



등록특허 10-2778328



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월11일

(11) 등록번호 10-2778328

(24) 등록일자 2025년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/79 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)  
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01)  
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/79 (2013.01)  
C12N 15/102 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7017487(분할)

(22) 출원일자(국제) 2018년04월10일

심사청구일자 2023년06월09일

(85) 번역문제출일자 2023년05월23일

(65) 공개번호 10-2023-0084312

(43) 공개일자 2023년06월12일

(62) 원출원 특허 10-2019-7032518

원출원일자(국제) 2018년04월10일

심사청구일자 2021년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/059173

(87) 국제공개번호 WO 2018/189186

국제공개일자 2018년10월18일

(30) 우선권주장

17165784.4 2017년04월10일

유럽특허청(EPO)(EP)

17203591.7 2017년11월24일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2016509063 A\*

Francis Robert et al, "Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing", Genome Medicine, Vol. 7, Article number 93(2015.08.)\*

J Immunol. 2016 April 1; 196(7): 3032-3042

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

막스-플랑크-게젤샤프트 츠어 뢰르더룽 데어 비셴  
샤프텐 에.파우.

독일 뮌헨 테-80539 호프가르텐슈트라세 8

(72) 발명자

리첸버그 스테판

독일, 07743 제나, 젠커웨그 4

마리척 토미스라브

독일, 04103 라이프치히, 앤 더 베르파썅린테 16

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 11 항

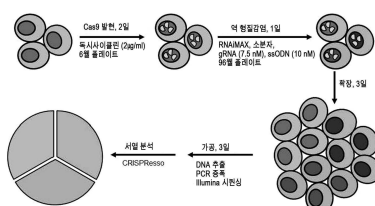
심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 유전체 편집 효율 증가를 위한 화합물

## (57) 요약

본 발명은 진핵생물 표적 세포 또는 표적 유기체에서 정밀 유전체 편집 효율을 증가시키기에 적합한 화합물, 조성물, 및 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12N 15/113* (2013.01)

*C12N 15/907* (2013.01)

*C12N 9/1205* (2013.01)

*C12N 9/22* (2013.01)

*C12N 2310/20* (2017.05)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음 중 적어도 하나를 포함하는, 진핵생물 표적 세포에서 유전체 편집(genome editing)을 위한 조성물:

- (i) 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전하고, 인간 NCBI 참조 서열 NP\_008835.5의 야생형 서열과 비교하여 돌연변이 K3753R을 포함하는, DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛;
- (ii) (i)의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 암호화하는 핵산 분자; 및
- (iii) (i)의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 포함하거나 이를 발현할 수 있는 진핵 세포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 표적 세포가 척추동물 표적 세포를 포함하는 진핵생물 표적 세포인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 표적 세포가 설치동물 표적 세포 또는 사람 표적 세포를 포함하는 포유동물 표적 세포인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 표적 세포가 진핵생물 표적 유기체의 유도 또는 배아 만능 줄기 세포, 또는 사람 유도 또는 배아 만능 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 하기를 표적 세포로 도입하는 것을 추가로 포함하는, 조성물:

- (a) HDAC 억제제인 화합물 (I),
- (b) NAE 억제제인 화합물 (II),
- (c) DNA-PK 억제제인 화합물 (III), 또는
- (d) RPA 억제제인 화합물 (IV),

또는 상기 화합물 중 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 조합.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 화합물이 하기 특징 중 적어도 하나를 갖는, 조성물:

화합물 (I)은 트리코스타틴 A임,

화합물 (II)는 MLN4924임,

화합물 (III)은 NU7026임, 및

화합물 (IV)는 NSC15520임.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 유전체 편집이 표적 세포의 이중 가닥 유전체로 엇갈린 절단(staggered cut), 5' 오버행(overhangs)을 갖는 엇갈린 절단, 또는 평활-말단 절단(blunt-ended cut)을 도입하는 것을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 유전체 편집이 표적 세포에서 (i) DNA 절단 효소의 존재, (ii) CRISPR/Cas9D10A 효소의 존재, (iii) CRISPR/Cpf1 효소의 존재, 또는 (iv) Cas9 뉴클레아제의 존재를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 유전체 편집이 원하는 돌연변이를 운반하는 공여자 DNA 분자를 표적 세포 내로 도입하는 것을 포함하되, 상기 DNA 분자가 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 분자인, 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포에서 내인성 DNA-PKcs의 녹다운(knock-down)과 조합되는, 조성물.

#### 청구항 11

진핵생물 표적 세포 또는 표적 유기체의 유전체를 편집하는 방법으로서,

(i) 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전하고, 인간 NCBI 참조 서열 NP\_008835.5의 야생형 서열과 비교하여 돌연변이 K3753R을 포함하는, DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛, 또는

(ii) (i) 조합의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 암호화하는 핵산 분자를, 표적 세포 또는 표적 유기체 내로 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 진핵생물 표적 세포 또는 표적 유기체에서 정밀 유전체 편집 효율을 증가시키기에 적합한 화합물, 조성물, 및 키트에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] CRISPR는 바이러스 DNA에 대한 박테리아 뉴클레아제 면역 시스템으로, 진핵 세포에서 염색체 DNA 서열을 정확하게 절단하기 위해 이용되어 왔다. 이러한 DNA 절단은 다음 2가지 경쟁 경로에 의해 복구된다: 비-상동성-말단-접합(Non-homologous-End-Joining: NHEJ) 또는 상동성-지정-복구(Homology directed Repair: HDR).

[0003] NHEJ에서, DNA 말단에 결합하는 최초의 단백질은 Ku70/Ku80이고, 그 다음은 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛(DNA-PKcs)이다(Shrivastav et al. 2008). 상기 키나아제는 복구 부위에서 그 자신, 다른 하류 이펙터를 인산화시킨다. 아르테미스(Artemis)와 같은 여러 단백질의 모집 및 인산화는 리가아제 IV(LIG4), X-선 복구 교차-보체화 단백질 4(XRCC4) 및 비-상동성-말단-접합 인자 1(XLF)에 의한 말단-가공(end-processing) 결찰을 초래한다(Dueva, Iliakis 2013).

[0004] 이 정규 NHEJ 경로가 억제되면, 대체 NHEJ 경로(A-NHEJ)가 활성화된다(Nussenzweig, Nussenzweig 2007). 이것은 다른 단백질들 중에서도 폴리(ADP-리보오스)-폴리머라아제 1(PARP-1), 베르너 증후군 ATP-의존성(WRN) 헬리

카아제 및 DNA 리가아제 3(LIG3) 또는 DNA 리가아제 1(LIG1)을 필요로 한다. 이중 가닥 절단(double strand break: DSB)에 MRN-복합체(Mre11, Rad50 및 Nbs1)의 결합은 HDR을 개시시킨다(Shrivastav et al. 2008). DNA 엔도뉴클레아제 RBBP8(CtIP), 블룸 헬리카아제(BLM) 및 엑소뉴클레아제 1(EXO1)과 같은 다른 단백질과 함께, 5' 말단의 말단 뉴클레오티드가 제거되어, 상기 DNA의 절단부의 양쪽에 긴 3' 단일 가닥 DNA(ssDNA) 오버행(overhangs)이 생성된다(Dueva, Iliakis 2013). 이 꼬리들은 그 후 복제 단백질 A(RPA) 복합체에 의해 코팅되고 안정화되며, 이어서 Rad51 핵 단백질 필라멘트 유방암 2(BRCA2) 보조생성이 수반된다(Shrivastav et al. 2008). Rad52는 ssDNA에 결합된 RPA를 Rad51로 대체하는 것을 용이하게 하고 ssDNA 어닐링을 촉진시킨다(Grimme et al. 2010). 공여자 DNA로의 가닥 침입 및 폴리머라제에 의한 후속 DNA 합성은 최종적으로 정확하게 복구된 DNA를 초래한다. 변이 혈관확장성 운동실조증(ATM) 단백질 키나아제는, 적어도 12개의 복구 단백질을 인산화시키기 때문에 HDR에서 주요한 역할을 한다(Shrivastav et al. 2008).

[0005] CRISPR Cas9-유도된 DSBs의 NHEJ는 오류가 발생하기 쉽고, 절단 부위에서 삽입 및 결실(인델)을 자주 도입시킨다. 따라서 표적화된 유전자를 녹아웃시키는데 유용하다. 대조적으로, HDR은 상동성 공여자 DNA 서열을 사용함으로써 DSB의 정확한 복구를 가능케한다. 이 공여자 서열이 실험에 제공되고 돌연변이를 운반하는 경우, 이들은 유전체에 도입될 것이다.

[0006] Cas9에 의해 도입되는 DSB에 대한 요건은 DNA 중의 NGG 서열(PAM 부위)이다. Cas9의 표적화는 PAM 부위에 인접한 20개의 뉴클레오티드에 상보적인 결합된 가이드 RNA(gRNA)에 의해 결정된다. 그러나, Cas9 뉴클레아제가 또한 gRNA에 의해 표적화된 것들과 서열 유사성을 갖는 부위에서 유전체를 절단할 수 있다(Fu et al. 2013). 이러한 표적-이탈(off-target) 이중 가닥 절단은 원하지 않는 돌연변이가 원하는 돌연변이와 더불어 유전체의 다른 곳에 나타날 수 있음을 의미한다.

[0007] 이러한 표적-이탈 절단을 줄이는 한 가지 전략은 Cas9 D10A와 같은 DSBs 대신 단일 가닥 Nick(nicks)을 도입하는 돌연변이된 Cas9를 사용하는 것이다(Shen et al. 2014). 서로 매우 근접한 위치에서 대향하는 DNA 가닥에 2개의 Nick을 도입하기 위해 2개의 gRNA를 사용하는 것은 DSB를 유발하기에 충분히 가까운 유전체의 다른 곳에서 발생하는 2개의 표적-이탈 Nick의 위험을 감소시키면서 원하는 유전자좌에서 DSB를 초래할 것이다. 또다른 전략은 Cpf1을 사용하는 것이다(Zetsche et al. 2015). 이 뉴클레아제는 T-풍부 PAM 부위 근처에 엇갈린(staggered) 절단을 도입하고 표적-이탈 효과를 덜 발생시키는 것으로 나타났다(Kim et al. 2016)(Kleinstiver et al. 2016).

[0008] 현재의 접근법에서, 특히 줄기 세포에서 표적화된 뉴클레오티드 치환에 대한, 정밀 유전체 편집(PGE) 효율은 일반적으로 낮은, 0.5 내지 15% 범위에 있다(Yu et al. 2015)(Gonzalez et al. 2014). 일부 연구자들은 HDR을 촉진하거나 NHEJ를 감소시키기 위한 시도를 함으로써 정밀 유전체 편집의 낮은 효율을 해결하였다.

[0009] G2/M기에 대한 세포 주기 동기화는 HEK293T 세포(26%에서 38%), 사람 일차 신생아 섬유아세포(검출불가능한 수준에서 0.6%) 및 사람 배아 줄기 세포(hESCs)(검출불가능한 수준에서 1.6%)에서 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오티드(ssODN) 공여자로(Lin et al. 2014), 그리고 hESCs에서 이중 가닥 올리고데옥시뉴클레오티드(dsODN) 공여자로(정렬 후 7 내지 41%)(Yang et al. 2016) PGE를 증가시키는 것으로 나타났는데, 이는 상동성 재조합이 이 시기로 제한되고 이의 단백질이 상향조절되기 때문이다.

[0010] 또한, dsODN 공여자를 사용하여 HEK293/TLR 세포에서 siRNA로(5 내지 25 %) 또는 아테노바이러스 5형 단백질 4E1B55K 및 E4orf6의 동시-발현으로(5 내지 36 %) Ku70/80 및 리가아제 IV와 같은 중요 단백질을 억제함으로써 효율이 개선되었다(Chu et al. 2015). E1B55K 및 E4orf6 단백질은 다른 표적 중에서도 LIG4의 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 매개한다.

[0011] 유전체 편집을 증가시키는 일반적인 전략은 소분자를 사용하는 것이었다. 소분자 리가아제 IV 억제제 SCR7은 NHEJ를 차단하고 마우스 배아에서 PGE의 효율을 증가시키는 것(5 내지 22.7%)으로 주장되었다(Maruyama et al. 2015). 다른 연구자들에 의해 HEK293/TLR 세포에서 유사한 증가, HEK293A에서 미미하지만 유의미한 증가가 기술되었거나, 또는 마우스 배아, 토끼 배아, 및 사람 줄기 세포에서 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Chu et al. 2015)(Song et al. 2015)(Song et al. 2016)(Yang et al. 2016)(Zhang et al. 2017). 최근에, Greco 등은 SCR7의 구조 및 억제 특성을 재분석하였다(Greco et al. 2016). 그들은 SCR7 및 이의 유도체가 사람 LIG4의 선택적 억제제도 아니고 강력한 억제제도 아니라는 결론을 내렸다.

[0012] 소분자 NU7441, KU-0060648 및 NU7026에 의한, NHEJ 경로의 핵심 단백질 복합체인 DNA-PK의 약리학적 억제는, dsODN 공여자를 이용한 HEK293/TLR 세포에서(1.9 내지 3.8%), HEK293에서(3 내지 7.6%) 및 사람 유도 만능 줄

기 세포(hiPSCs)(13 내지 16%)에서, 그리고 ssODN 공여자를 이용한 마우스 배아 섬유아세포(3 내지 10%)에서 NHEJ의 빈도를 감소시키고 PGE를 증가시키는 것으로 나타났다(Robert et al. 2015)(Suzuki et al. 2016)(Zhang et al. 2017).

[0013] 또한, CRISPR-Cas9와의 상동 재조합을 향상시키는 단일 소분자가 기술되었다. RAD51 자극 화합물 RS-1은, 모두 dsODN 공여자를 이용해, 토끼 배아(4.4 내지 26.1%), HEK293A 세포(3.5 내지 21%) 및 U2OS 세포(1.9 내지 2.4%)에서 PGE를 증가시켰으나(Song et al. 2016)(Pinder et al. 2015), hiPSCs에서는 그렇지 않았다(Zhang et al., 2017). PGE 효율에 RS-1은 ssODN 공여자를 이용한 돼지 태아 섬유아세포에서 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Wang et al. 2016).

[0014] 또한, 약 4000개의 소분자에 대한 라이브러리 스크린을 사용하여, Yu 등은  $\beta$ 3-아드레날린 수용체 작용제 L755507이, ssODN을 사용하여 hiPSCs에서(0.35 내지 3.13%), 그리고 dsODN 공여자를 사용하여 마우스 ESC에서(17.7에서 33.3 %) PGE를 증가시키는 것을 확인하였으나, 상기 분자의 복구 경로 표적은 알려져 있지 않다(Yu et al. 2015). 다른 연구자들은 HEK293A 세포 또는 hiPSCs에서 L755507에 의한 PGE의 유의한 자극을 발견하지 못하였다(Pinder et al. 2015)(Zhang et al. 2017). Pinder 등은 SCR7, RS-1 및 L755507을 단독으로, 그리고 함께 비교하였고, RS-1 단독과 비교하여 SCR7 및 L755507을 RS-1과 함께 첨가할 때 부가적인 효과를 발견하지 못하였다.

[0015] CRIPR-Cas9 유전체 편집을 향상시키는 소분자에 대한 최신 기술 개요로부터, 본 발명자들은 DNA-PK의 억제제가 CRISPR-Cas9 유전체 편집에서 PGE를 증가시킬 수 있지만, SCR7, L755507 및 RS-1의 효과는 세포주와 유전자좌 간에 불일치하였다는 것을 인지하고 있다. 본 발명자들은 또한 이전에 시험된 소분자의 조합이 부가적인 효과를 나타내지 않았다는 것을 인지하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0016] 본 발명자들은 특정 화합물이, 특히 2종 이상의 상이한 화합물의 조합물로서 적용될 때, 정밀 유전체 편집 효율을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 억제제, NEDD8 활성화 효소(NAE)의 억제제, DNA-의존성 단백질 키나아제(DNA-PK), 특히 이의 촉매 서브유닛(DNA-PKcs)의 억제제, 및 복제 단백질 A(RPA)의 억제제로부터 선택된 화합물 및 이들 억제제의 상이한 부류들로부터 선택된 화합물의 조합이 유전체 편집 효율을 증가시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 상기 화합물 및 이들의 조합은 예를 들어, 연구 도구로서 비의료적 응용 또는 예를 들어, 생체내(*in vivo*) 또는 생체외(*ex vivo*) 사용을 위한 의료적 응용들 모두에 적합하다.

[0017] 또한, 본 발명자들은, 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한 DNA-PKcs가, 위에 기재한 화합물의 존재와는 독립적으로, 정밀 유전체 편집 효율을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 이 효과는 유전체 편집을 위한 복수의 상이한 시스템에서 발견되고, 따라서 광범위하게 적용가능하다.

### 과제의 해결 수단

[0018] 첫 번째 측면에서, 본 발명은 유전체 편집에 사용하기 위한, 이하에서 화합물 (I)로 지정한, 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 억제제인 화합물에 관한 것이다.

[0019] HDAC 억제제는 세포주기 정지, 분화 및/또는 아포토시스를 유도함으로써 종양 세포 증식을 억제하기 위한 세포 증식억제제로 알려져 있다. HDAC 억제제는 일반적으로 HDACs의 아연-함유 촉매 도메인에 결합함으로써 작용한다. 이들은 아연 이온에 결합하는 화학 모이머티에 따라 분류될 수 있다. 적합한 부류의 HDAC 억제제의 예는 다음과 같다:

[0020] (1) 하이드록사메이트 화합물,

[0021] (2) 티올기를 통해 아연 이온에 결합하는 사이클릭 테트라펩타이드 및 펩시펩타이드,

[0022] (3) 벤즈아미드 화합물,

[0023] (4) 친전자성 케톤, 및

[0024] (5) 지방족산 화합물.



- [0025] HDAC 억제제는, 예를 들어, 본원에 참고로 포함된, Khan & La Thangue(Immunol. Cell Biol. 90(2012), 85-94) 및 Falkenberg & Johnstone(Nature Rev. Drug Discovery 13(2014) 673-691)에 검토되어 있다.
- [0026] 본 발명에 따르면, HDAC 억제제는 바람직하게는 합성 비-뉴클레오시드 화합물, 예를 들어, 1500 Da 이하 또는 1000 Da 이하의 분자 질량을 갖는 소분자에서 선택되는 것이 바람직하다. HDAC 억제제의 특정 예는 트리코스타틴 A, 보리노스텐, 엔티노스텐, 파노비노스텐, 모세티노스텐, 벨리노스텐, 로미덱신, MC1568, 투바스타틴 A, HCI, 지비노스텐, LAQ824, CUDC-101, 퀴시노스텐 2HCI, 프라시노스텐, PCI-34051, 드록시노스텐, PCI-24781, RGFP966, AR-42, 로실리노스텐, 발프로산, CI994, CUDC-907, 투바신, M344, 레스미노스텐, RG2833, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, CAY10603, 넥스투라스텐 A, BG45, LMK-235, 산타크루자메이트 A, BRD73954, HPOB, TMP269, 타스퀴니모드 및 4SC-202 뿐만 아니라, 이들의 염 또는 용매화물, 특히 이들의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물에서 선택된다.
- [0027] 바람직한 화합물 (I)은 트리코스타틴 A이며, 이의 염 및 용매화물을 포함한다.
- [0028] 두번째 측면에서, 본 발명은 유전체 편집에 사용하기 위한, 이하에서 화합물 (II)로 지정한, NEDD8 활성화 효소 (NAE)의 억제제인 화합물에 관한 것이다.
- [0029] NAE 억제제는, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는, Nawrocki 등(Exp Opin Investing Drugs 21(2012), 1564-1573)에 의해 검토된 바와 같이 항-종양제, 또는, 예를 들어, Le-Trilling 등(Sci. Rep. 6(2016), doi: 19977)에 의해 검토된 바와 같이 항바이러스제로 알려져 있다.
- [0030] 본 발명에 따르면, NAE 억제제는 바람직하게는 합성 비-뉴클레오시드 화합물, 예를 들어, 1500 Da 이하 또는 1000 Da 이하의 분자 질량을 갖는 소분자에서 선택된다. 바람직한 NAE 억제제는 MLN4924(페보네디스텐) 또는 이의 염의 염 또는 용매화물, 특히 이의 염의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물이다.
- [0031] 세번째 측면에서, 본 발명은 유전체 편집에 사용하기 위한, 이하에서 화합물 (III)으로 지정한, DNA-의존성 단백질 키나아제(DNA-PK)의 억제제, 특히 이의 촉매 서브유닛(DNA-PKcs)의 억제제인 화합물에 관한 것이다.
- [0032] DNA-PK 억제제는, 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는, Davidson 등(Front. Pharmacol. 4(2013), doi: 133389)에 의해 검토된 바와 같이 화학요법제로 알려져 있다.
- [0033] 본 발명에 따르면, DNA-PK 억제제는 바람직하게는 합성 비-뉴클레오시드 화합물, 예를 들어, 1500 Da 이하 또는 1000 Da 이하의 분자 질량을 갖는 소분자에서 선택된다. DNA-PK 억제제의 구체적인 예는 NU7026, NU7441, PIK-75, 및 PI-103 뿐만 아니라, 이의 염 또는 용매화물, 특히 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 용매화물이다.
- [0034] 바람직한 구현예에서, 화합물 (III)은 NU7026이며, 이의 염 및 용매화물을 포함한다.
- [0035] 네번째 측면에서, 본 발명은 유전체 편집을 위한, 이하에서 화합물 (IV)로 지정한, 복제 단백질 A(RPA)의 억제제인 화합물에 관한 것이다.
- [0036] RPA 억제제는, 예를 들어, 본원에 참고로 포함된, Neher 등(Mel. Cancer Ther. 10(2011), 1756-1806)에 의해 검토된 바와 같이 항-종양제로 알려져 있다.
- [0037] 본 발명에 따르면, RPA 억제제는 바람직하게는 합성 비-뉴클레오시드 화합물, 예를 들어 1500 Da 이하 또는 1000 Da 이하의 분자 질량을 갖는 소분자에서 선택된다. RPA 억제제의 구체적인 예는 NSC15520, TDRL-505 및 NSC111847 뿐만 아니라 이의 염 또는 용매화물, 특히 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 용매화물이다.
- [0038] 화합물 (IV)의 바람직한 구현예는 NSC15520이며, 이의 염 및 용매화물을 포함한다.
- [0039] 본 발명자들은, 화합물 (I), 화합물 (II), 화합물 (III), 또는 화합물 (IV)가 동물, 예를 들어, 사람 세포를 포함하는 포유동물과 같은 진핵생물 세포에서 정밀 유전체 편집 빈도를 증가시킨다는 것을 발견하였다.
- [0040] 특히, 본 발명자들은, 화합물 (I), (ii), (iii) 및/또는 (IV)가 함께 투여될 때 부가적인 효과를 나타낸다는 것을 발견하였다. 특히, 트리코스타틴 A, MLN4924, NSC15520, 및 NU7026 화합물로 구성된 조합을 사용하는 경우, 최대 6.7배의 정밀 유전체 편집의 증가 또는 거의 50%의 편집된 염색체가 달성되었는데, 이는 본 발명자들의 지식에 따르면 현재까지 기술된 사람 만능 줄기 세포에 대한 가장 높은 유전체 편집 효율이다. 또한, 만능 줄기 세포에서 상기 화합물의 조합을 촉매적으로 불활성인 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛, 특히 돌연변이체 K3753R과 함께 사용하는 경우, 최대 82%의 편집된 염색체 또는 19.2배 증가를 수반하는 거의 완전한 유전체 편

집이 달성된다. 또한, 이들은 2주 이내에 선별 없이 3개 유전자의 두 염색체에 대해 다중화된 정밀 유전체 편집(Multiplexed Precision Genome Editing: MPGE)을 달성하였고, 포유동물 시스템에서의 MPGE를 최초로 나타낸다. 분석된 클론의 3분의 1은 3개의 유전자의 두 염색체에서 표적화된 뉴클레오티드 치환을 갖는다.

- [0041] 화합물 (I), (ii), (iii) 및 (IV) 중 둘 이상의 조합, 특히 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (I) 및 선택적으로 적어도 하나의 화합물 (II) 및/또는 적어도 하나의 화합물 (IV)의 조합을 투여하는 것의 특히 강한 부가적인 효과가, 원하는 유전자좌에서, DNA 이중 가닥, 예를 들어, 염색체 DNA 내에, 엇갈린 절단을 도입할 수 있는 뉴클레아제(예를 들어, Cpf1) 또는 니카아제 효소 시스템(예를 들어, Cas9D10A)의 사용과 함께 발견되었다.
- [0042] 추가의 실험에서, 특히 화합물 (II)의 부재하에 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (I) 및 선택적으로 적어도 하나의 화합물 (IV)의 조합을 투여하는 것의 강력한 효과가, 원하는 유전자좌에서, DNA 이중 가닥, 예를 들어, 염색체 DNA 내에, 엇갈린 절단을 도입할 수 있는 뉴클레아제(예를 들어, Cpf1) 또는 니카아제 효소 시스템(예를 들어, Cas9D10A)의 사용과 함께 조혈 세포, 예를 들어, CD4<sup>+</sup> T 세포와 같은 T 세포 또는 조혈 전구 세포, 예를 들어, CD34<sup>+</sup> 세포에서 확인되었다.
- [0043] 사람 배아 신장 세포주 HEK293 및 백혈병 세포주 K562에서, 예를 들어, 원하는 유전자좌에서, DNA 이중 가닥, 예를 들어, 염색체 DNA에 엇갈린 절단을 도입할 수 있는 뉴클레아제(예를 들어, Cpf1) 또는 니카아제 효소 시스템(예를 들어, Cas9D10A)의 사용과 함께, 특히 화합물 (II)의 부재하에, 임의의 적어도 하나의 화합물 (I) 및/또는 적어도 하나의 화합물 (IV)와 함께 적어도 하나의 화합물 (III)을 투여할 때, 강력한 효과가 확인되었다.
- [0044] 따라서, 본 발명의 일 측면은 (a) 화합물 (I), (b) 화합물 (II), (c) 화합물 (III) 및 (d) 화합물 (IV) 중 적어도 2종을 포함하는 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트에 관한 것이다. 바람직한 구현예는 화합물 (I)이 트리코스타틴 A이고/이거나, 화합물 (II)가 MLN4924이고/이거나, 화합물 (III)이 NU7026이고/이거나, 화합물 (IV)가 NSC15520인 조합이다. 특히, 본 발명의 조합은 비의료적 응용 및 의료적 응용 둘 모두에서 두 염색체에 대한 다중화된 유전체 편집을 포함하는 유전체 편집에 사용하기 위한 것이다.
- [0045] 본 발명의 맥락에서 용어 "조합"은 선택적으로 적합한 담체, 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 혼합하여 상기한 것과 같은 적어도 2종의 화합물을 포함하는 조성물을 포함한다. 용어 "조합"은 또한, 각각 선택적으로 적합한 담체, 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께, 별개의 형태로 상기에 나타난 바와 같은 적어도 2종의 화합물을 포함하는 키트를 포함한다.
- [0046] 또한, 본 발명은 (i) 적어도 하나의 화합물 (I) 및 적어도 하나의 화합물 (II), (ii) 적어도 하나의 화합물 (I) 및 적어도 하나의 화합물 (III), (iii) 적어도 하나의 화합물 (I) 및 적어도 하나의 화합물 (IV), (iv) 적어도 하나의 화합물 (II) 및 적어도 하나의 화합물 (III), (v) 적어도 하나의 화합물 (II) 및 적어도 하나의 화합물 (IV), 또는 (vi) 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트에 관한 것이다. 바람직한 화합물 (I), (ii), (iii) 및/또는 (IV)는 상기한 것과 같다.
- [0047] 또한, 본 발명은 (i) 적어도 하나의 화합물 (I), 적어도 하나의 화합물 (II), 및 적어도 하나의 화합물 (III), (ii) 적어도 하나의 화합물 (I), 적어도 하나의 화합물 (II), 및 적어도 하나의 화합물 (IV), 또는 (iii) 적어도 하나의 화합물 (II), 적어도 하나의 화합물 (III), 및 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트에 관한 것이다. 바람직한 화합물 (I), (ii), (iii) 및/또는 (IV)는 상기한 것과 같다.
- [0048] 또한, 본 발명은 적어도 하나의 화합물 (I), 적어도 하나의 화합물 (II), 적어도 하나의 화합물 (III), 및 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트에 관한 것이다. 바람직한 화합물 (I), (ii), (iii) 및/또는 (IV)는 상기한 것과 같다.
- [0049] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (I) 및 선택적으로 적어도 하나의 화합물 (II) 및/또는 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 화합물 (II)는 부재한다.
- [0050] 더 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 화합물 (III) 및 화합물 (I) 및 화합물 (IV) 중 적어도 하나를 포함하는 조합에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 화합물 (II)는 부재한다.
- [0051] 기재된 본 발명의 조합은 하나 이상의 추가 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 조합은 노코다졸 및 ABT-751(Yang et al., 2016), 파클리탁셀(Shu et al., Apoptosis 2(1997), 463-470), 또는 콜치신 또는 빈



크리스틴(Blajeski et al., J. Clin. Invest. 110(2002), 91-95), 또는 이의 염 또는 용매화물과 같은 G2/M 기에 세포를 동기화시키기 위한 화합물을 포함할 수 있다. 추가의 구현예에서, 조합은, 특히 촉매적으로 불활성인 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛과 함께, NSC19630 또는 이의 염 또는 용매화물과 같은 Alt-NHEJ 억제제를 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트는, 포유동물 표적 세포와 같은 동물 표적 세포, 예를 들어, 사람 표적 세포 뿐만 아니라, 줄기 세포, 예를 들어, 사람 줄기 세포, 예를 들어, 배아 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포를 포함하는마우스 또는 제브라피쉬와 같은 비-사람 동물 유래 표적 세포를 포함하는, 진핵생물 표적 세포, 특히 하기에 기술된 것과 같은 진핵생물 표적 세포에서, 유전체 편집에 사용하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 유도 또는 배아 만능 줄기 세포, 예컨대, 사람 유도 또는 배아 만능 줄기 세포 뿐만 아니라 비사람 동물로부터의 유도 또는 배아 만능 줄기 세포를 포함하는, 진핵생물 표적 유기체의 줄기 세포이다. 다른 구현예에서, 표적 세포는 조혈 세포 또는 조혈 전구 세포이다. 또다른 구현예에서, 표적 세포는 암 세포와 같은 불멸화된 세포이다.

[0053] 본 발명의 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트는 엇갈린 절단, 특히 5' 오버행을 갖는 엇갈린 절단을 표적 세포의 유전체 내로 도입하는 단계를 포함하는 유전체 편집 절차에 특히 적합하다. 이 결과를 달성하기 위해, 표적 세포는 CRISPR/Cas9의 돌연변이된 니카아제 버전, 예컨대 CRISPR/Cas9 또는 CRISPR/Cpf1 효소의 돌연변이된 니카아제 버전인 CRISPR/Cas9 D10A 또는 CRISPR/Cas9 H840A 효소를 포함할 수 있다. 대안적으로, 다른 유전체 편집 효소, 예를 들어, CRISPRs, 전사 활성화제-유사 효과기-기반 뉴클레아제(TALENs), 징크 핑거 뉴클레아제 단백질, 박테리아 써머스 써모필레스의 아르고너트(TtAgo), 재조합효소, 또는 메가뉴클레아제 또는 다른 효소, 특히 이중 가닥 표적 DNA에 엇갈린 절단을 제공하는 효소가 존재할 수 있다. 본 발명은 또한 상기 효소의 분할-융합(split-fusion) 버전, 예를 들어, Cas9 또는 Cas9 D10A의 분할-융합 버전(Zetsche et al., 2015)과 함께 사용하기에 적합하다. 효소(들)은 그대로, 예를 들어, 단백질 또는 리보핵단백질로서 또는 각각의 효소(들)을 암호화하는 핵산 분자로서 표적 세포 내로 도입될 수 있다. 핵산 분자는 표적 세포에서 일시적 또는 안정적 발현을 위한 적절한 발현 제어 요소와 작동적으로 연결되어 플라스미드와 같은 발현 벡터로서 도입될 수 있다. 진핵생물 표적 세포 내로 단백질 또는 핵산을 도입하기에 적합한 형질감염 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 리포펙션, 전기천공법, 예를 들어, 뉴클레오펙션, Ca-포스페이트 또는 바이러스-기반 방법을 포함한다.

[0054] 특정 구현예에서, 본 발명은 사람 유도 또는 배아 줄기 세포와 같은 유도 또는 배아 만능 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포인, 진핵생물 표적 세포에서의 유전체 편집을 위한, 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (I) 및 선택적으로 적어도 하나의 화합물 (II) 및/또는 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합의 용도에 관한 것으로, 여기서 상기 유전체 편집 절차는 엇갈린 절단, 특히 특히 5' 오버행을 갖는 엇갈린 절단을 상기 표적 세포의 유전체 내로 도입하는 단계를 포함한다. 엇갈린 절단은 상기한 것과 같은 효소에 의해 표적 세포의 유전체 내로 도입될 수 있다.

[0055] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명은 T 세포, 예를 들어, CD4<sup>+</sup> T 세포와 같은 조혈세포 또는 CD34<sup>+</sup> 세포와 같은 조혈 전구 세포인 진핵생물 표적 세포에서 유전체 편집을 위한, 특히 화합물 (II)의 부재하에 적어도 하나의 화합물 (III) 및 적어도 하나의 화합물 (I) 및 선택적으로 적어도 하나의 화합물 (IV)를 포함하는 조합의 용도에 관한 것으로, 여기서 유전체 편집 절차는 엇갈린 절단, 특히 5' 오버행을 갖는 엇갈린 절단을 표적 세포의 유전체 내로 도입하는 것을 포함한다. 엇갈린 절단은 상기한 바와 같이 효소에 의해 표적 세포의 유전체 내로 도입될 수 있다.

[0056] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명은 포유동물 불멸화 세포, 예를 들어, HEK293 또는 K562인 진핵생물 표적 세포에서의 유전체 편집을 위한, 특히 화합물 (II)의 부재하에 적어도 하나의 화합물 (III)과 선택적으로 화합물 (I) 및/또는 화합물 (IV) 중 적어도 하나를 포함하는 조합의 용도에 관한 것으로, 여기서 유전체 편집 절차는 엇갈린 절단, 특히 5' 오버행을 갖는 엇갈린 절단을 상기 표적 세포의 유전체 내로 도입하는 것을 포함한다. 엇갈린 절단은 상기한 것과 같이 효소에 의해 표적 세포의 유전체 내로 도입될 수 있다.

[0057] 본 발명의 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트는 (i) 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한, DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛(DNA-PKcs), (ii) (i)의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 암호화하는 핵산 분자, 및/또는 (iii) 이의 분할-융합 버전을 포함하는 (i)의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 포함하거나 발현할 수 있는 진핵 세포를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한 돌연변이체는 상응하는 야생형 서열, 예를 들어, 사람 서열 NP\_008835.5의 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 상기 야생형 서열과 비교하여 감소된 키나아제 활성을 초

래하는 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 구조적으로 온전하고 촉매적으로 불활성인 적합한 돌연변이체 및 이러한 돌연변이체를 검출하기 위한 시험은, 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되는, 문헌(Neal et al., 2001)에 기재되어 있다.

[0058] 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한 DNA-PKcs 서브유닛은 단백질로서 또는 표적 세포 내에서 일시적 또는 안정적 발현을 위해 각각의 서브유닛을 암호화하는 핵산으로서 표적 세포에 도입될 수 있다. 이러한 접근법은, 예를 들어, 표적화된 상동 재조합에 의해 또는 RNA 간섭, 예를 들어 siRNA의 사용에 의해, 표적 세포에서 내인성 DNA-PKcs 유전자의 녹다운과 조합하여 사용될 수 있다. 또한, 이러한 접근법은, 예를 들어, 다른 중, 예를 들어, 진화적으로 밀접하게 관련된 종으로부터의 DNA-PKcs 돌연변이체를 사용함으로써, 내인성 DNA-PKcs 없이 세포에서 사용될 수 있다.

[0059] 특히, DNA-PKcs 돌연변이체는 촉매 3인조(N3927, D3922, H3924)를 포함하는 촉매 루프(아미노산 3919-3927) 또는 P-루프(아미노산 3729-3735) 또는 NCBI 참조 서열 NP\_008835.5에 기초한 아미노산 F3946, T3950, 및 특히 K3753을 포함하는 인접 영역(아미노산 3736-3760) 내에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 이것은 또한 키나아제 활성을 감소시키거나 불활성화시키는, NCBI 참조 서열 NP\_008835.5에 기초한 절두(예를 들어, Y4046\*)를 야기하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 지정된 아미노산의 위치는 사람 이외의 종에서 DNA-PKcs 또는 이의 상동체에서 변동될 수 있다.

[0060] 더욱 특히, DNA-PKcs 돌연변이체는 NCBI 참조 서열 NP\_008835.5에 기초하여, 위치 K3753에 적어도 하나의 돌연변이, 예를 들어, 돌연변이 K3753R 및/또는 K3753H, 위치 D3922에, 예를 들어, 돌연변이 D3922A, 위치 T3950에, 예를 들어, 돌연변이 T3950D, 및/또는 위치 F3946에, 예를 들어, F3946D를 포함한다. 상기 지정된 아미노산의 위치는 사람 이외의 종에서 DNA-PK 또는 이의 상동체에서 변동될 수 있다.

[0061] 또한, DNA-PKcs는, 일반적으로 자가인산화 기능의 표적인, 인산화 클러스터에 적어도 하나의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이들은 NCBI 참조 서열 NP\_008835.5에 기초하여, PQR 클러스터(S2023 및/또는 S2029 및/또는 S2041 및/또는 S2053 및/또는 S2056)에 대한, 예를 들어, 알라닌으로 제한되지 않는, 불활성화 돌연변이, 및/또는 ABCDE 클러스터(T2069 및/또는 S2612 및/또는 T2620 및/또는 S2624 및/또는 T2638 및/또는 T2647) 및/또는 N 클러스터(S56 및/또는 S72) 및/또는 JK 클러스터(T946 및/또는 S1003)에 대한, 예를 들어, 아스파르트산으로 제한되지 않는, 활성화(인산화모사(phosphomimicking)) 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 지정된 아미노산의 위치는 사람 이외의 종에서 DNA-PK 또는 이의 상동체에서 변동될 수 있다.

[0062] 조합, 예를 들어, 조성물 또는 키트는 생체내(*in vivo*) 또는 시험관내에서(*in vitro*) 증폭되거나 화학적으로 합성된 단일 가닥 분자 또는 이중 가닥 DNA 분자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 모든 종류의 공여자 핵산 분자와 함께 사용하기에 적합하다. 공여자 핵산 분자의 길이는 일반적으로 약 20 내지 2000개 nt 이상의 범위, 예를 들어, 약 80 내지 120개 nt, 50 내지 200개 nt, 또는 500 내지 2000개 nt이다. 공여자 핵산 분자는 유전체 편집에 의해 표적 세포의 유전체내로 도입될 야생형 서열의 관점에서 적어도 하나의 원하는 돌연변이를 포함하도록 설계된다. 돌연변이는 단일 뉴클레오티드 돌연변이 또는 복수의 뉴클레오티드를 포함하는 돌연변이일 수 있다. 이 문맥에서, 용어 돌연변이는 단일 뉴클레오티드 또는 복수의 뉴클레오티드의 치환, 결실, 또는 삽입을 지칭한다.

[0063] 상기 측면은 생체내에서, 예를 들어, 단리된 세포 또는 세포 클러스터에서, 뿐만 아니라 시험관내에서, 표적 유기체의 세포에서의 사용을 포함한다. 조합은, 특히 DNA 이중 가닥에서 엇갈린 절단을 도입할 수 있는 DNA 절단 효소의 사용을 포함하여, 상기한 것과 같은 세포 유형에, 유전체 편집 절차에 따라 적용될 수 있다. 이 측면은 또한 사람 또는 수의 의약을 포함하는 의약에서의 사용을 포함한다.

[0064] 본 발명의 추가의 측면은, 진핵생물 표적 세포, 특히 척추동물 표적 세포, 예를 들어, 설치류를 포함하는 포유동물 표적 세포, 사람 줄기 세포를 포함하는 사람 또는 비-사람 표적 세포에서 유전체 편집을 위한, (i) 전술한 것과 같은, 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛, 특히 돌연변이된 서브유닛 K3753R, (ii) (i)의 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 암호화하는 핵산 분자 및/또는 (iii) (i)의 단백질 키나아제 촉매 서브유닛을 포함하거나 이를 발현할 수 있는 진핵생물 세포의 용도에 관한 것이다.

[0065] 이 측면은 생체내에서, 예를 들어, 단리된 세포 또는 세포 클러스터에서, 뿐만 아니라 시험관내에서, 표적 유기체의 세포에서의 사용을 포함한다. DNA-PKcs 돌연변이체는 모든 세포 유형에, 모든 유형의 유전체 편집 절차에 따라 적용될 수 있고, 이는, 예를 들어, 임의의 DNA 절단 효소, 예를 들어, 상기한 것과 같이 DNA 이중 가닥 내로 엇갈린 절단을 도입할 수 있는 효소 시스템 뿐만 아니라 다른 효소 시스템, 예를 들어, 평활말단 절단을 도

입할 수 있는 효소 시스템의 사용을 포함한다. 이 측면은 또한 사람 또는 수의 의약을 포함하는 의약에서의 사용을 포함한다.

[0066] 본 발명의 또다른 추가 측면은 조합, 예를 들어, 사람 또는 수의 의약을 포함하는 의약에서 적어도 2종의 상이한 화합물 (I), (ii), (iii) 및 (IV)를 포함하는 조성물 또는 키트의 용도이다. 약제학적 조성물을 제조하기 위한 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 보조제 이외에, 유효 용량의 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 염, 용매화물 또는 전구 약물이 사용된다. 활성 화합물의 용량은 투여 경로, 환자의 연령 및 체중, 치료될 질환의 성질 및 중증도, 및 유사한 요인에 따라 변동될 수 있다. 일일 용량은 1회 투여되는, 단일 용량으로 제공되거나, 2회 이상의 일일 용량으로 분할될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 2000 mg이다. 투여하는 일일 용량은 0.1 내지 500 mg, 예를 들어, 0.1 내지 100 mg으로 제공되는 것이 특히 바람직하다.

[0067] 적합한 투여 형태는 경구, 비경구, 정맥내, 경피, 국소, 흡입, 비강내 및 설하 제제이다. 본 발명에 따른 화합물의 경구, 비경구, 예를 들어, 정맥내 또는 근육내, 비강내 제제, 예를 들어, 건조 분말 또는 설하 제제를 사용하여 제공하는 것이 특히 바람직하다. 정제, 당-코팅 정제, 캡슐, 분산성 분말, 과립제, 수용액, 알코올 함유 수용액, 수성 또는 유성 현탁액, 시럽, 주스 또는 점적제와 같은, 관용적인 갈레닉(galenic) 제제 형태가 사용될 수 있다.

[0068] 고체 의약 형태는, 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 인산 나트륨, 락토오스, 전분, 만니톨, 알기네이트, 젤라틴, 구아검, 마그네슘 스테아레이트, 알루미늄 스테아레이트, 메틸셀룰로오스, 탈크, 고도로 분산된 규산, 실리콘 오일, 고분자량 지방산(예컨대, 스테아르산), 젤라틴, 한천 또는 식물성 또는 동물성 지방 및 오일, 또는 고체 고분자량 폴리머(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜)와 같은, 불활성 성분 및 담체 물질을 포함할 수 있고; 경구 투여에 적합한 제제는, 원하는 경우, 추가 향미제 및/또는 감미제를 포함할 수 있다.

[0069] 액체 의약 형태는 멸균될 수 있고/거나, 적절한 경우, 방부제, 안정화제, 습윤제, 침투제, 유화제, 확산제, 가용화제, 염, 삼투압 조절 또는 완충을 위한 당 또는 당 알코올, 및/또는 점도 조절제와 같은, 보조 물질을 포함할 수 있다.

[0070] 비경구 투여를 위한 제제는, 앰플 또는 바이알과 같은 별개의 용량 단위 형태로 존재할 수 있다. 활성 화합물의 용액, 바람직하게는 수용액, 특히 등장성 용액 및 또한 현탁액으로 제조하여 사용하는 것이 바람직하다. 이들 주사 형태는 즉시 사용 가능한 제제로 이용가능하게 제조되거나, 또는 활성 화합물, 예를 들어, 적절한 경우, 다른 고체 담체 물질을 함유하는 동결건조물을 원하는 용매 또는 현탁화제와 혼합함으로써 오로지 사용 직전에 준비될 수 있다.

[0071] 비강내 제제는 수성 또는 유성 용액으로, 또는 수성 또는 유성 현탁액으로 존재할 수 있다. 이들은 또한 적합한 용매 또는 현탁화제를 사용하여 사용 전에 준비되는 동결건조물로서 존재할 수 있다.

[0072] 흡입가능한 제제는 분말, 용액 또는 현탁액으로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 흡입가능한 제제는 분말 형태로, 예를 들어, 활성 성분과 락토오스와 같은 적합한 제형 보조제의 혼합물로서 존재한다.

[0073] 제제는 통상적인 항균 및 무균 조건 하에서 제조, 분취 및 밀봉된다.

[0074] 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 추가의 활성제와의 병용 요법으로 투여될 수 있다.

[0075] 본 발명의 조합의 의학적 용도는 특히 표적 유전자 요법, 예를 들어, 치료가 필요한 환자의 바람직하지 않은 유전자형과 관련된 장애의 치료를 포함한다. 예를 들어, 장애는 대사 기능 장애 또는 암이다. 본 발명에 의해, 환자로부터의 세포는 상기한 것과 같은 조합의 존재하에 유전체 편집 절차를 거칠 수 있어, 정밀 유전체 편집 효율을 증가시킬 수 있다. 이 절차는 생체내에서, 즉 조합을 환자에게 투여함으로써, 또는 성공적인 유전체 편집 후 환자 내로 재이식되는, 환자로부터 단리된 세포로 생체외에서 수행될 수 있다. 환자는 포유동물, 바람직하게는 사람 환자와 같은 척추동물일 수 있다. 마지막으로, 본 발명의 조합은 또한 식물 세포 또는 식물에서의 유전체 편집에 적합하다.

[0076] 또한, 본 발명은 다음의 도면 및 실시예에 의해 보다 상세하게 설명될 것이다.

### 발명의 효과

[0077] 본 발명은 진핵생물 표적 세포 또는 표적 유기체에서 정밀 유전체 편집 효율을 증가시키기에 적합한 화합물, 조성물, 및 키트를 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

[0078]

**도 1: 유전체 편집 및 분석 플로우차트.** iCRISPR 409-B2 iPSCs를 적어도 2일 동안 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  독시사이클린으로 처리하여 Cas9 또는 Cas9D10A 발현을 유도한다. RNAiMAX, gRNA(각각 7.5 nM), ssODN(10 nM) 및 평가될 소분자로의 역 형질감염을 1일 동안 96웰 플레이트에서 수행한다. 사용된 세포의 양은 ~80% 융합성을 나타낸다. 이후 세포를 규칙적으로 배지를 교체하면서 3일 동안 확장시킨다. 수확후 DNA 추출, 표적화된 유전자좌의 PCR 증폭, 인텔 및 정밀 유전체 편집 양에 관한 일루미나(Illumina) 시퀀싱 및 CRISPResso(Pinello et al. 2016) 서열 분석을 수행한다.

**도 2: 사람과 네안데르탈인의 마지막 공통 조상의 고대 상태로의 사람 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 정밀 유전체 편집(PGE)을 위한 gRNA 및 ssODN의 설계.** DSB 생성에 사용된 gRNAs 및 이들의 효율 스코어(sc)(sgRNA 스코어러 1.0 Chari et al. 2015)와 함께 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 각각의 유전자좌가 도시되어 있다. PAM 사이트는 회색이고, 표적 서열은 파란색이며, 변경될 염기는 적색이다. Cas9D10A(Cas9n)에 의한 Nick 포인트 또는 Cas9에 의한 DSB는 화살표로 표시되어 있다. Cas9n으로의 편집을 위해 두 가이드가 사용된 반면, *CALD1* g1, *KATNA1* g2 및 *SLITRK1* g2가 Cas9로 편집을 위해 사용된다. 두 Cas9 변이체로의 편집을 위한 각각의 ssODN가 또한 표시되어 있다. 원하는 돌연변이는 녹색으로 표시되고 추가 돌연변이는 오렌지색이다. 블록은 유전자좌의 재결단을 막기 위한 Cas9-차단 돌연변이를 나타낸다. 모든 Cas9D10A 공여자는 Nick 이후 50 nt 상동성 아암(arm)을 갖는 반면, 모든 Cas9 공여자는 중간에 집중된 원하는 돌연변이를 갖는 총 90개 nt이다. 전체 서열은 표 2에 제시되어 있다.

**도 3: iCRISPR Cas9D10A로의 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 유전체 편집에 대한 용매 효과 및 상이한 소분자 농도의 영향에 대한 1차 스크린.** 정밀 유전체 편집(PGE) 및 인텔은, 각각 녹색 원(삼각형) 또는 파란색 다이아몬드로 표시되어 있다. 각 기호는 기술적 복제본을 나타낸다. 각각의 평균은 검은 선으로 표시되어 있다. 각각의 해골은 위상차 광 현미경에 의해 결정되는 최대 20%의 세포 사멸을 나타낸다. 모든 세포는 1  $\mu\text{M}$  및 0.1  $\mu\text{M}$  트리코스타틴 A로 사멸되었다. 추가 실험을 위해 선택된 농도는 청록색으로 표시되어 있다.

**도 4: Cas9D10A 및 Cas9로의 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*에서의 정밀 유전체 편집(PGE) 효율에 대한 소분자의 효과.** PGE 효율은 서로 다른 유전자좌에서의 효율 변화를 설명하기 위해 1로 설정된 대조군 평균에 대한 상대적 단위(RU)로 주어진다. n회의 독립적인 실험의 기술적 복제본이 표시되어 있다. 회색 및 검은색 막대는 각각 대조군과 각 소분자의 평균을 나타낸다. 사용된 농도는 20  $\mu\text{M}$ 의 NU7026, 0.01  $\mu\text{M}$ 의 트리코스타틴 A(TSA), 0.5  $\mu\text{M}$ 의 MLN4924, 1  $\mu\text{M}$ 의 NSC 19630, 5  $\mu\text{M}$ 의 NSC 15520, 20  $\mu\text{M}$ 의 AICAR, 1  $\mu\text{M}$ 의 RS-1, 1  $\mu\text{M}$ 의 레스베라트롤, 1  $\mu\text{M}$ 의 SCR7, 5  $\mu\text{M}$ 의 L755507, 5  $\mu\text{M}$ 의 STL127685, 및 20  $\mu\text{M}$ 의 B02이었다.

**도 5: Cas9D10A 및 Cas9로의 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*에서의, 그리고 Cpf1로의 *HPRT* 및 *DMNT1*에서의 정밀 유전체 편집(PGE) 효율에 대한 소분자 조합의 영향.** 소분자는 409-B2 iCRISPR iPSC 주에서 Cas9D10A(A)로는 PGE 효율에 부가적인 효과를 나타내지만, Cas9(B)로는 그렇지 않다. 409-B2 hiPSC에서 재조합 Cpf1으로의 *HPRT* 및 *DMNT1*의 PGE 효율은 또한 CRISPY 믹스(C)를 사용하여 증가되었다. CRISPY 믹스를 사용할 때, PGE 효율은 또한 플라스미드-운반된 Cas9n-2A-GFP(GFP-FACS 농축)를 사용하여 SC102A1 hiPSCs 및 H9 hESC에서, 그리고 재조합 Cpf1(D)을 사용하여 침팬지 SandraA ciPSC에서 증가되었다. PGE, PGE + 인텔, 및 인텔은, 각각 녹색, 회색 또는 파란색 막대로 표시되어 있다. 오차 막대는 A, B 및 C에 대한 3개의 기술적 복제본과, D에 대한 2개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다. 사용된 농도는 20  $\mu\text{M}$ 의 NU7026, 0.01  $\mu\text{M}$ 의 트리코스타틴 A(TSA), 0.5  $\mu\text{M}$ 의 MLN4924, 1  $\mu\text{M}$ 의 NSC 19630, 5  $\mu\text{M}$ 의 NSC 15520, 20  $\mu\text{M}$ 의 AICAR 및 1  $\mu\text{M}$ 의 RS-1이었다. CRISPY 믹스는 NU7026, TSA, MLN4924 및 NSC 15520의 소분자 믹스를 나타낸다. 녹-인(Knock-In) 효율에서의 변화의 유의성은 3개 유전자 *CALD1*, *KATNA1*, *SLITRK1*에 걸쳐 풀링된(pooled) 이원 분산분석(two-way-ANOVA) 및 터키(Tukey) 다중 비교를 사용하여 결정되었다. 유전자 및 처리는, 각각 무작위 및 고정 효과로 처리되었다. 분석에는 각각의 유전자에 대한 3개의 기술적 복제본이 포함되었다. 다중 비교를 위해 P 값은 조정된다(\*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

**도 6: CRISPY 믹스 및 소분자 조합이 비-만능 세포 유형에서 Cpf1로의 *HPRT*에서의 정밀 유전체 편집(PGE) 효율에 미치는 영향.**

CRISPY 믹스 성분에 대한 가능한 모든 조합이 HEK293 및 K562 세포에 대해 표시되어 있다(A). NU7026은 PGE 효율을 증가시키는 반면, TSA 및 NSC15520은 명확한 효과가 없으며, MLN4924는 암 특성을 지니는 그러한 세포주에서 명확한 파괴 효과를 나타낸다. MLN4924는 또한 일차 세포에서 PEG 효율에 대해 파괴적 효과를 나타낸다



(B). MLN4924가 없는 CRISPY 믹스는  $CD4^+$  T 및  $CD34^+$  전구 세포에서 NU7026 단독 보다 PGE 효율에 더 큰 영향을 미친다. 일차 사람 상피 각질형성세포(HEKa)에서 NU7026 및 NSC15520 역시 PGE 효율에 파괴적인 영향을 미친다. PGE, PGE + 인텔, 및 인텔은 각각 녹색, 회색 또는 파란색 막대로 표시되어 있다. 오차 막대는 A에 대한 2개의 독립적인 실험, 및 B에 대한 2개의 독립적인 실험 각각에 대한 2개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다. CRISPY 믹스는 20  $\mu$ M의 NU7026, 0.01의  $\mu$ M 트리코스타틴 A(TSA), 0.5  $\mu$ M의 MLN4924, 및 5  $\mu$ M의 NSC 15520의 소분자 믹스를 나타낸다.

**도 7: CRISPY 믹스와 그 성분의 독성.** RNAiMax, gRNA 및 ssODN 존재 또는 부재하에, 도 4 및 5로부터의 소분자 및 조합과 함께 24시간 인큐베이션 후 409-B2-iCRISPR-Cas9n 세포에서의 레자주린(resazurin) 분석이 (A)에 제시되어 있다. 레자주린은 세포 탈수소효소에 의해 형광 레조르핀(resorfin)으로 전환되고, 생성된 형광(여기: 530 내지 570nm, 방출: 590 내지 620nm)은 세포 생존도의 마커로 간주된다(O'Brien et al. 2000). CRISPY 믹스는 검은색 테두리로 강조되어 있고, 약간의 독성을 띠지만 이의 성분들의 부가적인 독성 효과는 없다. 오차 막대는 2개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다. CRISPY 믹스 및 모의(mock) 처리와 함께 세포를 5회 계대한 후의 핵형 분석이 (B)에 제시되어 있다. 각각의 조건의 벌크(bulk) 및 5개 클론의 적어도 20개의 중기(metaphases)를 트립신 유도된 김사(giemsa) 염색을 사용하여 분석하였다. CRISPY 믹스(25개의 중기 배수체 중 3개) 및 모의 처리(25개 중기 배수체 중 4개)에 해당하는 2개의 단일 클론으로부터의 작은 서브세트의 중기를 제외하고는, 수치적 또는 대규모 염색체 이상이 확인되지 않았다.

**도 8: CRISPY 믹스와 그 성분 NU7026이 사람 유도 만능 줄기 세포에서 BFP 삽입(ssODN) 효율에 미치는 영향.** mtagBFP2(Subach et al. 2011) ssODN 공여자 및 iCRISPR 시스템의 설계는 (A)에 제시되어 있다. 본 발명자들은 청색 형광 단백질(BFP) 앞에 2A-자가 절단 펩타이드를 암호화하는 871개 nt(50개 nt의 상동성 아암 포함) 서열을 이형접합 AAVS1 iCRISPR 유전자좌(409-B2 iCRISPR-Cas9n hiPSCs) 중의 Cas9n의 N-말단 핵 국소화 신호 서열(NLS) 바로 다음에 삽입하였다. 서열이 삽입되면, 독시사이클린은 핵-유입된 BFP의 발현을 초래할 것이다. BFP 발현 7일 후 모의, NU7026, 및 CRISPY 믹스 처리에 대한 대표적인 이미지는 위상차(PC), 프로피디움 요도드 화물 핵 염색(PI), mtagBFP2 발현(BFP), 및 PI와 BFP의 중첩(merge)으로 (B)에 제시되어 있다. 각 처리에 대한 3개의 기술적 복제본 각각으로부터의 2개의 이미지(50x 확대, 흰색 크기 막대 200  $\mu$ m)를 사용하여 BFP 삽입을 갖는 세포의 백분율을 ImageJ를 사용하여 정량하였다(C).

**도 9: 촉매적으로 불활성인 DNA-PKcs(K3753R)는 상동성-지정-복구(HDR)를 촉진하고 비-상동성-말단-접합(NHEJ)을 차단한다.** 예를 들어, CRISPR Cas9 또는 Cpf1(회색 gRNA가 있는 밝은 청색)에 의해 유도된 이중 가닥 절단(DSB) 후, DNA 말단은 Ku70/80(오렌지색)에 의해 뒤덮이고, 뒤이어 DNA-PKcs(청록색)가 결합하고, 둘 다 각각의 DSB 말단 상의 DNA-PK 복합체를 구성한다(A). DNA-PKcs의 자가인산화는 하류 NHEJ 단백질의 동원과 활성화를 유발한다. DNA-PKcs가 촉매적으로 활성화된 경우 NHEJ는 HDR을 능가한다. DNA-PKcs가 촉매적으로 불활성화되면(예를 들어, K3753R 돌연변이에 의해), 자가인산화가 일어날 수 없고 NHEJ 경로는 차단된다. 키나아제-불활성화된 DNA-PKcs는 DSB의 우선적 HDR 복구를 이끈다. 이의 인산화 클러스터, 이의 키나아제(보라색) 및 K3753R 돌연변이(진한 파란색)와 함께, DNA-PKcs의 조직 구조가 (B)에 나타나 있다(Neal et al. 2014를 수정함). 4128개 aa(~ 470kDa) 길이의 효소는 세린/트레오닌으로 구성된 다음의 인산화 클러스터를 갖는다: N(잔기 56 및 72), JK(잔기 946 및 1003), PQR(2023 내지 2056 사이의 5개의 잔기), 및 ABCDE(2609 내지 2647 사이의 6개의 잔기). 일부 클러스터는 인산화될 때 DNA-PKcs를 활성화시키는 반면, 다른 것들은 NHEJ를 해체시키거나 심지어 키나아제를 불활성화시킨다(Neal et al. 2014). N 클러스터의 인산화, T3950 뿐만 아니라, K3753R 돌연변이는 키나아제 활성을 불활성화시키는 것으로 나타났다(Neal et al. 2011, Shrivastav et al. 2008, Douglas et al. 2007). DNA-PKcs 및 이의 K3753 주위의 서열은 척추동물에서 진화적으로 보존되어 있다(Cent et al. 2002).

**도 10: 촉매적으로 불활성인 DNA-PKcs(K3753R)는 DNA 이중 가닥 절단의 정밀 유전체 편집(PGE)의 거의 완전한 전환을 초래한다.** KR 돌연변이체는, 도입된 이중 가닥 절단의 유형에 관계없이, 409-B2 hiPSCs에서 야생형 DNA-PKcs에 비해 증가된 PGE를 야기한다. Cas9n 이중 닉킹(nickings)으로의 *CALD1*, *KATNA1*, *SLITRK1*, 및 *PRKDC*(R3753K)(A)의, 그리고 Cas9으로의 *CALD1*, 또는 Cpf1으로의 *HPRT*(B)의 증가된 PGE가 나타나 있다. PGE, PGE + 인텔, 및 인텔은, 각각 녹색, 연녹색 또는 파란색 막대로 표시되어 있다. 오차 막대는 A에 대한 2개의 독립적 실험 각각에 대한 3개의 기술적 복제본, 및 B에 대한 2개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다. 세포를 독시사이클린과 함께 3일 동안 인큐베이션하여 A의 이중 닉킹을 위해 Cas9n을 발현시켰다.

**도 11: *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 효율적인 다중화된 정밀 유전체 편집(MPGE).** gRNAs 및 ssODN DNA 공여자의 전기천공은 DNA-PKcs KR 돌연변이를 갖는 409-B2 hiPSCs에서 3개 유전자 모두에 대해 정밀 유전체 편집(PG

E)의 강력한 벌크 효율을 가능케 한다(A). PGE, PGE + 인텔, 및 인텔은 각각 녹색, 연녹색 또는 파란색 막대로 표시되어 있다. 오차 막대는 2개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타내고, 세포를 독시사이클린과 함께 4일 동안 인큐베이션하여 이중 Nicking을 위한 Cas9n을 발현시켰다. 고대 돌연변이 및 침묵 차단 돌연변이는, 표적화된 뉴클레오타이드 치환(TNS)이 발생하였고 다른 돌연변이들로부터 멀리 떨어진 차단 돌연변이가 유일한 TNS로서 도입될 수 있는 염색체에 항상 함께 도입되는 것은 아니다(B). 각각의 유전자에 대한 이중 Nicking 가이드 표적(파란색) 및 돌연변이(녹색)가 척도로 도시되어 있다. 33개의 분석된 클론들 중 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*을 운반하는 염색체에서 유전체 편집 이벤트(TNS 및/또는 인텔)의 히트맵이 (C)에 제시되어 있다. 대부분의 클론은 야생형으로 유지되거나 3개 유전자 모두에 대해 정확하게 편집된다. 히트맵은 단일 유전자에 대해 2개의 염색체 또는 세 개의 유전자 모두에 대해 6개의 염색체를 나타내는데, 상기 유전자들은, 차단 돌연변이인지 고대 돌연변이인지에 관계 없이, 인텔의 도입 및 임의의 TNS의 도입을 수반하거나(왼쪽 패널), 적어도 고대 돌연변이의 도입을 수반한다(오른쪽 패널). 단일 세포 희석 시딩(seeding)이 이제 막 전기천공된 세포의 적은 부분을 사용하여 수행되면, MPGE 클론의 생성은 2주 이내에 가능하다(D). 선발된 56개 콜로니 중, 45개가 살아 남았고, 이들 중 12개는 하나 이상의 세포에서 유래되었고(DNA 시퀀싱 판독 비율에 근거함), 분석을 위한 클론 33개가 남았다.

**도 12: Cas9D10A를 사용한 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*에서의 정밀 유전체 편집(PGE) 효율에 대한 CRISPY 믹스 및 DNA-PKcs(K3753R)의 부가적인 효과.** PGE 효율은 야생형(WT)에 비해 DNA-PKcs KR 돌연변이체(KR)로 크게 증가되고, 단일 유전자의 경우 CRISPY 믹스의 첨가로 더 증가되며(A), 일반적으로 효율이 더 낮은, 다중화된 PGE(B)의 경우에도 훨씬 더 증가된다. PGE, PGE + 인텔, 및 인텔은 각각 녹색, 연녹색 또는 파란색 막대로 표시되어 있다. 오차 막대는 3개의 기술적 복제본의 표준 편차를 나타낸다. CRISPY 믹스는 20  $\mu$ M의 NU7026, 0.01  $\mu$ M의 트리코스타틴 A(TSA), 0.5  $\mu$ M의 MLN4924, 및 5  $\mu$ M의 NSC 15520의 소분자 믹스를 나타낸다. 세포를 독시사이클린과 함께 2일(다중화의 경우 4일) 동안 인큐베이션하여 이중 Nicking을 위한 Cas9n을 발현시켰다.

**도 13: 배양 3개월 후 DNA-PKcs KR 돌연변이를 갖는 409-B2 iCRISPR hiPSCs의 대표 핵형도(karyogram).** 트립신 유도된 김사 염색으로 분석된, 25개의 중기의 경우, 모두 건강한 핵형을 나타냈다(46, XX). 수치적 또는 대규모 염색체 변이는 확인되지 않았다(밴드 수 350, 회색 음영 3).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 방법

#### 세포 배양

이 프로젝트를 위해 배양된 줄기 세포주에는 사람 409-B2 hiPSC(여성, Riken BioResource Center) 및 SC102A1 hiPSC(남성, BioCat GmbH), 침팬지 SandraA ciPSC(암컷, Mora-Bermúdez et al. 201637) 뿐만 아니라, H9 hESC(여성, WiCell Research Institute, 윤리 승인 AZ 3.04.02/0118)가 포함되었다. 줄기 세포주를 마트리젤 매트릭스(Corning, 35248)에서 성장시켰고, mTeSR1 보충제(StemCell Technologies, 05852)와 함께 mTeSR1(StemCell Technologies, 05851)을 배양 배지로 사용하였다. 비-만능 세포 유형과 이들 각각에 사용된 배지는 다음과 같았다: HEK293(ECACC, 85120602)은 10% FBS(SIGMA, F2442)와 1% NEAA(SIGMA, M7145)가 보충된 DMEM/F-12(Gibco, 31330-038)를 사용; K562(ECACC, 89121407)는 10% FBS가 보충된 IMDM(ThermoFisher, 12440053)을 사용; CD4<sup>+</sup> T(HemaCare, PB04C-1)는 10% FBS가 보충된 RPMI 1640(ThermoFisher, 11875-093)을 사용하고, Dynabeads Human T-Activator(CD3/CD28)(ThermoFisher, 11131D)로 활성화시킴; CD34<sup>+</sup> 전구체(HemaCare, M34C-1)는 StemSpan CC110(StemCell, 02697)을 보충한 StemSpan SFEM(Stemcell, 09600)을 사용; 및 HEKa(Gibco, C0055C)는 Medium 154(ThermoFisher, M154500) 및 사람 각질형성세포 성장 보충제(ThermoFisher, S0015)를 사용. 세포를 5% CO<sub>2</sub>가 채워진 가습된 인큐베이터에서 37°C에서 성장시켰다. 줄기 세포의 경우 매일, 비-만능 세포주의 경우 2일 마다 배지를 교체하였다. 세포 배양물을 ~80% 융합성까지 4 내지 6일 동안 유지하였고, 1:6 내지 1:10 희석비로 계대배양하였다. 부착 세포를 EDTA(VWR, 437012C)를 사용하여 해리시켰다. 세포 생존을 증가시키기 위해 세포를 1일 동안 분할한 후 배지에 10  $\mu$ M의 Rho-연관 단백질 키나아제(ROCK) 억제제 Y-27632(Calbiochem, 688000)를 보충하였다.

#### iCRISPR 세포주의 생성 및 검증

사람 409-B2 iPSC를 사용하여 Gonzalez 등(Gonzalez et al. 2014)에 기재된 iCRISPR-Cas9D10A 주를 생성시켰다. iCRISPR-Cas9D10A 주의 생성을 위해, Puro-Cas9 공여자를 Q5 돌연변이유발 키트(New England



Biolabs, E0554S)를 사용하여 부위-지정 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)에 적용하였다. 프라이머를 IDT(미국 코럴 빌)에 주문하였고, 표 2에 제시되어 있다. iCRISPR 주에서 만능성 마커 SOX2, OCT-4, TRA1-60 및 SSEA4의 발현을 PSC 4-마커 면역세포화학 키트(Molecular Probes, A24881)를 사용하여 검증하였다(데이터 미제시). 정량적 PCR을 사용하여 독시사이클린 유도성 Cas9 또는 Cas9D10A 발현을 확인하였고, 디지털 PCR을 사용하여 iCRISPR 카세트의 표적-이탈 통합을 배제하였다(데이터 미제시).

[0084] **소분자**

[0085] 본 연구에 사용된 상업적으로 이용가능한 소분자는 NU7026(SIGMA, T8552), TSA(SIGMA, T8552), MLN4924(Adooq BioScience, A11260), NSC 19630(Calbiochem, 681647), NSC 15520(ChemBridge, 6048069), AICAR(SIGMA, A9978), RS-1(Calbiochem, 553510), 레스베라트롤(Selleckchem, S1396), SCR7(XcessBio, M60082-2s), L755507(TOCRIS, 2197), B02(SIGMA, SML0364) 및 STL127685(Vitas-M)이었다. STL127685는 상업적으로 이용불가능한 STL127705의 4-플루오로페닐 유사체이다. 디메틸설폭사이드(DMSO)(Thermo Scientific, D12345)를 사용하여 15 mM(또는 NU7026의 경우 10 mM)의 원액(stocks)을 제조하였다. 용해도는 NU7026 농도의 제한요인이다. 각 소분자의 첨가가 배지에서 0.08%(또는 NU7026의 경우 0.2%) DMSO의 최종 농도를 차지하도록 상이한 농도에 적합한 작업 용액을 제조하였다. 모든 소분자의 첨가는 0.7% DMSO의 최종 농도를 야기할 것이다.

[0086] **gRNAs 및 ssODNs의 설계**

[0087] 본 발명자들은 사람과 네안데르탈인의 마지막 공통 조상의 상태로 되돌리는 하나의 원하는 돌연변이를 3개의 유전자 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*에 도입하기로 선택하였다(Prufer et al. 2013). 원하는 돌연변이로부터, 그리고 각각의 파트너 sgRNA로부터 단거리에서 효율적으로 절단하기 위해 Cas9D10A 니카아제를 이용한 편집을 위한 gRNA 쌍을 선택하였다. 효율을 sgRNA 스코어러 1.0 툴(Chari et al. 2015)을 사용하여 백분위 순위 점수로 평가하였다. 니카아제 편집을 위한 공여자 ssODN은 유전자좌의 재절단을 방지하기 위해 원하는 돌연변이 및 Cas9-차단 돌연변이를 갖도록 설계되었고, 각각의 Nick 상류 및 하류에 적어도 30개 nt의 상동성 아암을 가졌다(도 2). 원하는 돌연변이에 더 근접하여 절단하는 니카아제 gRNA 쌍의 gRNA를 원하는 돌연변이를 중심으로 하고 Cas9-차단 돌연변이를 함유하는 90개 nt ssODN과 함께 Cas9 뉴클레아제 편집을 위해 사용하였다(도 2). Cpf1을 사용하여 *HPRT* 및 *DMNT1*를 편집하기 위한 ssODNs은 PAM 부위 근처에 차단 돌연변이 및 절단 근처에 추가 돌연변이를 함유하도록 설계되었다. gRNAs(crRNA 및 tracrRNA) 및 ssODN을 IDT(Coralville, USA)에 주문하였다. ssODN 및 crRNA 표적은 표 2에 제시되어 있다.

[0088] **올리고뉴클레오타이드의 리포펙션**

[0089] 세포를 리포펙션 2일 전에 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 독시사이클린(Clontech, 631311)을 함유하는 배지에서 인큐베이션하였다. 리포펙션(역 형질감염)을 alt-CRISPR 제조사의 프로토콜(IDT)을 사용하여 각각의 gRNA 7.5 nM 및 각각의 ssODN 10 nM의 최종 농도로 수행하였다. 간단히 말해서, 0.75  $\mu\text{l}$ 의 RNAiMAX(Invitrogen, 13778075) 및 각각의 올리고뉴클레오타이드를 각각 25  $\mu\text{l}$ 의 OPTI-MEM(Gibco, 1985-062) 중에서 개별적으로 희석하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 두 희석액을 혼합하여 RNAiMAX, gRNA 및 ssODN을 포함하는 50  $\mu\text{l}$ 의 OPTI-MEM을 수득하였다. 리포펙션 믹스를 실온에서 20-30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안 세포를 5분 동안 EDTA를 사용하여 해리시키고, Countess Automated Cell Counter(Invitrogen)를 사용하여 계수하였다. 리포펙션 믹스, Y-27632이 보충된 mTeSR1 중의 25,000개의 해리된 세포를 함유하는 100  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 독시사이클린 및 시험될 각각의 소분자(들)을 완전히 혼합하고, 매트릭스(Corning, 35248)로 덮인 96웰 중의 하나의 웰에 넣었다. 24시간 후 배지를 일반 mTeSR1 배지로 교체했다.

[0090] **올리고뉴클레오타이드 및 리보핵단백질 전기천공(뉴클레오펙션)**

[0091] 제조함 A.s. Cpf1 및 S.p. Cas9 단백질 및 전기천공 증강제를 IDT(Coralville, USA)에 주문하였고, 다음의 변형을 제외하고, 제조업자의 프로토콜을 사용하여 뉴클레오펙션을 수행하였다. 뉴클레오펙션을, 각각의 세포주의 100만개 세포, 78 pmol의 전기천공 증강제, 160 pmol의 각각의 gRNA(Cas9 경우 crRNA/tracrRNA 듀플렉스 및 Cpf1 경우 crRNA)(하나의 유전자에 대해 두 gRNAs로의 이중 니킹의 경우 320 pmol), 200 pmol의 ssODN 공여자, 252 pmol의 CRISPR 단백질을 함유하는, 100  $\mu\text{l}$ 의 사람 줄기 세포 뉴클레오펙션 버퍼(Lonza, VVPH-5022), 또는  $\text{CD4}^+$  T 세포용 사람 T 세포 뉴클레오펙션 버퍼(Lonza, VPA-1002), 및  $\text{CD34}^+$  전구 세포용 사람 CD34 세포 뉴클레오펙션 버퍼(Lonza, VPA-1003)에 대한 큐벳들에서 Nucleofector 2b 장치(Lonza)의 B-16 프로그램(또는  $\text{CD4}^+$  T 세포의 경우 U-14)을 사용하여 수행하였다. 다중화의 경우, Cas9n 발현 iCRISPR-Cas9n hiPSC 주를 사용하였기 때문에, gRNAs 및 단일 가닥 DNA 공여자만을 전기천공하였다. Countess Automated Cell Counter(Invitrogen)

를 사용하여 세포를 계수하였다.

#### [0092] FACS-분류

[0093] 2  $\mu$ g의 플라스미드 DNA(pSpCas9n(BB)-2A-GFP(PX461), Addgene # 48140)의 Cas9를 유도가능하게 발현하지 않는 세포로의 도입을, 100만개의 SC102A1 iPSC 또는 H9 ESC를 함유하는 100  $\mu$ l의 사람 줄기 세포 뉴클레오펙션 버퍼(Lonza, VVPH-5022)에 대한 큐벳에서 Nucleofector 2b Device(Lonza)의 B-16 프로그램을 사용하여 수행하였다. Countess Automated Cell Counter(Invitrogen)를 사용하여 세포를 계수하였다. 뉴클레오펙션 24시간 후 세포를 아큐타아제(SIGMA, A6964)를 사용하여 해리시키고, 여과하여 단일 세포 용액을 수득하고, GFP 발현 세포에 대해 형광 연관 세포 분류(FACS)를 실시하였다. BD FACSAria iii(Becton-Dickinson)으로 분류하는 동안, 세포를 Y-27632가 보충된 mTeSR1에서 4°C로 유지하였다. 분류 48시간 후 세포를 sgRNA, ssODN으로 리포펙션하고 소분자로 처리하였다.

#### [0094] Illumina 라이브러리 준비 및 시퀀싱

[0095] 리포펙션 3일 후, 세포를 아큐타아제(SIGMA, A6964)를 사용하여 해리시키고, 펠렛화하고, 15 $\mu$ l의 QuickExtract(Epicentre, QE0905T)에 재현탁시켰다. 65°C에서 10분, 68°C에서 5분 및 마지막으로 98°C에서 5분 동안 인큐베이션하여 PCR 주형으로서 ssDNA를 수득하였다. Illumina 시퀀싱을 위한 어댑터를 함유하는 *CALD1*, *KATNA1*, 및 *SLITRK1*의 각각의 표적화된 유전자좌에 대한 프라이머를 IDT(Coralville, USA)에 주문하였다. 버퍼 B 및 총 부피 25 $\mu$ l 중의 3 $\mu$ l의 세포 추출물이 가 공급된 KAPA2G Robust PCR 키트(Peqlab, 07-KK5532-03)를 사용하는 T100 Thermal Cycler(Bio-Rad)에서 PCR을 수행하였다. 이 PCR의 열 사이클링 프로파일은 다음과 같았다: 95°C, 3분; 34x(95°C, 15초, 65°C, 15초, 72°C, 15초); 72°C, 60초. 샘플 특이 지수를 갖는 P5 및 P7 Illumina 어댑터를 Phusion HF MasterMix(Thermo Scientific, F-531L) 및 0.3  $\mu$ l의 첫번째 PCR 생성물을 사용하여 두번째 PCR 반응(Kircher et al. 2012)에 첨가하였다. PCR의 열 사이클링 프로파일은 다음과 같았다: 98°C, 30초; 25x(98°C, 10초, 58°C, 10초, 72°C, 20초); 72°C, 5분. EX 겔(Invitrogen, G4010-11)을 사용한 크기 분별 아가로스 겔 전기영동으로 증폭을 확인하였다. 색인된 애플리콘을 SPRI(Solid Phase Reversible Immobilization) 비드(Meyer, Kircher 2010)를 사용하여 정제하였다. 이중-색인된 라이브러리를 MiSeq(Illumina)에서 시퀀싱하여 2 x 150 bp의 짝지은 말단(paired-end) 서열을 제공하였다. Bustard(Illumina)를 사용한 염기 할당(base calling) 후 leeHom(Renaud et al. 2014)을 사용하여 어댑터를 다듬었다.

#### [0096] 서열 데이터 분석

[0097] CRISPresso(Pinello et al. 2016)를 사용하여 야생형, 표적화된 뉴클레오티드 치환(TNS), 인텔, 및 TNS와 인텔의 믹스의 백분율에 대해 CRISPR 유전체 편집 실험으로부터의 시퀀싱 데이터를 분석하였다. 분석에 사용된 매개변수는 '-w 20', '--min\_identity\_score 70' 및 '--ignore\_substitutions'이었다(분석은 야생형 서열과 최소 70%의 유사성을 갖는 애플리콘과 각 gRNA로부터의 20 bp의 윈도우로 제한되었음; 시퀀싱 오류가 NHEJ-이벤트로 잘못 특성화될 수 있으므로 치환은 무시되었음). 단일 세포 시딩 후 콜로니로부터의 시퀀싱 데이터(도 3B 및 C)는 SAMtools를 사용하여 실제 판독 서열을 평가함으로써 추가로 분석하였다. 클론 콜로니를 서열 판독 비율을 사용하여 혼합 콜로니와 구별하였다. 명백한 다수의 판독이 단일 서열(상동성) 또는 유사한 판독 횟수의 2개 서열(이중성)로 구성된 경우, 콜로니를 클론으로 계수하였다. 본 발명자들은 건강한 핵형을 확인하였기 때문에, 각 세포가 두 개의 염색체를 가지고 있다고 추정하였다. 한 클론의 세포들의 각각의 염색체에 대한 통합된 차단 돌연변이, 고대 돌연변이, 뿐만 아니라 인텔에 주목하였다.

#### [0098] 통계 분석

[0099] TNS 효율에서의 변화의 유의성을 3개 유전자 *CALD1*, *KATNA1*, *SLITRK1*에 걸쳐 풀링된 이원 분산분석 및 터키 다중 비교를 사용하여 결정하였다. 유전자 및 처치를, 각각 랜덤 효과 및 고정 효과로 처리하였다. 이에, 본 발명자들은 처치의 효과를 유전자와의 이의 상호작용에 대해 시험하였다(Zar 1999). 분석에는 각 유전자에 대해 3개의 기술적 복제본을 포함시켰다. 본 발명자들은 QQ-플롯(Field 2005)의 육안 검사와 적합치(fitted values)에 대해 플롯팅된 잔차(residual)(Quinn & Keough 2002)에 의해 정규 분포되고 균질한 잔차에 대한 추정이 충족되는지 확인했다. 이들은 잔차가 대략 대칭으로 분포되지만 가늘고 긴 꼬리(즉, 너무 큰 양 및 음의 잔차)를 가지며 균질성 추정으로부터 명백한 편차가 없음을 나타냈다. 다중 비교를 위해 P 값이 조정된다. R을 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

#### [0100] 레자주린 분석

[0101] 409-B2 iCRISPR-Cas9n hiPSCs를 '올리고뉴클레오타이드의 리포펙션'에 기재된 바와 같이 편집 시약(KATNA1 편집을 위한 RNAiMax, gRNA 및 ssODN 공여자)의 존재 또는 부재하에 시딩하였다. 배지에 소분자 또는 소분자의 조합을 보충하고, 각각의 조건을 이중으로 수행하였다. 24시간 후 배지를 흡인하고 10  $\mu$ l의 레자주린 용액(Cell Signaling, 11884)과 함께 100  $\mu$ l의 신선한 배지를 첨가하였다. 레자주린은 세포 탈수소효소에 의해 형광 레조르핀으로 전환되고, 생성된 형광(여기: 530-570nm, 방출: 590-620nm)은 세포 생존도에 대한 선형 마커로 간주된다(O'Brien et al. 2000). 세포를 37°C에서 레자주린과 함께 인큐베이션하였다. 산화환원 반응을 Typhoon 9410 이미저(Amersham Biosciences)를 사용하여 흡광도 판독으로 매시간 측정하였다. 5시간 후, 흡광도 스캔은 포화되지 않으면서 양호한 대조를 나타내었고, ImageJ 및 'ReadPlate' 플러그인을 사용하여 흡광도를 정량화하는데 사용하였다. 세포 없이, 배지 및 레자주린 함유 중복(duplicate) 웰을, 블랭크로 사용하였다.

## [0102] 현미경 및 이미지 분석

[0103] 모의(mock), NU7026, 및 CRISPY 믹스 처리에 대한 2개의 기술적 복제본에서 409-B2 iCRISPR-Cas9n hiPSC를 gRNAs 및 BFP(Blue Fluorescent Protein) 단일 가닥 올리고로 뉴클레오펙션시켰다(도 8A, 330ng). 정밀하게 편집된 세포에서 핵으로 유입된 BFP의 발현을 가능하도록 하기 위해, 7일 동안 2  $\mu$ g/ml의 독시사이클린(Clontech, 631311)을 배지에 보충하였다. 이어서, 세포를 DPBS(ThermoFisher, A24881) 중의 4% 포름알데히드로 15분 동안 고정시키고, 100 $\mu$ g/ml의 RNaseA(ThermoFisher, EN0531) 및 40 $\mu$ g/ml의 프로피디움 요오드화물(ThermoFisher)이 보충된 DPBS(ThermoFisher, A24881) 중의 1% 사포닌으로 37°C에서 45분 동안 투과시키고, DPBS로 3회 세척하였다. 핵산 인터칼레이팅 프로피디움 요오드화물을 사용하여 핵을 대비염색하였다. 형광 현미경 Axio Observer Z(Zeiss)를 사용하여, 각 처리에 대한 3개의 기술적 복제본 각각으로부터, 위상차, HcRed 채널(BP 580-604nm, BS 615nm, BP 625-725nm, 10.000ms), 및 DAPI 채널(BP 335-383nm, BS 395nm, BP 420-470nm, 20.000ms)로 이루어진, 2개의 이미지(50x 배율)를 얻었다. 이미지를 가리고, Adobe Photoshop CS5 카운팅 툴을 사용하여 BFP 양성 핵을 계수하였다. 프로피디움 요오드화물 양성 핵을 핵의 면적(디폴트 역치)을 단일 핵들의 평균 면적으로 나누어 ImageJ를 사용하여 정량하였다.

## [0104] 핵형분석

[0105] 핵형의 현미경 분석을 트립신 유도된 검사 염색 후에 수행하였다. 분석을 "Sähsischer Inkubator für klinische Translation"(독일, 라이프치히)에 의한 국제 품질 가이드라인(ISCN 2016: 사람 세포유전학적 명명법에 관한 국제규약 48)에 따라 수행하였다.

## [0106] 연구 설계

[0107] 본 발명자들은 iPSCs에서 몇몇 소분자의 정밀한 유전체 편집 효율을 시험하는 것을 목표로 하였다. 화합물 SCR7, L755507, 및 RS-1은 문헌에서 잠재적인 CRISPR-Cas 효과기로서 제시되었으나, 나머지 다른 시험 화합물은 아직 이러한 목적으로 알려져 있지 않다. 시험 화합물은 표 1에 제시되어 있다.

[0108] **표 1: 본 연구에서 평가된 소분자의 개요.** 표적화된 단백질, 이의 기능, 뿐만 아니라 각각의 경로와 소분자의 기능이 나타나 있다. 별표가 표시된 참조문헌은 소분자를 CRISPR-Cas 효과기로 나타낸다. 약어: 대체 NHEJ(Alt-NHEJ), 손상 의존적 신호전달(DDS).

경로	단백질	단백질 기능	소분자	소분자 기능	참조문헌
NHEJ	Ku70/80	DNA 말단에 결합하는 첫번째 단백질	STL127685	Ku70/80 억제자의 4-플루오로페닐 유사체	Weterings et al. 2016
	DNA-PK	Ku70/80 및 DNA-PKcs 의 복합체, DNA-PKcs 는 복구 부위에서 그 자체 및 하류 효과기들 인산화시킴	NU7026	DNA-PK 억제제	Suzuki et al. 2016*
	리가아제 IV	말단-가공 결합	SCR7	리가아제 IV 억제제	Maruyama et al. 2015*
Alt-NHEJ (NHEJ)	WRN 헬리카제	DNA 풀림	NSC 19630	WRN 헬리카제 억제제	Aggarwal et al. 2011
HDR	CtIP	DNA 말단 절제	MLN4924	NAE 억제자, CtIP 의 네딜화(neddylation)를 억제함	Jimeno et al. 2015
	RPA	ssDNA 의 코팅 및 안정화	NSC15520	p53 및 RAD9 에 대한 RPA 의 결합을 억제함	Glanzer et al. 2011, 2013
	RAD52	ssDNA 역닐링	AICAR	RAD52 억제제	Sullivan et al. 2016
	RAD51	상기 공여자 DNA 와 함께 가닥 침투	RS-1	RAD51 인핸서	Song et al. 2016*
			B02	RAD51 억제제	Huang et al. 2011
DDS	ATM	다수의 DNA 복구 단백질들을 인산화시킴	테스베다트론	정제된 ATM 에 대해 직접적인 자극 효과	Lee et al. 2014
			TSA	비스몬탈아세틸화효소 억제제, ATM 중의 Ser1981 의 인산화를 유도함	Lee 2007
?	$\beta$ 3-아드레날린 수용체	아드레날린 고리화효소의 활성화에 관여함	L755507	$\beta$ 3-아드레날린 수용체 작용제	Yu et al. 2016*

HDR 효율에 대한 소분자의 영향 분석을 위한 도구로서, 본 발명자들은 독시사이클린 유도성 Cas9 또는 Cas9D10A 발현과, ssODN 및 가이드 RNA(gRNA)의 효율적인 전달을 가능하게 하는 iCRISPR-Cas9 및 iCRISPR-Cas9D10A iPSC 주를 생성시켰다(Gonzalez et al. 2014). 유전체 편집 및 분석 플로우차트는 도 1에 도시되어 있다. 3개의 예시적인 유전자 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 편집에 사용된 gRNA, ssODN 및 프라이머의 설계는 도 2 및 표 2에 나타나 있다.

**표 2: 본 연구에 사용된 올리고뉴클레오타이드.** *CALD1*, *KATNA1*, *SLITRK1*, *HPRT*, *DMNT1*, AAVS1-iCRISPR, 및 *PRKDC*의 편집을 위한 gRNA(crRNA 표적) 및 단일 가닥 DNA 공여자(ssODN) 뿐만 아니라, Cas9 iCRISPR 공여자 플라스미드의 분석 및 Q5 부위-지정-돌연변이유발을 위한 프라이머가 제시되어 있다. 돌연변이는 굵은 글씨로 표시되어 있고, 고대 돌연변이는 또한 밑줄이 그어져 있다. 공여자 *KATNA1* Cas9D10A 2 및 *SLITRK1* Cas9D10A 2는 상이한 침묵 돌연변이를 지니고 있고, 도 10 내지 12에서 사용되었다.

gRNAs	<i>CALD1</i> t1	TGGAGACTATTGCTGCTTGA (서열번호 1)
	<i>CALD1</i> t2	GCACTATACCACTGCAATTG (서열번호 2)
	<i>KATNA1</i> t1	AAATGATGACCCCTTCCAAA (서열번호 3)
	<i>KATNA1</i> t2	CACACCTAAATAAGGGTA (서열번호 4)
	<i>SLITRK1</i> t1	GCTAACAGTTTACCCCTGCC (서열번호 5)
	<i>SLITRK1</i> t1	ACCCGTCGCTATCGCTGCTG (서열번호 6)
	<i>HPRT</i> t1	GGTTAAGATGGTTAATGAT (서열번호 7)
	<i>DMNT1</i> t1	CTGATGGTCCATGCTGTATC (서열번호 8)
	iCRISPR BFP 삽입 t1	TGTCGGGCTGCTGGGACTCG (서열번호 9)
	iCRISPR BFP 삽입 t2	TACAGCATCGGCGCTGGCTAT (서열번호 10)
	<i>PRKDC</i> t1	GGTCCCTCGCCACCCCTTCAC (서열번호 11)
	<i>PRKDC</i> t2	GCGCGTGGAGCAGCTCTTCC (서열번호 12)
	<i>PRKDC</i> t1-복귀(back)	GGTCCCTCGCCACCTCTCAC (서열번호 13)
	<i>CALD1</i> Cas9	GTATACTGCTCCAGTCTGCTGTCAATCTTGGAGACTACTGCTGCTTGATGGGTCGATTGAC
ssODNs		ACCACCTGCTAATAAAGTAACACATACA (서열번호 14)



CALD1 Cas9D10A	TTATATGTTATGTTTACTTTTTTTAGCAGTGGTGTCAAACTGCACCCATCAAGCTGCAGTAGT CTCCAGAAATTGACAGCAGACTGGAGCAGATATACCACTGCTATTGAGGTGAGAAATTGTCTCTCA GGCTATGTTGCTCTGCTGAACAGAAATAGA (서열번호 15)
KATNA1 Cas9	GAAAGGGCTCATCATTTTTCAGAAAGCCCTCCACACCTAAATATAGGGAGAGGGGAGAGGTGAAA AAGATATTAAAGTTGGATTATACCAATG (서열번호 16)
KATNA1 Cas9D10A	CTCATCTATATCTCCAGGAAAAATTTAGTAGCTGCCAGAACCATACCATTTTATAGAAAGGGTCAT CATTTTTCAGAGGGCGCTCCCAACACTAAATATAGGTAGAGGGAGAGTGAAGAAAGATATTAA GTTGGATTATACCAATTAAGACT (서열번호 17)
KATNA1 Cas9D10A 2	CTCATCTATATCTCCAGGAAAAATTTAGTAGCTGCCAGAACCATACCATTTTATAGAAAGGGTCAT CATTTTTCAGAAAGGACTCCCAACACTAAATATAGGTAGAGGGAGAGTGAAGAAAGATATTAA GTTGGATTATACCAATTAAGACT (서열번호 18)
SLITRK1 Cas9	TGTTGATTAAAGGTTTGTCTCTGGCGTACCCGCTGCTATCGCTCGGTGGGCTGATTTT ATCTGCAAGTCTGCTGGGATCTTTGTGAC (서열번호 19)
SLITRK1 Cas9D10A	TCATCTTTAAACCCGACCTCGGAGTGTGGTCGAGCTGCGAGCCCCAGGACAGGGGTAAACTG TTAGCTAAAGGTTTGTCTCTGGGATGCTGCTGCTATCGCTGCGGTGGGCTGATTTTGTAT CTGCGACTGCTGGATCTTTGTACTCTCG (서열번호 20)
SLITRK1 Cas9D10A 2	TCATCTTTAAACCCGACCTCGGAGTGTGGTCGAGCTGCGAGCCCCAGGACATGTTAACTG TTAGCTAAAGGTTTGTCTCTGGGCTACCCGCTGCTATCGCAGCTGTGGGCTGATTTTGTAT CTGCGACTGCTGGATCTTTGTACTCTCG (서열번호 21)
HPRT Cpf1	GCCATTTCACATAAACTCTTTTAGGTTATAGATGGTTAAATGAATGACAAAAAAGTAATT CATTTACAGCTCTGCTTTATATCCACAC (서열번호 22)
DMNT1 Cpf1	TTAACTACACTAGTCTTAATGTTTCTTGATGCTCATGTCTGTAGTCTGCTGCTCAAGTGGCG TGACACCGGGGTGTCTCCACAGAGTGAC (서열번호 23)
mtagBFP-CRISPR-Cas9	AAGACGCTGACGATAGATGGCCCAAAGAAAGAGCGGAAGGTCTGGTATCCACGGAGTCCC AGCAGCGTGAGCAAGAGGCGAGAGCTCATCAAGGAGAACTGCACATGAAGCTGTACATGG AGGCGACCGTGACACCACTCACTCAAGTGCACAGCGAGGGGCGAGGCGACGCCCTCAGAG GAGCCACCAAGCACTGCGCATCAAGGTGGTGAGGGCGGCGCCCTCGCTCTGCATCTGCAT CTTGCGCCACAGCTTCTGTCACGCGCAAGACTTCATCAACCAACCCAGGGCATCCCGC ACCTTCTCAAGCAGAGCTTCCCGCAGGGGCTCACTCGGAGGCGGTGACCACTACGAGGAC GGCGGCTGCTGACGCCACAGGACACCAAGCTGCGAGCAAGGCTGCTGATCTACAAAGT GAAGATCCCGGCTGTGAATCTCAAGTAATGGGCTCTGATGTCAGCAAGAGACTCTGGGCT GGAGGCACTACACGAGACCTCTATCTGGGCTGATGGTGGGCTGAGGGGTGCAACGATG GCTTTGAAACTGTGCGGAGAGGCTCACTCATGCGCAACCGCTAAACCAACCTATAGGTCTAA GAAGCCCGCAAGAACTTGAAGTGCAGGGGCTCTACTATGTAGATACCCGTGGAGCAAG TAAAGAGGGCTAATATAGAGAGCTCGTAGAACAAACAGAGGTAGAGTCTGCTGATATGCTG GATCTGGCAGGTAAAGCTGGACATAAGCTGAACGGCAGTGGAGAGGTGGGAGTCACTGCT GAGTGTGGAGATGTGAAGAGAACCCCGGCCCGCCAGAGAGTACAGCATCGGCTGGGCA TCGGCACCACTCTGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGCAGAGTACAAAGGTGCCCA (서열번호 24)
PRKDC Cas9n	GCGAAGCCCAAGCGCATCATCTCGTGGCCATGACGAGAGGGAAACCCCTTCTCGGTGA GAGGTGGCAGGAGCTTGGCGCAGGACAGCGGCTGGAGCAGCTCTTCAGGTCATGAATGGG ATCCTGGCCCAAG (서열번호 25)
PRKDC-복구 Cas9n	GCGAAGCCCAAGCGCATCATCTCGTGGCCATGACGAGAGGGAAACCCCTTCTCGGTGA AGGCTGGCAGGAGCTTGGCGCAGGACAGCGGCTGGAGCAGCTCTTCAGGTCATGAATGGG ATCCTGGCCCAAG (서열번호 26)
CALD1 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCTAATCAGCTAGCATATGTATGAGAA (서열번호 27)
CALD1 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGACTTGATTATTGTCTTAAGTG (서열번호 28)
KATNA1 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGACGGCAAGAGAAATATAG (서열번호 29)
KATNA1 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTGTGCTTCTGTATTGTGT (서열번호 30)
SLITRK1 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGGCTTCAAACTCAGCCAAAG (서열번호 31)
SLITRK1 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAAGCAAAATGGGCAAG (서열번호 32)
HPRT 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTGAAGAGAGCCCCACGAA (서열번호 33)
HPRT 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGCAAAATGTGCTCTCTACAAAT (서열번호 34)
DMNT1 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGAACGTTCCCTTAGCACTCTG (서열번호 35)
DMNT1 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTAGCAGCTTCTCTCTCTC (서열번호 36)
Q5 D10A 정방향	TGGTGGCAGTAGCCAGGCGGATG (서열번호 37)
Q5 D10A 역방향	ACTCTGGGGCTGGGCGG (서열번호 38)
PRKDC 정방향	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGCTGTGGCTTGAGATG (서열번호 39)
PRKDC 역방향	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCACAACTGATAGGTCTCTCA (서열번호 40)

[0113]

[0114]

NHEJ를 차단하는 능력을 시험하기 위해 본 발명자들이 선택한 소분자는 SCR7, STL127685(Ku70/80 억제제 STL127705의 4-플로오로페닐 유사체임(Weterings et al. 2016)), 및 DNA-PK 억제제 NU7026(Suzuki et al. 2016)이다. Alt-NHEJ를 차단하기 위해, 본 발명자들은 WRN 헬리카제 억제제인 NSC 19630(Aggarwal et al. 2011)을 선택했다. NEDD8 활성화 효소(NAE) 억제제 MLN4924는 CtIP의 네틸화(neddylation)를 억제하는 것으로 나타났는데, 이는 가닥 절단에서 DNA 말단 절제(resection)의 연장을 증가시키고, 따라서 DNA 이중 가닥 절단 복구 경로 선택을 조절하여 우선적으로 HDR을 겪게 한다(Jimeno et al. 2015). DNA 절제는, 상동성 검색 및 재조합을 겪기 전에, RPA에 의해 코팅되고 안정화된 ssDNA를 남긴다. 본 발명자들은 RPA의 가용성이 증가하면 HDR을 선호할 수 있다고 추정하였다. 푸마로피미르산(NSC15520)은 p53과 RAD9(Glanzer et al. 2011)(Glanzer et al. 2013)에 대한 RPA의 연합을 차단하여, 아마도 ssDNA에 대해 가용한 RPA의 풍부성을 증가시킨다. RAD51은 이중 가닥 DNA(dsDNA)와의 상동성 재조합에 중요한 반면, RAD52는 ssDNA의 어닐링에 필요하다(Grimme et al. 2010). 따라서, 본 발명자들은 정밀 유전체 편집 효율에 대한 RAD52 억제제 AICAR(Sullivan et al. 2016), RAD51 억제제 B02(Huang et al. 2011), 및 RAD51 인핸서 RS-1(Song et al. 2016)의 영향을 시험하기로 결정하였다. 또한, 본 발명자들은 복구 단백질 키나아제 ATM을 증강시키는 것으로 기술된 소분자를 포함시켰다. 레스베라트롤은 시험관내에서(*in vitro*) 정제된 ATM의 촉매 효율에 직접적인 자극 효과를 나타내는 것으로 기술되었다(Lee et al. 2014). 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 트리코스타틴 A는 ATM-의존적 DNA 손

상 신호전달 경로를 활성화시키고, HR을 증가시키는 것으로 기술되었다(Lee 2007)(Jimeno et al. 2015). 마지막으로, 본 발명자들은 본 스크리닝에  $\beta$ 3-아드레날린 수용체 작용제 L755507을 포함시켰다.

[0115] **결과**

[0116] **정밀 유전체 편집에 대한 소분자의 영향**

[0117] 먼저, 본 발명자들은 iCRISPR Cas9D10A를 이용한 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 정밀 편집에 미치는 소분자의 영향을 조사하기 위해 이들 소분자를 다양한 농도로 시험하였다(도 3). 결과적으로, 본 발명자들은 가장 높은 빈도의 정밀 유전체 편집을 나타낸 각각의 농도를 선택하였다. 다른 농도들이 편집에 유사한 영향을 미쳤을 경우, 본 발명자들은 더 낮은 농도를 선택하였다. 반복된 독립적인 실험들로부터 Cas9D10A 및 Cas9을 이용한 *CALD1*, *KATNA1*, 및 *SLITRK1*에서의 정밀 유전체 편집 효율에 대한 선택된 소분자의 농도 효과는 도 4에 제시되어 있다.

[0118] Cas9D10A(도 4A) 및 Cas9(도 4B)와 함께 NU7026 처리는 3개 유전자좌 모두에 대해 PGE를 증가시켰다. 평균 변화는 Cas9D10A를 이용시 *CALD1*의 경우 1.5배, *KATNA1*의 경우 2.6배, 및 *SLITRK1*의 경우 2.5배로 나타났고, Cas9을 이용시 *CALD1*의 경우 1.5배, *KATNA1*의 경우 1.6배, 및 *SLITRK1*의 경우 1.2배로 나타났다. NU7026 외에도, 본 발명자들은 TSA 및 MLN4924가 Cas9D10A를 이용시 PGE 빈도에 증강 효과를 나타내는 것을 확인하였다. TSA는 Cas9D10A를 이용시 PGE를 *CALD1*의 경우 1.5배, *KATNA1*의 경우 2.2배, 및 *SLITRK1*의 경우 1.8배 증가시켰고; 흥미롭게도 Cas9 이용시에는 아무런 증강 효과도 확인되지 않았다. MLN4924는 Cas9D10A를 이용시 PGE를 *CALD1*의 경우 1.2배, *KATNA1*의 경우 1.1배, 및 *SLITRK1*의 경우 1.3배 증가시켰다. Cas9을 이용시, MLN4924가 PGE에 미치는 영향은 약간 감소한다. NSC 15520으로의 처리는 Cas9D10A 및 Cas9와의 이용시, 이 *CALD1*의 PGE를 각각 1.4배 및 1.3배 증가시켰다. 그러나, *KATNA1* 및 *SLITRK1*의 PGE에는 영향을 미치지 않았다. NSC 19630, AICAR, RS-1, 레스베라트롤, SCR7, L755507, 및 STL127685는 Cas9D10A를 이용시 각각의 대조군에 비해 3개의 유전자 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1* 전체에 걸쳐 PGE 빈도에 명확한 영향을 나타내지 않았고, Cas9 이용시에는 영향이 없거나 감소된 영향을 나타내었다. B02는 Cas9D10A 및 Cas9을 이용한 둘 다에서 3개 유전자좌 모두의 PGE를 절반으로 감소시켰다.

[0119] 다음으로, 본 발명자들은 소분자의 조합이 Cas9D10A 또는 Cas9를 이용한 PGE에 증강 효과를 나타내는지 시험하였다. 본 발명자들은 적어도 하나의 유전자좌에서 Cas9D10A를 이용한 PGE의 증가를 나타내고, PGE 감소를 결코 나타내지 않은 소분자를 선택하였고; 이들 분자는 NU7026, TSA, MLN4924, NSC 19630, NSC 15520, AICAR, 및 RS-1이다.

[0120] Cas9D10A 또는 Cas9 중 하나를 이용한 3개의 다른 유전자좌의 편집에 대한 소분자 조합의 영향은 도 5에 제시되어 있다. Cas9D10A를 이용한 편집의 경우, NU7026 처리는 상기 분자가 없는 경우 보다 2.3- 또는 1.8배 더 높은 PGE 빈도를 초래하였다(터키 쌍대 사후 비교 :  $p < 0.001$ )(도 5A). NU7026 및 TSA 모두의 조합은 NU7026 또는 TSA 단독 보다 1.3 또는 1.6배 더 높은 PGE 빈도를 초래하였다( $p < 0.001$ ). NU7026 및 TSA의 믹스에 MLN4924의 첨가는 PGE에서 추가로 1.3배의 증가를 야기한다( $p < 0.01$ ). NSC 15520의 추가 첨가는, 편집을 위해 Cas9D10A를 사용했을 때, 모든 유전자좌에 대한 PGE의 평균을 약간 증가시켰으나, 통계적 유의성에는 도달하지 못하였다. NSC 19630, AICAR, 및 RS-1의 첨가는 PGE에 측정가능한 영향을 미치지 않았다.

[0121] 본 발명자들은 Cas9D10A를 이용한 PGE의 빈도를 가장 증가시키는 소분자의 믹스가 NU7026(20  $\mu$ M), TSA(0.01  $\mu$ M), MLN4924(0.5  $\mu$ M) 및 NSC 15520(5  $\mu$ M)의 조합인 것으로 결론짓고, 이를 'CRISPY' 닉카아제 믹스로 명명한다. 이것은 iCRISPR 409-B2 iPSC 주에서 *CALD1*의 경우 2.8배(11에서 31%), *KATNA1*의 경우 3.6배(12.8에서 45.8%), *SLITRK1*의 경우 6.7배(4.7에서 31.6%)의 PGE 증가를 가져왔다.

[0122] 평활 말단 DSBs를 도입하는, Cas9를 사용했을 때, NU7026 외에 다른 소분자를 첨가한 경우 유의미한 효과는 확인되지 않았다(도 5B). 대조적으로, 409-B2 hiPSC에서 전기천공으로 도입된, 엇갈린 DNA 절단을 생성하는, Cpf1 리보핵단백질과 함께 CRISPY 믹스는, PGE를 *HPRT*의 경우 2.9배 및 *DMNT1*의 경우 4.0배 증가시켰다(도 5D). 단지 NU7026의 첨가는 PGE를 *HPRT*의 경우 2.1배 및 *DMNT1*의 경우 2.4배 증가시켰다.

[0123] CRISPY 믹스가 다른 만능 줄기 세포주에서 PGE를 증가시키는지 시험하기 위해, 본 발명자들은 Cas9n 플라스미드 전기천공을 사용하여 SC102A1 hiPSCs 및 H9 hESCs에서 유전자 *KATNA1*을 편집하고, Cpf1 리보핵단백질을 사용하여 침팬지 iPSCs에서 *HPRT*를 편집하였다. PGE는 각각 2.6배, 2.8배, 2.3배 증가했으며, NU7026 단독으로 사용했을 때보다 더 크게 증가하였다(도 5C).

[0124] 추가 실험에서, 표적화된 뉴클레오타이드 치환 효율에 대한 CRISPY 믹스 및 그의 성분의 영향을 Cpf1의 전기천공



에 의해 불멸화된 사람 배아 신장 세포주 HEK293, 불멸화된 백혈병 세포주 K562, 조혈 CD4<sup>+</sup> T 세포 및 CD34<sup>+</sup> 조혈 전구 세포 뿐만 아니라, 일차 사람 각질형성세포(HEKα)를 포함하는 복수의 비-만능 세포 유형에서 시험하였다. 결과는 도 6에 제시되어 있다. CRISPY 믹스의 성분 NU7026은 HEKα 세포를 제외한 시험된 세포주에서 효과적이라는 것이 확인되었다. HEK293 및 K562 세포에서, NU7026은 PGE 효율을 강하게 증가시키고, TSA 및 NSC15520은 효율을 적당히 증가시키며, MLN4924는 암 특성을 갖는 그러한 세포주에서 명백한 파괴적 효과를 나타낸다. MLN4924는 일차 세포에서도 PGE 효율에 파괴적 효과를 나타낸다. MLN4924가 없는 CRISPY 믹스는 조혈 CD4<sup>+</sup> T 및 CD34<sup>+</sup> 선조 세포에서 NU7026 단독 보다 PGE 효율에 더 높은 영향을 미친다. 일차 사람 각질형성세포(HEKα)에서, NU7026 및 NSC15520 또한 PGE 효율에 파괴적인 영향을 미친다.

[0125] 또다른 추가 실험에서, CRISPY 믹스 및 그 성분의 독성을 시험하였다. 24시간 동안 Cas9n 이중 니킹 및 CRISPY 믹스 처리를 이용한 KATNA1 편집 후, 세포는 소분자를 처리하지 않은 것과 비교하여 75%의 생존도를 나타냈고, 이들의 성분들의 부가적 독성 효과는 없었다(도 7). 중요하게도, 본 발명자들이 5 라운드의 편집을 시뮬레이션 하였을 때, 각 라운드는 리포펙션 시약과 CRISPY 믹스를 이용해 세포를 계대배양 한 후, 뒤이어 3일이 회복으로 이루어졌으며, 세포는 트립신-유도된 검사 염색에 의해 나타난 바와 같이 수치적 또는 대규모 염색체 이상이 없는 건강한 핵형을 가졌다(도 13).

[0126] 또다른 추가 실험에서, 사람 유도 만능 줄기 세포에서 BFP 삽입(ssODN) 효율에 대한 CRISPY 믹스 및 그의 성분 NU7026이 미치는 영향을 시험하였다. 결과는 도 8에 제시되어 있다. 본 발명자들은 AAVS1 iCRISPR 유전자좌에서 증강된 청색 형광 단백질(BFP)(Subach et al. 2011) 앞에 2A-자가 절단 펩타이드를 암호화하는 871개 nt(50개 nt 상동성 아암 포함) 서열을 삽입하였다. 서열이 삽입되면, 독시사이클린은 핵-유입된 BFP의 발현을 초래할 것이다. BFP에 대해 양성인 핵은 CRISPY-무처리 대조군(3.7%)과 비교하여 7.1배(26.6%) 증가한 반면, 단독의 NU7026은 1.6배(6 %) 증가를 가져오는데(도 8B 및 C), 이는 CRISPY 믹스가 iPSCs에서 유전자 단편의 삽입 효율을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0127] 정밀 유전체 편집에 대한 제형화된 DNA 단백질 키나아제 촉매 서브유닛의 효과

[0128] ATP 결합 부위 근처의 K3753R의 돌연변이는 DNA-PKcs의 키나아제 활성을 폐기시킨다. CHOv3 세포에서, DNA-PKcs KR 세포에서 DSB 유도된 HDR은 DNA-PKcs 제거(null) 세포의 상승된 HDR 수준 보다 2 내지 3배 더 높은 것으로 나타났고, 야생형 DNA-PKcs를 발현하는 세포에서 보다 ~4 내지 7배 더 높은 것으로 나타났다(Shrivastav et al. 2008 및 2009).

[0129] 본 발명자들은, 감소된 표적-이탈과 함께 표적화된 DSBs의 높은 효율을 달성하기 위해(Shen et al. 2014), Gonzalez 등(2014)에 의해 기술된 바와 같이 독시사이클린 유도성 Cas9 니카아제(iCRISPR-D10A)로 유도된 만능 줄기(iPSC) 세포주를 생성하였다. 통합된 Cas9D10A를 사용하여, 본 발명자들은 DNA-PKcs의 키나아제 활성 부위 근처에서 라이신을 아르기닌으로 교체(K3752R)하여 이의 키나아제 활성을 불활성화시키면서(Shrivastav et al. 2008 및 2009), 전반적인 구조를 온전하게 유지시켰다. 야생형 DNA-PKcs를 사용한 정밀 유전체 편집의 효율성을 DNA-PKcs KR을 사용한 경우와 비교하기 위해, 본 발명자들은 신경돌기 생장 유전자 *CALD1*, *KATNA1* 및 *SLITRK1*을 선택하여 사람과 네안데르탈인의 마지막 공통 조상의 조상 상태로 정밀하게 편집하기로 결정하였다(Prufer et al. al. 2014). 본 발명자들은 또한 R3753을 다시 리신으로 교환함으로써 *PRKDC*(DNA-PKcs)의 역 불활성화의 효율을 탐구하였다. 야생형 DNA-PKcs 또는 DNA-PKcs KR을 발현하는 iCRISPR-Cas9D10A로의 *CALD1*, *KATNA1*, *SLITRK1* 및 *PRKDC*의 PGE 효율은 도 10A에 도시되어 있다. DNA-PKcs KR을 사용할 때, PGE 효율은 *CALD1*, *KATNA1*, 및 *SLITRK1*의 경우 2.5배(36%), 4.1배(78.5%), 및 7.8배(51.1%) 증가한다. 이는 PGE/NHEJ의 비율이, 각각 0.23, 0.29 및 0.08에서 3.49, 25.45, 및 2.60으로 이동한 것에 상응한다. 본 발명자들은 염색체의 71.4%에서 *PRKDC*의 역 돌연변이를 달성하였다. 제조함 Cas9 또는 Cpf1을 전기천공할 때, *CALD1* 또는 *HPRT*에 대한 PGE 효율은 4.8배(72.2%) 또는 8.3배(43.7%) 증가하였고, PGE/NHEJ의 비율이 0.45에서 12.8 또는 0.08에서 7.1로 이동하였다. 따라서 DSB 유형에 관계없이 KR 주에 의해 PGE가 증가된다.

[0130] DNA-PKcs KR을 이용한 이렇게 높은 PGE 효율성을 감안하여, 본 발명자들은 그 다음으로 상기 3개 유전자의 다중 편집을 시도하였다. 본 발명자들은, gRNA 및 ssDNA 공여자의 다중화된 리포펙션을 사용할 때, 유전자에 대해 기껏해야 3 내지 10%의 PGE 효율을 달성하였다(데이터 미제시). 3개 유전자에 대해 gRNAs 및 ssODN을 전기천공할 때, 본 발명자들은 *CALD1*의 경우 21.3%, *KATNA1*의 경우 32.0%, *SLITRK1*의 경우 34.0%의 PGE 효율을 달성하였다(도 11A). 리포펙션과 달리, 세포는 전기천공을 위한 단일 세포 현탁액으로 제조된다. 세포의 대부분을 이후의 벌크 DNA 단리를 위해 도말하였으나, 10%는 하나의 세포에서 유래되는 콜로니를 생성시키게 될 단일 세포 희석으로 도말하였다. 33개 클론의 분석으로, 고대 돌연변이 및 침묵 차단 돌연변이가 표적화된 뉴클레오티

드 치환(Targeted Nucleotide Substitution; TNS)이 발생한 염색체에 항상 함께 도입되는 것은 아닌 것으로 나타났다(도 11B). 도 11C는 차단 돌연변이 또는 고대 돌연변이에 상관 없이(좌측 패널), 또는 적어도 상기 고대 돌연변이의 도입에 상관없이(우측 패널), 인텔의 도입 및 임의의 TNS의 도입을 갖는 염색체의 히트맵을 보여준다. 대부분의 클론은 야생형으로 유지되거나, 3개 유전자 모두에 대해 정밀하게 편집된다. 놀랍게도, 클론의 3분의 1은 3개의 유전자 모두에 대해 두 염색체 상에 임의의 추가 인텔 없이 TNS를 갖는다. 클론의 12.1%는 3개 유전자 모두에 대해 두 염색체 상에 임의의 추가 인텔 없이 적어도 상기 고대 TNS를 갖는다. 33.3%에서 12.1%로의 하락은 주로 *CALD1* 공여자의 설계에 기인한 것으로, 우측 차단 돌연변이는 다른 두 돌연변이와는 멀리 떨어져 있었으며, 이것은 *CALD1* TNS 양성 염색체의 30%(30개 중 9개)에서 유일하게 도입된 치환이다(도 3A). 단일 유전자 TNS 효율(임의의 TNS에 대해 7.1%가 예상되고 적어도 고대 TNS에 대해 2.9%가 예상됨)에 기초하여, 3개 유전자의 두 염색체 상에 TNS의 도입은 우연히 예상되는 것보다 4배 이상 더 높다. 본 명세서에 제시된 MPGE는 효율적일 뿐만 아니라 신속하다. 전기천공 직후에 단일 세포 희석 시딩을 사용하면 2주 이내에 원하는 MPGE로 클론을 생성할 수 있다(도 11D). 중요하게도, DNA-PKcs KR hiPSCs는, 트립신 유도된 김사 밴딩에 의해 나타난 것과 같이, 26회 계대(3개월에 해당) 후에 수치적 또는 대규모 염색체 이상을 수반하지 않는 건강한 핵형을 유지하였다(도 13).

[0131] 돌연변이된 DNA-PKcs의 존재 하의 PGE 효율은 본 발명자들이 추가 실험에서 확인한 바와 같이 Cas9D10A와 함께 CRISPY 믹스에 의해 추가로 증강될 수 있다. DNA-PKcs 돌연변이체는 *CALD1*, *KATNA1*, 및 *SLITRK1* 각각에 대해 2.8배, 4.3배, 및 12.4배 증가된 PGE를 나타내었다(도 12 참조). 또한, CRISPY 믹스의 사용으로, 소분자를 처리하지 않은 DNA-PKcs 야생형에 비해 PEG 효율이 훨씬 더 증가되었다. PGE 효율은 *CALD1*, *KATNA1*, 및 *SLITRK1* 각각에 대해 48%(3.7배 증가), 82%(4.7배 증가), 및 57.5%(19.2배 증가)이었다.

[0132] **고찰**

[0133] CRISPY 믹스는 시험된 4개의 만능 줄기 세포주(3개 사람 및 1개 침팬지) 모두에서 이를 구성하는 임의의 개별 성분 보다 PGE를 더 증가시키지만(도 5A, C, 및 D), 이는 시험된 다른 세포주의 경우에는 해당되지 않는다(도 6). 실제로, 본 발명의 결과는 소분자 및 이들의 조합이 상이한 세포주에서 PGE에 상반되는 효과를 나타낼 수 있음을 보여준다. 이는 세포주가 다른 복구 단백질 또는 복구 경로에 의존하고 있기 때문일 수 있고, DNA 복구의 세포 유형-특이적 메커니즘에 대한 후속 연구가 필요하다는 것을 시사한다. 이러한 해석과 일치하게, 사람 ESC와 iPSC가 분화 후 감소하는 매우 높은 DNA 복구 능력을 가지고 있다는 것을 제시하는 연구가 있다(Blanpain et al. 2011, Rocha et al. 2013). 이것은 또한 연구들 간의 일부 불일치, 예를 들어, DNA 리가아제 IV 억제제 SCR7 및 RAD51 인핸서 RS-1이 일부 세포 유형에서는 정밀 유전체 편집을 증가시키지만, 다른 세포에서는 그렇지 않은 것에 대해 설명할 수 있다. 따라서, 각각의 관심 세포 유형에서 CRISPR 편집에 미치는 영향에 대해 이들 소분자를 스크리닝하는 것이 필요할 수 있다.

[0134] 단독으로(도 4A), 그리고 믹스로(도 5A) 둘 다에서 Cas9D10A 및 ssODN 공여자를 이용해 만능 줄기 세포에서 PGE를 증가시킨 소분자는 NU7026, TSA, MLN4924 및 NSC 15520이다. 상기 믹스는 또한 NU7026로의 단독 처리와 비교하여 Cas9이 아닌 Cpf1을 이용한 PGE에 대해 추가적인 증가 효과를 나타내었다. NU7026은, NHEJ 경로의 주요 복합체인, DNA-PK를 억제하고(Shrivastav et al. 2008), 이전에 밝혀진 바로는 hiPSCs에서 PGE 효율을 증가시킨다(Suzuki et al. 2016). TSA는 ATM-의존적 DNA 손상 신호전달 경로를 활성화할 수 있다(Lee 2007). Nedd8 활성화 효소(NAE) 억제제 MLN4924는 가닥 절단에서 DNA 말단 절제의 범위를 증가시켜 CtIP의 네덜화를 억제하고, HDR을 촉진시키는 것으로 나타났다(Jimeno et al. 2015). DNA 절제는 상동성 검색 및 재조합을 겪기 전에 RPA에 의해 코팅되고 안정화된 ssDNA를 생성한다. NSC15520은 p53 및 RAD9(Glanzer et al. 2011)(Glanzer et al. 2013)에 대한 RPA의 연합을 방지하여, 아마도 HDR을 선호할 수 있는 ssDNA에 대해 가용한 RPA의 풍부도를 증가시킬 것이다. PGE를 증가시키는 능력에 대한 상충되는 보고가 있는 RS-1, SCR7 및 L755507은 본 연구자들에 의해 Cas9 또는 Cas9D10A를 이용한 모두에서 PGE에 명백한 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

[0135] Cas9와 함께 사용시 가시적 효과가 없는 것과는 반대로 Cas9D10A 이중 니킹 또는 Cpf1과 함께 사용될 때 PGE에 대한 TSA 및 MLN4924의 증강 효과는 평활 및 엇갈린 DNA 절단(5' 오버행)이 다른 복구 메커니즘에 의해 복구된다는 것을 제시한다. 현재까지 ssODN을 사용한 HDR 메커니즘은 명확하지 않지만, 모델은 제안되었다(Bothmer et al. 2017). Bothmer 등은 5' 오버행 구조가 3' 오버행 보다 높은 수준의 HDR을 생성한다는 것을 발견하고, 상이한 오버행 극성이 상이한 복구 경로와 관여한다는 것을 제안한다.

[0136] 그러나 Cas9 편집에서 MLN4924의 부정적인 영향은 더 긴 Cas9D10A ssODN에 비해 더 짧은 ssODN을 사용하였기 때

문일 수 있다. MLN4924에 의해 촉발된 광범위한 DNA 절제가 일어나는 경우, 짧은 공여자가 사용되면 ssODN 어닐링을 위한 상동성이 남아 있지 않게 된다. 더 긴 5' 오버행이 Cas9D10A 편집에 존재하기 때문에, 광범위한 절제 후에도, 상동성 DNA가 제공된다. 따라서, 긴 공여자를 사용하는 것이 Cas9를 사용할 때에도 MLN4924가 정밀 유전체 편집을 증강시키는데 있어 효과적이게 만들 수 있다.

[0137] RAD51은 dsDNA와의 고전적인 상동성 재조합에 분명히 중요하지만(Shrivastav et al. 2008), 본 발명자들은, RAD52가 ssDNA의 어닐링에 필요하기 때문에(Grimme et al. 2010), RAD51 보다는, RAD52가 ssODN의 HDR의 원동력이 될 수 있는지 검토하고자 했다. PGE 효율에 대한 RAD52 억제제 AICAR, RAD51 억제제 B02, 및 RAD51 인핸서 RS-1이 미치는 효과에 대한 본 발명자들의 결과는, B02에 의한 RAD51의 억제는 전반으로 감소하였고, RAD52의 억제는 PGE 효율에 영향을 미치지 않았기 때문에, RAD52가 아닌 RAD51이 ssODN을 사용한 정밀 편집에 중요하다는 것을 시사한다. 흥미롭게도, RS-1으로의 RAD51의 자극은 PGE에 유리한 영향을 미치지 않았다.

[0138] PGE 효율을 높이기 위해, 본 발명자들은 유도성 Cas9D10A iPSC 주를 생산하였고, 때때로 세포의 90% 이상에서 인텔이 관찰되도록 ssODN의 전달을 최적화하였다(도 3A). CRISPY 소분자 믹스를 사용하여, 본 발명자들은 hiPSC에서 거의 50%의 PGE를 달성하였는데(도 3A), 이는 현재까지 기술된 사람 만능 줄기 세포에서의 최고의 PGE 효율이다. 또한, 본 발명자들은 CRISPY 믹스의 도움 하에 Cpf1(20%)을 사용하여 효율적인 PGE를 최초로 제시한다(도 5C). CRISPY 믹스는 PGE 빈도를 증가시키는데 용이한 도구를 제공하고, 따라서 CRISPR 시스템을 사용하는 정밀 유전체 편집을 수행하기 위해 많은 연구자 또는 의료 전문가에게 유용할 수 있다.

[0139] iCRISPR을 사용하여 효율적인 DSB 유도를 이용하고, 키나아제 데드 DNA-PKcs KR을 활용함으로써, NHEJ와 HDR 간의 스위치로서, 유전체의 정밀 편집이 매우 효율적으로 가능하다(도 10). 높은 PGE 효율은 PGE 대 인텔의 높은 비율과 관련이 있다. 본 발명자들은 또한, 여러 유전자를 다중화할 때, 단일 유전자 TNS 효율에 기초하여, 모든 표적화된 염색체에 TNS의 도입이 우연히 예상되는 것보다 훨씬 더 높다는 것을 제시한다. DNA-PKcs의 HDR 억제 특성은 그의 키나아제 활성에 절대적으로 의존하는 것으로 나타났다(Neal et al. 2011). 본 발명자들의 데이터와 유사하게, CHO3 KR 세포에서의 HDR은 야생형 DNA-PKcs를 발현하는 세포 보다 4배 내지 7배 높은 것으로 나타났다(Shrivastav et al. 2008 및 2009). 놀랍게도, CHO3 KR 세포에서 HDR의 증가는 CHO3 DNA-PKcs 녹아웃 세포에서보다 높았으며, 이는 단백질 구조가 HDR의 추가적 증강을 위해 필요하다는 것을 시사한다. 이의 ABCDE 또는 JK 클러스터의 인산화는 각각 말단 가공을 촉진하거나, NHEJ를 억제하는 것으로 나타났다(도 9B 참조). DNA-PKcs 결핍은 배양된 세포주 및 마우스에서 중요한 복구 키나아제 ATM 수준의 감소를 초래하였다(10). Shrivastav 등은 DNA-PKcs KR의 복구된 ATM-의존적 인산화, 및 아마도 ATM 촉진된 RAD51 턴오버가, 초고도재조합(hyperrecombination) 표현형에 기여한다고 주장한다(Neal et al., 2016). 촉매적으로 불활성이지만 구조적으로 온전한 DNA-PKcs를 사용함으로써, 하류 c-NHEJ 단백질의 인산화가 차단될 뿐만 아니라, ATM 키나아제 활성의 인산화 유도된 억제가 차단되는(Zhou et al., 2017) 한편, ATM 수준은 키나아제 비의존적 방식으로 유지되고, 그리하여 증강된 HDR이 야기된다. c-NHEJ에서 DNA-PKcs의 중심적 역할과 차이니스 햄스터 난소 세포에서 Shrivastav 등에 의한 HDR 증가에 대한 유사한 발견을 감안할 때, 본 발명자들은 KR 돌연변이가 세포 유형 및 종에 걸쳐 일관된 효과를 나타낼 것이라고 추정한다. DNA-PKcs와, K3753 주위의 이의 서열은, 척추 동물에서 보존적이기 때문에(도 9C), 상기 KR 돌연변이는 여러 동물 모델에서 유용한 유전자 변형 도구가 될 수 있다. DNA-PKcs 상동체(orthologues)는 또한 모기, 꿀벌, 및 이 효소의 고대 조상을 제시하는 아메바 점균류에서 발견되었다(Dore et al. 2004, Douglas et al. 2007).

[0140] 본 발명자들은 DNA-PKcs KR hiPSC의 배양 3개월 후 임의의 수치적 또는 대규모 염색체 이상을 검출하지 못하였다(도 13). 표적화된 유전체 절단 이외에, 내인성 DSBs는 복제 기점(replication fork) 붕괴를 야기하는 반응성 산소종과 물리적 스트레스로 인해 정기적으로 일어날 뿐만 아니라, V(D)J 재조합 도중에 일어난다. DNA-PKcs의 키나아제 활성을 불활성화하여 오류-유발성 c-NHEJ의 손상은, 오류-유발성 a-NHEJ의 지연으로, 세포가 자매 염색분체를 이용하여 충실하고 증강된 HDR로 DSB를 복구하거나, 그렇지 않으면 사멸에 이르게 한다. 따라서, 추측컨대, 유전체 안정성은 이형접합성에서의 손실을 치르면서, HDR에 의한 높은 충실도 복구로 인해 야생형에 비해 KR 세포에서 훨씬 더 양호할 수 있다.

[0141] 본 발명자들은 또한 R3753을 다시 리신으로 변이시킴으로써 DNA-PKcs의 효율적인 역 불활성화를 확인하였다(도 10A). V(D)J 재조합은 c-NHEJ에 의존하기 때문에, T 세포로의 세포 분화 전에, 표적화된 돌연변이를 구현한 후 DNA-PKcs를 재활성화시키는 것이 바람직할 수 있다. 뉴런과 같은 비-증식 세포로의 세포 분화 전에 DNA-PKcs KR의 역-돌연변이가 또한 유리할 수 있다. HDR은 분열 세포에 제한되고, 그러므로 NHEJ는 유사분열 후 세포에서 DNA 복구의 중심이다. 그러나, XLF와 함께 c-NHEJ 인자 Ku70/80, XRCC4, 및 LIG4는 낮은 수준의 손상을 복

구하기에 충분하고(Gu et al., 2000), a-NHEJ는 어쨌든 DNA-PKcs와는 독립적이다.

- [0142] CRISPY 소분자 믹스를 촉매적으로 불활성화된 DNA-PKcs와 함께 사용하면, 한번에 다수의 유전자좌의 편집이 가능하기 때문에, 이러한 발견은 CRISPR 보조 연구 및 맞춤형 유전체에 혁명을 일으킬 잠재력을 갖는다. 편집 효율이 매우 높을 뿐만 아니라(최대 82%), 제한된 비율의 인텔은 이제 신속한(다중화된) 정밀 유전체 편집을 가능하게 한다(도 10 및 11).
- [0143] 결론적으로, CRISPR 기술과 조합된 DNA-PKcs KR의 초고도재조합 효과는 정밀 유전체 편집에서 예상치 못한 효율을 야기하며, 이는 사람 만능 줄기 세포에서 CRISPY 소분자 믹스에 의해 더욱 증가될 수 있다. 이것은 다양한 유전체 연구 분야에서 시간과 노동을 실질적으로 줄일 수 있다. 이들에게는 관련있는 의학적으로 중요한 특성에 대한 고처리 유전체 전체 연관 스크리닝(Genome-Wide-Association-Screen; GWAS) 검증, 질병 모델링 및 약물 검사, 종 비교 분석, 생체외 유전자 치료, 맞춤형 동물 모델의 단순화된 생산, 멸절된 종의 복원, 및 언젠가 가능할 새로(*de-novo*) 합성된 거대 유전체 단편의 구현과 같은 흥미로운 응용분야가 포함된다.
- [0144] **참고문헌**
- [0145] 1. Aggarwal, M., Sommers, J.A., Shoemaker, R.H. & Brosh, R.M., Jr. Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1525-1530 (2011).
- [0146] 2. Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A. & Passegue, E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 16-29 (2011).
- [0147] 3. Chari, R., Mali, P., Moosburner, M. & Church, G.M. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nat Methods* **12**, 823-826 (2015).
- [0148] 4. Chu, V.T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **33**, 543-548 (2015).
- [0149] 5. Dore, A.S., Drake, A.C., Brewerton, S.C. & Blundell, T.L. Identification of DNA-PK in the arthropods. Evidence for the ancient ancestry of vertebrate non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* **3**, 33-41 (2004).
- [0150] 6. Douglas, P. et al. The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain. *Mol Cell Biol* **27**, 1581-1591 (2007).
- [0151] 7. Field, A. Discovering Statistics using SPSS. (Sage Publications, London; 2005).
- [0152] 8. Fu, Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **31**, 822-826 (2013).
- [0153] 9. G., D.R.I. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res* **2** (2013).
- [0154] 10. Glanzer, J.G. et al. A small molecule directly inhibits the p53 transactivation domain from binding to replication protein A. *Nucleic Acids Res* **41**, 2047-2059 (2013).
- [0155] 11. Glanzer, J.G., Liu, S. & Oakley, G.G. Small molecule inhibitor of the RPA70 N-terminal protein interaction domain discovered using in silico and in vitro methods. *Bioorg Med Chem* **19**, 2589-2595 (2011).
- [0156] 12. Gonzalez, F. et al. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **15**, 215-226 (2014).
- [0157] 13. Greco, G.E. et al. SCR7 is neither a selective nor a potent inhibitor of human DNA ligase IV. *DNA Repair (Amst)* **43**, 18-23 (2016).
- [0158] 14. Grimme, J.M. et al. Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. *Nucleic Acids Res* **38**, 2917-2930 (2010).



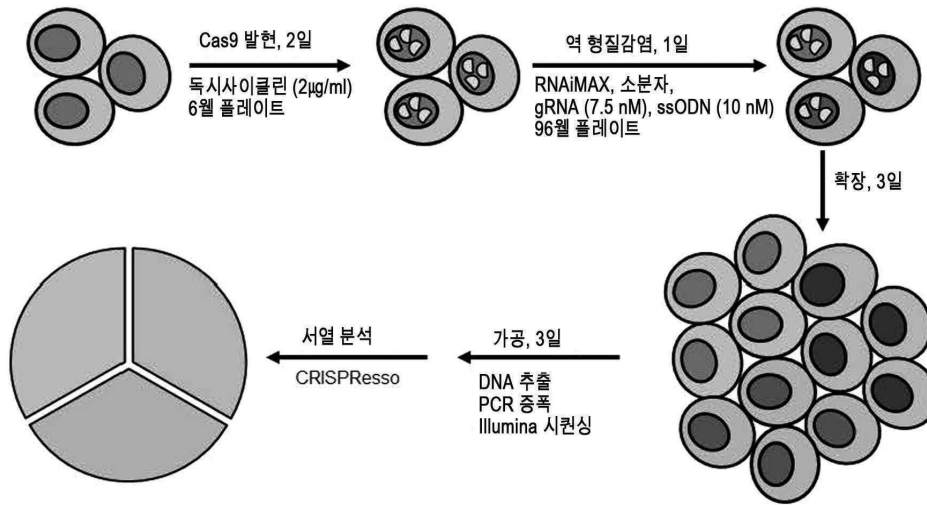
- [0159] 15. Gu, Y. et al. Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2668-2673 (2000).
- [0160] 16. Huang, F. et al. Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem Biol* **6**, 628-635 (2011).
- [0161] 17. Jimeno, S. et al. Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice. *Nucleic Acids Res* **43**, 987-999 (2015).
- [0162] 18. Kent, W.J. et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* **12**, 996-1006 (2002).
- [0163] 19. Kim, D. et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **34**, 863-868 (2016).
- [0164] 20. Kircher, M., Sawyer, S. & Meyer, M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res* **40**, e3 (2012).
- [0165] 21. Kleinstiver, B.P. et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **34**, 869-874 (2016).
- [0166] 22. Lee, J.H., Guo, Z., Myler, L.R., Zheng, S. & Paull, T.T. Direct activation of ATM by resveratrol under oxidizing conditions. *PLoS One* **9**, e97969 (2014).
- [0167] 23. Lee, J.S. Activation of ATM-dependent DNA damage signal pathway by a histone deacetylase inhibitor, trichostatin A. *Cancer Res Treat* **39**, 125-130 (2007).
- [0168] 24. Lin, S., Staahl, B.T., Alla, R.K. & Doudna, J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* **3**, e04766 (2014).
- [0169] 25. Maruyama, T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* **33**, 538-542 (2015).
- [0170] 26. Meyer, M. & Kircher, M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc* **2010**, pdb prot5448 (2010).
- [0171] 27. Milanowska, K. et al. REPAIRtoire--a database of DNA repair pathways. *Nucleic Acids Res* **39**, D788-792 (2011).
- [0172] 28. Neal, J.A. et al. Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **31**, 1719-1733 (2011).
- [0173] 29. Neal, J.A. et al. Unraveling the complexities of DNA-dependent protein kinase autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **34**, 2162-2175 (2014).
- [0174] 30. Neal, J.A., Xu, Y., Abe, M., Hendrickson, E. & Meek, K. Restoration of ATM Expression in DNA-PKcs-Deficient Cells Inhibits Signal End Joining. *J Immunol* **196**, 3032-3042 (2016).
- [0175] 31. Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M.C. A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* **131**, 223-225 (2007).
- [0176] 32. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426 (2000).
- [0177] 33. Pinder, J., Salsman, J. & Deltaille, G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res* **43**, 9379-9392 (2015).
- [0178] 34. Pinello, L. et al. Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nat Biotechnol* **34**, 695-697 (2016).

- [0179] 35. Prufer, K. et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* **505**, 43-49 (2014).
- [0180] 36. Quinn, G.P.K., M.J. Experimental Designs and Data Analysis for Biologists. (Cambridge University Press, Cambridge; 2002).
- [0181] 37. Renaud, G., Stenzel, U. & Kelso, J. leeHom: adaptor trimming and merging for Illumina sequencing reads. *Nucleic Acids Res* **42**, e141 (2014).
- [0182] 38. Robert, F., Barbeau, M., Ethier, S., Dostie, J. & Pelletier, J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med* **7**, 93 (2015).
- [0183] 39. Rocha, C.R., Lerner, L.K., Okamoto, O.K., Marchetto, M.C. & Menck, C.F. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res* **752**, 25-35 (2013).
- [0184] 40. Shen, B. et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* **11**, 399-402 (2014).
- [0185] 41. Shrivastav, M., De Haro, L.P. & Nickoloff, J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**, 134-147 (2008).
- [0186] 42. Shrivastav, M. et al. DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **8**, 920-929 (2009).
- [0187] 43. Song, J. et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun* **7**, 10548 (2016).
- [0188] 44. Subach, O.M., Cranfill, P.J., Davidson, M.W. & Verkhusha, V.V. An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One* **6**, e28674 (2011).
- [0189] 45. Sullivan, K. et al. Identification of a Small Molecule Inhibitor of RAD52 by Structure-Based Selection. *PLoS One* **11**, e0147230 (2016).
- [0190] 46. Suzuki, K. et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144-149 (2016).
- [0191] 47. Wang, K. et al. Efficient Generation of Orthologous Point Mutations in Pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated Homology-directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids* **5**, e396 (2016).
- [0192] 48. Weterings, E. et al. A novel small molecule inhibitor of the DNA repair protein Ku70/80. *DNA Repair (Amst)* **43**, 98-106 (2016).
- [0193] 49. Yang, D. et al. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci Rep* **6**, 21264 (2016).
- [0194] 50. Yu, C. et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 142-147 (2015).
- [0195] 51. Zar, J.H. Biostatistical Analysis. (Prentice Hall, New Jersey; 1999).
- [0196] 52. Zetsche, B. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**, 759-771 (2015).
- [0197] 53. Zhang, J.P. et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol* **18**, 35 (2017).
- [0198] 54. Zhou, Y. et al. Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Mol Cell* **65**, 91-104 (2017).

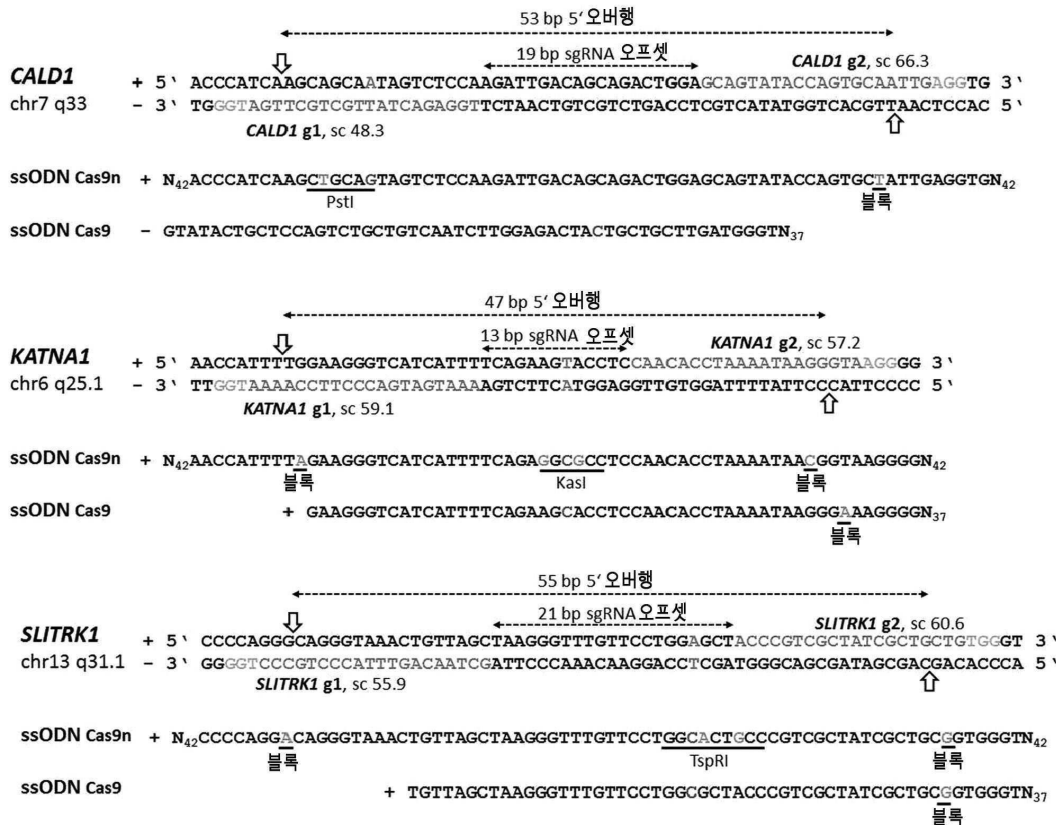


## 도면

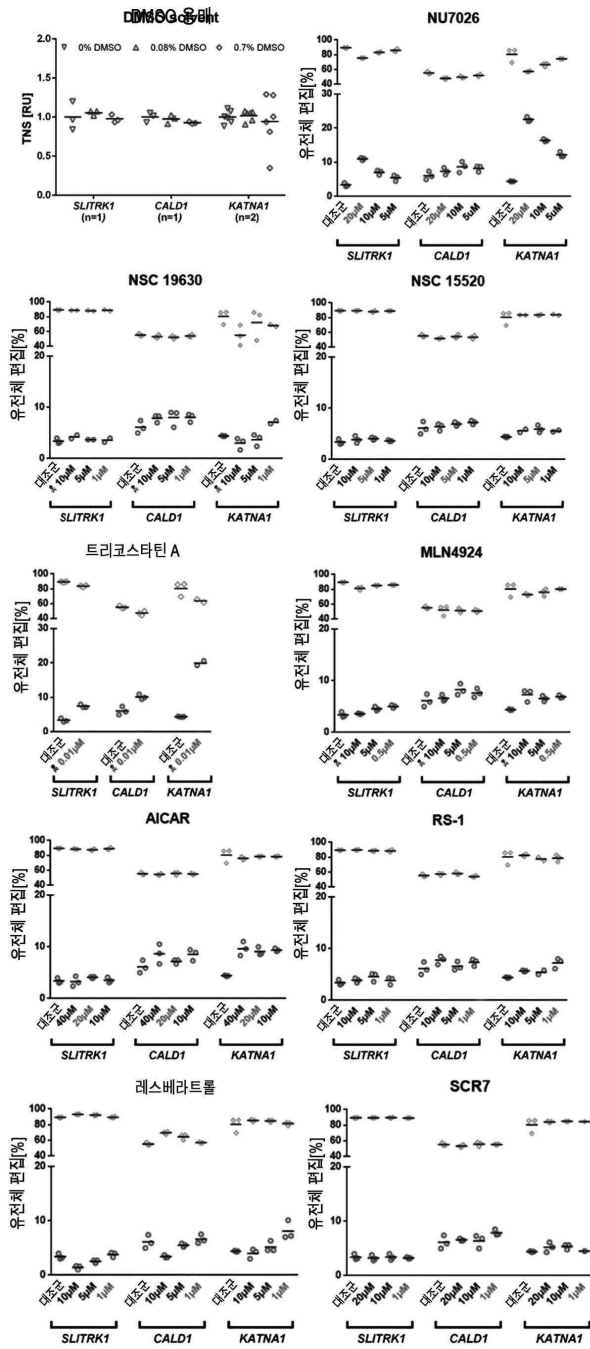
### 도면1



### 도면2

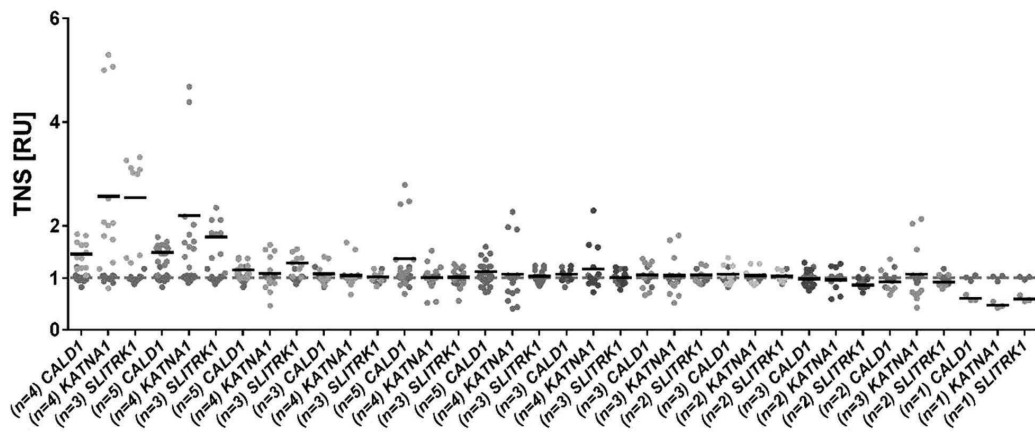


도면3

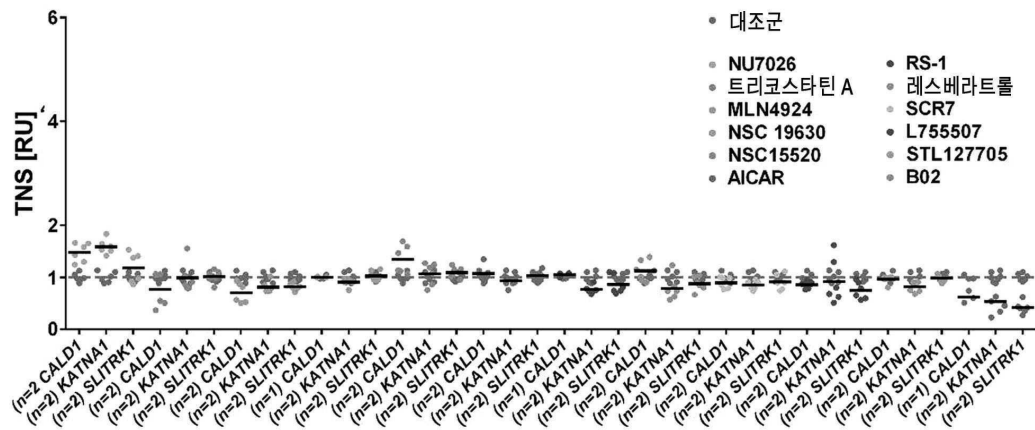


도면4

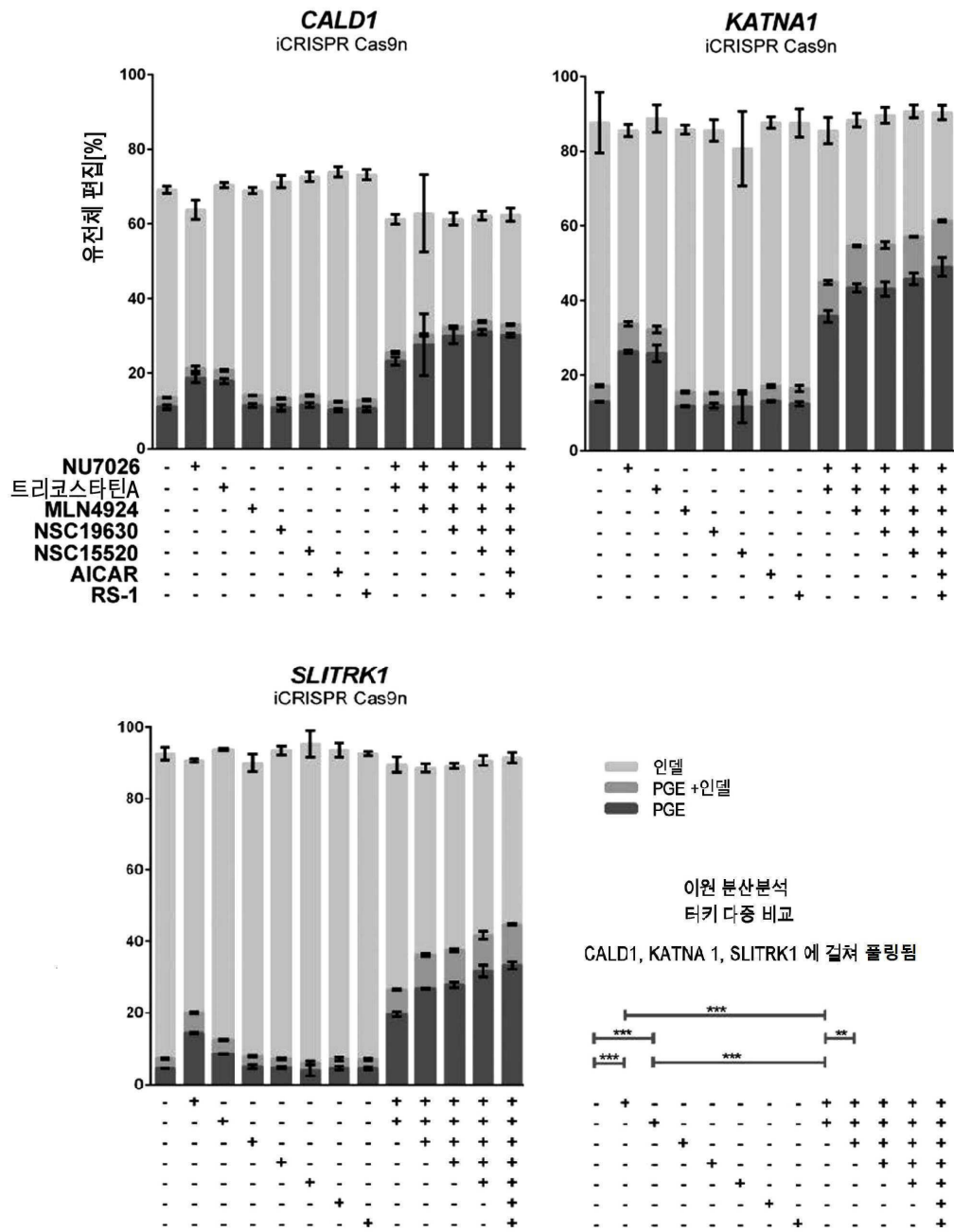
**A** iCRISPR Cas9n



**B** iCRISPR Cas9

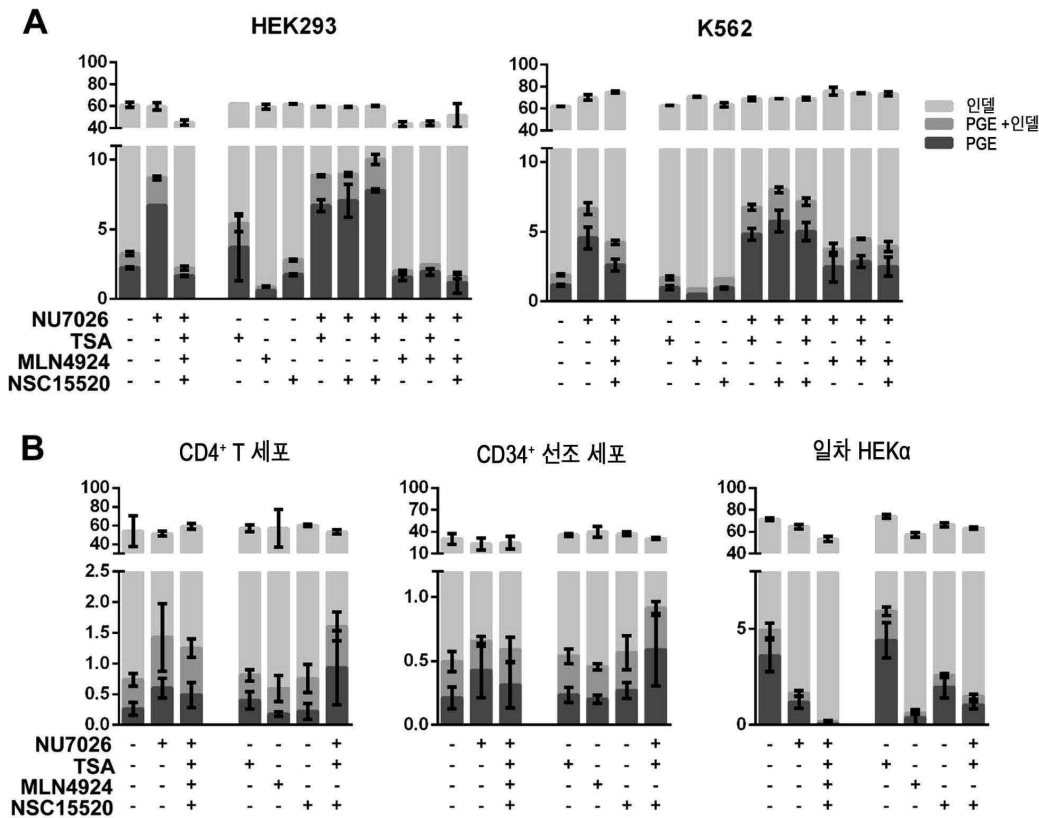


도면5a

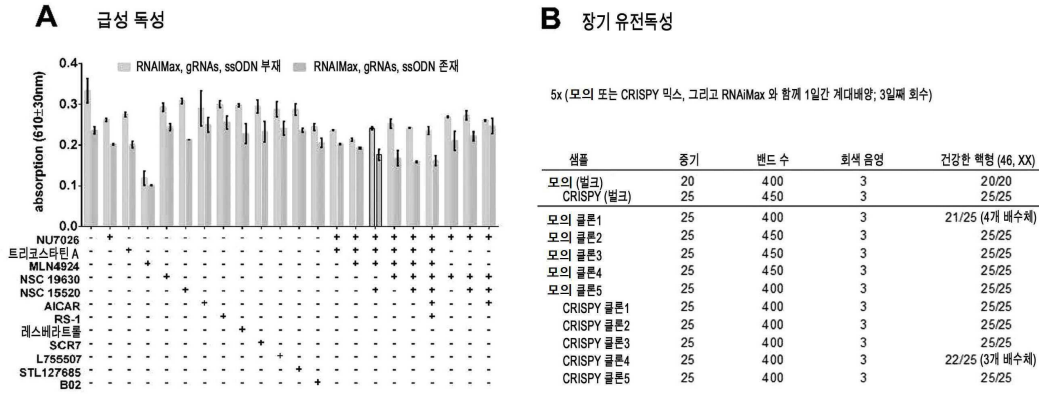




도면6

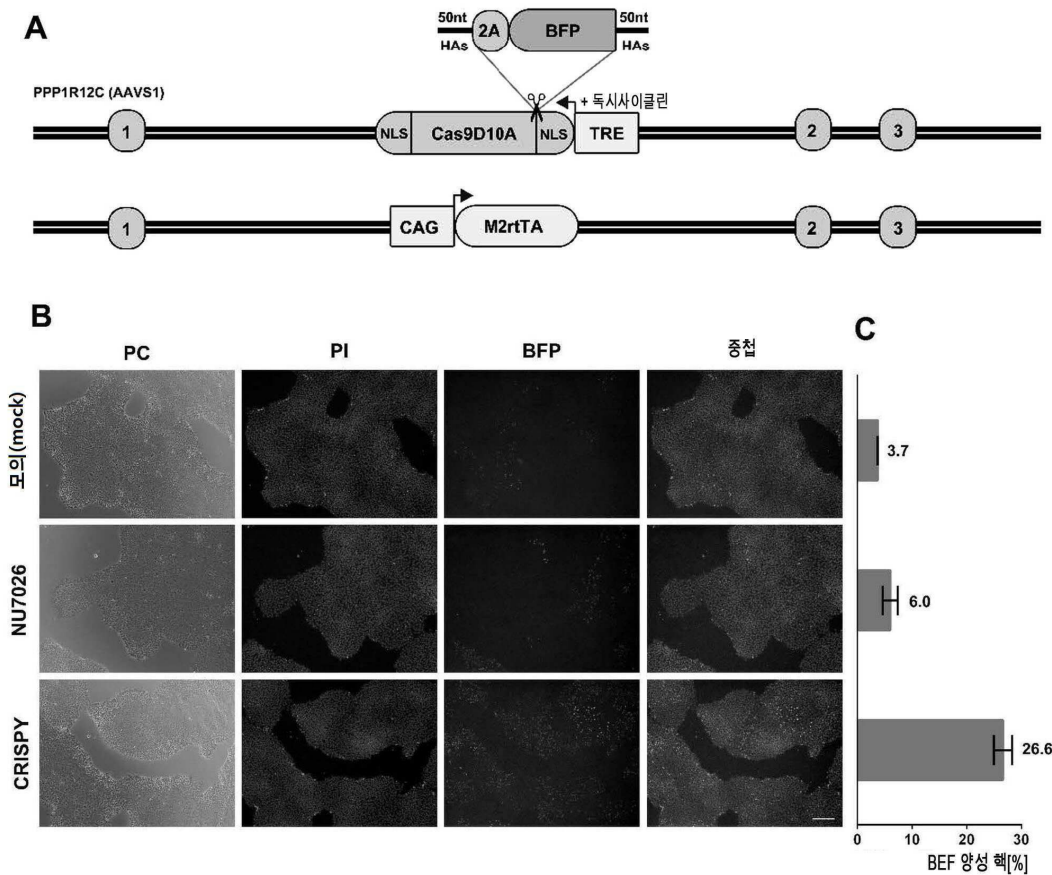


도면7

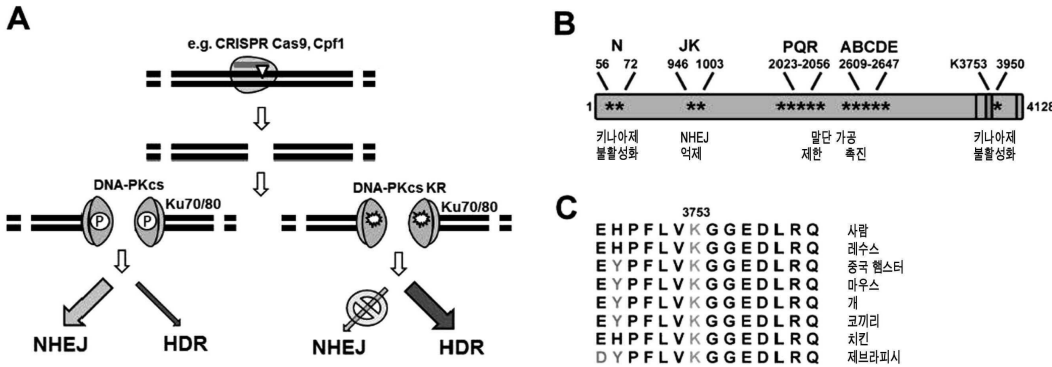




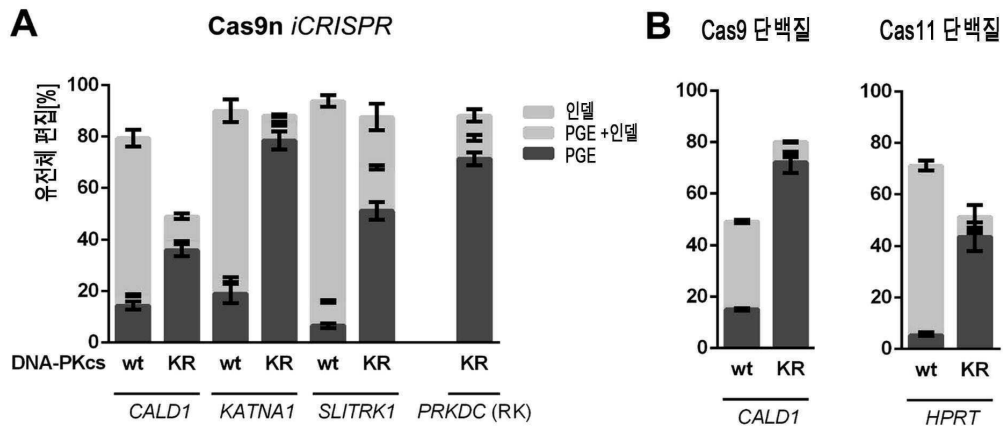
도면8



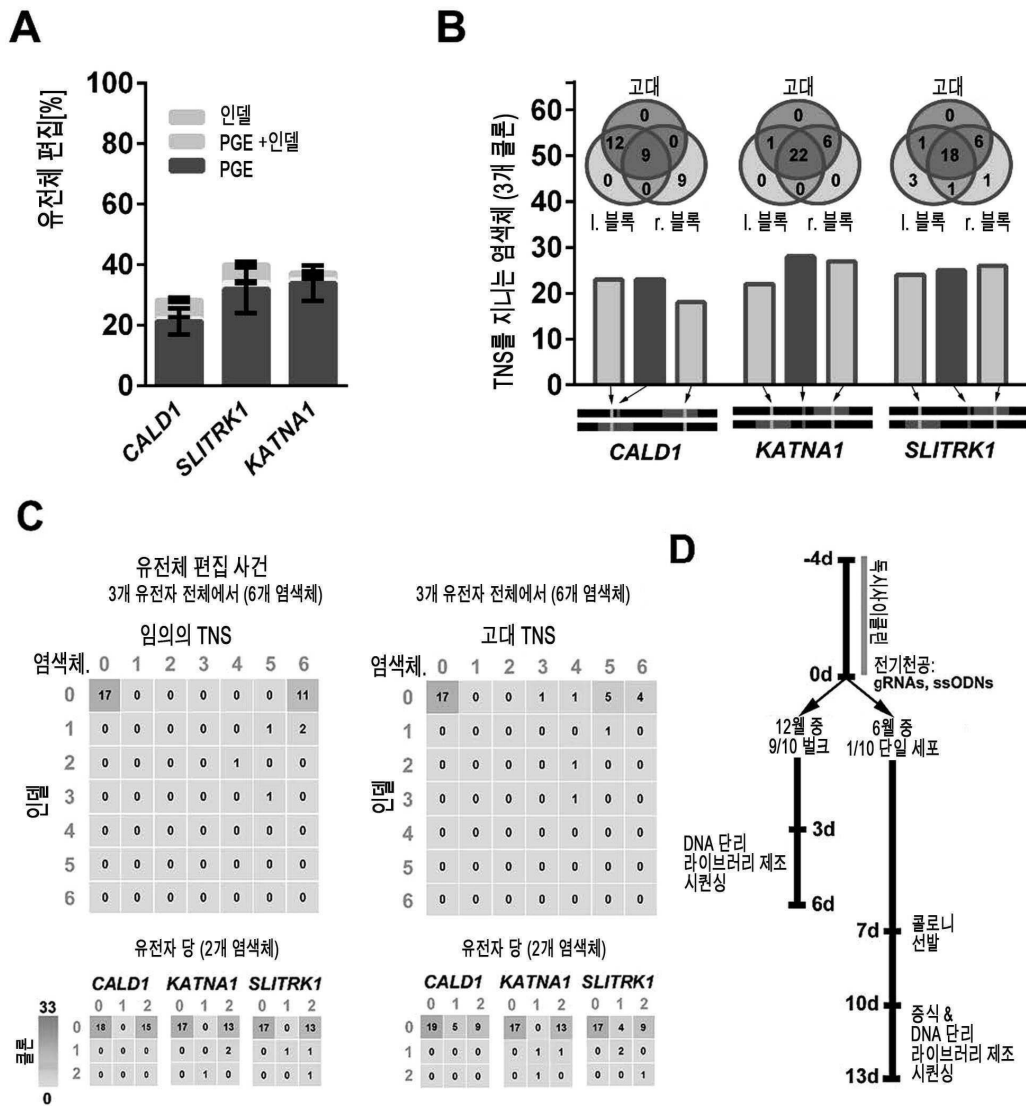
도면9



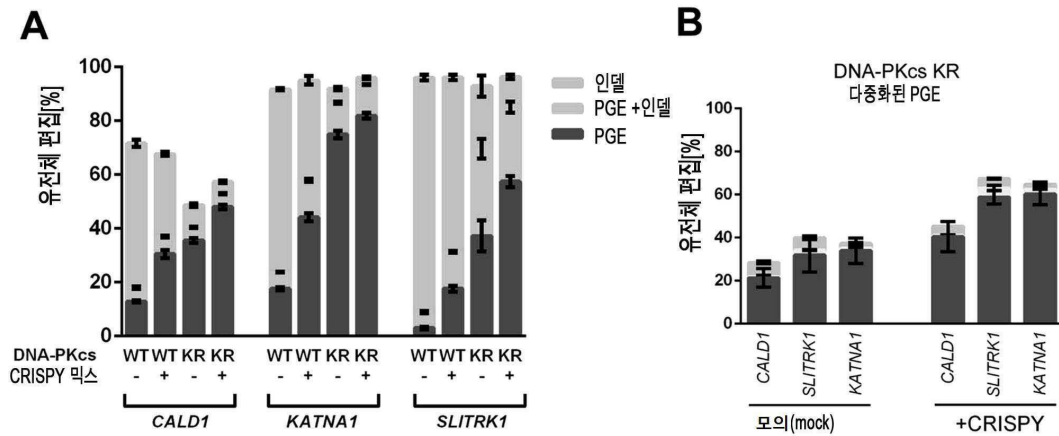
도면10



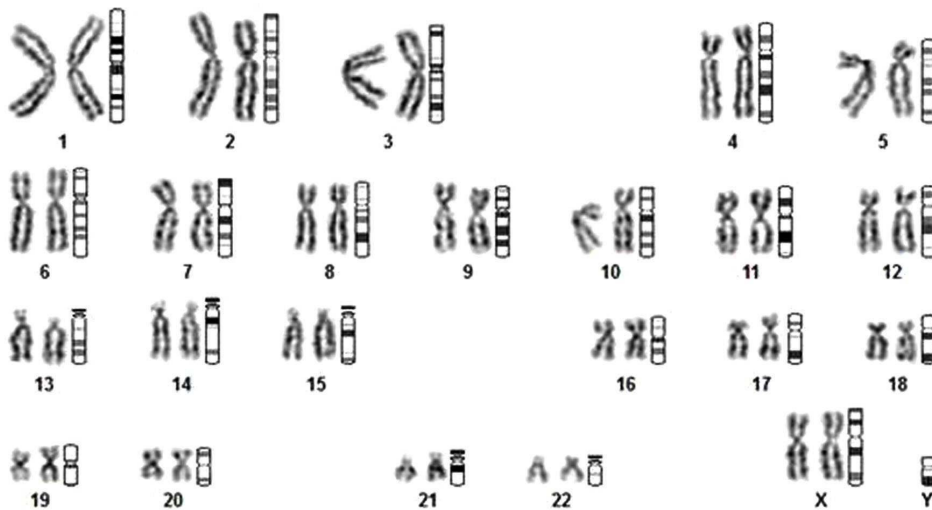
도면11



도면12



도면13



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> MPG Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaft  
e.V.

<120> Directing repair pathways with small molecules to increase  
precise genome editing efficiency

<130> IPA191255-DE-D1

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALD1 t1

<400> 1

tggagactat tgctgcttga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALD1 t2

<400> 2

gcagtatacc agtgcaattg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 t1

<400> 3

aaatgatgac ccttccaaaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 t2

<400> 4

caacacctaa aataagggtg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 t1

<400> 5

gctaacagtt taccctgccc 20

<210> 6



<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SLITRK1 t1  
 <400> 6  
 acccgctgct atcgctgctg 20  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> HPRT t1  
 <400> 7  
 ggtaaagat ggtaaata t 21  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> DMNT1 t1  
 <400> 8  
 ctgatggctc atgtctgtta c 21  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> iCRISPR BFP insertion t1  
 <400> 9  
 tgtcggctgc tgggactccg 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> iCRISPR BFP insertion t2  
 <400> 10  
 tacagcatcg gcctggtat 20

<210> 11

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRKDC t1

<400> 11

ggtcctcgcc acccttcacc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRKDC t2

<400> 12

gcgcgtggag cagctcttcc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRKDC t1-back

<400> 13

ggtcctcgcc accttcacc 20

<210> 14

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALD1 Cas9

<400> 14

gtatactgct ccagtctgct gtcaatcttg gagactactg ctgcttgatg ggtcgatttg 60

acaccactgc taaaaaagta aacacataca 90

<210> 15

<211> 153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALD1 Cas9D10A

<400> 15

ttatatgtat gtgtttactt ttttagcagt ggtgtcaaat cgacccatca agctgcagta 60

gtctccaaga ttgacagcag actggagcag tataccagtg ctattgaggt gagaattgtc 120

ctcagcgtaa tggctctgct gaacagaaat aga 153

<210> 16

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 Cas9

<400> 16

gaagggtcat cattttcaga agcacctcca acacctaata taagggaag gggagagtga 60

aaaagatatt aagttggatt ataccaaatg 90

<210> 17

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 Cas9D10A

<400> 17

ctcatctata tcccaggga aattagtagc tgccagaacc ataaccattt tagaagggtc 60

atcattttca gaggcgcctc caacaccta aataacggta aggggagagt gaaaaagata 120

ttaagttgga ttatacaaa tgaagct 147

<210> 18

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 Cas9D10A 2

<400> 18

ctcatctata tcccaggga aattagtagc tgccagaacc ataaccattt tagaagggtc 60

atcattttca gaagcacctc caacaccta aataacggta aggggagagt gaaaaagata 120

ttaagttgga ttatacaaa tgaagct 147

<210> 19

<211>

90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 Cas9

<400> 19

tgtttagctaa gggtttgttc ctggcgctac ccgtcgctat cgctgcggtg ggtctgattt 60

tgatctgcc a gttgcctggg atctttgtac 90

<210> 20

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 Cas9D10A

<400> 20

tcatctttaa acccgaccct gggatgtggt cgcagctgca gccccagga cagggtaaac 60

tgtttagctaa gggtttgttc ctggcactgc ccgtcgctat cgctgcggtg ggtctgattt 120

tgatctgcc a gttgcctggg atctttgtac ctccg 155

<210> 21

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 Cas9D10A 2

<400> 21

tcatctttaa acccgaccct gggatgtggt cgcagctgca gccccaggg catggtaaac 60

tgtttagctaa gggtttgttc ctggcgctac ccgtcgctat cgcagctgtg ggtctgattt 120

tgatctgcc a gttgcctggg atctttgtac ctccg 155

<210> 22

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT Cpf1

<400> 22

gccatttcac ataaaactct tttaggttat agatggttaa atgaatgaca aaaaaagtaa 60

ttcacttaca gtctggctta tatccaacac 90



<210> 23  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> DMNT1 Cpf1  
 <400> 23  
 ttaacatcag tacgttaatg tttcctgac gtccatgtct gttagtcgcc tgtcaagtgg 60  
 cgtgacaccg ggcgtgttcc ccagagtgc 90

<210> 24  
 <211> 922  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mtagBFP-iCRISPR-Cas9n  
 <400> 24  
 aaagacgatg acgataagat ggccccaag aagaagcgga aggtcggat ccacggagt 60  
 ccagcagccg tgagcaaggg cgaggagctg atcaaggaga acatgcacat gaagctgtac 120  
 atggagggca ccgtggacaa ccaccattc aagtgcacca gcgaggcgga gggcaagccc 180  
 tacgagggca cccagacat gcgcacaaag gtggtggagg gcggccccct gcccttcgcc 240  
 ttcgacatcc tggccaccag cttcctgtac ggagcaaga ccttcacaa ccacaccag 300  
 ggcatcccc acttcttcaa cgagagcttc cccgagggt tcacctggga gcgcgtgacc 360  
 acctacgagg acggcggtgt gctgaccgcc acccaggaca ccagcctgca ggacggctgc 420  
 ctgatctaca acgtgaagat ccgcggtgtg aattcacca gtaatgggcc tgtgatgcag 480  
 aagaagactc tgggctggga ggcattcacc gagaccctct atccggctga tgggtggctc 540  
 gaggtgcga acgatatggc ttgaaactc gtcggaggaa gtcacatcat cgcaaagct 600  
 aaaacaacct ataggtctaa gaagcccgcc aagaactga aaatgccagg ggtctactat 660  
 gtagattacc gcttgaacg aattaaagag gctaataatg agacttacgt agaacaacac 720  
 gaggtagcag tcgctcgata ttgcgacttg ccgagtaagc tcggacataa gctgaacggc 780  
 agtggagaag gtcggggatc actcctgacg tgtggagatg ttgaagagaa ccccgcccc 840  
 gacaagaagt acagcatcgg cctggccatc ggaccaact ctgtgggctg ggccgtgatc 900  
 accgacgagt acaaggtgcc ca 922

<210> 25  
 <211> 137

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRKDC Cas9n  
 <400> 25  
 gcgaaggccc aagcgcatca tcatccgtgg ccatgacgag agggaacacc ctttcctggt 60  
 gagaggtggc gaggacctgc ggcaggacca gcgcgtggag cagctcttcc aggtcatgaa 120  
 tgggatcctg gcccaag 137  
 <210> 26  
 <211> 137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRKDC-back Cas9n  
 <400>  
 > 26  
 gcgaaggccc aagcgcatca tcatccgtgg ccatgacgag agggaacacc ctttcctggt 60  
 gaagggtggc gaggacctgc ggcaggacca gcgcgtggag cagctcttcc aggtcatgaa 120  
 tgggatcctg gcccaag 137  
 <210> 27  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CALD1 forward  
 <400> 27  
 acactcttcc cctacacgac gctcttccga tctgctaate agctagcata tgtatgagaa 60  
 <210> 28  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CALD1 reverse  
 <400> 28  
 gtgactggag ttacagcgtg tgctcttccg atctttggac ttgattattg tcctaagtg 59  
 <210> 29  
 <211> 54  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 forward

<400> 29

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcctgacg gcaaaggaat atag 54

<210> 30

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KATNA1 reverse

<400> 30

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctactgtg cttccttgta ttgttgt 57

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 forward

<400> 31

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgggcttc aaatcagcca ag 52

<210> 32

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLITRK1 reverse

<400> 32

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atcttttcaa gacaaatggg caag 54

<210> 33

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT forward

<400> 33

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctggtgaaa aggacccac gaa 53

<210> 34

<211> 58

<212  
 > DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> HPRT reverse  
 <400> 34  
 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atcttggcaa atgtgcctct ctacaaat 58  
 <210> 35  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> DMNT1 forward  
 <400> 35  
 acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttgaacgt tcccttagca ctctg 55  
 <210> 36  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> DMNT1 reverse  
 <400> 36  
 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctccttag cagcttctc ctcc 54  
 <210> 37  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Q5 D10A forward  
 <400> 37  
 tgggtgccgat agccaggccg atg 23  
 <210> 38  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Q5 D10A reverse  
 <400> 38  
 actctgtggg ctgggccg 18

<210> 39  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRKDC forward  
 <400> 39  
 acactctttc cctacacgac gctcttccga tctctagcct gtgccctgag atg 53  
  
 <210> 40  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRKDC reverse  
 <400> 40  
 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctgcacaa cgctataggt cctca 55  
 <210> 41  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 15  
 <400> 41  
 acccatcaag ctgcagtagt ctccaagatt gacagcagac tggagcagta taccagtgt 60  
 attgaggtg 69  
 <210> 42  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 14  
 <400> 42  
 gtatactgct ccagttctgt gtcaatcttg gagactactg ctgcttgatg ggt 53  
 <210> 43  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 17

<400> 43

aaccatttta gaagggtcat cattttcaga ggcgcctcca acacctaataa taacggtaag 60

ggg 63

<210> 44

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 16

<400> 44

gaagggtcat cattttcaga agcacctcca acacctaataa taagggaag ggg 53

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 20

<400> 45

ccccaggaca gggtaactg ttagctaagg gtttgcttct ggcactgccc gtcgctatcg 60

ctgcggtggg t 71

<210> 46

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of SEQ ID NO: 19

<400> 46

tgtagctaa gggttgttc ctggcgctac ccgctgctat cgctcggtg ggt 53

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of 4128aa enzyme 1

<400> 47

Glu His Pro Phe Leu Val Lys Gly Gly Glu Asp Leu Arg Gln

1                    5                    10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of human 4128aa enzyme 2

<400> 48

Glu Tyr Pro Phe Leu Val Lys Gly Gly Glu Asp Leu Arg Gln

1                    5                    10

<210> 49

<211>

14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial sequence of human 4128aa enzyme 3

<400> 49

Asp Tyr Pro Phe Leu Val Lys Gly Gly Glu Asp Leu Arg Gln

1                    5                    10