

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0075782
(43) 공개일자 2025년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0161960

(22) 출원일자 2023년11월21일

심사청구일자 2023년11월21일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

주식회사놀라바이오

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 305 (가좌동)

(72) 발명자

김재연

경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호 (가좌동, 센트럴웰가)

부반티엔

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 110동 1102호 (가좌동, 가좌그린빌주공아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

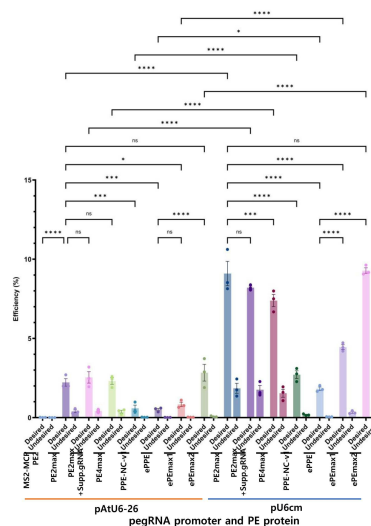
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 교정 정밀도가 향상된 프라임 에디팅 시스템 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 교정 정밀도가 향상된 프라임 에디팅 시스템 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 돌연변이 Cas9(R221K, N394K, D840A), 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNaseH 도메인이 결손된 mutant MMLV 역전사효소(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W)를 포함하는 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트; 및 U6 composite 프로모터에 의해 전사 조절되는 pegRNA (prime editing guide RNA) 발현 카세트;를 포함하는 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 재조합 벡터에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/1276 (2013.01)

C12N 9/22 (2025.05)

C12N 2310/20 (2025.05)

(72) 발명자

우엔티으언

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 116동 1102호
(가좌동, 가좌그린빌주공아파트)

김지혜

경상남도 밀양시 내일중앙길 26-9 (내일동)

우웬호아이 투

경상남도 진주시 가좌길29번길 63 경상대학교 가좌
캠퍼스 10동 416호 (가좌동)

송영중

경상남도 진주시 천수로298번길 10, 903호 (신안동, 대화리네르빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711174911
 과제번호 2022-주문연구창업-공공-SB1-01
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 (재단)과학기술일자리진흥원
 연구사업명 연구산업육성
 연구과제명 식물유전자교정기반 주문연구 서비스 및 BM 개발
 기 여 율 30/100
 과제수행기관명 (주)놀라바이오
 연구기간 2022.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181092
 과제번호 2021R1A5A8029490
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원
 연구과제명 향노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터
 기 여 율 5/100
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711182138
 과제번호 2022R1A2C3010331
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 세포간 이동 유전자가위 활용 in planta 유전자교정
 기 여 율 20/100
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395075476
 과제번호 PJ016867022022
 부처명 농촌진흥청
 과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
 연구사업명 차세대농작물신육종기술개발사업
 연구과제명 유전자와 특이적인 유전자교정 기술 개발(2공동)
 기 여 율 20/100
 과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
 연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183464
 과제번호 2020M3A9I4038352
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정
활용 원천기술 개발	
기 여 율	20/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345366491
과제번호	2020R1A6A1A03044344
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	식물생명공학연구소
기 여 율	5/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터 (Prime Editor) 발현 카세트; 및 프라임에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트;를 포함하는 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 돌연변이 Cas9 단백질은 R221K, N394K 및 D840A 돌연변이를 가지는 SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9)인 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV 역전사효소 단백질은 RNase H 도메인 결손외에 D200N, T306K, W313F, T330P 및 L603W 돌연변이를 추가로 가지는 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 프라임 에디터는 서열번호 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프라임 에디터 발현 카세트는 CaMV 35S 프로모터와 EURb7 터미네이터에 의해 발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 pegRNA 발현 카세트는 U6 composite 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 선택 마커 발현 카세트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법.

청구항 9

돌연변이 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터 (Prime Editor) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 생체 내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo)에서 표적 DNA 또는 유전자를 교정하기

위한 것을 특징으로 하는 프라임 에디팅용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅 시스템 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프라임 에디팅(Prime Editing, 프라임 편집)은 2019년 Anzalone 등(Nature 2019, 576, 149-157)에 의해 처음 설명된 CRISPR-Cas9 도구로서, 프라임 에디팅은 이중가닥 절단(double strand break, DSB)을 유도하지 않으며 모든 유형의 점 돌연변이, 삽입 및 삭제를 정확하게 교정할 수 있어, 인간 병원성 유전적 변이의 약 89%를 복구할 수 있는 잠재력이 있는 것으로 보고되었다.

[0003] 프라임 편집 기술에는 두 가지 주요 구성 요소가 필요한데, 첫 번째는 니카아제(nickase) Cas9 (nCas9)에 융합된 역전사 효소(reverse transcriptase)로 구성된 프라임 에디터(prime editor, PE) 단백질이고, 두 번째는 표적 위치로 PE를 가이드하고 원하는 교정을 위한 주형으로서 기능하는 프라임 에디터 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA)이다. pegRNA는 역전사 효소의 도킹 사이트 역할을 하는 PBS (primer binding site)와 원하는 교정 정보를 포함하는 RTT (reverse transcription template)로 구성되어 있다.

[0004] 프라임 에디팅은 HDR (homology-directed repair)보다 더 효과적인 것으로 나타났고, 염기 편집(Base Editing)과 비교하여 대상 범위가 더 크고 bystander 편집의 위험이 있는 대상에 대해 장점을 가지는 것으로 알려졌다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2022-0112698호에는 '교정 효율이 개선된 프라임에디팅용 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0075420호에는 'HIV 역전사효소 및 Cas9 또는 이의 변이체를 이용한 프라임 에디팅'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '교정 정밀도가 향상된 프라임 에디팅 시스템 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 다양한 프라임 에디터(Prime Editor) 구성 단백질 또는 조절인자들의 조합을 통해 의도된(desired) 편집의 정밀도(precision)를 향상시킬 수 있는 프라임 에디팅 시스템을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 돌연변이 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트; 및 프라임에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트;를 포함하는 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 돌연변이 Cas9 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임에디팅 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 교정 정밀도가 향상된 프라임 에디팅용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 사용하면 의도된 부위의 교정 정밀도(precision)를 향상시킬 수 있으므로, 유전자 치료 및 정밀 유전자 편집 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명에서 사용된 프라임 에디터(PE) 발현 카세트의 모식도이다. p35S: CaMV 35S promoter, nCas9max: mutant SpCas9(R221K, N394K, D840A), nCas9: mutant SpCas9(D840A), MMLV-RT: mutant MMLV reverse transcriptase(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W), MMLV-RT-△RNaseH: RNaseH domain truncated mutant MMLV reverse transcriptase(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W), MHL1dn: truncated MLH1 D754-756 lacking endonuclease domain, NC: viral nucleocapsid protein, EURb7: EU + Rb7 dual terminator, MCP-MMLV-RT: MS2 coat protein fused MMLV-RT (MCP was cloned from pREDIT_MCP-RecT, MMLV RT is a tobacco codon-optimized MMLV RT from the PE2).

도 2 및 도 3은 본 발명의 실시 예에서 사용된 프라임 에디팅용 재조합 벡터의 모식도로, 도 2는 U6-26 core 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터이고, 도 3은 U6 composite 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터이다. Supp.gRNA는 *ALS1* 프라임 편집을 위한 pegRNA의 근접 위치에 결합하여 프라임 에디팅 반응을 보조하는 gRNA를 의미하는 것으로 서열번호 45의 염기서열로 이루어져 있으며, 도 2 및 도 3에서 pegR1.6-MS2는 서열번호 46의 염기서열로 이루어져 있으며, pegR1.8은 Cas9 gRNA scaffold 서열(서열번호 45의 염기서열에서 92번째부터 177번째 염기에 해당)의 양 말단에 표 1의 서열번호 11 및 서열번호 12의 염기서열이 연결되어 이루어져 있다.

도 4는 도 2 및 도 3의 재조합 벡터를 이용한 프라임 에디팅의 교정 효율 분석 결과이다. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.0002$, ****: $p < 0.0001$.

도 5는 도 4의 결과를 바탕으로 프라임 에디터 시스템에 따른 프라임 에디팅의 교정 정밀도 분석 결과이다. **: $p < 0.0021$, ****: $p < 0.0001$.

도 6은 재분화된 식물체에서 의도된 프라임 에디팅의 빈도 및 효율을 분석한 결과이다. 그래프에서 y축 수치는 형질전환체(도 2 또는 도 3의 벡터로 형질전환된 떡잎 절편체로부터 재분화된 식물체 즉, PEO 이벤트를 의미)에서 표적 위치의 Sanger 시퀀싱에 의해 분석된 프라임 편집의 빈도(%)를 의미하고, 각 플랏의 상단에 표시된 수치는 식물 단계에서 의도된 프라임 편집의 효율을 의미하는 것으로, 의도된 프라임 편집을 수반하는 형질전환체의 수를 분석된 총 형질전환체 수로 나누어 계산하였다.

도 7은 일부 PEO 이벤트 식물체에서 레플리콘과 T-DNA의 존재 여부를 확인한 PCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돌연변이 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트; 및 프라임에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트;를 포함하는 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 제공한다.

[0013] 프라임 에디터(prime editor)는 CRISPR/Cas9에 기반을 둔 유전자가위 시스템의 일종으로, DNA 이중가닥 절단 없이 한 가닥의 DNA만 절단하여 유전자 변화를 도입할 수 있다. 상기 프라임 에디터는 Cas 니카아제(nickase)-역전사 효소(reverse transcriptase, RT) 융합 단백질 및 프라임에디팅 가이드 RNA (pegRNA)를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 프라임 에디팅의 효율을 향상시키기 위해 추가적인 도메인 또는 단백질이 상기 융합 단백질에 추가로 포함될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 용어 "pegRNA"는 표적 서열을 인식하는 가이드 서열(guide sequence 또는 spacer sequence), tracrRNA (trans-activating crisp RNA) 스캐폴드 서열, 역전사 개시에 필요한 프라이머 결합 부위(primer binding site, PBS) 및 원하는 유전적 변화를 포함하는 역전사 주형(reverse transcription template, RTT)을 포함한다. 또한, 상기 pegRNA는 pegRNA의 안정성을 향상시킬 수 있는 tevopreQ1 융합과 같은 변형된 형태도 포함될 수 있다.

[0015] 상기 pegRNA에서 가이드 서열은 표적 부위를 지정하는 가이드 RNA 내의 서열을 지칭하며, 표적 서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함한다. 상기 가이드 서열은 표적 DNA 서열과 혼성화하고, 표적 DNA 서열로의 유전자 편집 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

- [0016] 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 돌연변이 Cas9 단백질은 R221K, N394K 및 D840A 돌연변이를 가지는 SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV 역전사효소 단백질은 RNase H 도메인 결손 외에 D200N, T306K, W313F, T330P 및 L603W 돌연변이를 추가로 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 프라임 에디터는 서열번호 6의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0020] 또한, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.
- [0021] 상기 벡터는 바이러스, 코즈미드 또는 플라스미드 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포 등의 각종 목적하는 세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능 등이 작용할 수 있도록 하는 한 특별히 제한되지 않지만, 구체적으로 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "발현 카세트(expression cassette)"는 하나 이상의 유전자 및 이들의 발현을 조절하는 서열, 예를 들어 다양한 cis-작용 전사 조절 요소들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 발현 카세트는 하기의 세 가지 주요한 요소를 포함한다: i) 프로모터; ii) 상기 프로모터에 작동가능하게 연결되고 상기 발현 카세트가 세포 내로 도입되는 경우 상기 프로모터에 의해 그 전사가 지시되는 것인 "코딩 폴리뉴클레오티드(coding polynucleotide)" 또는 "코딩 서열(coding sequence)(코딩 유전자라고도 함)"로 지칭될 수 있는 제2 폴리뉴클레오티드; 및 iii) 전사의 종료를 지시하고 상기 제2 폴리뉴클레오티드의 바로 하류에 위치하는 종결자(terminator) 폴리뉴클레오티드(전사종결인자라고도 함).
- [0023] 상기 프로모터는 일반 프로모터로서 구성적 또는 유도성일 수 있고, 원핵세포의 경우에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터, 진핵세포의 경우에는 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들어 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 물로니 바이러스 프로모터, 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 인간 헤로글로빈 프로모터, 인간 근육 크레아틴 프로모터, 인간 메탈로티오네인 프로모터 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 프라임 에디터 발현 카세트는 CaMV 35S 프로모터와 EURb7 터미네이터(EU + Rb7 dual terminator)에 의해 발현이 조절되는 것일 수 있고, 상기 pegRNA 발현 카세트는 U6 composite 프로모터에 의해 전사가 조절되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 CaMV 35S 프로모터는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 EURb7 터미네이터는 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 U6 composite 프로모터는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 상기 프라임 에디팅용 재조합 벡터는 선택 마커 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 선택마커는 벡터가 도입되어 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로서, 약물 내성, 영양 요구성, 세포독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포

함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 대상 개체의 유전자 편집 방법에 있어서, 상기 재조합 벡터는 전술한 것과 같다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 편집 방법에 있어서, 상기 재조합 벡터의 도입은 대상 개체로의 형질전환을 의미한다. 상기 형질전환 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법, 하나한 방법(Hanahan, D, J Mol Biol, (1983) 166:557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀 매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한, 돌연변이 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질 및 RNase H 도메인이 결손된 돌연변이 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 단백질을 포함하는 프라임 에디터(Prime Editor) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 교정 정밀도(precision)가 향상된 프라임 에디팅용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에 따른 프라임 에디팅용 조성물은, 생체 내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo)에서 표적 DNA 또는 유전자를 편집하기 위한 조성물일 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 조성물은 표적 부위에서 의도된(desired) 교정의 정밀도를 향상시키는 것이 특징이다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실험방법

[0037] 1. PE 단백질 요소들의 조합 및 플라스미드 구축

[0038] 본 발명에서 사용된 PE 단백질의 생산을 위해 플라스미드 pCMV-PEmax-P2A-hMLH1dn (Addgene #174828)으로부터 PE2max와 PE4max, ePEmax1의 nCas9(H840A), ePEmax2, ePEmax3의 nCas9와 eRT를 클로닝하였다. PPE-NC-v1의 nCas9는 nCas9-PPE 플라스미드(Addgene #140445)로부터 클로닝하였고, NC 및 RT는 pH-ePPE 플라스미드(Addgene #183097)로부터 클로닝하였다. pH-ePPE 플라스미드로부터 ePPE를 클로닝하였고, pH-ePPE 플라스미드로부터 ePEmax1, ePEmax2, ePEmax3 및 PE2max-NC에서 사용된 NC 서열을 클로닝하였다.

[0039] 기본 PE 발현 카세트의 경우 CaMV 35S 프로모터(p35S) (Addgene #50267)와 EU + Rb7 이중 터미네이터(EURB7) (Diamos and Mason, 2018, Plant Biotechnol J. 16:1971-1982)를 사용하여 전사를 제어하였다. 프로모터의 영향을 평가한 실험의 경우 EU + 35S + Rb7 삼중 터미네이터 (t3T)와 함께 여러 프로모터 (p35S, 이중 CaMV 35S 프로모터(p2x35S) (Addgene #50269) 및 토마토 EF1 α (PSLEF1 α) (Niu et al., 2023, Plant Biotechnol J. 21:5-7)를 사용하였다. PE 효율성에 대한 터미네이터 영향을 평가하기 위해 p35S를 여러 터미네이터 (t35S, tNOS, EURB7, t3T)와 결합하였다.

[0040] 수정된 epegRNA는 변경된 SpCas9 스캐폴드에서 epegRNA의 스캐폴드에 기본 변경사항을 도입하여 설계되었다 (Nelson et al., 2022, Nat Biotechnol. 40:402-410). pegRNA의 전사를 구동하기 위해 U6-26 코어 프로모터 (pU6-26 core) 또는 U6 composite 프로모터(Jiang et al., 2020, Genome Biol. 21:257)를 사용하였다. 편집된 부위/loci, gRNA 및 RTT 정보는 표 1에 자세히 나와있다. pegRNA는 PCR로 증폭되어 발현 카세트에 클로닝된 후 골든 게이트 어셈블리에 의해 바이너리 벡터로 결합되었다.

[0041] T-DNA 기반 PE 도구의 경우 선택 마커(NPTII, Addgene #51144), PE 단백질 및 pegRNA의 발현 카세트를 pAGM4723 플라스미드(Addgene #48015)에 클로닝하였고, 제미니바이러스 복제 시스템을 사용한 경우 앞서 보고한 pLSL.R.Ly 벡터에 발현 카세트를 클로닝하였다(Vu et al., 2020, Plant Biotechnol J. 18:2133-2143). 모든 바이오 부품[pNOS::NptII::tOCS (from pICSL11024, Addgene Plasmid #51144), PE2max(서열번호 1), PE4max(서열번호 2), PPE-NC-v1(서열번호 3), ePPE(서열번호 4), ePEmax1(서열번호 5), ePEmax2(서열번호 6), 35S promoter(서열번호 7), EU + Rb7 double terminator (EURB7; 서열번호 8), U6-26 core promoter(서열번호 9), U6 composite promoter(서열번호 10)]은 Moclo(Weber et al., 2011) 레벨 0 플라스미드로 길들여지고 (domesticated) PE 단백질 조합 및 바이너리 벡터로 조립되었다.

표 1

[0042]

토마토 *ALS1* 유전자 프라이밍 편집을 위한 pegRNA 서열

Accession no.	<i>So1yc03g044330</i>
Targeted change	P186S: +1 C to T; +3 A to T
gRNA (5'-3')	CTATTACAGGTCAAGTGCCA (서열번호 11)
RTT + PBS* (5'-3')	CAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT (서열번호 12)
PBS: 밑줄 표시 서열	

표 2

PE 단백질 클로닝을 위해 사용된 프라이머 정보

서열번호	Primer	Sequence (5'-3')	PCR template	For cloning	Note
13	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	pCMV-PEmax-P2A-hMLH1dn	CDS1-PE2max, level 0 of Moclo system	PE2max
14	PEmax-Rev1	CATACGAAGACAAatcttcaatgttcagggtgcttcg			
15	PEmax-Fwd1	CAGTCGAAGACAAagatgagtatagactgcatgaataaag			
16	PE2max-R1	CATACGAAGACAAAAGCtagtcagcttcactctcttagcg			
13	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag		CDS1-PE4max, level 0 of Moclo system	PE4max
14	PEmax-Rev1	CATACGAAGACAAatcttcaatgttcagggtgcttcg			
15	PEmax-Fwd1	CAGTCGAAGACAAagatgagtatagactgcatgaataaag			
17	PE4max-Rev2	CATACGAAGACAAAtTggatcacctcgccggcgg			
18	PE4max-Fwd2	CAGTCGAAGACAAcaAagacctgccaatgcaataaagga			
19	PE4max-R1	CATACGAAGACAAAAGCttacacctctctttcttcttcgggc			
13	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag		CDS1n-nCas9max, level 0 of Moclo system	assembly of ePEmax1 and ePEmax2
20	nCas9max-R2	CATACGAAGACAACGAAccaccgctctcgaattcagagccgtcgg			
21	nC9PPE-F1	CAGTCGAAGACAAatgcctaagaaaaagagaaaagtgga	nC9S9-PPE	CDS1-nCas9-NC, level 0 of Moclo system	For assembly of PPE-NC-v1
22	nC9PPE-Rev3	CAGTCGAAGACAAatcactgtggcatggagagaacc			
23	nC9PPE-Fwd3	CAGTCGAAGACAgtgaatatcgtaaaaagacagaggt	pH-ePPE		
24	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAatcttccacgcgcttgttga			
25	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAAgataccaccgcacgctccc			
26	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacacctcttttcttctcgggc			
21	nC9PPE-F1	CAGTCGAAGACAAatgcctaagaaaaagagaaaagtgga	nC9S9-PPE	CDS1ns-ePPE, level 0 of Moclo system	ePPE
22	nC9PPE-Rev3	CAGTCGAAGACAAatcactgtggcatggagagaacc			
23	nC9PPE-Fwd3	CAGTCGAAGACAgtgaatatcgtaaaaagacagaggt	pH-ePPE		
27	ePPE-R2	CATACGAAGACAACGAACcaaggagggatgtttgtggc			
28	PPE-F1	CAGTCGAAGACAATTCGccaagaagaagcggaaggtg			
24	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAatcttccacgcgcttgttga			
25	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAagataccaccgcacgctccc			
26	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacacctcttttcttctcgggc			
29	eNCRT-F1	CAGTCGAAGACAATTCGccacagtgtgtccggccaa			
24	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAatcttccacgcgcttgttga		CT-NC-eRT, level 0 of Moclo system	For assembly of ePEmax1 and PPE-NC-v1
25	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAagataccaccgcacgctccc			
26	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacacctcttttcttctcgggc			
13	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	PE2max	CDS1-PE2max-NC, level 0	PE2max-NC
30	PEmax-Rev2	CATACGAAGACAAatggcgtcagcttcactcttagcgg			
31	NC-Fwd1	CAGTCGAAGACAAGccacagtgggtgccggccaa			

[0043]

표 3

PE 단백질 클로닝을 위해 사용된 프라이머 정보

서열번호	Primer	Sequence (5'-3')	PCR template	For cloning of Moclo system	Note
32	NC-R1	CATACGAAGACAAAAGCttaaaggaggatgtttgtggcc ttg	ePPE		
13	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	PE2max	CDS1-ePEmax3, level 0 of Moclo system	ePEmax3
33	PEmax-Rev3	CATACGAAGACAAAtggcgctctcgaattcagagccgtcg			
31	NC-Fwd1	CAGTCGAAGACAAgccacagtgggtgccggccaa	ePPE		
34	NC-Rev2	CAGTCGAAGACAAagggtaggcctagatctctcc			
35	PEmax-Fwd2	CAGTCGAAGACAAccctgaacattgaagatgagtatag			
36	ePE2max-Rev1	CATACGAAGACAAcagacaggggctgacggtcaggt	PE2max		
37	ePE2max-Fwd1	CAGTCGAAGACAAAtctggcggtctcaaaaagaaccg			
16	PE2max-R1	CATACGAAGACAAAAGCTTAGTCCAGTTCCTACTCT CTTAGCGG			

[0044]

[0046]

2. 아그로박테리움 매개 토마토 형질전환 및 프라임 에디팅 효율 분석

[0047]

토마토의 아그로박테리움 매개 변환은 Vu 등에 의해 설명된 대로 수행되었다. 본 발명에서는 GV3101::pMP90, EHA105 및 EHA105 기반 슈퍼아그로 버전 2(Nonaka et al., 2019, Front Plant Sci. 10:1204) 아그로박테리움 투메파시엔스 균주를 사용하였다. 토마토 식물체의 7일령 떡잎을 절개하고 형질전환에 이용하였다. PE 플라스미드를 함유하는 아그로박테리움은 배양하여 원심분리로 수확한 후 100 μ M 아세트시링곤을 보충한 ABM-MS 용액 (Vu et al., 2020)에 재현탁하여 OD_{600nm}이 0.8이 되도록 준비하였다. 아그로박테리아는 형질전환 전 28℃에서 1 시간 동안 배양함으로써 활성화되었다. 아그로박테리아와 떡잎을 혼합하여 실온에서 20분 동안 배양한 후, 형질 전환된 식물을 세척 전 2일 동안 공배양하여 선별 배지 상에 옮겼다. 샘플을 31℃에서 5일 동안 배양한 후 28℃에서 5일 동안 배양한 후 나머지 단계에서 25℃ 배양 조건을 적용하였다. 재분화된 신태를 80 mg/L 카나마이신이 포함된 배지에서 선별하고 토양으로 옮기기 전에 발근을 유도하였다. 이어 경화(hardened) 된 식물을 PE 효율 평가에 사용하였다. 온도 처리 실험을 위해, 공배양 후, 절편체(explant)를 다른 온도에서 5일 동안 배양한 후 28℃에서 5일 동안 배양한 후 후기 단계에서 25℃ 배양 조건으로 옮겼다.

[0048]

PE 효율을 평가하기 위해, 형질전환 후 16일(dpt)에 시료를 채취하여 표적 딥 시퀀싱(Targeted deep sequencing)을 실시하였으며, 모든 식물 생장 단계에서 형질전환체의 잎을 채취하여 PCR과 Sanger 시퀀싱을 이용하여 PE 대립 유전자를 스크리닝 하였다.

[0050]

3. Targeted deep sequencing

[0051]

게노믹 DNA (gDNA)는 CTAB 방법을 이용하여 떡잎 또는 식물체의 잎에서 추출하였다. 분석에는 MiniSeq 시퀀싱 서비스(MiniSeq™ System, Illumina, USA)를 이용하였다. MiniSeq 시료는 표 4에 기재된 프라이머를 활용한 3 번의 PCR을 통해 제조하였다. 세 번째 PCR은 제조사가 제공한 프라이머로 진행하여 시료 ID를 할당하였다. 이어서 MiniSeq 원시(raw) 데이터 FASTQ 파일은 표 5에 기재된 파라미터로 Cas-Analyzer (Park et al., 2016, Bioinformatics 33:286-288) 및 CRISPResso2 (Clement et al., 2019, Nat Biotechnol. 37:224-226) 도구를 이용하여 분석하였다.

표 4

[0052]

MiniSeq 시료 증폭을 위한 프라이머 정보

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
ALS-F1	CCTCACCATCTCCATGTTTCTC	38
ALS-R1	GTCTCAGCTCCTCACTTGATTG	39
ALS-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCTACAAATCTTGTAGTGGTCTTG	40
ALS-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GCTTCGTAATAGATCTCGTTACCTC	41

표 5

[0053] FASTQ 파일 분석에 사용된 파라미터

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
Reference sequence	GCTACAAATCTTGTAGTGGTCTTGCAGGATGCTTTGTAGATAGTATTCGATTGTTGCT ATTACAGGTCAAGTGCCAAGGAGGATGATTGGTACTGATGCGTTCCAGGAAACGCCTATT GTTGAGGTAACGAGATCTATTACGAAGCA	42
Donor (RGEN)	AGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTG	43
CRISPResso2 extension	3' CAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT	44

[0055] 4. PE 대립 유전자를 포함하는 형질전환체의 확인

[0056] 경화 단계 후 생존한 형질전환체에 대해 PE 대립 유전자 선별을 실시하였다. 각 식물체의 세 가지 다른 잎 조각을 수집하고 조합하여 CTAB 방법을 사용하여 gDNA를 분리하였다. PCR 반응은 표적 부위 옆에 있는 DNA 서열을 증폭하기 위해 사용되었으며 PCR 생성물은 Sanger 시퀀싱 방법에 의해 시퀀싱되었다. 결과적인 시퀀싱 크로마토그램은 PE 대립 유전자를 운반하는 잠재적인 이벤트를 선별하기 위해 ICE Synthgo 도구 (Conant et al., 2022, *Crispr J.* 5:123-130)에 의해 분석되었다. 일부 대표적인 PE 이벤트는 표적 딥 시퀀싱에 의해 후속적으로 검증되었다.

[0058] 5. PE 이벤트 내의 T-DNA 및 레플리콘 존재 유무 평가

[0059] T-DNA와 레플리콘의 유무를 평가하기 위해 PE 식물의 gDNA를 T-DNA의 오른쪽 경계(RB)에 명시된 프라이머 쌍과 레플리콘의 원형화된 형태를 사용하여 PCR 반응의 템플릿으로 사용하였다. 레플리콘 프라이머는 벡터로부터 방출되도록 구성된 원형화된 DNA만 증폭할 수 있는 방식으로 설계되었다(Vu et al., 2020). PCR 생성물은 1% 아가로스 겔에서 전개되었으며, T-DNA와 레플리콘에 각각 해당하는 크기의 PCR 밴드의 확인을 통해 T-DNA와 레플리콘의 존재 유무를 판단하였다.

[0061] 6. 표적이탈(off-target) 분석

[0062] pegRNA의 gRNA 시퀀스는 gRNA 시퀀스와 일치하지 않는 부분이 4개 미만인 토마토 게놈 데이터베이스 *Solanum lycopersicum*(SL2.4) 내의 잠재적 off-target 부위를 검색하기 위해 Cas-OFinder 도구를 사용하였다. 확인된 잠재적 off-target 부위를 가진 pegRNA로 변환된 16-dpt (day post transformation) 떡잎 절편체는 표 4에 나열된 프라이머를 사용하여 표적 딥 시퀀싱에 의해 분석되었다.

[0064] 7. 데이터 분석

[0065] 모든 실험은 최소 3배수로 수행되었다. 편집 결과, 해당 통계 분석 및 산점도는 MS Excel과 GraphPad Prism 9.0 소프트웨어를 사용하여 처리되었다. 수정되지 않은 Fisher's LSD 테스트를 사용하여 다중 비교를 실행하였다.

[0067] 실시예 1. 프라임 에디터 구성 단백질 조합 및 pegRNA 전사 조절 프로모터의 종류에 따른 교정 효율 및 정밀도 분석

[0068] 본 발명자는 토마토 *ALSI* 유전자를 표적으로 하는 다양한 프라임 에디터용 재조합 벡터(도 2 및 도 3)를 구축한 뒤, 이들 각각을 아그로박테리움을 매개로 하여 토마토 홍광 품종의 떡잎에 형질전환하였다. 그 후, 표적 부위의 NGS 분석을 통해 염기 교정 여부를 분석하였다.

[0069] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 U6-26 core 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터보다 U6 composite 프로모터에 의해 pegRNA의 전사가 조절되는 벡터 실험군에서 교정 효율이 현저히 우수한 것을 확인할 수 있었으며, 이 중 특히 PE2max와 ePEmax2의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 의도된 염기 교정이 가장 많

이 일어난 것을 알 수 있었다. 그러나, PE2max 프라임 에디터를 사용한 실험군은 의도되지 않은 편집의 비율이 ePEmax2 프라임 에디터를 사용한 실험군에 비해 현저히 높아, 프라임 에디팅 정밀도는 ePEmax2 프라임 에디터를 사용한 실험군이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0071] 실시예 2. 프라임 에디팅 재분화 식물체 내의 의도된 편집 빈도 및 효율 분석

[0072] 상기 실시예 1을 통해 획득한 토마토 *ALS1* 유전자가 교정된 캘러스로부터 식물체를 재분화한 뒤 재분화된 식물체에서 의도된 프라임 편집의 여부를 재확인하였다. 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 식물 단계에서도 pegRNA 전사 조절 프로모터가 U6 composite 프로모터일 때 U6-26 core 프로모터보다 의도된 프라임 편집 효율이 전반적으로 높은 것을 확인할 수 있었으며, ePEmax2 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 의도된 프라임 편집 효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.

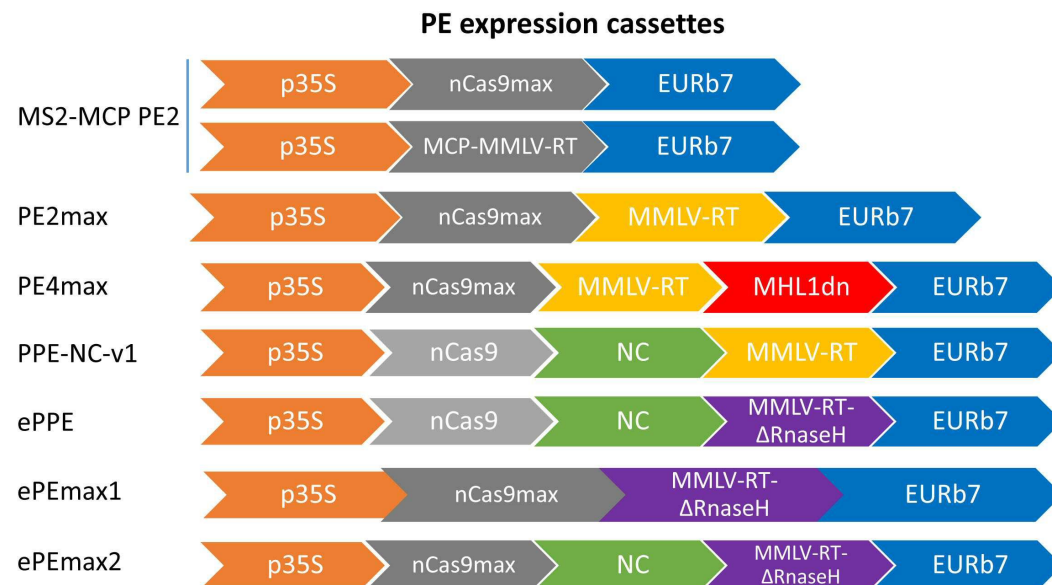
[0074] 실시예 3. 프라임 에디팅 이벤트 식물체에서 T-DNA 및 레플리콘 존재 유무

[0075] 상기 실시예 1을 통해 획득한 토마토 *ALS1* 유전자 프라임 에디팅 식물체 내의 T-DNA 및 레플리콘의 존재 유무를 PCR을 통해 확인하였다. 프라이머는 한국등록특허 제2074744호에 개시된 것과 동일한 것을 사용하였다.

[0076] 분석 결과, 일부 PE0 이벤트 식물체에서 T-DNA와 레플리콘이 확인되지 않는 것을 확인할 수 있었으며(도 7), 이들 개체들을 세대 진전하였다.

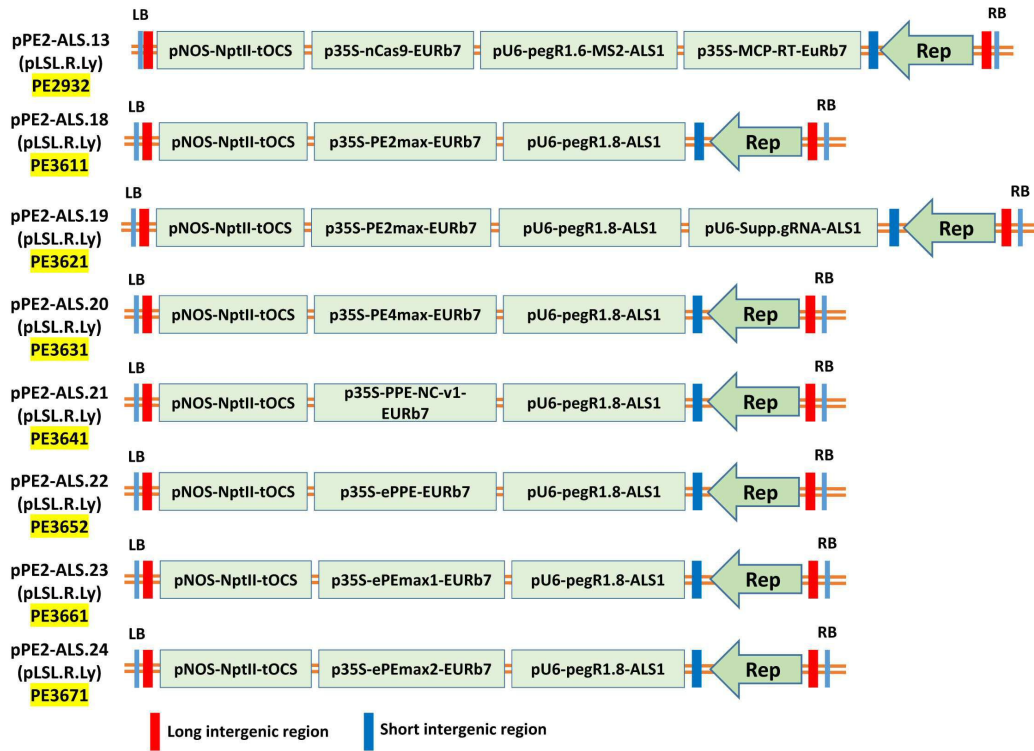
도면

도면1



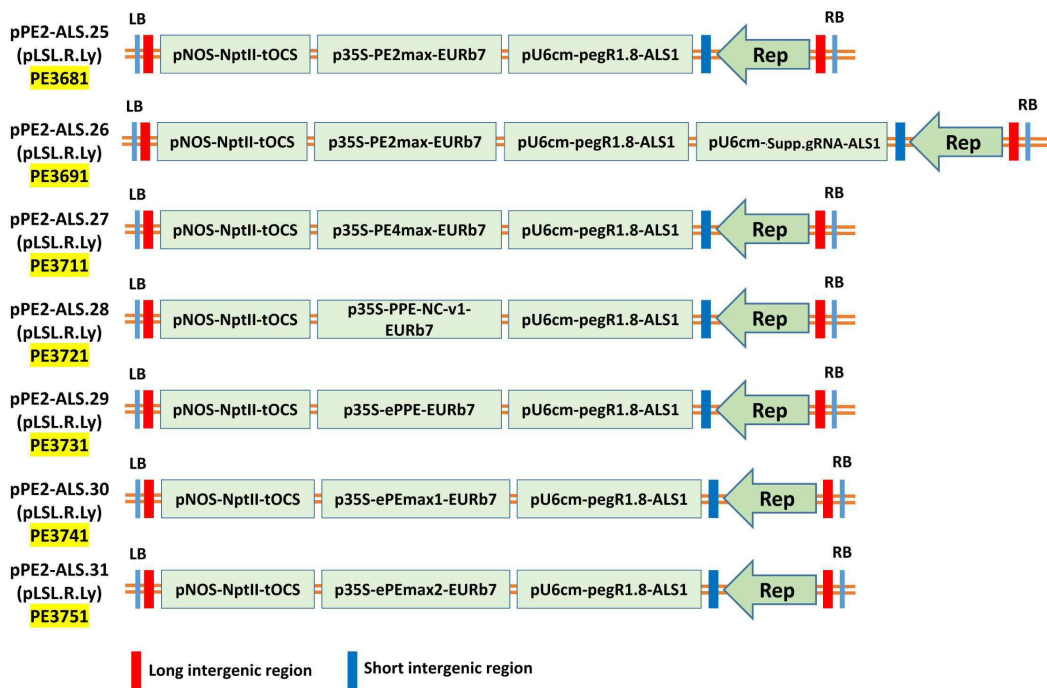
도면2

Map of binary vectors with U6-26 core promoter used in the experiment

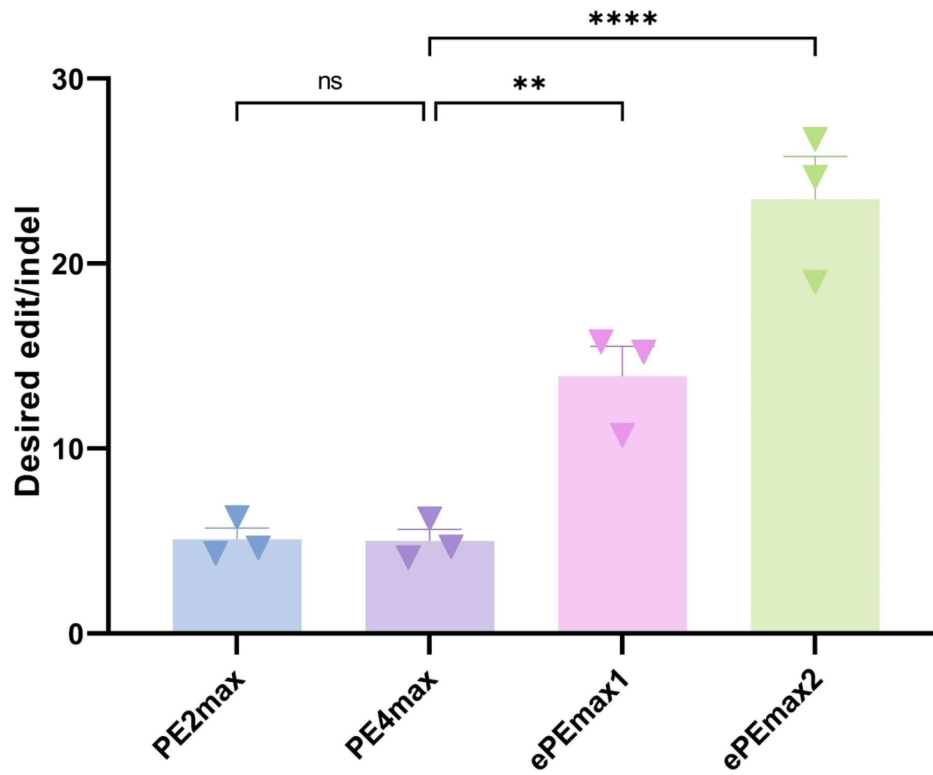


도면3

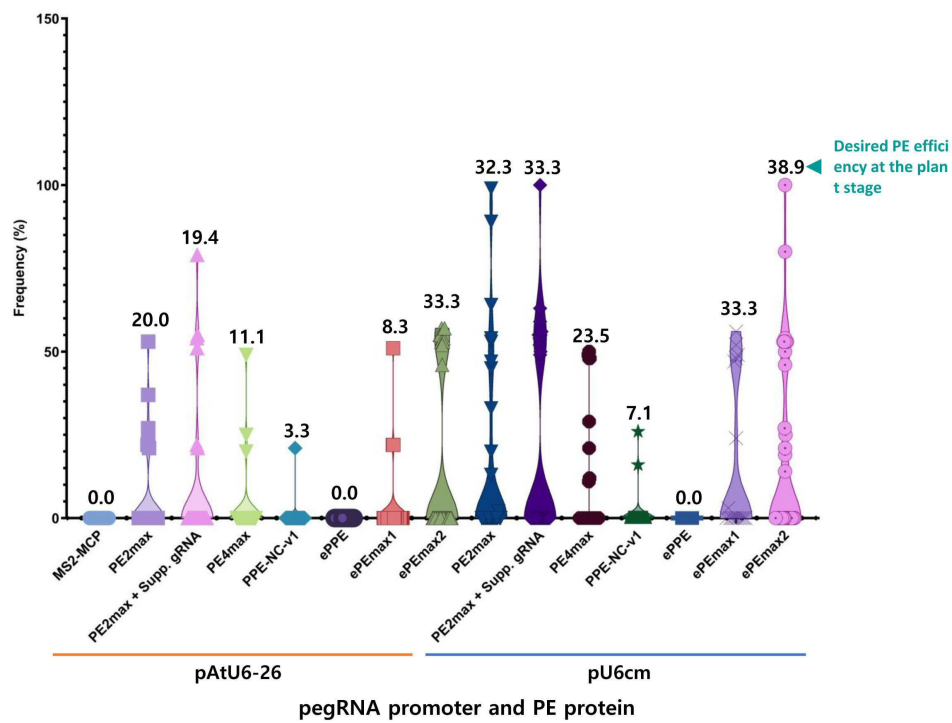
Map of binary vectors with U6cm promoter used in the experiment



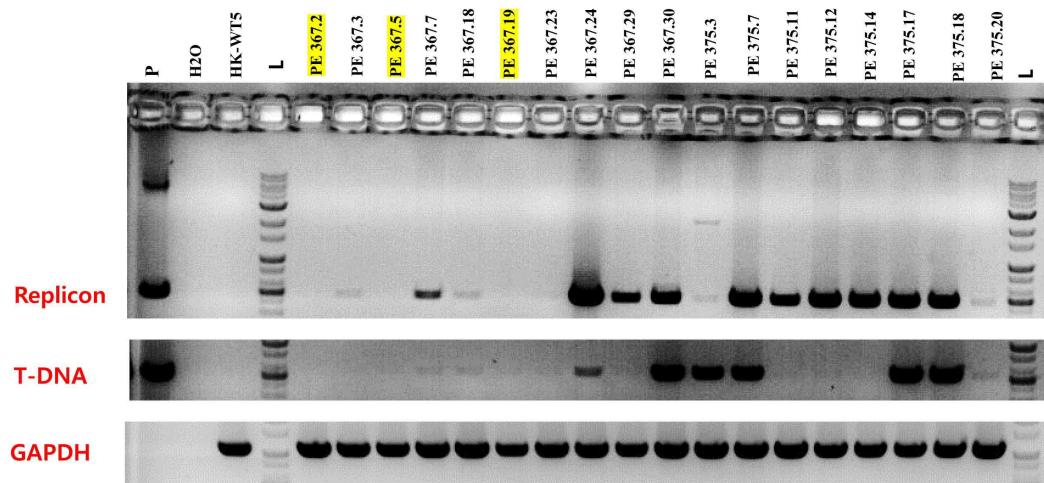
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.