

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 6월 20일 (20.06.2019) WIPO | PCT

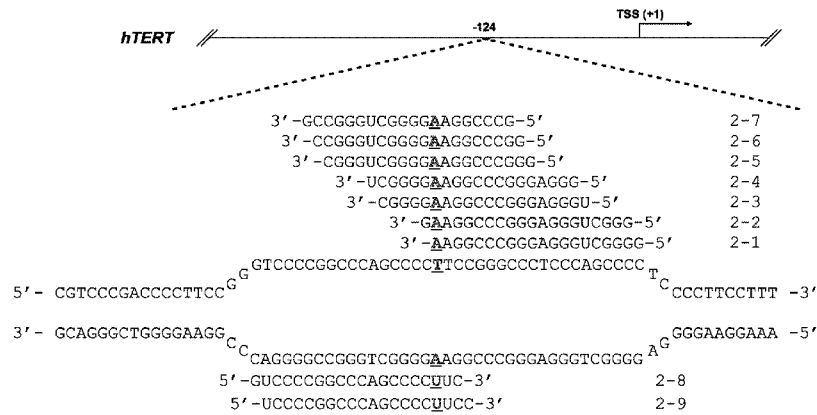


(10) 국제공개번호
WO 2019/117662 A2

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/10* (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/015903
- (22) 국제출원일: 2018년 12월 14일 (14.12.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0172385 2017년 12월 14일 (14.12.2017)KR
- (71) 출원인: 단국대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, DANKOOK UNIVERSITY) [KR/KR]; 16890 경기도 용인시 수지구 죽전로 152, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이성욱 (LEE, Seong Wook); 02780 서울시 성북구 화랑로48길 16, 121동 602호, Seoul (KR). 이창호 (LEE, Chang Ho); 05107 서울시 광진구 똑섬로56가길 28, 807호, Seoul (KR). 한승렬 (HAN, Seung Ryul); 16919 경기도 용인시 기흥구 구성로 90, 213동 902호, Gyeonggi-do (KR). 김지현 (KIM, Ji Hyun); 03380 서울시 은평구 녹번로1길 19-17, 301호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: CRISPR SYSTEM SPECIFIC TO TERT PROMOTER MUTATION AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: TERT 프로모터 돌연변이에 특이적인 CRISPR 시스템 및 그의 이용



Red : C -> T 돌연변이 부위 (-124) AA
TSS : 전사 개시점 (Transcription start site) BB

AA ... Red: C->T mutant part(-124)
BB ... TSS: Transcription start site

(57) Abstract: The present invention relates to a DNA marking composition using a CRISPR interference (CRISPRi) system specific to a TERT promoter mutation, a composition for preventing or treating cancer using the system, a diagnostic and imaging composition, a single strand guide RNA (sgRNA) used in a CRISPR interference (CRISPRi) system and uses thereof. The single strand guide RNA (sgRNA) according to the present invention and the CRISPRi system using the same can selectively and effectively target the point mutation of the TERT promoter and inhibit activity thereof, and therefore, -124 C> T or -146 C> T mutant TERT promoter targeting through this epigenetic editing technique is expected to be highly suitable as a novel cancer therapy.



WO 2019/117662 A2

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 TERT 프로모터 돌연변이에 특이적인 CRISPR interference (CRISPRi) 시스템을 이용한 DNA 표적용 조성물, 상기 시스템을 이용한 암의 예방 또는 치료용 조성물, 진단용 및 이미징 조성물, CRISPR interference (CRISPRi) 시스템에 이용되는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 그의 이용에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 이를 이용한 CRISPRi 시스템은 선택적이고 효과적으로 TERT 프로모터의 점돌연변이 (point mutation) 을 표적하고 이의 활성을 억제할 수 있는 바, 이러한 후성편집기술을 통한 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이 TERT 프로모터 표적화는 새로운 암 치료법으로써 매우 적합할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: TERT 프로모터 돌연변이에 특이적인 CRISPR 시스템 및 그의 이용

기술분야

- [1] 본 발명은 TERT 프로모터 돌연변이에 특이적인 CRISPR interference (CRISPRi) 시스템을 이용한 DNA 표적용 조성물, 상기 시스템을 이용한 암의 예방 또는 치료용 조성물, 진단용 및 이미징 조성물, CRISPR interference (CRISPRi) 시스템에 이용되는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 그의 이용에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 암은 우리나라에서 순환기 질환과 함께 가장 많이 발생하는 질환이다. 정상적으로 세포는 세포내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하며 세포수의 균형을 유지하며 살아간다. 이러한 세포가 손상을 받는 경우, 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 되어 통제되지 못하고 과다하게 증식할 뿐만 아니라, 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴 형성 및 정상 조직의 파괴를 초래하는 경우가 있다. 이 상태를 암 또는 종양(cancer)이라 정의한다.
- [4] 종양에는 양성종양과 악성종양이 있으며, 양성종양은 비교적 서서히 성장하며, 신체 여러 부위에 확산, 전이하지 않으며 제거하여 치유시킬 수 있는 종양을 말하고, 특이한 경우를 제외하고 대개의 양성종양은 생명에 위협을 초래하지는 않는다. 이와 달리 악성종양은 빠른 성장과 침윤성(파고들거나 퍼져 나감) 성장 및 체내 각 부위에 확산 전이(원래 장소에서 떨어진 곳까지 이동함)하여 생명에 위협을 초래하는 종양을 말한다.
- [5] 특히, 간세포암종 (hepatocellular carcinoma, HCC)은 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 암 관련 사망원인 3위에 있으며, 빈도가 증가하는 암종이다. HCC는 임상적, 병리적 그리고 분자적 수준에서 매우 이질적인 (heterogenous) 질환으로 80~90% 이상이 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, HBV), C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV), 알코올 (alcohol), 대사성 질환 (metabolic etiologies) 등에 의하여 발생한 간경화에서 발생한다. HCC는 간경화 결절 (cirrhotic nodule, regenerating nodule) > 이형성 결절 (dysplastic nodule, DN) > 초기간세포암종 (early HCC) > 진행성 간세포암종 (progressed HCC) > 간내/간외 전이의 다단계 간세포암종 발암 (multistep hepatocarcinogenesis) 으로 정립되어 있으나 다른 암과는 달리 발생 및 진행 관련 유전자적 변화는 TP53, CTNNB1 유전자의 돌연변이와 소수의 유전자변이 이외에 거의 알려진 유전자 변이는 없다.
- [6] 또한, 피부암은 야외활동 증가와 같은 최근 생활 패턴 및 환경오염에 따른 오존층의 파괴로 인한 자외선의 유입량 증가로 인해 각종 유해물질이나

자외선의 노출 기회가 빈번해지고, 인간의 평균수명이 늘어나면서 자외선 축적량이 많은 고령 인구수가 늘어남에 따라 그 환자수가 전 세계적으로 지속해서 증가하고 있다. 피부암은 피부 악성 종양으로 대표적인 종류로는 기저세포암, 편평상피세포암, 흑색종이 있다. 그 중 흑색종은 피부, 눈알, 뇌척수 연막 등 멜라닌 세포가 존재하는 어느 부위에서나 발생할 수 있으며, 다른 피부암과 달리 성장 속도가 매우 빨라 발생 초기에 다른 장기로 전이율이 높고 재발하기 쉬워 악성도가 높은 종양으로 알려져 있다. 흑색종의 주요 전이 부위는 원발병소 이외의 피부이지만 그 밖에도 림프절, 뼈, 폐, 간, 비장 등 어떤 기관들도 침범될 수 있다. 특히 뇌와 척수로의 전이는 주요 사망 원인으로 꼽히고 있다. 미국의 국립 암 연구소(National Cancer Institute)가 추정하는 바에 따르면 2012년에 미국에서의 흑색종 환자는 996,587명으로 예측되었다. 또한 2009년에 미국 통계국 발표에 따르면 향후 50년 후 아시아인에게서 흑색종의 발병인구가 지금의 3배로 증가될 것으로 예측되었다. 실제로 우리나라의 경우, 건강보험심사평가원의 조사로는 지난 2010년부터 2014년까지 피부의 흑색종으로 진료받은 환자수가 5년 사이에 약 63% 증가한 것으로 나타났다.

- [7] 이러한 흑색종은 초기에 진단되면 수술의 방법으로 쉽게 치료가 가능하지만 통증을 경험하게 되고 수술 후 얼마간은 피곤함을 느끼거나 위약감을 느끼게 되며 림프절을 절제한 경우에는 감염과 림프부종을 경험할 수 있다. 또한 수술범위나 종양의 위치, 개인의 체질에 따라 흉터가 남을 수 있다는 부작용이 있다. 게다가 흑색종은 종래의 화학요법제 및 방사선에 대한 높은 저항성을 가지기 때문에 초기 이상 진행되거나 재발한 경우에는 현재까지 특별한 치료방법이 없는 난치성 질환이다. 방사선 치료의 경우 방사선을 조사한 부위의 피부가 건조해지거나 붉게 변하며 모발이 빠질 수 있고 피부염이 생길 수 있다는 부작용이 있고, 항암화학요법에서 사용되는 치료제들은 다카르바진 (DTIC), 카르무스틴 (BCUN), 로무스틴 (CCNU), 시스플라틴 (cisplatin) 등이 있으며 이들을 단일요법으로 사용하기도 하고 복합요법으로 사용하기도 하는데 이들은 대부분은 인공으로 합성된 물질로, 그 효과는 미약할 뿐만 아니라 오심, 구토, 백혈구감소증, 혈소판감소증, 몸살 증상, 설사 등과 같은 부작용이 매우 심각하다.
- [8] 최근 TERT promoter 체세포 돌연변이 (somatic mutation)이 melanoma, HCC 및 다른 몇몇 암에서 자주 나타난다는 보고가 있다. Melanoma의 경우 -124 C>T, -146 C>T 돌연변이가 보고되었고, TERT promoter의 -124 C>T somatic mutation이 HCC의 경우 약 59%에서 관찰된다고 보고된 바 있다. HCC 치료제로 사용되어지고 있는 소라페닙 (sorafenib)의 경우 약물로 인한 장기간의 생명 연장 이득이 없으며, 내성 유발 등 한계가 있기에 유전자 치료 등 효과적인 신규 치료법 개발이 절실히 필요하다.
- [9] 한편, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) / Cas9 system은 박테리아에서 발견된 면역 시스템 (immune system)으로 파지 (phage)에

대한 방어기작으로 작용한다. 단일가닥 가이드 RNA (sgRNA)에 의해 표적 DNA의 표적 염기가 인식되고 Cas9 단백질이 함유한 뉴클레아제 (nuclease) 활성화에 의해 DNA 이중가닥절단 (double strand break, DSB)을 일으키는 RNA 유도형 유전자 가위이다. 기존의 ZFN, TALEN 유전자 가위에 비해, 20개의 염기서열을 인식하는 sgRNA와 Cas9 단백질 인식 PAM (protospacer adjacent motif) 서열만 있으면 sgRNA의 서열 변화만을 통해 어느 DNA 부위든지 표적하여 편집할 수 있는 장점이 존재한다. 또한 복수의 sgRNA를 이용하여 동시에 복수의 표적도 가능하며, 그 효율 또한 ZFN과 TALEN에 비해 비약적으로 높다. 이는 세포실험과 동물실험을 통해 포유류 세포 및 동물에서도 매우 잘 작동함이 알려져 있다.

[10]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[11] 이에 본 발명자들은 HCC에서 발견되는 -124 C>T 또는 -146 C>T somatic TERT 프로모터 돌연변이 염기 부위를 표적하여 CRISPR system을 통해 mutant TERT 프로모터에 특이적으로 작동하고 wild TERT promoter에는 작동하지 않는 sgRNA를 제작 하였다. 또한 Cas9의 뉴클레아제 (nuclease) 활성이 없어 DSB를 일으키지 않는 돌연변이 (D10A / H840A) dead Cas9을 사용하고, 후성편집자로 알려진 KRAB을 도입하여 돌연변이 TERT 프로모터를 타겟팅하기 위한 CRISPR system을 구축하였다. 또한, 이에 따라, TERT 프로모터의 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이를 가지는 HCC만을 표적하기 위한 CRISPR interference (CRISPRi) system을 구축하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[12] 따라서 본 발명의 목적은 CRISPR interference (CRISPRi) 시스템을 이용한 DNA 표적용 조성물에 관한 것이다.

[13] 또한, 본 발명의 목적은 상기 시스템을 이용한 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[14] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CRISPR interference (CRISPRi) 시스템에 이용되는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)에 관한 것이다.

[15]

과제 해결 수단

[16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[17] TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화 하는 DNA; 및

[18] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물을 제공한다.

[19] 상기 조성물은 DNA의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[20] 또한, 상기 TERT 프로모터는 1개 이상의 점 돌연변이 (point mutation)을

포함하는 것일 수 있으며, 상기 TERT 프로모터는 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이를 포함하는 것일 수 있다.

[21]

[22] 또한, 상기 뉴클레오타이드는 TERT 프로모터의 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드인 것일 수 있으며, 상기 뉴클레오타이드는 3' 말단으로부터 1 내지 5번째에 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 것일 수 있다. 특히, 상기 뉴클레오타이드는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCGGAA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGCUGGGAGGGCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[23] 또한, 상기 Cas9은 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)인 것일 수 있으며, 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB, KOX, SID, MBD2, MBD3, DNMT1, DNMT3A 및 DNMT3B로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 도메인이 연결된 것일 수 있으며, 바람직하게는 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것일 수 있다.

[24] 또한, 본 발명은 상기의 DNA 표적용 조성물을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[25] 상기 암은 췌장암, 담도암, 신경내분비종양, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 위암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 간암 또는 피부암일 수 있다.

[26] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 포함하는, 암의 진단용 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 포함하는, 암의 이미징 조성물을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)로서, TERT 프로모터의 -124 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드인 것인, 단일 가닥 가이드 RNA를 제공한다.

[29] 상기 단일 가닥 가이드 RNA는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCGGAA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGCUGGGAGGGCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[30] 또한, 본 발명은 TERT 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 가이드 RNA의 제조 방법을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법을 제공한다.

[32] 또한, 본 발명은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[33]

발명의 효과

[34] 본 발명에 따른 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 이를 이용한 CRISPRi 시스템은 선택적이고 효과적으로 TERT 프로모터의 점돌연변이 (point mutation)을 표적하고 이의 활성을 억제할 수 있는 바, 이러한 후성편집기술을 통한 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이 TERT 프로모터 표적화는 새로운 암 치료법으로써 매우 적합할 것으로 기대된다.

[35]

도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 -124 C>T mutant TERT (Telomerase reverse transcriptase) promoter를 표적하는 프로토스페이스 (protospacer) 서열을 나타낸 도이다.

[37] 도 2는 Mutant TERT promoter DNA 특이적 sgRNA 선별을 위한 *in vitro* DNA cleavage assay를 수행한 결과이다.

[38] 도 3은 CRISPR interference (CRISPRi) system의 개요를 도식화한 도이다.

[39] 도 4는 dCas9과 후성편집자 (epigenetic editor)들의 가능한 조합을 도식화한 도이다.

[40] 도 5는 세포실험을 통한 CRISPRi system 작동 여부를 Huh-7.5 간암세포주에서 reporter assay로 확인한 도이다. (A) 2-1 sgRNA, (B) 2-2 sgRNA.

[41] 도 6은 CRISPRi system 작동 여부를 Huh-7.5 간암세포주와 Hep3B 간암세포주에서 확인한 결과를 나타낸 도이다. 웨스턴 블랏 (western blot)을 통해 TERT 단백질 발현량을 확인하였다.

[42] 도 7은 Huh-7.5 간암세포주와 Hep3B 간암세포주에서 cell proliferation assay를 수행하여 CRISPRi system 작동에 의한 세포사를 확인한 도이다.

[43] 도 8에서 (A)는 2-1, 2-2 sgRNA의 P19 부위를 표시한 도이다. (B)는 2-1, 2-2 P19 mutant sgRNA를 이용한 *in vitro* DNA cleavage assay 결과를 나타낸 도이다. P19G: 2-1, 2-2 원본 sgRNA; P19C, P19A, P19U: 점 돌연변이 (point mutation) sgRNA.

[44] 도 9는 간암세포주 (A) Hep3B (wild TERT promoter), (B) Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter)에서 CRISPRi system 작동 여부를 확인한 결과이다. TERT protein 발현량을 웨스턴 블랏 (western blot)으로 확인하였다. P19G; 2-1, 2-2 원본 sgRNA; P19C, P19A, P19U: 점 돌연변이 (point mutation) sgRNA.

[45] 도 10은 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스의 게놈 구조 모식도이다.

[46] 도 11은 간암세포주인 Hep3B (wild TERT promoter), Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter)에서 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스에 의한 TERT 유전자 발현 감소를 RNA 수준에서 확인한 도이다. sg2-1: 2-1 원본 sgRNA; sg2-1 p19: P19C mutant sgRNA.

- [47] 도 12는 간암세포주인 Hep3B (wild TERT promoter), Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter)에서 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스에 의한 세포사 유도를 cell proliferation assay로 확인한 도이다. sg2-1: 2-1 원본 sgRNA; sg2-1 p19: P19C mutant sgRNA.
- [48] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [49] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [50] 본 발명은
- [51] TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화 하는 DNA; 및
- [52] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물을 제공한다.
- [53] 본원에서 사용된, 용어 "가이드 RNA" 는 표적 DNA에 특이적인 RNA로, Cas 단백질과 복합체를 형성할 수 있고, Cas 단백질을 표적 DNA에 가져오는 RNA를 말한다.
- [54] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, CRISPR RNA (crRNA) 및 트랜스활성화 crRNA (transactivating crRNA, tracrRNA)로 이루어져 있는 것일 수 있으며, 또는 crRNA 및 tracrRNA의 필수적 부분의 융합에 의해 생성된 단일 사슬 RNA (single-chain RNA, sgRNA)일 수 있다.
- [55] 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중RNA (dual RNA)일 수 있다.
- [56] 만약 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 필수적인 부분 및 표적과 상보적인 부분을 포함한다면, 어떠한 가이드 RNA라도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [57] 상기 crRNA는 표적 DNA와 혼성화될 수 있다.
- [58] 가이드 RNA는 RNA의 형태 또는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA의 형태로 세포 또는 유기체에 전달될 수 있다. 가이드 RNA는 분리된 RNA의 형태, 바이러스 벡터에 포함되어 있는 RNA, 또는 벡터에 암호화되어있는 형태일 수도 있다. 바람직하게, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터 또는 아그로박테리움 (agrobacterium) 벡터일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 가이드 RNA는 TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [60] 상기 TERT 프로모터는 1개 이상의 점 돌연변이 (point mutation)를 포함할 수 있으며, 해당 돌연변이는 바람직하게는 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이일 수 있다.
- [61] 이에 따라서, 상기 뉴클레오타이드는 TERT 프로모터의 -124 C>T (chr5, 1,295,228 C>T hg19 coordinate) 또는 -146 C>T (chr5, 1,295,250 C>T hg19

- coordinate) 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [62] 상기 뉴클레오타이드는 바람직하게는 3' 말단으로부터 1 내지 5 번째 위치에 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 대하여 상보적인 염기를 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCCGGA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGCUGGGAGGGCCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [63] 본원에서 사용된, 용어 "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미하고, CRISPR RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)로 불리는 두 RNA와 복합체를 형성할 때, 활성 엔도뉴클레아제 또는 니카아제 (nickase)를 형성한다.
- [64] Cas 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터 (national center for biotechnology information, NCBI)의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [65] Cas 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관 (CRISPR-associated, cas) 유전자는 종종 CRISPR-반복 스페이스 배열 (CRISPR repeat-spacer array)과 관련된다. 40개 이상의 서로 다른 Cas 단백질 패밀리가 기재되어 왔다. 이러한 단백질 패밀리 중, Cas1은 서로 다른 CRISPR/Cas 시스템 중에서 아주 흔한 (ubiquitous) 것으로 보인다. CRISPR-Cas 시스템은 세 종류가 있다. 이들 중에서, Cas9 단백질 및 crRNA 및 tracrRNA를 수반하는 타입 II CRISPR/Cas 시스템이 대표적이며, 잘 알려져 있다. cas 유전자 및 반복 구조 (repeat structure)의 특정 조합은 8개의 CRISPR 하위 유형 (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Apern, 및 Mtube)을 정의하는데 사용되어 왔다.
- [66] 본 발명의 조성물은 단백질의 형태 또는 Cas 단백질을 암호화하는 핵산의 형태로 Cas 요소를 포함할 수 있다.
- [67] 바람직하게, Cas 단백질은 Cas9 단백질 또는 이의 변이체이다.
- [68] 상기 Cas9 단백질은 바람직하게는 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)일 수 있다.
- [69] 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB (Kruppel associated box), KOX (Kruppel-type zinc finger factor), SID (mSin interaction domain), MBD2(methyl-CpG binding domain protein 2), MBD3, DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) 및 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 도메인이 연결된 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 Cas9 단백질은 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것일 수 있다.
- [70]
- [71] 또한, 본 발명은 TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및

- [72] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [73] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [74] 본 발명에서 암은 고형암 또는 비고형암일 수 있다. 고형암은 예를 들어 간, 폐, 유방, 피부 등 장기에 암 종양이 발생한 것을 말한다. 비고형암은 혈액 내에서 발생한 암이고, 혈액암으로도 불린다. 상기 암은 암종 (carcinoma), 육종(sarcoma), 조혈세포 유래의 암, 배세포 종양(germ cell tumor), 또는 모세포종(blastoma)일 수 있다. 암종은 상피세포(epithelial cells) 유래의 암일 수 있다. 육종은 각 조직이 골수 밖의 중간엽 세포(mesenchymal cell)에서 유래된 세포로부터 발생된 것일 수 있는 결합 조직(즉, 뼈, 연골, 지방, 및 신경)으로부터 유래된 암일 수 있다. 조혈세포 유래의 암은 골수를 떠나 림프절 및 혈액에서 성숙하는 경향이 있는 조혈 세포로부터 유래할 수 있다. 배세포 종양은 다능성 세포(pluripotent cell)로부터 유래된 암일 수 있다. 상기 다능성 세포는 정소 또는 난소에 종종 존재할 수 있다. 모세포종은 미성숙 전구 세포 또는 배아 조직으로부터 유래할 수 있다. 상기 암은 췌장암, 담도암, 신경내분비종양, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 위암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 및 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [75] 바람직하게는, 상기 암은 간암 또는 피부암일 수 있다.
- [76] 본 발명에서 사용되는 용어인 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암을 억제하거나 암의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [77] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 암의 예방 또는 치료방법에 이용될 수 있으며, 구체적으로 상기 예방 또는 치료방법은 암이 발병되거나 또는 발병될 것으로 예상되는 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [78] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 상기 조성물을 도입하는 것을 의미한다.
- [79] 본 발명의 용어 "개체"란, 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미하고, 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류

및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 유효성분으로 1일 0.01 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 10 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 조성물을 0.001 내지 50% 중량 백분율로 포함할 수 있다.

- [81] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [82] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [83] 본 발명의 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [84] 본 발명의 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만,

당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[85] 본 발명의 상기 조성물은 기타 항암제, 방사선 치료, 외과적 수술과 병행될 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택 및 병행될 수 있다.

[86]

[87] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 포함하는, 암의 진단용 조성물을 제공한다.

[88] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 포함하는, 암의 이미징 조성물을 제공한다.

[89] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 암의 발병 여부, 경과 또는 예후를 확인하는 것이다.

[90] 상기 DNA 표적용 조성물은 영상을 통하여 암을 진단하기 위하여 분자 영상용 형광체와 결합할 수 있다.

[91] 상기 분자 영상용 형광체는 형광을 발생시키는 모든 물질을 말하며, 적색이나 근적외선 (near-infrared)의 형광을 발광하는 것이 바람직하며, 양자 수득량 (quantum yield)이 높은 형광체가 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[92] 상기 분자 영상용 형광체는 상기 DNA 표적용 조성물과 결합할 수 있는 형광체, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[93] 형광체는 플루오레신 (fluorescein), 보디피 (BODIPY), 테트라메틸로드아민 (Tetramethylrhodamine), 알렉사 (Alexa), 시아닌 (Cyanine), 알로피코시아닌 (allopicocyanine) 또는 이들의 유도체가 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[94] 형광 단백질은 Dronpa 단백질, 형광 발색 유전자 (EGFP), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5 또는 기타 형광 단백질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[95] 기타 영상용 물질은 산화철, 방사성 동위원소 등이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, MR, PET과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.

[96]

[97] 또한, 본 발명은 TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)로서, TERT 프로모터의 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드인 것인, 단일 가닥 가이드 RNA를 제공한다.

[98] 바람직하게, 상기 단일 가닥 가이드 RNA는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCGGAA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[99] 또한, 본 발명은 TERT 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 가이드 RNA의 제조 방법을 제공한다.

[100] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는

진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법을 제공한다.

[101] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[102]

발명의 실시를 위한 형태

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

[104]

[105] 실험예 1: TERT wild / -124 mutant (C>T) promoter를 가지는 reporter plasmid 제작

[106] Wild / -124 mutant (C>T) TERT 프로모터를 얻기 위해 Hep3B (wild TERT promoter), Huh-7.5 (-124 (C>T) mutant TERT promoter) 세포에서 genomic DNA를 추출하였다. 1×10^6 개 세포에 Quick Extract DNA Extraction solution (Epicentre) $200\mu\text{l}$ 를 넣은 후 65°C 에서 6분간 반응한 뒤 15초 동안 볼텍싱 (vortexing) 하였다. 98°C 에서 2분간 반응시키고 genomic DNA를 추출 하여 TERT promoter PCR의 주형으로 사용 하였다. $2\mu\text{l}$ genomic DNA, 5X buffer, 200uM dNTP, 0.2uM forward primer, 0.2uM reverse primer, 0.4U phusion DNA polymerase (NEB)를 혼합한 뒤 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 30 cycle을 반복하여 290bp 길이를 가지는 wild / mutant TERT promoter DNA를 얻어내었다. 얻어진 TERT promoter DNA는 pGL3-flrefly luciferase(F.luci) plasmid에 in-fusion HD cloning kit을 이용하여 클로닝 (cloning) 하였다.

[107]

[108] 실험예 2: *In vitro* DNA cleavage assay

[109] *E.coli*에서 정제한 Cas9 단백질과 *in vitro* 전사 (transcription)로 제작한 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA로 TERT 프로모터 DNA 절단을 아가로스 겔에서 확인하였다. Substrate DNA로는 pGL3-wild/mutant TERT promoter-F.luci vector를 ScaI 제한효소 (restriction enzyme)로 선형화 (linearization) 시킨 DNA를 사용하였다. Substrate DNA 100ng, Cas9 reaction buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT), 0.5 pmole Cas9 protein, 1 pmole sgRNA를 $10\mu\text{l}$ volume으로 혼합한 뒤 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 250mM EDTA를 포함한 3X DNA dye를 반응액에 넣어 반응을 멈춘 뒤 1% TBE 겔 (gel)에 반응액을 로딩하여 절단된 DNA를 EtBr 염색으로 확인하였다.

[110]

[111] 실험예 3: Luciferase assay

[112] 12-웰 플레이트에 1×10^5 개의 Huh-7.5 세포를 배양한 뒤 50ng pTK-renilla luciferase plasmid, 500ng wild or mutant TERT promoter-firefly luciferase plasmid,

1 μ g sgRNA 발현 plasmid, 500ng dCas9 발현 plasmid를 opti-MEM 배지와 50ul volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 동시에 2ug의 polyethylenimine (PEI)를 opti-MEM 배지와 100ul volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 각각의 plasmid DNA 용액과 PEI 용액을 혼합한 뒤 상온에서 20분간 반응시켰다. 20분 뒤 반응액을 각각의 세포에 넣어 준 뒤 CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양하였다. 6시간 뒤 plasmid DNA와 PEI가 들어 있는 배양액을 제거한 뒤 새 배양액으로 교체해준 다음 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 뒤 배양액을 제거하고 1X PBS 용액으로 씻어준 뒤 passive lysis buffer (Promega) 100 μ l를 넣어 준 뒤 상온에서 15분간 반응시켰다. 세포 용해물 (Cell lysate)을 마이크로튜브 (micro-tube)로 옮긴 뒤 13000rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상기 용해물 10ul를 dual-luciferase assay kit (Promega)을 사용해 luminometer (Berthold)에서 luciferase 값을 측정하였다.

[113]

[114] 실험 예 4: Western blot

[115] 6-웰 플레이트에 3 x 10⁵개의 Huh-7.5와 Hep3B 세포를 배양한 뒤 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 plasmid DNA를 PEI를 이용해 형질감염시켰다. 2 μ g의 pTZ-U6+1-sgRNA plasmid DNA와 1 μ g의 3xFlag-KRAB-dCas9 plasmid DNA를 opti-MEM 배지와 100 μ l volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 동시에 2ug의 PEI를 opti-MEM 배지와 100 μ l volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 각각의 plasmid DNA 용액과 PEI 용액을 혼합한 뒤 상온에서 20분간 반응시켰다. 20분 뒤 반응액을 각각의 세포에 넣어 준 뒤 CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양하였다. 6시간 뒤 plasmid DNA와 PEI가 들어 있는 배양액을 제거한 뒤 새 배양액으로 교체해준 다음 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 뒤 배양액을 제거하고 1X PBS 용액으로 씻어준 뒤 150 μ l RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)를 넣어준 뒤 4°C에서 20분간 반응시켰다. 용해된 세포를 1.5ml 마이크로튜브로 옮긴 후 4°C에서 30분 동안 rotation 시킨 후 15000rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액만 따서 새로운 마이크로튜브에 옮겼다. Smart™ BCA protein assay kit을 이용해 total protein 정량값을 얻은 뒤 30 μ g의 총 단백질을 10% SDS-PAGE에 로딩하였다. 이후 PVDF 막 (membrane)으로 트랜스퍼 (transfer)한 뒤 상온에서 1시간동안 블로킹 (blocking) 용액으로 블로킹하였다. 1차 항체가 들어 있는 블로킹 용액으로 교체한 뒤 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, 0.1% Tween-20, 1X PBS 용액으로 5분씩 6회 세척하였다. 그 후, 2차 항체가 들어 있는 블로킹 용액으로 교체하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 0.1% Tween-20, 1X PBS 용액으로 5분씩 6회 세척한 뒤 막을 ECL 용액에서 1분간 반응시키고 x-ray 필름에 감광시킨 후 현상액 (developer)에 담그어 단백질 밴드를 확인하였다. 사용한 항체는 다음과 같다. 1차 항체: Anti-3xFlag antibody (Sigma), anti-human telomerase reverse transcriptase (TERT) (Fitzgerald), anti-tubulin (MBL), 2차 항체:

Goat anti-mouse-HRP conjugated (Santa cruz), Anti-rabbit-HRP conjugated.

[116]

[117] 실험 예 5: TERT 유전자 RT-PCR

[118] 6-웰 플레이트에 3×10^5 개의 Hep3B와 Huh-7.5 세포를 배양한 뒤 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 아데노바이러스를 각각 감염시켰다. Hep3B 세포에는 10 MOI의 아데노바이러스를, Huh-7.5 세포에는 100 MOI의 아데노바이러스를 배양액에 섞어 감염시켰다. 48시간 뒤 배양액을 제거하고 1X PBS 용액으로 씻어준 뒤 $500\mu\text{l}$ TRIZOL 시약을 넣고 상온에서 3분간 반응시켰다. TRIZOL 시약과 세포를 1.5ml 마이크로튜브로 옮긴 후 $100\mu\text{l}$ 클로로포름 (chloroform) 용액을 넣어주고 볼텍싱하여 섞어준 뒤, 상온에서 5분간 반응시키고 4°C에서 10분 동안 원심분리 후 상층액만 따서 다시 새로운 마이크로튜브에 옮겼다. 동일량의 이소프로판올 (isopropanol) 용액을 넣고 상온에서 20분간 반응시킨 후 4°C에서 40분 동안 원심분리하여 세포의 total RNA 침전물을 얻어내었다. DEPC-treated D.W에 침전된 RNA를 녹인 후 정량값을 얻었다. $5\mu\text{g}$ 의 total RNA에 500ng의 random primer (5'-NNNNNN-3')와 dNTP, 역전사 효소를 섞은 후 42°C에서 50분간 반응시켰다. 역전사 과정으로 얻어낸 cDNA 중 $2\mu\text{l}$ 를 PCR에 이용하였다. cDNA $2\mu\text{l}$, 10pmole 5' primer (5'-CATTTTCATCAGCAAGTTTGAAG), 10pmole 3' primer (5'-TTTCAGGATGGAGTAGCAGAGG-3')와 2x SYBR PCR master mix를 섞은 뒤 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초, 40cycle 조건으로 ABI StepOne Plus real-time PCR 기기에서 증폭시켰다.

[119]

[120] 실험 예 6: Cell proliferation assay

[121] 96-웰 플레이트에 1×10^4 의 세포를 배양한 뒤 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 아데노바이러스를 감염시켰다. 72시간 후 Opti-MEM 100ul에 CellTiter 96 Aqueous one solution reagent(MTS, Promega)를 20% 추가하여 각 웰에 첨가한 후 1~4시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 490nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[122]

[123] 실시 예 1: -124 C>T mutant TERT promoter DNA에 특이적으로 작용할 수 있는 sgRNA 제작

[124] TERT promoter의 -124번째가 C>T 돌연변이 된 mutant TERT promoter만 표적할 수 있는 sgRNA를 제작하기 위해 염기서열 분석을 통해 CRISPR/Cas9 system이 적용될 수 있는 -124번째 돌연변이를 포함하는 9개의 protospacer 서열을 선정하였다 (도 1).

[125]

선정한 프로토스페이스 서열을 가이드 서열 (guide sequence)로 가지는 9종의 sgRNA는 -124 C>T mutant TERT promoter와는 100% 일치하지만 wild TERT promoter와는 1개의 미스매치 (mismatch)를 가지는 특징을 가지고 있다. 이러한

특징을 가지는 9종의 mutant TERT promoter 표적 sgRNA를 제작하였다.

- [126] -124 C>T 돌연변이를 가지는 mutant TERT promoter 특이적으로 작용하는지 확인하기 위해 *in vitro* DNA cleavage assay를 수행하였다. 9종의 sgRNA중에 2-1, 2-2번 sgRNA가 wild TERT promoter에 작용하지 않고 -124 C>T mutant TERT promoter 특이적 DNA cleavage를 유발하는 것을 확인하였다 (도 2). 이를 통해 2-1, 2-2번 프로토스페이서를 가이드 서열로 가지는 sgRNA들이 -124 C>T mutant TERT promoter에 특이적으로 작용함을 확인하였다. 2-1과 2-2 sgRNA 가이드 서열은 다음과 같다.
- [127] 2-1 : 5' - GGGGCUGGGAGGGCCCCGGAA - 3' (서열번호 1)
- [128] 2-2 : 5' - GGGCUGGGAGGGCCCCGGAAG - 3' (서열번호 2)
- [129]
- [130] 실시예 2: CRISPRi system 제작 및 최적의 조합 확인
- [131] -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하여 TERT 유전자의 발현을 억제하기 위해 D10A / H840H 돌연변이를 가지는 뉴클레아제 활성이 없는 dead Cas9 (dCas9) 과 후성편집자 (epigenetic editor)를 도입한 CRISPRi system을 제작하였다 (도 3). 또한, dCas9을 기준으로 N-말단 / C-말단에 후성편집자 (epigenetic editor)인 KRAB과 DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)를 도입한 다양한 조합의 CRISPRi system을 제작하였다 (도 4). 그 다음, dCas9-후성편집자 단백질과 sgRNA로 구성된 CRISPRi system이 작동하는지 reporter assay를 통해 세포실험에서 확인하였다 (도 5).
- [132] 도 5의 A 및 B에 각각 나타낸 바와 같이, Mutant TERT promoter 특이적 sgRNA인 2-1, 2-2 sgRNA에 의해 mutant TERT promoter-luciferase reporter값이 wild TERT promoter-luciferase reporter에 비해 현저히 낮아, 2-1, 2-2 sgRNA가 luciferase 발현을 효율적으로 감소시킴을 확인한다. 다양한 dCas9-후성편집자 조합들 중에서는 KRAB-dCas9의 조합이 다른 dCas9-후성편집자 조합들보다 mutant TERT promoter 특이적으로 그 발현을 저해하는 것으로 확인되어 KRAB-dCas9의 조합이 CRISPRi system에 최적임을 확인하였다.
- [133]
- [134] 실시예 3: Transient DNA transfection을 통한 TERT 유전자 발현 감소와 세포사 유도 확인
- [135] 위에서 제작한 CRISPRi system이 염색체상의 TERT promoter에 작용하여 내재적 (endogenous) TERT 유전자 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 TERT protein 발현량 변화를 측정하였다. 구체적으로, wild TERT promoter를 보유한 Hep3B 간암 세포주와 -124 C>T mutant TERT promoter를 보유한 Huh-7.5 간암 세포주에 -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하는 2-1, 2-2 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 DNA를 각각의 세포에 공동 형질감염 (co-transfection) 시킨 뒤 TERT protein 발현량 변화를 확인하였다 (도 6).
- [136] 도 6에 나타낸 바와 같이, 도입한 CRISPRi system에 의해 -124 C>T mutant TERT

promoter를 보유한 Huh-7.5 세포주에서는 TERT protein 발현이 감소함을 확인하였다. 반면, wild TERT promoter를 보유한 Hep3B 세포주는 TERT protein의 변화가 없음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 CRISPRi system은 -124 mutant TERT promoter에 특이적으로 작용함을 확인하였다.

[137] 또한, TERT protein의 발현 감소를 통해 세포사가 유도될 수 있는지를 cell proliferation assay를 통해 확인하였다 (도 7).

[138] 도 7에 나타낸 바와 같이, 2-2 sgRNA를 도입 하였을 때 Huh-7.5 세포주에서 다른 sgRNA들보다 세포사를 더 유도함을 확인하였다. 반면, 2-2 sgRNA는 Hep3B 세포주에서는 세포사를 유도하지 않음을 확인하였다. 이를 통해 2-2 sgRNA와 KRAB-dCas9 조합의 CRISPRi system이 -124 C>T mutant TERT promoter에 작용하여 TERT 유전자 발현 억제와 세포사를 유도할 수 있음을 확인 하였다. 대조군으로 사용한 2-8 sgRNA의 서열은 다음과 같다.

[139] 2-8 : 5' - GUCCCCGGCCCAGCCCCUUC - 3' (서열번호 5)

[140]

[141] 실시예 4: sgRNA 가이드 서열에 점 돌연변이 (point mutation) 도입을 통한 CRISPRi system 최적화

[142] -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하는 CRISPRi system을 더욱 최적화하기 위해 sgRNA 가이드 서열의 P19 (PAM distal 부위)에 단일 염기 돌연변이를 도입하여 wild TERT promoter 서열에 2개의 미스매치 (mismatch)가 형성되도록 하였다 (도 8A). 또한, 제작한 sgRNA들을 이용해 *in vitro* DNA cleavage를 통해 돌연변이 sgRNA들의 활성이 변하는지 확인하였다 (도 6B). 사용한 sgRNA의 서열을 하기에 나타내었다.

[143]

[144] 2-1 : 5' - GGGGCU~~G~~GGGAGGGCCCGGAA - 3' (서열번호 1)

[145] 2-2 : 5' - GGGCU~~G~~GGGAGGGCCCGGAAG - 3' (서열번호 2)

[146] 2-1 P19 : 5' - G~~C~~GGCUGGGAGGGCCCGGAA - 3' (서열번호 3)

[147] 2-2 P19 : 5' - G~~C~~GCUGGGAGGGCCCGGAAG - 3' (서열번호 4)

[148] (각 sgRNA의 P19 부위에 G>C로의 점 돌연변이 (point mutation)를 도입하였으며, 돌연변이 부위는 밑줄과 Bold체로 표기하였다.)

[149]

[150] 도 8B에 나타낸 바와 같이, 제작된 돌연변이 sgRNA들은 원본 sgRNA보다 더 좋은 DNA cleavage 활성을 유도함을 확인하였다 (도 8B).

[151] 상기 돌연변이 sgRNA들을 wild TERT promoter를 가지는 Hep3B 간암 세포주와 -124 C>T mutant TERT promoter를 가지는 Huh-7.5 간암 세포주에 DNA 형질감염 (transfection)으로 도입하여 실험을 수행하였다 (도 9).

[152] 도 9B에 나타낸 바와 같이, 2-1 sgRNA의 경우 -124 C>T mutant TERT promoter를 가지는 Huh-7.5 간암세포주에서 P19U 돌연변이를 도입한 sgRNA가 TERT protein의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 2-2 sgRNA의 경우 원본 2-2

sgRNA (P19G) 보다 P19C, P19A 돌연변이를 도입한 sgRNA가 TERT protein의 발현을 더욱 감소시킴을 확인하였다.

[153] 반면, 도 9A에 나타난 바와 같이, 2-1, 2-2 sgRNA 모두 wild TERT promoter를 가지는 Hep3B 간암세포주에서는 CRISPRi system에 의해 TERT protein 발현에 전혀 영향이 없음을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에 따른 TERT promoter를 표적하는 CRISPRi system은 -124 C>T mutant TERT promoter 특이적으로 작용해 내재적 TERT protein 발현을 억제함을 확인하였다.

[154]

[155] 실시예 5: 아데노바이러스를 이용한 CRISPRi system 검증

[156] 상기 실시예에서 확인한 최적화된 형태인 KRAB-dCas9과 -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA를 아데노바이러스 벡터 시스템에 도입하여 단일 아데노바이러스에서 KRAB-dCas9과 sgRNA가 함께 발현될 수 있는 형태의 아데노바이러스를 제작하였다 (도 10). 2-1 sgRNA와 2-1, 2-2 sgRNA의 P19 부위에 점 돌연변이 (point mutation)를 도입한 sgRNA를 발현하는 아데노바이러스로 Hep3B (wild TERT promoter)와 Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter) 간암세포주를 감염시키고 TERT mRNA의 발현량을 관찰하였다 (도 11).

[157] 도 11에 나타난 바와 같이, 상기 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 아데노바이러스를 이용한 CRISPRi system 전달에 의해 간암 세포주에서 세포내 TERT mRNA의 발현이 감소함을 확인하였다. 구체적으로, -124 C>T mutant TERT promoter를 보유한 Huh-7.5 세포주에서는 sgRNA를 발현하지 않고, KRAB-dCas9만 발현하는 아데노바이러스에 비해 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA들을 발현하는 아데노바이러스들에 의해 TERT 유전자의 발현이 90% 이상 감소함을 확인하였다. 반면, wild TERT promoter를 보유한 Hep3B 세포주에서는 Huh-7.5 세포주에 비해 감소 효과가 매우 적음을 확인하였다. 상기 결과를 통해 sgRNA의 가이드 서열에 돌연변이를 도입할 경우 sgRNA의 활성에 변화를 줄 수 있음을 확인하였다.

[158] 또한, TERT 유전자 발현의 감소에 의해 세포사가 유도될 수 있는지 확인하기 위해 cell proliferation assay를 수행하였다 (도 12).

[159] 도 12에 나타난 바와 같이, wild TERT promoter를 보유한 Hep3B에서는 어떠한 아데노바이러스도 세포사를 유도하지 못함을 확인하였다. 반면, -124 C>T mutant TERT promoter를 보유한 Huh-7.5 세포주에서는 2-2 P19 sgRNA를 발현하는 CRISPRi system을 보유한 아데노바이러스에서 50%의 세포사를 유도함을 확인하였다.

[160]

[161] 상기 결과를 통해, -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하는 2-2 P19 sgRNA와 KRAB-dCas9을 조합한 CRISPRi system이 -124 C>T mutant TERT promoter를 보유한 암세포에서 TERT 유전자의 발현 억제와 동시에 세포사까지

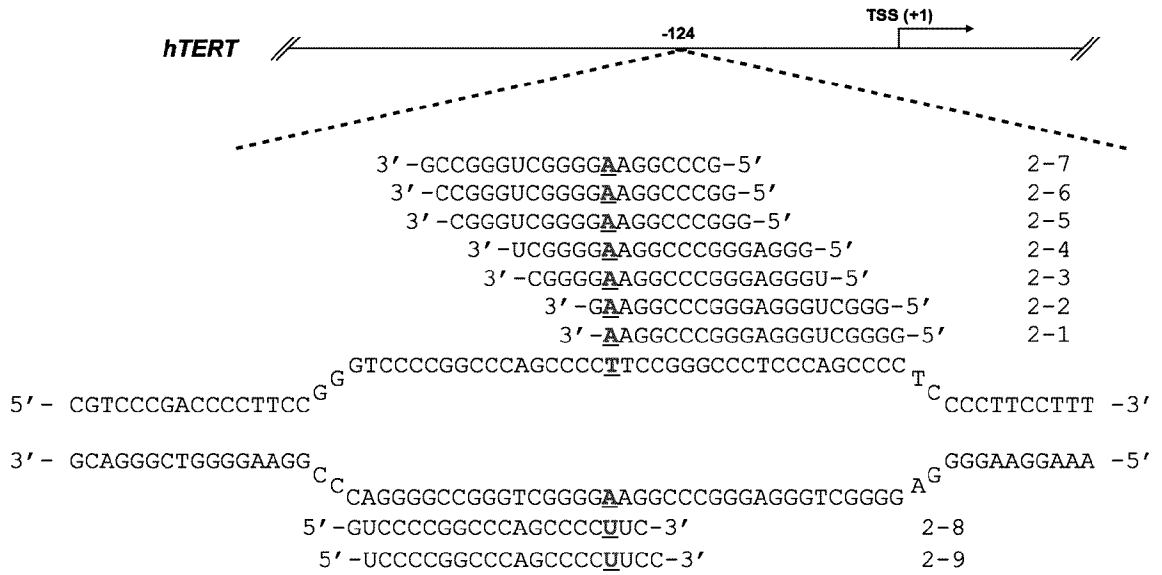
유도할 수 있는 최적의 system임을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 CRISPRi system을 사용하면 TERT 프로모터의 -124 또는 -146 C>T mutation을 가지는 암세포만을 표적하여 세포 특이적인 치료가 가능하고, 따라서 새로운 암 치료법으로써 유용하게 활용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화 하는 DNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 DNA의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 것인, 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 TERT 프로모터는 1개 이상의 점 돌연변이 (point mutation)를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 TERT 프로모터는 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 TERT 프로모터의 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드인 것인, 조성물.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 3' 말단으로부터 1 내지 5 번째 위치에 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 대하여 상보적인 염기를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCCGGA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGCUGGGAGGGCCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 Cas9은 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)인 것인, 조성물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB (Kruppel associated box), KOX (Kruppel-type zinc finger factor), SID (mSin interaction domain), MBD2(methyl-CpG binding domain protein 2), MBD3, DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) 및 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 도메인이 연결된 것인, 조성물.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것인, 조성물.
- [청구항 11] 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 암의 예방 또는

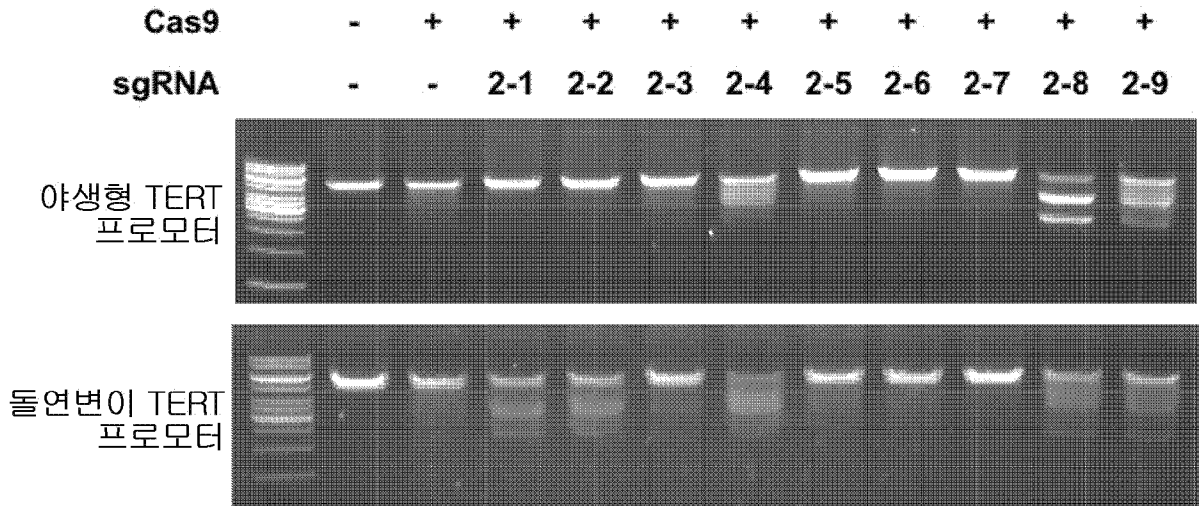
- 치료용 조성물.
- [청구항 12] 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 암의 진단용 조성물.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 암의 이미징 조성물.
- [청구항 14] TERT (Telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)로서, 상기 뉴클레오타이드는 TERT 프로모터의 -124 C>T 또는 -146 C>T 돌연변이에 상보적인 염기를 포함하는 20개의 뉴클레오타이드인 것인, 단일 가닥 가이드 RNA.
- [청구항 15] 청구항 15에 있어서, 상기 단일 가닥 가이드 RNA는 서열번호 1 (5' - GGGGCUGGGAGGGCCCCGGAA - 3') 또는 서열번호 2 (5' - GGGCUGGGAGGGCCCCGGAAG - 3')의 염기서열로 이루어진 것인, 단일 가닥 가이드 RNA.
- [청구항 16] TERT 프로모터에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 가이드 RNA의 제조 방법.
- [청구항 17] 청구항 1의 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법.
- [청구항 18] 청구항 11의 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

[도1]

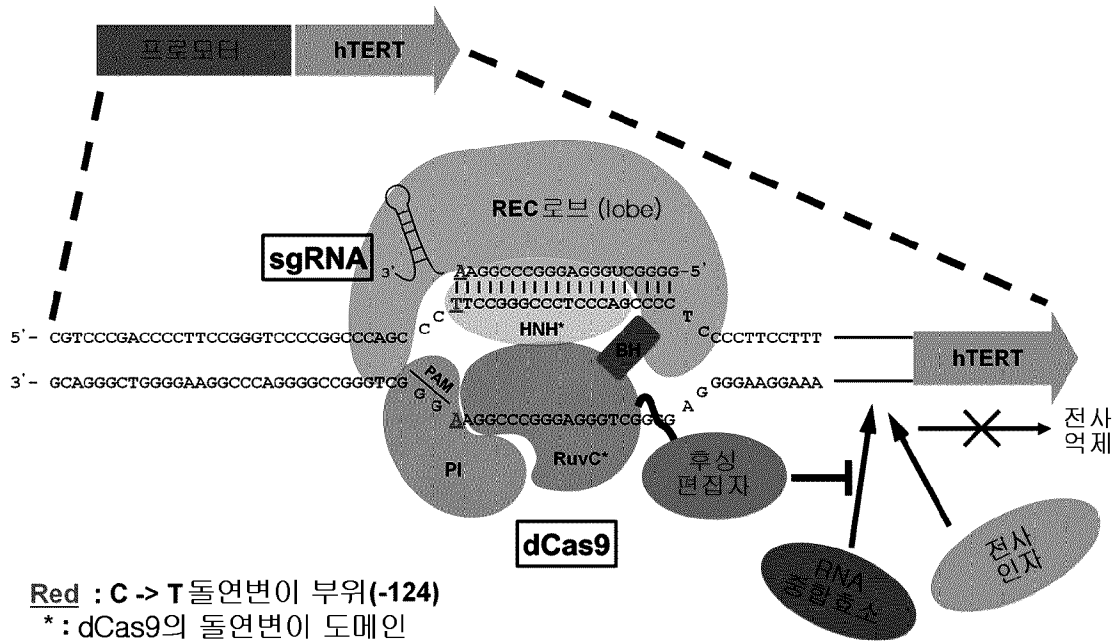


Red : C -> T 돌연변이 부위 (-124)
TSS : 전사 개시점 (Transcription start site)

[도2]



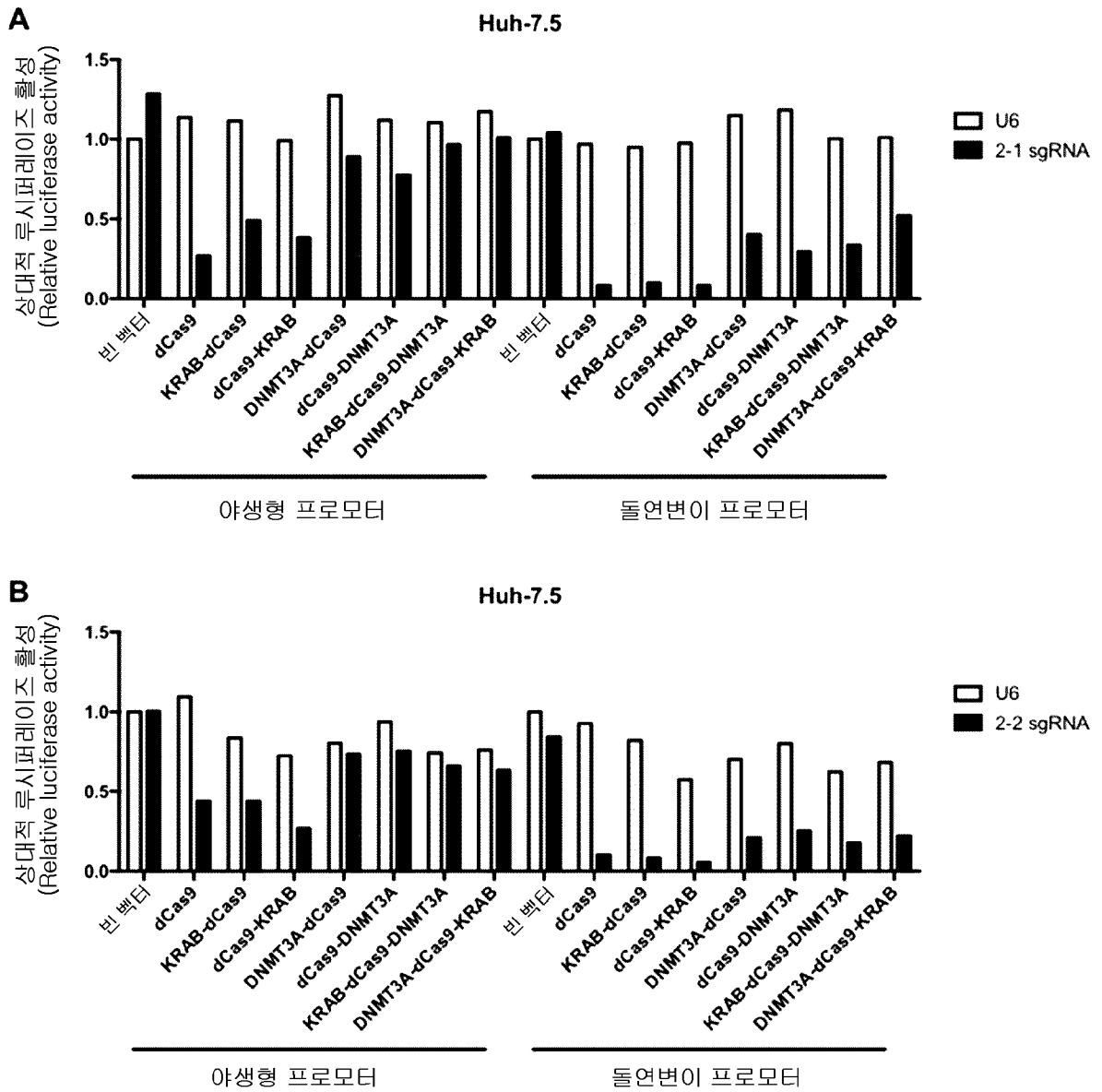
[도3]



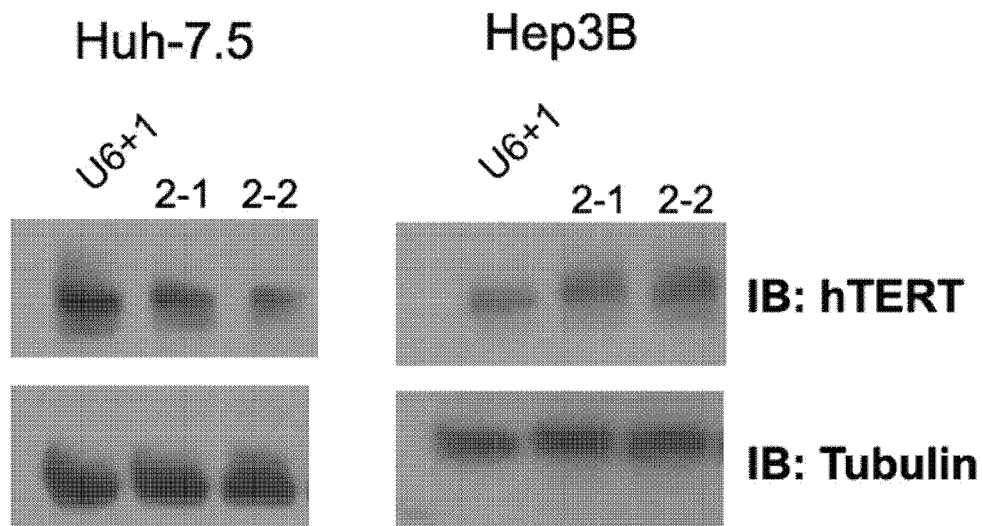
[도4]



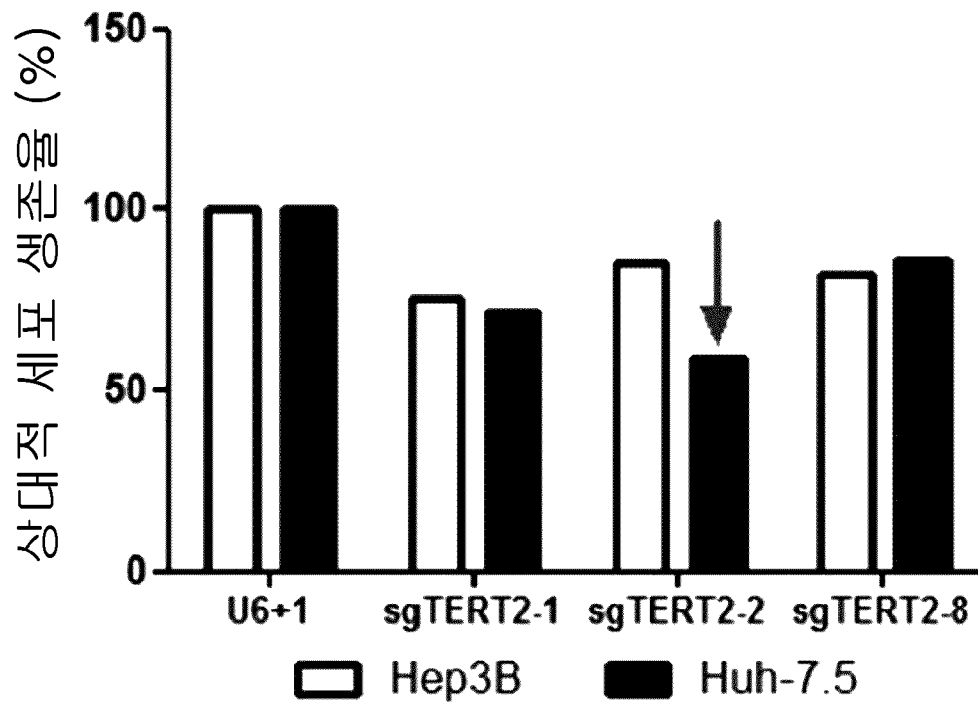
[도5]



[도6]



[도7]



[도8]

A

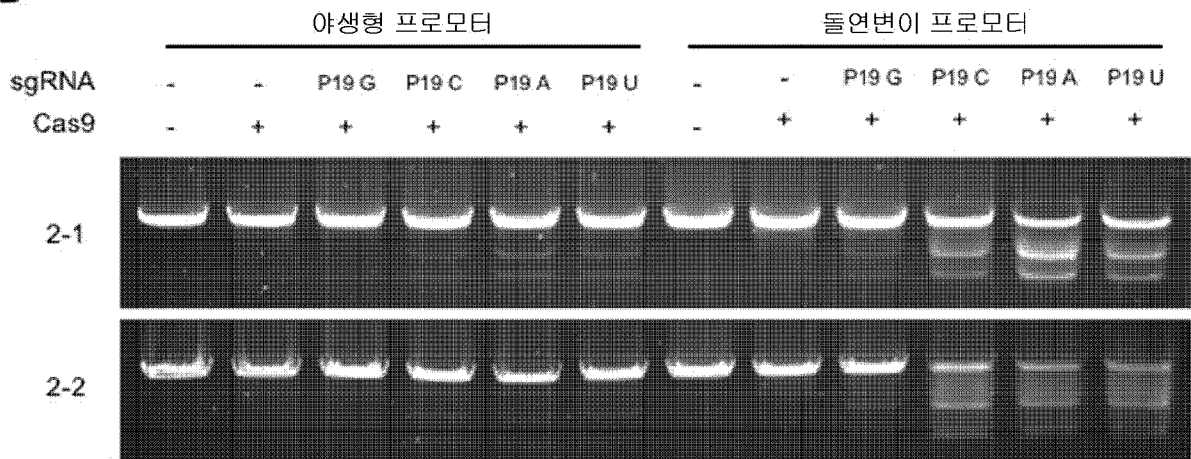
5' – GGGGCUGGGAGGGCCCGGAA PAM – 3' 2-1 sgRNA

5' – GGGCUGGGAGGGCCCGGAAG PAM – 3' 2-2 sgRNA

↑
P19

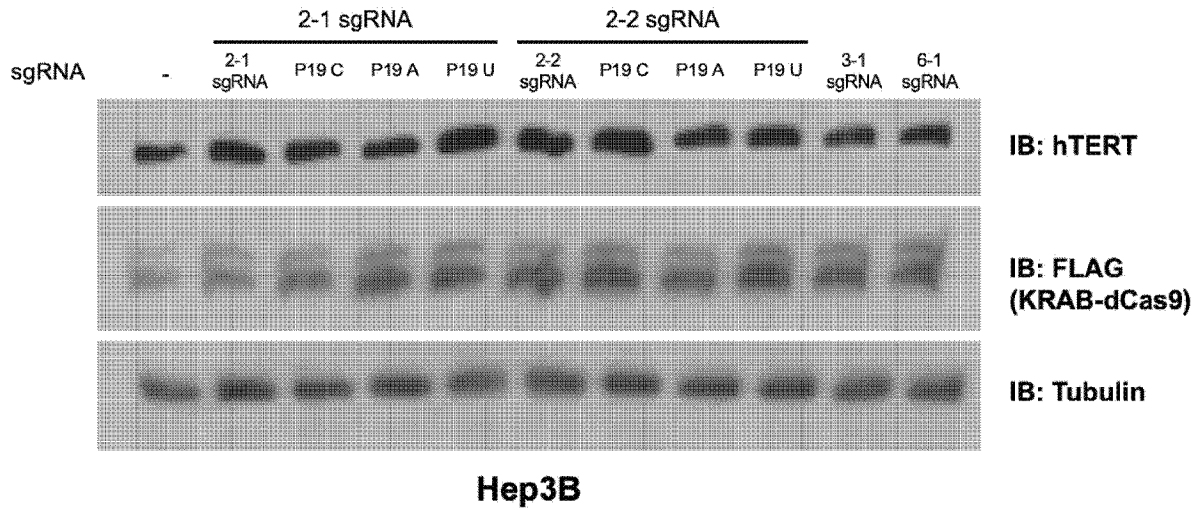
↑
P1

B

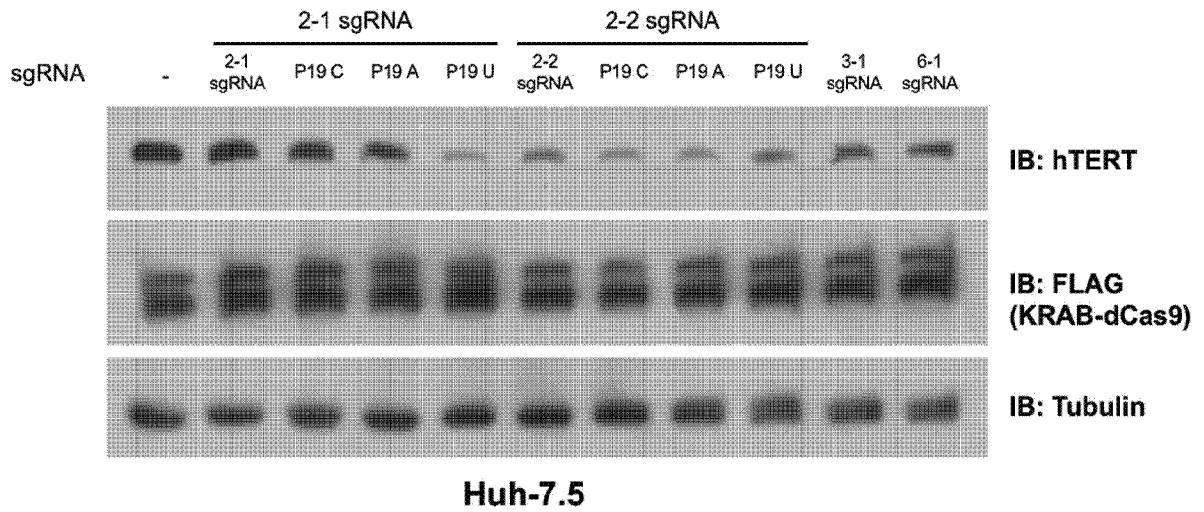


[도9]

A



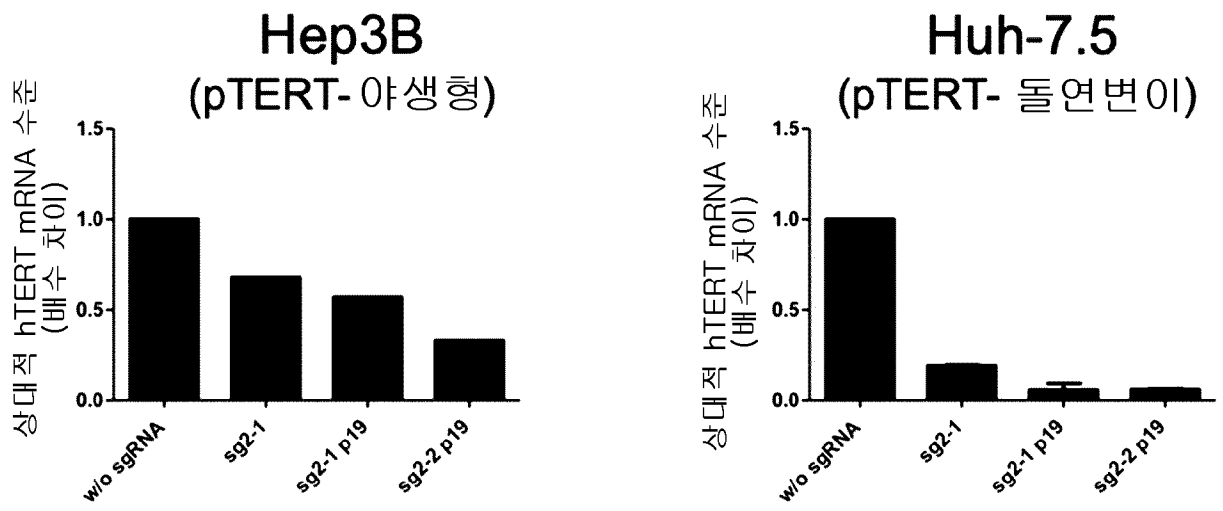
B



[도10]



[도11]



[도 12]

