



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0065515
(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0151239
(22) 출원일자 2023년11월03일
심사청구일자 2023년11월03일

(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)
(가좌동에 계속)
(74) 대리인
최규환

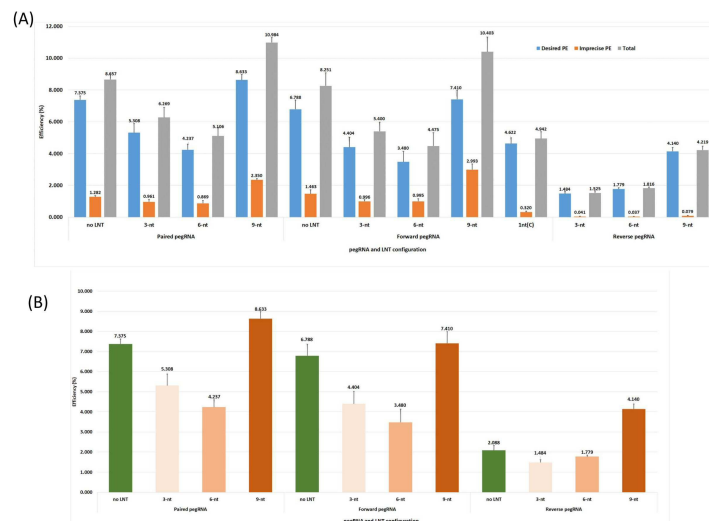
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 5' flap 절단에 유리한 변형된 pegRNA 및 상기 변형된 pegRNA를 이용한 프라임 에디팅 효율 증진 방법

(57) 요약

본 발명은 5' flap 절단에 유리한 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA) 및 상기 변형된 pegRNA를 이용한 프라임 에디팅 효율 증진 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 RTT (reverse transcription template) 서열의 5' 상류에, Cas9 니카아제(nickase)에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오티드를 추가한 변형된 pegRNA 및 이를 포함하는 유전자 교정용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 변형된 pegRNA는 의도된(desired) 편집 서열이 포함되지 않은 내생의 5' DNA flap의 절단을 증가시켜 프라임 에디팅 효율을 증진시키는 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 9/22 (2025.05)

C12N 2310/20 (2025.05)

(72) 발명자

김지혜

경상남도 밀양시 내일중앙길 26-9 (내일동)

송영중

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

우엔티으언

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

우웬호아이 투

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

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

RTT (reverse transcription template) 서열의 5' 상류에, Cas9 니카아제(nickase)에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오티드를 추가한 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변형된 pegRNA는 3'에서 5' 방향으로, PBS (primer binding site); RTT; 및 Cas9 니카아제에 의해 생성된 내생의 5' 오버행 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오티드; tracrRNA (trans-activating crisper RNA) 스캐폴드 서열; 및 표적 서열을 인식하는 스페이서 서열(spacer sequence)이 순차적으로 연결된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 변형된 pegRNA.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변형된 pegRNA는 의도된(desired) 편집 서열이 포함되지 않은 내생의 5' DNA 플랩(flap)의 절단을 증가시켜 프라임 에디팅 효율을 증진시키는 것을 특징으로 하는 변형된 pegRNA.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA); 및 프라임 에디터(Prime Editor, PE);를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 변형된 pegRNA는 단일 또는 paired 형태인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 프라임 에디터는 PE1, PE2, PE3, PE3b, PE4, PE5 및 PEmax로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제4항의 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임 에디터(Prime Editor, PE) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 유전자 편집용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 프라임 에디터는 PE1, PE2, PE3, PE3b, PE4, PE5 및 PEmax로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전자 편집용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 생체 내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo)에서 표적 DNA 또는 유전자를 편집하기 위한 것을 특징으로 하는 유전자 편집용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 5' flap 절단에 유리한(favorable) 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA) 및 상기 변형된 pegRNA를 이용한 프라임 에디팅(Prime editing) 효율 증진 방법에 관한 것이다.

배경기술

[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. 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) 단백질 이고, 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.

[0003] 프라임 에디팅의 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. PE/pegRNA 복합체가 표적 DNA에 결합하고 nCas9는 PAM 서열을 포함하는 가닥을 니킹한다. 그 후, pegRNA의 PBS가 니킹에 의해 발생된 3' flap에 혼성화되고, 역전사 효소는 PAM 서열을 포함하는 가닥의 확장을 시작하고 RTT를 주형으로 사용하여 원하는 편집을 만들어낸다. 이 과정은 두 개의 경쟁적인 중간 flap을 생성하는데, 의도된 편집이 포함된 3' flap과 의도된 편집이 포함되지 않은 원래 시퀀스가 있는 5' flap이다. 열역학적으로, 편집되지 않은 완벽한 상보적인 5' flap이 통합에 선호될 가능성이 있으나, 지연가닥(lagging-strand) DNA 합성 중에 발생하는 FEN1 (Flap structure-specific endonuclease 1)과 같은 효소는 5' flap을 기질로서 선호하기 때문에, 5' flap의 분해 및 3' flap의 통합을 유도한다. 마지막으로, 결과적인 이중 이종(heteroduplex) DNA 가닥이 분해되고, 원하는 편집은 내인성 DNA 복구 메커니즘에 의해 표적 DNA의 양가닥에 통합된다. 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 우수하였다.

[0004] 여러 연구를 통해 pegRNA의 3' 말단의 결합 안정도가 프라임 에디팅 효율의 주요 인자인 것으로 밝혀졌다. 김 등(Nat. Biotechnol. 2021, 39, 198-206)은 표적 DNA에 대한 pegRNA의 안정적인 결합을 이끄는 PBS의 높은 GC 함량 및 GC 개수가 프라임 에디팅 효율을 위한 가장 중요한 특징 중 하나이며, 다른 표적 자리에 대한 pegRNA 디자인에 영향을 미친다고 보고하였다. 또한, Nelson 등(Nat. Biotechnol. 2022, 40, 402-410)은 pegRNA의 3' 말단의 분해에 의한 PBS의 손실은 프라임 에디팅의 효율을 저해할 수 있을 것으로 가정하였다. 그래서, 연구진은 pegRNA의 3' 말단을 3' 말단의 분해를 막고 안정성을 증가시키는 구조화된 RNA 모티프(evopreQ1 또는 mpknot)를 결합시켰다. 조작된 pegRNA (engineered pegRNA, epegRNA)는 다양한 세포 유형에서 InDel 비율의 증가 없이, 프라임 에디팅의 효율을 상용화된 PE3와 비교하여 3~4배 증가시켰다. 유사하게, Zhang 등(Nat. Commun. 2022, 13, 1856)은 3' 말단 분해를 방지하기 위해 pegRNA에 바이러스 유래의 exoribonuclease-resistant RNA (xrRNA) 모티프를 결합시켰으며, 비슷한 전략으로 Li 등(J. Mol. Cell Biol. 2022, 14, mjac022)은 pegRNA의 3' 말단에 human telomerase RNA (hTR) G-quadruplex 변형을 추가하기도 하였다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2022-0112698호에는 '교정 효율이 개선된 프라임에디팅용 조성물'이 개시되어 있고, 미국 공개특허 제2022-0356469호에는 'Methods and compositions for prime editing nucleotide sequences'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '5' flap 절단에 유리한 변형된 pegRNA 및 상기 변형된 pegRNA를 이용한 프라임 에디팅 효율 증진 방법'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 pegRNA (prime editing guide RNA)의 3' 말단 RTT (reverse transcription template) 서열의 5' 상류에 Cas9 니카아제(nickase)에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합하는 뉴클레오티드를 추가하여 변형된 pegRNA를 제작하였다. 그 후 상기 변형된 pegRNA를 이용하여 프라임 에디팅을 수행한 결과, 변형되지 않은 pegRNA를 이용한 프라임 에디팅보

다 의도된(desired) 편집 효율이 증가한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 RTT (reverse transcription template) 서열의 5' 상류에, Cas9 니카아제(nickase)에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오티드를 추가한 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA)를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 변형된 pegRNA; 및 프라임 에디터(Prime Editor);를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 변형된 pegRNA 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임 에디터 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 변형된 pegRNA를 포함하는 프라임 에디팅 조성물을 이용하면 의도된(desired) 편집 서열이 포함되지 않은 5' DNA 플랩(flap)의 절단을 증가시켜 프라임 에디팅 효율을 증진시킬 수 있으므로, 편집 효율이 낮은 프라임 에디팅 시스템의 개선에 본 발명의 기술을 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에 따른 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA)를 이용한 프라임 편집의 기작을 도식화한 것이다.
- 도 2는 제조제 저항성 부여를 위한 토마토 *ALSI* (acetolactate synthase 1) 유전자의 프라임 편집을 위한 변형된 pegRNA의 RTT (reverse transcription template), PBS (primer binding site) 및 추가된 폴리뉴클레오티드의 위치 및 배열 정보를 보여준다.
- 도 3은 본 발명의 실시 예에서 사용된 재조합 벡터의 모식도로, 도 2의 변형된 pegRNA를 paired pegRNA로 발현하는 시스템을 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 실시 예에서 사용된 재조합 벡터의 모식도로, 도 2의 변형된 pegRNA를 단일 forward pegRNA로 발현하는 시스템을 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 실시 예에서 사용된 재조합 벡터의 모식도로, 도 2의 변형된 pegRNA를 단일 reverse pegRNA로 발현하는 시스템을 나타낸다.
- 도 6은 도 3 내지 도 5의 재조합 벡터를 이용한 프라임 에디팅의 효율을 분석한 것으로, 의도된(desired) 위치의 편집 여부를 NGS (Next Generation Sequencing)로 분석한 결과이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 변형된 pegRNA에서 추가된 뉴클레오티드의 개수에 따른 편집 효율의 통계분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RTT (reverse transcription template) 서열의 5' 상류에, Cas9 니카아제(nickase)에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오티드를 추가한 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA)를 제공한다.
- [0014] 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. 다른 유전자 가위들과 마찬가지로 프라임 에디터의 유전자 교정 효율은 pegRNA의 영향을 많이 받기 때문에, 특정한 유전자 교정을 위해서 최적의 pegRNA를 선정하는 것이 중요하다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 "pegRNA"는 표적 서열을 인식하는 가이드 서열(guide sequence 또는 spacer sequence),

tracrRNA (trans-activating crisper 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.

- [0016] 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 합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오타이드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0017] 본 발명에 따른 변형된 pegRNA는 3'에서 5' 방향으로, PBS (primer binding site); RTT; 및 Cas9 니카아제에 의해 생성된 내생의 5' 오버행 단일 가닥 DNA에 결합하는 7개 이상의 뉴클레오타이드; tracrRNA (trans-activating crisper RNA) 스캐폴드 서열; 및 표적 서열을 인식하는 스페이스 서열(spacer sequence)이 순차적으로 연결된 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 Cas9 니카아제에 의해 생성된 내생의 5' 오버행 단일 가닥 DNA에 결합하는 뉴클레오타이드는 7개 이상, 바람직하게는 7-15개, 더욱 바람직하게는 7-12개, 더더욱 바람직하게는 7-10개, 가장 바람직하게는 9개 뉴클레오타이드이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에 따른 상기 변형된 pegRNA는 의도된(desired) 편집 서열이 포함되지 않은 내생의 5' DNA 플랩(flap)의 절단을 증가시켜 프라임 에디팅 효율을 증진시킬 수 있다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA); 및 프라임 에디터(Prime Editor, PE);를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 변형된 pegRNA는 전술한 것과 같다. 또한, 상기 변형된 pegRNA는 단일의 형태 또는 paired pegRNA의 형태로 재조합 벡터에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 또한, 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 프라임 에디터는 PE1, PE2, PE3, PE3b, PE4, PE5 및 PEmax로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 PE2max일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 상기 PE1은 nickase Cas9(H840A)과 융합된 야생형의 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소 및 pegRNA로 구성된 것이고, PE2는 PE1에서 야생형의 M-MLV 역전사 효소 대신 돌연변이 M-MLV 역전사 효소(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W)를 사용한 것이며, PE3은 PE2에 추가의 gRNA (편집되지 않은 가닥에 nick을 유도하여 편집된 가닥이 통합될 수 있도록 작용)를 포함하는 것이며, PE3b는 PE3에서 사용된 추가의 gRNA가 편집된 서열에 매칭되도록 디자인된 것이며, PE4는 PE2에서 사용된 mutated M-MLV 역전사 효소, nickase Cas9 외 DNA 미스매치 복구 경로를 저해할 수 있는 MLH1dn (truncated MLH1 D754-756 lacking endonuclease domain)을 포함하는 것이며, PE5는 모든 PE3 요소에 MLH1dn을 포함하는 것이며, PEmax는 PE2와 유사하나 nCas9(H840A) 대신 mutated nCas9(R221K, N394K, H840A)를 사용하고, 상기 mutated nCas9(R221K, N394K, H840A)의 카복시 말단에 c-Myc NLS (nuclear localization signal)이 연결되어 있으며, 인간 코돈에 최적화된 역전사 효소를 포함하고 있다. 각각의 프라임 에디터에 대한 구성 요소는 당업계에 공지된 문헌들을 통해 당업자가 용이하게 선택 및 구성할 수 있다(Hassan et al., Biotechnol. J. 2022; 17:2100673; Zhao et al., Trends Biotechnol. 2023;41(8):1000-1012).
- [0024] 본 명세서에서 용어 "재조합 벡터"는 상기 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 전달하거나 및/또는 암호화하고 있는 목적 단백질을 발현할 수 있는 매개체를 의미할 수 있다. 본 명세서에서 상기 재조합 벡터는 상기 프라임 에디터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 변형된 pegRNA 암호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 벡터는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물, 즉 폴리뉴클레오타이드가 발현될 수 있도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 용어 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조 및 정제할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다. 상기 벡터는 프로모터, 개시코돈, 및 종결코돈 터미네이터를 포함할 수 있다. 그 외에 시그널 펩타이드를 코드하는 DNA, 및/또는 인핸서 서열, 및/또는 원하는 유전자의 5' 및 3'의 비번역 영역, 및/또는 선택마커 영역, 및/또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다.
- [0025] 상기 프로모터는 일반 프로모터로서 구성적 또는 유도성일 수 있고, 원핵세포의 경우에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터, 진핵세포의 경우에는 콜리폴라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프

로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들어 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터를 단리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 대상 개체의 유전자를 편집하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 대상 개체의 유전자 편집 방법에 있어서, 상기 재조합 벡터는 변형된 pegRNA 및 프라임 에디터를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고 있으며, 각각에 대해서는 전술한 것과 같다.

[0030] 본 발명은 또한, 상기 변형된 pegRNA (prime editing guide RNA) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 프라임 에디터(Prime Editor, PE) 또는 이를 암호화하는 핵산 서열;을 유효성분으로 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공한다.

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

[0032] 본 발명에 따른 조성물은 의도된(desired) 편집 서열이 포함되지 않은 내생의 5' DNA 플랩(flap)의 절단을 증가시켜 프라임 에디팅 효율을 증진시키는 변형된 pegRNA를 포함하는 것이 특징으로, 상기 변형된 pegRNA, 프라임 에디터는 전술한 것과 같다.

[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 표 2에 나열된 프라이머를 사용하여 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), 35S promoter(서열번호 2), EU + Rb7 double terminator (EURb7; 서열번호 3), U6 composite promoter(서열번호 4)]은 Moclo(Weber et al., 2011) 레벨 0 플라스미드로 길들여지고(domesticated) PE 단백질 조합 및 바이너리 벡터로 조립되었다.

표 1

[0042]

본 발명에 사용된 pegRNA 서열 정보

No	Specification	Orientation of pegRNA	pegRNA spacer	3' extension (5'-3')	PBS (5'-3')	RTT (5'-3')	LNT (5'-3')
1	No LNT	Forward	CTATTACAGTCAAGTGC	CAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT (서열번호 6)	CACTTGACCT (서열번호 10)	CAATCATCCTCCTaGa (서열번호 11)	-
2	3-nt LNT		CA (서열번호 5)	ttgCAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT (서열번호 7)			ttg
3	6-nt LNT			tgatttgCAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT (서열번호 8)			tgatttg
4	9-nt LNT			ggatgatttgCAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT (서열번호 9)			ggatgatttg
5	No LNT	Reverse	TCAGTACCAATCATCCTCT (서열번호 12)	TACAGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTGG (서열번호 13)	AGGATGATG (서열번호 17)	TACAGGTC AAGTGtCtAGG (서열번호 18)	-
6	3-nt LNT			gtatTACAGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTGG (서열번호 14)			gta
7	6-nt LNT			cctgtaTACAGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTGG (서열번호 15)			cctgta
8	9-nt LNT			tgacctgtaTACAGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTGG (서열번호 16)			tgacctgta

표 2

[0043]

ALS1 에디팅을 위한 pegRNA 증폭용 프라이머 정보

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
npegR-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAATGCACTATTACAGGTCAAGTGCCA	19
npegR-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAAAACTGGCACTTGACCTGTAATAG	20
2gRNA-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAATGCACCTAACCCATAGGCGTTTCCGTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGC	21
2gRNA-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGGACCGACTCGGTGCGACTT	22
PBR1-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCCAATCATCTCTCTAGACACTTGA	23
PBR1-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGAGGTCAAGTGTCTAGGAGGATGA	24
ALS1-Pr1r-F1	CAGTCGAAGACAATGCATCAGTACCAATCATCCTCTCT	25
ALS1-Pr1r-R1	CAGTCGAAGACAAAAACAGGAGGATGATTGGTACTGA	26
rPBR1-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCTACAGGTCAAGTGtCtAGGAGGATG	27
rPBR1-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGCAATCATCTCTCTaGaCACTTGACC	28

[0045]

2. 아그로박테리움 매개 토마토 형질전환 및 프라임 에디팅 효율 분석

[0046] 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, 형질전환된 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 신초를 80 mg/L 카나마이신이 포함된 배지에서 선별하고 토양으로 옮기기 전에 발근을 유도하였다. 이어 경화된 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.

[0047] 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.

[0049] 3. Targeted deep sequencing

[0050] 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 3에 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 4에 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 3

[0051] MiniSeq 시료 증폭을 위한 프라이머 정보

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
ALS-F1	CCTCACCATCTCCATGTTTCTC	29
ALS-R1	GTCTCAGCTCCTCACTTGATTG	30
ALS-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCTACAAATCTTGTAGTGGTCTTG	31
ALS-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GCTTCGTAATAGATCTCGTTACCTC	32

표 4

[0052] FASTQ 파일 분석에 사용된 파라미터

Name	Sequence (5'-3')	서열번호
Reference sequence	GCTACAAATCTTGTAGTGGTCTTGCAGATGCTTTGTAGATAGTATTCCGATTGTTGCT ATTACAGGTCAAGTGCCAAGGAGGATGATTGGTACTGATGCGTTCCAGGAAACGCCTATT GTTGAGGTAACGAGATCTATTACGAAGCA	33
Donor (RGEN)	AGGTCAAGTGtCtAGGAGGATGATTG	34
CRISPResso2 extension	3' CAATCATCCTCCTaGaCACTTGACCT	35

[0054] 4. PE 대립 유전자를 포함하는 형질전환체의 확인

[0055] 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.

5. PE 이벤트 내의 T-DNA 및 레플리콘 존재 유무 평가

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.

6. 표적이탈(off-target) 분석

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 3에 나열된 프라이머를 사용하여 표적 딥 시퀀싱에 의해 분석되었다.

7. 데이터 분석

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.

실시예 1. 토마토 *ALS1* 유전자의 프라임 에디팅 효율 증진을 위한 pegRNA의 변형

본 발명자는 프라임 에디팅 과정 중 편집되지 않은, 즉 의도된 염기 교체가 일어나지 않은 5' flap DNA의 절단이 보다 더 많은 빈도로 발생할 수 있도록 pegRNA의 RTT 서열의 5' 상류에, Cas9 니카아제에 의해 생성된 내생의 5' 오버행(overhang) 단일 가닥 DNA에 결합할 수 있는 뉴클레오티드를 추가한 변형된 pegRNA를 제작하였다(도 2). 상기 변형된 pegRNA를 이용하면 5' flap DNA의 절단이 보다 더 유리하게 발생될 수 있다(도 1).

본 발명에서는 제초제 저항성을 부여하기 위해 토마토 *ALS1* 단백질의 P186S (CCA→TCT) 편집을 위한 pegRNA를 다양하게 디자인하였다(표 1). 또한, 상기 pegRNA를 단일 정방향, 단일 역방향 또는 paired pegRNA의 형태로 세포 내에서 작동할 수 있도록 다양한 재조합 벡터를 구성하였으며(도 3 내지 5), 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105sv2 균주를 이용하여 형질전환하였다. 토마토 절편체는 상기 아그로박테리움과 공배양 후 5일 동안 31℃에서 배양되었다.

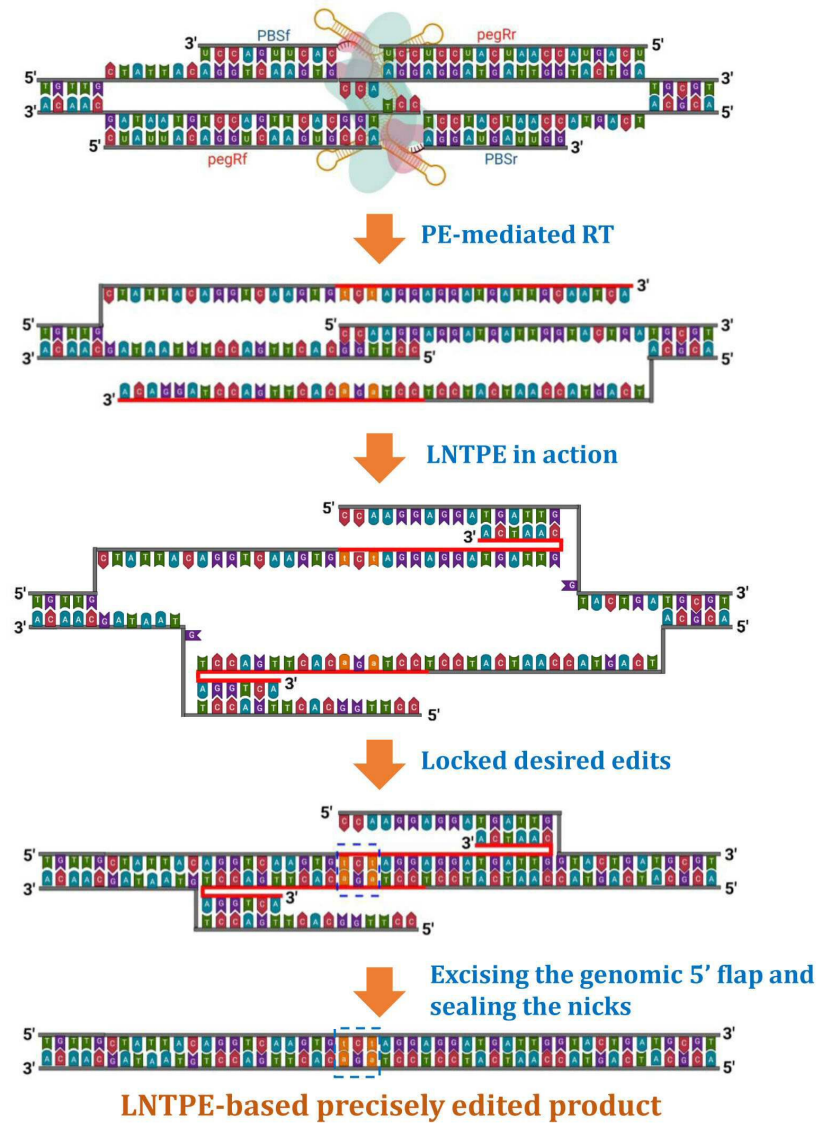
각기 다른 개수의 추가 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 pegRNA를 사용한 프라임 편집의 결과, RTT 서열의 5' 상류에 3개 또는 6개의 뉴클레오티드가 추가된 경우에는 뉴클레오티드를 추가하지 않은 대조군(no LNT) 보다 전체적인 편집 비율이 감소되었으나, 9개의 뉴클레오티드를 추가한 pegRNA 사용 시 의도된 교정 및 전체적인 편집 비율이 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 6). 또한, 단일 reverse pegRNA를 사용한 모든 실험군은 단일 forward 및 paired pegRNA를 사용한 실험군 대비 의도하지 않은 교정 비율이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다.

상기 결과를 통해, RTT 서열의 5' 상류에 Cas9 니카아제에 의해 생성된 내생의 5' 오버행 단일 가닥 DNA에 결합하는 뉴클레오티드를 7개 이상, 보다 바람직하게는 9개 추가할 때 프라임 편집의 효율이 증가될 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

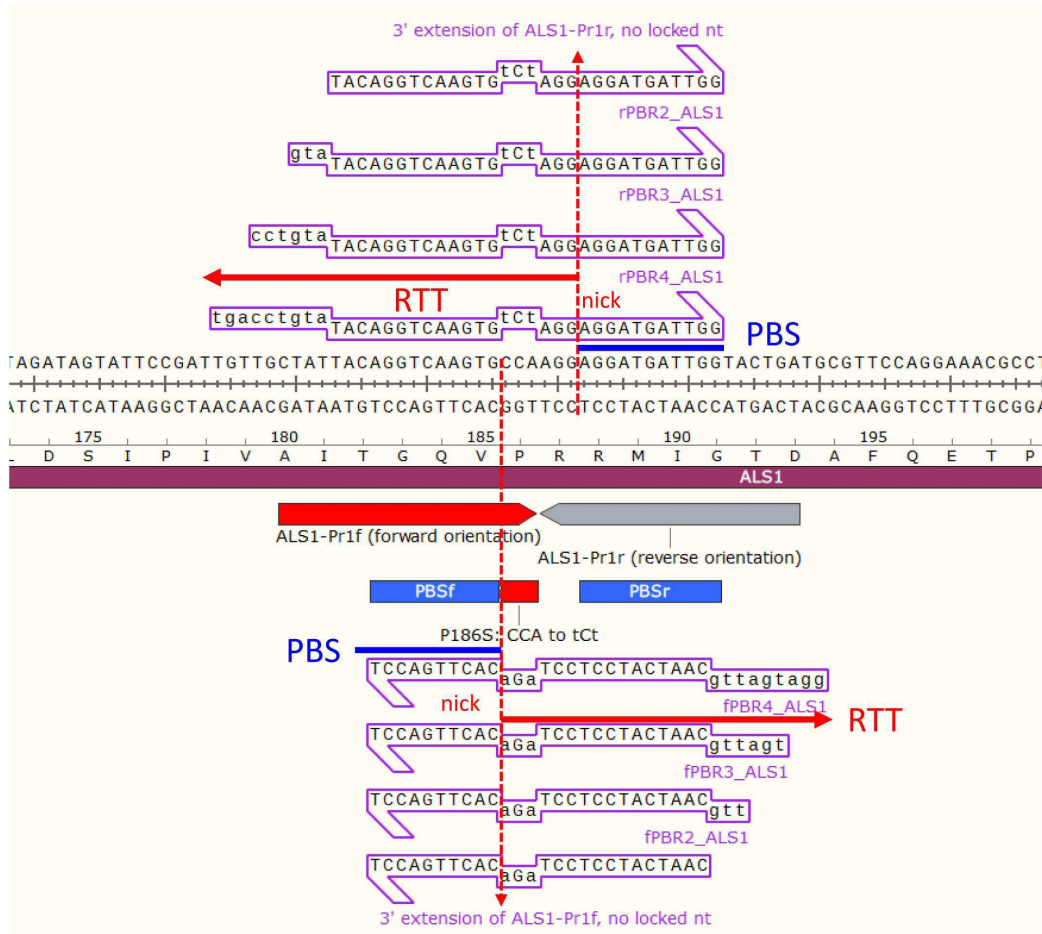
도면1

LNTPE approach for favoring the installation of desired edits (novel idea)



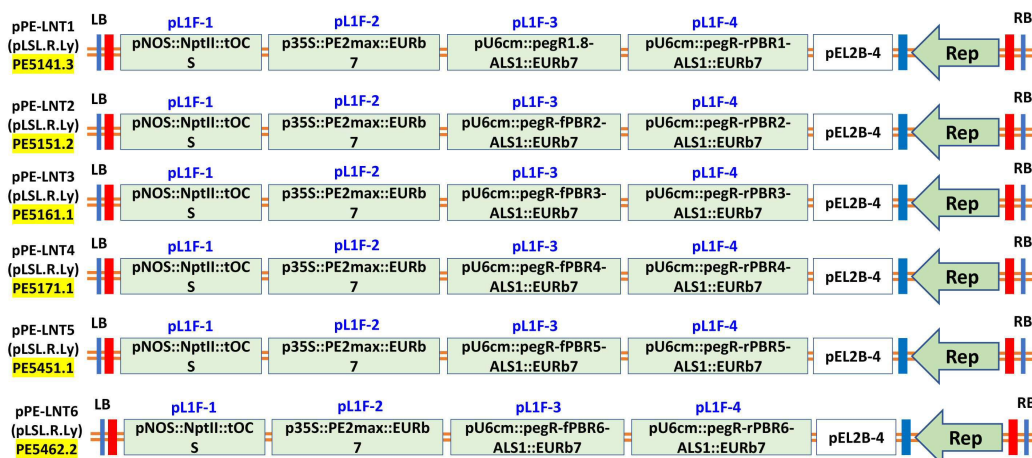
도면2

The selected target site for the initial evaluation of LNTPE
SIALS1 P186S site for herbicide tolerance



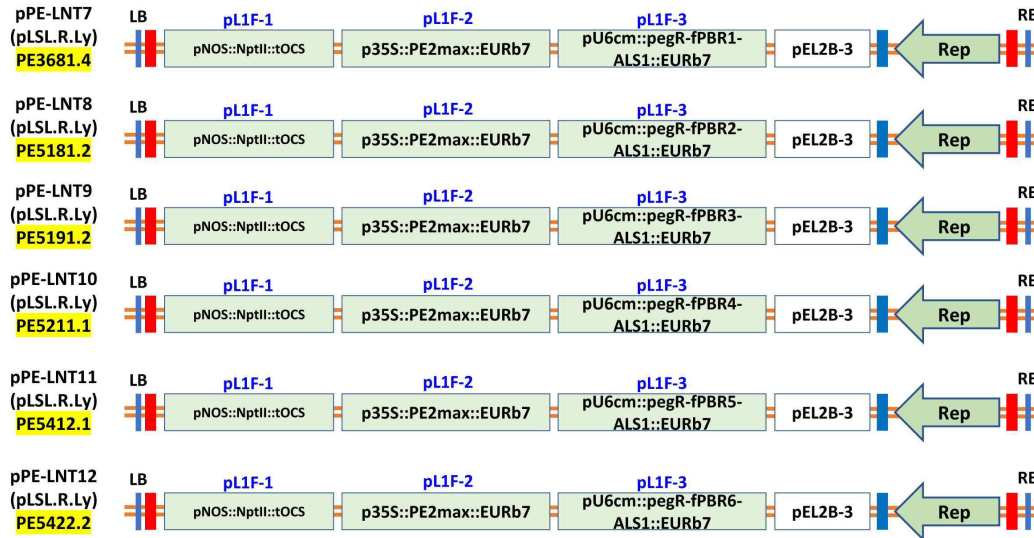
도면3

Level 2 plasmid maps for PELNT
Paired pegRNA constructs



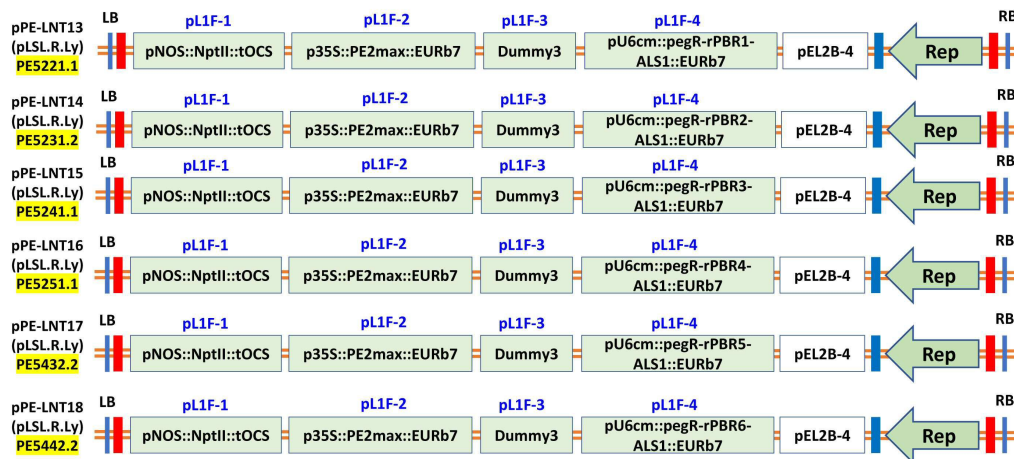
도면4

Level 2 plasmid maps for PELNT Forward pegRNA constructs

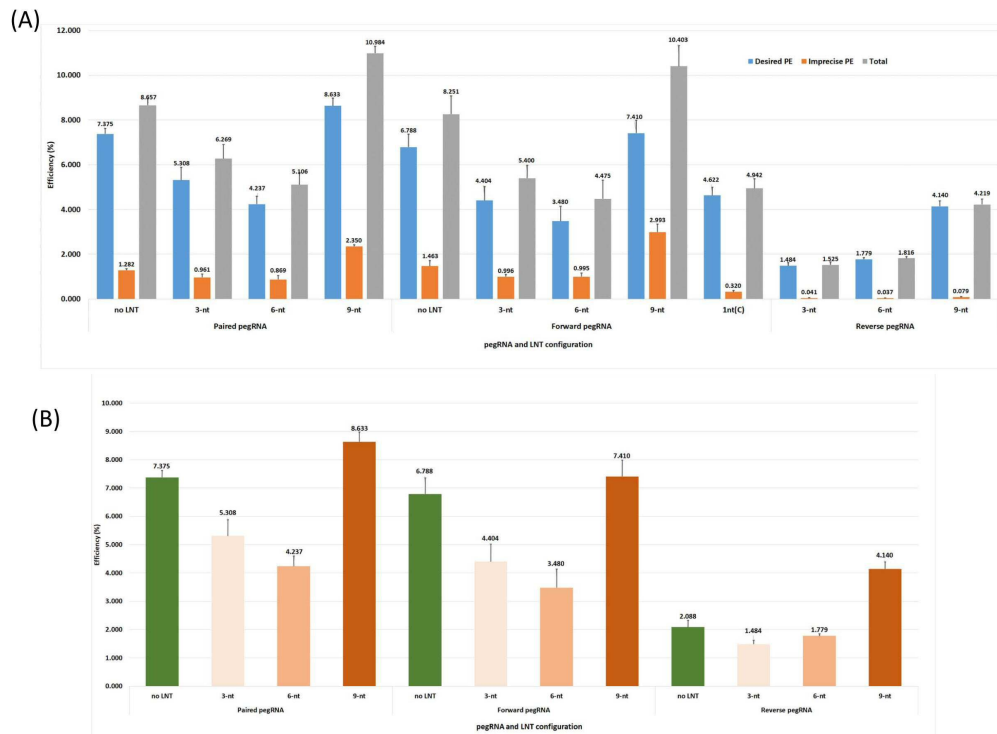


도면5

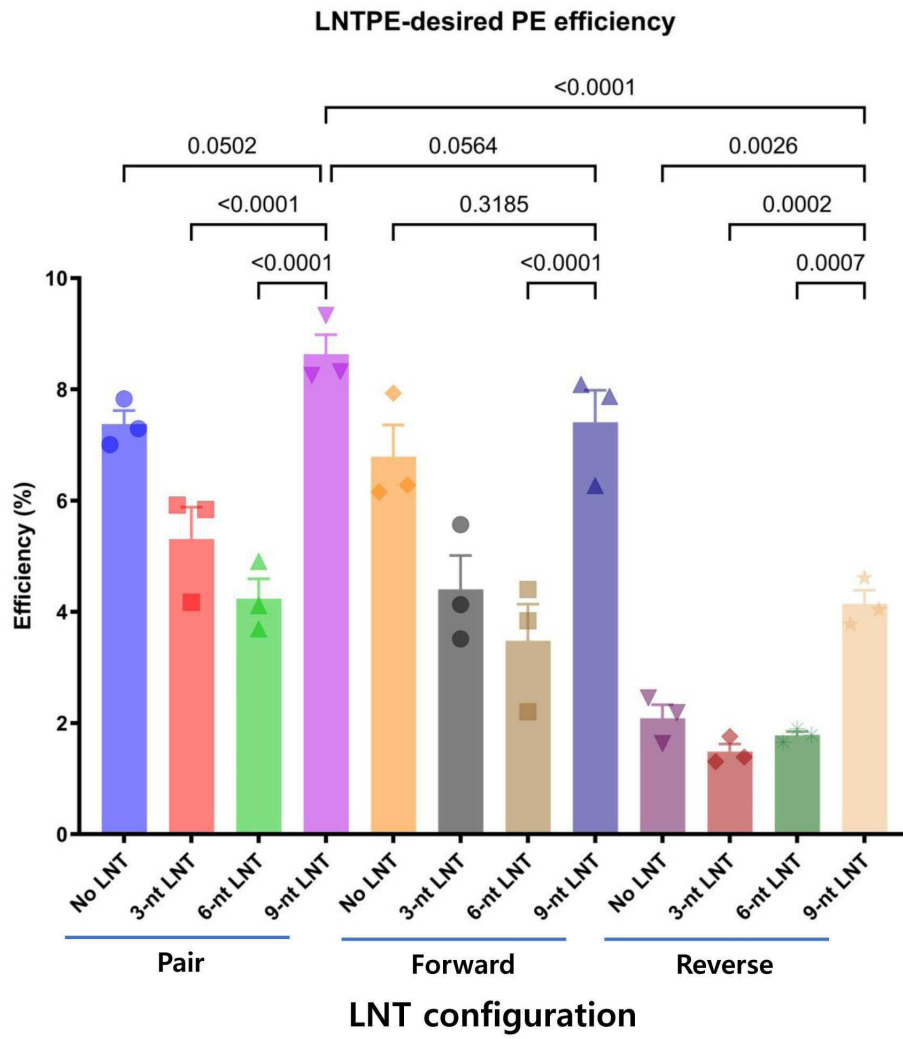
Level 2 plasmid maps for PELNT Reverse pegRNA constructs



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.