

명세서

발명의 명칭: 자가 환형화 RNA 구조체

기술분야

- [1] 본 발명은 자가 환형화 RNA 구조체 등에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] Circular RNA (circRNA)는 공유 결합으로 연결된 단일 가닥의 전사물(transcript)로서, RNA-seq 데이터와 새롭게 개발된 생물정보학 접근법을 통해 다양한 생명체에서 수만 개가 넘는 종류의 circRNA가 확인되었다. 진핵생물에서 circRNA는 mRNA로부터 백스플라이싱(back-splicing)을 통해 생성되고, 생체 내에서 microRNA 스폰지(sponge) 기능을 수행하여 유전자 발현을 조절할 수 있음이 알려져 있다. circRNA가 면역원성을 유발하는지 여부는 알려져 있지 아니하며, 그 구조적 특성에 의해 생체 내에서 매우 안정적으로 존재한다.
- [4] 한편, 최근 messenger RNA (mRNA)를 이용한 치료제 개발이 활발하다. 그러나 mRNA는 생체 내에서 쉽게 분해되어 비교적 짧은 반감기를 갖는 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 mRNA에 poly(A)tail을 붙여 안정성을 향상시키는 등의 연구가 진행되고 있다. 같은 맥락에서 US 10,953,033는 circRNA의 구조적 특성에 기초하여 생체 내에서 유전자 발현을 목적으로 circRNA를 개시하고 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 자체적으로 표적화 및 스플라이싱 반응을 수행하여 환형화되는 RNA 구조체를 제공하는 것이다.
- [7] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 구조를 갖는 자가 환형화 RNA 구조체를 제공한다:
- [10] 5' - IGS (internal guide sequence) - 리보자임(Ribozyme) - 목적 유전자 (gene of interest) - 타겟 사이트(target site) - 3'.
- [11] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 IGS 영역은 타겟 사이트와 구아닌(Guanine, G) : 우라실(Uracil, U) 워블 염기쌍(wobble base pair)을 형성하고, 상기 워블 염기쌍을

- 형성하는 구아닌은 IGS 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 워블 염기쌍을 형성하는 우라실은 타겟 사이트 영역의 3' 말단에 위치할 수 있다.
- [12] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 IGS 영역은 5'-GNNNNN-3'의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 타겟 사이트 영역은 5'-N'N'N'N'U-3'의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다. 상기 IGS 영역의 N과 타겟 사이트 영역의 N'는 각각 독립적으로 A, G, C, 또는 U일 수 있으나, 바람직하게는 1개 뉴클레오티드 이상이 IGS 영역과 타겟 사이트 영역이 상보적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드일 수 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 IGS 영역의 염기 서열은 상기 구아닌을 제외하고 타겟 사이트의 영역의 염기서열과 역상보적일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 리보자임은 그룹 I 인트론 리보자임 (Group I intron ribozyme)일 수 있으며, 상기 리보자임은 서열번호 6의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 구조체는 IGS 영역의 5' 방향으로 연장된 뉴클레오티드를 포함하여 P1 helix 및 P10 helix를 형성하는 것일 수 있으며, 이때 P1 helix는 타겟 사이트의 3' 방향으로 연장된 뉴클레오티드와 함께 IGS 영역과 타겟 사이트의 상보적 결합이 이루어지는 영역에서 형성되고, P10 helix는 IGS 영역의 5' 방향으로 연장된 뉴클레오티드가 리보자임과 GOI 영역 사이에 위치하는 상기 연장된 뉴클레오타이드와 역상보적인 서열과 상보적 결합이 이루어지는 영역에서 형성될 수 있다. 상기 P1 helix를 형성하는 연장된 뉴클레오티드의 길이는 3-nt일 수 있으며, P10 helix를 형성하는 연장된 뉴클레오티드의 길이는 6-nt일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 구조체는 P1 helix는 형성하되 P10 helix는 형성하지 않는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 구조체는 5' 말단 및 3' 말단에 서로 상보적으로 결합할 수 있는 AS(antisense sequence) 영역과 ABS(antisense binding sequence) 영역을 포함할 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 ABS 영역은 AS 영역과 역상보적인(reverse complementary) 서열로 이루어질 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 AS 영역의 길이는 GOI에 따라 가변적일 수 있으나, 10 내지 500-nt, 바람직하게는 50-nt 초과 400-nt 미만, 더욱 바람직하게는 150-350nt 일 수 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 GOI 영역은 5' 말단에 IRES (internal ribosome entry site) 영역을 포함할 수 있으며, 개시코돈 및 종결코돈을 포함할 수 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 구조체는 무작위 염기서열로 이루어진 스페이서 (Spacer) 영역을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 스페이서 영역은 IGS 영역과 목적 유전자 영역 사이 및/또는 목적 유전자 영역과 타겟 사이트 영역

사이에 위치할 수 있다.

- [22] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 스페이서 영역은 poly(A)를 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있으며, poly(A)는 아데닌(A)이 반복적으로 연결된 폴리 뉴클레오티드로 상기 A는 10 내지 50회 반복하여 연결된 것일 수 있으며, 바람직하게는 30회 반복하여 연결된 것일 수 있다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체는 DNA 벡터에서 발현됨과 동시에 별도의 GTP 처리 없이도 self-targeting & splicing 반응을 통해 circularization되어 circRNA를 형성할 수 있으며, 상기 circRNA는 목적 유전자만으로 구성될 수 있으며, 상기 목적 유전자는 IRES 영역, 개시코돈 및 종결코돈을 포함하여 펩타이드 또는 단백질을 빠르게 발현할 수 있는 장점이 있다. 또한, circRNA는 원형의 구조로 5' 및 3' 말단이 노출되지 않으므로 안정적이고 높은 반감기를 가지며, miRNA, anti-miRNA, shRNA, aptamer, mRNA 백신, mRNA 치료제, 항체, 백신 보조제, CAR-T mRNA 등의 기능성 RNA를 circRNA로 제조하여 세포 내에서 높은 안정성을 갖도록 할 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1a와 도 1b는 IGS, 리보자임, 목적 유전자, 및 타겟 사이트 영역만을 포함하는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체가 self-targeting and splicing (STS) reaction에 의하여 circRNA로 형성되는 과정의 모식도이다.
- [27] 도 2a는 AS, IGS, 리보자임, 목적 유전자, 타겟 사이트, 및 ABS 영역을 포함하는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체가 STS reaction에 의하여 circRNA로 형성되는 과정의 모식도이다.
- [28] 도 2b는 transgene의 번역이 가능하도록 목적 유전자 영역에 IRES와 종결코돈을 포함하고, P1 helix 및 P10 helix를 형성할 수 있도록 5' 방향으로 연장된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체와 상기 구조체가 STS reaction에 의하여 circRNA로 형성되는 과정의 모식도이다.
- [29] 도 2c는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체의 일 형태이다.
- [30] 도 2d는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체 발현 벡터 제조를 위한 DNA template 염기서열이다.
- [31] 도 3은 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체 발현 벡터의 시험관 내 전사 후 즉시, 추가 GTP 처리 없이도, circRNA가 발생하는지 확인하기 위하여 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동한 결과이다. 전사 후 즉시(direct STS) 확보된 샘플과, 추가의 GTP를 처리하여 1차 및 2차 환형화 반응을 유도하는 1차 및 2차 STS 반응단계 이후의 샘플을 이용하였으며, 각 샘플의 일부는 RNase R을 처리하여 linear RNA를 제거함으로써 샘플 내 circRNA를 농축하여

전기영동하였다.

- [32] 도 4는 도 3의 결과에서 circRNA로 추정되는 Candidate 1이 circRNA임을 검증한 것으로서, 도 4a는 상기 candidate 1 밴드에서 RNA를 추출하고 RT-PCR을 수행한 결과이고, 도 4b는 상기 candidate 1 밴드에서 추출한 RNA의 염기서열분석 결과이다.
- [33] 도 5는 도 4의 결과에서 candidate 1 밴드의 RNA에 monomer임을 검증한 것으로서, 도 3의 결과에서 circRNA로 추정되는 candidate 1 및 2 밴드에서 RNA를 추출하고 Mg^{2+} 을 처리하여 nick을 유도한 후 전기영동한 결과이다.
- [34] 도 6은 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체 발현 벡터가 세포 내에서 circRNA를 생성하고 circRNA가 포함하는 transgene이 발현되는지 확인한 결과이다. 구체적으로, 도 6a는 상기 자가 환형화 RNA 구조체 발현 벡터의 구조이고, 도 6b는 luciferase activity assay를 통한 transgene의 발현을 확인한 결과이고, 도 6c 및 도 6d는 상기 transgene이 circRNA에서 발현된 것임을 검증한 RP-PCR 및 염기서열 분석 결과이다.
- [35] 도 7 및 도 8은 HPLC를 통한 circRNA 정제 조건 및 정제 결과이다.
- [36] 구체적으로, 도 7a는 Ultra HPLC 시스템을 이용한 HPLC 분석 조건이고, 도 7b는 시험관 내 전사 후 즉시 확보한 샘플을 컬럼 정제한 결과이고, 도 7c는 상기 샘플에 RNase R을 처리한 후 컬럼 정제한 결과이다. 또한, 도 8a는 컬럼 정제를 통해 확보한 fraction에서 peak를 확인한 결과이고, 도 8b는 도 8a에서 peak가 두드러진 7번, 10번, 11번, 12번, 및 13번 fraction의 전기영동 결과이다.
- [37] 도 9 및 도 10은 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체에서 AS 영역이 STS 반응 및 환형화에 미치는 영향을 확인한 것으로서, 도 9는 서로 다른 길이의 AS 영역을 포함하는 자가 환형화 RNA의 구조이고, 도 10은 상기 RNA를 발현하는 벡터의 시험관 내 전사 후 확보된 샘플의 전기영동 결과이다.
- [38] 도 11 및 도 12는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체에서 Spacer 영역이 STS 반응 및 환형화에 미치는 영향을 확인한 것으로서, 도 11은 대조군의 spacer (control spacer)과 다양한 길이의 poly(A) spacer를 포함하는 자가 환형화 RNA의 구조이고, 도 12는 상기 RNA를 발현하는 벡터의 시험관 내 전사 후 확보된 샘플의 전기영동 결과이다.
- [39] 도 13은 P1 영역만 포함하는 자가 환형화 RNA; P1 및 P10 영역만 포함하는 자가 환형화 RNA; 및 P1 영역, P10 영역, 및 AS 영역을 포함하는 자가 환형화 RNA;의 리보자임에 의해 cleavage 되는 영역 부근의 염기서열과 각 영역을 표시한 것이다.
- [40] 도 14는 P10 및 AS 영역이 없고 P1 영역만 포함하는 자가 환형화 RNA 발현 벡터 제작을 위한 DNA template의 염기서열이다.
- [41] 도 15는 도 13의 각 자가 환형화 RNA 발현 벡터의 시험관 내 전사 후 확보된 샘플을 전기영동한 결과이다.
- [42] 도 16a 및 도 16b는 P10 및 AS 영역이 없고 P1 영역만 포함하는 자가 환형화

RNA 발현 벡터에서 시험관 내 전사 후 자가 환형화 RNA 구조체가 circRNA로 형성됨을 전기영동을 통해 확인한 결과이다.

- [43] 도 17 내지 도 19는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체에서 P1 영역의 염기서열이 STS 반응 및 환형화에 미치는 영향을 확인한 것이다. 구체적으로, 도 17은 서로 다른 염기서열의 P1 영역을 설계한 것이고, 도 18은 상기 도 17의 P1 영역을 갖는 자가 환형화 RNA 발현 벡터의 시험관 내 전사 후 확보되는 샘플의 전기영동한 결과이며, 도 19는 AU-rich P1 영역을 갖는 자가 환형화 RNA 발현 벡터와 2-site P1 영역을 갖는 자가 환형화 RNA 발현 벡터의 시험관 내 전사 후 확보되는 샘플의 전기영동 결과로서, 원형 RNA를 확인하는 RT-PCR 전기영동 결과이다.

- [44] 도 20은 자가 환형화 RNA 구조체의 필수 구성만을 간결하게 나타낸 것으로서, 도 20a는 IGS, 리보자임 및 GOI 영역과 3' 말단에 우라실 염기만 포함하는 RNA 구조체 만으로도 circRNA 제작이 가능하며, 도 20b는 GOI의 3' 말단에 우라실 염기가 포함되어 있다면 단순히 IGS, 리보자임, 및 GOI 영역의 RNA 구조체 만으로도 circRNA 제작이 가능함을 나타낸 것이고, 이 경우 생성되는 circRNA는 GOI만으로 구성됨을 나타낸 모식도이다. 다시 말해, 도 20b는 GOI의 어느 부위에서든 5개의 유일한 염기서열 뒤에 우라실이 포함되어 있다면 그 부분을 3' 말단으로 해서 GOI의 3'쪽 나머지 부분을 리보자임의 바로 뒤로 보내 추가적인 우라실 없이 GOI만으로 원형 RNA가 구성되는 모식도이다.

[45]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 본 발명자들은 circRNA 제작 위하여 트랜스 스플라이싱 리보자임(trans-splicing ribozyme, T/S ribozyme)을 이용하여 목적 유전자를 탑재한 RNA가 스스로 타겟팅 및 스플라이싱 반응을 수행하여 환형화되는 시스템(이하 'Circularization system by self-targeting & splicing reaction')을 고안하였다(도 1a 및 도 1b).
- [47] 그룹 I 인트론 리보자임 (Group I intron ribozyme)은 두 번의 연속적인 trans-esterification 반응을 통해 표적 RNA를 절단한 후에 절단된 3' 말단에 별도로 존재하는 전사체를 서로 연결하여 trans-splicing을 유도할 수 있다.
- [48] 이에, 본 발명의 시스템은 목적 유전자(gene of interest, GOI)의 5' 방향에 내부 가이드 서열(internal guide sequence, IGS)를 구성하고 3' 방향에 타겟 사이트(target site)를 구성하여 상기 IGS가 타겟 사이트와 상보적 결합하도록 하되 구아닌(guanine, G) : 우라실(uracil, U) 위블 염기쌍을 형성시켜 GOI와 IGS 사이에 위치하는 ribozyme에 의한 절단 및 접합을 유도하여 circRNA를 제조할 수 있다(도 2a 및 도 2b).
- [49] 한편, 본 발명자들은 그룹 I 인트론 리보자임의 trans-splicing 효율 향상을 위한 이전의 연구(Mol Ther.2005 Nov;12(5):824-34.)에 착안하여 도 2c에 도식화된 바와 같이 자가 환형화 RNA 구조체의 5' 및 3' 말단에 서로 상보적 결합이 가능한

AS(antisense sequence) 영역과 ABS(antisense binding sequence)가 존재하고, 리보자임의 2차 구조 앞/뒤에 P1 및 P10 helix가 형성되도록 자가 환형화 RNA 구조체를 설계하고 T7 프로모터 하에서 상기 RNA 구조체를 발현할 수 있는 DNA template 제작하였다(실시예 1).

- [50] 이어서, 상기 DNA template를 삽입한 벡터를 제조하고 이를 시험관 내에서 전사(in vitro transcription, IVT)시킨 후 circRNA의 형성을 확인하였다. 그 결과, 상기 벡터는 자가 환형화 RNA 구조체를 발현하고, 상기 RNA 구조체는 GTP의 추가 없이도 전사 후 즉시 self-targeting and splicing (STS) 반응을 통해 monomer의 circRNA를 형성함을 알 수 있었다(실시예 2).
- [51] 나아가, 본 발명자들은 상기 자가 환형화 RNA 구조체 발현 벡터가 세포 내에서도 본 발명의 RNA 구조체를 발현하고, 발현된 RNA가 circRNA 형태로 탑재한 목전 유전자를 발현할 수 있는지 확인하고자 하였다. 구체적으로 세포 내에서 유전자(transgene)의 번역(translation)이 가능하도록 목적 유전자 내에 IRES 및 종결코돈을 포함시키고, gaussian luciferase를 목적 유전자 내에 transgene으로 이용하여 플라스미드 벡터를 제조하고, 상기 플라스미드 벡터를 세포 내에 형질전환시켜 circRNA의 생성 및 luciferase activity는 확인하였다. 그 결과, 제조된 플라스미드 벡터가 세포 내에서 자가 환형화 RNA 구조체를 발현하고, 상기 구조체는 리보자임에 의해 circRNA로 환형화되고, 상기 circRNA에서 목적 유전자가 발현됨을 분자 수준에서 확인할 수 있었다(실시예 3).
- [52] 이어서, 본 발명자들은 IVT상에서 즉각적으로 STS (direct STS) 반응을 통해 효율적으로 circRNA를 형성할 수 있도록 RNA 구조체 최적화를 시도하였다.
- [53] 먼저, 구체적인 실험을 통해 IVT상에서 AS 영역의 길이에 따른 direct STS 반응율을 확인하였다. 구체적으로 상기 AS 영역과 ABS 영역의 길이가 50, 100, 150, 200, 250, 또는 300-nt가 되도록 자가 환형화 RNA 발현 벡터를 제조하고 상기 벡터를 IVT 시킨 후 direct STS 효율을 확인하였다. 그 결과, 200-nt 이상의 길이에서 자가 환형화 효율이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 한편, 50, 100, 및 150-nt 길이에서 자가 환형화 효율은 유사하였으나, 50 또는 100-nt 길이의 AS 영역 및 ABS 영역을 포함하는 경우 시험관 내 전사 반응 자체가 감소함을 확인하였는바, cricRNA 제조 효율 측면에서 AS 영역과 ABS 영역의 길이는 150-nt가 바람직함을 확인하였다(실시예 5).
- [54] 한편, AS 영역 및 ABS 영역의 길이에 따른 circRNA 제조 효율을 확인한 것과 마찬가지로 IVT상에서 spacer 영역의 길이 및 염기서열에 따른 circRNA 제조 효율을 확인한 결과, 그 길이와 염기서열이 circRNA 제조 효율에 큰 영향을 미치지 않는으나 30개의 아데닌(A)이 연결된 것이 ribozyme과 EMCV IRES의 경우에서 ribozyme과 IRES의 좁은 간격으로 인해 발생할 수 있는 구조적 충돌을 만들지 않기에 충분함을 알 수 있었다(실시예 6).
- [55] 본 발명에서 리보자임은 연속적인 trans-esterification 반응이 가능한 그룹 I

인트론 리보자임을 이용하였다. 그룹 I 인트론 리보자임은 타겟 사이트 절단 후 절단된 3' 말단에 별도로 존재하는 전사체를 서로 연결하여 trans-splicing을 유도하는데, 자가 환형화 RNA 구조체에서는 별도로 존재하는 전사체가 아닌 GOI의 5' 부위를 절단된 3' 말단에 연결시키는 것인 바, trans-splicing 효율을 증가시키는 것으로 알려진 P1 및 P10 helix 영역과 자가 환형화 RNA 구조체 양 말단의 AS 영역 및 ABS 영역이 circularization 효율에도 긍정적인 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

- [56] 구체적으로, 본 발명자들은 P1 helix 영역만 포함하거나, P1 및 P10 helix 영역만 포함하거나, P1 및 P10 helix와 AS 영역을 모두 포함하는 자가 환형화 RNA 발현 벡터를 제조하고 상기 벡터를 IVT 시킨 후 direct STS 효율을 확인하였다. 그 결과, 놀랍게도 자가 환형화 RNA 구조체에 P10 helix 영역은 P1 helix와 P10 helix 영역의 존재 하에서 circRNA 제조 효율을 감소시킴을 알 수 있었다. 한편, AS 영역 없이 P1 helix 영역만 포함하는 경우에도 우수한 circRNA 제조 효율을 나타내었다(실시예 7).
- [57] 나아가, 본 발명자들은 최종 산물인 circRNA에 목적 유전자만 남길 수 있도록 IGS 만이 P1 helix를 형성하도록 자가 환형화 RNA 구조체를 설계하고 다양한 IGS 서열에서 STS 반응이 발생하는지 확인하였다. 그 결과, 놀랍게도 IGS 영역만이 P1 helix를 형성하는 경우에도 DNA 에서 발현된 자가 환형화 RNA 구조체의 STS 반응이 유도되었으며, 나아가 IGS 영역과 타겟 사이트 영역이 서로 상보적이지 않음에도 불구하고 circRNA가 형성됨을 확인하였다. 그러나, IGS 영역과 타겟 사이트 영역이 서로 상보적이지 않은 경우 원하지 않는 부위에서의 비특이적인 반응이 일어날 수 있어 원치않는 산물이 생성될 수 있다. 5'-GNNNNN-3'의 IGS 영역과 5'-N'N'N'N'U-3'의 타겟 사이트 영역은 서로 상보적 결합이 가능한 염기서열의 비율이 증가할수록 circRNA 제조 효율이 증가였으며, 특정 서열에서 보다 높은 circRNA 제조 효율을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 8).
- [58] 상기로부터, 본 발명자들은 도 1a에 도식화된 RNA 구조체만으로도 STS 반응을 통해 circRNA를 획득할 수 있으며, 도 20a에 도식화된 자가 환형화 RNA 구조체는 도 20b의 모식도와 같이 circRNA 전구체에서 GOI 3' 말단에 U 염기를 포함한 목적 유전자만으로 구성된 circRNA를 형성할 수 있음을 확인하였다.
- [59] 한편, P1 helix는 그룹 I 인트론 리보자임의 2차 구조 형성 시 리보자임의 전단(5' 방향) 방향에 연결된 염기서열과 리보자임에 의해 접합이 유도되는 전사체의 3' 방향의 염기서열이 상보적인 결합을 통해 형성되는 helix 구조를 의미하며, P10 helix는 상기 리보자임의 전단 영역과 리보자임에 의한 절단되는 전사체의 5' 방향의 염기서열이 상보적인 결합을 통해 형성되는 helix 구조를 의미한다.
- [60] 본 발명에서 P1 helix는 본 발명의 자가 환형화 RNA 구조체에서 5' 말단의 IGS와 3' 말단의 타겟 사이트의 상보적 결합을 통해 형성될 수 있고, P10 helix는 5' 말단의 연장된 염기서열과 리보자임의 후단(3' 방향)에 연결된 염기서열이

상보적인 결합을 통해 형성되는 helix 구조를 의미한다.

- [61] 본 명세서에서 P1 helix를 형성하는 염기서열을 P1 영역 또는 P1 helix 영역이라고 하며, 마찬가지로 P10 helix를 형성하는 염기서열을 P10 영역 또는 P10 helix 영역이라고 명명한다.
- [62] 본 발명에서 IGS 영역의 염기서열은 5'-GNNNNN-3' 이고, target site 영역의 염기서열은 5'-N'N'N'N'N'U-3'으로, P1 helix은 IGS 영역과 target site 영역이 서로 상보적으로 결합하여 형성될 수 있으며, 이때, 중복적인 표현을 배제하기 위하여 P1 helix 영역의 기술은 IGS 영역의 염기서열과 혼용하여 사용될 수 있다.
- [63] 본 발명에서 P1 helix는 상기 IGS 영역의 5' 방향으로 연장된 염기서열을 포함하여 형성될 수 있으며, 자연히 연장된 염기서열과 역상보적 서열의 염기서열이 target site의 3' 방향으로 연장되어 P1 helix를 구성한다. 이때, 상기 연장된 염기서열이 존재하는 경우 본 명세서에서는 IGS 영역과 구분을 위해 상기 연장된 염기서열 영역을 P1으로 표시한다. P10 helix의 경우도 마찬가지이다.
- [64] 한편, 본 발명에서 타겟 사이트(target site) 영역은 IGS 영역과 상보적인 결합을 하는 염기서열을 나타내기 위한 것으로서, IGS 영역의 염기서열 설계에 따라서 목적 유전자(GOI) 영역과 중첩될 수 있으며, 이때에도 IGS 영역과 상보적인 결합하는 영역을 특정하기 위하여 목적 유전자 내에서 IGS 영역과 상보적인 결합을 하는 영역을 타겟 사이트로 구분하여 명명한다. 환언하면, 본 발명에서 타겟 사이트는 목적 유전자 영역의 일부 또는 전부와 중첩되거나, 목적 유전자와 별도로 존재할 수 있다.
- [65] 본 발명에서 AS(antisense sequence) 영역은 자가 환형화 RNA 구조체의 5' 말단에 위치하여 상기 RNA 구조체의 3' 말단에 위치하는 ABS(antisense binding sequence) 영역의 염기서열과 수소결합을 목적으로 하는바, 본 발명에서 AS 영역은 ABS 영역과 필수적으로 공존하는 것으로서 AS 영역의 부존재는 ABS 영역의 부존재를 포함하는 의미로 이해되고, 마찬가지로 AS 영역을 포함하는 RNA 구조체는 ABS 영역도 포함하는 것으로 이해된다.
- [66] 한편, 본 발명자들은 자가 환형화 RNA 구조체의 STS 반응에 의한 환형화 효율에 있어 P1 영역, P10 영역, 및 AS 영역의 3중 구성 존부가 미치는 영향을 확인한 결과 P1 및 P10 영역과 AS 영역을 모두 포함하는 경우, P1 영역만 포함하는 경우, P1 및 P10 영역만 포함하는 경우의 순서로 circRNA 생성량이 많은 것을 확인하였으며, P1 영역만 포함하는 경우의 자가 환형화 RNA 구조체도 충분한 효율로 환형화 되어 circRNA를 생성함을 확인하였는바, 본 발명은 P1 영역만 포함된 경우의 자가 환형화 RNA 구조체를 제공한다.
- [67] 따라서, 본 명세서에서 P1 영역만 포함된 자가 환형화 RNA 구조체란 P10 영역과 AS 영역이 존재하지 않는 것을 의미하고 이외에 다른 구성을 배제하는 의미로 사용된 것은 아니다. 마찬가지로 P1 영역 및 AS 영역만을 포함하는 자가 환형화 RNA 구조체는 P10 영역이 존재하지 않는 것을 의미하는 것이고 P10

영역 이외의 다른 구성을 배제하는 의미로 사용된 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [68] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [69]
- [70] 실시예에서 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.
- [71]
- [72] 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.
- [73]
- [74] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [75]
- [76] [실시예]
- [77] 실시예 1. 자가 환형화 RNA 설계 및 상기 RNA 발현 벡터 제조
- [78] 자가 환형화 RNA는 도 2c와 같이 설계하고, 이를 발현하기 위한 DNA template에 시험관 내 전사 반응을 위하여 T7 promoter 서열을 추가로 포함시켰다(도 2d). 상기 DNA template는 T7 Circular Forward primer: 5'-GGGATTCGAACATCGATTAATACGACTCACTATAGGGGCATCGATTGAA TTGTCGA-3' (Tm = 77.5°C) 및 T7 Circular Reverse primer: 5'-AGATCTCTCGAGCAGCGCTGCTCGAGGCAAGCTT-3' (Tm = 79.4°C)을 이용하여 PCR로 증폭하고, 상기 DNA template 증폭 산물은 PstI 제한효소를

이용하여 pTOP TA V2 cloning vector (Enzymonomics)에 삽입하여 자가 환형화 RNA 발현 벡터를 제조하였다.

- [79]
- [80] 실시예 2. 시험관 내 전사 및 자가 환형화 확인
- [81] 2-1. 시험관 내 전사 (In vitro transcription, IVT)
- [82] 상기 실시예 1에서 제조한 자가 환형화 RNA 발현 벡터를 NEB의 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 시험관 내 전사를 수행하였다. 구체적으로, 20 uL scale (1 ug T7 DNA template, 1 X Reaction buffer, 10 mM each ATP, UTP, CTP, GTP, T7 RNA polymerase mix 2 ul)로 37°C에서 3시간 반응 후 29 uL의 Nuclease-free water를 추가한 다음 RNase-free DNase I (10 U/ul) 을 1 uL 넣어 37°C에서 30분 반응시켜 전사 후 즉각적인 circularization (direct STS) 반응을 유도하였다.
- [83] 이어서, 자가 환형화 반응이 완성되는 단계를 확인하기 위하여 추가의 circularization 반응을 유도하였다. 구체적으로, 첫번째 Self-targeting and splicing(1st STS) 반응을 유도하기 위하여 추가로 Nuclease-free water 28 uL와 20 uL의 5X STS buffer (50 mM Hepes (pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), 2 uL의 100 mM GTP (최종 2 mM)를 첨가해 100 uL의 볼륨을 만들어 37°C에서 1시간 동안 자가 환형화 반응을 시켰다. 그리고, 55°C에서 15분 가열한 다음 Monarch RNA cleanup kit (NEB)를 이용하여 컬럼 정제를 수행하였다. 컬럼 정제된 50 uL의 샘플에 다시 20 uL의 5X STS buffer, 100 mM GTP (최종 2 mM), Nuclease-free water 28 uL를 넣어 최종 100 uL를 만들고 37°C에서 3시간 반응시켜 두번째 STS(2nd STS) 반응을 유도하였다. 반응 후 55°C에서 8분 가열하고 Monarch RNA cleanup kit (NEB)를 이용하여 컬럼 정제를 수행하고, Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 제품)장비를 이용하여 농도를 측정하였다.
- [84] 한편, 반응 산물에서 linear RNA를 제거하기 위하여 첫번째 및 두번째 STS 반응 후 컬럼 정제된 샘플 중 일부에 대해 RNase R을 처리하였다. 구체적으로, 최대 100 ug 정도의 컬럼 정제된 IVT RNA에 10 uL의 10X RNase R reaction buffer (10X: 0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 1 M KCl, 1 mM MgCl₂), RNase R 20 Unit을 첨가하여 (물로 볼륨을 100 uL로 맞춤) 37°C에서 30분 반응시킨 다음 추가로 RNase R 10 unit을 첨가해 30분 더 반응시킨 후 Monarch RNA cleanup kit (NEB)를 이용하여 컬럼 정제를 수행하고 Nanodrop으로 농도를 측정하였다.
- [85] 각 STS 단계별로 얻은 RNA와 각 단계별로 얻은 RNA에 RNase R을 처리한 샘플 각 250 ng은 10 M Urea-BPB (1X TBE) dye와 1:1로 혼합하고 75°C에서 5분간 가열한 후 4% Polyacrylamide-7 M Urea denature PAGE (50°C 온도 유지하며 50 W 조건으로 2시간 전기영동)를 수행하고, Gel을 SYBR Gold Nucleic Acid Stain 제품 (Thermo Fisher Scientific)으로 염색하여 ImageQuant 800 (Cytiva 제품)을 이용하여 분석하였다.
- [86] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, RNase R을 처리하면 RNase R에 잘

잘리지 않아 풍부해지는 RNA 밴드가 나타났으며 (Candidate 1), 이 밖에 RNase R 처리에도 불구하고 뚜렷하게 관찰이 가능한 밴드들이 확인되었다 (Candidate 2 및 Nicked circular RNA로 추정되는 밴드). 또한, 추가적인 1st 및 2nd STS 반응을 수행하지 않아도 이미 direct STS 반응, 즉 시험관 내 전사 반응만으로 circRNA로 추정되는 물질이 충분히 만들어짐을 확인할 수 있었다.

[87]

[88] 2-2. 자가 환형화 확인

[89] 이어서, 상기 PAGE 수행 결과에서 RNase R에 의해 절단되지 않는 RNA 밴드 중에서 Candidate 1이 circRNA임을 검증하기 위하여 RT-PCR 염기 서열 분석을 수행하였다. 구체적으로 상기 PAGE 에서 Candidate 1 위치의 밴드를 잘라 으갠 후 37°C에서 3시간에서 최대 16시간까지 물에 elution하여 Ethanol precipitation으로 정제한 Circular RNA 샘플과 Ribozyme 부위와 antisense부위가 존재하지 않아 원형화될 수 없는 linear RNA를 대조구로 하여 오직 circRNA가 만들어졌을 때에만 PCR 증폭이 가능한 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[90] Reverse transcription (RT)은 OneScript Plus RTase (Abm)을 이용하였으며, 125 ng의 각각의 RNA (Control RNA와 Circular RNA로 추정되는 RNA에 RNase R을 처리하거나 처리하지 않은 샘플)를 70°C에서 5분간 가열 후 얼음에 두고 순서대로, 5X RT buffer 4 uL, 10 mM dNTP mix 1 uL, 2 uM reverse primer (Circular STS R) 1 uL, 및 OneScript Plus RTase 200 U을 넣어 최종 20 uL의 볼륨으로 50°C에서 15분간 반응시키고, 95°C에서 5분간 가열하여 효소를 비활성화 시킨 후 얼음에 보관하였다.

[91] 이어서, AccuPower Taq PCR premix (바이오니아)을 이용하여 PCR을 수행하였으며, 2 uL의 RT 샘플과 20 uM의 Circular STS F (5'-CCCTGAGTGGCTGAGCTCAGG-3') 및 Circular STS R (5'-CAGCAAGCATACTAAATTGCCAG-3')을 1 uL 씩을 넣고 물로 20 uL 볼륨을 맞춰 95°C 1 분, [95°C 30초, 65°C 30초, 72°C 30초] 35 cycles, 72°C 5분의 조건으로 PCR 증폭을 수행하였다. 5 uL의 PCR 산물은 1 uL의 6X DNA loading dye에 넣어 150 V로 35분 전기영동 후, gel imaging system (영인과학의 Davinch-Gel 제품)으로 이미지를 분석하였다. 예상되는 STS PCR 산물의 길이는 479 bp이며 1.5% agarose gel (인트론바이오 제품인 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution가 1X 농도로 함유)에서 GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)로 분석했을 때 Circular RNA로 추정되는 RNA 샘플의 경우에만 RNase R 처리에 관계없이 예측되는 사이즈의 특이적인 PCR 산물이 관찰되었다(도 4a).

[92] 또한, 얻어진 예상되는 사이즈의 밴드에서 gel extraction kit (코스모진텍 제품)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 PCR 산물을 분리 및 정제하고, TOPcloner TA-Blunt kit (엔지노믹스 제품)를 이용하여 클로닝하고 DH5alpha 대장균 (Chemically competent E. coli, 엔지노믹스 제품)에 형질 전환하여 LB-Agar

(Kanamycin 포함) 플레이트에서 대장균 colony를 얻고 plasmid DNA를 DNA purification kit (코스모진텍 제품)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출 및 정제하여 염기서열 분석을 의뢰한 결과 (코스모진텍 회사의 Sanger sequencing 서비스, 업체에서 제공하는 M13R (-40) 혹은 M13F(-20) universal primer를 이용), Gaussia Luciferase의 3' 과 IRES의 5'이 STS junction 부위에서 정확히 연결된 것을 확인할 수 있었다(도 4b).

- [93] 상기 결과로부터, Candidate 1이 원형의 RNA임을 알 수 있다.
- [94]
- [95] 2-3. 자가 환형화 재검증
- [96] RT-PCR을 통해 Candidate 1이 circRNA임을 확인하였으나, 이론적으로 상기 candidate 1이 dimer의 형태일 가능성을 배제할 수 없다. 이에, nicking test를 수행하여 Candidate 1이 circRNA임을 재검증하고자 하였다.
- [97] 정제된 원형 RNA candidate 1과 2 (100 ng)에 $MgCl_2$ 를 각각 최종 0, 2.5, 5 mM로 섞어주고 최종 10 μ L의 물에 존재하는 샘플을 65°C에서 30분간 가열한 다음 얼음에 잠시 보관한 후, 10 μ L의 10 M Urea-BPB (1X TEB) loading dye를 섞어 주었다.
- [98] 75°C에서 5분간 가열한 후 4% Polyacrylamide-7 M Urea denature PAGE (50°C 온도 유지하며 50 W 조건으로 2시간 전기영동)를 수행하고, Gel을 SYBR Gold Nucleic Acid Stain 제품 (Thermo Fisher Scientific)으로 staining하여 ImageQuant 800 (Cytiva 제품)을 이용하여 분석한 결과는 도 5와 같다.
- [99] Candidate 1의 경우 Mg^{2+} 가 없는 조건에서 약간의 nicked circular RNA에 해당하는 사이즈의 밴드가 포함되어 있었고 (1092-nt), 2.5 mM Mg^{2+} 조건의 경우 원형 RNA의 위치로 여겨지는 Candidate 1 위치의 밴드가 줄어들음을 확인하였고 여전히 nicked circular RNA 사이즈의 밴드가 존재함을 확인하였다. 5 mM Mg^{2+} 조건의 경우 nicked circular RNA 밴드까지 가수분해에 의해 전부 사라짐을 확인할 수 있었다. 이를 통해 Candidate 1 즉 원형 RNA가 nicking이 일어났을때 monomer로 예상되는 1092-nt 사이즈를 거쳐 (2.5 mM Mg^{2+}) 결국 전부 분해됨 (5 mM Mg^{2+})을 관찰하였으므로 Candidate 1이 원형 RNA이며 monomer인것을 재확인할 수 있었다.
- [100] 한편, Candidate 2는 intact RNA 사이즈인 1874-nt에 유사한 사이즈 (마커의 2000-nt 주위)를 가지며, 2.5 mM Mg^{2+} 조건의 mild한 nicking 조건에서 Candidate 1과는 다르게 nicked circular RNA의 사이즈인 1092-nt 밴드가 생성되지 않고 사라져 버렸는바, 원형 RNA가 아님을 알 수 있었다.
- [101]
- [102] 실시예 3. 세포 내 전사 및 자가 환형화 확인
- [103] 실시예 2에서 실시예 1에서 제조한 자가 환형화 RNA 발현 벡터가 시험관 내에서 전사되어 circRNA를 형성함을 확인하였는바, 상기 벡터가 세포 내에서도 동일하게 작동하는지, 나아가 circRNA가 포함하는 목적 유전자가 세포 내에서

원활하게 발현되는지 확인하고자 하였다.

- [104] 세포 내에서 목적 유전자의 발현을 위해 목적 유전자는 5'-EMCV IRES-transgene-stop codon-3'의 구조로 설계하고, 발현된 목적 유전자의 용이한 확인을 위하여 transgene으로는 gaussian luciferase (G.luci)을 이용하였다.
- [105] 상술한 목적 유전자를 포함하는 자가 환형과 RNA 구조체를 설계하고, 이를 발현할 수 있는 DNA template를 pCMV promoter의 하에서 발현되도록 플라스미드에 삽입하였다(도 6a). 상기 플라스미드 벡터를 293A 세포에 transfection하고, circRNA의 생성을 RT-PCR 및 염기서열 분석을 통해 확인하고, transgene의 발현은 luciferase activity assay를 수행하여 확인하였다.
- [106] 구체적으로, 6 well plate에 2×10^5 /well로 293A 세포를 seeding 하고 24시간 뒤에 lipofectamine 2000 transfection reagent를 이용하여 상기 플라스미드 벡터로 형질전환하였다. 형질전환 6시간 후 배양액을 교체하였다. 그리고, 형질전환 후 12, 24, 및 48 시간에 100 uL 배양액을 회수하여 G.luci activity를 측정하였다. 배양액에서 G.luci 활성이 검출되었고, 시간이 지남에 따라 활성이 증가함을 확인하였는바, 세포 내 도입된 벡터에서 transgene인 G.luci 유전자가 발현되었음을 확인하였다(도 6b).
- [107] Transgene의 발현이 circRNA의 형성에 의한 것인지를 RT-PCR과 염기서열 분석을 통해 분자 수준에서 확인하였다. 형질전환 후 48시간 시간 뒤, 상기 플라스미드 벡터가 도입된 293A 세포에서 trizol reagent를 이용하여 total RNA를 추출한 뒤, RT-PCR을 수행하여 원형 RNA가 생성되었음을 확인하였다.
- [108] Reverse transcription (RT)은 OneScript Plus RTase (Abm 제품)을 이용하였으며, 1ug의 total RNA를 70°C에서 5분간 가열 후 얼음에 두고 순서대로, 5X RT buffer 4 uL, 10 mM dNTP mix 1 uL, 2 uM reverse primer (Circular STS R) 1 uL, OneScript Plus RTase 200 U을 넣어 최종 20 uL의 볼륨으로 50°C에서 15분간 반응시키고, 95°C에서 5분간 가열하여 효소를 비활성화 시킨 후 얼음에 보관하였다.
- [109] 이어서, AccuPower Taq PCR premix (바이오니아 제품)을 이용하여 PCR을 수행하였으며, 2 uL의 RT 샘플과 20 uM의 Circular STS primer F (5' - caaggacttgagcccatggagcag - 3')와 primer R (5' - tgtgccgccttgcaggtgtac - 3')를 1 uL 씩을 넣고 물로 20 uL 볼륨을 맞춰 95°C 1 분, [95°C 30초, 65°C 30초, 72°C 30초] 35 cycles, 72°C 5분의 조건으로 PCR 증폭을 수행하였다. 예상되는 STS PCR 산물의 길이는 479 bp이며 1.5% agarose gel (인트론바이오 제품인 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution가 1X 농도로 함유)에서 GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific 제품)로 분석했을 때 Circular RNA가 존재할 경우에만 예측되는 사이즈의 특이적인 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 이때, 5 uL의 PCR 산물은 1 uL의 6X DNA loading dye에 넣어 150 V로 35분 전기영동 후, gel imaging system (영인과학의 Davinch-Gel 제품)으로 이미지를 분석하였다(도 6c).
- [110] 또한, 얻어진 예상되는 사이즈의 밴드는 gel extraction kit (코스모진텍 제품)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 PCR 산물을 분리 및 정제하고 TOPcloner

TA-Blunt kit (엔지노믹스 제품)와 이용하여 클로닝하고 DH5alpha 대장균 (Chemically competent E. coli, 엔지노믹스 제품)에 형질 전환하여 LB-Agar (Kanamycin 포함) 플레이트에서 대장균 colony를 얻고 plasmid DNA를 DNA purification kit (코스모진텍 제품)과 매뉴얼을 이용하여 추출, 정제하여 염기서열 분석을 의뢰한 결과 (코스모진텍 회사의 Sanger sequencing 서비스, 업체에서 제공하는 M13R (-40) 혹은 M13F(-20) universal primer를 이용), Gaussia Luciferase의 3' 과 IRES의 5'이 STS junction 부위에서 정확히 연결된 염기서열을 확인할 수 있었다(도 6d).

- [111] 상기로부터, 제조된 플라스미드 벡터가 세포 내에서 자가 환형화 RNA 구조체를 발현하고, 상기 구조체는 리보자임에 의해 circRNA로 환형화되고, 상기 circRNA에서 목적 유전자가 발현됨을 분자 수준에서 확인할 수 있었다.
- [112]
- [113] 실시예 4. circRNA 정제
- [114] 4-1. HPLC 수행으로 circRNA 정제 가능성 확인
- [115] 인체 주입을 위한 circRNA 제조에 있어 면역원성 발생을 최소화하기 위하여 HPLC를 이용한 분석 및 정제를 수행하였다. 구체적으로, agilent 1290 Infinity II Bio UHPLC 시스템을 이용하였으며 분석 조건은 도 7a와 같다. 분석의 경우 [Analytical]의 gradient 조건을 사용하였으며, 샘플의 분취는 [Fraction collection]의 조건을 사용하였다.
- [116] IVT를 하고나서 Monarch RNA cleanup kit (NEB)를 사용해 컬럼 정제만 한 RNA(도 7b)와 RNase R을 처리한 RNA(도 7c)를 분석해 보았을 때 RNase R을 처리한 샘플에서 증가하는 peak이 존재하며 이로부터 RNase R 처리 없이도 circRNA를 HPLC로 분리할 수 있음을 알 수 있었다.
- [117]
- [118] 4-2 HPLC 수행으로 circRNA 정제
- [119] HPLC를 통해 fraction collection 조건에 나와있는 gradient를 이용하여 분취하였고 도 8a와 같이 각각의 fraction을 확보하였다. Peak가 확인한 7번, 및 10번 내지 13번 fraction을 4% denature PAGE에서 각 200 ng씩 걸어 앞선 방법과 동일하게 전기영동을 수행하였다.
- [120] 그 결과, 도 8b에서 확인할 수 있는 바와 같이, fraction 12에서 깨끗한 circular RNA가 분리 정제되었다.
- [121]
- [122] 실시예 5. AS(antisense sequence) 영역 최적화
- [123] 시험관 내 전사 과정 중에서 즉각적인 환형화 반응에 AS(antisense sequence) 영역과 이에 역-상보적인(reverse complementary) ABS(antisense binding sequence) 영역의 길이가 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이에, AS 영역과 ABS 영역의 길이를 50, 100, 150, 200, 250, 또는 300-nt로 달리하는 DNA template를 제작하고(도 9), 실시예 1과 동일하게 각각의 RNA 구조체를 발현할 수 있는

백터를 제조하고, 실시예 2와 동일하게 37°C에서 3시간 동안 시험관 내 전사를 수행하고 즉각적인 STS 반응 정도를 4% Polyacrylamide-7 M Urea gel(20 x 20 cm, 1 mm)에서 PAGE를 수행하여 Relative band intensity로 비교확인하였다.

[124] 각 AS 영역의 염기서열은 아래 표 1에 나타내었다.

[125] [표1]

구분	염기서열(5' --> 3')
AS50	AAGTTAGGGCCTTCTGTGCCATTCATGGCTGTGGCCCTTGTG GCTGACCC
AS100	ACTCGAAGTGGCTGCGTACCACACCCGTCGCATTGGAGAAG GGCACGTAGAAGTTAGGGCCTTCTGTGCCATTCATGGCTGT GGCCCTTGTGGCTGACCC
AS150	GGCGGCCAGCATGGAGAACTGCCATGGCTCAGCCAGGTAGT ACTGTGGTACTCGAAGTGGCTGCGTACCACACCCGTCGCA TTGGAGAAGGGCACGTAGAAGTTAGGGCCTTCTGTGCCATT CATGGCTGTGGCCCTTGTGGCTGACCC
AS200	AGCGTGAGGAAGTTGATGGGGAAGCCCAGCACGATCAGCA GAAACATGTAGGCGGCCAGCATGGAGAACTGCCATGGCTCA GCCAGGTAGTACTGTGGTACTCGAAGTGGCTGCGTACCAC ACCCGTCGCATTGGAGAAGGGCACGTAGAAGTTAGGGCCTT CTGTGCCATTCATGGCTGTGGCCCTTGTGGCTGACCC
AS250	GGATGTAGTTGAGAGGCGTGCGCAGCTTCTTGTGCTGGACG GTGACGTAGAGCGTGAGGAAGTTGATGGGGAAGCCCAGCA CGATCAGCAGAAACATGTAGGCGGCCAGCATGGAGAACTG CCATGGCTCAGCCAGGTAGTACTGTGGTACTCGAAGTGGC TGCGTACCACACCCGTCGCATTGGAGAAGGGCACGTAGAAG TTAGGGCCTTCTGTGCCATTCATGGCTGTGGCCCTTGTGGCT GACCC
AS300	GGTGAAGCCACCTAGGACCATGAAGAGGTCAGCCACGGCTA GGTTGAGCAGGATGTAGTTGAGAGGCGTGCGCAGCTTCTTG TGCTGGACGGTGACGTAGAGCGTGAGGAAGTTGATGGGGA AGCCCAGCACGATCAGCAGAAACATGTAGGCGGCCAGCAT GGAGAACTGCCATGGCTCAGCCAGGTAGTACTGTGGTACT CGAAGTGGCTGCGTACCACACCCGTCGCATTGGAGAAGGGC ACGTAGAAGTTAGGGCCTTCTGTGCCATTCATGGCTGTGGCC CTTGTGGCTGACCC

- [126] 그 결과, 도 10 및 하기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, AS50, AS100, AS150의 경우 자가 환형화 효율이 AS200이상의 길이에 비해 상대적으로 우수하였다. 한편, AS50과 AS100은 시험관 내 전사 반응이후 생산된 전체 RNA 현저하게 적었다. 따라서, 자가 환형화 RNA 구조체 발현 및 원형의 RNA 제작에 있어 AS150이 가장 최적의 길이임을 알 수 있었다.

- [127] [표2]

AS series	AS50	AS100	AS150	AS200	AS250	AS300
A: 생성된 Total RNA 양 (μg)	69.5 ± 1.77	9.15 ± 0.46	176.5 ± 3.89	140 ± 3.54	133 ± 2.83	141 ± 5.66
B: Relative band intensity of circular RNA (%)	6.35 ± 0.25	6.75 ± 0.04	5.95 ± 0.18	4.30 ± 0.07	4.20 ± 0.07	3.60 ± 0.14
Relative factor (A * B)	441	62	1050	602	559	508

- [128] 실시예 6. Spacer 영역 최적화

- [129] 이어서, 시험관 내 전사 과정 중에서 즉각적인 환형화 반응에 spacer 영역의 길이 또는 종류가 미치는 영향을 확인하고자, 서로 다른 길이 및 염기서열의 spacer 영역을 포함하는 DNA template를 제작하고(도 11), 실시예 1과 동일하게 각각의 RNA 구조체를 발현할 수 있는 벡터를 제조하고, 실시예 2와 동일하게 37°C에서 3시간 동안 시험관 내 전사를 수행하고 즉각적인 STS 반응 정도를 4% Polyacrylamide-7 M Urea gel(20 x 20 cm, 1 mm)에서 PAGE를 수행하여 Relative band intensity로 비교확인하였다. 각 spacer 영역의 염기서열은 하기 표 3과 같으며, 본 실험에서 A10, A30, 및 A30의 spacer는 spacer 영역의 바로 뒤에 IRES 삽입을 위하여 3' 말단에 제한 인식 부위(restriction site)을 부가하여 이용하였다. 본 실험에서는 spacer의 3'말단에 AatII site (GACGTC)를 부가하여 이용하였다.

- [130] [표3]

구분	염기서열(5' --> 3')
A10	AAAAAAAAAA
A30	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A50	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA
Control spacer 1	GGTAGTGGTGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA
Control spacer 2	GGTAGTAACTACTAACTACAACCTGCTGAAGCA

- [131] 그 결과, 도 12 및 하기 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, spacer의 길이와 sequence 차이에도 불구하고 시험관 내 전사 과정에서 즉각적인 환형화 효율에 큰 차이를 나타내지 않았으나, 자가 환형화 RNA 구조체 발현 및 원형의 RNA 제작에 있어 A30이 가장 최적의 spacer로 작동함을 알 수 있었다.

- [132] [표4]

AS150 Spacer version	A10	Control spacer 1	Control spacer 1	A30	A50
A: 생성된 Total RNA 양 (μg)	199.5 ± 9.19	199.5 ± 6.36	187 ± 5.66	190 ± 8.49	192.5 ± 0.71
B: Relative band intensity of circular RNA (%)	5.55 ± 0.35	6.7 ± 0.14	6.15 ± 0.07	6.5 ± 1.27	5.7 ± 0.85
Relative factor (A * B)	1106 ± 19	1311 ± 70	1150 ± 21	1240 ± 297	1097 ± 160

- [133] 실시예 7. 자가 환형화 RNA 구조체 최적화
- [134] 7-1. AS 영역, P1 helix, 및 P10 helix 영역
- [135] 실시예 1에서 설계한 자가 환형화 RNA 구조체는 AS 영역, P1 helix, 및 P10 helix 영역을 포함한다. 이하, 각 구성이 시험관 내 전사 과정 중에서 즉각적인 환형화 반응에 미치는 영향을 확인하고자 도 13에 도식화한 것과 같이 P1 helix 영역만 포함하거나, P1 및 P10 helix 영역만 포함하거나, P1 및 P10 helix와 AS 영역을 모두 포함하는 DNA template를 제작하고 실시예 1과 동일하게 각각의 RNA 구조체를 발현할 수 있는 벡터를 제조하고, 실시예 2와 동일하게 37°C에서 3시간 동안 시험관 내 전사를 수행하고 즉각적인 STS 반응 정도를 4% Polyacrylamide-7 M Urea gel(20 x 20 cm, 1 mm)에서 PAGE를 수행하여 Relative band intensity로 비교확인하였다.
- [136] P1 helix 영역만 포함하는 T7 DNA template의 염기서열은 도 14과 같다.
- [137] 그 결과, 도 15 및 하기 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각각의 벡터가 시험관 내 전사 생성된 총 RNA 에는 큰 차이가 없었으나, P1 및 P10 helix와 AS 영역을 모두 포함하는 경우, P1 helix 영역만 포함하는 경우, P1 및 P10 영역만 포함하는 경우의 순서로 원형 RNA 생성량이 많은 것을 알 수 있었다.

[138] [표5]

AS150	P1 (No AS)	P1&P10 (No AS)	P1&P10 (AS150)
A: 생성된 Total RNA 양 (μg)	200	196	182
B: Relative band intensity of circular RNA(%)	3.2	0.5	5.1
Relative factor (A * B)	640	98	928

[139]

[140] 7-2. P10 및 AS 영역을 포함하지 않는 자가 환형화 RNA 구조체의 환형화 검증

[141] 실시예 7-1의 결과로부터 P10 및 AS 영역을 포함하지 않는 DNA template(P1 구조체)에서 시험관 내 전사 과정 중에서 추가적인 circularization 단계 없이도 충분한 circRNA를 제조할 수 있음을 알 수 있다. 이를 검증하기 위하여 실시예 7-1의 STS 반응 후 산물에 RNase R을 처리하여 linear RNA를 제거하고 앞선 실험과 동일하게 PAGE를 수행하고, 실시예 2-2와 동일하게 RT-PCR 및 염기서열 분석을 수행하였다.

[142] 그 결과, 도 16a 및 도 16b에서 확인할 수 있는 바와 같이, P1 구조체를 이용해 자가 환형화를 수행한 경우에도 RNase R을 처리하면 RNase R에 잘 잘리지 않아 풍부해지는 RNA 밴드가 관찰되었으며, 상기 밴드에 STS 반응 산물을 RT-PCR과 염기서열 분석을 수행한 결과, circRNA임을 확인하였다.

[143]

[144] 실시예 8. P1 helix 영역 최적화

[145] 실시예 7의 결과를 통해 P10과 AS 및 ABS가 없는 자가 환형화 구조체도 충분하게 circRNA를 만들 수 있음을 확인하였다. 이에, P1 helix를 구성하는 5' 말단에 존재하는 Internal Guide Sequence (IGS)와 3' 말단에 존재하는 target site의 염기서열만 서로 상보적으로 결합하게 하면 (U와 G는 wobble base pair) 원형 RNA가 생성될 것으로 가정하고 이를 검증하고자 하였다.

[146] IGS 영역은 GNNNNN이고, Target site 염기서열은 N'N'N'N'U이기 때문에 GOI에 U 한 개의 뉴클레오타이드만 추가하면 최종적으로 생성되는 circRNA는 한 개의 U 염기와 GOI 영역만으로 구성된다. (도 1a 및 도 1b). 또한, GOI의 3' 말단이 U 염기로 끝나는 경우 IGS 영역의 염기서열을 GOI와 역상보적으로 설계함으로써 최종적으로 생성되는 circRNA가 GOI 영역만으로 구성되도록 제작할 수 있다 (도 20a 및 도 20b).

[147] 도 17에 나타낸 바와 같이 IGS와 target site의 서열을 다양하게 설계하고 실시예 1의 방법으로 벡터를 제조한 후 실시예 2-1의 시험관 내 전사를 수행하였다.

[148] 그 결과, 도 18-19 및 하기 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 양쪽 말단이

Complementary한 시퀀스를 가진 경우 시험관 내 전사 후 즉각적인 STS 반응을 통해 생성된 circRNA 증가를 확인할 수 있었으며, No-complement IGS 영역을 포함하는 벡터는 매우 낮은 수준의 circRNA를 생성함을 알 수 있었다. 상기로부터, IGS와 target site는 서로 상보적이라면 모두 효율적으로 자가 환형화 반응을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[149] [표6]

P1 variants (No AS)	AS150 (P1&P1 0)	RZ004	RZ001	RZ003	GC-rich	AU-rich	2 sites	No complement
Relative band intensity of circular RNA(%)	5.4	3.7	7.9	6.6	5.4	11.6	6.1	1

[150]

[151] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[152] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

[153]

산업상 이용가능성

[154] 본 발명은 시험관 내, 세포 내, 및 생체 내에서 단백질 발현을 위한 circRNA 제조에 이용될 수 있으며, miRNA, anti-miRNA, shRNA, aptamer, mRNA 백신, mRNA 치료제, 항체, 백신 보조제, CAR-T mRNA 등의 기능성 RNA를 circRNA로 제조하는 것에 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 자가 환형화 RNA 구조체로서,
 상기 구조체는 5' - IGS (internal guide sequence) - 리보자임(Ribozyme) -
 목적 유전자 (gene of interest) - 타겟 사이트(target site) - 3'의 구조를
 가지며,
 상기 IGS 영역은 타겟 사이트와 구아닌(Guanine, G) : 우라실(Uracil, U)
 워블 염기쌍(wobble base pair)을 형성하고,
 상기 워블 염기쌍을 형성하는 구아닌은 IGS 영역의 5' 말단에 위치하고,
 상기 워블 염기쌍을 형성하는 우라실은 타겟 사이트 영역의 3' 말단에
 위치하는 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 타겟 사이트 영역은 목적 유전자 영역과 중첩된 것인, 자가 환형화
 RNA 구조체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 IGS 영역의 염기 서열은 상기 구아닌을 제외하고 타겟 사이트의
 영역의 염기서열과 역상보적인 것을 특징으로 하는, 자가 환형화 RNA
 구조체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 리보자임은 그룹 I 인트론 리보자임 (Group I intron ribozyme)인, 자가
 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 리보자임은 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 것인, 자가 환형화
 RNA 구조체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 구조체는 IGS 영역의 5' 방향으로 연장된 뉴클레오티드를 포함하여
 P10 helix를 형성하는 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 구조체는 IGS 영역의 5' 방향 및 타겟 사이트의 3' 방향으로 연장된
 뉴클레오티드를 포함하여 P1 helix를 형성하는 것인, 자가 환형화 RNA
 구조체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 구조체는 P10 helix를 형성하지 않는 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 9] 제1항 또는 제6항에 있어서,
 상기 구조체는 IGS 영역의 5' 방향으로 AS(antisense sequence) 영역과,
 타겟 사이트의 3' 방향으로 상기 AS 영역과 상보적으로 결합할 수 있는
 ABS(antisense binding sequence) 영역을 추가로 포함하는 것인, 자가
 환형화 RNA 구조체.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 AS 영역의 길이는 50 내지 400 nt 인 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 목적 유전자 영역은 5' 말단에 IRES (internal ribosome entry site) 영역을 포함하는 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 구조체는 리보자임 영역과 목적 유전자 영역이 무작위 염기서열로 이루어진 스페이서 (Spacer) 영역으로 연결된 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 구조체는 목적 유전자 영역과 타겟 사이트 영역이 무작위 염기서열로 이루어진 스페이서 (Spacer) 영역으로 연결된 것인, 자가 환형화 RNA 구조체.
- [청구항 14] 제1항의 자가 환형화 RNA 구조체를 발현하는 벡터.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 벡터는 자가 환형과 RNA를 암호화하는 유전자와 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 것인, 벡터.