



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0001761
(43) 공개일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/78 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0084418
(22) 출원일자 2023년06월29일
심사청구일자 2023년06월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
구대영
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 약학대학 419호
김대식
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교 의학관6305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

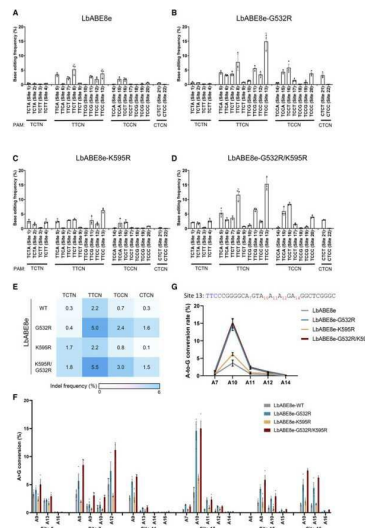
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 유전자 편집용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 유전자 편집용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor) LbABE8e 시스템은 변경된 PAM 특이성을 갖게 되어 표적 DNA에 유의적인 유전체 단일염기 편집 효과를 달성하므로, 적용할 수 있는 CRISPR 시스템 선택의 폭을 넓혀주며, 이에 따른 유전자 교정으로 인해 유전자 치료, 생산성이 향상된 산업 균주로 상업적 이윤 창출, 장내 미생물 개량을 통한 공중보건의료분야 질 향상, GMO 이슈로부터 자유로운 농작물, 가축 품종 개량 등의 다양한 분야에 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 9/78 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

최은영

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 약학대학 402호

황혜연

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교
의학관B120호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711191510
과제번호	2022R1A2C1013352
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	프라임에디터 고도화 및 전달법 개발을 통한 알츠하이머병 치료전략 수립
기 여 율	15/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711198608
과제번호	00262386
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	유전자편집제어복원기반기술개발
연구과제명	면역회피 바이러스 기반 크리스퍼 탐제기술 고도화 전략 구축
기 여 율	30/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2023.07.01 ~ 2027.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475013717
과제번호	DY0002259958-21153규제학607-1
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	규제과학인재양성사업
연구과제명	의약품 유효성평가 분야 인재양성대학 운영
기 여 율	5/100
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2021.05.01 ~ 2025.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184430
과제번호	2020R1A2C2101714
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	프라임에디터를 이용한 약물 내성 돌연변이 특이적 교정 시스템 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체.

청구항 2

하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor).

청구항 3

하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA (guide RNA)를 포함하는, 유전자 편집용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 34, 36, 39, 40, 43, 46, 47, 50, 54, 57, 58, 111, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 676, 679, 680, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 707, 711, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 739, 765, 768, 769, 773, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884 및 1048로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 하나 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 532 및 595에 상응하는 하나 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 G532R 및 K595R에 상응하는 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질에 비해, 서열 TTCN을 갖는 PAM을 특이적으로 인식하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질에 비해, 서열 TTCC를 갖는 PAM을 특이적으로 인식하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 라크노스피라카에 박테륨 (*Lachnospiraceae bacterium*), 프란시셀라 노비시드 (*Francisella novicid*), 프란시셀라 툴라렌시스 (*Francisella tularensis*), 프레보텔라 알벤시스 (*Prevotella albensis*), 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스 (*Butyrivibrio proteoclasticus*), 프레그 린박테리아 박테륨 (*Peregrinibacteria bacterium*), 파르쿠박테리아 박테륨 (*Parcubacteria bacterium*), 스미텔라 종 (*Smithella* sp.), 아시다미노코커스 종 (*Acidaminococcus* sp.), 칸디다투스 메타노플라스마 터미툼 (*Candidatus Methanoplasma termitum*), 유박테륨 엘리겐스 (*Eubacterium eligens*), 모락셀라 보보쿨리 (*Moraxella bovoculi*), 렙토스피라 이나다이 (*Leptospira inadai*), 포르피로모나스 크레비오리카니스 (*Porphyromonas crevioricanis*), 포르피로모나스 마카카 (*Porphyromonas macacae*), 석신비브리오 텍스트리노솔벤스 (*Succinivibrio dextrinosolvens*), 프레보텔라 디시엔스 (*Prevotella disiens*), 플라보박테륨 브란키오피룸 (*Flavobacterium branchiophilum*), 헬코코커스 쿤지 (*Helcococcus kunzii*), 유박테륨 종 (*Eubacterium* sp.), 플라보박테륨 종 (*Flavobacterium* sp.), 프레보텔라 브레비스 (*Prevotella brevis*), 모락셀라 카프래 (*Moraxella caprae*), 박테로이데테스 오랄 (*Bacteroidetes oral*), 포르피로모나스 칸설치 (*Porphyromonas cansulci*), 시너지스테스 조네시 (*Synergistes jonesii*), 프레보텔라 브리안티 (*Prevotella bryantii*), 아나로비브리오 종 (*Anaerovibrio* sp.), 부티리비브리오 피브리솔벤스 (*Butyrivibrio fibrisolvens*), 칸디다투스 메타노메틸로필루스 (*Candidatus Methanomethylophilus*), 부티리비브리오 종 (*Butyrivibrio* sp.), 오리박테륨 종 (*Oribacterium* sp.), 슈도부티리비브리오 루미니스 (*Pseudobutyrvibrio ruminis*) 및 프로테오카텔라 스페니치 (*Proteocatella sphenisci*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아 종으로부터 유래된 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 Cas12a 단백질 변이체는, 라크노스피라카에 박테륨 (*Lachnospiraceae bacterium*)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 11

제3항에 있어서,

상기 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)는 에스케리치아 콜리, 스타필로코커스 아우레우스, 살모넬라 타이피, 셰와넬라 푸트레파시엔스, 해모필러스 인플루엔자, 콜로박터 크레슨투스 및 바실러스 서브틸리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아 종으로부터 유래된 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)는 에스케리치아 콜리로부터 유래된 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 ABE8e, ABEmax, ABEmax-m, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 아데닌 염기교정 유전자가위는 ABE8인 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 15

제3항에 있어서,

상기 조성물은 아데닌 (A)을 구아닌 (G), 사이토신 (C) 및 티민 (T)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기로 치환하는 것을 특징으로 하는,

유전자 편집용 조성물.

청구항 16

제3항 내지 제15항 중 어느 한 항의 유전자 편집용 조성물을 *in vitro*에서 타겟 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법.

청구항 17

제3항 내지 제15항 중 어느 한 항의 유전자 편집용 조성물을 포함하는, 유전자 편집용 키트.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 유전자 편집용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 가위 기술은 현재의 유전자 치료 기술에 매우 비약적인 발전을 가져왔다.

[0004] 유전자 가위들은 공통적으로 DNA 이중나선의 절단(DNA double strand break; DSB)을 유도하게 된다. 그러면 살아있는 세포는 이러한 DSB를 심각한 손상으로 인식하고 이를 복구하기 위한 시스템을 가동한다. 구체적으로, 복구의 속도는 빠르지만 복구원본에 의존하지 않기 때문에 다양한 유전자 서열의 변형이 유도되는 비상동말단연결(Non-Homologous End-Joining; NHEJ)과 주형가닥을 통하여 정확한 복구가 가능한 상동재조합(Homologous Direct Repair; HDR) 두 가지 경로를 이용하여 잘린 DNA 가닥을 복구한다. 유전자의 제거를 위해서는 NHEJ 경로가, 유전자의 교정, 삽입을 위해서는 HDR 경로가 통상 이용된다.

[0005] 그러나, HDR에 의한 교정은 매우 비효율적인 것으로 알려져 있으며, 특히, Cas9 뉴클레아제(nuclease)에 의한 DNA 절단은 종종 표적 부위에 원치않는 DNA의 삽입이나 결실(indel)을 일으키곤 한다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 CRISPR/Cas 시스템의 절단 기능을 제거하고 특정 DNA 서열을 인식하는 특징만을 이용하여 사용하기도 한다. 절단기능이 제거된(catalytically impaired) Cas9 단백질(dead Cas9; dCas9)에 다양한 유전자 조절 인자들을 결합하여 사용한다. 특히, 4세대 유전자 가위 기술이라고 불리는 염기교정 유전자 가위(base editor; 이하 "염기 편집기"라고도 함)를 이용하면, 특정 서열을 교정하거나 교체하여 유전자를 결손시키거나 원하는 형질로 전환할 수 있다.

[0006] 상기 염기 편집기로는 크게 2 가지 종류가 사용되고 있다. 즉, CRISPR/Cas9의 이중가닥 DNA 절단기능을 제거하거나(dCas9), 단일 가닥 DNA 절단기능만을 제거한 Cas9 nickase (nCas9)에 시토신 탈아미노효소(cytidine deaminase)를 결합하여 DNA 서열 중 시토신(C)만 찾아 티민(T)으로 교체할 수 있는 CBE(cytidine base editor)와, 아데닌 탈아미노효소(Adenine deaminase)를 결합하여 아데닌(A)을 구아닌(G)으로 교체할 수 있는 ABE(adenine base editor)가 있다. 이러한 염기 편집기는 DNA 이중나선의 절단(DSB)을 거의 생성하지 않으며 기증자 DNA 템플릿이 필요하지 않아, 식물 게놈 공학, 마우스 접합체 공학, 생물 의학 응용 등 광범위한 연구 분야에서 널리 활용되고 있다.

[0007] 그러나, CRISPR 뉴클레아제와 유사하게, 염기 편집기 역시 단일 가이드 RNA (sgRNA) 의존적인 게놈 전반에서 off target 효과를 나타낸다. 또한, ABE는 표적 서열 모티프에 위치한 아데닌 이외에 시토신의 전환을 촉매하는 것으로 밝혀졌다. 또한, CBE는 게놈에서 sgRNA와는 무관하게 무차별 DNA 탈아미노화를 유발하며, CBE와 ABE는 모두 RNA 전사체에서 전사체 전반의 무차별 RNA 탈아미노화를 유도한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 Cas9 effector engineering 기법을 사용하거나 또는 cytidine/adenine deaminase을 변형시키는 시도들이 있었으나, 여전히 완전히 해결되지는 않고 있어, 새로운 염기 편집기의 개발이 필요하다.

선행기술문헌**비특허문헌**

[0008] (비특허문헌 0001) Cell, Vol.165, pp.949-962(2016.04.21), Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 상술한 문제점을 해결하기 위하여, Cas12a 뉴클레아제와 Cas12a 기반 아데닌 염기교정 유전자가위(Cas12a-ABE)에, 특정 변이(G532R 및 K595R)를 유도한 Cas12a 변이체를 도입하였고, 그 결과, 상기 엔지니어링된 ABE가 5'-TTCC-3' PAM 서열을 특이적으로 인식함에 따라 우수한 유전자 교정 효과를 발휘함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 일 목적은 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체를 제공하는 데 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위(Adenine Base Editor)를 제공하는 데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위(Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA(guide RNA)를 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자 편집용 조성물을 *in vitro*에서 타겟 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자 편집용 조성물을 포함하는, 유전자 편집용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0019] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 서열", "뉴클레오타이드 서열" 및 "폴리뉴클레오타이드 서열"은, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 및 이의 단편 또는 일부, 및 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있는 게놈 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 의미하고, 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낸다.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체, 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위(Adenine Base Editor), 또는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위(Adenine Base Editor); 및 가이드 RNA(guide RNA)를 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "편집한다", "편집하는" 또는 "편집된"은 특정 게놈 표적을 선택적으로 결실시키거나, 외부로부터 공급된 DNA 주형을 사용하여 새로운 특정 서열을 포함시킴으로써 폴리뉴클레오타이드의

핵산 서열(예를 들면, 야생형 천연 생성 핵산 서열 또는 돌연변이된 천연 생성 서열)을 변경시키는 방법을 의미한다. 이러한 특정 게놈 표적은 염색체 영역, 미토콘드리아 DNA, 유전자, 프로모터, 오픈 리딩 프레임 또는 임의의 핵산 서열을 포함하나, 이들로 한정되지 않을 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “유전체 교정(genome editing)”은, 특별한 언급이 없는 한, 표적 DNA의 표적 부위에서의 Cas12a 절단에 의한 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 유전자 기능을 편집, 회복, 수정, 상실 및/또는 변경시키는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 “염기교정 유전자가위 (Base Editors, BEs)”는 단일 염기 교정 수단으로서, 보다 구체적으로, 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)를, 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체의 N-말단에 융합시킴으로써 구축되며, 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editors, ABEs)로 명명된다. 상기 BEs는 이중 가닥 절단을 일으키지 않으면서, ABEs는 특정 부위에서 아데닌을 구아닌으로 교정한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 “아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editors, ABEs)”는 아데닌을 구아닌으로 교정하기 위해, 임의의 자연유래 탈아미노화효소 (ecTadA)를 Cas12a 변이체의 N-말단에 융합시킴으로써 구축되었으며, ABEs의 종류로는 버전에 따라 ABE8e, ABEmax, ABEmax-m, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m 등이 있으나 이에 제한되지 않고, 본 발명에 따른 “아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase) 및 Cas12a 단백질 변이체를 포함하는 ABEs는 “LbABE8e 변이체” 또는 “LbABE8e-G532R/K595R” 또는 “LbABE8e-G532R/K595R 변이체”로 혼용된다.

[0029] 본 발명에 따른 “아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)”는 아데닌에서 아미노기를 제거하고 히포크산틴(hypoxanthine)의 생성에 관여하는 효소이고, 상기 효소는 고등 동물에는 거의 발견되지 않으나 암소의 근육내, 우유, 쥐의 혈액에 조금 존재하며 가재의 내장 및 곤충 등에서는 많이 존재한다고 보고된다.

[0030] 상기 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)는 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 당업계에 공지된 임의의 박테리아로부터 유래된 아데닌 탈아미노화효소일 수 있고, 바람직하게는 에스케리치아 콜리, 스타필로코커스 아우레우스, 살모넬라 타이피, 쉘와넬라 푸트레파시엔스, 헤모필러스 인플루엔자, 콜로박터 크레슨투스 및 바실러스 서브틸리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아 종으로부터 유래된 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 에스케리치아 콜리로부터 유래된 것(ecTadA)이나, 이에 한정되지 않는다.

[0031] 상기 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 34, 36, 39, 40, 43, 46, 47, 50, 54, 57, 58, 111, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 676, 679, 680, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 707, 711, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 739, 765, 768, 769, 773, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884 및 1048로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 하나 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하며, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 이에 한정되지 않으나, 보다 바람직하게는 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 532 및 595에 상응하는 하나 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 가장 바람직하게는, 야생형 Cas12a 단백질의 아미노산 위치 G532R 및 K595R에 상응하는 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 것이다.

[0032] 또한, 본 발명의 Cas12a 단백질 변이체는, 야생형 Cas12a 단백질에 비해, 서열 TTCN(바람직하게는, TTCC)을 갖는 PAM을 특이적으로 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 Cas12a 단백질 변이체는, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 당업계에 공지된 임의의 박테리아로부터 유래된 Cas12a 단백질의 변이체일 수 있으나, 바람직하게는 라크노스피라카에 박테륨(*Lachnospiraceae bacterium*), 프란시셀라 노비시드(*Francisella novicid*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 프레보텔라 알벤시스(*Prevotella albensis*), 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스(*Butyrivibrio proteoclasticus*), 프레그 린박테리아 박테륨(*Peregrinibacteria bacterium*), 파르쿠박테리아 박테륨(*Parcubacteria bacterium*), 스미텔라 종(*Smithella sp.*), 아시다미노코커스 종(*Acidaminococcus*

sp.), 칸디다투스 메타노플라스마 터미툼 (*Candidatus Methanoplasma termitum*), 유박테륨 엘리겐스 (*Eubacterium eligens*), 모락셀라 보보쿨리 (*Moraxella bovoculi*), 렙토스피라 이나다이 (*Leptospira inadai*), 포르피로모나스 크레비오리카니스 (*Porphyromonas crevioricanis*), 포르피로모나스 마카카 (*Porphyromonas macacae*), 석신비브리오 텍스트리노솔벤스 (*Succinivibrio dextrinosolvens*), 프레보텔라 디시엔스 (*Prevotella disiens*), 플라보박테륨 브란키오피룸 (*Flavobacterium branchiophilum*), 헬코코커스 쿤지 (*Helcococcus kunzii*), 유박테륨 종 (*Eubacterium* sp.), 플라보박테륨 종 (*Flavobacterium* sp.), 프레보텔라 브레비스 (*Prevotella brevis*), 모락셀라 카프래 (*Moraxella caprae*), 박테로이데테스 오랄 (*Bacteroidetes oral*), 포르피로모나스 칸설치 (*Porphyromonas cansulci*), 시너지스테스 조네시 (*Synergistes jonesii*), 프레보텔라 브리안티 (*Prevotella bryantii*), 아네로비브리오 종 (*Anaerovibrio* sp.), 부티리비브리오 피브리솔벤스 (*Butyrivibrio fibrisolvens*), 칸디다투스 메타노메틸로필루스 (*Candidatus Methanomethylophilus*), 부티리비브리오 종 (*Butyrivibrio* sp.), 오리박테륨 종 (*Oribacterium* sp.), 슈도부티리비브리오 루미니스 (*Pseudobutyrvibrio ruminis*) 및 프로테오카텔라 스페니스 (*Proteocatella sphenisci*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아 종으로부터 유래된 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 라크노스피라카에 박테륨 (*Lachnospiraceae bacterium*)으로부터 유래된 것이다.

- [0034] 또한, 본 발명에서, 상기 아데닌 염기교정 유전자가위는, 바람직하게는 ABE8e, ABEmax, ABEmax-m, ABE8e-V106W 및 ABE8.17-m으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 가장 바람직하게는 ABE8이다.
- [0035] 또한, 본 발명의 조성물은 아데닌 (A)을 구아닌 (G), 사이토신 (C) 및 티민 (T)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기로 치환할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서는, 유전자를 교정하기 위해 엔지니어링된 본 발명의 ABEs가 특이적으로 결합하는 모티프와 교정 윈도우를 규명한바, 목적 대상체의 유전체를 효과적으로 단일 염기 단위로 정교하게 편집할 수 있음을 입증한다.
- [0037] 상기 대상체는, 본 발명의 방법을 적용할 수 있는 한, 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드, 바이러스, 원핵 세포, 분리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체일 수 있다.
- [0038] 상기 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 식물, 곤충, 양서류, 포유동물 등의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는 인 비트로에서 배양된 세포, 이식된 세포, 일차 세포 배양, 인 비보 세포, 인간을 포함하는 포유 동물의 세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 본 발명에 따른 상기 형질전환은 목적하는 유전자(핵산)를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 유전자 편집용 조성물을 in vitro에서 타겟 서열과 접촉시키는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법을 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 유전자 편집용 조성물을 포함하는, 유전자 편집용 키트를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 방법 및 키트는 상술한 조성물을 이용하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명에 따른 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소 (adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor) LbABE8e 시스템은 변경된 PAM 특이성을 갖게 되어 표적 DNA에 유의적인 유전체 단일염기 편집 효과를 달성하므로, 적용할 수 있는 CRISPR 시스템 선택의 폭을 넓혀주며, 이에 따른 유전자 교정으로 인해, 유전자 치료, 생산성이 향상된 산업 균주로 상업적 이윤 창출, 장내 미생물 개량을 통한 공중보건의료분야 질 향상, GMO 이슈로부터 자유로운 농작물, 가축 품종 개량 등의 다양한 분야에 폭넓게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 비표준 및 표준 PAM이 있는 부위에서 야생형 LbCas12a의 활성을 보여준다. HEK293T 세포에서 비표준 및 표준 PAM을 포함하는 60개의 내인성 표적 부위에서 LbCas12a에 의해 유도된 인텔 빈도를 나타내며, 타겟 딥 시퀀싱을 통해 인텔 주파수를 측정했다. 검은색 화살표는 TTTT PAM을 포함하는 표적 부위를 나타낸다. 각 점은 생물학적으로 독립적인 삼중 염기서열의 평균을 나타낸다.

도 2A 내지 2D는 네 번째 위치에 T 또는 V 뉴클레오타이드가 있는 비-표준(non-canonical) 및 표준적인(canonical) PAM이 있는 부위에서의 조작된 LbCas12a 변이체의 활성을 보여준다. 표준(A) 및 비표준 PAM(B)의 네 번째 위치에 있는 뉴클레오타이드 유형(V 또는 T)에 따른 62개 표적 부위에서 LbCas12a 및 그 변이체의 활성을 보여준다. (C) 비표준 PAM의 네 번째 위치에 T가 포함된 32개 표적 부위에서 LbCas12a 및 그 변이체의 활성을 보여준다. (D) 히트맵은 타겟 딥 시퀀싱(targeted deep sequencing)으로 측정한 평균 인텔 빈도를 보여준다. 그래프에는 평균 인텔 빈도 $\pm$ SEM이 표시된다. p 값은 Student's two-tailed t test에서 도출되었다. *p < 0.05; NS, 유의하지 않음.

도 3A 내지 3G는 비표준 PAM이 있는 부위에서 엔지니어링된 LbABE8e 변형을 사용한 아데닌 염기 편집 효과를 보여준다. 22개의 내인성 표적 부위에서 (A) 야생형 LbABE8e 및 (B) G532R, (C) K595R 또는 (D) G532R/K595R 돌연변이를 포함하는 조작된 LbABE8e에 의해 유도된 아데닌 염기 편집 효율성을 보여주며, 상기 LbCas12a-G532R/K595R이 20% 이상의 빈도로 인텔을 생성한 것으로 HEK293T 세포에서 타겟 딥 시퀀싱으로 측정하였다. 평균 염기 편집 빈도 $\pm$ SEM이 그래프에 표시되어 있다. (E) 대표적인 히트맵은 타겟 딥 시퀀싱으로 측정한 평균 염기 편집 빈도를 보여준다. (F) 야생형 LbABE8e 및 G532R, K595R 또는 G532R/K595R 돌연변이를 포함하는 조작된 LbABE8e에 대한 HEK293T 세포의 6개 게놈 부위에서 프로토스페이서 내의 염기 편집 윈도우를 보여준다. (G) 13번 부위에서 LbABE8e 변이체의 향상된 편집 윈도우를 보여준다. 각 점은 개별 데이터 포인트를 나타낸다. 평균 편집 빈도 $\pm$ SEM이 표시된다.

도 4는 대조군으로 LbABE8e-G532A, LbABE8e-K595A 변이체를 제작하여 LbABE8e-G532R/K595R 변이체와의 효율을 비교분석한 결과이다.

도 5A 내지 5E는 조작된 LbCas12a에 의한 삼중 발암성 돌연변이 편집이 비정상적인 암세포 증식을 억제함을 보여준다. (A) HCT-15 대장암 세포의 발암성 돌연변이 모식도를 보여준다. 발암성 돌연변이는 빨간색으로, PAM 서열은 파란색으로 표시되어 있다. (B) LbCas12a-G532R/K595R, LbABE8e-G532R/K595R을 암호화하는 벡터와 직접 반복되는 CRISPR 배열, 다중화된 crRNA-V1, -V2, -V3를 나타낸 모식도를 보여준다. 다중화된 crRNA-V2 및 -V3는 그림과 같이 스페이서 서열 사이에 구분자가 포함되어 있다. 세 가지 버전 모두에서 단일 전사체의 발현은 U6 프로모터에 의해 제어된다. (C) APC, PIK3CA, TP53을 표적으로 하는 다중화된 crRNA-V3를 가진 LbCas12a-G532R/K595R의 활성과 (D) HCT-15 세포에서 APC, PIK3CA, TP53을 표적으로 하는 다중화된 crRNA-V3를 가진 LbABE8e-G532R/K595R의 활성을 보여준다. 프로토스페이서의 평균 염기 편집 빈도가 표시되어 있다. (E) LbCas12a-G532R/K595R 또는 LbABE8e-G532R/K595R을 코딩하는 플라스미드 및 해당 crRNA를 감염시킨 후 MTT 분석을 사용하여 세포 생존율을 측정한 결과를 보여준다. "mock"는 LbCas12a-G532R/K595R 또는 LbABE8e-G532R/K595R을 코딩하는 플라스미드와 비표적 멀티플렉스 crRNA-V3로 처리한 세포를 의미한다. 오차 막대는 SEM(n = 3)을 나타낸다. p 값은 Student's two-tailed t test에서 도출되었다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; NS, 유의하지 않음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0050]

실시예 1. 본 발명의 LbABE8e 변이체 제작

[0051]

본 발명자들은 crRNA 플라스미드 및 LbABE8e 변이체를 하기와 같이 제작하였다:

[0052]

먼저, 표적 유전자 서열은 Ensembl genome browser에서 얻었으며, 23 nucleotide의 표적부위에 결합할 수 있는 forward oligonucleotide와 reverse oligonucleotide가 상보적으로 결합할 수 있도록 디자인하였다. 두 개의

oligonucleotides는 T100 온도순환기에 의해 어닐링되었으며 클로닝을 위해 U6 promoter가 삽입되어 있는 pRG2z empty vector에 BsaI enzyme을 첨가하였다. 절단된 벡터는 ExpinTMGelSV(GeneallBiotechnology,Korea)를 사용하여 정제하였고 어닐링해준 oligonucleotides 와 T4 DNA ligase를 첨가하여 25℃ 배양을 통해 연결하였다. 클로닝된 벡터는 DH5 α chemically competent *E. coli*에 형질전환시킨 후 100 μ g/ml의 ampicillin sodium salt가 함유된 LB agar 배지에 도말해서 37℃에서 16 시간 이상 배양하였다. 자란 콜로니는 100 μ g/ml의 ampicillin sodium salt가 함유된 LB 배지에 키워준 후 플라스미드를 추출하였다.

[0053] 또한, LbABE8e(Addgene # 138504) 플라스미드의 서열정보를 참고하여 인간 코돈최적화(human codon-optimization) 방법을 통해 codon-optimized LbABE8를 제작한 후, 해당 LbABE8e 플라스미드에 site-directed metagenesis 방법을 통해 G532R, K595R, G532R/K595R 변이를 도입하였다. 이어서, DH5 α chemically competent *E. coli*에 형질전환시킨 후 플라스미드를 추출하였다. HEK293T 세포를 24-웰 플레이트에 형질전환(transfection) 24 시간전 분주하고, 각 웰마다 2 ug의 상기 플라스미드(1500ng gRNA 및 500ng LbABE8e)와 PEI를 함께 첨가하여 형질전환시켰다. 48 시간 후, 세포로부터 genomic DNA를 추출하였다.

[0054] 또한, 차세대 염기서열 분석을 위한 library를 하기와 같이 제작하였다:

[0055] Genomic DNA의 on-target loci은 해당 프라이머와 High-Fidelity DNA 중합효소를 사용하여 3 단계의 polymerase chain reaction (PCR; 중합 효소 연쇄 반응)을 걸쳐 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물을 정제해서 deep sequencing library로 제작되었다. PCR 프라이머는 Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>)와 IDT PrimerQuestTMTTool(<https://sg.idtdna.com/pages/tools/primerquest>)을 사용하여 디자인하였으며 Pooling 한 library는 MiniSeq (Illumina, San Diego, CA)을 사용하여 next generation sequencing (NGS)를 진행하였다.

[0056] 또한, 하기와 같이 데이터 분석 및 통계적 분석을 실시하였다:

[0057] Base editing frequencies는 각각 JavaScript based internal algorithm에 기반한 web-based CRISPR 분석 tool인 CRISPR RGEN tools (<http://www.rgenome.net/>)의 BEAnalyzer를 사용하여 분석하였다. genomic DNA 내에 일어나는 base editing 효율은 정확한 표적부위에서 계수된 (base editing수/전체 reads 수)로 정해진다. 모든 결과는 mean $\pm$ SEM (standard error of the mean)으로 표현하였으며, 통계적 분석은 GraphPad Prism 9.11로 진행하였다.

[0059] 실시예 2. 본 발명의 Cas12a의 비표준 PAM 의존적 활성 확인

[0060] 본 발명자들은, LbCas12a의 활성에 PAM 서열이 영향을 미치는지 확인하기 위해, 다양한 비표준 PAM을 포함하는 부위에서 LbCas12a의 게놈 편집 활성을 조사하였다.

[0061] 간략하게는, 비표준 PAM(TCTN, TTCN, TCCN, CTCN)과 표준 TTTN PAM을 포함하는 부위에서 TP53, APC, PIK3CA 게놈 유전자좌를 표적으로 하는 총 60개의 crRNA를 생성하였다. 그런 다음 LbCas12a를 코딩하는 플라스미드와 해당 crRNA를 HEK293T 세포에 주입하고 게놈 편집 효율을 타겟 딥 시퀀싱으로 측정하였다.

[0062] 그 결과, LbCas12a는, 각각 2.7% $\pm$ 1.0%, 10.1% $\pm$ 3.6%, 2.1% $\pm$ 0.7%, 0.4% $\pm$ 0.1%, 29.9% $\pm$ 3.5%의 빈도로 TCTN, TTCN, TCCN, CTCN 및 TTTN PAM이 있는 부위에서 활성을 나타낸 반면, 흥미롭게도 테스트된 비표준 PAM 중에서 TTCN을 가장 잘 인식하는 것으로 나타났다(도 1).

[0064] 실시예 2. 본 발명의 Cas12a 변이체에 의한 PAM 선호도 확인

[0065] 본 발명자들은, 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 LbCas12a 변이체의 활성에도 PAM 서열이 영향을 미치는지 조사하였다. 이때, 통계적으로 의미 있는 PAM 선호도 차이를 확인하기 위해 두 개의 추가 표적 부위에 TTTT PAM을 포함시켰다.

[0066] 그 결과, 야생형 LbCas12a는 TTTT PAM에 비해 TTTV를 더 선호하는 것으로 나타난 반면, LbCas12a-G532R이나 LbCas12a-G532R/K595R은 표준 PAM에서 네 번째 뉴클레오티드에 대한 선호도를 보이지 않았다. 또한, LbCas12a 변이체는 네 번째 위치에 T가 있는 모든 테스트된 비표준 PAM을 포함하는 부위에서 야생형 LbCas12a보다 더 높은 활성을 보였다(도 2A).

[0067] 또한, 흥미롭게도, LbCas12a와 그 세 가지 변이체는 비표준 PAM에서 네 번째 뉴클레오티드를 선호하지 않는 것

으로 나타났다(도 2B).

[0068] 또한, 야생형 LbCas12a에 의해 인식된 비표준 PAM(TCCT, TTCT, TCTT, CTCT, CCTT, CTTT, TTTT)은, 1.8% 내지 21% 범위로 평균 인텔 빈도를 유도한 반면, 놀랍게도 LbCas12a-G532R/K595R은 8.7% 내지 35.8% 범위로 평균 인텔 빈도를 유도했으며, 이는 이러한 변이체의 활성은 야생형 LbCas12a에 비해 증가함을 보여준다(도 2C 및 2D).

[0070] 실시예 3. 본 발명의 LbABE8e 변이체에 의한 유전자 편집 효과 확인

[0071] 본 발명자들은, 상기 결과들을 바탕으로, PAM 특이성을 변경하여 염기 편집기의 표적 범위를 확장함으로써 치료 유용성을 넓히기 위해, Cas12a 단백질과 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)인 LbABE8e 내 LbCas12a 부위에 하나 이상의 돌연변이를 도입시킨 LbABE8e 변이체를 제작하였고, 이에 의한 유전자 편집 효과를 확인하고자, 다양한 비표준 PAM이 있는 부위에서 아데닌 염기 편집을 유도할 수 있는지 조사하였다. 즉, LbABE8e는 LbCas12a 단백질에서 핵산분해활성이 결핍시킨 (catalytically dead) LbCas12a와 융합된 단량체 TadA-8e 변종(monomeric TadA-8e variant)으로 구성된 염기 편집기이다.

[0072] 또한, 본 발명의 LbABE8e 변이체는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Cas12a 단백질 변이체와 아데닌 탈아미노화효소(adenine deaminase)가 융합된 아데닌 염기교정 유전자가위 (Adenine Base Editor)이다.

[0073] 그 결과, 야생형 LbABE8e를 코딩하는 플라스미드와 해당 crRNA를 HEK293T 세포에 주입하여 20% 이상의 빈도로 LbCas12a-G532R/K595R에 의해 인텔이 생성되는 22개의 내인성 표적 부위에서 염기 편집 효율을 확인했을 때, 야생형 LbABE8e의 기본 편집 효율은 비표준 PAM이 있는 이러한 부위에서 0%에서 5.3%까지 다양했다(도 3A).

[0074] 이에, 비표준 PAM을 인식하는 데 있어 야생형 LbABE8e의 낮은 효율을 극복하기 위해, PAM 제약을 완화하는 적절한 아미노산 변화를 통해 PAM 선호도를 변경시킬 수 있도록, G532R 및/또는 K595R 돌연변이를 인간 코돈-최적화된 LbABE8e에 도입시켜 LbABE8e-G532R, LbABE8e-K595R, LbABE8e-G532R/K595R을 제작하였다.

[0075] 그 결과, 단일 돌연변이(G532R)를 야생형 LbABE8e에 도입하면 여러 PAM이 있는 부위에서 염기 편집 효율이 증가한 반면, LbABE8e에서 K595R 돌연변이의 영향은 미미했다(도 3B 및 3C). 이중 돌연변이를 도입하여 LbABE8e-G532R/K595R을 제작한 경우 테스트된 모든 PAM 서열이 있는 부위에서 야생형 LbABE8e에 비해 염기 편집 효율이 최대 14배까지 증가했다(도 3A 및 3D). 이중 G532R/K595R 돌연변이의 효과는 TTCC PAM이 있는 부위에서 두드러졌다. 이 부위에서 야생형 LbABE8e에 의한 편집 효율은 낮았지만, LbABE8e-G532R/K595R은 높은 편집 효율을 보였다(도 3D 및 3E).

[0076] 또한, 본 발명자들은 5% 이상의 빈도로 LbABE8e-G532R/K595R에 의해 A-to-G 변환이 생성된 6개의 게놈 부위에서 LbABE8e 변이체의 염기 편집 윈도우를 조사하였다. LbABE8e-G532R/K595R의 편집 윈도우는 야생형 LbABE8e의 편집 윈도우와 유사하였다. 프로토스페이서는 8-14번 위치(PAM에서 다운스트림으로 계산)에 걸쳐 있다(도 3F).

[0078] 또한, 추가적으로 대조군(Control)으로서, LbABE8e-G532A, LbABE8e-K595A 변이체를 제작하여 LbABE8e-G532R/K595R 변이체와의 효율을 비교분석한 결과, LbABE8e에 G532A 또는 K595A 변이체 도입으로 인한 유전자 교정 개선 효과는 관찰되지 않았다. 반면 LbABE8e에 G532/K595R 도입에 의한 유전자 교정 개선 효과가 관찰되었다(도 4).

[0079] 즉, 이러한 결과들은, LbABE8e, LbABE8e-G532R, LbABE8e-K595R, LbABE8e-G532A, LbABE8e-K595A, LbABE8e-G532R/K595R 변이체의 유전자 염기교정 효율을 비교분석한 결과, LbABE8e에 G532R/K595R 도입시킨 본 발명의 LbABE8e-G532R/K595R 변이체가 현저한 유전자 교정 개선 효과를 발휘함을 입증한다.

[0081] 실시예 4. 본 발명의 LbABE8e 변이체에 의한 발암성 유전자 편집 효과 검증

[0082] 본 발명자들은, 본 발명의 모든 LbABE8e 변이체 중에서 가장 높은 빈도의 염기 편집을 유도한 LbABE8e-G532R/K595R 변이체에 의해 유도된 유전자 교정이 인간 암세포주에서도 유도되는지 여부를 확인하였다.

[0083] HCT-15 CRC(Colorectal cancer) 세포에 존재하는 발암성 돌연변이를 조사하기 위해 세포에서 게놈 DNA를 분리하고 표적 심층 시퀀싱을 사용하여 암 관련 유전자의 염기 서열을 분석했다. 그 결과, 대립 유전자의 각각 48% ±

0.2%, 41% $\pm$ 1.2%, 50% $\pm$ 0.8%에 존재하는 APC(6496C-to-T), PIK3CA(1633G-to-A), TP53(722C-to-T)에서 미스센스 변이를 발견했다(도 5A). 이러한 삼중 발암성 돌연변이의 LbCas12a 매개 편집을 평가하기 위해 각각의 경우에 다양한 비표준 및 표준 PAM의 하류에 위치한 이러한 돌연변이 표적 서열과 혼성화되는 여러 crRNA를 설계했으며, 편집은 PAM에 따라 다른 빈도로 발생했다. APC, PIK3CA, TP53 유전자에서 가장 높은 인텔 빈도를 초래하는 각 crRNA를 LbCas12a-G532R, LbCas12a-K595R, 또는 LbCas12a-G532R/K595R과 함께 HCT-15 세포에 주입하여 LbCas12a 변이체의 게놈 편집 효율을 비교했을 때, crRNA와 결합된 LbCas12a-G532R/K595R이 가장 높은 빈도로 돌연변이 대립유전자 특이적 유전자 편집을 유도했다.

[0084] 다음으로, 각 종양 유전자에서 가장 높은 인텔 빈도를 초래하는 각각의 crRNA 인코딩 서열을 결합하여 APC, PIK3CA 및 TP53을 동시에 표적으로 하는 CRISPR 어레이를 생성했다. 스페이서의 GC 함량에 따라 가장 낮은 것부터 가장 높은 것, 즉 APC(GC 함량 35%), PIK3CA(39%), TP53(52%) 유전자를 표적으로 하는 순서로 세 가지 crRNA 인코딩 서열을 배열했다. 멀티플렉스 crRNA-V1은 3개의 스페이서 서열을 포함하고 있으며, 멀티플렉스 crRNA-V2는 스페이서 사이에 separators를 포함하고 있다. 또한, 프로모터 하류에 추가 separators를 포함하는 다중화된 crRNA-V3를 추가로 설계했다(도 5B). CRISPR 어레이 및 LbCas12a-G532R/K595R 인코딩 플라스미드를 HCT-15 세포에 감염시킨 후, 멀티플렉스 crRNA-V3가 가장 높은 활성과 연관되어 25.9% $\pm$ 2.4%의 결실 빈도를 나타냈으며 32.6% $\pm$ 2.9%, 43.3% $\pm$ 0.5%를 나타냈으며, 돌연변이 APC, PIK3CA, TP53 대립유전자에서는 각각 1.7배, 1.3배 증가하여 다중화된 crRNA-V1 및 -V2와 관련된 활성과 비교했을 때 각각 1.7배, 1.3배 증가했다(도 5C).

[0085] 또한, 다중화된 crRNA-V3 및 LbABE8e-G532R/K595R 인코딩 플라스미드로 HCT-15 세포를 처리하면 APC에서 2.3% $\pm$ 0.5%, PIK3CA에서 12.8% $\pm$ 2.9%, TP53에서 3.3% $\pm$ 0.4%의 빈도로 아데닌 염기 편집이 유도되어 발암성 미스센스 변이가 교정되었다(도 5D). 이러한 결과는 세 개의 separators가 있는 다중 CRISPR 어레이와 함께 LbABE8e-G532R/K595R을 사용하면 다중 유전자 편집을 성공적으로 유도할 수 있음을 시사한다.

[0087] 실시예 5. 본 발명의 LbABE8e 변이체에 의한 발암성 유전자 편집에 의해 매개된 암세포 증식 억제 효과

[0088] 본 발명자들은, 본 발명의 모든 LbABE8e 변이체 중에서 가장 높은 빈도의 염기 편집을 유도한 LbABE8e-G532R/K595R 변이체에 의해 유도된 유전자 교정, 즉, 이러한 삼중 발암 돌연변이 대립유전자에 대한 LbCas12a-유도 인텔 또는 LbABE8e 유도 염기 편집에 의해 암세포 증식을 감소시킬 수 있는지 조사하기 위해 MTT 세포 증식 분석을 수행하였다.

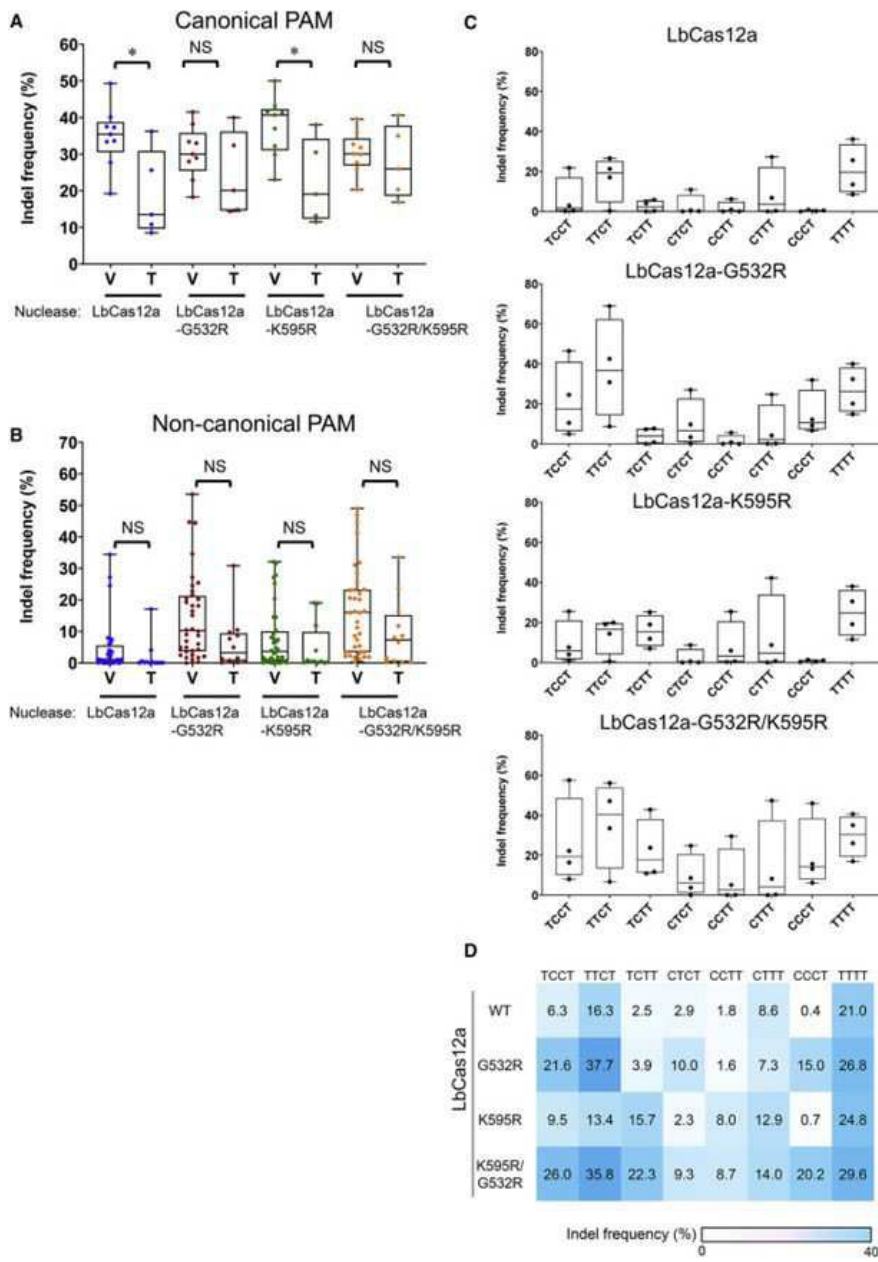
[0089] 그 결과, 다중화된 crRNA-V3 및 LbABE8e-G532R/K595R(LbABE8e variant)로 처리한 HCT-15 세포는 대조군에 비해 생존율이 현격하게 감소하였다(도 5E). 이러한 데이터를 종합해 볼 때, 다중 CRISPR 어레이로 여러 발암성 돌연변이를 LbABE8e를 매개로 교정하면 비정상적인 암세포 증식을 효율적으로 억제할 수 있음을 보여준다.

[0091] 종합적으로, 이러한 결과들은, G532R/K595R 변이를 도입함으로써 제작된 LbCas12a 변이체에 아데닌 탈아미노화 효소(Adenine Deaminase, ecTadA)를 융합시켜 구축한 본 발명의 아데닌 염기교정 유전자가위(Adenine Base Editors)(LbABE8e 변이체)가 종래 야생형 LbABE8e가 인지하지 못하거나 낮은 효율로 인지하는 특정 non-canonical PAM 서열을 개선된 효율로 인지하여 탁월한 유전자 교정 효율 상승 효과를 발휘하도록 한다는 것을 입증한다.

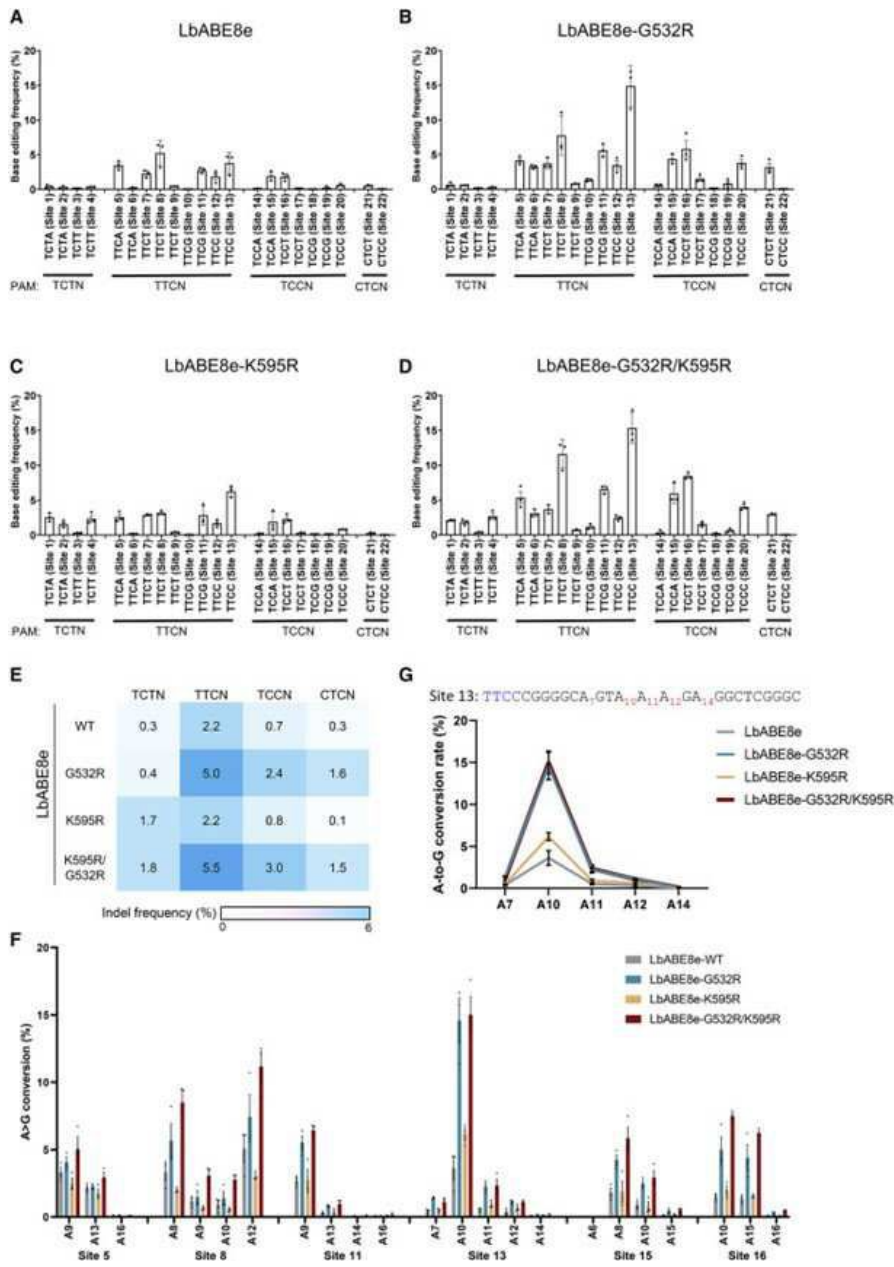
[0092] 따라서, 본 발명의 LbABE8e 시스템을 기반으로 유전체를 단일 뉴클레오타이드 수준에서 편집하는 방법은 향후 의학, 농업 등 다양한 분야에 단일 뉴클레오타이드 편집이 적용되는 데 기초가 될 수 있는 중요한 정보를 제공한다.

[0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

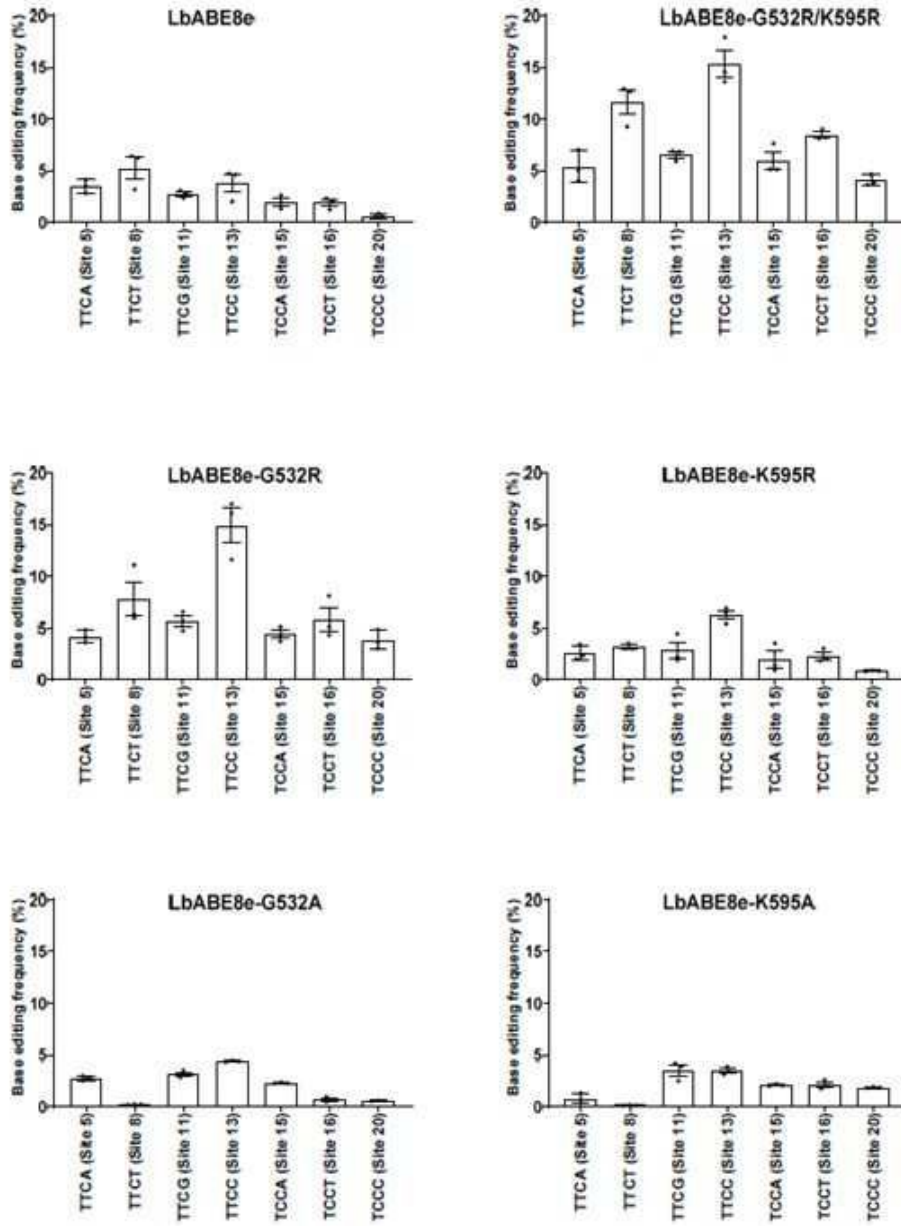
도면2



도면3



도면4



도면5

