, 상호 교환하여 사용될 수 있다.
- [35] 본 발명에서 상기 발현 벡터의 구체적인 예시로는 상업적으로 널리 사용되는 pCDNA 벡터, F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, Ti 벡터; 코스미드; 람다, 람도이드(lambdoid), M13, Mu, p1 P22, Q μ , T-even, T2, T3, T7 등의 파아지; 식물 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자에게 발현 벡터로 알려진 모든 발현 벡터는 본 발명에 사용 가능하고, 발현 벡터를 선택할 때에는 목적으로 하는 숙주 세포의 성질에 따른다. 숙주세포로의 벡터 도입 시 인산칼슘 트랜스펙션, 바이러스 감염, DEAE-덱스트란 조절 트랜스펙션, 리포펙타민 트랜스펙션 또는 전기천공법에 의해 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자는 사용하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 알맞은 도입 방법을 선택하여 이용할 수 있다. 바람직하게 벡터는 하나 이상의 선별 마커를 함유하나 이에 한정되지 않으며, 선별 마커를 포함하지 않은 벡터를 이용하여 생산물 생산 여부에 따라 선별이 가능하다. 선별 마커의 선택은 목적하는 숙주 세포에 의해 선별되며, 이는 이미 당업자에게 알려진 방법을 이용하므로 본 발명은 이에 제한을 두지 않는다.
- [36] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 벡터는 아데노바이러스(Adenovirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스 관련 바이러스(Adeno-Associated Virus, AAV), 헤르페스 바이러스(Herpes simplex virus; HSV), 렌티바이러스(Lentivirus), 플라스미드(Plasmid), 및 리포솜(Liposome)으로 구성된

균으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 벡터이다. 구체적으로는 렌티바이러스 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [37] 본 명세서에서 용어 "아데노바이러스(Adenovirus)"는 90~100nm의 중형 크기의 바이러스를 의미하며, 외피는 없다. 모양은 정이십면체로 되어 있으며, 이중나선 형태의 DNA를 가지고 있다. 아데노바이러스는 어린이가 걸린 상부 호흡기 질환 중 5~10%의 원인이며, 어른들도 감염되기도 한다. 아데노바이러스 감염의 가장 흔한 증상은 상부 호흡기 질환이다. 아데노바이러스 감염은 종종 결막염, 편도염, 중이염, 후두염, 위장염 등을 동반하기도 한다. 특히 어린이의 경우 세기관지염이나 폐렴에 걸릴 수 있으며, 상당히 악화될 수 있다. 아기들의 경우 백일해에 걸린 것처럼 기침을 하기도 한다. 그 밖에도 아데노바이러스는 드물게 뇌염이나 방광염을 유발시킬 수 있다.
- [38] 본 명세서에서 용어 "레트로바이러스(Retrovirus)"는 침입한 숙주 세포의 DNA에 RNA 게놈의 사본을 삽입하여 해당 세포의 게놈을 변화시키는 바이러스 유형을 의미한다. 일단 숙주 세포의 세포질 내부로 들어가면, 바이러스는 자신의 역전사 효소를 사용하여 RNA 게놈에서 DNA를 생성하며, 일반적인 패턴의 반대이므로 역방향(역방향)이다. 새로운 DNA는 인테그라제 효소에 의해 숙주 세포 게놈에 통합되며, 이때 레트로바이러스 DNA는 프로바이러스라고 한다. 그런 다음 숙주 세포는 바이러스 DNA를 자신의 게놈의 일부로 취급하여 바이러스 유전자를 세포 자신의 유전자와 함께 전사 및 번역하여 바이러스의 새로운 사본을 조립하는 데 필요한 단백질을 생성한다.
- [39] 본 명세서에서 용어 "렌티바이러스(lentivirus)"는 인간과 다른 포유류 중에서 긴 잠복기를 특징으로 하는 만성적이고 치명적인 질병을 일으키는 레트로바이러스의 한 종류를 의미한다. 속은 AIDS를 유발하는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)를 포함한다. 렌티바이러스는 전 세계에 분포하며 유인원, 소, 염소, 말, 고양이, 양 및 기타 여러 포유류에 서식하는 것으로 알려져 있다. 렌티바이러스는 상당한 양의 바이러스 상보성 DNA를 숙주 세포의 DNA에 통합할 수 있고 비분열 세포를 효율적으로 감염시킬 수 있으므로 가장 효율적인 유전자 전달 방법 중 하나이다. 렌티바이러스는 내인성이 될 수 있고, 게놈을 숙주 생식계열 게놈에 통합하여 이후에 바이러스가 숙주의 후손에게 유전될 수 있다.
- [40] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD) 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [41] 본 명세서에서 용어 "황반변성(Age-related macular degeneration: AMD)"은 나이가 들면서 망막의 황반부에 여러 가지 변화가 동반되어 생기는 질병을 의미한다. 나이가 증가함에 따라 발생률이 증가하며, 선진국에서는 성인 실명 원인 1위 질환으로 전세계적으로 약 2억명 정도의 환자가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 우리나라에서도 앞으로 노인 인구가 증가함에 따라서 그 발생 빈도는 더욱 증가

하리라 예상된다. 황반은 망막이라고 하는 신경 조직의 중심 부위를 말하는데, 빛 자극에 반응하는 광수용체 세포가 밀집되어 있어 중심 시력을 담당한다.

- [42] 본 명세서에서 용어 “약학조성물”은 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학조성물은 황반변성을 예방 또는 치료하는 것이며, 이에 관여하는 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 유효성분을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 약학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않아야 한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산과 염기 화합물의 산부가염 등이 가능하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [43] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [44] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 황반변성인 대상체에 도입할 경우 VEGFA 유전자의 기능을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.
- [45] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [46] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 약학조성물이다.
- [47] 본 발명에 따르면, 노인성 황반변성은 노화가 진행됨에 따라 이러한 황반부 광수용체 세포가 소실되어 시력 장애를 일으키는 것으로, ① 습성 또는 삼출성 형태와 ② 건성 또는 비삼출성 형태로 나눌 수 있다. 습성(wet=neovascular, exudative) 형태는 망막 밑에 맥락막 신생혈관이 자라는 경우로 항혈관내피성장인자 항체 (Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) monoclonal antibody)를 안구내 주사하는 방법으로 치료한다. 건성(dry=atrophic) 형태는 AMD의 대부분을 차지하

며 망막에 드루젠(drusen)이나 색소이상(pigmentary abnormality), 또는 망막상피의 위축(atrophy)과 같은 병변이 생긴 경우를 말한다.

- [48] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 벡터를 유효성분으로 포함하는 조성물은 망막 색소 상피의 혈관 내피 성장인자 유전자 발현을 억제하고, 신경망막의 혈관 내피 성장인자 유전자 발현은 억제하지 않는 것인, 약학조성물이다.
- [49] 본 발명에 따르면, 혈관 내피 성장인자는 저산소증(Hypoxia)에 의한 혈관내피 세포 유도제로 작용하는 강력한 혈관 투과성 인자이며, 맥관형성(vasculogenesis)과 혈관신생(angiogenesis) 유발 인자이다. 혈관 내피 성장인자는 Flt-1, KDR/Flt-1의 대표적인 수용체를 통해 작용하게 되며, 이 두 수용체는 정상적인 혈관계 발생에 필수적이다. 혈관계의 발생 조절과 유사하게 중추신경계에서도 저산소증에 의해 글리아세포(glial cell)로부터 혈관 내피 성장인자분비가 증가하며, 이들이 혈관신생을 증가시킨다. 또한, 이렇게 분비된 혈관 내피 성장인자는 신경세포에도 직접적인 영향을 준다. 신경계에서 혈관 내피 성장인자는 신경영양성 인자(Neurotrophic factors)로 작용하여 신경축색성장(axonal outgrowth)를 유도하고, 세포의 생존을 향상시키며, 슈반세포(schwann cell)의 증식을 촉진시킨다. 혈관 내피 성장인자는 혈관계 생성에 있어 가장 핵심적인 단백질로 신경계의 발생 조절에도 작용한다. 따라서, 신경세포에서 혈관 내피 성장인자의 과도한 억제는 부작용을 초래할 수 있으며, 본 발명의 유효성분을 포함하는 약학조성물은 황반변성을 개선하기 위해 혈관 내피 성장인자를 억제함에 있어, 신경망막(Neural retina; NR)이 아닌 망막 색소 상피에서만 혈관 내피 성장인자유전자 발현을 억제한다는 특성을 가지고 있다.
- [50] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [51] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 형질 전환체는 미생물, 세포, 또는 인간을 제외한 동물개체인, 형질 전환체이다.
- [52] 본 명세서에서 용어 "형질전환(transformation)"은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 유전자가 있는 DNA사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합, 세포의 유전형질이 변화되는 분자생물학적 현상을 의미한다. 형질전환은 세균(Bacteria)에서 흔히 관찰되며 인공적인 유전자 조작을 통해 이루어질 수도 있다. 형질전환된 수용세포는 접합과 형질도입을 통해 새로운 유전형질을 확산시킬 수 있다. 형질전환된 개체를 형질전환체라고 한다.
- [53] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 벡터로 형질전환된 형질전환체의 망막 내 혈관 발달 억제를 확인하는 단계;
- [54] (b) 상기 형질전환체에 혈관 발달 촉진용 후보물질을 투여하는 단계; 및,
- [55] (c) 상기 형질전환체의 망막 내 혈관 발달이 증가한 경우에 상기 후보물질을 망막질환의 치료용 물질로 판단하는 단계;를 포함하는, 망막질환 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

- [56] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 방법이다.
- [57] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면 상기 망막질환은 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [58] 본 명세서에서 용어 "당뇨망막병증(Diabetic retinopathy)"은 당뇨병으로 인해 망막에 손상이 발생하는 질환을 의미한다. 당뇨병성 안질환(diabetic eye disease;DED)이라고도 한다. 선진국에서 실명의 주요 원인으로, 망막의 미세혈관이 손상되는 질환이다. 이는 세계 각국의 실명 원인 중에서 높은 비중을 차지하고 있고, 당뇨병 경력이 30년 또는 그 이상인 환자의 약 90%에게서 발생하며, 15년 전후일 경우에는 발병률이 약 60~70%에 이른다.
- [59] 본 명세서에서 용어 "미숙아 망막병증"은 망막혈관들의 비정상적인 발달로 인해 망막의 혈관성 변화가 일어나는 질환을 의미한다. 임신 주수가 낮을수록, 출생 시 체중이 작을수록 많이 발생하며, 망막혈관이 완전히 발달하기 전에 출생한 미숙아의 경우, 망막조직이 대기나 산소에 노출되어 그 산소 농도가 높아지면 망막혈관들이 수축한다.
- [60] 본 명세서에서 용어 "망막동맥폐쇄"는 망막에 있는 혈류가 막히는 질환을 의미한다. 중풍처럼 증상이 경미하거나 심하며 발생하는 위치와 범위도 다르며, 통상적으로 1만 명 중 한명 꼴로 발병하며 양쪽 눈에서 발병하는 경우는 1~2%이다. 혈관폐쇄가 일어나기 전에 일시적으로 한쪽 눈이 완전히 안보일 수 있고, 이후 혈관폐쇄가 나타나면 눈 앞에 먹구름이 낀 것처럼 캄캄해지며 90%이상에서 눈 앞의 손가락을 잘 구별할 수 없을 정도로 시력이 급격하게 저하된다.
- [61] 본 명세서에서 용어 "망막정맥폐쇄"는 눈에 있는 정맥혈관이 막혀 혈액순환장애가 발생해, 신생혈관이 생기고 출혈과 부종을 일으키는 질환을 의미한다. 폐쇄된 망막정맥의 위치에 따라 중심정맥폐쇄 또는 분지정맥폐쇄 등으로 구분하며, 대부분 통증 없이 한쪽 눈이 갑자기 잘 보이지 않으며, 입체시가 떨어진다. 시력은 무증상, 시야장애, 시력감소 등 다양하게 나타나고, 환자의 약 25%는 자연스럽게 시력이 돌아오지만, 나머지 환자들은 시력이 회복되지 않거나 더 떨어지는 경우도 있다.
- [62] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 VMD2 프로모터를 포함하는 가이드 RNA(Guide RNA) 및 Cas(CRISPR associated protein) 핵산분해효소를 포함하는, CRISPR/Cas 복합체를 제공한다.
- [63] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 가이드 RNA는 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor; VEGF)를 포함하는 것인, CRISPR/Cas 복합체이다.
- [64] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 혈관 내피 성장인자는 혈관 내피 성장 인자 A(Vascular endothelial growth factor A; VEGFA), 태반 형성 인자(Placental

growth factor; PGF), 혈관 내피 성장 인자 B(Vascular endothelial growth factor B; VEGFB), 혈관 내피 성장 인자 C(Vascular endothelial growth factor C; VEGFC), 저산소증 유발 인자 1-알파(Hypoxia-inducible factor 1-alpha; Hif1 α), 및 혈관 내피 성장 인자 D(Vascular endothelial growth factor D; VEGFD)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, CRISPR/Cas 복합체이다. 구체적으로는 혈관 내피 성장 인자 A일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [65] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CRISPR/Cas 복합체는 망막 색소 상피(Retinal pigment epithelium; RPE)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현을 특이적으로 억제하고, 신경망막(Neural retina; NR)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현은 억제하지 않는 것인, CRISPR/Cas 복합체이다.
- [66] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Cas 핵산분해효소는 Cas9, Cas12, Cas13, 및 Cas14로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, CRISPR/Cas 복합체이다.
- [67] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VMD2 프로모터를 포함하는 가이드 RNA(Guide RNA) 및 Cas(CRISPR associated protein) 핵산분해효소를 포함하는, CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [68] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 벡터는 아데노바이러스(Adenovirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스 관련 바이러스(Adeno-Associated Virus, AAV), 헤르페스 바이러스(Herpes simplex virus; HSV), 렌티바이러스(Lentivirus), 플라스미드(Plasmid), 및 리포솜(Liposome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 벡터이다.
- [69] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [70] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학 조성물이다.
- [71] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 약학 조성물이다.
- [72] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 약학조성물이다.
- [73] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [74] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 형질 전환체는 미생물, 세포, 또는 인간을 제외한 동물개체인, 형질 전환체이다.
- [75] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 제 12항의 형질전환체의 망막 내 혈관 발달 상태억제를 확인하는 단계;

- [76] (b) 상기 형질전환체에 혈관 발달 촉진 또는 억제용 후보물질을 투여하는 단계;
및,
- [77] (c) 상기 형질전환체의 망막 내 혈관 발달이 증가 또는 감소한 경우에 상기 후보 물질을 망막질환의 치료용 물질로 판단하는 단계;를 포함하는, 망막질환 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [78] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 방법이다.
- [79] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 방법이다.
- [80] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CRISPR/Cas 복합체를 투여해서 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [81] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 방법이다.
- [82] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 방법이다.
- [83] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 방법이다.
- [84] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터를 투여해서 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [85] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 방법이다.
- [86] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 방법이다.
- [87] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제조하기 위한 상기 CRISPR/Cas 복합체의 용도를 제공한다.
- [88] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 용도이다.
- [89] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 용도이다.
- [90] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 용도이다.
- [91] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제조하기 위한 상기 CRISPR/Cas 복합체를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

- [92] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 용도이다.
- [93] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 용도이다.
- [94] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 용도이다.

발명의 효과

- [95] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [96] (a) 본 발명은 CRISPR/Cas 복합체를 유효성분으로 포함하는, 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [97] (b) 본 발명은 안질환, 구체적으로 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발을 위한 연구로서, 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 유기체 모델 모두에서 RPE 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인하였다. 이를 이용하여, RPE 세포에 국한되어 유전자 편집(교정)이 가능할 것이며, 이는 RPE 세포와 연관된 다양한 유전성, 비유전성 안질환의 근본적인 치료에 크게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [98] 도 1은 pVMD2-SpCas9-E2A-mRFP-T2A-Puro 벡터의 도식 구성을 나타내며, 인간 VMD2의 -585 ~ +38에 위치한 623 bps 크기의 VMD2 프로모터는 CMV 프로모터를 대체하여 사용되었다.
- [99] 도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른, pCMV-SpCas9-RFP 및 pVMD2-SpCas9-RFP 생체 내 마우스 및 시험관 내 인간 망막 오가노이드의 발현 패턴을 나타내고, pCMV 벡터는 생체 내 마우스(도 2a 및 2b) 및 시험관 내 인간 망막 오가노이드(도 2e 및 2f) 모두에서 망막 색소 상피 및 신경 망막 모두에서 RFP를 발현한 반면, pVMD2 벡터는 생체 내 마우스(도 2c 및 2d) 및 시험관 내 인간 망막 오가노이드(도 2g 및 2h)에서 망막 색소 상피에서만 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein; RFP)을 발현하였다. 도 2a, 2c, 2e, 및 2g는 명시야 이미지를 나타내고, 도 2b, 2d, 2f, 및 2h는 형광 이미지를 나타낸다. 도 2a 내지 2d의 스케일 바는 100 μm 이고, 도 2e 내지 2h는 500 μm 이다.
- [100] 도 3은 본 발명의 일 실험예에 따른, pVMD2-SpCas9에 의한 망막 색소 상피 특이적 유전자 편집의 결과를 나타내는 것이다. 도 3a 및 3b는 pVMD2-SpCas9 및 마우스 *Vegfa* 또는 *Rosa26* 표적화 가이드 RNA(gRNA)를 발현하는 2개의 렌티바이러스의 망막하 주사를 수행하고, 망막 색소 상피 및 신경 망막(NR)에서 2개의 마우스 유전자의 생성된 삽입-결실(삽입 및 결실)을 조사하였다. 삽입결실 효율은

신경망막보다 망막 색소 상피에서 유의하게 더 높았다(Vegfa, $p=0.005$; Rosa26, $p < 0.001$). 도 3c는 pVMD2-SpCas9 및 인간 AAVS1 표적화 gRNA의 렌티바이러스가 망막 색소 상피 구체를 함유하는 인간 망막 오가노이드로 형질도입되었을 때, 삽입결실 효율은 신경망막 보다 망막 색소 상피에서 상당히 더 높았다($p = 0.016$). 도 3d는 신경망막에서 생성된 삽입결실과 비교하여 망막 색소 상피에서 생성된 삽입결실의 비율을 망막 색소 상피 특이성으로 정의하였다. pVMD2-SpCas9는 pCMV-SpCas9보다 유의하게 더 높은 망막 색소 상피 특이성을 나타냈다($p = 0.002$).

- [101] 도 4는 본 발명의 일 실험예에 따른, 망막 색소 상피 특정 *Vegfa* 절제는 맥락막 혈관신생을 효율적으로 퇴행시킴을 확인한 결과를 나타낸다. 도 4a 및 4b는 레이저 유도 CNV 마우스 모델에서 망막하 주사를 통한 gRNA 표적화 pVMD2-SpCas9/pCMV-SpCas9 및 마우스 *Vegfa*의 치료 효과를 평가할 때, gRNA를 표적으로 하는 pVMD2-SpCas9 및 *Vegfa*는 대조군과 비교하여 CNV를 유의하게 퇴행시켰으며 gRNA 및 애플리버셉트(Aflibercept)를 표적으로 하는 pCMV-SpCas9 및 *Vegfa*와 유사하였다. 스케일 바는 200 μm 이다. 도 4c는 망막 색소 상피에서 마우스 혈관 내피 성장인자 단백질의 양은 gRNA를 표적으로 하는 pCMV-SpCas9 및 *Vegfa* 및 gRNA를 표적으로 하는 pVMD2-SpCas9 및 *Vegfa*의 두 그룹 모두에서 대조군에 비해 유의하게 감소하는 것을 나타냈다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [102] 망막 색소 상피 복합체를 신경 망막에서 분리하고, 프로테아제 억제제(Quartett, Berlin, Germany)와 함께 120 μl 의 RIPA 완충액(Rockland immunochemicals, PA, USA)에서 용해시켰다. 마우스 혈관 내피 성장인자 단백질 수준은 제조업체의 지침에 따라, 마우스 혈관 내피 성장인자 Quantikine ELISA 키트(R&D Systems, 미국)를 사용하여 측정되었다.
- [103] 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현의 경우, 편재적으로 발현되는 Cas9 벡터인 pCMV-SpCas9-E2A-mRFP-T2A-Puro에서 CMV 프로모터는 망막 색소 상피(RPE) 특이적 프로모터인 인간 VMD2 프로모터로 대체되었다.

- [104] 실험결과, 두 모델 모두에서 pCMV 벡터는 망막 색소 상피 및 신경 망막에서 RFP를 발현한 반면, pVMD2 벡터는 망막 색소 상피에서만 RFP를 발현하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [105] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [106] 실시예
- [107] Cas9 및 가이드 RNA를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터 플라스미드의 구축

- [108] 623개의 염기쌍(base pairs) 크기의 인간 VMD2 프로모터 시퀀스(-585 ~ +38)는 전방 프라이머 5'-accggtATGGAATTCTGTC-3' 및 리버스 프라이머 5'-aaacttAGGTCTGGCCTACTAG-3' 로 증폭하여, HEK293T(ATCC, VA, 미국)의 게놈 DNA에서 얻었다. pCMV-Cas9-mRFP-Puro 벡터에서, pCMV는 적절한 제한 효소인 Mlu^o와 HIND III를 사용하여 pVMD2로 대체되었다. 렌티 바이러스 벡터를 만들기 위해 pVMD2-Cas9-mRFP-Puro 및 pCMV-Cas9-mRFP-Puro를 렌티 CRISPRv2(#52961, 애드진, 미국) 벡터로 서브클론하였다.
- [109] LentiGuide-Puro(#52963, 애드진, 미국) 벡터는 gRNA를 발현하기 위한 렌티 바이러스 벡터로 사용되었다. gRNA의 벡터 서브클론을 위한 표적 유전자 및 서열, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열 및 올리고뉴클레오티드는 표 1에 요약되어 있다. 마우스 *Vegfa*와 인간 *VEGFA*를 대상으로 하는 gRNA의 경우, 두 종 사이의 공통 염기서열이 선택되었다.

- [110] [표1]

Target gene	Target sequences	Forward oligo (5' to 3')	Reverse oligo (5' to 3')
<i>VEGFA</i> (human) & <i>Vegfa</i> (mouse)	CTCCTGGAAGA TGTCCACCA GG G	caccgCTCCTGGA AGATGTCCACC A	aaacTGGTGGACA TCTTCCAGGAGc
<i>AAVS1</i> (human)	GGGGCCACTAG GGACAGGAT TG G	caccgGGGGCCAC TAGGGACAGGA T	aaacATCCTGTCC CTAGTGGCCCCc
<i>Rosa26</i> (mouse)	GGCGGTCCTCA GAAGCCAGG AG G	caccgGGCGGTCC TCAGAAGCCAG G	aaacCCTGGCTTC TGAGGACCGCCc

- [111] 동물

- [112] 성체 C57BL/6J 마우스의 무게는 18-20g으로 8-10주령이다. 모든 마우스는 안과 및 시력 연구에서 동물 사용을 위한 시력 및 안과 연구 협회(ARVO) 진술에 따라 치료되었다. 모든 동물 실험은 연세대 의과대학(IACUC 번호: 2017-0239) 기관 동물 보호 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았다. C57BL/6 마우스는 12시간 빛, 12시간 어둠 사이클 하에서 유지되었다.

- [113] 렌티바이러스 생산

- [114] 렌티바이러스를 생산하기 위해 HEK293T 세포는 관심 유전자, psPAX2(#12260, Addgene) 및 pMD2.G(#12259, Addgene)의 플라스미드 혼합물(20 µg)과 함께 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000; 서모 피셔 사이언티픽, 미국)을 사용하여 4:3:1의 중량비로 전이되었다. 바이러스가 포함된 상층액(supernatant)는 최초 감염(전이) 후, 36시간 및 60시간에 수집되었고, Millex-HV 0.45 µm 저단백질 결합막(Millipore, 미국)을 통해 여과된 상층액은 비바스핀 20(Vivaspin 20; 독일 고텅겐

주 사르토리우스)에서 원심분리에 의해 농축되었다. 상기 높은 타이터(titer)를 얻기 위하여, 초원심분리(BECKMAN COULTER, 미국)를 2차적으로 24,000 rpm으로 4°C에서 2시간 동안 수행하였다. 초원심분리 후 상층액을 완전히 제거하고 바이러스 펠릿을 200 μ l PBS에서 4°C에서 밤새 보관 후, -80°C에서 저장하였다. 렌티바이러스 타이터는 제조사의 지침에 따라 뉴셀로스피프 RNA 바이러스 키트(일본 시가현 타카라)와 렌티엑스 qRT-PCR 적정 키트(일본 시가현 타카라)로 측정되었다.

[115] 망막하주입 및 생체내 맥락막신혈관신생화모델(Sub-retinal injection and in vivo choroidal neovascularization model)

[116] 8 내지 10주령의 마우스를 틸레타민(tiletamine)과 졸라제팜 (zolazepam)(1:1, 2.25mg/kg 체중)과 자일라진염산염 (xylazine hydrochloride)(0.7mg/kg 체중)의 혼합물을 복강 내 주사하여 마취하였다. 이후, 렌티바이러스 벡터에 포함된 Cas9과 gRNA를 수술 현미경(Leica Microsystems Ltd.)에서 33G 무딘 바늘(World Precision Instruments Inc.)이 있는 Nanofil 주사기를 사용하여 유리체내 주사하여 전달하였다. 이후 레이저를 이용하여 맥락막 신생혈관을 모델링하였다. 서브 망막 주입은 33 게이지 서브 마이크로리터 주입 시스템(World Precision Instruments, FL, USA)으로 수행되었다.

[117] *Vegfa* 또는 *Rosa26*을 대상으로 pVMD2-Cas9 또는 pCMV-Cas9 1 μ l와 gRNA 1 μ l로 구성된 8×10^{10} 바이러스 게놈(vg)/mL 중 2 μ l가 마우스 망막하 공간으로 전달되었으며, 렌티바이러스 도입 후 1주일 후, 532 nm 파장, 50 μ m 스폿 크기, 100 mW 전력, 100 ms 노출 시간 파라미터를 갖는 아르곤 레이저 시스템(NIDEK, CA, USA)에 의해 레이저 광응고(photocoagulation)를 사용하여 맥락막 신생혈관이 유도되었다. 출혈 없이 거품을 낸 화상만 분석에 포함되었고, 임상적으로 사용된 섬유소는 양성 대조군으로 CNV 유도과 동시에 생체 내에 주입되었으며, CNV 유도 후 1주일 후 조직을 채취하거나 CNV 크기를 평가하였다.

[118] 망막 오가노이드 분화 및 렌티바이러스 도입(Retinal organoid differentiation and lentivirus transduction)

[119] 망막 오가노이드는 인간 배아줄기세포(hESC)에서 분화되었으며, H9는 이전의 프로토콜에 따라 약간의 수정을 가하였다. 130-160일 분화 후, 망막색소상피(retinal pigment epithelium; RPE) 구체를 포함하는 망막 오가노이드가 형질도입 실험을 위해 선택되었다. 폴리브렌(미국 미주리주 시그마-알드리치)이 8 μ g/ml 함유된 LTR(Long-Term Retina) 배지 200 μ l에 각 오가노이드당 총 8×10^9 개(Cas9 관련, 4×10^9 및 gRNA 관련, 4×10^9)의 렌티바이러스를 형질도입하였다. LTR 배지는 형질도입 후 24시간에 300 μ l를 첨가하였고, 48시간 동안 배양한 후, 형질도입된 망막 오가노이드는 3X PBS에서 평균 다음 렌티바이러스 없이 LTR 배지에서 유지되었다. 렌티바이러스 형질도입 2주 후, 형광 영상을 분석하거나 세포를 수

확했고, 망막 색소 상피 구와 신경 망막은 망막 오가노이드에서 수동으로 분리되어 분석에 사용되었다.

[120] **마우스 망막의 면역조직화학과 혈관조영술(Immunohistochemistry and angiography of mouse retina)**

[121] 마우스 신경망막과 망막 색소 상피의 단면적 영상을 분석하기 위해 눈을 적출하고 각막을 뚫어 PBS에서 4% 파라포름알데히드 1시간 동안 눈을 고정시켰다. 고정된 눈은 PBS의 15% 수크로스(Sucrose)에 가라앉힌 후, 30% 수크로스에 평형을 유지함으로써 저온 보존되었다. 눈은 OCT 화합물에 박혀 있었고, 액체 질소에 의해 딱딱 얼어붙었다. 시료는 냉동고를 이용하여 7 μ m 두께로 절단하였고, 냉동절편 샘플은 1차 항체, 항-RFP 항체 및 2차 항체인 Alexa Fluor™ 594 항-토끼 IgG(인비트로젠, 미국)로 면역염색되었다.

[122] CNV의 크기를 평가하기 위해 FITC-텍스트란은 마우스 희생 5분 전에 정맥 주사로 주입되었다. 적출된 눈은 실온에서 4%의 파라포름알데히드에 1시간 동안 고정되었다. 망막 색소 상피 복합체(RPE/맥락막/공막)를 평면 장착하고, 형광 현미경(BX43, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. CNV 영역은 맹검 관찰자가 Image J 소프트웨어(NIH)를 사용하여 측정했으며, 눈당 평균 3-4개의 CNV 영역이 분석되었다.

[123] **타겟 딥 시퀀싱(Targeted deep sequencing)**

[124] 표적 딥 시퀀싱을 위해 표2에 나열된 특정 프라이머를 사용하여 게놈 DNA의 표적 및 표적 외 영역을 증폭하였다. 딥 시퀀싱 라이브러리는 PCR에 의해 생성되었고, TruSeq HT Dual Index 프라이머를 사용하여 각 샘플에 라벨을 붙였다. 풀링된 라이브러리는 HiSeq X(Illumina, CA, USA)를 사용하여 페어드 엔드 시퀀싱을 수행하였다. PAM 서열의 상류 3 bp 부위 주위의 삽입결실(indel)은 Cas9 활성으로 인한 돌연변이로 간주되었고, 삽입결실 빈도는 생물정보학 도구를 사용하여 계산되었다.

[125] [표2]

Target gene	PCR	
	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>VEGFA</i> (human)	ACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTGCCTCT CATGCAGTGGTGAA	GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTCCACC TGCATGGTGATGTTG
<i>Vegfa</i> (mouse)	ACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTCCACA CAGTGATCAAGTTC	GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTCTTCA TCGTTACAGCAGCCTG

AAVS1 (human)	ACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTGACCA CCTTATATTCCCAGGG	GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTGTGG GGGTTAGACCCAATATC
Rosa26 (mouse)	ACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTATCAGT AAGGGAGCTGCAGTG	GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTCAGA AGACTCCCGCCCATC
Vegfa (mouse) off target 1	ACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTGTGATC AGCTGACTTCCAGTTC	GTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTCTCCA CAACTCAAGTCCCATTAC

- [126] 마우스 혈관 내피 성장인자 효소면역측정법(Mouse VEGF ELISA)
- [127] 망막 색소 상피 복합체를 신경 망막에서 분리하고, 프로테아제 억제제(Quartett, Berlin, Germany)와 함께 120 μ l의 RIPA 완충액(Rockland immunochemicals, PA, USA)에서 용해시켰다. 마우스 혈관 내피 성장인자 단백질 수준은 제조업체의 지침에 따라, 마우스 혈관 내피 성장인자 Quantikine ELISA 키트(R&D Systems, 미국)를 사용하여 측정되었다.
- [128] 실험 결과
- [129] 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현의 경우, 편재적으로 발현되는 Cas9 벡터인 pCMV-SpCas9-E2A-mRFP-T2A-Puro에서 CMV 프로모터는 망막 색소 상피(RPE) 특이적 프로모터인 인간 VMD2 프로모터로 대체되었다. 인간 VMD2의 -585 ~ +38에 위치한 충분한 발현과 함께 가능한 한 짧은 623 bps 크기의 VMD2 프로모터 서열을 선택하였다(도 1).
- [130] 두 벡터의 발현 패턴은 RFP(적색 형광 단백질)의 형광에 의해 결정된 생체 외 마우스 모델 및 시험관 내 인간 망막 오가노이드를 테스트했으며, pCMV-SpCas9-E2A-mRFP-T2A-Puro(pCMV-SpCas9) 및 pVMD2-SpCas9-E2A-mRFP-T2A-Puro(pVMD2-SpCas9)를 발현하는 렌티바이러스는 망막 색소 상피 세포를 함유하는 인간 망막 오가노이드 및 망막하 주사를 통해 마우스 망막하 공간으로 형질도입되었다.
- [131] 두 모델 모두에서 pCMV 벡터는 망막 색소 상피 및 신경 망막(도 2a, 2b, 2e, 및 2f)에서 RFP를 발현한 반면, pVMD2 벡터는 망막 색소 상피에서만 RFP를 발현하였다(도 2c, 2d, 2g, 및 2h). pVMD2-SpCas9 및 마우스 *Vegfa* 또는 *Rosa26*을 표적으로 하는 gRNA를 발현하는 2개의 렌티바이러스를 망막하 주사한 후 표적 시퀀싱을 통해 망막 색소 상피 및 신경 망막(NR)에서 indel(삽입 및 결실)을 각각 조사하였다. 2개의 상이한 마우스 유전자를 표적으로 하는 gRNA의 경우, 삽입결실 빈도는 NR에서보다 망막 색소 상피에서 유의하게 더 높았다[NR 대 RPE, 평균 \pm 평균 표준 오차(S.E.M.); *Vegfa*, 0.25 \pm 0.03% 대 5.97 \pm 0.42%, p=0.005; *Rosa26*, 0.275 \pm 0.14% 대 4.27 \pm 0.43%, p < 0.001](도 3a, 및 3b). 전체 마우스 계통에서 *Vegfa* gRNA의 표적 서열과 1개 또는 2개의 염기 불일치가 있는 부위는 1개뿐이었고,

표적 덩 시퀀싱을 통한 분석에서는 그 부위에 대한 표적외 효과가 관찰되지 않았다. pVMD2-SpCas9 및 인간 AAVS1 표적화 gRNA를 인간 망막 오가노이드로 렌티바이러스 형질도입은 NR에서 $1.07 \pm 0.27\%$ 의 삽입결실을, 망막 색소 상피에서 $24.13 \pm 5.69\%$ 의 삽입결실을 보여주었다($p = 0.016$)(도 3c). NR에서 생성된 삽입결실과 비교하여 망막 색소 상피에서 생성된 삽입결실의 비율을 망막 색소 상피 특이성으로 정의하였고, pCMV-SpCas9 및 pVMD2-SpCas9에서 각각의 비율을 비교하였을 때 indel의 비율(RPE/NR)은 3.48 ± 0.93 이었다. pCMV-SpCas9의 경우 및 pVMD2-SpCas9의 경우 및 pVMD2-SpCas9의 경우 17.40 ± 2.41 은 유의하게 더 높은 망막 색소 상피 특이성을 나타냈다($p = 0.002$)(도 3d).

[132] 생체 내 마우스에서 레이저 유도 CNV를 퇴행시키는데, gRNA를 표적으로 하는 pVMD2-SpCas9 및 마우스 *Vegfa*의 치료 효과를 평가하였다. gRNA 및 pCMV-SpCas9 또는 pVMD2-SpCas9를 표적으로 하는 Rosa26은 PBS 주사의 음성 대조군과 비교하여 CNV 크기를 유의하게 감소시키지 않았다(CNV 크기, μm^2 , 평균 \pm S.E.M.; PBS, 17335 ± 1231 ; pCMV-Cas9 및 Rosa26 gRNA, 16517 ± 1007 , pVMD2-Cas9 및 Rosa26 gRNA, 15074 ± 1493). pVMD2-SpCas9 및 *Vegfa* 표적화 gRNA는 대조군(CNV 크기, μm^2 , 평균 \pm S.E.M., pVMD2-SpCas9 및 Rosa26 gRNA, 15074 ± 1493 대 pVMD2-SpCas9 및 *Vegfa* gRNA, $90,001 \pm 0.03159$)에 비해 CNV를 유의하게 퇴보시켰다. pCMV-SpCas9 및 *Vegfa* 표적화 gRNA 및 임상적으로 사용되는 유리체내 애플리버셉트(Aflibercept)(CNV 크기, μm^2 , 평균 \pm S.E.M.; pCMV-SpCas9 및 *Vegfa* gRNA, 8999 ± 971 ; Aflibercept, 9405 ± 890)와 유사하였다(도 4a).

[133] 망막 색소 상피에서 마우스 혈관 내피 성장인자 단백질의 양은 PBS 그룹과 비교하여 pCMV-SpCas9 및 *Vegfa* 표적화 gRNA 및 pVMD2-SpCas9 및 *Vegfa* 표적화 gRNA의 두 그룹 모두에서 PBS 그룹(mVEGF, pg/단백질 mg, 평균 \pm S.E.M.; pCMV-Cas9 및 *Vegfa* gRNA, 50.29 ± 14.93 , pVMD2-Cas9 및 *Vegfa* gRNA, 47.98 ± 7.553 , PBS, 172.5 ± 13.45 , $p < 0.001$) 두 그룹 간에 차이가 없었다(도 4b).

[134] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

[135] 본 발명은 안질환, 구체적으로 황반변성(Age-related Macular Disease; AMD)의 근본적인 치료를 위해, 치료해야 할 표적 세포를 타겟(target)할 수 있는 기술 개발로서, 인간 VMD2 프로모터 하에서 발현된 Cas9를 제작하여 망막 색소 상피(RPE) 특이적 발현을 유도하였으며, pVMD2-Cas9가 체내 마우스와 체외 인간 망막 오가노이드 모델 모두에서 RPE 세포에서 구체적으로 발현되고 작동됨을 확인하였다. 이를 이용하여, RPE 세포에 국한되어 유전자 편집(교정)이 가능할 것

이며, 이는 RPE 세포와 연관된 다양한 유전성, 비유전성 안질환의 근본적인 치료에 크게 이용될 것으로 기대된다.

서열목록 Free Text

- [136] 서열번호 1: *VEGFA* (human) & *Vegfa* (mouse) Forward oligonucleotides
 [137] caccgctcct ggaagatgc cacca
- [138] 서열번호 2: *VEGFA* (human) & *Vegfa* (mouse) Reverse oligonucleotides
 [139] aaactggtgg acatctcca ggagc
- [140] 서열번호 3: *AAVSI* (human) Forward oligonucleotides
 [141] caccgggggc cactaggac aggat
- [142] 서열번호 4: *AAVSI* (human) Reverse oligonucleotides
 [143] aaacatcctg tcctagtgg ccccc
- [144] 서열번호 5: *Rosa26* (mouse) Forward oligonucleotides
 [145] caccgggagg tcctcagaag ccagg
- [146] 서열번호 6: *Rosa26* (mouse) Reverse oligonucleotides
 [147] aaaccctggc ttctgaggac cgccc
- [148] 서열번호 7: *VEGFA* (human) Forward primer
 [149] acactcttc cctacacgac gctctccga tctgcctctc atgcagtgt gaa
- [150] 서열번호 8: *VEGFA* (human) Reverse primer
 [151] gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atctccact gcatggtgat gttg
- [152] 서열번호 9: *Vegfa* (mouse) Forward primer
 [153] acactcttc cctacacgac gctctccga tctccacac agtgatecaag ttc
- [154] 서열번호 10: *Vegfa* (mouse) Reverse primer
 [155] gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atctctcat cgttacagca gcctg
- [156] 서열번호 11: *AAVSI* (human) Forward primer
 [157] acactcttc cctacacgac gctctccga tctgaccacc ttatattccc aggg
- [158] 서열번호 12: *AAVSI* (human) Reverse primer
 [159] gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atctgtgggg gtagacca atacc
- [160] 서열번호 13: *Rosa26* (mouse) Forward primer
 [161] acactcttc cctacacgac gctctccga tctatcagta agggagctgc agtg
- [162] 서열번호 14: *Rosa26* (mouse) Reverse primer
 [163] gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atctcagaag actcccggcc atc
- [164] 서열번호 15: *Vegfa* (mouse) off target 1 Forward primer
 [165] acactcttc cctacacgac gctctccga tctgtgatca gctgactcc agttc
- [166] 서열번호 16: *Vegfa* (mouse) off target 1 Reverse primer
 [167] gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atctctccac aactcaagtc ccattac
- [168] 서열번호 17: Adaptor sequence Forward primer
 [169] acactcttc cctacacgac gctctccga tct

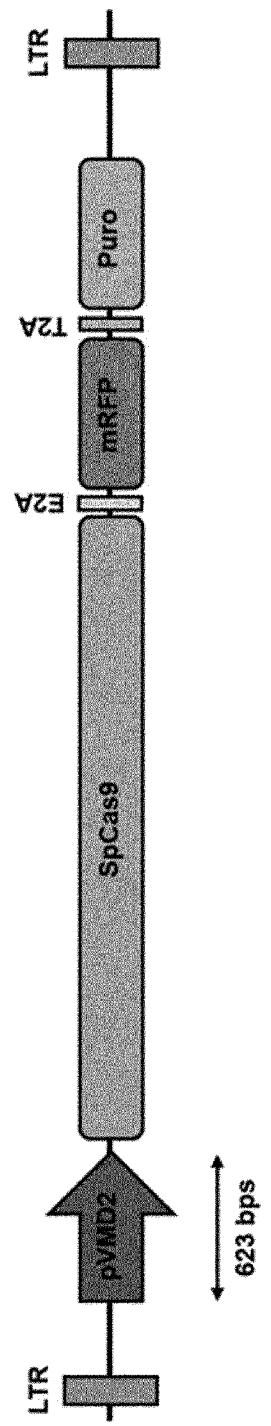
- [170] 서열번호 18: Adaptor sequence Reverse primer
[171] gtgactggag ttcagacgtg tgctttccg atct
[172] 서열번호 19: Target sequences of *Vegfa* (mouse) off target 1
[173] ctctggaag attttacca ggg

청구범위

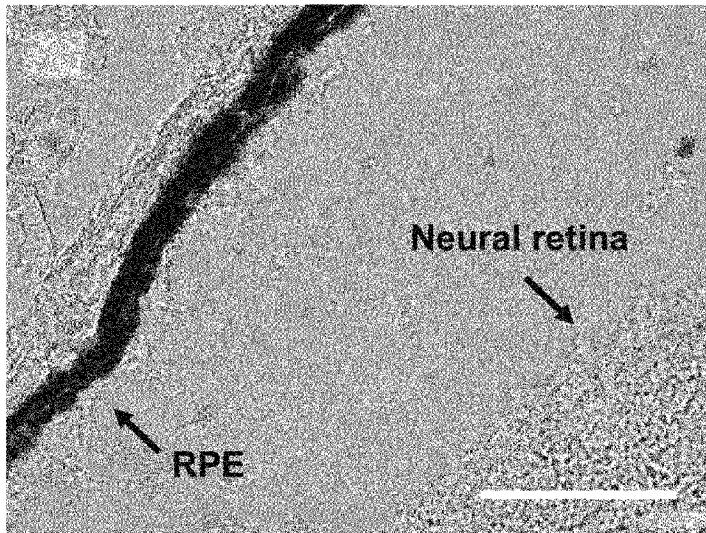
- [청구항 1] VMD2 프로모터를 포함하는 가이드 RNA(Guide RNA) 및 Cas(CRISPR associated protein) 핵산분해효소를 포함하는, CRISPR/Cas 복합체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 가이드 RNA는 혈관 내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor; VEGF)를 포함하는 것인, CRISPR/Cas 복합체.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 혈관 내피 성장인자는 혈관 내피 성장 인자 A(Vascular endothelial growth factor A; VEGFA), 태반 형성 인자(Placental growth factor; PGF), 혈관 내피 성장 인자 B(Vascular endothelial growth factor B; VEGFB), 혈관 내피 성장 인자 C(Vascular endothelial growth factor C; VEGFC), 저산소증 유발 인자 1-알파(Hypoxia-inducible factor 1-alpha; Hif1 α), 및 혈관 내피 성장 인자 D(Vascular endothelial growth factor D; VEGFD)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, CRISPR/Cas 복합체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 CRISPR/Cas 복합체는 망막 색소 상피(Retinal pigment epithelium; RPE)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현을 특이적으로 억제하고, 신경망막(Neural retina; NR)의 혈관 내피 성장 인자 유전자 발현은 억제하지 않는 것인, CRISPR/Cas 복합체.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 Cas 핵산분해효소는 Cas9, Cas12, Cas13, 및 Cas14로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, CRISPR/Cas 복합체.
- [청구항 6] 제 1항의 복합체를 포함하는 벡터.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 벡터는 아데노바이러스(Adenovirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스 관련 바이러스(Adeno-Associated Virus, AAV), 헤르페스 바이러스(Herpes simplex virus; HSV), 렌티바이러스(Lentivirus), 플라스미드(Plasmid), 및 리포솜(Liposome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 벡터.
- [청구항 8] 제 6항의 벡터를 유효성분으로 포함하는 망막질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서,

- 상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 11] 제 9항에 있어서,
상기 황반변성은 건성, 또는 습성인 것인, 약학조성물.
- [청구항 12] 제 6항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 형질 전환체는 미생물, 세포, 또는 인간을 제외한 동물개체인, 형질 전환체.
- [청구항 14] (a) 제 12항의 형질전환체의 망막 내 혈관 발달 상태억제를 확인하는 단계;
(b) 상기 형질전환체에 혈관 발달 촉진 또는 억제용 후보물질을 투여하는 단계; 및,
(c) 상기 형질전환체의 망막 내 혈관 발달이 증가 또는 감소한 경우에 상기 후보물질을 망막질환의 치료용 물질로 판단하는 단계;를 포함하는, 망막 질환 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 망막질환은 망막 내 혈관 생성 억제, 또는 혈관 손상에 의한 질환인 것인, 방법.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서,
상기 망막질환은 황반변성, 당뇨망막병증, 미숙아 망막병증, 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 및 기타 망막혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 방법.
- [청구항 17] 제 1항의 CRISPR/Cas 복합체를 투여해서 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 18] 제 6항의 벡터를 투여해서 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 19] 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제조하기 위한 제 1항의 CRISPR/Cas 복합체의 용도.
- [청구항 20] 망막질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제조하기 위한 제 6항의 벡터의 용도.

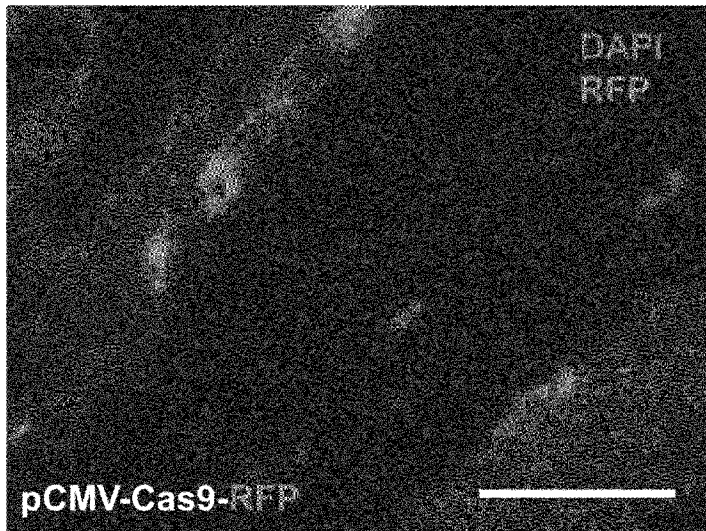
[도 1]



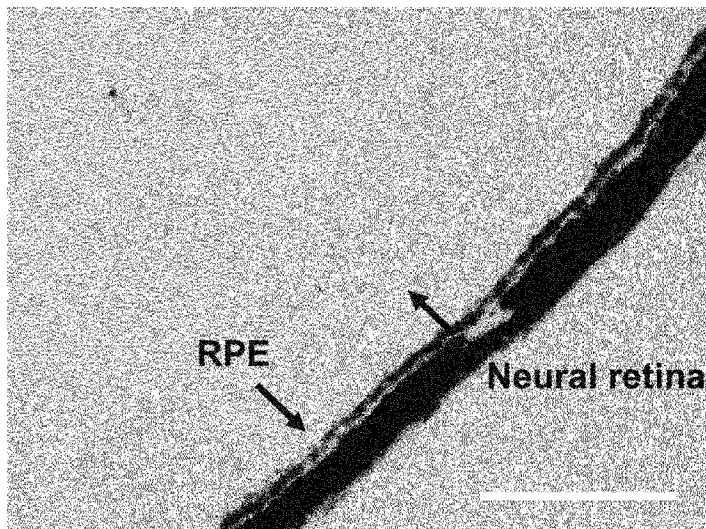
[도2a]



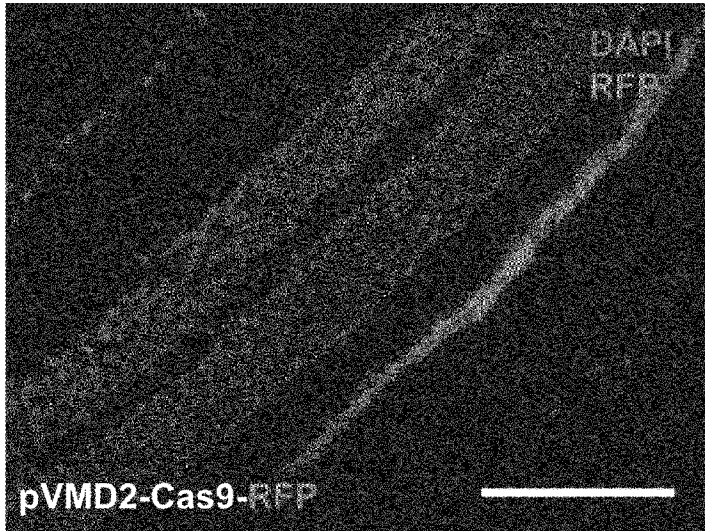
[도2b]



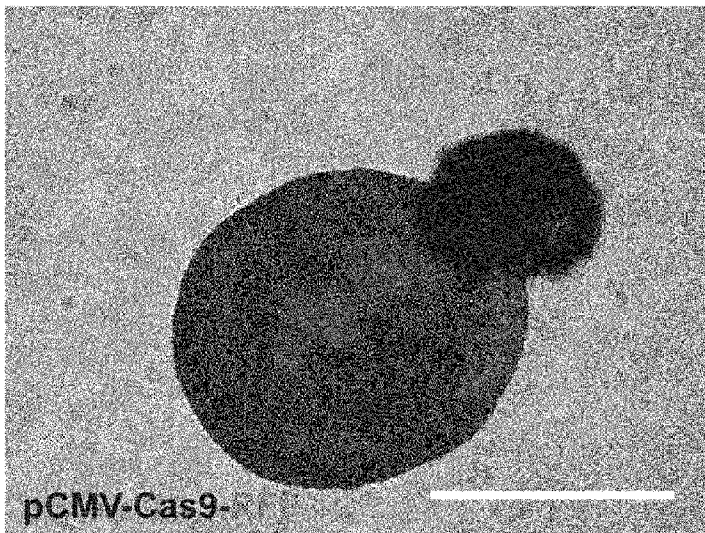
[도2c]



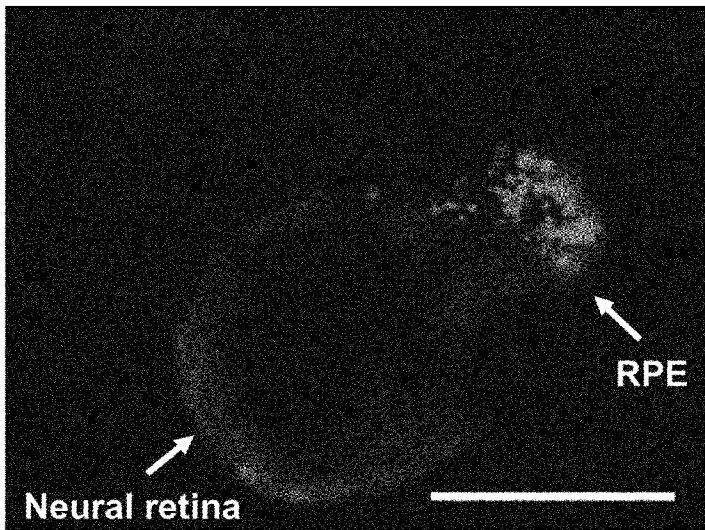
[도2d]



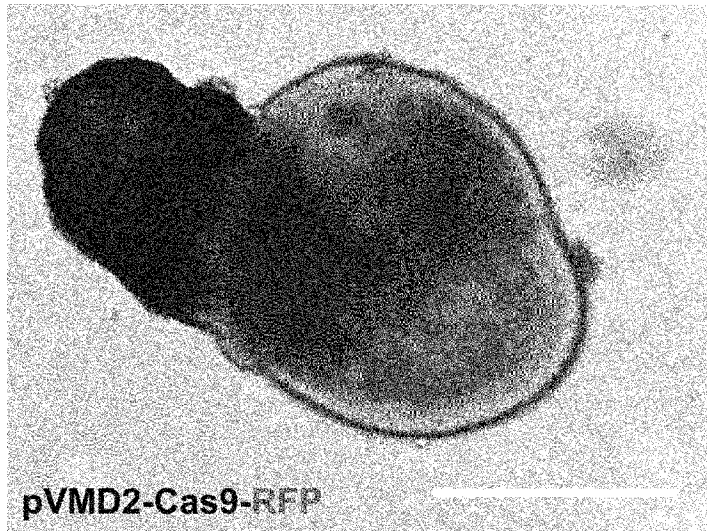
[도2e]



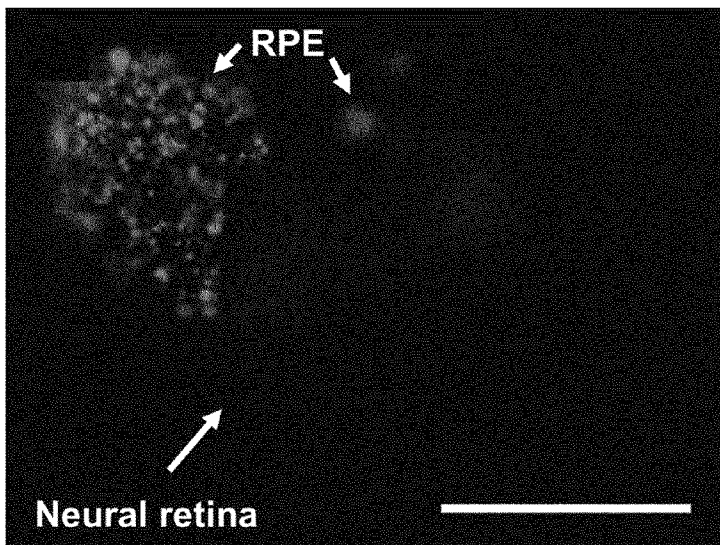
[도2f]



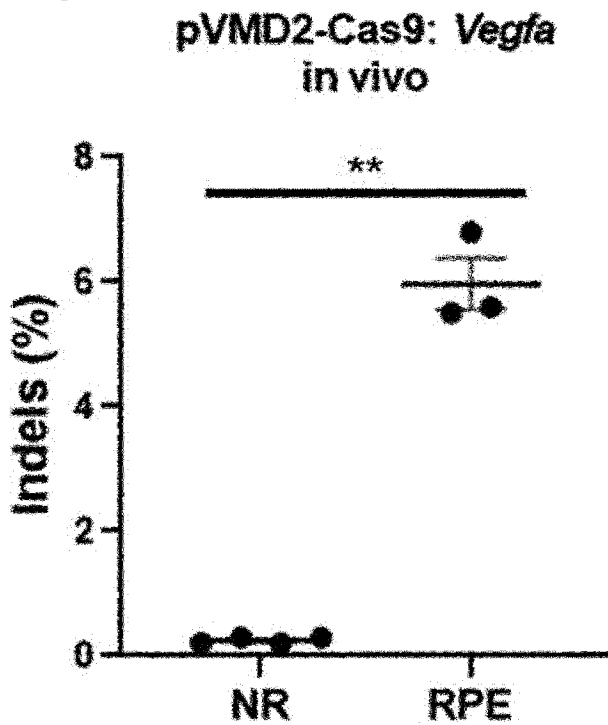
[도2g]



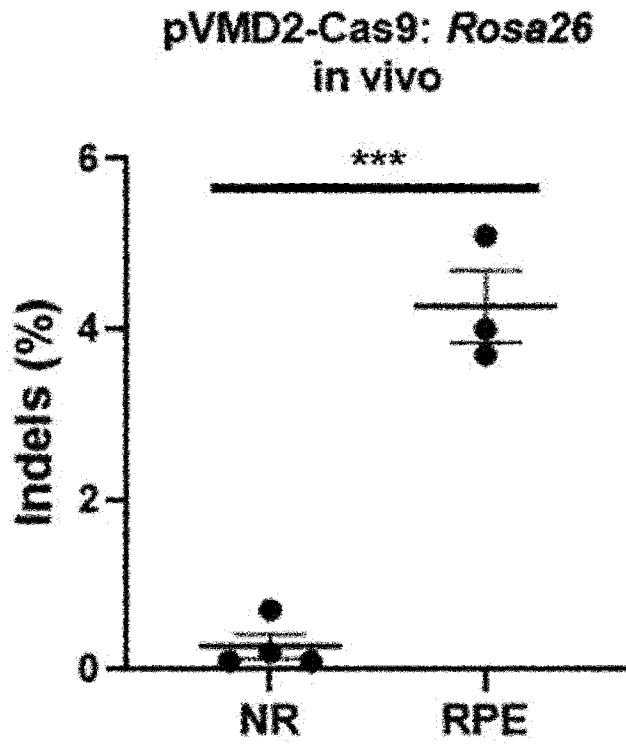
[도2h]



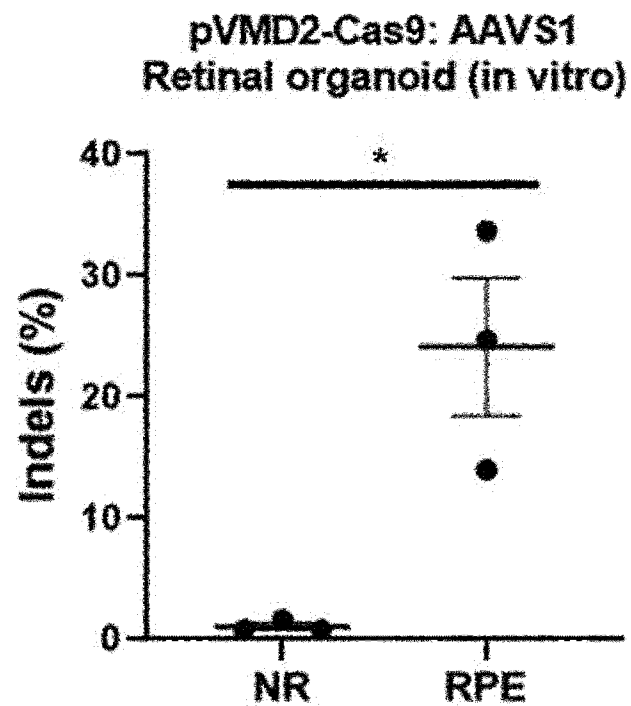
[도3a]



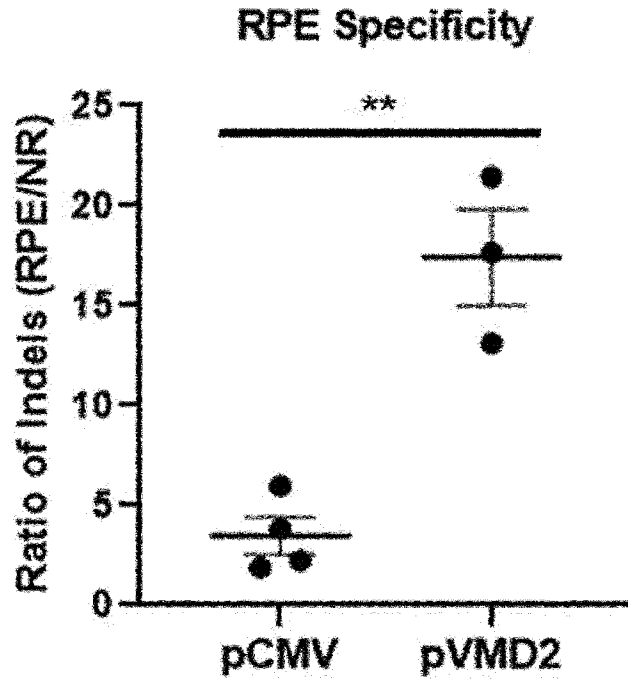
[도3b]



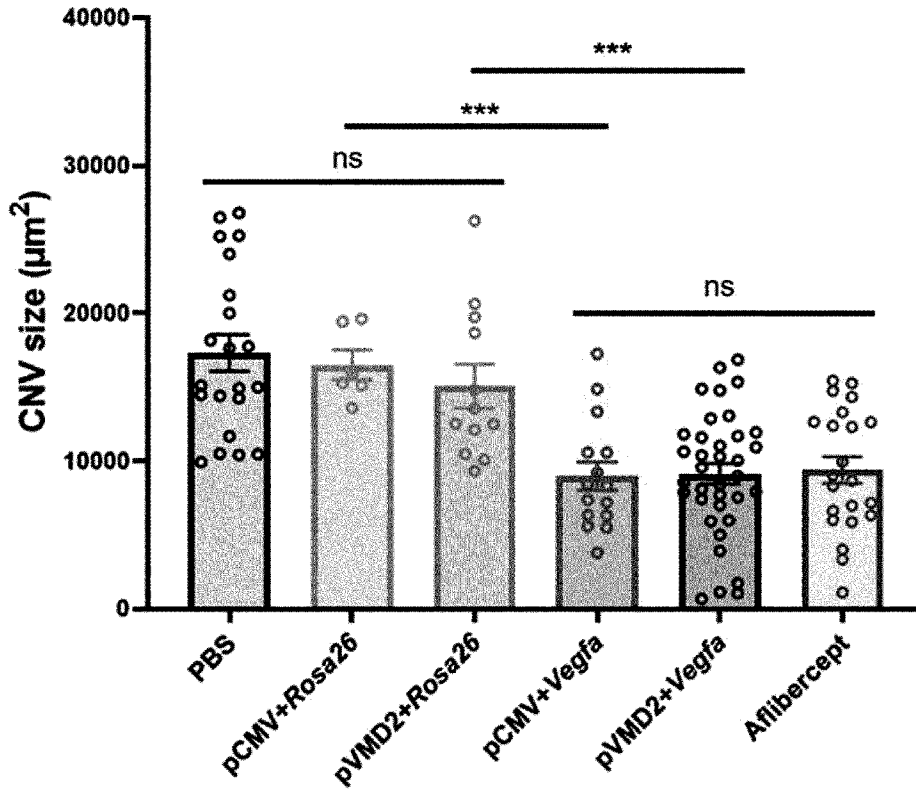
[도3c]



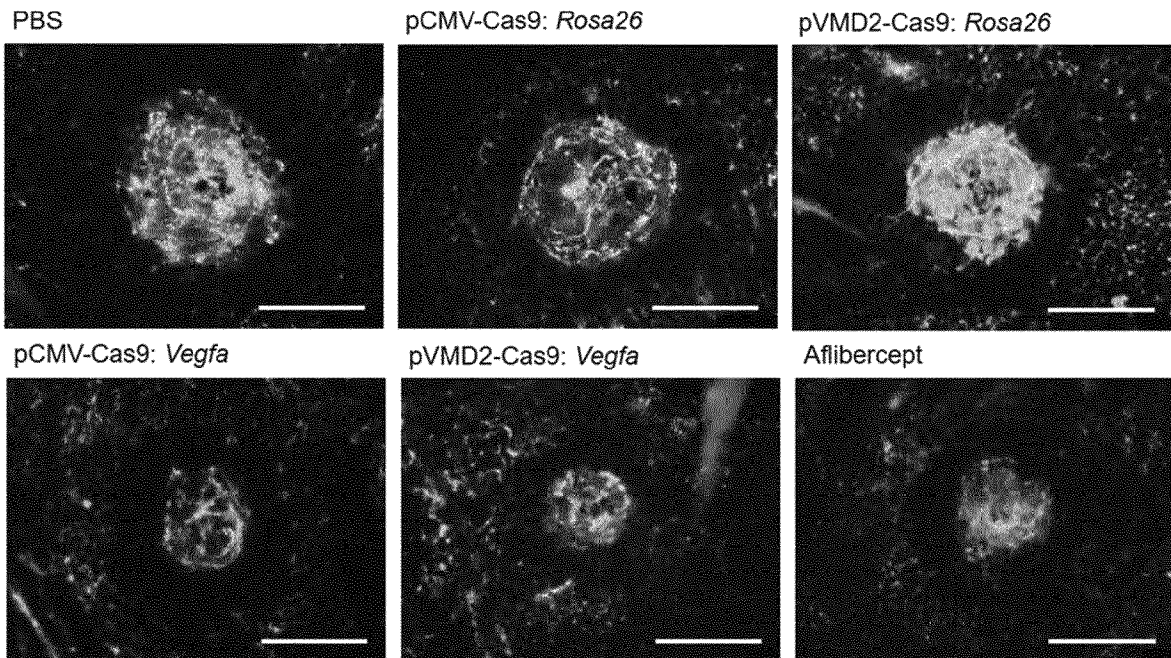
[도3d]



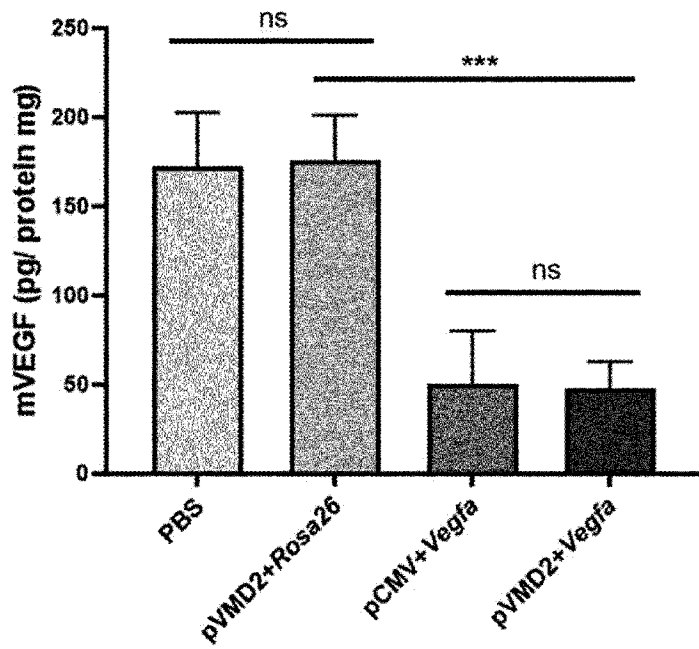
[도4a]



[도4b]



[도4c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/095023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(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) C12N 15/63(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 15/79(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12Q 1/6897(2018.01); G01N 33/50(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 가이드 RNA(Guide RNA), Cas(CRISPR associated protein), 핵산분해효소 (nuclease), 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor), 유전자 편집(genome editing), 벡터(vector), 망막(retina)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2020-0036912 A (REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LIMITED) 07 April 2020 (2020-04-07) See claims 1-7, 20-23, 103, 133, 142, 145-147, 149, 159 and 165; and paragraphs [0133], [0162] and [0266].	1,5-13,19,20
Y		2-4,14-16
Y	KR 10-1961332 B1 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE et al.) 22 March 2019 (2019-03-22) See claim 1; and paragraphs [0109]-[0111] and [0215]-[0229].	2-4,14-16
A	KR 10-2022-0022107 A (ABEONA THERAPEUTICS INC.) 24 February 2022 (2022-02-24) See entire document.	1-16,19,20
A	KR 10-2264829 B1 (KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES) 14 June 2021 (2021-06-14) See entire document.	1-16,19,20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2023		Date of mailing of the international search report 25 September 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/095023

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015-195621 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 23 December 2015 (2015-12-23) See entire document.	1-16,19,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/095023

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

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

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **17, 18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 17 and 18 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/095023

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0036912	A		07 April 2020	AU 2018-311504	A1		12 March 2020
				BR 112020001940	A2		18 August 2020
				CA 3071769	A1		07 February 2019
				CN 111630170	A		04 September 2020
				EP 3662066	A1		10 June 2020
				JP 2021-500917	A		14 January 2021
				MX 2020001340	A		31 August 2020
				SG 11202000840	A		27 February 2020
				TW 201920679	A		01 June 2019
				US 2020-0255859	A1		13 August 2020
				WO 2019-025984	A1		07 February 2019
KR 10-1961332	B1		22 March 2019	CN 109789185	A		21 May 2019
				EP 3492096	A1		05 June 2019
				JP 2019-522034	A		08 August 2019
				JP 6875500	B2		26 May 2021
				US 11123409	B2		21 September 2021
				US 2018-0078620	A1		22 March 2018
				WO 2018-021855	A1		01 February 2018
KR 10-2022-0022107	A		24 February 2022	AU 2019-391042	A1		10 June 2021
				BR 112021009913	A2		17 August 2021
				CA 3121177	A1		11 June 2020
				CN 113423434	A		21 September 2021
				EP 3890786	A1		13 October 2021
				JP 2022-515338	A		18 February 2022
				MX 2021006646	A		10 December 2021
				US 2022-0090129	A1		24 March 2022
				WO 2020-117898	A1		11 June 2020
KR 10-2264829	B1		14 June 2021	KR 10-2021-0063167	A		01 June 2021
WO 2015-195621	A1		23 December 2015	AU 2015-277369	A1		02 February 2017
				AU 2015-277369	B2		19 August 2021
				AU 2021-269446	A1		16 December 2021
				BR 112016029178	A2		17 October 2017
				CA 2952697	A1		23 December 2015
				CL 2016003247	A1		24 November 2017
				CN 106852157	A		13 June 2017
				CN 106852157	B		12 April 2022
				CN 114686483	A		01 July 2022
				DK 3155101	T3		04 May 2020
				EA 039693	B1		28 February 2022
				EA 201692510	A1		30 June 2017
				EP 3155101	A1		19 April 2017
				EP 3155101	B1		29 January 2020
				EP 3674408	A1		01 July 2020
				ES 2788426	T3		21 October 2020
				JP 2017-519500	A		20 July 2017
				JP 2021-052809	A		08 April 2021
				JP 6930834	B2		01 September 2021
				KR 10-2017-0020867	A		24 February 2017
				MX 2016016833	A		04 October 2017
MX 2020007078	A		09 September 2020				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/095023

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		SG 10202002486 A	29 April 2020
		SG 11201610405 A	27 January 2017
		US 10369234 B2	06 August 2019
		US 10406245 B2	10 September 2019
		US 10668173 B2	02 June 2020
		US 2016-0074535 A1	17 March 2016
		US 2018-0200388 A1	19 July 2018
		US 2018-0369420 A1	27 December 2018
		US 2019-0365928 A1	05 December 2019
		US 2020-0268907 A1	27 August 2020
		US 9907863 B2	06 March 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/63(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 15/79(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12Q 1/6897(2018.01); G01N 33/50(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 가이드 RNA(Guide RNA), Cas(CRISPR associated protein), 핵산분해효소(nuclease), 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor), 유전자 편집(genome editing), 벡터(vector), 망막(retina)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	KR 10-2020-0036912 A (리플렉션 바이오테크놀로지스 리미티드) 2020.04.07 청구항 1-7, 20-23, 103, 133, 142, 145-147, 149, 159, 165; 단락 [0133], [0162], [0266]	1,5-13,19,20 2-4,14-16
Y	KR 10-1961332 B1 (기초과학연구원 등) 2019.03.22 청구항 1; 단락 [0109]-[0111], [0215]-[0229]	2-4,14-16
A	KR 10-2022-0022107 A (아베오나 테라퓨틱스 인코퍼레이티드) 2022.02.24 전체 문헌	1-16,19,20
A	KR 10-2264829 B1 (한국원자력의학원) 2021.06.14 전체 문헌	1-16,19,20
A	WO 2015-195621 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2015.12.23 전체 문헌	1-16,19,20
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2023년09월25일 (25.09.2023)	2023년09월25일 (25.09.2023)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: **17, 18**
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
 청구항 17, 18은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. 청구항:
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0036912 A	2020/04/07	AU 2018-311504 A1	2020/03/12
		BR 112020001940 A2	2020/08/18
		CA 3071769 A1	2019/02/07
		CN 111630170 A	2020/09/04
		EP 3662066 A1	2020/06/10
		JP 2021-500917 A	2021/01/14
		MX 2020001340 A	2020/08/31
		SG 11202000840 A	2020/02/27
		TW 201920679 A	2019/06/01
		US 2020-0255859 A1	2020/08/13
		WO 2019-025984 A1	2019/02/07
KR 10-1961332 B1	2019/03/22	CN 109789185 A	2019/05/21
		EP 3492096 A1	2019/06/05
		JP 2019-522034 A	2019/08/08
		JP 6875500 B2	2021/05/26
		US 11123409 B2	2021/09/21
		US 2018-0078620 A1	2018/03/22
		WO 2018-021855 A1	2018/02/01
KR 10-2022-0022107 A	2022/02/24	AU 2019-391042 A1	2021/06/10
		BR 112021009913 A2	2021/08/17
		CA 3121177 A1	2020/06/11
		CN 113423434 A	2021/09/21
		EP 3890786 A1	2021/10/13
		JP 2022-515338 A	2022/02/18
		MX 2021006646 A	2021/12/10
		US 2022-0090129 A1	2022/03/24
		WO 2020-117898 A1	2020/06/11
KR 10-2264829 B1	2021/06/14	KR 10-2021-0063167 A	2021/06/01
WO 2015-195621 A1	2015/12/23	AU 2015-277369 A1	2017/02/02
		AU 2015-277369 B2	2021/08/19
		AU 2021-269446 A1	2021/12/16
		BR 112016029178 A2	2017/10/17
		CA 2952697 A1	2015/12/23
		CL 2016003247 A1	2017/11/24
		CN 106852157 A	2017/06/13
		CN 106852157 B	2022/04/12
		CN 114686483 A	2022/07/01
		DK 3155101 T3	2020/05/04
		EA 039693 B1	2022/02/28
		EA 201692510 A1	2017/06/30
		EP 3155101 A1	2017/04/19
		EP 3155101 B1	2020/01/29
		EP 3674408 A1	2020/07/01
		ES 2788426 T3	2020/10/21
		JP 2017-519500 A	2017/07/20
		JP 2021-052809 A	2021/04/08
		JP 6930834 B2	2021/09/01
		KR 10-2017-0020867 A	2017/02/24
		MX 2016016833 A	2017/10/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		MX 2020007078 A	2020/09/09
		SG 10202002486 A	2020/04/29
		SG 11201610405 A	2017/01/27
		US 10369234 B2	2019/08/06
		US 10406245 B2	2019/09/10
		US 10668173 B2	2020/06/02
		US 2016-0074535 A1	2016/03/17
		US 2018-0200388 A1	2018/07/19
		US 2018-0369420 A1	2018/12/27
		US 2019-0365928 A1	2019/12/05
		US 2020-0268907 A1	2020/08/27
		US 9907863 B2	2018/03/06