



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030474
(43) 공개일자 2020년03월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/102 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0112763
(22) 출원일자 2019년09월11일
심사청구일자 2019년12월02일
- (30) 우선권주장
1020180109214 2018년09월12일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
명경재
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 404동
1204호 (반연리)
- 권태준
울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-17, 703동
1402호 (구영리, 구영우미린2차아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이처영, 장제환

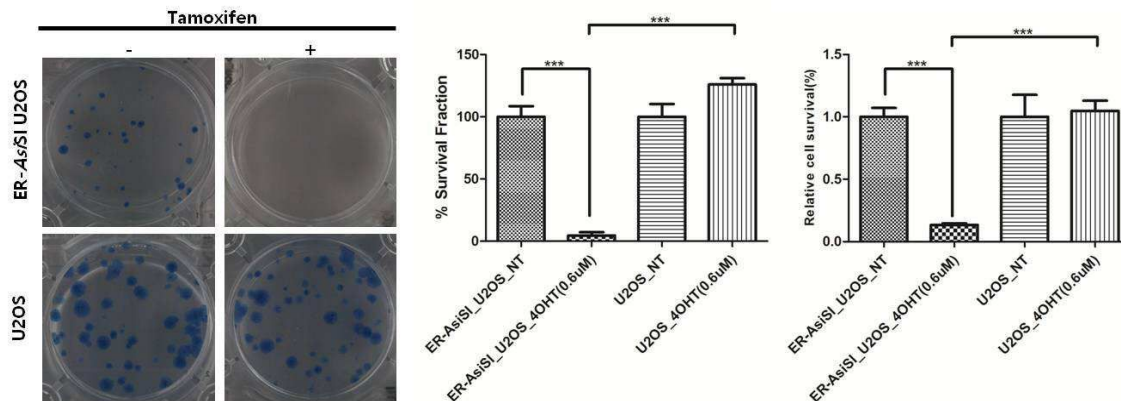
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 유전자가 변이된 세포의 사멸 유도 조성물 및 상기 조성물을 이용한 유전자가 변형된 세포 사멸 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 핵산절단효소 및 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 조성물, 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2750/14141 (2013.01)

(72) 발명자

백인준

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 403동
 1102호 (반연리)

라재선

울산광역시 울주군 범서읍 평천길 82, 201동 2213
 호 (천상리, 천상청구그린타운2단지)

서유리

대전광역시 동구 동부로 73, 504동 706호 (관암동,
 주공아파트5단지)

윤성민

전라북도 군산시 미장안길 45, 203동 604호 (미장
 동, 군산미장2차아이파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	IBS-R022-D1-2018-a00
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	기초과학연구원
연구사업명	캠퍼스연구단 연구사업
연구과제명	DNA 상해 복원 기작에 대한 연구 수행 (5/6)
기 여 율	1/1
주관기관	기초과학연구원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도용 조성물.

청구항 2

핵산절단효소 및 암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 암 치료용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산절단효소는 제한효소 (restriction enzyme), ZNFN (zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease) 또는 Cas 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas3, Cas9, Cpf1, Cas6, C2c12 또는 C2c2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 코리네박터(Corynebacter), 수테렐라(Sutterella), 레지오넬라(Legionella), 트레포네마(Treponema), 피리팩터(Filifactor), 유박테리움(Eubacterium), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 미코플라즈마(Mycoplasma), 박테로이드(Bacteroides), 플라비플라비이볼라(Flaviivola), 플라보박테리움(Flavobacterium), 아조스피릴룸(Azospirillum), 글루코나세토박터(Gluconacetobacter), 나이세리아(Neisseria), 로세부리아(Roseburia), 파비바큐럼(Parvibaculum), 스탕필로코커스(Staphylococcus), 니트라티프랙터(Nitratifractor), 코리네박테리움(Corynebacterium) 및 캄필로박터(Campylobacter)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Cas 단백질의 오소로그(ortholog)를 포함하는 미생물 속으로부터 유래하고, 이들로부터 분리된 것 또는 재조합된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 절단인자는 서열번호 1 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 유전자 변이된 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 정상세포의 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 61 내지 90의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 암은 대장암이고, 대장암 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 1 내지 30의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 암은 골육종이고, 골육종 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 31 내지 60의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 암은 교모세포종이고, 교모세포종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제2항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 폐암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 유전자 변이된 세포 고유의 삽입 및/또는 결실을 포함하는 핵산 서열 부위에 이중가닥절단(Double-stranded break, DSB)을 유도하여 세포를 사멸시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 벡터를 이용하여 절단인자를 도입하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 벡터는 AAV (Adeno-associated virus)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 유전자 변이된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 방법.

청구항 17

유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequenceing)을 수행하는 단계;

유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 변이 서열을 선별하는 단계;

상기 선별된 변이 서열을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계;

상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및

핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법.

청구항 18

유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequenceing)을 수행하는 단계;

유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 indel을 선별하는 단계;

상기 선별된 indel을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계;

상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및

핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 핵산절단효소는 제한효소 (restriction enzyme), ZNFN (zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease) 또는 Cas 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas3, Cas9, Cpf1, Cas6, 또는 C2c2인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 코리네박터(Corynebacter), 수테렐라(Sutterella), 레지오넬라(Legionella), 트레포네마(Treponema), 피리팩터(Filifactor), 유박테리움(Eubacterium), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 미코플라즈마(Mycoplasma), 박테로이드(Bacteroides), 플라비플라비볼라(Flaviivola), 플라보박테리움(Flavobacterium), 아조스피릴룸(Azospirillum), 글루코나세토박터(Gluconacetobacter), 나이세리아(Neisseria), 로세부리아(Roseburia), 파비바큐럼(Parvibaculum), 스탕필로코커스(Staphylococcus), 니트라티프랙터(Nitratifactor), 코리네박테리움(Corynebacterium) 및 캄필로박터(Campylobacter)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Cas 단백질의 오소로그(ortholog)를 포함하는 미생물 속으로부터 유래하고, 이들로부터 단순 분리된 것 또는 재조합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 절단인자는 서열번호 1 내지 163의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 유전자 변이된 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제17항 또는 제18항에 있어서, 정상세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 61 내지 90의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 암은 대장암이고, 대장암 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 1 내지 30의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 암은 골육종이고, 골육종 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 31 내지 60의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 암은 교모세포종이고, 교모세포종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 121 내지 136로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 폐암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제17항 또는 제18항에 있어서, 유전자 변이된 세포 고유의 삽입 및/또는 결실을 포함하는 핵산 서열 부위에 동시다발적 이중가닥절단(Double-stranded break, DSB)을 유도하여 세포를 사멸시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제17항 또는 제18항에 있어서,

Caffeine, Wortmannin, CP-466722, KU-55933, KU-60019, KU-559403으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATM (Ataxia telangiectasia mutated) 저해제,

Schisandrin B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20, AZD6738로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATR (Ataxia telangiectasia and Rad-3 mutated) 저해제, 또는

DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)의 DNA 이중나선 복구 저해제를 추가로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

핵산절단효소 및 환자의 암세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 환자 맞춤형 암 치료용 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 핵산절단효소는 제한효소 (restriction enzyme), ZNFN (zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease) 또는 Cas 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas3, Cas9, Cpf1, Cas6, C2c12 또는 C2c2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 코리네박터(Corynebacter), 슈테렐라(Sutterella), 레지오넬라(Legionella), 트레포넬라(Treponema), 필리팩터(Filifactor), 유박테리움(Eubacterium), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 미코플라스마(Mycoplasma), 박테로이드(Bacteroides), 플라비플라비이볼라(Flaviivola), 플라보박테리움(Flavobacterium), 아조스피릴럼(Azospirillum), 글루코나세토박터(Gluconacetobacter), 나이세리아(Neisseria), 로세부리아(Roseburia), 파비바큐럼(Parvibaculum), 스태필로코커스(Staphylococcus), 니트라티프랙터(Nitratifactor), 코리네박테리움(Corynebacterium) 및 캄필로박터(Campylobacter)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Cas 단백질의 오소로그(ortholog)를 포함하는 미생물 속으로부터 유래하고, 이들로부터 분리된 것 또는 재조합된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 절단인자는 서열번호 1 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 36

제31항에 있어서, 정상세포의 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 61 내지 90의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 37

제31항에 있어서, 상기 암은 대장암이고, 대장암 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 1 내지 30의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 38

제31항에 있어서, 상기 암은 골육종이고, 골육종 고유의 삽입(insertion) 및/또는 결실(deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 31 내지 60의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 39

제31항에 있어서, 상기 암은 교모세포종이고, 교모세포종 특이적 삽입(insertion) 및/또는 결실(deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 40

제31항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 폐암 특이적 삽입(insertion) 및/또는 결실(deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 41

제31항에 있어서, 상기 조성물은 유전자 변이된 세포 고유의 삽입 및/또는 결실을 포함하는 핵산 서열 부위에 이중가닥절단(Double-stranded break, DSB)을 유도하여 세포를 사멸시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 42

제31항에 있어서, 벡터를 이용하여 절단인자를 도입하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 벡터는 AAV인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산절단효소 및 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 조성물, 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 또는 유전체가 손상된 세포는 생물체 또는 생물의 기관이 살아가거나 작동하는데 있어 문제를 야기한다. 이러한 세포를 선택적으로 사멸을 유도하는 방법은 여러가지가 있을 수 있으나 대부분 정상세포까지 함께 손상을 주는 경우가 많기 때문에 임상적으로 사용하는데 문제점이 있는 것이 사실이다.

[0003] 유전자 또는 유전체가 손상된 세포로서 생물체의 생존이나 생물의 기관에 문제를 야기하는 가장 대표적인 것이 암 세포이다. DNA 손상(DNA damage)이 인간 전체 게놈에 비해 매우 적은 부분을 차지하더라도, DNA 손상이 원종양 유전자(proto-oncogene) 또는 억제유전자(suppressor gene)에 일어나게 되면 궁극적으로 암이 생길 가능성이 높아지게 된다. (Molecular Cell Biology. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman; 2000, "Section 12.4DNA Damage and Repair and Their Role in Carcinogenesis").

[0004] 암 특이적 변이에 대한 연구 및 분석은 암 치료제 개발의 주요 기반이라 할 수 있다. 예를 들어, 암 변이에 대한 연구를 통해 특이 유전적 변이를 타겟하는 치료제가 개발될 수 있었고, 변이 프로파일과 약물 반응성 사이의 상관성도 확인할 수 있었다.

[0005] 암은 유전자 변이의 축적에 의해 발생하고 이것은 생식세포를 통해 유전되거나 세포 주기동안 체세포 내에 획득되게 된다. 이러한 종양유전자, 종양억제유전자, DNA 복구 유전자들의 변화는 세포가 성장과 조절 메커니즘에서 벗어나 암을 발생시키도록 한다.

[0006] 이러한 과정에 의해 발생된 암에서는 정상세포에서 발견되지 않는 새로운 DNA 서열이 삽입되거나 (Insertion: IN), 정상세포의 DNA 일부가 잘려지는 (Deletion: Del) 현상이 다수 관찰된다. 이러한 암세포 DNA에 나타나는

특이적 삽입 또는 삭제 DNA(INDEL)는 정상세포에 존재하지 않는 DNA 서열이기 때문에 이들을 정상세포와 암세포의 차별적 공격 타겟으로 설정할 수 있다.

[0007] 한편, DNA 이중사슬절단은 세포 수준에서 가장 심각한 손상 중의 하나로, 손상된 DNA는 비상동 말단 연결(non-homologous end joining), 상동 재조합(homologous recombination)에 의해 복구되지만, 복구되지 못한 DNA는 유전 정보의 손상 또는 재배열을 일으켜 세포사(apoptosis)가 유도될 수 있다.

[0008] CRISPR/Cas는 RNA 가이드를 통한 유전자 교정 도구로, 박테리아 유도 엔도뉴클레아제 Cas9 (또는 돌연변이 니케이즈)와 가이드 RNA를 사용하여, 가이드 RNA와 게놈 DNA 사이의 서열을 매칭시켜, 게놈 내 특정 위치에 이중 (또는 단일) 가닥 브레이크를 도입할 수 있다. CRISPR/Cas 매개 유전자 녹아웃은 RNA 간섭 매개 유전자 녹다운(RNA interference-mediated gene knockdown) 보다 더 효율적인 것으로 예상되고, 유전자 기능을 연구하기 위한 유용한 실험 도구를 제공하고 있다.

[0009] 포유동물 세포에서 CRISPR-Cas 시스템이 작동할 수 있다는 연구들이 보고되었고, 미생물의 적응면역에서 비롯된 유전자 편집 기술은 Cas9(CRISPR associated protein 9 : RNA-guided DNA endonuclease enzyme) 및 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 포함한다. 가이드 RNA는 crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (*trans*-activating crRNA)를 포함하며, Cas9에 결합하여 타겟 서열에 대한 염기 쌍결합을 통해 목적하는 게놈 서열로 안내하여, 이중나선절단 (Double strand break, DSB)이 생성된다. 타겟 서열을 정의하는 유일한 기준은 PAM (protospacer adjacent motif)의 존재 여부로, PAM(protospacer adjacent motif)은 이를 인식하는 Cas 단백질에 따라 서열이 다른 특징이 있으며, 예를 들어, *S. pyogenes* 유래의 Cas9은 5'-NGG-3'(N은 A, T, G, C 중 하나); *S. thermophilus* 유래의 Cas9은 5'-NNAGAAW-3'; *C. jejuni* 유래의 Cas9은 5'-NNNNRYAC-3'로 알려져 있으며, 인간의 게놈 상에 상기 서열이 일정간격으로 배열되어 있기 때문에, 유전자 편집에 활용할 수 있다.

[0010] 한편, CRISPR/Cas 시스템을 인간의 암 치료에 적용할 수 있음이 보고되고 있다 (Oncotarget. 2016 Mar 15;7(11):12305-17). 그러나, 이는 암의 유발과 상관성 있는 복수의 유전자 변이에 기초하여, 게놈 중 하나 이상의 부분을 수정 또는 절제하는 것이 암에 대한 강력한 치료를 제공할 가능성을 높일 수 있음을 제시하고 있다.

[0011] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 모든 암세포와 같은 유전자 변이된 세포에는 유전자 변이된 세포 고유의 INDEL 서열이 있고, 이를 바탕으로 제작된 절단인자 및 핵산절단효소를 이용하여 특정 DNA 부위에 DSB (double strand break)를 유도하고, 세포 내에 여러군데의 DNA DSB가 일어나면 유전자 변이된 세포가 사멸될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 핵산절단효소 및 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도용 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 목적은 핵산절단효소 및 절단인자를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 목적은 핵산절단효소 및 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 방법을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 목적은 핵산절단효소 및 절단인자를 이용하여 암 치료방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 핵산절단효소 및 암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 유전자 변이된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 방법을 제공한다.

- [0019] 본 발명은 또한, 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequenceing)를 수행하는 단계;
- [0020] 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 변이 서열을 선별하는 단계;
- [0021] 상기 선별된 변이 서열을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계;
- [0022] 상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및
- [0023] 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한, 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequenceing)를 수행하는 단계;
- [0025] 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 indel을 선별하는 단계;
- [0026] 상기 선별된 indel을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계;
- [0027] 상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및
- [0028] 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명은 또한, 핵산절단효소 및 암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 더욱이, 핵산절단효소 및 암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 암 세포에 처리하는 것을 포함하는 암의 치료방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명은 더욱이, 핵산절단효소 및 환자의 암세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 환자 맞춤형 암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명은 더욱이, 환자의 암세포에서 암세포 특이적인 indel을 선별하고, 이를 인식하는 절단인자를 제조하여 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 환자에 전달하는 것을 포함하는 환자 맞춤형 암의 치료방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 DNA DSB (double strand break)가 동시 다발적으로 발생하였을 시 세포가 사멸되는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 가이드 RNA를 이용하여 CRIPSR 시스템에 의한 DNA의 절단이 이루어지는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 대장암과 골육종세포에 30개의 특위적 RNP (ribonucleotide protein) 복합체 (complex)를 형질감염 (transfection)하여 DNA DSB를 유도한 후 세포의 성장률을 콜로니 형성 어세이 (colony forming assay)를 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 면역형광 (immunofluorescence) 및 유세포분석 (flow cytometry)을 이용하여, AAV의 세포 감염율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 면역형광법을 통해 AAV 입자가 형질감염되었음을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 30개의 U2OS 세포주 특이적 crRNA를 사용하여 U2OS 특이적 crRNA 의존성 세포사멸 결과를 확인한 것이다.
- 도 7은 U2OS 세포 특이적 saCAS9 AAV 시스템 작동 여부, U2OS 세포에서 세포사멸 결과를 확인한 것이다.
- 도 8은 암 특이적 INDEL에 의한 세포사멸 기반 세포생존 비율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 AAV 의존성 세포사멸이 crRNA 특이적 세포주에서만 유도되는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 교모세포종에서 선택적 암세포 사멸이 일어나는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 ATM 카이네이즈 억제제를 포함하거나 포함하지 않는 AAV 입자를 사용하는 경우 세포사멸 효과 차이를

확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 폐암 특이적 INDEL 유도 세포사멸 (CINDELA) 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0035] 본 발명은 일 관점에서, 핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도용 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 핵산절단효소 및 암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 또한, 본 발명은 핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 고유의 변이 서열을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 유전자 변이된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도 방법에 관한 것이다.
- [0038] 상기 유전자 변이된 세포는 유전자 변형에 의해 세포의 활성이 정상세포와 다르게 된 세포를 의미하고, 예를 들어 유전자 변이에 의한 질환 발병 상태의 세포, 구체적으로 암세포를 의미할 수 있다.
- [0039] 상기 암은 예를 들어, 흑색종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 신경교종, 간암, 갑상선 종양, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 방광암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 교모세포종, 자궁내막암, 신장암, 결장암, 췌장암, 식도암종, 머리 및 목암, 중피종, 육종, 골육종, 담관암 또는 표피암 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 모든 암세포에는 정상세포에서 발견되지 않는 새로운 DNA 서열이 삽입되거나 (Insertion: IN), 정상세포의 DNA 일부가 잘려지는 (Deletion: Del) 현상이 다수 관찰되며, 각 암세포마다 특이적으로 삽입/결실된 DNA 서열이 존재할 수 있다.
- [0041] 세포는 DNA 이중나선이 절단되면, 이를 복구하려는 DNA 손상 복구 기작이 있다. 그러나, 이러한 손상 복구 기작은 DNA 이중나선 절단의 수가 적은 경우 효과적으로 복구하나, 그 수가 많아지면 사멸하게 된다. 박테리아의 경우 한 개의 DNA 이중나선 절단으로 박테리아가 사멸될 수 있으나, 동물 세포의 경우 그보다 많은 DSB가 필요하다고 알려져 있다.
- [0042] 본 발명에 따르면, 위 사실을 기초로 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포의 InDel을 찾아내어 이를 인식할 수 있는 절단인자를 제작하고, 핵산절단효소를 이용하여 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포 등을 특이적으로 사멸하도록 유도할 수 있다.
- [0043] 이러한 DNA 이중나선 절단의 수단인 핵산절단효소는 제한효소 (restriction enzyme), ZNFN (zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease) 또는 Cas 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Cas 단백질은 Cas3, Cas9, Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1), Cas6, C2c12 또는 C2c2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 Cas 단백질은 코리네박터(*Corynebacter*), 수테렐라(*Sutterella*), 레지오넬라(*Legionella*), 트레포네마(*Treponema*), 피리팩터(*Filifactor*), 유박테리움(*Eubacterium*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*: *Streptococcus pyogenes*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 미코플라스마(*Mycoplasma*), 박테로이드(*Bacteroides*), 플라비플라비이볼라(*Flaviivola*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 아조스피릴룸(*Azospirillum*), 글루코나세토박터(*Gluconacetobacter*), 나이세리아(*Neisseria*), 로세부리아(*Roseburia*), 파비바큐럼(*Parvibaculum*), 스탕필로코커스(*Staphylococcus*: *Staphylococcus aureus*), 니트라티프랙터(*Nitratifractor*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 및 캄필로박터(*Campylobacter*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Cas 단백질의 오소로그(ortholog)를 포함하는 미생물 속으로부터 유래하고, 이들로부터 단순 분리된 것 또는 재조합된 것일 수 있다.
- [0045] 다른 관점에서, 본 발명은 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequencing)을 수행하는 단계; 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 변이 서열을 선별하는 단계; 상기 선별된 변이 서열을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계; 상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이

된 세포 사멸 유도방법에 관한 것이다.

- [0046] 다른 관점에서, 본 발명은 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포와 정상세포의 WGS (whole genome sequencing)을 수행하는 단계; 유전자 변이된 세포와 정상세포의 WGS를 비교하여 유전자 변이된 세포 특이적인 indel을 선별하는 단계; 상기 선별된 indel을 인식하는 절단인자를 제조하는 단계; 상기 절단인자와 핵산절단효소를 결합하는 단계; 및 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 유전자 변이된 세포에 인가하는 단계를 포함하는 유전자 변이된 세포 사멸 유도방법에 관한 것이다.
- [0047] InDel의 매핑은 WGS (whole genome sequencing), 또는 차감 혼성화 (subtractive hybridization) 및 시퀀싱의 방법을 통하여 수행될 수 있고, 이 때 도출된 InDel의 경우 암에서 발견된 삽입의 경우에는 바로 가이드 RNA를 제작하고, 결실의 경우에는 절단 지점 (break point)을 매핑한 후에 절단 지점을 포함하는 가이드 RNA를 제작하여 사용할 수 있다.
- [0048] WGS는 차세대 시퀀싱 (next generation sequencing)에 의한 전장 유전체 시퀀싱을 10 X, 20 X, 40 X 형식으로 여러 배수로 유전체를 읽는 방법을 의미한다. "차세대 시퀀싱"은 칩 (Chip) 기반, 그리고 PCR 기반 페어드 엔드 (paired end) 형식으로 전장 유전체를 조각내고, 상기 조각을 화학적인 반응 (hybridization)에 기초하여 초고속으로 시퀀싱을 수행하는 기술을 의미한다.
- [0049] 차감 혼성화는 여러 조직 또는 세포 간에 발현의 차이가 있는 유전자의 클로닝에 이용되는 방법이다. 시험하는 세포의 DNA 시료 특이적 유전자가 검출될 수 있다. 시험하는 세포의 DNA를 한 가닥 DNA로 변성시킨 후에 어닐링 (annealing)시킨다. 어닐링 조건을 조절함으로써, 시험하는 세포 특이적 DNA 서열을 2 가닥 DNA로 분리할 수 있다.
- [0050] 유전자 변이된 세포의 한 종류인 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 예를 들어, InDel을 타겟으로 하여 핵산절단효소에 의해 핵산 서열 내 DNA의 DSB가 일어나는 유전자 부위를 의미하는 것으로, 핵산 서열 내 핵산절단효소가 특이적으로 인식하는 서열 예를 들어 핵산절단효소가 Cas9인 경우 Cas9 단백질이 인식하는 PAM 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 약 17bp 내지 23bp 길이의 핵산 서열을 의미할 수 있다.
- [0051] 유전자 변이된 세포인, 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 해당 서열 부위의 두 개의 DNA 가닥 중 PAM 서열이 위치하는 가닥의 핵산 서열로 표시된다. 이 때, 실제로 가이드 RNA가 결합하는 DNA 가닥은 PAM 서열이 위치하는 가닥의 상보적 가닥이므로, 상기 가이드 RNA에 포함된 표적화 서열은, RNA 특성상 T를 U로 변경하는 것을 제외하고, InDel을 포함하는 핵산 서열과 동일한 핵산 서열을 갖게 된다.
- [0052] 상기 Cas9 단백질이 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NGG-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0053] 상기 Cas9 단백질이 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNAGAAW-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0054] 상기 Cas9 단백질이 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNGRRT-3' (N은 A, T, G, 또는 C이고, R은 A 또는 G)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNGRRT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0055] 상기 Cas9 단백질이 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNNNRYAC-3' (N은 A, T, G, 또는 C이고, R은 A 또는 G 이고, Y는 C 또는 T임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 절단인자란, 정상세포와 비교하여 유전자 변이된 세포의 핵산서열 중에서 변이되어 달라진 부분을 인식하여 절단할 수 있도록 하는 염기서열을 말한다.
- [0057] 본 발명에서 상기 절단인자는 정상세포의 염기서열과 비교하여 세포의 사멸을 유도할 수 있는 충분한 숫자여야 하고, 바람직하게는 1개 내지 30개, 더욱 바람직하게는 10개 내지 30개, 더욱 바람직하게는 16개 내지 30개일

수 있으나, 세포의 종류나 절단인자에 따라 숫자가 달라질 수 있다.

- [0058] 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어 가이드 RNA일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 예를 들어, CRISPR RNA (crRNA), trans-activating crRNA (tracrRNA), 및 단일 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 구체적으로 crRNA와 tracrRNA가 서로 결합된 이중 가닥 crRNA:tracrRNA 복합체, 또는 crRNA 또는 그 일부와 tracrRNA 또는 그 일부가 올리고뉴클레오타이드 링커로 연결된 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있다.
- [0059] 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 PAM 서열이 위치하는 DNA 가닥의 상보적인 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것으로, 상기 상보적 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 결합 가능하다.
- [0060] 상기 가이드 RNA는 다음과 같은 단계를 통해 제작할 수 있다: 암 세포와 일반 세포의 WGS 결과 데이터를 비교하여 암세포 특이적인 InDel을 찾는다. 이를 바탕으로 가이드 RNA 제작 조건에 충족한 암 세포 특이적인 가이드 RNA를 설계한다. 그 후 InDel 사이트의 길이를 고려하여 임의적 순위를 부여하고 모든 염색체(chromosome)에 골고루 가이드 RNA가 설계될 수 있도록 하여 최종 가이드 RNA 조합을 완성한다.
- [0061] 가이드 RNA 제작 조건은 다음과 같다. (a) PAM 사이트를 제외한 가이드 RNA의 염기 서열 길이는 20염기쌍(base pair)이다. (b) 가이드 RNA에 존재하는 구아닌(guanine) 과 시토신 (cytosine)의 합 비율이 40%에서 60% 사이이다. (c) InDel이 PAM 사이트 근처 바로 앞 영역에 존재한다. (d) 최대 단일 중합체 (homopolymer) 길이가 4 염기쌍(base pair) 이하이다. (e) 일반 세포의 WGS 결과 데이터에 하나의 불일치(mismatch)를 허용하는 매핑 했을 때, 매핑 결과가 없어야 한다.
- [0062] 이를 바탕으로 제작된 상기 가이드 RNA는 예를 들어, 서열번호 1 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 암세포 사멸을 유도할 수 있는 가이드 RNA의 수는 구체적으로 약 1 내지 40여개, 약 15 내지 25개, 또는 약 10 내지 20개일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 예를 들어, 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 31 내지 60으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 61 내지 90으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 91 내지 120으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.
- [0063] 하나의 실시예에서, 상기 암은 대장암이고, 대장암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 1 내지 30의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0064] 하나의 실시예에서, 상기 암은 골육종이고, 골육종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 31 내지 60의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA 또는 서열번호 91 내지 120의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0065] 하나의 실시예에서, 정상세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 61 내지 90의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0066] 하나의 실시예에서, 상기 암은 교모세포종이고, 교모세포종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0067] 하나의 실시예에서, 상기 암은 폐암이고, 폐암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 실시예에 따르면, 대장암 세포주인 HCT116, 골육종 세포주인 U2OS, 교모세포종 세포주인 GBL-67, 폐암 조직 및 정상 세포를 immortalization 한 세포주 REP1 세포 각각에서 암 특이적 InDel을 확인하고, 이를 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 제작하여 DNA DSB를 유도한 후 세포 성장을 확인하였다. 구체적으로 대장암 세포주인 HCT116의 InDel을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 서열번호 1 내지 30의 서열을 포함하고, 골육종 세

포주인 U2OS의 InDel을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 서열번호 31 내지 60 또는 서열번호 91 내지 120의 서열을 포함하며, 교모세포종인 Glioblastoma의 InDel을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하고, 폐암 조직의 InDel을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 정상 세포주인 REP1의 InDel을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 서열번호 61 내지 90의 서열을 포함한다.

- [0069] 세포주 특이적인 InDel 을 전장유전체 해독(WGS)을 통해 확인한 이후, 해당 영역을 강하게 결합하는 PAM 사이트 영역에 포함하도록 가이드 RNA를 설계한다. 설계된 가이드 RNA는 정상을 대표하는 인간 표준 유전체에 확인하여 비특이적 반응이 없음을 확인한다. 그 이후 InDel 사이트의 길이를 고려하여 임의적 순위를 부여하고 이를 바탕으로 모든 염색체(chromosome)에 골고루 가이드 RNA 가 설계될 수 있도록 하여 최종 가이드 RNA 조합을 완성한다. 현재 실시예에서 30개의 가이드 RNA를 사용하였으나 이 숫자는 암세포의 종류 및 DSB를 일으키는 실험 방법에 따라 조정 가능하다.
- [0070] 본 발명에 따른 핵산절단효소 및 절단인자 예를 들어, 가이드 RNA는 (a) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질을 발현하는 핵산서열을 포함하는 벡터, (b) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질로 구성된 리보핵산단백질(Ribonucleoprotein, RNP) 또는 RGEN(RNA-guided engineered nuclease), 또는 (c) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질로 코딩되는 mRNA의 구성으로 세포 내에 전달될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 하나의 실시예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스 파코바이러스 (예컨대, 아데노관련 (adenoassociated) 바이러스 (AAV)), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스 (orthomyxovirus)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들 (예컨대 인플루엔자 바이러스), 램도바이러스 (rhabdovirus) 예컨대, 광견병 및 소포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스 (paramyxovirus) (예컨대, 홍역 및 센다이 (Sendai), 알파바이러스 (alphavirus) 및 피코르나바이러스 (picornavirus))와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및 헤르페스바이러스(예컨대, 단순포진(Herpes Simplex) 바이러스 타입들 1 및 2, 엡스타인 (Epstein)-바(Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus)), 아데노바이러스를 포함하는 이중-가닥의 DNA 바이러스들, 포스바이러스(poxvirus)(예컨대, 우두(vaccinia), 계두(fowlpox) 또는 카나리아두창 (canarypox)) 등일 수 있다.
- [0072] 상기 벡터는 각각 전기천공법 (electroporation), 리포펙션, 바이러스 벡터, 나노파티클 (nanoparticles) 뿐만 아니라, PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등을 통해 생체 내 또는 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0073] 경우에 따라서, DNA 이중나선절단을 통해 세포 사멸 효율을 높이고자 DNA 이중나선 복구를 저해하도록 예를 들어, Caffeine, Wortmannin, CP-466722, KU-55933, KU-60019, KU-559403으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATM (Ataxia telangiectasia mutated) 저해제, Schisandrin B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20, AZD6738로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATR (Ataxia telangiectasia and Rad-3 mutated) 저해제, 또는 DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)의 DNA 이중나선 복구 저해제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명은 핵산절단효소 및 암 세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 핵산절단효소 및 암 세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법에 관한 것이다.
- [0075] 또한, 본 발명에 따르면 환자의 암세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자 및 핵산절단효소를 포함하는 환자 맞춤형 암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0076] 환자 맞춤형은 환자 고유의 특성 또는 환자의 질병 특성을 충분히 반영하여, 효과적으로 암을 치료할 수 있음을 의미한다. 환자 맞춤형 암 치료용 조성물을 통해 치료제의 선별 및 치료 방법의 선택 등에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0077] 상기 유전자 변이된 세포는 유전자 변형에 의해 세포의 활성이 정상세포와 다르게 된 세포를 의미하고, 예를 들어 유전자 변이에 의한 질환 발병 상태의 세포, 구체적으로 암세포를 의미할 수 있다.
- [0078] 상기 암은 예를 들어, 흑색종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 신경교종, 간암, 갑상선 종양, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 방광암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 교모세포종, 자궁내막암, 신장암, 결장암, 췌장암,

식도암종, 머리 및 목암, 중피종, 육종, 골육종, 담관암 또는 표피암 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0079] 모든 암세포에는 정상세포에서 발견되지 않는 새로운 DNA 서열이 삽입되거나 (Insertion: IN), 정상세포의 DNA 일부가 잘려지는 (Deletion: Del) 현상이 다수 관찰되며, 각 암세포마다 특이적으로 삽입/결실된 DNA 서열이 존재할 수 있다.
- [0080] 세포는 DNA 이중나선이 절단되면, 이를 복구하려는 DNA 손상 복구 기작이 있다. 그러나, 이러한 손상 복구 기작은 DNA 이중나선 절단의 수가 적은 경우 효과적으로 복구하나, 그 수가 많아지면 사멸하게 된다. 박테리아의 경우 한 개의 DNA 이중나선 절단으로 박테리아가 사멸될 수 있으나, 동물 세포의 경우 그보다 많은 DSB가 필요하다고 알려져 있다.
- [0081] 본 발명에 따르면, 위 사실을 기초로 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포의 InDel을 찾아내어 이를 인식할 수 있는 절단인자를 제작하고, 핵산절단효소를 이용하여 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포 등을 특이적으로 사멸하도록 유도할 수 있다.
- [0082] 이러한 DNA 이중나선 절단의 수단인 핵산절단효소는 제한효소 (restriction enzyme), ZNFN (zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease) 또는 Cas 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Cas 단백질은 Cas3, Cas9, Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1), Cas6, C2c12 또는 C2c2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 상기 Cas 단백질은 코리네박터(*Corynebacter*), 슈테렐라(*Sutterella*), 레지오넬라(*Legionella*), 트레포네마(*Treponema*), 피리팩터(*Filifactor*), 유박테리움(*Eubacterium*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*: *Streptococcus pyogenes*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 미코플라즈마(*Mycoplasma*), 박테로이드(*Bacteroides*), 플라비볼라비이볼라(*Flaviivola*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 아조스피릴룸(*Azospirillum*), 글루코나세토박터(*Gluconacetobacter*), 나이세리아(*Neisseria*), 로세부리아(*Roseburia*), 파비바큐럼(*Parvibaculum*), 스탕필로코커스(*Staphylococcus*: *Staphylococcus aureus*), 니트라티프랙터(*Nitratifractor*), 코리네박터리움(*Corynebacterium*) 및 캄필로박터(*Campylobacter*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Cas 단백질의 오소로그(ortholog)를 포함하는 미생물 속으로부터 유래하고, 이들로부터 단순 분리된 것 또는 재조합된 것일 수 있다.
- [0084] 유전자 변이된 세포의 한 종류인 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 예를 들어, InDel을 타겟으로 하여 핵산절단효소에 의해 핵산 서열 내 DNA의 DSB가 일어나는 유전자 부위를 의미하는 것으로, 핵산 서열 내 핵산절단효소가 특이적으로 인식하는 서열 예를 들어 핵산절단효소가 Cas9인 경우 Cas9 단백질이 인식하는 PAM 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 약 17bp 내지 23bp 길이의 핵산 서열을 의미할 수 있다.
- [0085] 유전자 변이된 세포인, 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 해당 서열 부위의 두 개의 DNA 가닥 중 PAM 서열이 위치하는 가닥의 핵산 서열로 표시된다. 이 때, 실제로 가이드 RNA가 결합하는 DNA 가닥은 PAM 서열이 위치하는 가닥의 상보적 가닥이므로, 상기 가이드 RNA에 포함된 표적화 서열은, RNA 특성상 T를 U로 변경하는 것을 제외하고, InDel을 포함하는 핵산 서열과 동일한 핵산 서열을 갖게 된다.
- [0086] 상기 Cas9 단백질이 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NGG-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NGG-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0087] 상기 Cas9 단백질이 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNAGAAW-3' (N은 A, T, G, 또는 C임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNAGAAW-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0088] 상기 Cas9 단백질이 스탕필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNGRRT-3' (N은 A, T, G, 또는 C이고, R은 A 또는 G)이고, 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNGRRT-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.
- [0089] 상기 Cas9 단백질이 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 유래의 것인 경우, 상기 PAM 서열은 5'-NNNNRYAC-3' (N은 A, T, G, 또는 C이고, R은 A 또는 G 이고, Y는 C 또는 T임)이고, 유전자 변이된 세포 고유의

InDel을 포함하는 핵산 서열은 서열 내 5'-NNNNRYAC-3' 서열의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 유전자 부위로서, 예컨대, 최대 길이가 약 50bp 또는 약 40bp인 유전자 부위일 수 있다.

- [0090] 본 발명에서 절단인자란, 정상세포와 비교하여 유전자 변이된 세포의 핵산서열 중에서 변이되어 달라진 부분을 인식하여 절단할 수 있도록 하는 염기서열을 말한다.
- [0091] 본 발명에서 상기 절단인자는 정상세포의 염기서열과 비교하여 세포의 사멸을 유도할 수 있는 충분한 숫자여야 하고, 바람직하게는 1개 내지 30개, 더욱 바람직하게는 10개 내지 30개, 더욱 바람직하게는 16개 내지 30개일 수 있으나, 세포의 종류나 절단인자에 따라 숫자가 달라질 수 있다.
- [0092] 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어 가이드 RNA일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 예를 들어, CRISPR RNA (crRNA), trans-activating crRNA (tracrRNA), 및 단일 가이드 RNA (single guide RNA; sgRNA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 구체적으로 crRNA와 tracrRNA가 서로 결합된 이중 가닥 crRNA:tracrRNA 복합체, 또는 crRNA 또는 그 일부와 tracrRNA 또는 그 일부가 올리고뉴클레오타이드 링커로 연결된 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있다.
- [0093] 유전자 변이된 세포 고유의 InDel을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 가이드 RNA는 PAM 서열이 위치하는 DNA 가닥의 상보적인 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것으로, 상기 상보적 가닥의 뉴클레오타이드 서열과 결합 가능하다.
- [0094] 상기 가이드 RNA는 다음과 같은 단계를 통해 제작할 수 있다: 암 세포와 일반 세포의 WGS 결과 데이터를 비교하여 암세포 특이적인 InDel을 찾는다. 이를 바탕으로 가이드 RNA 제작 조건에 충족한 암 세포 특이적인 가이드 RNA를 설계한다. 그 후 InDel 사이트의 길이를 고려하여 임의적 순위를 부여하고 모든 염색체(chromosome)에 골고루 가이드 RNA가 설계될 수 있도록 하여 최종 가이드 RNA 조합을 완성한다.
- [0095] 가이드 RNA 제작 조건은 다음과 같다. (a) PAM 사이트를 제외한 가이드 RNA의 염기 서열 길이는 20염기쌍(base pair)이다. (b) 가이드 RNA에 존재하는 구아닌(guanine) 과 시토신 (cytosine)의 합 비율이 40%에서 60% 사이이다. (c) InDel이 PAM 사이트 근처 바로 앞 영역에 존재한다. (d) 최대 단일 중합체 (homopolymer) 길이가 4 염기쌍(base pair) 이하이다. (e) 일반 세포의 WGS 결과 데이터에 하나의 불일치(mismatch)를 허용하는 매핑 했을 때, 매핑 결과가 없어야 한다.
- [0096] 이를 바탕으로 제작된 상기 가이드 RNA는 예를 들어, 서열번호 1 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 암세포 사멸을 유도할 수 있는 가이드 RNA의 수는 구체적으로 약 1 내지 40여개, 약 15 내지 25개, 또는 약 10 내지 20개일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 예를 들어, 서열번호 1 내지 30으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 31 내지 60으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 61 내지 90으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 91 내지 120으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 서열, 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.
- [0097] 하나의 실시예에서, 상기 암은 대장암이고, 대장암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 1 내지 30의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0098] 하나의 실시예에서, 상기 암은 골육종이고, 골육종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 31 내지 60의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA 또는 서열번호 91 내지 120의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0099] 하나의 실시예에서, 정상세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 서열번호 61 내지 90의 서열으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0100] 하나의 실시예에서, 상기 암은 교모세포종이고, 교모세포종 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 121 내지 136으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0101] 하나의 실시예에서, 상기 암은 폐암이고, 폐암 특이적 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는

핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자는 예를 들어, 서열번호 137 내지 163로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 가이드 RNA일 수 있다.

[0102] 본 발명에 따른 핵산절단효소 및 절단인자 예를 들어, 가이드 RNA는 (a) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질을 발현하는 핵산서열을 포함하는 벡터, (b) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질로 구성된 리보핵산단백질(Ribonucleoprotein, RNP) 또는 RGEN(RNA-guided engineered nuclease), 또는 (c) 하나 이상의 가이드 RNA 및 핵산절단효소 예를 들어 Cas 단백질로 코딩되는 mRNA의 구성으로 세포 내에 전달될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 하나의 실시예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스 파코바이러스 (예컨대, 아데노관련 (adenoassociated) 바이러스 (AAV)), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스 (orthomyxovirus)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들 (예컨대 인플루엔자 바이러스), 램도바이러스 (rhabdovirus) 예컨대, 광견병 및 소포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스 (paramyxovirus) (예컨대, 홍역 및 센다이 (Sendai), 알파바이러스 (alphavirus) 및 피코르나바이러스 (picornavirus))와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및 헤르페스바이러스(예컨대, 단순포진(Herpes Simplex) 바이러스 타입들 1 및 2, 엡스타인 (Epstein)-바(Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus)), 아데노바이러스를 포함하는 이중-가닥의 DNA 바이러스들, 포스바이러스(poxvirus)(예컨대, 우두(vaccinia), 계두(fowlpox) 또는 카나리아두창 (canarypox)) 등일 수 있다.

[0104] 상기 벡터는 각각 전기천공법 (electroporation), 리포펙션, 바이러스 벡터, 나노파티클 (nanoparticles) 뿐만 아니라, PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등을 통해 생체 내 또는 세포 내로 전달될 수 있다.

[0105] 경우에 따라서, DNA 이중나선절단을 통해 세포 사멸 효율을 높이고자 DNA 이중나선 복구를 저해하도록 예를 들어, Caffeine, Wortmannin, CP-466722, KU-55933, KU-60019, KU-559403으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATM (Ataxia telangiectasia mutated) 저해제, Schisandrin B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20, AZD6738로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 ATR (Ataxia telangiectasia and Rad-3 mutated) 저해제, 또는 DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)의 DNA 이중나선 복구 저해제를 추가로 포함할 수 있다.

[0106] 더욱이, 본 발명에 따르면 환자의 암세포에서 암세포 특이적인 indel을 선별하고, 이를 인식하는 절단인자를 제조하여 핵산절단효소와 절단인자를 포함하는 조성물을 환자에 전달하는 것을 포함하는 환자 맞춤형 암의 치료방법에 관한 것이다.

[0107] 본 발명의 조성물, 방법 및 용도는 이를 필요로 하는 대상체에 충분량 또는 유효량으로 투여될 수 있다. '유효량' 또는 '충분량'은 단일 또는 다중 용량으로 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료용 조성물, 프로토콜, 또는 치료 요법과 조합되어 임의의 기간 동안 대상체에 이로움을 주거나 대상체에 예상되거나 요망되는 결과를 제공하는 양을 나타낸다. 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 투여 시간, 투여 경로, 배출 속도, 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0108] 핵산절단효소 및 유전자 변이된 세포 예를 들어, 암 세포 고유의 삽입 (insertion) 및/또는 결실 (deletion)을 포함하는 핵산 서열을 특이적으로 인식하는 절단인자의 발현 카세트를 포함하는 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 또는 아그로박테리움 벡터가 전달을 위해 사용될 수 있다. 구체적으로, 바이러스 벡터인 AAV (Adeno-associated virus) 벡터가 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0109] 치료학적 효과를 달성하기 위한 AAV 벡터 용량은 벡터 유전체 용량/체중kg(vg/kg)로 제공될 수 있으나, (a) 투여 경로, (b) 치료학적 효과를 달성하는데 요구되는 치료 유전자의 발현 수준, (c) AAV 벡터에 대한 임의의 숙주 면역 반응, (d) 발현된 단백질의 안정도와 같은 요건에 따라 변동될 수 있다.

[0110] 실시예

[0111] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0112] 실시예 1. DSB에 따른 세포사멸 효과 확인

[0113] 수 개의 DSB가 세포사멸을 유도할 수 있고, 모든 암세포는 고유의 In/DeI 서열을 가지는 것을 바탕으로,

HCT116, U2OS, 및 REP1 세포에서 고유의 In/Del 서열을 WGS (whole genome sequencing)를 통해 확인하였다. 이후 다음 표 1 내지 표 3과 같이 암세포가 가지고 있는 고유의 DNA 삽입 (insertion) 서열들 중 예 6~8bpdml 삽입 크기로 염색체 상에 고루 퍼져있는 부위를 30개 선정하여 세포주별 crRNA를 제작하였고, CRISPR RNP 복합체로 세포로 형질감염시킨 다음 crRNA 특이성 및 세포 생존도를 확인하였다.

[표 1]

SEQ ID NO.	name	Sequence (5'-3')
1	HCT116 1	AGCCCTAGAATTCCTTCAC
2	HCT116 2	CTTCTCCACCAATTGGTGTT
3	HCT116 3	GTTTTGTCTCATTATCACGC
4	HCT116 4	CTGTGTTTATGGTGCTTTGT
5	HCT116 5	TGTAAGAAGGCCGAATCACG
6	HCT116 6	TCCTATACGGCTCTACCAGT
7	HCT116 7	GTCTAAAGGTTAGAAATCCG
8	HCT116 8	GAGACTGCTATCAGTCATGT
9	HCT116 9	TTTTGGTCAAGAGCAGAGGA
10	HCT116 10	TGTGTGCCGTAATATGGGAA
11	HCT116 11	TGACCTTCTGAGTTCCTTAT
12	HCT116 12	GTTTGTGCATACCAGTCAAAG
13	HCT116 13	ACACAGGACCAGAAACCCTG
14	HCT116 14	ACTCTTCCAGTTGTTCACTG
15	HCT116 15	GTGCATTTCTCTGCTGAGTC

16	HCT116 16	TATATATCTGCAGGATCTGC
17	HCT116 17	TCTCTTGCTGTAGAGTGCGT
18	HCT116 18	ACACCTGCTTCAGGTGTGTG
19	HCT116 19	CATTTAAAAGGATGCCAGCA
20	HCT116 20	CTGATACTTCTGATACCAGA
21	HCT116 21	G TTCAGCCTGAGTTTGGAGT
22	HCT116 22	AGAGATACAGAAGTCCCTGT
23	HCT116 23	AGATGTGTAAGGTTGCAACA
24	HCT116 24	GAACCACAGAACCTGGCATA
25	HCT116 25	TGACCTTTCACAAAGGCCCA
26	HCT116 26	GCCTCAGGGGAATGGAGATA
27	HCT116 27	TTTGCTACTTTGCTAGGTTT
28	HCT116 28	AGGGAGCTCAGAGTCTTGTG
29	HCT116 29	CTCCTTCCCTTCCTGAGTTT
30	HCT116 30	GTGTGAGTGAGAGAGAAAGA

[0116]

[0117] [표 2]

SEQ ID NO.	name	Sequence (5'-3')
31	U2OS 1	TTATCCAATCAGCTATGGCC
32	U2OS 2	GCTTCACTGGCTTCACTGGA
33	U2OS 3	ATTTGTACAGTCTGCTTACT
34	U2OS 4	GCATCTTCAACAGGTGATTC
35	U2OS 5	TTCAAGCATTTCAATGCAG
36	U2OS 6	TTCTCTCTGTGCTTCTTGA
37	U2OS 7	TGGCCCTTGTGGCAGTTTAG
38	U2OS 8	ATGGGATTAATGGGATTGCT
39	U2OS 9	TCATACAGAGAAAGCAGGGC
40	U2OS 10	TCATCTCATGTCTTCTCATG
41	U2OS 11	GACAGAACCCAAGTAATTTC
42	U2OS 12	TTATGCCATCTGGTCCAGGC
43	U2OS 13	CCAGACATACTAGGCATC
44	U2OS 14	TCCCGTGAGGCATTCTGTAC
45	U2OS 15	ATTCTTCGTGCTGATGTACC

[0118]

46	U20S 16	ACAATCTGTCCAGAGGCCAA
47	U20S 17	GTGAAGGGCAAGCAAGGACA
48	U20S 18	TGATATGGCATAGCGATCAT
49	U20S 19	TAACAGCCATGTGGTGTAC
50	U20S 20	GGAAACAGCAGCAGTGCACA
51	U20S 21	CAGGGCTAGACCTTCGTTAT
52	U20S 22	ATGCAGTGTAGCATGGGGAG
53	U20S 23	AGTCTTTGGACAAGATGCCC
54	U20S 24	GAAGAAAGAGAAGAGGGCTT
55	U20S 25	AGCACTTTTATCTCACCTA
56	U20S 26	ACTGCCTGGGGTTTTCCCTT
57	U20S 27	GTGTCAACAGGGTCACTCTG
58	U20S 28	AATTTGCTTTGGAAGGACCT
59	U20S 29	AGATTCCAGAGTGATGGAAT
60	U20S 30	AGAGATACAGGAGTCCCTGT

[0119]

[0120] [표 3]

SEQ ID NO.	name	Sequence (5'-3')
61	RPE1	GAGTAATAAGTCTGCTCTTT
62	RPE2	ACTTTGAGGACCTTGAGGAA
63	RPE3	ACTGTGGGAACTGTGGGAGA
64	RPE4	CAGGCATATTTCCCATGTA
65	RPE5	ATGTGATGCTGGAGAGAAAT
66	RPE6	GGGGTTAGTTTGTGTTAACT
67	RPE7	ACTTACATCACAGGCATCAC
68	RPE8	ATGCCAGATTCTTCCCAGTG
69	RPE9	ACGAACTGTTGGGTGGTGCT
70	RPE10	TTAATCGAGCACATGCAGG
71	RPE11	TGATGGATCTGATGGATACT
72	RPE12	AAGAAGGGCTGGTTTGTCT
73	RPE13	ACCTGCAGGAACTGAAACAA
74	RPE14	TTGACTCCCATGGTAACCTG
75	RPE15	ATGAGGTTACTCAGAGCCAG

[0121]

76	RPE16	CACTTGAGTTCAGGAGAGCT
77	RPE17	CTTCACTTCCCTCCTTCCA
78	RPE18	CACTGCCCTCAAGTCCTTAC
79	RPE19	CAAACCTACCAAATGTCCAC
80	RPE20	TTCTTTGGTTGTGGTGGTTG
81	RPE21	TAGTGTTGGGGCATAACACC
82	RPE22	GTGGCATTGGAGTCCATGA
83	RPE23	CTCAGTACTTGGTCTCCTGT
84	RPE24	ACCTCTTGAGGGGTAACAAA
85	RPE25	CCCTGAATACTGAGCAAAGC
86	RPE26	GGGCAAGTGTGTGAAGTGTG
87	RPE27	ACACAGTAAAGACCCAAGTA
88	RPE28	TGTACATTCCAGGTTCTTC
89	RPE29	TTGGCCAGCTTGTCTTGAGT
90	RPE30	GGCCAAGATTGCATCCAGTC

[0122]

[0123]

먼저 DNA DSB가 동시 다발적으로 발생하였을지 세포가 사멸되는지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. AsiSI 제한효소에 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor)의 도메인을 삽입하여 만든 세포에 4-OHT (tamoxifen)을 처리하였을 때 세포의 사멸을 확인하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0124]

AsiSI 제한효소는 4-OHT을 처리하게 되면 핵 안으로 들어가 특정 서열을 인식하여 DNA DSB (double strand break)를 만들며, 대략 100개의 DSB가 만들어지게 된다. DSB의 생성에 따른 세포 생존률을 콜로니 형성 어세이 (colony forming assay)를 통하여 확인하였다. 200개의 세포를 시딩 (seeding)한 후 2일 뒤부터 4-OHT를 주기적으로 처리(2-3일에 한번씩 배양 배지에 처리)하여 DSBs를 만들어주고 2주 뒤에 콜로니가 형성되는지를 메틸렌 블루 염색 (methylene blue staining)을 통해 확인하였다. 또한, 세포마다 콜로니의 크기가 다르기 때문에 염색한 샘플들을 탈염색 (destain)하여 상대적 세포 생존도(relative cell survival)도 확인했을 때 염색시 확인한 결과와 유사한 것을 알 수 있었다.

[0125]

실시예 2. CRISPR system의 in vitro 작동 여부 확인

[0126]

실시예 1에서 제작된 crRNA를 이용하여 CRISPR 시스템이 작동하는지 여부를 알아보기 위하여 in vitro 절단 어세이(cleavage assay)를 수행하였다. 먼저 PCR을 통하여 삽입 서열 (insertion sequence)의 앞뒤 부분의 DNA를 500bp 크기로 증폭하고 정제 후, 제작된 crRNA를 이용하여 CRISPR 시스템에 의한 DNA의 절단이 이루어 지는지 확인하였다.

[0127] RPE1, U2OS, HCT116 세포들에서 genomic DNA를 Qiaamp DNA mini kit를 이용하여 추출하였으며 guide RNA를 중심으로 약 500bp 길이가 되도록 하는 양방향의 primer를 주문제작 하였다. iProof High-Fidelity DNA polymerase를 이용하여 annealing 온도를 맞추어 genomic DNA를 증폭한 후 1% agarose gel에서 증폭된 DNA를 절단 한 후 Qiagen QIAquick gel extraction kit를 이용하여 extraction을 시행하였다.

[0128] 10uM crRNA와 tracerRNA complex를 만들기 위해 95℃ 5분간 둔 후 상온에서 열이 증발될 때까지 기다린다. 그 후 RNP complex를 생성하기 위해 crRNA:tracerRNA complex와 Cas9 Nuclease를 1uM 농도로 PBS를 이용하여 맞춘 후 상온에서 10분간 incubation 한다.

[0129] 10X Cas9 Nuclease Reaction Buffer(200mM HEPES, 1M NaCl, 50mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 6.5), 1uM Cas9 RNP, 100nM DNA substrate, Nuclease-Free Water를 혼합하여 37℃ 3시간 동안 digestion reaction을 한다. 세 시간후 Cas9 endonuclease로부터 DNA substrate를 release하기 위해 20mg/ml Proteinase K 1ul 첨가 후 56℃ 10분간 incubation 한다. cleaved된 genomic DNA를 1% agarose gel에서 확인하였다.

[0130] [표 4]

1. crRNA:tracerRNA complex	Amount (μL)
10 μM Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA	10
100 μM Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA	1
Total volume	100

[0131]

[0132] [표 5]

2. RNP complex	Amount (μL)
9uM Complexed crRNA:tracrRNA	11
Cas9 enzyme [1 μM]	1.4
PBS	77.6
Total volume	90

[0133]

[0134] [표 6]

3. Digestion	Amount (μL)
10XCas9 Nuclease Reaction Buffer	1
1uM cas9 RNP	2
100nM DNA substrate	2
Nuclease-Free Water	5
Total volume	10

[0135]

[0136] 그 결과를 도 2에 나타내었으며, 아가로스 겔상에서 원래의 500bp 크기와 300bp 크기의 두 DNA 절편이 확인되었

다. 이를 통하여, 제작된 crRNA를 이용한 CRISPR 시스템이 잘 작동되고 있음을 확인하였다.

[0137] **실시예 3. DNA DSB 유도 후 세포의 성장률 확인**

[0138] 대장암 HCT116 세포와 골육종 U2OS 세포에 30개의 특위적 RNP (ribonucleotide protein) 복합체를 형질감염하여 DNA DSB를 유도한 후 세포의 성장률을 콜로니 형성 어세이 (colony forming assay)를 통하여 확인하였다.

[0139] 각각 500개와 1000개의 세포를 분주한 후 세포주별 특이적 RNP 복합체를 형질감염하였다. U2OS 세포들은 60mm 디시에 1000개, HCT 116 세포들은 500개 분주한 후 이를 동안 안정화시킨 후 guide RNA 형질전환할 준비를 한다. 1uM crRNA와 1uM tracerRNA 복합체를 만들기 위해 95℃ 5분간 둔 후 상온에서 열이 증발될 때까지 기다린다. 그 후 RNP 복합체를 생성하기 위해 96well 디시에 1uM crRNA:tracerRNA 복합체 1.5ul와 1uM Cas9 Nuclease 1.5ul, Opti-MEM media 22ul를 상온에서 5분간 반응한다. 25ul volume의 RNP 복합체 30개와 RNAimax transfection reagent 1.2ul의 30배, Opti-MEM 배지 23.8ul 30배로 총 볼륨 1.5ml를 20분간 상온에서 두어 형질전환 복합체를 만든다. 또한, 세포주별 특위적 crRNA를 이용한 DSB의 유도가 다른 세포주에서는 야기되지 않는다는 것을 확인하기 위하여 대장암세포에 골육종세포 고유의 RNP 복합체를 형질감염하였고 마찬가지로 골육종 세포에 대장암 고유의 RNP 복합체를 형질감염하였다. 이때 세포내의 DSB 복구 시스템 (DSB repair system)을 억제하기 위하여 ATM 저해제 (inhibitor)인 2uM KU 55933을 함께 처리하였다. 이후 세포의 성장을 관찰하며 3일마다 배지를 바꾸어주며 ATM 저해제를 함께 처리해 주었다. 2주 후 메틸렌 블루 (methylene blue) 염색을 통하여 세포의 성장을 확인하였다. Stain된 colony들은 Image J 프로그램을 통하여 colony 개수와 area를 서로 비교하여 결과를 정리한다.

[0140] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 각각의 세포주에 고유한 RNP 복합체를 형질감염한 실험군에서는 DSB에 의해 세포가 거의 사멸한 것을 확인할 수 있었고, 특이적 RNP 복합체는 다른 세포주에서는 DSB를 야기하지 않아 세포가 계속해서 성장하는 것을 확인하였다.

[0141] 다만 골육종에서는 대장암 특위적 RNP 복합체를 형질감염하였을 때 세포의 성장이 어느 정도 저해되는 현상이 보였다. 이는 많은 양의(30개) 형질감염에 의해 세포의 성장이 저해된 것으로 고려된다. 이를 보완하고 세포사멸을 위한 최소한의 RNP 복합체를 정하기 위하여 HCT116 및 U2OS gRNA를 RPE1 세포에 형질감염시켜 crRNA 특이도를 확인할 것이고, 최소 gRNA 수를 각 암세포당 20개 정도로 적정화시킬 것이다.

[0142] **실시예 4. 암 특이적 INDEL에 의한 세포사멸 (Cancer specific INsertion-DEletions induced Apoptosis: CINDELA) 효과 확인**

[0143] WGS (whole genome sequencing)를 통해, saCas9에 대한 신규한 U2OS 세포주 특이적 crRNA를 설계하여 AAV에 패키징하였다. U2OS 세포주 특이적 crRNA의 구체적 서열은 다음과 같다.

[0144] [표 7]

Numbering	Target Chromosome#	Forward Sequence
91	Chromosome #05	TACCTATGCCTCATGTAGAAA
92	Chromosome #13	ATCGTCAGGTTCTGGGACCGT
93	Chromosome #03	CAGAAGAGAGAGAGTAGTAGA
94	Chromosome #02	GAATGTTTAAGGTATAGTTTA
95	Chromosome #03	TGTTTCAGCAGGGGTTGAAGC
96	Chromosome #04	CTATACCCTAGACTTATTCCT
97	Chromosome #06	GTTTCTTTCTACAGAATAGAG
98	Chromosome #01	ATAGGTTAACAAAGATATTCA
99	Chromosome #04	CTACAAAATAGGTGACATAAC
100	Chromosome #05	TTAAATGGCGCAAATAAATT
101	Chromosome #05	TTTTATGAGTCTGCCAGGAAT
102	Chromosome #05	GAAGAAACAATTTCACTGGG
103	Chromosome #01	CAGGAAGGGAGCTAGTGAGCT
104	Chromosome #05	CCTCTCCTGCTGATGATCCCC
105	Chromosome #01	TGGGCCGCGACGTGTGAGTGCC
106	Chromosome #04	AGGAAACAAGCCCATGTTCCC
107	Chromosome #05	CATGGCAGAAAACAGAAGACA
108	Chromosome #05	AACAGTCTCTGTGATAGGGCA
109	Chromosome #05	GGGAAAATCAGACGGATATTC
110	Chromosome #06	ATTTCTGTTCTTCCCTCACTT
111	Chromosome #06	TAATAACTGTGTAGTTATAAC

[0145]

112	Chromosome #05	G TTCAGATTAGCTCTTAACTA
113	Chromosome #07	TAAACTTCCTATTTATTGTCT
114	Chromosome #07	ATAACTAATGCCAGGGTGAGT
115	Chromosome #01	CTCCACGCCGGTAGGGTTAGA
116	Chromosome #01	AGTTTGTAGTGTCTTTCCAGA
117	Chromosome #04	TATTTTCCAGATGTTCCAATA
118	Chromosome #05	GACTATGAGACTACTACTGCA
119	Chromosome #06	CCTTAGCCTCCTTTTCACACA
120	Chromosome #01	AGAGAAGAGAAAATAGGGGAA

[0146]

[0147]

면역형광 (immunofluorescence) 및 유세포분석 (flow cytometry)을 이용하여, AAV의 세포 감염율을 측정하였다. HA 세포내 염색은 60mm dish에 0.1M 세포를 포함하고 (0 day), HA 포함하지 않거나, 0.25ml, 0.5ml, 1ml HA를 포함하여 AAV를 감염시키고 (2day), 세포를 수확한 다음 염색하였다 (3day). HA (1:300)는 2 시간 실온 조건, 마우스 488 (1:500)은 1시간 실온 조건에서 두고, Rnase A 37℃ 30min 조건, PI 실온 10min

조건에 두었다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 핵 HA 태그 양성 세포의 비율은 1일차에 약 80% 정도로 나타났고, 비율은 2일 및 3일차에 부가적으로 감소하였다.

[0148] 8×10^4 U2OS 세포 웰을 챔버 슬라이드에 파종하여 하룻밤 성장시켰다. 세포를 차가운 PBS (ice-cold PBS)로 2회 세척하였다. 1ml의 차가운 투과 용액 (CSK 버퍼 + 0.5 % Triton X-100)를 10 분간 적용하였다. 세포를 1ml의 차가운 PBS로 2회 세척 하였다. PBS에 4 % paraformaldehyde 500 μ l를 사용하여 실온에서 15 분간 세포를 고정하였다.

[0149] 정착액을 제거하고, 1ml의 100 % 메탄올을 첨가한 다음, -20°C 10 분 동안 인큐베이션 하였다. 세포를 1ml PBS로 2회 세척하였다.

[0150] PBS에 10% FBS 500 μ l로 30분간 차단하고, 차단 용액을 제거한 다음 적절한 1차 항체를 1 시간 동안 차단 용액에 추가하였다. 세포를 PBS 중 0.05 % Triton X-100으로 5 분간 3 회 세척하였다. 암조건에서 실온 30 분간 2차 항체를 가한 후, PBS에 0.05% Triton X-100 세포를 5 분간 3 회 세척하고 PBS 및 DW에 추가 세척 공정을 실시했다. 주위의 챔버는 슬라이드에서 제거하였다.

[0151] 마운팅 시약 (mounting reagent)을 한방울씩 각 샘플에 도포하고, 커버 유리로 덮었다. 그 상태로 건조하고, 슬라이드를 완전히 밀폐하였다. LSM 880 (ZEISS) 및 ZEN 소프트웨어 (ZEISS)를 사용하여 초점을 감지하고 시각화하였다.

[0152] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 면역형광법을 통해 AAV 입자가 충분히 형질감염되었고, 표 7의 crRNA는 DNA DSB에 해당하는 rH2AX 포커스를 생성할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0153] 30개의 U2OS 세포주 특이적 crRNA를 사용하여, saCAS9 AAV 시스템을 개발하였고, AAV 입자를 U2OS 세포에 형질 도입하였다. 8×10^4 U2OS 세포를 6 웰 플레이트에 플레이팅하고 하룻밤 인큐베이션하여, 9×10^9 AAV 입자가 세포에 각각 형질도입되었다. 도 6에 따르면, 24 시간 후 EVOS 세포 이미징 시스템을 통해 U2OS 특이적 crRNA 의존성 세포사멸이 관찰되었다. 그러나, 비특이적 crRNA, HCT116 세포 특이적 crRNA는 세포사멸을 유도할 수 없었다. 도 6의 결과로부터, AAV 시스템에 의해 세포주 특이적인 선택적 세포사멸이 유도될 수 있음이 확인되었다.

[0154] 정상세포인 RPE1 세포주에서도 세포주 특이적인 선택적 세포사멸이 있는지 확인하였다. 도 7에 따르면, 실시예 2에서와 마찬가지로, U2OS 세포 특이적 saCAS9 AAV 시스템은 작동하고, U2OS 세포에서 세포사멸을 유도할 수 있으나, RPE1 세포에서 U2OS 세포주 특이적 AAV 시스템에 의해 유도되는 세포사멸은 없었다.

[0155] 암 특이적 INDEL에 의한 세포사멸 (Cancer specific Insertion-DEletions induced Apoptosis: CINDELA)에 의한 세포생존 (cell viability) 비율을 측정하였다. 72시간 후, AAV 입자가 형질도입된 세포를 실온에서 10 분간 1% 메틸렌블루로 염색하였다. 세포를 PBS로 3회 10 분간 세척하고 실온에서 건조시켰다. 세포를 500ul의 10 % 아세트산 용액으로 탈색하고 OD값을 측정하였다. 암세포 세포생존율(cell viability)에 대한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0156] 유세포분석을 통해 세포생존율을 시간 의존적 방식으로 측정하였다. U2OS 및 RPE1 세포 모두에 U2OS 세포 특이적 crRNA AAV 입자를 형질도입하였다. 아자이드 (azide)를 포함하지 않는 abd 혈청 / 단백질을 포함하지 않는 PBS를 이용하여 세포를 1×10^6 / ml로 재현탁하였다. 1ml 세포 당 1ul pf FVD를 넣고 즉시 볼텍싱하였다. 4°C 에서 30 분간 인큐베이션하고, 광을 차단하였다. PBS로 세포를 2회 세척하고, FACS VERSE (BD Inc.) 기계를 확인하였다. 도 9에 따르면, AAV 의존성 세포사멸은 crRNA 특이적 세포주에서만 유도되는 것으로 확인되었다.

[0157] 실시예 5. 교모세포종 특이적 INDEL에 의한 세포사멸 효과 확인

[0158] 환자 유래 교모세포종에서 INDEL에 의한 세포사멸 효과를 확인하였다. 세포를 저산소 챔버에서 배양한 것을 제외하고는 실시예 4과 동일한 방법으로 실험하였다. 교모세포종에 사용할 수 있는 서열은 16개 뿐이었다. 16개의 교모세포종 특이적 서열을 통한 선택적 세포사멸을 확인한다는 것은 16개 DNA DSB만을 생성시킬 수 있음을 의미한다.

[0159] [표 8]

Numbering	Target Chromosome#	Forward Sequence
121	Chromosome #05	ACACGGACAAGTTCTCCGTGA
122	Chromosome #13	AACAGTGGGGCAGTTAGGATT
123	Chromosome #03	CACAAGATAGATAGATAAGAT
124	Chromosome #02	TTTCCAGGTTTTGATTGAGGT
125	Chromosome #03	CAGATGCCAGAAAGGAGACTG
126	Chromosome #04	GAGGAGAAGCGGCGATAATCT
127	Chromosome #06	GTAGAAGGCTAAATAGTTACC
128	Chromosome #01	TTATACTAAGATTCTGGCCC
129	Chromosome #04	TCTCTTTGCACCCCAGGCATG
130	Chromosome #05	AGATAACAATAATTATTACTT
131	Chromosome #05	CCCCCTGGCCAGGCAGGGCCG
132	Chromosome #05	AGTAGCACGAACAAAACAAGT
133	Chromosome #01	GAGAAAAATCAGGATAGAGGT
134	Chromosome #05	CTCCACAAGCAGATGATCA AG
135	Chromosome #01	AAGTTTTGTAGAAAATAAAT
136	Chromosome #05	TACTGTGGGATAACTGACGGC

[0160]

[0161] 16개의 교모세포종 특이적 서열에 대한 연속적 형질도입을 수행하였다. NSC-10 세포를 정상 대조군으로 사용하였다. 도 10에 따르면, 교모세포종에서 선택적 암세포 사멸이 일어났음을 확인할 수 있다.

[0162] **실시예 6. ATM kinase 포함에 따른 세포사멸 효과**

[0163] ATM 카이네이즈 억제제를 포함하거나 포함하지 않는 AAV 입자를 실시예 5의 교모세포종 세포에 형질도입하였고, 실시예 4 및 실시예 5와 동일한 방법으로 실험하였다. 24시간의 형질도입 후, 세포를 실온에서 10분간 1% 메틸렌 블루로 염색하였다. 세포를 PBS로 3회 10분간 세척하고 실온에서 건조시켰다. 세포를 500ul의 10 % 아세트산 용액으로 탈색하고 OD를 측정하였다. 결과를 도 11에 나타내었다.

[0164] **실시예 7. 폐암 특이적 INDEL에 의한 세포사멸 효과 확인**

[0165] 암 특이적 INDEL 유도 세포사멸 (CINDELA) 효과를 확인하기 위해, 환자 유래의 폐암 조직을 마우스 이종이식에 사용하였다. 환자 유래의 폐암 조직을 마우스에 삽입하고 28개의 폐암 조직 특이적 crRNA를 포함하는 AAV 입자를 마우스에 연속적으로 주사하였다.

[0166] [표 9]

Numbering	Target Chromosome#	Forward Sequence
137	1	GAGGCTATTGGATTTCATTCTAGAGT
138	1	GCACTCACGAGGTCACGAGGTGTGGGT
139	2	CTTCTTAAACATAGAATCTATAGGAT
140	2	GAACAGTGCAAGGATAGGTGTGGGGGT
141	3	TGGTGCCCCGGGTTTACACTTAAGAAT
142	3	CTTCATCTATAGGAGCCTCCAGTGAGT
143	4	GGCCTTGAGTGAGGAGAAGGCAGGAGT
144	5	GGTGAAGTACATATTCTCATATGGAGT
145	5	GGGCTCAGTTTTCCCACCAGTGGGGGT
146	6	ATACGTTTTGACggCCAATAGTTGAAT
147	8	ACCTATGATGTGATAGTTTGTTGGGT
148	8	TAAGACCTCTTAGGAAGTAGAATGAAT
149	9	TTTGAGAGGCAGGGGCACCAGCTGGGT
150	9	TGGAAGAGTGGA AAAAGGTGGAAGAGT
151	10	TCTGCAGAACAGGCGCCCAGTCAGAGT
152	10	TGTAGAATTTTAACTGTTAACAGGAT
153	10	CAGCCAATGGTGTAAATAAGCTGTGGGT
154	11	TAAAGAGACTCAGGAGAGAAGAAGAAT
155	12	CAAGGGAGGTGCCTGGTTGCCAGAGT
156	12	AGTCTATTTGATTGTTTTAGGGAGT
157	12	GCATCACTGAAGAATCAGCCTAAGAGT

[0167]

158	13	GATTTTAATCATAACTGCATGAAGGGT
159	14	GTCACAAGTTTCTGTTTCTTGGTGGAT
160	15	TCCATCTCTGAAATGTGGATGGAGAAT
161	16	TAAAGGGTGCTTTTCTTATTATAGAAT
162	18	TTTGGGAGTGGAGAGATTG GGGGAGT
163	20	AGGCTCTCAGGGAATGAGAGGAGGGAT

[0168]

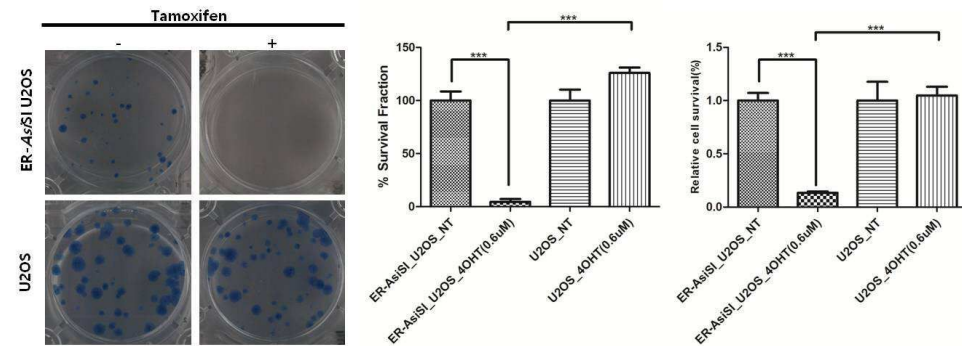
[0169] AAV 입자를 2일마다 주입하고 종양 크기를 측정하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에 따르면, 정상세포는 시간 의존적으로 성장하였으나, 암세포는 두 번째 AAV 주사 동안 성장하지 않았다.

[0170] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서,

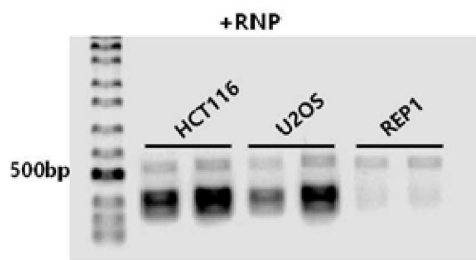
이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다

도면

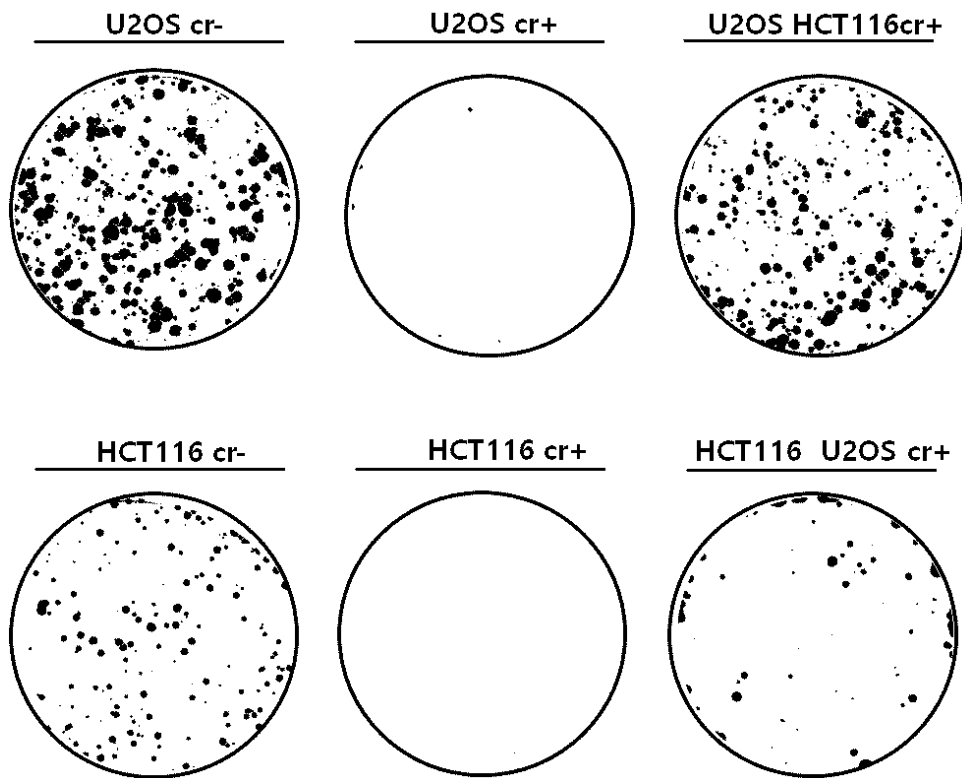
도면1



도면2

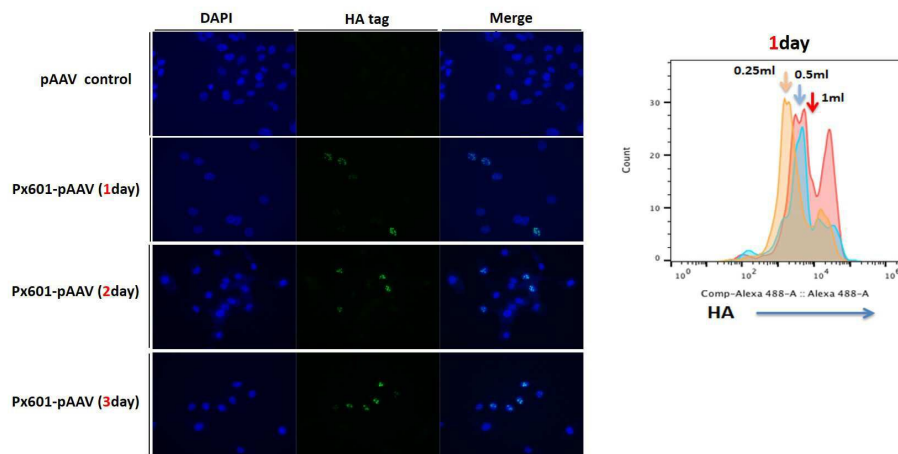


도면3

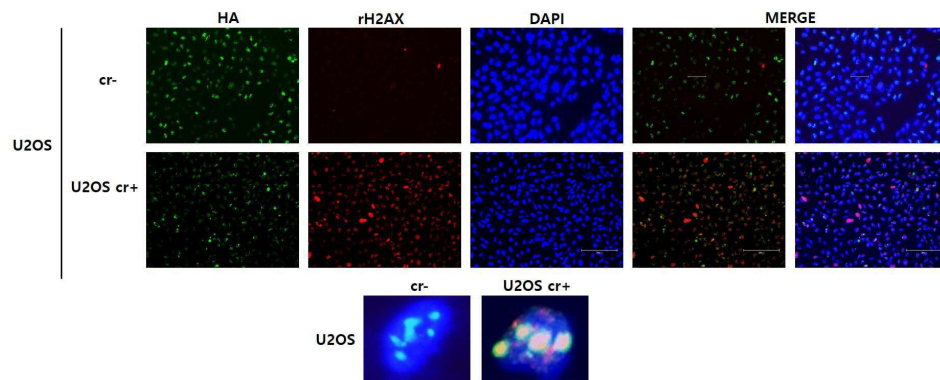


도면4

In in-vitro, the infection of CRISPR vector confirmed by HA IF and HA Flow cytometry.



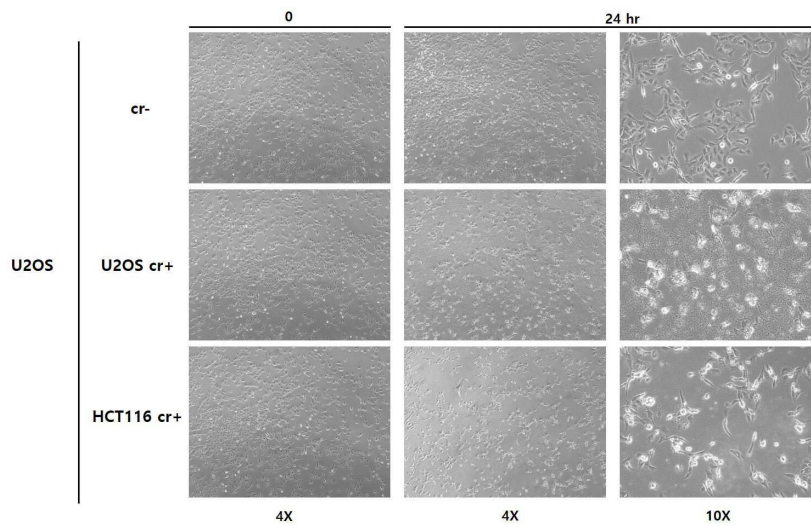
도면5



도면6

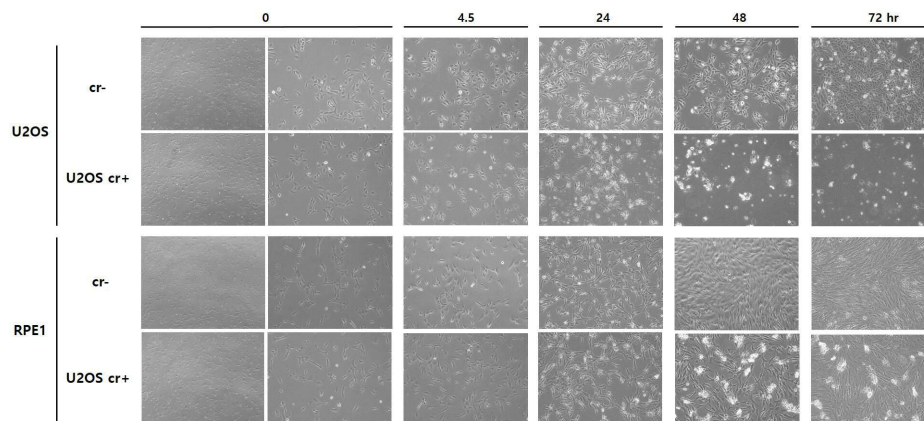
Cancer specific INsertion-DEletions induced Apoptosis. (CINDELA)

CINDELA in Sarcoma (30 DSB was introduced by saCAS9 AAV system)



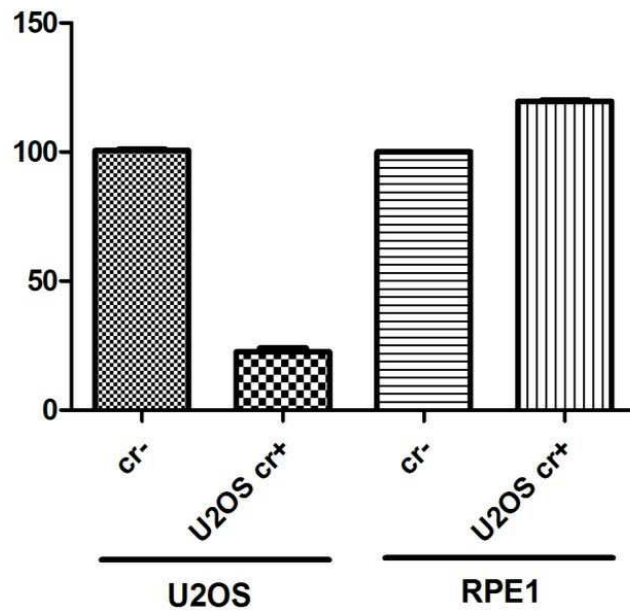
도면7

CINDELA in Sarcoma (30 DSB was introduced by saCAS9 AAV system)



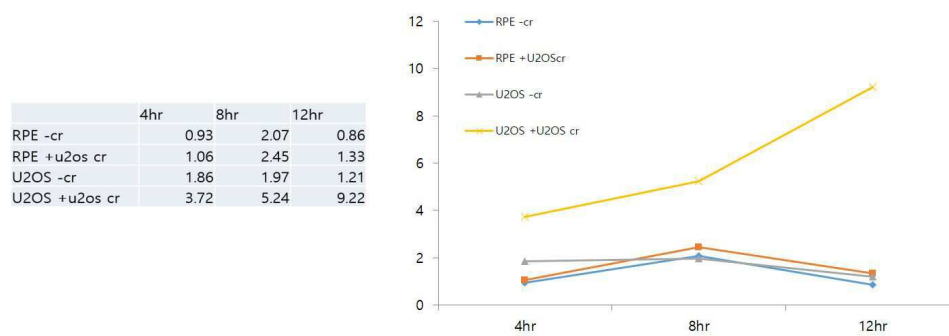
도면8

Relative %of cell viability caused by CINDELA

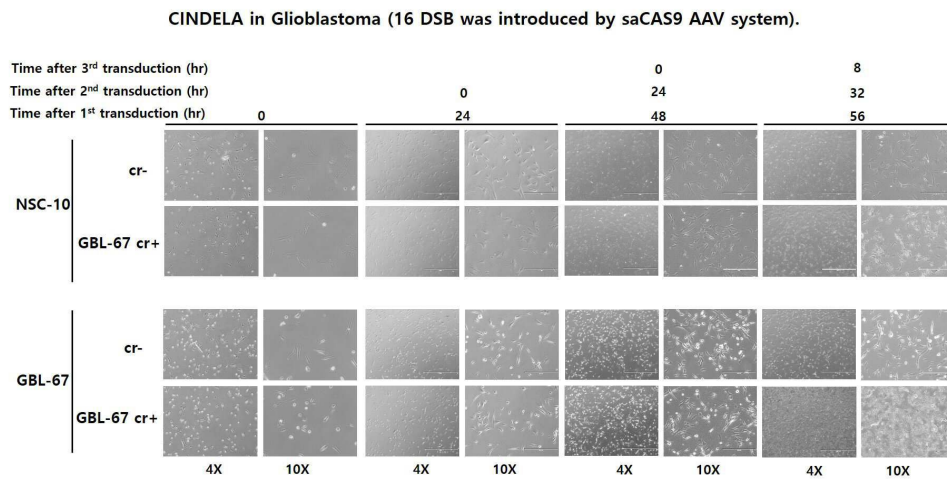


도면9

Relative %of cell viability caused by CINDELA

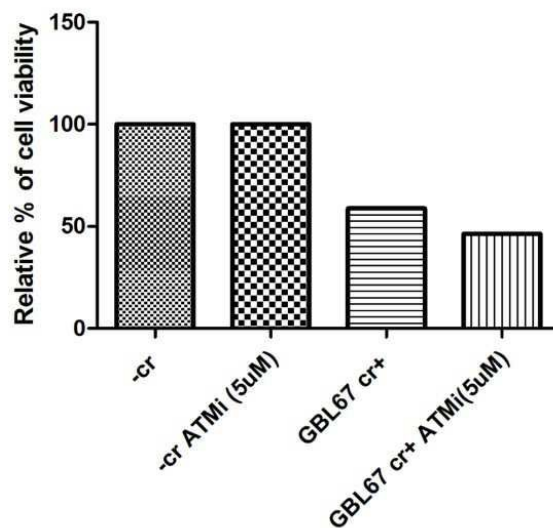


도면10



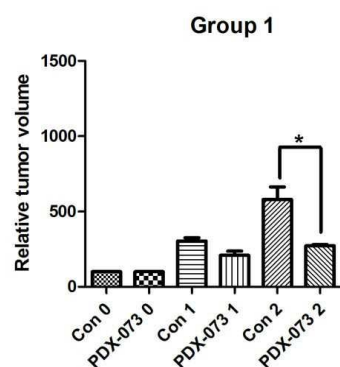
도면11

Relative %of cell viability caused by CINDELA



도면12

CINDELA system work in PDX in vivo mouse xenograft model system



서열 목록

<110>	Institute for Basic Science Ulsan National Institute of Science and Technology	
<120>	Composition For Inducing Apoptosis of Cells With Modified Genes	
<130>	257	
<150>	KR 18/109,214	
<151>	2018-09-12	
<160>	163	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	1	
	agccctagaa ttcccttcac	20
<210>	2	
<211>	20	
<		
212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	2	
	cttctccacc aattggtgtt	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	3	
	gttttgtctc attatcacgc	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 4

ctgtgtttat ggtgctttgt

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 5

tgtagaagg ccgaatcacg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 6

tcctatacgg ctctaccagt

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400>

7

gtctaaaggt tagaattccg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 8

gagactgcta tcagtcatgt

20

<210> 9

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	9	
	ttttggtcaa gagcagagga	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	10	
	tgtgtgccgt aatatgggaa	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	11	
	tgaccttctg agttccttat	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	12	
	gtttgtcata ccagtcaaag	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	13	
	acacaggacc agaaaccctg	20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 14
 actcttcag ttgttactg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 15
 gtgcatttct ctgtgagtc 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 16
 tatatatctg caggatctgc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 17
 tctcttgctg tagagtgcgt 20
 <210> 18
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400>	18	
acacctgctt caggtgtgtg		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	19	
cattttaaag gatgccagca		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	20	
ctgatacttc tgataccaga		20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	21	
gttcagcctg agtttggagt		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	22	
agagatacag aagtcctgt		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 23

agatgtgtaa ggttgcaaca 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 24

gaaccacaga acctggcata 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 25

tgacctttca caaaggccca 20

<210> 26

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 26

gcctcagggg aatggagata 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 27

tttgctactt tgctaggttt 20

<210> 28

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	28	
	agggagctca gagtcttg	20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	29	
	ctccttcct tcctgagtt	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	30	
	gtgtgagtga gagagaaaga	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	31	
	ttatccaatc agctatggcc	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	32	
	gcttcactgg cttcactgga	20

<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	33	
atttgtacag tctgcttact		20
<210>	34	
<211>		
>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	34	
gcattcttcaa caggtgattc		20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	35	
tttcaagcat ttcaatgcag		20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	36	
ttctctctgt gcttctttga		20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	

<400> 37
 tggcccttgt ggcagtttag 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 38
 atgggattaa tgggattgct 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 39
 tcatacagag aaagcagggc 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 40
 tcattctcatg tcttctcatg 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 41
 gacagaaccc aagtaatttc 20

<210> 42
 <211>
 > 20
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	42	
	ttatgccatc tgggccaggc	20
<210>	43	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	43	
	ccagacatac actaggcatc	20
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	44	
	tcccgtagg cattctgtac	20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	45	
	attcttcgtg ctgatgtacc	20
<210>	46	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	46	
	acaatctgtc cagaggccaa	20
<210>	47	
<211>	20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 47
 gtgaaggga agcaaggaca 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 48

tgatatggca tagcgatcat 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 49
 taacagccat gtggtgttac 20

<210> 50

<211>

> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 50
 ggaaacagca gcagtgcaca 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 51
 cagggtctaga ccttcgttat 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 52
 atgcagtgtgta gcatggggag 20

<210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 53
 agtcttttga caagatgccc 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 54
 gaagaaagag aagagggtt 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 55
 agcactttta tctcacccta 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 56
actgcctggg gttttcctt 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence
<400> 57
gtgtcaacag ggtcactctg 20

<210> 58
<211>
> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence
<400> 58
aatttgcttt ggaaggacct 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence
<400> 59
agattccaga gtgatggaat 20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence
<400> 60
agagatacag ggtccctgt 20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 61
 gagtaataag tctgctcttt 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 62
 actttgagga ccttgaggaa 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 63
 actgtgggaa ctgtgggaga 20
 <210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 64
 caggcatatt ttcccatgta 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 65
 atgtgatgct ggagagaaat 20
 <210> 66
 <211>

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 66

ggggttagtt tgtgttaact 20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 67

acttacatca caggcatcac 20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 68

atgccagatt cttcccagtg 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 69

acgaactgtt gggtgggtgct 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 70

tttaatcgag cacatgcagg 20

<210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 71
 tgatggatct gatggatact 20

<210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 72
 aagaagggct ggttgttct 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 73
 acctgcagga actgaaacaa 20

<210> 74
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 74
 ttgactccca tggtaacctg 20

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400>	75	
atgaggttac tcagagccag		20
<210>	76	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	76	
cacttgagtt caggagagct		20
<210>	77	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	77	
cttcacttcc ctcctttcca		20
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	78	
cactgccctc aagtccttac		20
<210>	79	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	79	
caaactcacc aaatgtccac		20
<210>	80	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 80

ttcttttggtt gtggtggttg 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 81

tagtggtggg gcataacacc 20

<210> 82

<211>

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 82

gtggcatttg gattccatga 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 83

ctcagtactt ggtctcctgt 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 84

acctcttgag gggtacacaa 20

<210> 85

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 85
 ccctgaatac tgagcaaagc 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 86
 gggcaagtgt gtgaagtgtg 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 87
 acacagtaaa gacccaagta 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 88
 tgtacatttc caggttcttc 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 89
 ttggccagct tgtcctgagt 20

<210> 90
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 90
 ggccaagatt gcatccagtc 20
 <210> 91
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 91
 tacctatgcc tcatgtagaa a 21
 <210> 92
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 92
 atcgtcaggt tctgggaccg t 21
 <210> 93
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 93
 cagaagagag agagtagtag a 21
 <210> 94
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 94
gaatgtttaa ggtatagttt a 21

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence

<400> 95
tgtttcagca ggggttgaag c 21

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence

<400> 96
ctatacccta gacttattcc t 21

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence

<400> 97
gtttctttct acagaataga g 21

<210> 98
<211>
> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Sequence

<400> 98
ataggttaac aaagatatcc a 21

<210> 99
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 99

ctacaaaata ggtgacataa c 21

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 100

ttaaaatggc gcaataaat t 21

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 101

ttttatgagt ctgccaggaa t 21

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 102

gaagaaacaa ttttactgg g 21

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 103

caggaaggga gctagtgagc t 21

<210> 104

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 104
 cctctcctgc tgatgatccc c 21
 <210> 105
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 105
 tgggccgcac gtgtgagtgc c 21
 <210> 106

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 106
 aggaaacaag cccatgttcc c 21
 <210> 107
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 107
 catggcagaa aacagaagac a 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 108

aacagtctct gtgatagggc a	21
<210> 109	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 109	
gggaaaatca gacggatatt c	21
<210> 110	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 110	
atttctgttc ttccctcact t	21
<210> 111	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 111	
taataactgt gtagttataa c	21
<210> 112	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 112	
gttcagatta gctcttaact a	21
<210> 113	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	

<400>	113	
taaacttcct atttattgtc t		21
<210>	114	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	114	
ataactaatg ccagggtgag t		21
<210>	115	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	115	
ctccacgccg gtagggttag a		21
<210>	116	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	116	
agttttagt gtctttccag a		21
<210>	117	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Sequence	
<400>	117	
tattttccag atgttccaat a		21
<210>	118	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 118
 gactatgaga ctactactgc a 21
 <210> 119

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 119
 ccttagcctc cttttcacac a 21
 <210> 120
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 120
 agagaagaga aaatagggga a 21
 <210> 121
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 121

 acacggacaa gttctccgtg a 21
 <210> 122
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 122
 aacagtgggg cagtaggat t 21
 <210> 123

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 123
 cacaagatag atagataaga t 21
 <210> 124
 <211> 21

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 124
 tttccaggtt ttgattgagg t 21
 <210> 125
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 125
 cagatgccag aaaggagact g 21
 <210> 126
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 126
 gaggagaagc ggcgataatc t 21

 <210> 127
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 127

gtagaaggct aaatagttac c	21
<210> 128	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 128	
ttataactaa gattctggcc c	21
<210> 129	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 129	
tctctttgca cccagggcat g	21
<210> 130	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 130	
agataacaat aattattact t	21
<210> 131	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Sequence	
<400> 131	
ccccctggcc aggcagggcc g	21
<210> 132	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 132

agtagcacga acaaaacaag t 21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 133

gagaaaaatc aggatagagg t 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 134

ctccacaagc agatgatcaa g 21

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 135

aagttttgta gaaaactaaa t 21

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 136

tactgtggga taactgacgg c 21

<210> 137

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 137
 gaggctattg gatttcattt ctagagt 27
 <210> 138
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 138
 gcactcacga ggtcacgagg tgtgggt 27
 <210> 139
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 139
 ctttcttaaa catagaatct ataggat 27

 <210> 140
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 140
 gaacagtgca aggataggtg tgggggt 27
 <210> 141
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 141
 tgggtccccg ggtttacact taagaat 27
 <210> 142

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 142
 cttcatctat aggagcctcc agtgagt 27

<210> 143
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 143
 ggccttgagt gaggagaagg caggagt 27

<210> 144
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 144
 ggtgaagtac atattctcat atggagt 27

<210> 145

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 145
 gggctcagtt ttcccaccag tgggggt 27

<210> 146
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence

<400> 146

atacgttttg acggccaata gttgaat

27

<210> 147

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 147

acctatgatg tgatagtttg tttgggt

27

<210> 148

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 148

taagacctct taggaagtag aatgaat

27

<210> 149

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 149

tttgagaggc aggggcacca gctgggt

27

<210> 150

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 150

tggaagagtg gaaaaaggtg gaagagt

27

<210> 151

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 151

tctgcagaac aggcgcccag tcagagt

27

<210> 152

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 152

tgtagaattt ttaactgtta acaggat

27

<210> 153

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 153

cagccaatgg tgtaataagc tgtgggt

27

<210> 154

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 154

taaagagact caggagagaa gaagaat

27

<210> 155

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 155

caaggagagt gcctggttgc ccagagt

27

<210> 156

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 156
 agtctatattt gattgttttt agggagt 27
 <210> 157
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 157
 gcatcactga agaatacagcc taagagt 27
 <210> 158

 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 158
 gattttaatc ataactgcat gaagggt 27
 <210> 159
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 159
 gtcacaagtt tctgtttctt ggtggat 27
 <210> 160
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 160

 tccatctctg aaatgtggat ggagaat 27

<210> 161
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 161
 taaagggtgc ttttcttatt atagaat 27
 <210> 162
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 162
 tttgggagtg gagagatttg ggggagt 27
 <210> 163
 <211> 27

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Sequence
 <400> 163
 aggctctcag ggaatgagag gagggat 27