(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 2 월 20 일 (20.02.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/037906 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/012084

(22) 국제출원일: 2024 년 8 월 13 일 (13.08.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0107089 2023 년 8 월 16 일 (16.08.2023) KR

(71) 출원인: 기초과학연구원 (**INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE**) [KR/KR]; 34126 대전광역시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR). 울산과학기술원 (**UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)**) [KR/KR]; 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 조승우 (**CHO, Seung Woo**); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 이소영 (**LEE, So Young**); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 권태준 (**KWON, Taejoon**); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 명경재 (**MYUNG, Jyungjae**); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

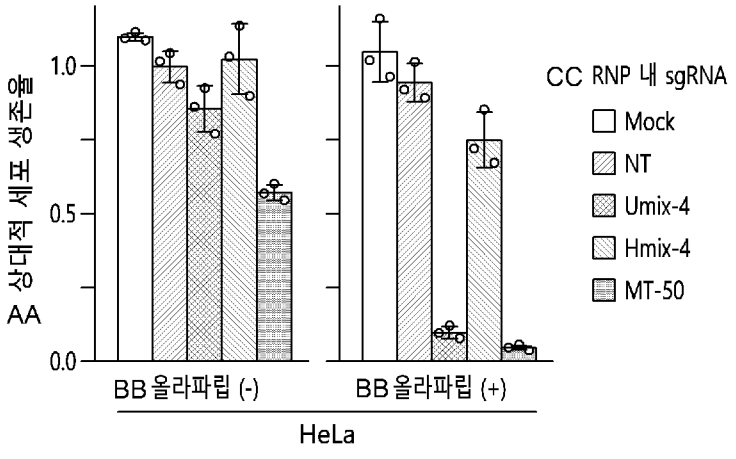
(74) 대리인: 이처영 등 (**LEE, Cheo Young** et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층, Seoul (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

WO 2025/037906 A1

(54) **Title:** CELL DEATH METHOD USING CRISPR/CAS SYSTEM HAVING SINGLE-STRAND BREAK ACTIVITY AND PARP INHIBITOR

(54) **발명의 명칭:** 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/CAS 시스템과 PARP 억제제를 이용하는 세포 사멸 방법



AA ... Relative cell viability
BB ... Olaparib
CC ... sgRNA in RNP

(57) **Abstract:** Disclosed herein is a cell death method using a CRISPR/Cas system having single-strand break activity together with a PARP inhibitor, as one type of cell death method using a CRISPR/Cas system. This method is a safer cell death technology with few unwanted side effects, compared to cell death methods using CRISPR/Cas systems having double-strand break activity. Disclosed herein are a method for treating cancer by using the cell death method, and specific configurations required for implementing the methods.

(57) **요약서:** 이 명세서는 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 세포 사멸 방법의 일종으로, 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템, 그리고 PARP 억제제를 함께 이용하는 세포 사멸 방법을 개시한다. 이는, 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 이용하는 세포 사멸 방법에 비해 원치 않은 부작용이 적고, 더 안전한 세포 사멸 기술이다. 이 명세서는 상기 세포 사멸 방법을 응용하여 암을 치료하는 방법, 그리고 위 방법들을 구현하기 위해 필요한 구체적인 구성들을 개시한다.

[다음 쪽 계속]

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/CAS 시스템과 PARP 억제제를 이용하는 세포 사멸 방법

기술분야

[1] 이 명세서에서 개시하는 기술은 CRISPR/Cas 시스템으로 세포 유전체 여러 군데를 절단하여 세포를 사멸시키는 기술과 관련된다. 구체적으로, CRISPR/Cas 시스템을 이용한 표적-특이적 절단 기술, 그리고 PARP 억제제를 이용하여 세포 유전체의 단일가닥 절단 수선을 억제하는 기술과 관련된다.

[2]

배경기술

[3] 국제공개공보 WO2020/055187 A1에는 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 세포 사멸 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 위 선행문헌에서는 암세포 특이적인 핵산 서열을 표적하는 복수의 CRISPR/Cas 시스템을 세포에 전달하여 암세포를 사멸시키는 방법이 개시되어 있다. 다만, CRISPR/Cas 시스템은 표적 핵산 서열과 유사한 서열을 표적으로 잘못 인식하여 이를 절단하는 오프타겟 (Off-target) 문제가 있으며, 이 때문에 비표적 세포에 원치 않은 영향을 미치는 부작용이 우려된다. CRISPR/Cas 시스템을 치료제로 개발하기 위해서는 원치 않은 부작용이 적고, 더 안전한 세포 사멸 기술이 요구된다.

[4] [특허문헌]

[5] 국제공개공보 WO2020/055187 A1

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 세포 사멸 방법이 알려져 있음

[8] 국제공개공보 WO2020/055187 A1에는 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 세포 사멸 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 위 선행문헌에서는 암세포 특이적인 핵산 서열을 표적하는 복수의 CRISPR/Cas 시스템을 세포에 전달하여 암세포를 사멸시키는 방법이 개시되어 있다. 위 선행문헌에 따르면, 세포 유전체 내 일정 수 이상의 표적 핵산을 CRISPR/Cas 시스템으로 표적하여 절단하면 세포가 사멸한다.

[9] CRISPR/Cas 시스템의 오프타겟 활성으로 인한 부작용이 문제됨

[10] CRISPR/Cas 시스템은 PAM 서열과 가이드 RNA의 유도에 따라 표적-특이적으로 작동한다. 하지만, CRISPR/Cas 시스템이 표적 핵산 서열과 유사한 서열을 표적으로 잘못 인식하여 이를 절단할 수도 있음이 보고되었다. 이를 CRISPR/Cas 시스템의 오프타겟 (Off-target) 문제라 한다. 오프타겟 문제가 발생하면, 의도치

않은 핵산이 절단되게 된다. 위 핵산이 세포 유전체 내의 핵산이라면, 높은 확률로 인델 (indel)과 같은 돌연변이가 도입될 수 있다. 위 오프타겟 문제는 CRISPR/Cas 시스템의 중요한 부작용 중 하나로 알려져 있다.

[11] 원치 않은 부작용이 적고 더 안전한 세포 사멸 기술 개발이 요구됨

[12] 상기 CRISPR/Cas 시스템의 오프타겟 문제가 발생하면, 1) 어떤 핵산에 문제를 일으킬 지 예측할 수 없으며, 2) 그 결과가 환자에게 어떤 영향을 미칠 지 전혀 알 수 없다는 문제점이 있다. 이는 상기 CRISPR/Cas 시스템을 환자에게 투여하는 치료제로 사용할 때의 약점이며, 반드시 극복해야 하는 문제이다. 따라서, 치료제로 개발하기 위해서는 원치 않은 부작용이 적고, 더 안전한 세포 사멸 기술이 요구된다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 이 명세서는 상기 기술적 과제의 해결 방법으로, 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템, 그리고 PARP 억제제를 함께 이용하는 세포 사멸 방법을 개시한다.

[15] 이 명세서는 상기 세포 사멸 방법을 응용하여 암을 치료하는 방법 또한 개시한다.

[16] 이 명세서는 상기 세포 사멸 방법, 그리고 암을 치료하는 방법을 구현하기 위해 필요한 구체적인 구성들을 개시한다.

[17]

발명의 효과

[18] 이 명세서에서 제시한 세포 사멸 방법을 활용하면, 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 활용한 세포 사멸 방법과 동등하거나 그 이상의 효율로 세포를 사멸시킬 수 있다. 나아가, 상기 세포 사멸 방법을 사용하면, 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 활용할 때에 비해 부작용이 적게 발생한다. 위 부작용은 구체적으로, 1) 표적 세포가 아닌 세포에 상기 CRISPR/Cas 시스템이 도입되었을 때, 표적 서열이 아닌 서열 (비표적 서열)을 대상으로 기능하여 원치 않는 돌연변이를 도입하는 문제, 그리고 2) 표적 세포가 아닌 세포에 대해 세포 독성을 보이는 문제 등이 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 실험예 2에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HeLa 세포에 표 1에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, 올라파립 (-)는 PARP 억제제를 투여하지 않은 군, 그리고 올라파립 (+)는 PARP 억제제를 투여한 군을 나타낸다. 또한, Mock은 PBS만을 투여한 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는

HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[21] 도 2는 실험예 2에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HCT-116 세포에 표 1에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, 올라파립 (-)는 PARP 억제제를 투여하지 않은 군, 그리고 올라파립 (+)는 PARP 억제제를 투여한 군을 나타낸다. 또한, Mock은 PBS만을 투여한 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는 HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[22] 도 3은 실험예 3에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HeLa 세포에 표 4에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, $Cas9^{WT}$는 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 야생형의 SpCas9을 포함하는 RNP를 투여한 군; $nCas9^{D10A}$는 SpCas9의 D10A 변이로, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP를 투여한 군; 그리고 $nCas9^{D10A}$ + Olaparib은 위 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP와 PARP 억제제인 올라파립을 함께 투여한 군을 의미한다. 또한, Mock은 PBS만을 투여한 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는 HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[23] 도 4는 실험예 3에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HCT-116 세포에 표 4에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, $Cas9^{WT}$는 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 야생형의 SpCas9을 포함하는 RNP를 투여한 군; $nCas9^{D10A}$는 SpCas9의 D10A 변이로, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP를 투여한 군; 그리고 $nCas9^{D10A}$ + Olaparib은 위 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP와 PARP 억제제인 올라파립을 함께 투여한 군을 의미한다. 또한, Mock은 PBS만을 투여한 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는 HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을

포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[24] 도 5는 실험예 4에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HeLa 세포에 표 5에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, 그래프의 가로축은 올라파립의 농도를 μM로 나타낸 수치를 로그 스케일로 표시하였다. 또한, Non-treated는 PARP 억제제만 투여한 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는 HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 siBRCA2는 BRCA2 유전자를 침묵시키는 siRNA를 투여한 군을 의미한다.

[25] 도 6은 실험예 4에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HCT-116 세포에 표 5에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, 그래프의 가로축은 올라파립의 농도를 μM로 나타낸 수치를 로그 스케일로 표시하였다. 또한, Non-treated는 PARP 억제제만 투여한 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Hmix-4는 HCT-116 세포의 유전체에만 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 siBRCA2는 BRCA2 유전자를 침묵시키는 siRNA를 투여한 군을 의미한다.

[26] 도 7은 실험예 5에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HeLa 세포에 표 8에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, $Cas9^{WT}$는 이중가닥 절단 활성을 가지는 야생형의 SpCas9을 포함하는 RNP를 투여한 군; 그리고 $nCas9^{D10A}$는 SpCas9의 D10A 변이로, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP를 투여한 군을 의미한다. 또한, DMSO는 PARP 억제제 없이 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 투여한 군; 그리고 Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Veliparib, Iniparib은 각각에 해당하는 PARP 억제제를 투여한 군을 의미한다. 또한, Mock은 sgRNA 대신 PBS를 포함하는 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-2는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 2군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Umix-3는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 3군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[27] 도 8은 실험예 5에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HCT-116 세포에 표 8에 따른 각각의 물질을 처리한 결과이다. 여기서, $Cas9^{WT}$는 이중가닥 절단 활

성을 가지는 야생형의 SpCas9을 포함하는 RNP를 투여한 군; 그리고 $nCas9^{D10A}$는 SpCas9의 D10A 변이로, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP를 투여한 군을 의미한다. 또한, DMSO는 PARP 억제제 없이 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 투여한 군; 그리고 Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Veliparib, Iniparib은 각각에 해당하는 PARP 억제제를 투여한 군을 의미한다. 또한, Mock은 sgRNA 대신 PBS를 포함하는 군; NT는 아무것도 표적하지 않는 임의의 sgRNA를 포함하는 군; Umix-2는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 2군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Umix-3는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 3군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; Umix-4는 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함된 4군데의 표적 핵산을 표적하는 sgRNA들을 포함하는 군; 그리고 MT-50은 HeLa 세포 및 HCT-116 세포 모두의 유전체에 공통적으로 포함되고, 50군데의 표적 핵산을 표적하면서, 표적 서열이 동일하여 하나의 sgRNA만 포함하는 군을 의미한다.

[28] 도 9는 실험예 6에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포 각각에 대해, HPRT1, BCR, DNAJC6, PLXDC2 유전자를 표적하는 RNP를 처리한 결과 측정된 돌연변이 효율을 나타낸다. 여기서, $Cas9^{WT}$는 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 야생형의 SpCas9을 포함하는 RNP를 투여한 군; $nCas9^{D10A}$는 SpCas9의 D10A 변이로, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP를 투여한 군; 그리고 $nCas9^{D10A}$ + Olaparib은 위 니케이즈 단백질을 포함하는 RNP와 PARP 억제제인 올라파립을 함께 투여한 군을 의미한다.

[29] 도 10은 실험예 6에서, 각 Cas 단백질 종류 별로 돌연변이 발생률이 다르게 나타나는 이유를 모식적으로 나타낸 도면이다.

[30] 도 11은 실험예 7에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, HCT-116 종양을 이식한 마우스 이종이식 모델에 표 14에 따른 물질을 투여하고, 일 별로 종양 크기를 측정한 결과이다. 종양 크기는 실험예 1.11에 따라 mm3 단위로 측정되었다. 여기서, PBS는 PBS만을 투여한 마우스, Olaparib only는 올라파립만을 투여한 마우스, RNP (Hmix-4) only는 nCas 단백질 및 표 14의 Hmix-4 가이드 RNA를 포함하는 RNP만을 투여한 마우스, 그리고 RNP (Hmix-4) + Olaparib은 올라파립과 RNP를 모두 투여한 마우스의 종양 크기를 의미한다.

[31] 도 12는 실험예 7에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, 실험예 7의 각 물질을 투여한 마우스 종양 절편을 실험예 1.13 및 실험예 1.14에 따라 Ki-67, Caspase-3, 그리고 TUNEL assay 한 결과이다. 여기서, PBS는 PBS만을 투여한 마우스, Olaparib은 올라파립만을 투여한 마우스, Hmix-4는 nCas 단백질 및 표 14의 Hmix-4 가이드 RNA를 포함하는 RNP만을 투여한 마우스, 그리고 Hmix-4 + Olaparib은 올라파립과 RNP를 모두 투여한 마우스의 종양을 의미한다.

[32] 도 13은 실험예 7에 따른 실험 결과를 나타낸다. 구체적으로, 25일차에 희생된 마우스의 종양 조직 사진을 나타낸다. 여기서, PBS는 PBS만을 투여한 마우스, Olaparib은 올라파립만을 투여한 마우스, Hmix-4는 nCas 단백질 및 표 14의 Hmix-4 가이드 RNA를 포함하는 RNP만을 투여한 마우스, 그리고 Hmix-4 + Olaparib은 올라파립과 RNP를 모두 투여한 마우스의 종양을 의미한다.

[33]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 이하, 발명의 실시를 위한 최선의 형태를 예시적으로 개시한다. 이는 본 명세서에서 개시되는 발명의 일부 구현예를 포함하지만, 모든 구현예를 포함하고 있지는 않다. 본 단락에 서술된 실시예는 예시에 불과하며, 본 단락에 서술된 구현예만이 "본 발명의 최선의 형태"라고 이해되면 안 된다. 통상의 기술자라면 본 단락에 서술된 예시에 대한 많은 변형 및 보다 바람직한 구현예들을 떠올릴 수 있을 것이며, 그러한 내용 또한 본 발명의 실시를 위한 최선의 형태에 포함된다고 보아야 한다.

[35] 이 명세서는 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 3개 이상의 표적 핵산을 포함하고,

[36] 다음을 포함하는 방법을 개시한다:

[37] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,

[38] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 표적 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[39] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 세포를 사멸시키며,

[40] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 1 종류 이상의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하고,

[41] 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:

[42] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 또는 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고

[43] 가이드 도메인과 스캐폴드를 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산;

[44] 여기서, 상기 스캐폴드는 상기 Cas 단백질과 상호작용하여 상기 가이드 RNA가 상기 Cas 단백질과 복합체를 이루도록 하고,

[45] 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[46] 일 실시예로,

[47] 상기 표적 세포는 서로 다른 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,

[48] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 3 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,

[49] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 서로 다른 핵산 서열을 표적하고,

[50] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[51] 일 실시예로,

[52] 상기 표적 세포는 같은 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,

[53] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 1 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,

[54] 상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열을 표적할 수 있다.

[55] 일 실시예로,

[56] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음 중 선택된 형태일 수 있다:

[57] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 그리고 가이드 RNA를 포함하며, 상기 Cas 단백질과 가이드 RNA가 결합하여 RNA-단백질 복합체를 이룸; 또는

[58] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 가이드 RNA를 포함함.

[59] 일 실시예로,

[60] 상기 PARP 억제제는 i) 올라파립 (Olaparib); ii) 루카파립 (Rucaparib); iii) 니라파립 (Niraparib); iv) 벨리파립 (Veliparib); v) 이니파립 (Iniparib); 또는 vi) i) 내지 v)의 조합 중 선택될 수 있다.

[61] 일 실시예로,

[62] 상기 표적 핵산들은 표적 가닥과 비표적 가닥을 포함하는 이중가닥 DNA이고,

[63] 상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함은 다음 중 선택된 것임:

[64] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 비표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 동등한 RNA 서열을 가짐;

[65] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 혼성화될 수 있음; 또는

[66] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 상보적인 RNA 서열을 가질 수 있다.

[67] 이 명세서에서는 환자의 암 세포를 선택적으로 사멸시키는 암 치료 방법으로,

[68] 상기 환자의 암 세포는 정상 세포에는 포함되지 않은 3개 이상의 표적 핵산을 포함하고,

[69] 다음을 포함하는 암 치료 방법을 개시한다:

[70] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 환자에게 투여하는 과정,

[71] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 환자의 암 세포의 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[72] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 암 세포를 사멸시키며,

[73] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 1 종류 이상의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하고,

[74] 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:

[75] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 또는 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고

[76] 가이드 도메인과 스캐폴드를 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산;

[77] 여기서, 상기 스캐폴드는 상기 Cas 단백질과 상호작용하여 상기 가이드 RNA가 상기 Cas 단백질과 복합체를 이루도록 하고,

[78] 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[79] 일 실시예로,

[80] 상기 암 세포는 서로 다른 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,

[81] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 3 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,

[82] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 서로 다른 핵산 서열을 표적하고,

[83] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적할 수 있다.

[84] 일 실시예로,

[85] 상기 암 세포는 같은 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,

[86] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 1 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,

[87] 상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열을 표적할 수 있다.

[88] 일 실시예로,

[89] 상기 PARP 억제제는 i) 올라파립 (Olaparib); ii) 루카파립 (Rucaparib); iii) 니라파립 (Niraparib); iv) 벨리파립 (Veliparib); v) 이니파립 (Iniparib); 또는 vi) i) 내지 v)의 조합 중 선택될 수 있다.

[90] 일 실시예로,

[91] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제는 각각 독립적으로 환자에게 투여될 수 있다.

[92] 일 실시예로,

[93] 상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음 중 선택됨:

[94] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 그리고 가이드 RNA를 포함하며, 상기 Cas 단백질과 가이드 RNA가 결합하여 RNA-단백질 복합체를 이룸; 또는

[95] 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 가이드 RNA를 포함할 수 있다.

[96] 일 실시예로,

[97] 상기 표적 핵산들은 표적 가닥과 비표적 가닥을 포함하는 이중가닥 DNA이고,

[98] 상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함은 다음 중 선택된 것임:

[99] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 비표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 동등한 RNA 서열을 가짐;

[100] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 혼성화될 수 있음; 또는

[101] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 상보적인 RNA 서열을 가질 수 있다.

[102] 이 명세서에서는 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함하고,

[103] 다음을 포함하는 방법을 개시한다:

[104] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,

[105] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:

[106] 제1 nCas 단백질, 그리고 제1 가이드 RNA를 포함하는 제1 CRISPR/nCas 복합체;

[107] 제2 nCas 단백질, 그리고 제2 가이드 RNA를 포함하는 제2 CRISPR/nCas 복합체; 그리고

[108] 제3 nCas 단백질, 그리고 제3 가이드 RNA를 포함하는 제3 CRISPR/nCas 복합체;

[109] 여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제1 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[110] 상기 제2 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제2 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[111] 상기 제3 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제3 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[112] 상기 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 사멸시킴.

[113] 이 명세서에서는 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함하고,

[114] 다음을 포함하는 방법을 개시한다:

[115] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,

[116] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:

[117] 제1 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제1 가이드 RNA를 포함하는 제1 CRISPR/nCas 조성물;

[118] 제2 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제2 가이드 RNA를 포함하는 제2 CRISPR/nCas 조성물; 그리고

[119] 제3 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제3 가이드 RNA를 포함하는 제3 CRISPR/nCas 조성물;

[120] 여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제1 nCas 단백질과 상기 제1 가이드 RNA가 결합한 제1 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,

[121] 상기 제2 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제2 nCas 단백질과 상기 제2 가이드 RNA가 결합한 제2 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,

[122] 상기 제3 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제3 nCas 단백질과 상기 제3 가이드 RNA가 결합한 제3 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,

[123] 여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제1 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[124] 상기 제2 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제2 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[125] 상기 제3 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제3 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[126] 상기 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 사멸시킴.

[127] 일 실시예로,

[128] 상기 표적 세포는 암 세포이고, 상기 제1 표적 핵산, 상기 제2 표적 핵산, 그리고 상기 제3 표적 핵산은 암 세포 특이적인 표적 핵산일 수 있다.

[129]

발명의 실시를 위한 형태

[130] 이하, 첨부된 도면을 참조하여, 발명의 내용을 특정한 구현예와 예시들을 통해 더욱 상세하게 설명한다. 상기 첨부된 도면은 발명의 일부 구현예를 포함하지만, 모든 구현예를 포함하고 있지는 않다는 점에 유의해야 한다. 본 명세서에 의해 개시되는 발명의 내용은 다양하게 구현될 수 있으며, 여기에 설명되는 특정 구현예로 제한되지 않는다. 이러한 구현예들은 본 명세서에 적용되는 법적 요건을 만족시키기 위해 제공되는 것으로 보아야 한다. 본 명세서에 개시된 발명이 속한

기술분야에 있어 통상의 기술자라면, 본 명세서에 개시된 발명의 내용에 대한 많은 변형 및 다른 구현예들을 떠올릴 수 있을 것이다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 발명의 내용은 여기에 기재된 특정 구현예로 제한되지 않으며, 이에 대한 변형 및 다른 구현예들도 청구범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[131]

[132] 용어의 정의

[133] 약

[134] 이 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1%, 또는 0% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[135] 아미노산 서열 표기

[136] 달리 서술하지 않는 한, 이 명세서에서 아미노산 서열을 기재할 때는 아미노산 일문자 표기법, 또는 세문자 표기법을 사용하여, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 기재한다. 예를 들어, MDK로 표기하는 경우, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 메티오닌 (Methionine), 아스파르트산 (Aspartic acid), 그리고 리신 (Lysine)이 차례로 연결된 펩타이드를 의미한다. 또 다른 예를 들어, Lys-Tyr-Ser로 표기하는 경우, N-터미널에서 C-터미널 방향으로 리신 (Lysine), 티로신 (Tyrosine), 그리고 세린 (Serine)이 차례로 연결된 펩타이드를 의미한다. 상기 일문자 표기법으로 나타낼 수 없는 아미노산의 경우, 다른 문자를 사용하여 표기하며, 추가적으로 보충하여 설명한다.

[137] 각각의 아미노산 표기 방법은 다음과 같다: 알라닌(Alanine; Ala, A); 아르기닌(Arginine; Arg, R); 아스파라긴(Asparagine; Asn, N); 아스파르트산(Aspartic acid; Asp, D); 시스테인(Cysteine; Cys, C); 글루탐산(Glutamic acid; Glu, E); 글루타민(Glutamine; Gln, Q); 글리신(Glycine; Gly, G); 히스티딘(Histidine; His, H); 이소류신(Isoleucine; Ile, I); 류신(Leucine; Leu, L); 리신(Lysine; Lys K); 메티오닌(Methionine; Met, M); 페닐알라닌(Phenylalanine; Phe, F); 프롤린(Proline; Pro, P); 세린(Serine; Ser, S); 트레오닌(Threonine; Thr, T); 트립토판(Tryptophan; Trp, W); 티로신(Tyrosine; Tyr, Y); 및 발린(Valine; Val, V).

[138] 핵산 서열 표기

[139] 이 명세서에서 사용되는 A, T, C, G 및 U 기호는 당업계 통상의 기술자가 이해하는 의미로 해석된다. 문맥 및 기술에 따라 DNA 또는 RNA 상에서 염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로 적절히 해석될 수 있다. 예를 들어, 염기를 의미하는 경우는 각각 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G) 또는 우라실(U) 자체로 해석될 수 있고, 뉴클레오사이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티미딘(T), 시티딘(C), 구아노신(G) 또는 유리딘(U)으로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의 뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석되어야 한다. 달리 정의하지 않은 한, 핵

산 서열을 지칭하거나 이를 표기할 때는 핵산의 5'말단에서부터 3'말단 방향으로 서술한다.

[140]

[141] **배경기술 - CRISPR/Cas 시스템**

[142] CRISPR/Cas 시스템 개괄

[143] CRISPR/Cas 시스템은 원핵생물 유기체에서 발견되는 면역 시스템의 일종이며, Cas 단백질, 및 가이드 RNA를 포함한다. Cas 단백질, 또는 가이드 RNA의 자세한 구성에 대해서는 공개문헌인 WO2018/231018(국제공개번호)에 자세히 설명되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 "Cas 단백질" 이라는 용어는 CRISPR/Cas 시스템에서 이용되는 것으로 해석될 수 있는 뉴클레이즈(nuclease)를 총칭하는 용어이다. 이하에서는 가장 일반적으로 쓰이는 CRISPR/Cas9 시스템의 DNA 절단 과정을 간략히 설명한다.

[144] Cas9 단백질

[145] CRISPR/Cas9 복합체에서, 핵산을 절단하는 뉴클레이즈(nuclase) 활성을 가지는 단백질을 Cas9 단백질이라 한다. 상기 Cas9 단백질은 CRISPR/Cas 시스템 분류 상 Class 2, Type II에 해당하며, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 속 (Streptococcus sp.), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum), 스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum) 유래 Cas9 단백질 등이 있다.

[146] 가이드 RNA

[147] CRISPR/Cas9 복합체에서, 표적 핵산에 포함된 특정 서열을 인식하도록 CRISPR/Cas9 복합체를 유도하는 기능을 가지는 RNA를 가이드 RNA라 한다. 상기 가이드 RNA의 구성은 크게 스캐폴드와 가이드 도메인으로 나눌 수 있다. 상기 스캐폴드는 Cas9 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas9 단백질과 결합하여 복합체를 이룰 수 있도록 하는 부분이다. 일반적으로, 상기 스캐폴드는 tracrRNA와 crRNA 반복 서열 부분을 포함한다. 구체적인 핵산 서열은 함께 사용되는 Cas9 단백질의 종류에 따라 달라진다. 상기 가이드 도메인은 표적 핵산의 전부 또는 일부와 상보적으로 결합할 수 있는 부분이다. 상기 가이드 도메인은 표적하고자 하는 표적 핵산에 따라 인위적으로 설계된다.

[148] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하는 과정

[149] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산에 접촉하여 Cas9 단백질이 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열을 인식하고, 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 Cas9 단백질이 인식한 서열과 인접한 핵산에 상보적으로 결합하면, CRISPR/Cas9 복합체에 의해 상기 표적 핵산이 절단된다. 이때, Cas9 단백질이 인식하는 일정 길이의

뉴클레오타이드 서열은 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)라 한다. 이는 Cas9 단백질의 종류나 기원에 따라 결정되는 서열이다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질은 표적 핵산 내 5'-NGG-3' 서열을 인식할 수 있다. 이때, 상기 N은 A, T, C, 또는 G 중 하나이다. CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하기 위해서는 가이드 RNA의 가이드 도메인이 PAM에 인접한 서열 부분과 상보적으로 결합해야 한다. 여기서, 표적 핵산이 이중가닥 DNA인 경우 가이드 RNA는 PAM이 포함되지 않은 가닥과 상보적으로 결합한다. 이에 대해서는 아래 "표적 가닥, 비표적 가닥" 단락에서 더 자세히 설명한다. 따라서, 상기 가이드 서열 부분은 표적 핵산의 서열, 구체적으로는 PAM 서열과 인접한 서열 부분에 맞추어 설계된다. CRISPR/Cas9 복합체가 상기 표적 핵산을 절단할 때, 표적 핵산의 PAM 서열 부분 및/또는 상기 가이드 도메인과 상보적으로 결합하는 서열 부분 내 임의의 위치가 절단되게 된다.

[150] 표적 가닥, 비표적 가닥

[151] CRISPR/Cas9 복합체는 이중가닥 DNA에 대한 절단 활성을 가진다. 이중가닥 DNA에서, 상기 가이드 도메인과 결합하는 가닥을 표적 가닥(Target Strand; TS)이라 한다. 상기 표적 가닥과는 상보적인 가닥으로, 상기 가이드 도메인과 결합하지 않으며, Cas9 단백질이 인식하는 PAM과 프로토스페이서(protospacer)가 있는 가닥을 비표적 가닥(Non-Target Strand; NTS)라 한다. 상기 가이드 도메인은 상기 비표적 가닥의 프로토스페이서와 동등한 (equivalent) 핵산 서열을 가진다. 상기 가이드 도메인은 상기 표적 가닥의 일정 부분과 상보적인 (complementary) 핵산 서열을 가진다.

[152]

[153] **배경기술 - 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템**

[154] 세포 유전체 편집에 흔히 사용되는 CRISPR/Cas 시스템은 이중가닥 핵산을 표적-특이적으로 절단한다. 다만, 경우에 따라 이중가닥 핵산 전부가 아니라, 한 가닥만을 절단할 필요가 있다. 이때 사용되는 CRISPR/Cas 시스템이 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템이다. 위 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 니케이즈 (nickase), 또는 CRISPR/nCas 시스템이라고 지칭하기도 한다. 위 니케이즈는 이중가닥 핵산 (예를 들어, 이중가닥 DNA)를 표적-특이적으로 인식하되, 이중가닥 핵산 중 한 가닥만을 절단한다. 위 CRISPR/nCas 시스템은 일반적으로 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 Cas 단백질의 일부 도메인을 인위적으로 변형하여 제조한다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질의 아미노산 서열 중 840번째 히스티딘을 알라닌으로 치환하거나 (H840A 변이), 10번째 아스파르트산을 알라닌으로 치환하는 경우 (D10A 변이), Cas9 단백질의 각 핵산 가닥을 절단하는 도메인 중 하나가 불활성화되어, 니케이즈로 활용할 수 있음이 알려져 있다.

[155]

[156] **배경기술 - PARP**

[157] PARP 개괄

[158] Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)는 DNA 손상 반응과 수선에 중요한 역할을 하는 단백질 군으로, 주로 세포핵에 존재한다. 인간에게는 17개의 PARP 단백질이 알려져 있으며, 이 중 PARP1과 PARP2가 DNA 수선에 가장 중요한 역할을 한다. PARP는 NAD+를 기질로 사용하여 표적 단백질에 ADP-ribose 중합체를 부착하는 과정인 poly(ADP-ribosyl)ation을 촉매한다. 이 과정은 다양한 세포 기능에 영향을 미치며, 특히 DNA 수선, 전사 조절, 세포 사멸, 염색질 구조 변경 등에 관여한다. 이와 같이, PARP는 게놈 안정성 유지에 중요한 역할을 한다. PARP의 이러한 다양한 기능은 암, 염증, 신경퇴행성 질환 등 여러 질병의 병리학적 과정과 밀접하게 연관되어 있어 중요한 연구 대상이다.

[159] PARP의 주요 기능 - PARP-매개 DNA 수선

[160] PARP는 DNA에 단일가닥 절단 (Single Strand Breaks; SSB)이 발생하면, 이를 감지하고 단일가닥 절단 수선이 일어나도록 한다. 단일가닥 DNA 절단이 발생하면, PARP는 단일가닥 절단 부위에 결합하여 활성화된다. 예를 들어, PARP1은 N 말단의 징크핑거 (Zinc Finger) 도메인을 통해, 그리고 PARP2는 다른 특정 도메인을 통해 손상 부위에 결합한다. 활성화된 PARP는 NAD+를 기질로 활용하여 poly(ADP-ribose) (PAR) 사슬을 합성한다. 합성된 PAR 사슬은 XRCC1, DNA 리가아제 III, DNA 중합효소 베타, 그리고 키나아제 등의 수선 단백질을 손상 부위로 모집한다. 위 다양한 효소들에 의해 단일가닥 절단 부위가 수선되는데, 이를 염기 절제 수선 (Base Excision Repair; BER)이라 한다.

[161] PARP 억제제의 치료적 사용과 그 한계

[162] PARP 억제제를 투여하면, 세포 내에서 PARP-매개 DNA 수선이 억제된다. 난소암, 유방암 등 BRCA1 및 BRCA2에 돌연변이가 발생해 상동 재조합 수선 (Homologous Recombination Repair; HRR) 기전이 제대로 동작하지 않는 암종에 PARP 억제제를 투여하면, 단일가닥 DNA 수선 능력까지 억제되어 유전체 손상이 누적되고, 결과적으로 암세포가 사멸되는 효과가 있다. 이를 합성 치사 (synthetic lethality)라 일컫는다. 현재 FDA 승인을 받은 PARP 억제제로는 올라파립 (Olaparib), 루카파립 (Rucaparib), 니라파립 (Niraparib) 등이 있다. 이들은 단독으로, 또는 다른 항암제와 병용하여 사용된다. 하지만, PARP 억제제는 1) BRCA 돌연변이가 없는 암종에는 효과가 제한적이고, 2) 장기간 사용 시 암세포가 내성이 생길 수 있으며, 3) 암세포를 사멸시킬 정도의 용량으로 투여하는 경우 골수억제, 피로, 구토, 빈혈, 혈소판 감소증 등의 심각한 부작용이 나타날 수 있다는 문제가 있다.

[163]

[164] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 사용하는 표적 세포 사멸 방법**

[165] 표적 세포 사멸 방법 개괄

[166] 이 명세서에서는 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 사용하는 표적 세포 사멸 방법을 개시한다. 구체적으로, 상기 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 표적 세포에 전달하는 과정을 포함한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 표적 세포의 유전체 내 3군데 이상을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킨다. 상기 PARP 억제제는 위에서 설명한 PARP의 작용을 억제한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 표적 세포 내에서 함께 작용하여 표적 세포가 사멸한다. 이 명세서의 발명자들은 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하면 세포 유전체 내 3군데 이상에서 이중가닥 핵산 절단이 일어나고, 이로 인해 세포가 사멸한다고 추측한다.

[167] 표적 세포 사멸 방법을 설명하기 위한 주요 개념

[168] (i) 표적 세포는 유전체 (genome) 내에 3개 이상의 표적 핵산을 가진다. 각각의 표적 핵산들은 동일한 핵산 서열을 가질 수도 있고, 서로 다른 핵산 서열을 가질 수도 있다.

[169] (ii) 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 한 단위 이상의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다. 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 핵산 서열을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 발생시킨다. 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 3개 이상의 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 발생시키기 충분한 단위 수의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다.

[170] (iii) 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 표적 세포에 전달되면, 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단이 발생한다.

[171] (iv) PARP 억제제는 세포 내에서 PARP의 기능을 억제한다.

[172] (v) PARP 억제제가 표적 세포에 전달되면, 표적 세포의 PARP-매개 단일가닥 핵산 수선 기전을 억제한다.

[173] (vi) 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 모두 전달된 표적 세포는 사멸한다.

[174] 이하, 주요 개념들을 더 구체적으로 설명한다.

[175] 표적 세포

[176] 이 명세서에서 개시하는 표적 세포 사멸 방법에서 사멸 대상이 되는 세포를 표적 세포라고 한다. 상기 표적 세포 사멸 방법에서 죽이고자 하는 표적 세포의 종류는 달리 제한되지 않는다. 상기 표적 세포는 유전체 내에 3개 이상의 표적 핵산을 가진다. 표적 핵산에 대해서는 아래 단락에서 더 구체적으로 설명한다. 즉, 상기 표적 세포는 상기 세포 사멸 방법을 사용하는 용도와 목적에 따라 적절하게 선택된다. 예를 들어, 상기 표적 세포는 암세포 또는 노화 세포일 수 있다.

[177] 표적 핵산

[178] 표적 핵산은 특정 위치의, 특정 서열을 가지는 핵산 영역을 지칭한다. 이 명세서에서 상기 표적 핵산은 핵산 서열과 그 위치를 모두 포괄하는 개념으로 사용한다. 예를 들어, 특정 대상에 포함된 표적 핵산이라 하면, (i) 특정 대상의, (ii) 특정

위치의 염기를 시작점으로 하고, (iii) 특정 위치의 염기를 끝점으로 하는 핵산 영역으로 특정할 수 있다. 여기서, 염기 대신 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 특정할 수 있고, 맥락 상 적절하게 해석한다. 특정 대상은 예를 들어 특정 세포의 유전체 (genome), 특정 염색체 (chromosome), 특정 유전자 (gene), 또는 특정 유전적 영역 (genetic region)일 수 있으며, 위치와 서열을 특정할 수 있으면 무엇이든 될 수 있다. 상기 시작점의 염기에서부터 상기 끝점의 염기까지 연속된 염기의 종류를 나열한 서열을 표적 핵산의 서열이라고 한다. 상기 시작점의 염기에서부터 상기 끝점의 염기까지 연속된 염기의 수를 표적 핵산의 길이라고 한다. 표적 핵산은 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산을 지칭할 수 있다. 이는 어떤 맥락에서 표적 핵산을 정의하느냐에 따라 달라진다. 표적 핵산이 이중가닥 핵산을 지칭하는 경우라도 편의 상 한 가닥을 기준으로 서술한다. 하지만, 이와 상보적인 다른 가닥 또한 포함한다고 이해해야 한다.

[179] 표적 세포가 유전체 내에 3개 이상의 표적 핵산을 가짐

[180] 표적 세포가 유전체 내에 3개 이상의 표적 핵산을 가진다고 함은, 표적 세포의 유전체 내에서 3개 이상의 서로 다른 표적 핵산을 정의할 수 있다는 의미이다. 상기 표적 세포 사멸 방법을 사용하기 위해서는, 표적 세포의 유전체 내에서 적어도 3개 이상의 표적 핵산을 특정해야 한다. 위에서 설명한 바, 각각의 표적 핵산의 서열은 동일할 수도 있으나, 그 위치는 각각 다르다.

[181] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물

[182] 상기 표적 세포 사멸 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 사용한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 표적 세포에 전달되면, 상기 표적 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으킨다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 한 단위 이상의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다. 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 핵산 서열을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 3개 이상의 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 발생시키기 충분한 단위 수의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다양하게 구현될 수 있다. 구체적인 내용은 "세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물" 단락, 그리고 "발명의 가능한 실시예" 중 "세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물" 단락에서 설명한다.

[183] PARP 억제제

[184] 상기 표적 세포 사멸 방법은 PARP 억제제를 사용한다. 상기 PARP 억제제는 위에서 설명한 PARP의 기능, 특히 단일가닥 절단 수선 기능을 억제한다. 상기 PARP 억제제는 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 표적 세포 유전체에 단일가닥 핵산 절단을 일으켰을 때, PARP-매개 단일가닥 수선이 일어나지 못하도록 방해한다. 이 명세서에서 사용하는 PARP 억제제는 PARP의 단일가닥 절단 수선 기능을 억제하는 한, 그 형태나 구성, 종류가 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기

PARP 억제제는 올라파립 (Olaparib), 루카파립 (Rucaparib), 니라파립 (Niraparib), 벨리파립 (Veliparib), 또는 이니파립 (Iniparib)일 수 있다.

[185] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함

[186] 표적 세포를 죽이기 위해서는 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 표적 세포에 전달되어야 한다. 위 목적을 달성하도록 하는 한, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제를 표적 세포에 전달하는 방법은 달리 제한되지 않는다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제는 함께, 또는 독립적으로 표적 세포에 전달할 수 있으며, 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[187] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 작용하여 세포를 죽임

[188] 실험 결과, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 전달된 표적 세포만이 사멸된다. 따라서, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 작용하여 세포를 죽인다고 결론내릴 수 있다.

[189] 이 명세서의 발명자들은 다음 원리로 세포가 사멸한다고 본다:

[190] (a) 표적 세포에 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 전달되면, 상기 표적 세포의 유전체 내 3군데 이상에서 단일가닥 핵산 절단이 일어난다;

[191] (b) 표적 세포에 PARP 억제제가 전달되면, 표적 세포 내 PARP-매개 단일가닥 핵산 수선 기전이 억제된다;

[192] (c) 따라서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 표적 세포에 전달되면, 표적 세포의 유전체 내 3군데 이상에서 단일가닥 핵산 절단이 일어나나, PARP-매개 단일가닥 핵산 수선 기전이 억제되어 절단된 핵산이 제대로 수복되지 못한다;

[193] (d) 단일가닥 핵산 절단이 발행했을 때, PARP-매개 단일가닥 핵산 수선 기전이 기능하지 않으면, 해당 단일가닥 핵산 절단은 이중가닥 핵산 절단으로 발전한다고 알려져 있다 (논문출처);

[194] (e) 결론적으로, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 표적 세포에 전달되면 세포의 유전체 내 3군데 이상에서 이중가닥 핵산 절단이 일어나고, 이로 인해 세포가 사멸한다.

[195] 세포 사멸 방법의 장점 #1 - 표적 세포 사멸 효과가 뛰어남

[196] 이 명세서에서 개시하는 세포 사멸 방법을 사용하면 표적 세포를 효율적으로 죽일 수 있다. 특히, 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 세포를 사멸시키는 종래 기술과 비교하여 동등 이상의 세포 사멸 효과를 보인다.

[197] 세포 사멸 방법의 장점 #2 - 표적 세포만 선택적으로 사멸시킴

[198] 이 명세서에서 개시하는 세포 사멸 방법은 표적 세포만을 선택적으로 사멸시킨다. 이 명세서의 발명자들은 상기 세포 사멸 방법이 표적 세포가 아닌 세포 (비표적 세포)는 사멸시키지 않고, 표적 세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있음을 실

험을 통해 입증했다. 상기 세포 사멸 방법은 비표적 세포에 원치 않는 세포 독성을 보이지 않으며, 이는 이 기술을 치료제로 응용할 때 큰 장점이다.

[199] 세포 사멸 방법의 장점 #3 - 비표적 세포에 원치 않는 영향을 미치지 않음

[200] 위 세포 사멸 방법을 사용할 때, 비표적 세포에 영향을 미칠 수 있는 경우는 다음과 같다:

[201] (i) 비표적 세포에 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 전달됨; (ii) 비표적 세포에 PARP 억제제가 전달됨; 또는 (iii) 비표적 세포에 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 전달됨;

[202] (i)의 경우, 비표적 세포는 표적 핵산을 포함하지 않으므로, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물에 의해 영향을 받지 않는다. 설사 표적 핵산이 아닌 핵산을 잘못 인식하여 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 작동한다고 하더라도, 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템은 세포 유전체에 원치 않는 돌연변이를 도입할 확률이 낮다는 사실이 잘 알려져 있다.

[203] (ii)의 경우, 비표적 세포에 PARP 억제제가 미치는 영향이 문제될 수 있다. 하지만, 본 명세서의 발명자들은 PARP 억제제를 일반적인 세포에 영향을 미치지 않을 만큼 적은 용량으로 사용해도, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 함께 사용하면 세포 사멸 효과를 일으킬 수 있음을 밝혔다. 따라서, 위 세포 사멸 방법에 따르면, PARP 억제제가 비표적 세포에 전달되더라도 별다른 부작용이 발생하지 않는다.

[204] (iii)의 경우, (i)의 경우와 유사하게, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 비표적 세포에서 문제를 일으킬 확률이 낮다. 나아가, 본 명세서의 발명자들은 PARP 억제제와 CRISPR/nCas 시스템이 함께 도입되는 경우, 표적 핵산에 돌연변이 (즉, 인델)를 도입하는 비율이 CRISPR/nCas 시스템만 도입될 때보다도 더 낮아짐을 밝혔다. 따라서, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 표적 핵산이 아닌 핵산을 잘못 인식하여 작동하더라도, 비표적 세포의 유전체에 원치 않는 돌연변이를 도입할 확률은 현저히 낮을 것이다.

[205] (iii)의 경우에서, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 표적 핵산이 아닌 핵산을 잘못 인식하여 작동하고, PARP 억제제와 같이 동작하여 이중가닥 핵산 절단으로 발전하도록 유도할 때가 문제될 수 있다. 하지만, 표적 핵산이 아닌 핵산을 잘못 인식하여 작동할 확률 자체가 높지 않고, 일정 수 이상의 이중가닥 핵산 절단이 발생해야 세포가 사멸하기 때문에, 표적 핵산이 아닌 핵산을 잘못 인식하여 CRISPR/nCas 조성물이 작동해서 비표적 세포가 사멸될 확률은 거의 없다. 실제로, 발명자들은 실험을 통해 비표적 세포에 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 전달되더라도 비표적 세포를 사멸시키지 않음을 밝혔다.

[206] 종합하면, 위 (i) 내지 (iii)의 어떤 경우라도, 비표적 세포에 도입된 CRISPR/nCas 조성물 내지 PARP 억제제가 세포 독성을 일으키거나, 또는 비표적 세포 유전체 내에 원치 않는 돌연변이를 도입할 확률은 현저히 낮다.

[207]

[208] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물**

[209] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 개괄

[210] 이 명세서에서 개시하는 표적 세포 사멸 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 사용한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포의 유전체 내 3군데 이상에서 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 한 단위 이상의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다. 상기 표적 세포의 유전체에서 특정된 표적 핵산에 따라 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 다양하게 구현될 수 있다. 이를 설명하기 위해, 먼저 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템에 대해 설명하고, 이를 이용하여 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 어떻게 구현되는 지 설명한다.

[211] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 개괄

[212] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 개념적으로 한 종류의 핵산 서열을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있는 CRISPR/Cas 시스템을 의미한다. 위 CRISPR/nCas 시스템은 핵산에 직접 작용하여 단일가닥 핵산을 절단할 수 있는 RNA-단백질 복합체 뿐 아니라, 상기 RNA-단백질 복합체가 세포 내에서 발현될 수 있도록 하는 다양한 구현 형태를 모두 포괄한다.

[213] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 - 한 단위의 의미

[214] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 핵산 서열을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있는 CRISPR/Cas 시스템을 의미한다. 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 가이드 RNA, 그리고 한 종류의 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 포함한다. 한 단위로 표현하는 이유는 복수의 가이드 RNA 또는 복수의 Cas 단백질을 지칭할 때와 구분하기 위함이다. 예를 들어, 100개의 가이드 RNA 분자와 50개의 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질 분자가 각각 존재하더라도, 각각의 가이드 RNA 서열과 각각의 Cas 단백질 서열이 모두 동일하다면 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템으로 지칭한다.

[215] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 구성 #1 - 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질

[216] 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 포함한다. 상기 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질은 니케이즈 (nickase) 또는 nCas 단백질이라고도 지칭한다. 상기 단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질에 대해서는 "배경기술 - 단일가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 시스템"에서 설명하였다.

[217] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 구성 #2 - 가이드 RNA

[218] 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 가이드 RNA를 포함한다. 상기 가이드 RNA는 상기 nCas 단백질과 상호작용하여 복합체를 이루는 스캐폴드, 그리고 특정 핵산 서열을 인식할 수 있는 가이드 도메인을 포함한다. 상기 스캐폴드와 상기 가이드 도메인의 연결 구조는 상기 가이드 RNA와 복합체를 형성할 수 있는 상기 nCas 단백질의 종류에 따라 달라진다. 예를 들어, 상기 nCas 단백질

이 Cas9 단백질 또는 Cas9 단백질의 변이체라면, 상기 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 상기 가이드 도메인과 상기 스캐폴드가 순차적으로 연결된 구조이다. 또 다른 예를 들어, 상기 nCas 단백질이 Cas12a 단백질 또는 Cas12a 단백질의 변이체라면, 상기 가이드 RNA는 5'말단에서 3'말단 방향으로 상기 스캐폴드와 상기 가이드 도메인이 순차적으로 연결된 구조이다.

[219] 가이드 RNA #1 - 스캐폴드

[220] 상기 가이드 RNA는 스캐폴드를 포함한다. 상기 스캐폴드는 상기 가이드 RNA가 상기 nCas 단백질과 상호작용하여 복합체를 이루도록 한다. 상기 nCas 단백질의 종류에 따라 이와 상호작용하는 가이드 RNA의 스캐폴드의 핵산 서열이 달라진다. CRISPR/Cas 시스템의 가이드 RNA에 대해서는 매우 잘 알려져 있으므로, 통상의 기술자라면 이 명세서에서 스캐폴드라고 지칭하는 부분이 어느 부분인 지 쉽게 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 상기 nCas 단백질이 Cas9 단백질, 또는 Cas9 단백질의 변이체라면, 상기 스캐폴드는 tracrRNA, 그리고 crRNA 중 직접 반복부 (direct repeat)을 포함한다. 또 다른 예를 들어, 상기 nCas 단백질이 Cas12a 단백질, 또는 Cas12a 단백질의 변이체라면, 상기 스캐폴드는 crRNA 중 직접 반복부를 포함한다. 경우에 따라 상기 스캐폴드는 단일 분자로 구성되어 있을 수 있고, 두 개 이상의 분자를 포괄할 수도 있다.

[221] 가이드 RNA #2 - 가이드 도메인

[222] 상기 가이드 RNA는 가이드 도메인을 포함한다. 상기 가이드 도메인은 특정 핵산 서열을 인식할 수 있도록 설계된다. 구체적으로, 상기 가이드 도메인은 표적 핵산의 전부 또는 일부와 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된다. 상기 nCas 단백질이 PAM 서열을 인식하고, 상기 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 PAM 서열 근처의 핵산 서열을 인식하면, CRISPR/nCas 시스템이 기능하여 단일가닥 핵산 절단이 일어난다. 상기 가이드 도메인의 다양한 구현은 "발명의 가능한 실시예" 중 "가이드 도메인" 단락에 서술하였다.

[223] 가이드 RNA #3 - 기타 도메인

[224] 상기 가이드 RNA는 스캐폴드와 가이드 도메인 외 하나 이상의 다른 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 기타 도메인들은 목적에 따라 채택되며, 적절한 위치에 배치된다. 예를 들어,

[225] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템의 형태 #1 - 단백질-RNA 복합체

[226] 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA가 복합체를 이룬 단백질-RNA 복합체를 지칭할 수 있다. 상기 단백질-RNA 복합체는 CRISPR/nCas 복합체 (CRISPR/nCas complex) 또는 리보뉴클레오프로틴 (RiboNucleoProtein; RNP)으로도 지칭할 수 있다. 상기 단백질-RNA 복합체는 표적 핵산과 접촉하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있다.

[227] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템의 형태 #2 - 벡터 또는 암호화 핵산

[228] 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA 각각을 발현할 수 있는 벡터, 또는 상기 각각을 암호화하는 핵산을 지칭할 수 있

다. 상기 벡터 또는 상기 암호화 핵산을 통틀어 CRISPR/nCas 벡터로 지칭할 수 있다. 상기 CRISPR/nCas 벡터는 표적 세포에 도입되었을 때, 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA 각각을 발현할 수 있도록 구성되었다.

[229] 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템의 형태 #3 - 조성물

[230] 상기 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 다음을 포함하는 조성물을 지칭할 수 있다: nCas 단백질 또는 상기 nCas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산. 상기 조성물을 CRISPR/nCas 조성물로 지칭할 수 있다. 상기 CRISPR/nCas 조성물이 표적 세포에 도입되면, 표적 세포의 유전체와 CRISPR/nCas 복합체가 접촉할 수 있다.

[231] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 - 한 단위 이상의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[232] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 한 단위 이상의 CRISPR/nCas 시스템을 포함한다. 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 특정 핵산 서열을 포함하는 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 몇 단위의 CRISPR/nCas 시스템을 포함하는 지는 표적 세포의 유전체 내에서 특정된 표적 핵산의 개수, 그리고 서로 다른 표적 핵산 서열의 수에 따라 달라진다. 위 각각의 CRISPR/nCas 시스템은 서로 독립적으로 1) 단백질-RNA 복합체, 2) 벡터 또는 암호화 핵산, 3) 조성물, 또는 4) 위 형태의 적절한 조합일 수 있다. 달리 표현해, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다양한 형태의 CRISPR/nCas 시스템을 포함할 수 있다.

[233] 예를 들어, 상기 특정된 표적 핵산이 4개이고, 모든 표적 핵산의 서열이 다를 때, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 네 단위의 CRISPR/nCas 시스템을 포함할 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 특정된 표적 핵산이 5개이고, 모든 표적 핵산의 서열이 동일할 때, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템을 포함할 수 있다.

[234]

[235] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 전달하는 과정**

[236] 전달 과정 개괄

[237] 이 명세서에서 개시하는 표적 세포 사멸 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 표적 세포에 전달하는 과정을 포함한다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 전달함은 표적 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으키기 위함이다. 상기 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함은 상기 표적 세포 내에서 PARP-매개 단일가닥 핵산 수선이 일어남을 억제하기 위함이다. 위 목적을 달성할 수 있는 한, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 전달하는 과정, 그리고 상기 PARP 억제제를 전달하는 과정은 다양하게 구현될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제를 함께 표적 세포에 전달할 수 있다. 이 때, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제를 복합 제제화하여 사용할 수 있다. 또 다른 예

를 들어, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제를 각각 독립적으로 표적 세포에 전달할 수 있다.

[238] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제의 복합 제제 전달

[239] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 전달하는 과정은 위 둘을 함께 표적 세포에 전달하는 방법으로 구현될 수 있다. 나아가, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 함께 전달하기 위해, 위 둘을 복합 제제화 할 수 있다.

[240] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 전달

[241] 상기 표적 세포 사멸 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 각각 독립적으로 표적 세포에 전달하는 과정으로 구현될 수 있다. 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 전달하는 방법은 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 표적 세포에 전달하는 목적이 달성되는 한, 달리 제한되지 않는다. 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 공지된 기술을 적절히 활용하여 전달할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 단백질-RNA 복합체를 포함하는 경우, 또 다른 예를 들어, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 벡터 또는 암호화 핵산을 포함하는 경우,

[242] PARP 억제제 전달

[243] 상기 표적 세포 사멸 방법은 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 각각 독립적으로 표적 세포에 전달하는 과정으로 구현될 수 있다. 여기서, 상기 PARP 억제제를 전달하는 방법은 상기 PARP 억제제를 표적 세포에 전달하는 목적이 달성되는 한, 달리 제한되지 않는다. 상기 PARP 억제제를 공지된 기술을 적절히 활용하여 전달할 수 있다.

[244]

[245] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 사용하는 세포 사멸 방법의 활용**

[246] 이 명세서에서 개시하는 세포 사멸 방법은 표적 세포 특이적인 표적 핵산을 3개 이상 특정 가능한 경우, 표적 세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 따라서, 상기 표적 세포 사멸 방법은 종양 세포, 노화 세포, 기타 유전체에 돌연변이가 발생한 세포를 제거하는 데 응용될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 사멸 방법은 암 환자의 치료에 응용될 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 세포 사멸 방법은 대상의 노화 세포 제거에 응용될 수 있다.

[247]

[248] 발명의 가능한 실시예

[249] **nCas 단백질**

[250] 실시예 1, nCas 단백질

[251] 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 Cas 단백질로, 다음 중 선택된 어느 하나로 지칭됨:

[252] 단일가닥 핵산 절단 활성을 가지는 Cas 단백질; 니케이즈 (nickase) 활성을 가지는 Cas 단백질; 니케이즈; 그리고 nCas 단백질.

[253] 실시예 2, Cas 단백질 예시

[254] 실시예 1에 있어서, 상기 nCas 단백질은 다음 중 선택된 Cas 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체임:

[255] Cas12a (Cpf1); Cas12b1 (C2c1); Cas12c (C2c3); Cas12e (CasX); Cas12d (CasY); Cas12g; Cas12h; Cas12i; Cas1; Cas1B; Cas2; Cas3; Cas4; Cas5; Cas6; Cas7; Cas8; Cas9 (또한 Csn1 및 Csx12로도 공지됨); Cas10; Csy1; Csy2; Csy3; Cse1; Cse2; Csc1; Csc2; Csa5; Csn2; Csm2; Csm3; Csm4; Csm5; Csm6; Cmr1; Cmr3; Cmr4; Cmr5; Cmr6; Csb1; Csb2; Csb3; Csx17; Csx14; Csx10; Csx16; CsaX; Csx3; Csx1; Csx15; Csf1; Csf2; Csf3; Csf4; Cas13a (C2c2); Cas13b; Cas13c; Cas13d; Cas14; xCas9; 원형 순열 Cas9; 그리고 또는 아르고노트 (Ago) 도메인.

[256] 실시예 3, Cas9 한정

[257] 실시예 2에 있어서, 상기 nCas 단백질은 Cas9 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체임.

[258] 실시예 4, SpCas9 변이체 한정

[259] 실시예 3에 있어서, 상기 nCas 단백질은 스트렙토코커스 피요게네스 (Streptococcus pyogenes) 유래 Cas9 단백질의 변이체로, 다음 중 선택된 돌연변이를 포함함:

[260] 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로, D10A 변이; 그리고 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로, H840A 변이.

[261] 실시예 5, PAM 한정

[262] 실시예 4에 있어서, 상기 nCas 단백질은 5'-NGG-3'의 프로토스페이서 인접 모티프 (Protospacer Adjacent Motif; PAM)을 인식함.

[263] 실시예 6, Cas12a 한정

[264] 실시예 2에 있어서, 상기 nCas 단백질은 Cas12a 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체임.

[265] 실시예 7, AsCas12a 변이체 한정

[266] 실시예 6에 있어서, 상기 nCas 단백질은 아시다미노코쿠스 종 (Acidaminococcus species) 유래 Cas12a 단백질의 변이체로, 다음의 돌연변이를 포함함:

[267] 서열번호 11의 아미노산 서열을 기준으로, R1226A 변이.

[268] 실시예 8, nCas 단백질 서열 한정

[269] 실시예 1 내지 실시예 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 nCas 단백질은 IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK
RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTE
VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV
AYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPI
DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGE

LQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRD
KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTST
KEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD(서열번호 2),
IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQT
GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL
EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK
GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH
KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPI
REQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV
LDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD(서열번호 3), 및
KLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLF
YVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKN
ETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELI
ALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVL
QMANSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDAD
ANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN(서열번호 12) 중 선택된 아미노산 서열을 포함함.

[270] 실시예 9, NLS 포함

[271] 실시예 1 내지 실시예 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 nCas 단백질은 하나 이상의 핵 위치 신호 (Nuclear Localization Signal; NLS)를 더 포함함.

[272] 실시예 10, NLS 포함 구조 한정

[273] 실시예 9에 있어서, 상기 nCas 단백질은 다음 구조를 가짐:

[274] $[NLS_1]$-[nCas]-$[NLS_2]$

[275] 상기 NLS_1은 제1 핵 위치 신호이거나, 부존재하고,

[276] 상기 nCas는 실시예 1 내지 실시예 8 중 어느 하나의 nCas 단백질이고,

[277] 상기 NLS_2는 제2 핵 위치 신호이거나, 부존재하고,

[278] 여기서, 상기 NLS_1 또는 NLS_2 중 적어도 하나는 반드시 존재함.

[279] 실시예 11, NLS 서열 예시

[280] 실시예 9 또는 실시예 10 중 어느 하나에 있어서,

[281] 상기 핵 위치 신호는 PKKKRKV(서열번호 13), KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호 14), PAAKRVKLD(서열번호 15), RQRRNELKRSP(서열번호 16), NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(서열번호 17), RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(서열번호

18), VSRKRPRP(서열번호 19), PPKKARED(서열번호 20), PQPKKKPL(서열번호 21), SALIKKKKKMAP(서열번호 22), DRLRR(서열번호 23), PKQKKRK(서열번호 24), RKLKKKIKKL(서열번호 25), REKKKFLKRR(서열번호 26), KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK(서열번호 27), 및 RKCLQAGMNLEARKTKK(서열번호 28) 중 선택된 아미노산 서열이거나, 위 아미노산 서열의 임의의 조합임.

[282] 실시예 12, 유사한 서열 한정

[283] 실시예 1 내지 실시예 11 중 어느 하나의 nCas 단백질과 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 상동성 있는 (homologous) 아미노산 서열을 가지는 nCas9 단백질.

[284]

[285] **가이드 RNA**

[286] 실시예 13, 가이드 RNA #1

[287] 다음을 포함하는 가이드 RNA:

[288] 스캐폴드 (scaffold); 그리고

[289] 가이드 도메인 (guide domain),

[290] 여기서, 상기 가이드 도메인은 표적 핵산을 표적함.

[291] 실시예 14, 가이드 RNA #2

[292] 다음을 포함하는 가이드 RNA:

[293] tracrRNA; 그리고

[294] 직접 반복부 (direct repeat)와 가이드 도메인 (guide domain)을 포함하는 crRNA,

[295] 여기서, 상기 tracrRNA와 상기 crRNA의 직접 반복부를 통틀어 스캐폴드라 지칭하고,

[296] 상기 가이드 도메인은 표적 핵산을 표적함.

[297] 실시예 15, 가이드 RNA #3

[298] 다음을 포함하는 가이드 RNA:

[299] 직접 반복부 (direct repeat)와 가이드 도메인 (guide domain)을 포함하는 crRNA,

[300] 여기서, 직접 반복부를 스캐폴드라 지칭하고,

[301] 상기 가이드 도메인은 표적 핵산을 표적함.

[302] 실시예 16, 스캐폴드 기능 한정

[303] 실시예 13 내지 실시예 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 스캐폴드는 실시예 1 내지 실시예 12 중 어느 하나의 nCas 단백질과 상호작용하며,

[304] 상기 가이드 RNA가 상기 nCas 단백질과 복합체를 이루도록 함.

[305] 실시예 17, 싱글 가이드 RNA, 또는 듀얼 가이드 RNA

[306] 실시예 13 내지 실시예 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 RNA는 한 분자의 RNA, 또는 두 분자의 RNA임.

[307] 실시예 18, 표적 서열을 표적함

[308] 실시예 13 내지 실시예 17 중 어느 하나에 있어서,

[309] 상기 표적 핵산이 표적 가닥과 비표적 가닥을 포함하는 이중가닥 DNA일 때,

[310] 상기 가이드 도메인이 표적 핵산을 표적함은 다음 중 선택된 의미임:

[311] 상기 가이드 도메인의 서열이 상기 비표적 가닥의 전부 또는 일부 서열과 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 동일하거나 (same), 또는 동등함 (equivalent);

[312] 상기 가이드 도메인이 상기 표적 가닥과 혼성화되거나 (hybridized), 결합 (bind) 할 수 있음; 그리고

[313] 상기 가이드 도메인의 서열이 상기 표적 가닥의 전부 또는 일부 서열과 상보적임 (complementary).

[314] 실시예 19, 가이드 도메인 길이

[315] 실시예 13 내지 실시예 18 중 어느 하나에 있어서,

[316] 상기 가이드 도메인의 길이는,

[317] 12nt, 13nt, 14nt, 15nt, 16nt, 17nt, 18nt, 19nt, 20nt, 21nt, 22nt, 23nt, 24nt, 25nt, 26nt, 27nt, 28nt, 29nt, 또는 30nt 이거나,

[318] 전술한 두 수치범위 이내임 (예를 들어, 18nt 내지 22nt).

[319] 실시예 20, 가이드 도메인 미스매치

[320] 실시예 13 내지 실시예 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 상기 표적 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적이되,

[321] 0개, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 미스매치를 포함함.

[322] 실시예 21, 가이드 도메인 상동성

[323] 실시예 13 내지 실시예 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 가이드 도메인은 상기 표적 핵산과 혼성화되거나 결합할 수 있으며,

[324] 상기 가이드 도메인의 서열은 상기 표적 핵산의 서열과,

[325] 약 80% 이상, 약 81% 이상, 약 82% 이상, 약 83% 이상, 약 84% 이상, 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 동일하거나 (same), 또는 동등함 (equivalent).

[326] 실시예 22, SpCas9 가이드 RNA #1 - 싱글 가이드 RNA

[327] 실시예 13 내지 실시예 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 스캐폴드는 다음 중 선택된 핵산 서열을 포함함:

[328] GUUUCAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUGAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGC(서열번호 4), GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAG CAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열번호 5),

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열번호 6), GCACCGACUCGGUGCCACUUUUUCAAGUUGAUAACGGACUAG CCUUAUUUUAACUUGCUAUUUCUAGCUCUAAAAC(서열번 호 7), 및 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUU(서열번호 8) 중 선택된 어느 하나의 핵산 서열; 그리고

[329] 서열번호 4 내지 서열번호 8 중 선택된 어느 하나의 핵산 서열과 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 동등하거나 (equivalent), 유사한 (similar) 서열.

[330] 실시예 23, SpCas9 가이드 RNA #2 - tracrRNA, 직접 반복부 따로 정의

[331] 실시예 13 내지 실시예 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 스캐폴드는 tracrRNA와 직접 반복부를 포함하고,

[332] 상기 tracrRNA는 UAGCAAGUUAAAAAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열번호 9)의 핵산 서열을 포함하거나,

[333] 서열번호 9의 핵산 서열과 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 동등하거나 (equivalent), 유사한 (similar) 서열을 포함하고,

[334] 상기 직접 반복부는 GUUUUAGAGCUA(서열번호 10)의 핵산 서열을 포함하거나,

[335] 서열번호 10의 핵산 서열과 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 일치하거나 (identical), 매치되거나 (matched), 동등하거나 (equivalent), 유사한 (similar) 서열을 포함함.

[336]

[337] **CRISPR/nCas 시스템**

[338] 실시예 24, CRISPR/nCas 복합체

[339] 다음을 포함하는 CRISPR/nCas 복합체:

[340] 실시예 1 내지 실시예 12 중 어느 하나의 nCas 단백질; 그리고

[341] 실시예 13 내지 실시예 23 중 어느 하나의 가이드 RNA,

[342] 여기서, 상기 가이드 RNA의 스캐폴드는 상기 nCas 단백질과 상호작용하여 복합체를 형성하고,

[343] 상기 CRISPR/nCas 복합체는 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키며,

[344] 상기 CRISPR/nCas 복합체는 RNA-단백질 복합체 (RNA-protein complex), 리보뉴클레오프로틴 (RiboNucleoProtein; RNP), 또는 RNA-유도 니케이즈 (RNA-guided nickase)로도 지칭됨.

[345] 실시예 25, CRISPR/nCas 벡터

[346] 다음을 포함하는, CRISPR/nCas 시스템의 각 구성요소를 발현하는 벡터:

[347] 실시예 1 내지 실시예 12 중 어느 하나의 nCas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고

[348] 실시예 13 내지 실시예 23 중 어느 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 핵산,

[349] 여기서, 상기 CRISPR/nCas 시스템의 각 구성요소를 발현하는 벡터는 세포 내에서 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA를 발현하도록 구성되었고,

[350] 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA는 복합체를 형성할 수 있고,

[351] 상기 CRISPR/nCas 복합체는 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있으며,

[352] 상기 CRISPR/nCas 시스템의 각 구성요소를 발현하는 벡터는 CRISPR/nCas 암호화 핵산, 또는 CRISPR/nCas 벡터로도 지칭됨.

[353] 실시예 26, 바이러스 벡터

[354] 실시예 25에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 벡터는 바이러스 벡터임.

[355] 실시예 27, 바이러스 벡터 예시

[356] 실시예 26에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 다음 중 선택됨:

[357] 렌티바이러스 (Lentivirus); 아데노-연관 바이러스 (Adeno-Associate Virus; AAV); 아데노바이러스 (Adenovirus); 레트로바이러스 (Retrovirus); 백시니아바이러스 (Vaccinia Virus); 폭스바이러스 (Poxvirus); 단순포진 바이러스 (Herpes Simplex Virus; HSV); 또는 위 바이러스들의 임의의 조합.

[358] 실시예 28, 비-바이러스 벡터

[359] 실시예 25에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 벡터는 비-바이러스 벡터임.

[360] 실시예 29, 비-바이러스 벡터 예시

[361] 실시예 28에 있어서, 상기 비-바이러스 벡터는 다음 중 선택됨:

[362] 플라스미드 (Plasmid); 파지 (Phage); 네이키드 DNA (Naked DNA); DNA 복합체 (DNA complex); 환형 단일가닥 DNA (Circular single-stranded DNA); mRNA; 또는 위의 임의의 조합.

[363] 실시예 30, CRISPR/nCas 조성물

[364] 다음을 포함하는, CRISPR/nCas 조성물:

[365] 실시예 1 내지 실시예 12 중 어느 하나의 nCas 단백질, 또는 상기 nCas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고

[366] 실시예 13 내지 실시예 23 중 어느 하나의 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산,

[367] 상기 nCas 단백질과 상기 가이드 RNA는 복합체를 형성할 수 있고,

[368] 상기 CRISPR/nCas 복합체는 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킬 수 있음.

[369] 실시예 31, nCas 단백질 mRNA, 그리고 가이드 RNA 포함

[370] 실시예 30에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물은 nCas 단백질을 암호화하는 RNA, 그리고 가이드 RNA를 포함함.

[371] 실시예 32, 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템

[372] 다음을 포함하는 CRISPR/nCas 시스템:

[373] 실시예 24의 CRISPR/nCas 복합체; 실시예 25 내지 실시예 29의 CRISPR/nCas 벡터; 또는 실시예 30 내지 실시예 31 중 어느 하나의 CRISPR/nCas 조성물,

[374] 여기서, 상기 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 nCas 단백질 또는 상기 nCas 단백질을 암호화는 핵산, 그리고 한 종류의 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 포함함.

[375]

[376] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물**

[377] 실시예 33, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물

[378] 다음을 포함하는 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물:

[379] 한 단위 (종류) 이상의, 실시예 32 중 어느 하나의 CRISPR/nCas 시스템,

[380] 여기서, 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템은 한 종류의 nCas 단백질 또는 이의 암호화 핵산, 그리고 한 종류의 가이드 RNA 또는 이의 암호화 핵산을 포함하는 CRISPR/nCas 시스템을 의미함.

[381]

[382] **PARP 억제제**

[383] 실시예 34, PARP 억제제

[384] Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 억제제.

[385] 실시예 35, PARP 억제제의 주요 기능

[386] 실시예 34에 있어서, 상기 PARP 억제제는 PARP-매개 DNA 수선 기전을 억제함.

[387] 실시예 36, PARP 억제제 예시

[388] 실시예 34 내지 실시예 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 PARP 억제제는 다음 중 선택됨:

[389] 올라파립 (Olaparib); 루카파립 (Rucaparib); 니라파립 (Niraparib); 벨리파립 (Veliparib); 이니파립 (Iniparib); 파미파립 (Pamiparib); 플루조파립 (Fluzoparib); 탈라조파립 (Talazoparib); CEP-9722; E7449 (2X-121); BGB-290; AZD2461; 3-aminobenzamide; INO-1001; 또는 위 물질들의 임의의 조합.

[390] 실시예 37, PARP 억제제를 포함하는 경구 투여용 약학 조성물

[391] 다음을 포함하는 약학 조성물:

[392] 실시예 34 내지 실시예 36 중 어느 하나의 PARP 억제제; 그리고

[393] 경구 투여에 적합한 약학적으로 허용되는 담체.

[394] 실시예 38, 경구 투여용 담체 한정

[395] 실시예 37에 있어서, 상기 경구 투여에 적합한 약학적으로 허용되는 담체는 다음 중 선택됨:

[396] 희석제/충전제 (Dilluents/Fillers), 예를 들어, 미결정셀룰로오스, 무수물 유당, 일수화물 유당, 만니톨, 옥수수 전분, 감자 전분, 전호화 전분, 인산수소칼슘, 및/또는 소르비톨; 결합제 (Binders), 예를 들어, 포비돈 (PVP), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC), 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 젤라틴, 및/또는 아카시아 검; 붕해제 (Disintegrants), 예를 들어, 전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로오스나트륨, 크로스포비돈, 및/또는 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스 (L-HPC); 활택제 (Lubricants), 예를 들어, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 푸마르산스테아릴나트륨, 및/또는 탈크; 유동화제 (Glidants), 예를 들어, 콜로이드성 이산화규소, 및/또는 탈크; 코팅 물질 (Coating materials), 예를 들어, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC), 메타크릴산 공중합체 (유드라짓), 에틸셀룰로오스, 및/또는 폴리비닐알코올 (PVA); 가소제 (Plasticizers), 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 트리아세틴, 및/또는 프로필렌글리콜; 감미제 (Sweeteners), 예를 들어, 자당, 아스파탐, 수크랄로스, 및/또는 자일리톨; 향미제 (Flavoring agents), 예를 들어, 천연 및 인공 향료; 착색제 (Colorants), 예를 들어, 산화철 안료, FD&C 색소, 및/또는 이산화티타늄; pH 조절제 (pH adjusters), 예를 들어, 구연산, 구연산나트륨, 및/또는 타르타르산; 보존제 (Preservatives), 예를 들어, 벤조산나트륨, 및/또는 소르빈산칼륨; 가용화제 (Solubilizers), 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 및/또는 폴리소르베이트 (트윈); 흡수 촉진제 (Absorption enhancers), 예를 들어, 라우릴황산나트륨, 및/또는 레시틴; 서방성 매트릭스 (Sustained-release matrix), 예를 들어, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC), 에틸셀룰로오, 및/또는 카보머; 장용성 코팅 폴리머 (Enteric coating polymers), 예를 들어, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 및/또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트; 점막부착성 폴리머 (Mucoadhesive polymers), 예를 들어, 카보폴, 및/또는 키토산; 항산화제 (Antioxidants), 예를 들어, 부틸화히드록시아니솔 (BHA), 부틸화히드록시톨루엔 (BHT), 및/또는 아스코르브산.

[397] 실시예 39, PARP 억제제를 포함하는 주사제용 약학 조성물

[398] 다음을 포함하는 약학 조성물:

[399] 실시예 34 내지 실시예 36 중 어느 하나의 PARP 억제제; 그리고

[400] 주사제용으로 적합한 약학적으로 허용되는 담체.

[401] 실시예 40, 주사제용 담체 한정

[402] 실시예 39에 있어서, 상기 주사제용으로 적합한 약학적으로 허용되는 담체는 다음 중 선택됨:

[403] 수성 매체 (Aqueous Vehicles), 예를 들어, 주사용수, 생리식염수, 링거 용액, 및/또는 포도당 용액; 비수성 매체 (Non-aqueous Vehicles), 예를 들어, 에틸올레

이트 (Ethyl oleate), 이소프로필미리스테이트 (Isopropyl myristate), 식물성 오일 (Vegetable oils) (참깨유, 옥수수유, 땅콩유 등), 및/또는 중쇄 중성지방 (Medium-chain triglycerides); 공용매 (Cosolvents), 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 에탄올 (Ethanol), 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol, PEG), 및/또는 글리세린 (Glycerin); 계면활성제/유화제 (Surfactants/Emulsifiers), 예를 들어, 폴리소르베이트 (Polysorbates: Tween 80, Tween 20), 소르비탄 에스테르 (Sorbitan esters: Span), 레시틴 (Lecithin), 및/또는 데옥시콜산나트륨 (Sodium deoxycholate); pH 조절제 (pH Adjusters), 예를 들어, 수산화나트륨 (Sodium hydroxide), 염산 (Hydrochloric acid), 구연산/구연산나트륨 완충액 (Citric acid/sodium citrate buffer), 및/또는 인산 완충액 (Phosphate buffers); 등장화제 (Tonicity Adjusters), 예를 들어, 염화나트륨 (Sodium chloride), 포도당 (Dextrose), 만니톨 (Mannitol), 및/또는 글리세린 (Glycerin); 보존제 (Preservatives), 예를 들어, 벤질알코올 (Benzyl alcohol), 페놀 (Phenol), 메틸파라벤 (Methylparaben), 및/또는 프로필파라벤 (Propylparaben); 항산화제 (Antioxidants), 예를 들어, 메타중아황산나트륨 (Sodium metabisulfite), 아스코르브산 (Ascorbic acid), 알파-토코페롤 (Alpha-tocopherol), 및/또는 부틸화히드록시아니솔 (Butylated hydroxyanisole, BHA); 킬레이트화제 (Chelating Agents), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 및/또는 구연산 (Citric acid); 부형제 (동결건조 제형용) (Bulking Agents for lyophilized formulations), 예를 들어, 만니톨 (Mannitol), 유당 (Lactose), 트레할로스 (Trehalose), 및/또는 자당 (Sucrose); 서방성 중합체 (Polymers for Sustained Release), 예를 들어, 폴리(락트산-코-글리콜산) (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리락트산 (Polylactic acid, PLA), 및/또는 키토산 (Chitosan); 점도 증강제 (Viscosity Enhancers), 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 (Sodium carboxymethylcellulose), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC), 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (Polyvinylpyrrolidone, PVP); 리포좀 구성 성분 (Liposomal Components), 인지질 (Phospholipids: 예, 포스파티딜콜린), 및/또는 콜레스테롤 (Cholesterol); 나노입자 구성 성분 (Nanoparticle Components), 예를 들어, 알부민 (Albumin), 및/또는 폴록사머 (Poloxamers); 동결보호제 (Cryoprotectants), 예를 들어, 트레할로스 (Trehalose), 자당 (Sucrose), 및/또는 글리신 (Glycine); 국소 마취제 (주사 통증 감소용) (Local Anesthetics for reducing injection pain), 예를 들어, 리도카인 (Lidocaine), 및/또는 벤질알코올 (Benzyl alcohol); 가용화제 (Solubilizers), 예를 들어, 시클로덱스트린 (Cyclodextrins) (β-시클로덱스트린, 히드록시프로필-β-시클로덱스트린 등), 및/또는 크레모포 EL (Cremophor EL); 현탁용 기체 (미소구 제형의 경우) (Gas for Suspension in case of microspheres), 질소 (Nitrogen), 및/또는 이산화탄소 (Carbon dioxide); 또는 위의 임의의 조합.

[404] 실시예 41, PARP 억제제 농도

[405] 실시예 34 내지 실시예 36 내지 실시예 40 중 어느 하나에 있어서,

[406] 상기 PARP 억제제는 단독으로는 세포 독성을 보이지 않는 농도임.

[407]

[408] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 포함하는 표적 세포 사멸용 조성물**

[409] 실시예 42, 표적 세포 사멸용 조성물

[410] 다음을 포함하는 표적 세포 사멸용 조성물:

[411] 실시예 33 중 어느 하나의 표적 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물; 그리고

[412] 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제.

[413] 실시예 43, 담체 추가

[414] 실시예 42에 있어서, 상기 표적 세포 사멸용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 더 포함함.

[415] 실시예 44, 담체 예시

[416] 실시예 43에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 담체는 다음 중 선택됨:

[417] 수성 매체 (Aqueous Vehicles), 예를 들어, 주사용수, 생리식염수, 링거 용액, 및/또는 포도당 용액; 비수성 매체 (Non-aqueous Vehicles), 예를 들어, 에틸올레이트 (Ethyl oleate), 이소프로필미리스테이트 (Isopropyl myristate), 식물성 오일 (Vegetable oils) (참깨유, 옥수수유, 땅콩유 등), 및/또는 중쇄 중성지방 (Medium-chain triglycerides); 공용매 (Cosolvents), 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 에탄올 (Ethanol), 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol, PEG), 및/또는 글리세린 (Glycerin); 계면활성제/유화제 (Surfactants/Emulsifiers), 예를 들어, 폴리소르베이트 (Polysorbates: Tween 80, Tween 20), 소르비탄 에스테르 (Sorbitan esters: Span), 레시틴 (Lecithin), 및/또는 데옥시콜산나트륨 (Sodium deoxycholate); pH 조절제 (pH Adjusters), 예를 들어, 수산화나트륨 (Sodium hydroxide), 염산 (Hydrochloric acid), 구연산/구연산나트륨 완충액 (Citric acid/sodium citrate buffer), 및/또는 인산 완충액 (Phosphate buffers); 등장화제 (Tonicity Adjusters), 예를 들어, 염화나트륨 (Sodium chloride), 포도당 (Dextrose), 만니톨 (Mannitol), 및/또는 글리세린 (Glycerin); 보존제 (Preservatives), 예를 들어, 벤질알코올 (Benzyl alcohol), 페놀 (Phenol), 메틸파라벤 (Methylparaben), 및/또는 프로필파라벤 (Propylparaben); 항산화제 (Antioxidants), 예를 들어, 메타중아황산나트륨 (Sodium metabisulfite), 아스코르브산 (Ascorbic acid), 알파-토코페롤 (Alpha-tocopherol), 및/또는 부틸화히드록시아니솔 (Butylated hydroxyanisole, BHA); 킬레이트화제 (Chelating Agents), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 및/또는 구연산 (Citric acid); 부형제 (동결건조 제형용) (Bulking Agents for lyophilized formulations), 예를 들어, 만니톨 (Mannitol), 유당 (Lactose), 트레할로스 (Trehalose), 및/또는 자당 (Sucrose); 서방성 중합체 (Polymers for Sustained Release), 예를 들어, 폴리(락트산-코-글리콜산) (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리락트산 (Polylactic acid, PLA), 및/또는 키토산 (Chitosan); 점도 증강제 (Viscosity Enhancers), 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 (Sodium carboxymethylcellulose), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC), 및/또는 폴리비닐피롤리

돈 (Polyvinylpyrrolidone, PVP); 리포좀 구성 성분 (Liposomal Components), 인지질 (Phospholipids: 예, 포스파티딜콜린), 및/또는 콜레스테롤 (Cholesterol); 나노입자 구성 성분 (Nanoparticle Components), 예를 들어, 알부민 (Albumin), 및/또는 폴록사머 (Poloxamers); 동결보호제 (Cryoprotectants), 예를 들어, 트레할로스 (Trehalose), 자당 (Sucrose), 및/또는 글리신 (Glycine); 국소 마취제 (주사 통증 감소용) (Local Anesthetics for reducing injection pain), 예를 들어, 리도카인 (Lidocaine), 및/또는 벤질알코올 (Benzyl alcohol); 가용화제 (Solubilizers), 예를 들어, 시클로덱스트린 (Cyclodextrins) (β-시클로덱스트린, 히드록시프로필-β-시클로덱스트린 등), 및/또는 크레모포 EL (Cremophor EL); 현탁용 기체 (미소구 제형의 경우) (Gas for Suspension in case of microspheres), 질소 (Nitrogen), 및/또는 이산화탄소 (Carbon dioxide); 또는 위의 임의의 조합.

[418]

[419] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 사용하는 표적 세포 사멸 방법**

[420] 실시예 45, 표적 세포 사멸 방법

[421] 다음을 포함하는 표적 세포 사멸 방법:

[422] 실시예 33 중 어느 하나의 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제를 상기 표적 세포에 전달하는 과정,

[423] 여기서, 상기 CRISPR/nCas 조성물은 상기 표적 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[424] 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 사멸시킴.

[425] 실시예 46, 표적 세포 사멸 방법 #2 - N개의 표적 핵산

[426] 실시예 45에 있어서, 상기 표적 세포는 유전체 내에 N개의 표적 핵산을 포함하고,

[427] 상기 N개의 표적 핵산은 총 m개의 핵산 서열로 구별되고,

[428] 상기 N은 3 이상의 정수, 상기 m은 1 이상 N 이하의 정수이고,

[429] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 실시예 32의 CRISPR/nCas 시스템을 m 단위 포함함.

[430] 실시예 47, 표적 핵산 3개 이상

[431] 실시예 45 내지 실시예 46 중 어느 하나에 있어서, 환자의 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함함.

[432] 실시예 48, 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[433] 실시예 47에 있어서,

[434] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[435] 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열, 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열, 그리고 상기 제3 표적 서열의 핵산 서열은 동일하며, 이하, 이를 제1 표적 서열로 지칭할 때,

[436] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[437] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[438] 실시예 49, 두 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[439] 실시예 47에 있어서,

[440] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템, 그리고 제2 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[441] 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열, 그리고 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열은 동일하며, 이하, 이를 제1 표적 서열로 지칭하고,

[442] 이하, 상기 제3 표적 핵산의 핵산 서열을 제2 표적 서열로 지칭할 때,

[443] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[444] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[445] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제2 표적 서열을 표적하고,

[446] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제2 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[447] 실시예 50, 세 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[448] 실시예 47에 있어서,

[449] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템, 제2 CRISPR/nCas 시스템, 그리고 제3 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[450] 이하, 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열을 제1 표적 서열로 지칭하고,

[451] 이하, 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열을 제2 표적 서열로 지칭하고,

[452] 이하, 상기 제3 표적 핵산의 핵산 서열을 제3 표적 서열로 지칭할 때,

[453] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[454] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[455] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제2 표적 서열을 표적하고,

[456] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제2 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[457] 상기 제3 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제3 표적 서열을 표적하고,

[458] 상기 제3 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제3 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[459] 실시예 51, 전달의 대체 표현

[460] 실시예 45 내지 실시예 50 중 어느 하나에 있어서,

[461] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제 (이하, 위 구성)를 표적 세포에 전달하는 과정에서,

[462] '표적 세포에 위 구성을 전달하다 (deliver)'는 표현은 다음 표현으로 대체됨:

[463] 표적 세포에 위 구성을 주입하다 (inject); 표적 세포로 위 구성을 도입하다 (introduce); 표적 세포에 위 구성을 투여하다 (administer); 표적 세포 안으로 위 구성을 유입시키다 (import); 표적 세포 내부로 위 구성을 이동시키다 (transport); 표적 세포에 위 구성을 흡수시키다 (absorb); 표적 세포 내에 위 구성을 침투시키다 (penetrate); 표적 세포 내로 위 구성을 유도하다 (induce); 표적 세포에 위 구성을 주입하다 (infuse); 또는 위의 임의의 조합.

[464] 실시예 52, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 함께 전달

[465] 실시예 45 내지 실시예 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 상기 표적 세포에 전달하는 과정은,

[466] 실시예 42 내지 실시예 44 중 어느 하나의 표적 세포 사멸용 조성물을 상기 표적 세포에 전달하여 수행됨.

[467] 실시예 53, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 독립적으로 전달

[468] 실시예 45 내지 실시예 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 상기 표적 세포에 전달하는 과정은,

[469] 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 각각 독립적으로 상기 표적 세포에 전달하여 수행됨.

[470] 실시예 54, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 전달

[471] 실시예 53에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물은 다음 중 선택된 방법으로 표적 세포에 전달됨:

[472] 지질 나노입자 (lipid nanoparticle)-매개 형질감염; 전기천공법 (electroporation); 유전자 총 (gene gun); 초음파천공법 (sonoporation); 자기주입법 (magnetofection); 마이크로인젝션 (microinjection); 세포 스퀴징 (cell sqeezing); 리포펙션 (lipofection); 양이온성 리포좀법; 초산 리튬-DMSO; DEAE-dextran-매개 형질감염; PEI (polyethyleneimine)-매개 형질감염; 나노파티클-매개 핵산 전달; 또는 위 전달 방법들의 임의의 조합.

[473]

[474] **환자의 표적 세포를 선택적으로 사멸시키는 방법**

[475] 실시예 55, 표적 세포 선택적 사멸 방법

[476] 환자의 표적 세포를 선택적으로 사멸시키는 방법으로,

[477] 상기 환자의 표적 세포는 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산을 가지고, 상기 환자의 표적 세포가 아닌 세포는 상기 표적 핵산을 가지지 않으며,

[478] 상기 방법은 다음을 포함함:

[479] 실시예 33 중 어느 하나의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제를 환자에게 투여하는 과정,

[480] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 환자의 표적 세포의 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[481] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 선택적으로 사멸시킴.

[482] 실시예 56, N개의 표적 핵산, m개의 서로 다른 표적

[483] 실시예 55에 있어서, 상기 환자의 표적 세포는 N개의 표적 핵산을 가지고,

[484] 상기 N개의 표적 핵산은 총 m개의 핵산 서열로 구별되고,

[485] 여기서, 상기 N은 3 이상의 정수, 상기 m은 1 이상 N 이하의 정수이고,

[486] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 실시예 32의 CRISPR/nCas 시스템을 m 단위 포함함.

[487] 실시예 57, 3개 이상의 표적 핵산

[488] 실시예 55 내지 실시예 56 중 어느 하나에 있어서, 환자의 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함함.

[489] 실시예 58, 한 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[490] 실시예 57에 있어서,

[491] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[492] 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열, 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열, 그리고 상기 제3 표적 서열의 핵산 서열은 동일하며, 이하, 이를 제1 표적 서열로 지칭할 때,

[493] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[494] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[495] 실시예 59, 두 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[496] 실시예 57에 있어서,

[497] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템, 그리고 제2 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[498] 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열, 그리고 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열은 동일하며, 이하, 이를 제1 표적 서열로 지칭하고,

[499] 이하, 상기 제3 표적 핵산의 핵산 서열을 제2 표적 서열로 지칭할 때,

[500] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[501] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[502] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제2 표적 서열을 표적하고,

[503] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제2 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[504] 실시예 60, 세 단위의 CRISPR/nCas 시스템 포함

[505] 실시예 57에 있어서,

[506] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 제1 CRISPR/nCas 시스템, 제2 CRISPR/nCas 시스템, 그리고 제3 CRISPR/nCas 시스템을 포함하고,

[507] 이하, 상기 제1 표적 핵산의 핵산 서열을 제1 표적 서열로 지칭하고,

[508] 이하, 상기 제2 표적 핵산의 핵산 서열을 제2 표적 서열로 지칭하고,

[509] 이하, 상기 제3 표적 핵산의 핵산 서열을 제3 표적 서열로 지칭할 때,

[510] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제1 표적 서열을 표적하고,

[511] 상기 제1 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제1 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[512] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제2 표적 서열을 표적하고,

[513] 상기 제2 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제2 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,

[514] 상기 제3 CRISPR/nCas 시스템의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 제3 표적 서열을 표적하고,

[515] 상기 제3 CRISPR/nCas 시스템은 상기 제3 표적 핵산을 인식하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[516] 실시예 61, 투여의 대체 표현

[517] 실시예 55 내지 실시예 60 중 어느 하나에 있어서,

[518] 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제 (이하, 위 구성)를 환자에게 투여하는 과정에서,

[519] '환자에게 위 구성을 투여한다 (administer)'는 표현은 다음 표현으로 대체됨:

[520] 환자에게 위 구성을 준다 (give); 환자에게 위 구성을 제공한다 (provide); 환자에게 위 구성을 주입한다 (inject); 환자에게 위 구성을 투약한다 (medicate); 환자에게 위 구성을 적용한다 (apply); 환자에게 위 구성을 처치한다 (treat with); 환자에게 위 구성을 사용한다 (use); 환자에게 위 구성을 투여한다 (dispense); 환자에게 위 구성을 공급한다 (supply); 또는 위의 임의의 조합.

[521] 실시예 62, 표적 세포 한정

[522] 실시예 55 내지 실시예 61 중 어느 하나에 있어서,

[523] 상기 환자의 표적 세포는 다음 중 선택됨:

[524] 암 세포 (cancer cell); 양성 종양 (benign tumor); 악성 종양 (malignant tumor); 노화 세포 (sensecent cell); 바이러스에 감염된 세포 (virus-infected cell); 면역질환 발병 세포; 유전체 서열 변이를 가지는 세포; 또는 위 세포들의 임의의 조합.

[525] 실시예 63, 환자 투여 방법 - 함께 투여

[526] 실시예 55 내지 실시예 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 상기 환자에 투여하는 과정은,

[527] 실시예 42 내지 실시예 44 중 어느 하나의 표적 세포 사멸용 조성물을 상기 환자에 투여하여 수행됨.

[528] 실시예 64, 환자 투여 방법 - 독립적으로 투여

[529] 실시예 55 내지 실시예 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 상기 환자에 투여하는 과정은,

[530] 상기 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제를 각각 독립적으로 상기 환자에게 투여하여 수행됨.

[531] 실시예 65, CRISPR/nCas 조성물의 환자 투여 방법

[532] 실시예 64에 있어서, 상기 CRISPR/nCas 조성물을 상기 환자에게 투여함은 다음 중 선택된 방법으로 수행됨:

[533] 실시예 24의 CRISPR/nCas 복합체를 포함하는 지질 나노파티클 (lipid nanoparticle)을 환자에게 투여함; 실시예 31의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하는 지질 나노파티클을 환자에게 투여함; 실시예 25 내지 실시예 29의 CRISPR/nCas 벡터를 환자에게 투여함; 또는 위 투여 방법들의 임의의 조합.

[534] 실시예 66, PARP 억제제의 환자 투여 방법

[535] 실시예 64 내지 실시예 65 중 어느 하나에 있어서, 상기 PARP 억제제를 환자에게 투여함은 다음 중 선택된 방법으로 수행됨:

[536] 실시예 37 내지 실시예 38 중 어느 하나의 약학적 조성물을 환자에게 경구 투여 (oral administration)함; 실시예 39 내지 실시예 40 중 어느 하나의 약학적 조성물을 환자에게 주사 (inject)함; 또는 위 투여 방법들의 임의의 조합.

[537]

[538] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 사용하는 암 치료 방법**

[539] 실시예 67, 암 치료 방법

[540] 암 환자를 치료하는 방법으로, 실시예 55 내지 실시예 66 중 어느 하나의 방법을 수행하되,

[541] 상기 환자의 표적 세포는 암 세포이고, 상기 표적 핵산들은 상기 암 세포 특이적인 핵산 서열을 가짐.

[542] 실시예 68, 암 세포 한정

[543] 실시예 67에 있어서, 상기 암 세포는 다음 중 선택됨:

[544] 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; 표피암; 또는 위의 임의의 조합.

[545] 실시예 69, 암 세포 특이적인 핵산 서열

[546] 실시예 67에 있어서, 상기 암 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함하고,

[547] 상기 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산의 핵산 서열 모두 암 세포 특이적인 핵산 서열로, 정상 세포 유전체에는 포함되지 않음.

[548] 실시예 70, 모든 표적 핵산 서열이 다름

[549] 실시예 68 내지 실시예 69에 있어서, 상기 제1 표적 핵산, 상기 제2 표적 핵산, 그리고 상기 제3 표적 핵산은 서로 다른 핵산 서열을 가짐.

[550] 실시예 71, 모든 표적 핵산 서열이 동일함

[551] 실시예 68 내지 실시예 69에 있어서, 상기 제1 표적 핵산, 상기 제2 표적 핵산, 그리고 상기 제3 표적 핵산은 모두 동일한 핵산 서열을 가짐.

[552]

[553] **약학적 조성물**

[554] 실시예 72, 항암제 병용투여용 약학적 조성물

[555] 다음을 포함하는, 항암제 병용투여용 약학적 조성물:

[556] 실시예 33의 표적 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물,

[557] 여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 목적하는 암 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴; 그리고

[558] 약학적으로 허용되는 담체;

[559] 여기서, 상기 항암제는 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제를 유효 성분으로 함.

[560] 실시예 73, 암 치료용 약학적 조성물

[561] 실시예 42 내지 실시예 44 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물,

[562] 여기서, 상기 조성물의 표적 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 목적하는 암 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산을 표적하여 단일가닥 핵산 절단을 일으킴.

[563]

[564] **세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제의 용도**

[565] 실시예 74, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물의 용도

[566] 실시예 33의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물의 실시예 45 내지 실시예 66 중 어느 하나의 방법에 사용하는 용도.

[567] 실시예 75, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물의 의약 제조 용도

[568] 실시예 33의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물의, 항암제 병용투여용 의약품 제조 용도,

[569] 여기서, 상기 항암제는 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제를 유효 성분으로 함.

[570] 실시예 76, PARP 억제제의 용도

[571] 실시예 34 내지 실시예 36, 및 실시예 41 중 어느 하나의 PARP 억제제, 실시예 37 내지 실시예 38 중 어느 하나의 약학적 조성물, 또는 실시예 39 내지 실시예 40 중 어느 하나의 약학적 조성물의 실시예 45 내지 실시예 66 중 어느 하나의 방법에 사용하는 용도.

[572]

[573] 실험예

[574] 이하, 실험예 및 실시예를 통해 본 명세서가 제공하는 발명에 대해 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위한 것으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[575] **실험예 1. 실험 방법 및 재료**

[576] 실험예 1.1. 세포 배양

[577] HeLa (ATCC, CCL-2), HCT-116 (ATCC, CCL-247), 그리고 MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) 세포들은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, # 11965092)에서 배양되었다. SW-480 세포 (ATCC, CCL-228)는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지 (Gibco, # 11875093)에서 배양되었다. 모든 세포 배양 배지에는 10% fetal bovine serum (Gibco, # 10082147), 그리고 1% penicillin-streptomycin (Gibco, # 15140122)을 공급하였다. 세포는 37°C 에서, 5% CO_2를 함예한 습도가 높은 분위기에서 배양되었다. CRISPR RNP 또는 RNA를 전달하기 위해, 0.5 X 10^4 개의 세포를 형질감염 1일 전에 24-웰 플레이트에 도말했다.

[578] 실험예 1.2. Cas9-WT 및 nCas9-D10A 발현 및 정제

[579] pET-LbCas12a-ultra 벡터는 LbCas12a-ultra23를 암호화하는 DNA 서열을 사용하여 구성되었고, pET28a+ 벡터에 (Addgene, # 69864-3) 클로닝되었다. pET-Cas9-HN는 p3s-Cas9-HN(Addgene, #104171)에서 파생되었다. 위 벡터들을 C3013 균주 (NEB, # C3013I)로 형질전환시키고 재조합 Cas9WT 또는 LbCas12a-ultra 단백질을, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 25°C에서 4시간 동안 발현시킨 다음, Ni-NTA 아가로스 비드(Qiagen, # 30210)를 사용하여 정제하였다. 정제된 재조합 단백질을 투석 완충액(20 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM DTT 및 10% 글리세롤)에서 투석한 후, Amicon Ultra-4 50K 필터 장치(Millipore, # UFC8050)를 사용하여 농축하였다. 농축된 단백질들은 SDS-PAGE 젤에 시각화하여 분석하였고, BSA 표준의 밴드 강도와 비교하여 정량화하였다.

[580] 실험예 1.3. sgRNA 제조

[581] SpCas9WT 및 LbCas12a-ultra 용 sgRNA는 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit(NEB, # E2050S)를 사용하여 T7 프로모터와 sgRNA 서열을 포함하는 DNA 주형으로부터 in vitro로 전사되었다. 위 DNA 주형은 각 프라이머 100 μM과 NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix(NEB, # M0541L)를 사용하여 연장 PCR을 통해 생성하였다. 위 DNA 주형을 사용하여, 제조업체의 표준 RNA 합성 프로토콜에 따라 sgRNA를 합성하였다. 합성된 sgRNA를 Monarch RNA Cleanup Kit(NEB, # T2040L)을 사용하여 정제하고, 변성 아가로스 젤 또는 PAGE 젤에서 시각화하여 평가하였다.

[582] 실험예 1.4. Cas9 mRNA 제조

[583] Cas9WT mRNA를 합성하기 위해 SpeI-HF(NEB, # R3133S) 및 XhoI(NEB, # R0146S) 제한 효소로 p3s-Cas9HC(Addgene, # 43945)를 절단하여 DNA 주형을 생성하였다. 위 DNA 주형을 사용하여 mRNA를 tailing(NEB, # E2060S)이 있는 NEB HiScribe T7 ARCA mRNA 키트를 사용하여 합성하였다. 합성된 mRNA를 Monarch RNA Cleanup Kit(NEB, # T2040L)을 사용하여 정제하고, 변성 아가로스 젤 또는 PAGE 젤에서 시각화하여 평가하였다. 위 Cas9WT mRNA는 단일 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 사용하여 검증하였다.

[584] 실험예 1.5. RNP 및 이를 포함하는 LNP 제조

[585] RNP 전달을 위해, 에탄올 희석법을 사용하여 LNP를 준비하였다. 모든 지질(LNP의 몰 비율은 C12-200/DOPE/콜레스테롤/DMG-PEG/DOTAP 비율 35/16/46.5/2.5/11.11로 고정)을 에탄올에 용해시켰다. RNP(sgRNA 대 Cas9 단백질의 몰 비율은 1:1)를 PBS(pH 7.4)에 용해시켰다. 위 두 용액을 빠르게 피펫으로 옮겨 PBS 대 에탄올 비율 3:1(v/v) 및 총 지질 대 sgRNA 비율 20:1(w/w)로 혼합한 다음 실온에서 15분간 배양하였다. 생체 내 실험의 경우, RNP를 적재한 LNP 제형을 PBS에 대해 2시간 동안 투석 키트(Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits, MWCO 3.5 kDa)로 정제하고, Amicon Ultra-15 원심 필터(MWCO 50 kDa)로 농축한 다음, 종양 내 주입(주입당 sgRNA를 적재한 LNP 50 μg)하였다. 위 C12-200은 Cayman Chemical에서 구입하였다. 위 DOPE, DOTAP, DMG-PEG(MW 2000)는 Avanti Polar Lipids에서 구입하였다. 위 콜레스테롤, Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kit(MWCO, 3.5 kDa), Amicon Ultra-15 원심분리 필터(MWCO, 50 kDa)는 Sigma에서 구입하였다. 모든 화학 물질은 추가 정제 없이 사용하였다.

[586] 실험예 1.6. PARP 억제제 처리

[587] 총, 0.5 X 10^4 개의 세포들을 1 μM 올라파립 (AZD2281) (Selleckchem, # S1060), 1 μM 루카파립 (Selleckchem, # S4948), 0.1 μM 니라파립 (MK-4827) (Selleckchem, # S2741), 2 μM 벨리파립 (ABT-888) (Selleckchem, # S1004), 또는 10 μM 이니파립 (BSI-201) (Selleckchem, # S1087)과 혼합하고, 24-웰 플레이트에 접종하였다. 위 농도의 각각의 PARP 억제제 하, 세포들을 CellTiter-Glo 분석법으로 측정 시, 관찰 가능한 독성은 나타나지 않았다.

[588] 실험예 1.7 RNP 형질감염

[589] RNP를 형질감염시키기 위해, 세포를 각 실시예에 따른 Cas 단백질 665ng과 각 실시예에 따른 sgRNA 95ng을 Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 형질감염 시약 (Invitrogen, # CMAX00015)을 사용하여 세포에 형질감염하고, 3일간 배양하였다. PARP 억제제와 함께 처리하는 경우, 실험예 1.6에 따라 PARP 억제제를 처리하고 1일 후, RNP를 처리하였다.

[590] 실험예 1.8. 세포 생존률 측정

[591] 세포 생존률은 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, # G7571)를 사용하여 측정하였다. 형질감염된 세포를 3일간 배양한 후, Trypsin-EDTA

(0.25%) (Gibco, # 25200056)을 사용하여 분리하였다. 세포를 400 μL의 DMEM으로 희석하였고, 100 μL 의 세포를 분주하였고, 100 μL의 CellTiter-Glo Reagent와 섞은 후, 실온에서 10분간 배양하였다. 발광 신호는 흰색 불투명 96-웰 플테이트 (Corning, # 3917)에서 Infinite 200 (Tecan)을 사용하여 측정하였다.

[592] 실험예 1.9. 콜로니 형성 분석

[593] 형질감염된 세포를 3일간 배양한 후, Trypsin-EDTA (0.25%) (Gibco, # 25200056)을 사용하여 수확하였다. 수확한 세포들을 다음 밀로도 6-웰 플테이트에 도말하였다: HeLa 세포의 경우, 웰 당 100개, 웰 당 1,000개, 웰 당 10,000개; HCT-116 세포의 경우, 웰 당 30개, 웰 당 300개, 웰 당 3,000개. 세포 배양 배지는 형질감염 후 2주까지 5일마다 교체하였다. 이후, 세포를 실온에서 4% 파라포를알데히드로 20분 간 고정하였고, PBS로 두 번 세척하였고, 0.005% 크리스탈 바이올렛으로 30분간 염색하였고, 스캔 전 증류수로 세척하였다.

[594] 실험예 1.10. 표적 시퀀싱 및 분석

[595] CRISPR에 의해 유도된 인델 빈도를 측정하기 위해 다음을 수행하였다:

[596] 실험유 1.7에 따라 세포를 RNP로 형질감염시켰다. 3일 후에 수확하여 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, # 69506)를 사용하여 유전체 DNA를 추출하였다. Illumina 어댑터 서열을 포함하는 프라이머를 사용하여 표적 시퀀싱을 위한 DNA 라이브러리를 준비하였다. 위 DNA 라이브러리를 정량화하여 150개의 paired-end 리드와 함께 Illumina NextSeq 500 또는 NovaSeq X System에 로드하였다. 표적 부위의 돌연변이 빈도는 CRISPResso2 (v2.2.12) 또는 CRISPRpic를 사용하여 분석하였다. 위 둘 간 유의미한 차이는 없었다. 돌연변이 빈도는 변이된 인델, 또는 변이된 서열을 포함한 판독 횟수로부터 계산되었다. 이형 접합체 대립 유전자에 해당하는 서열은 변이되지 않은 서열로 분류하였다.

[597] 실험예 1.10. 종양 이종 이식 (Xenograft) 모델 제조

[598] 암컷 BALB/c 누드 마우스 (5 주령)을 Orient Bio로부터 구매하여 모든 동물 실험에 사용하였다. 마우스는 울산과학기술원 동물실험윤리위원회 (UNISTIACUC-23-09)의 지침에 따라 처리하였다. 이종이식 모델의 경우 Cas9WT를 안정적으로 발현하는 HCT116 세포 5 X 10^6개를 60 μL의 PBS (pH 7.4)에 현탁하고, 60 μL의 Matrigel (BD Bioscience)과 혼합하여 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 부피와 체중은 이틀마다 측정하였다. 종양 부피는 다음 공식을 사용하여 계산하였다:

[599] $$V=\frac{(a\times b)^2}{2}$$

[600] 위에서, V는 부피, a는 장축의 길이, b는 단축의 길이를 의미한다.

[601] 종양 크기가 약 80 mm^3에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 여러 군으로 나누어 실험에 사용하였다.

[602] 실험예 1.12. 종양 성장 억제 실험

[603] 각 군 별 투여 물질의 항종양 효능을 평가하기 위해, 실험예 1.10에 따른 종양이 이식된 마우스를 1.5% 이소플루란으로 마취하고, 이틀에 한 번씩 투여 물질 (PBS 또는 LNP)를 종양 내 주사하였다. 14일 동안 총 8번 주사하였고, 25일째 되는 날 마우스를 희생시켰다.

[604] 종양 성장 억제율은 다음 공식을 사용하여 계산하였다:

[605] $$\text{종양성장억제율}(\%)=\left(1-\frac{V_{Day0,treatment}-V_{Day24,treatment}}{V_{Day0,control}-V_{Day24,control}}\right)\times 100$$

[606] 여기서 $V_{Day0,treatment}$, 및 $V_{Day24,treatment}$는 각각 0일과 24일의 치료 그룹의 종양 부피이고, $V_{Day0,control}$, 및 $V_{Day24,control}$은 각각 0일과 24일의 PBS 대조군의 종양 부피를 의미한다.

[607] 실험예 1.13. Ki-67 and Caspase-3 immunohistochemistry

[608] 표준 프로토콜에 따라 파라핀-포매 종양 절편(8μm)에서 파라핀을 제거하였다. Coplin 병에 시트르산 완충액 pH 6.0(Sigma-Aldrich, # C9999-100ML)을 넣은 마이크로파를 사용하여 열 유도 항원 회수를 수행하였다. 항원 회수 조직 절편은 0.04% Triton X-100으로 투과 처리하였다. 증식을 평가하기 위해 조직을 항-Ki67 단일클론 항체(Santa Cruz, 1:200으로 희석)와 함께 4°C에서 하룻밤 배양한 다음 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG(H+L) 2차 항체(Invitrogen, # 31430; 1:400으로 희석)와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 세포사멸을 평가하기 위해 조직을 4°C에서 항-카스파제-3/p17/p19 단일클론 항체(Proteintech, 1:100으로 희석)로 밤새 배양한 다음, HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG(H+L) 2차 항체(Invitrogen, 31430; 1:400으로 희석)로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. DAB를 적용하여 신호를 개발하였다. 핵 성분을 구별하기 위해 헤마톡실린 염색을 수행하였다. 염색된 조직은 유기 장착 완충액을 첨가하여 보존하였다. 모든 이미지는 BX51 광학 현미경(Olympus)을 사용하여 획득하였다.

[609] 실험예 1.14. TUNEL assay

[610] 전체 종양 조직을 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후, 두께 8μm의 절편을 만들기 위해 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매된 종양 절편에서 표준 프로토콜에 따라 파라핀을 제거하였다. Coplin 병에 시트르산 완충액 pH 6.0(Sigma-Aldrich, # C9999-100ML)을 넣은 마이크로파를 사용하여 열 유도 항원 회수를 수행하였다. 세포 사멸은 제조업체의 지침에 따라 TUNEL Assay Kit-HRP-DAB(Abcam, # ab206386)로 분석하였다. DAB 용액은 종양 조직에서 TdT 표지 반응을 감지하여 사멸 중에 생성된 DNA 가닥 파손을 식별하였다. 헤마톡실린 대조 염색을 수행하여 정상 세포와 사멸 세포를 평가하였다. 염색된 조직을 영구적으로 보존하기 위해 유기 장착 완충액을 사용하였다. 모든 이미지는 가상 현미경(Olympus)을 사용하여 획득하였다.

[611]

[612] **실험예 2. 세포 사멸 실험 #1 - 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제의 세포 사멸 효과**

[613] 실험예 2.1. 실험 구성 및 실험 방법

[614] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제의 세포 사멸 효과를 측정하기 위해 다음 실험을 진행하였다. 구체적으로, 실험예 1.1에 따라 배양한 HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포에 다음 표에 따른 구성의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제 (올라파립)를 처리하였다.

[615] [표1]

Label	Form	nCas protein	Scaffold of guide RNAs	Guide domain of guide RNAs	PARP inhibitor
Olaparib (-),Mock	-	SEQ ID NO: 2	No guide RNA	No guide RNA	No PARP inhibitor
Olaparib (-),NT	RNP	SEQ ID NO: 2	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 8)	GCUCCGAUCGGGUUACAACA (SEQ ID NO: 53)	No PARP inhibitor
Olaparib (-),Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	CUAGAAUGACCAGUCAACAG (SEQ ID NO: 31), GCUACCUAAGCACAGCCACA (SEQ ID NO: 32), AUGGACCCCUAGGUCUCCGG (SEQ ID NO: 33), UGUUUGGUGGGUACUCACCC (SEQ ID NO: 34)	No PARP inhibitor
Olaparib (-),Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	AUAUUCCACAGGUAUAUGCA (SEQ ID NO: 35), GUUCAUGGCCAGAAGGACGA (SEQ ID NO: 36),	No PARP inhibitor

				UGGAAUGUGCCACACAGCAC (SEQ ID NO: 37), CUGCCUUGUCAUAGCUGUAC (SEQ ID NO: 38)	
Olaparib (-),MT-50	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	GCAGAGGCAGGUGGAUCAUG (SEQ ID NO: 39)	No PARP inhibitor
Olaparib (+),Mock	RNP	SEQ ID NO: 2	No guide RNA	No guide RNA	Olaparib, 1 μM
Olaparib (+),NT	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	Olaparib, 1 μM
Olaparib (+),Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	Olaparib, 1 μM
Olaparib (+),Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	Olaparib, 1 μM
Olaparib (+),MT-50	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	Olaparib, 1 μM

[616] 위에서, Umix-4, Hmix-4는 각각 표에 나타난 가이드 도메인 서열에 따른 4종의 가이드 RNA를 포함하였다. 예를 들어, Umix-4는 1) SEQ ID NO: 31의 가이드 도메인을 가지는 가이드 RNA, 2) SEQ ID NO: 32의 가이드 도메인을 가지는 가이드 RNA, 3) SEQ ID NO: 33의 가이드 도메인을 가지는 가이드 RNA, 그리고 4) SEQ ID NO: 34의 가이드 도메인을 가지는 가이드 RNA의 4 종류를 포함하였다. 각 가이드 RNA의 스캐폴드 서열은 SEQ ID NO: 8로 동일하였다. 이는 이하의 실험예에서 모두 동일하다.

[617] 실험에 사용한 nCas 단백질은 실험예 1.2에 따라 제조하였고, 사용한 sgRNA는 실험예 1.3에 따라 제조하였으며, nCas 단백질과 sgRNA를 실험예 1.7에 따라 RNP 형태로 세포에 투여하였다. PARP 억제제의 경우 위 표에 개시된 농도를 실험예 1.6에 따라 각각의 세포에 처리하였다.

[618] 이후, 실험예 1.8에 따라 세포 생존률을 측정하였다.

[619] 실험예 2.3. 세포 사멸 실험 결과

[620] 실험예 2.2에 따른 실험 결과는 도 1 내지 도 2에 나타내었다. 도 1, 도 2에 대한 정량 데이터는 다음 표에 나타내었다:

[621] [표2]

HeLa, Olaparib (-)				
RNP	**Rep 1 (rel)**	**Rep 2 (rel)**	**Rep 3 (rel)**	**Average**
Mock	1.115044	1.096304	1.088292	1.10
NT	1.043988	0.937012	1.019001	1.00
Umix-4	0.862832	0.771473	0.928423	0.85
Hmix-4	1.13706	0.900649	1.033056	1.02
MT-50	0.601249	0.568454	0.54659	0.57
HeLa, Olaparib (+)				
RNP	**Rep 1 (rel)**	**Rep 2 (rel)**	**Rep 3 (rel)**	**Average**
Mock	1.162936	0.966995	1.020302	1.05
NT	0.893805	0.921395	1.017496	0.94
Umix-4	0.079646	0.12025	0.096044	0.10
Hmix-4	0.72228	0.673087	0.854243	0.75
MT-50	0.04607	0.054659	0.038261	0.05

[622] [표3]

HCT-116, Olaparib (-)				
RNP	**Rep 1 (rel)**	**Rep 2 (rel)**	**Rep 3 (rel)**	**Average**
Mock	1.011918	0.994637	1.126744	1.04
NT	0.98662	0.985567	1.027813	1.00
Umix-4	0.900622	0.916543	1.099852	0.97
Hmix-4	0.836431	0.868928	0.850019	0.85
MT-50	0.687575	0.669142	0.58632	0.65
HCT-116, Olaparib (+)				
RNP	**Rep 1 (rel)**	**Rep 2 (rel)**	**Rep 3 (rel)**	**Average**
Mock	0.988918	1.026622	1.131285	1.05
NT	0.974643	0.981929	0.903936	0.95
Umix-4	0.306751	0.317982	0.288419	0.30
Hmix-4	0.316423	0.317562	0.3185	0.32

MT-50	0.313691	0.318563	0.323116	0.32

[623] 실험 결과, 1) PARP 억제제 (올라파립)과 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 함께 투여되었으며, 2) 세포 유전체에 표적 핵산이 존재하는 경우, 높은 세포 사멸 효과를 나타내었다. 반면, 1) PARP 억제제를 투여하지 않은 경우 (올라파립 (-)), 또는 2) 세포 유전체에 표적 핵산이 존재하지 않는 경우 (HeLa 세포에 대해 Hmix-4의 sgRNA 사용한 실험군), 세포가 거의 사멸되지 않았다. 이는, 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 함께 투여하는 경우 표적 세포만을 선택적으로, 높은 효율로 사멸시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 위 구성 중 일부만 전달되었거나, 비표적 세포의 경우에는 세포 사멸 효과가 현저히 낮음을 증명한다.

[624]

[625] **실험예 3. 세포 사멸 실험 #2 - 뉴클레이즈, 니케이즈, 그리고 니케이즈와 PARPi 억제제 투여 효과 비교**

[626] 실험예 3.1. 실험 구성 및 실험 방법

[627] 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제의 세포 사멸 효과를 측정하고, 이를 이중가닥 핵산 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 조성물의 세포 사멸 효과와 비교하기 위해 다음 실험을 진행하였다. 구체적으로, 실험예 1.1에 따라 배양한 HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포에 다음 표에 따른 구성의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제 (올라파립)를 처리하였다.

[628] [표4]

Cas Label	**sgRNA Label**	**Form**	**Cas/nCas protein**	**Scaffold of guide RNA**	**Guide domain of guide RNA**	**PARP inhibitor**
$Cas9^{WT}$	Mock	RNP	SEQ ID NO: 1	No guide RNA	No guide RNA	No PARP inhibitor
$Cas9^{WT}$	NT	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	No PARP inhibitor
$Cas9^{WT}$	Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	No PARP inhibitor
$Cas9^{WT}$	Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	No PARP inhibitor

$Cas9^{WT}$	MT-50	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$	Mock	RNP	SEQ ID NO: 2	No guide RNA	No guide RNA	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$	NT	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$	Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$	Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$	MT-50	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	No PARP inhibitor
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	Mock	RNP	SEQ ID NO: 2	No guide RNA	No guide RNA	Olaparib 1 μM
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	NT	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	Olaparib 1 μM
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	Olaparib 1 μM
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	Olaparib 1 μM
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	MT-50	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	Olaparib 1 μM

[629] 실험에 사용한 Cas 단백질 및 nCas 단백질은 실험예 1.2에 따라 제조하였고, 사용한 sgRNA는 실험예 1.3에 따라 제조하였으며, nCas 단백질과 sgRNA를 실험예 1.7에 따라 RNP 형태로 세포에 투여하였다. PARP 억제제의 경우 위 표에 개시된 농도를 실험예 1.6에 따라 각각의 세포에 처리하였다.

[630] 이후, 각 세포군을 실험예 1.9에 따라 콜로니 형성 분석하였다.

[631] 실험예 3.2. 세포 사멸 실험 결과

[632] 실험예 3.1에 따른 실험 결과는 도 3 내지 도 4에 나타내었다.

[633] 실험 결과, 1) 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 조성물이 투여되었거나, PARP 억제제 (올라파립)과 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 함께 투여되었으며, 2) 세포 유전체에 표적 핵산이 존재하는 경우, 높은 세포 사멸 효과를 나타내었다. 반면, 1) PARP 억제제를 투여하지 않은 경우 (nCas9-D10A 실험결과), 또는 2) 세포 유전체에 표적 핵산이 존재하지 않는 경우 (HeLa 세포에 대해 Hmix-4의 sgRNA 사용한 실험군), 세포가 거의 사멸되지 않았다. 실험 결과, 세포가 사멸되는 조건 하에서는 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 조성물 (Cas9WT)과 PARP 억제제와 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 (nCAs9-D10A + Olaparib)이 동등한 세포 사멸 효과를 보인다. 또한, 위 구성 중 일부만 전달되었거나, 비표적 세포의 경우에는 세포 사멸 효과가 현저히 낮았다.

[634]

[635] **실험예 4. 세포 사멸 실험 #3 - PARP 억제제의 농도에 따른 세포 사멸 효과 비교**

[636] 실험예 4.1. 실험 구성 및 실험 방법

[637] PARP 억제제를 투여하는 농도에 따른 세포 사멸 효과를 비교하기 위해 다음 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실험예 1.1에 따라 배양한 HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포에 다음 표에 따른 구성의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제 (올라파립)를 처리하였다.

[638] [표5]

Label	Form	nCas protein or siRNA	Scaffold of guide RNA	Guide domain of guide RNA	Olaparib concentration
Non-treated	-	-	-	-	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 μM
Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 μM
Hmix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 μM
siBRCA2	siRNA	CUGGAAAAGGAAUACA	-	-	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 μM

		GUUTT (SEQ ID NO: 40)			

[639] 각각의 레이블의 물질 별로, 올라파립의 농도를 다르게 하여 실험하였다.

[640] 여기서, siRNA의 경우 CUGGAAAAGGAAUACAGUUTT(서열번호 40)의 siRNA를 사용하였으며, 20 pmole을 실험예 1.7에 따라 세포에 전달하였다. 실험 후 실험예 1.8에 따라 세포 생존률을 측정하였다.

[641] 실험예 4.2. 세포 사멸 실험 결과

[642] 실험예 4.2에 따른 실험 결과는 도 5 내지 도 6에 나타내었다. 또한, 도 5, 도 6에 대한 정량 데이터는 다음 표에 나타내었다:

[643] [표6]

Cell Line	Label	Olaparib Concentration	Relative cell viability (average, n=3)
HeLa	Non-treated	0.0001	1.0000
HeLa	Non-treated	0.001	0.9810
HeLa	Non-treated	0.01	0.9959
HeLa	Non-treated	0.1	0.9391
HeLa	Non-treated	1	0.9279
HeLa	Non-treated	10	0.1192
HeLa	siBRCA2	0.0001	0.9931
HeLa	siBRCA2	0.001	1.1664
HeLa	siBRCA2	0.01	0.9553
HeLa	siBRCA2	0.1	0.7904
HeLa	siBRCA2	1	0.4826
HeLa	siBRCA2	10	0.2296
HeLa	Umix-4	0.0001	0.9916
HeLa	Umix-4	0.001	0.9689
HeLa	Umix-4	0.01	0.9984
HeLa	Umix-4	0.1	0.9542
HeLa	Umix-4	1	0.2260
HeLa	Umix-4	10	0.1860
HeLa	Hmix-4	0.0001	0.9644
HeLa	Hmix-4	0.001	0.9475

HeLa	Hmix-4	0.01	0.9466
HeLa	Hmix-4	0.1	0.9544
HeLa	Hmix-4	1	0.9271
HeLa	Hmix-4	10	0.1033

[644] [표7]

Cell Line	**Label**	**Olaparib Concentration**	**Relative cell viability (average, n=3)**
HCT-116	Non-treated	0.0001	1.0000
HCT-116	Non-treated	0.001	0.9939
HCT-116	Non-treated	0.01	0.9743
HCT-116	Non-treated	0.1	1.0072
HCT-116	Non-treated	1	1.0307
HCT-116	Non-treated	10	0.7979
HCT-116	siBRCA2	0.0001	0.9935
HCT-116	siBRCA2	0.001	0.9690
HCT-116	siBRCA2	0.01	0.9426
HCT-116	siBRCA2	0.1	0.9547
HCT-116	siBRCA2	1	0.7808
HCT-116	siBRCA2	10	0.5318
HCT-116	Umix-4	0.0001	1.0282
HCT-116	Umix-4	0.001	0.9932
HCT-116	Umix-4	0.01	1.0152
HCT-116	Umix-4	0.1	0.9870
HCT-116	Umix-4	1	0.3303
HCT-116	Umix-4	10	0.2380
HCT-116	Hmix-4	0.0001	0.9711

HCT-116	Hmix-4	0.001	0.9927
HCT-116	Hmix-4	0.01	0.9849
HCT-116	Hmix-4	0.1	1.0178
HCT-116	Hmix-4	1	0.3398
HCT-116	Hmix-4	10	0.2630

[645] 실험 결과, PARP 억제제 (올라파립)과 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 함께 투여하는 경우, PARP 억제제가 세포 독성을 보이는 농도 (10 μM)의 1/10 수준 (1 μM)에서도 세포 사멸 효과가 나타났다. 이는, PARP 억제제와 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 함께 투여할 때, PARP 억제제는 단독으로 세포 독성을 보이는 농도보다 훨씬 낮은 농도로 투여해도 효과를 보이므로, 부작용이 더 적고 안전함을 시사한다.

[646]

[647] **실험예 5. 세포 사멸 실험 #4 - PARP 억제제 종류에 따른 세포 사멸 효과**

[648] 실험예 5.1. 실험 구성 및 실험 방법

[649] PARP 억제제 종류에 따른 세포 사멸 효과를 확인하기 위해 다음 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실험예 1.1에 따라 배양한 HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포에 다음 표에 따른 구성의 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 처리하였다.

[650] [표8]

Cas label	**sgRNA label**	**Form**	**Cas / nCas protein**	**Scaffold of guide RNA**	**Guide domain of guide RNA**	**PARP inhibitor (or another agent)**
$Cas9^{WT}$	Mock	-	SEQ ID NO: 1	No guide RNA	No guide RNA	DMSO
$Cas9^{WT}$	NT	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	DMSO
$Cas9^{WT}$	Umix-2	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 32	DMSO
$Cas9^{WT}$	Umix-3	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 33	DMSO
$Cas9^{WT}$	Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	DMSO
$Cas9^{WT}$	MT-50	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	DMSO

nCas 9^{D10A}	Mock	-	SEQ ID NO: 2	No guide RNA	No guide RNA	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	NT	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 53	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	Drug only	-	No Cas protein	No guide RNA	No guide RNA	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	Umix-2	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 32	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	Umix-3	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 33	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	Umix-4	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 31 to 34	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib
nCas 9^{D10A}	MT-50	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39	One of DMSO, Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Velaparib, or Iniparib

[651] $nCas9^{D10A}$를 사용하는 실시예의, 각각의 RNP 구성에 대해, 올라파립, 루카파립, 니라파립, 벨리파립, 또는 이니파립 중 선택된 하나의 PARP 억제제를 같이 투여하였다. 대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

[652] 실험에 사용한 Cas 단백질 및 nCas 단백질은 실험예 1.2에 따라 제조하였고, 사용한 sgRNA는 실험예 1.3에 따라 제조하였으며, nCas 단백질과 sgRNA를 실험예 1.7에 따라 RNP 형태로 세포에 투여하였다. 각각의 PARP 억제제는 위 표에 개시된 물질을 실험예 1.6에 개시된 농도에 따라 각각의 세포에 처리하였다.

[653] 이후, 실험예 1.8에 따라 세포 생존률을 측정하였다.

[654] 실험예 5.2. PARP 억제제 종류에 따른 세포 사멸 실험 결과

[655] 실험예 5.1에 따른 실험 결과는 도 7 내지 도 8에 나타내었다. 도 7, 도 8에 대한 정량 데이터는 다음 표에 나타내었다:

[656] [표9]

CellLine	CRISPR	PARPi	Target	Relative cell viability (average, n=3)
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	Mock	1
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	Non-target	0.9838
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	Umix-2	0.8224
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	Umix-3	0.6143
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	Umix-4	0.1972
HeLa	$Cas9^{WT}$	DMSO	MT-50	0.1610
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Mock	0.9493
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Non-target	0.9947
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-2	0.9348
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-3	0.9250
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-4	0.8973
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DMSO	MT-50	0.4079
HeLa	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Mock	0.9135
HeLa	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Non-target	1.0018
HeLa	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-2	0.7135
HeLa	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-3	0.3623
HeLa	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-4	0.1999

HeLa	nCas9^{D10A}	Olaparib	MT-50	0.1507
HeLa	nCas9^{D10A}	Olaparib	drug_only	0.8856
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	Mock	0.7584
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	Non-target	0.7436
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	Umix-2	0.6221
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	Umix-3	0.2234
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	Umix-4	0.2354
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	MT-50	0.1482
HeLa	nCas9^{D10A}	Rucaparib	drug_only	0.7407
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	Mock	1.2444
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	Non-target	1.1930
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	Umix-2	1.0610
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	Umix-3	0.6240
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	Umix-4	0.4544
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	MT-50	0.4796
HeLa	nCas9^{D10A}	Niraparib	drug_only	1.1924
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	Mock	1.0773
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	Non-target	0.9843
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-2	0.8355
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-3	0.3616
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-4	0.3864
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	MT-50	0.4051
HeLa	nCas9^{D10A}	Veliparib	drug_only	1.2443

[657] [표10]

CellLine	**CRISPR**	**PARPi**	**Target**	**Relative cell viability (average, n=3)**
HCT-116	Cas9^{WT}	DMSO	Mock	1
HCT-116	Cas9^{WT}	DMSO	Non-target	0.9038
HCT-116	Cas9^{WT}	DMSO	Umix-2	0.7973

HCT-116	$Cas9^{WT}$	DMSO	Umix-3	0.3527
HCT-116	$Cas9^{WT}$	DMSO	Umix-4	0.3706
HCT-116	$Cas9^{WT}$	DMSO	MT-50	0.2636
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Mock	1.0499
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Non-target	1.0337
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-2	0.9629
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-3	0.9809
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	Umix-4	0.9679
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DMSO	MT-50	0.8059
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Mock	1.0164
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Non-target	0.9147
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-2	0.8940
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-3	0.6589
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	Umix-4	0.2872
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	MT-50	0.2388
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Olaparib	drug_only	1.1219
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	Mock	1.0585
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	Non-target	1.0405
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	Umix-2	0.6658
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	Umix-3	0.6846
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	Umix-4	0.3262
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	MT-50	0.2782
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Rucaparib	drug_only	1.0701
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Niraparib	Mock	0.9651
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Niraparib	Non-target	0.8608
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Niraparib	Umix-2	0.7023
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Niraparib	Umix-3	0.6104
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	Niraparib	Umix-4	0.4612

HCT-116	nCas9^{D10A}	Niraparib	MT-50	0.3127
HCT-116	nCas9^{D10A}	Niraparib	drug_only	0.9015
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	Mock	0.9574
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	Non-target	0.8435
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-2	0.8020
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-3	0.6189
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	Umix-4	0.5577
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	MT-50	0.6136
HCT-116	nCas9^{D10A}	Veliparib	drug_only	0.8648

[658] 실험 결과, 각각의 PARP 억제제와 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 투여했을 때, 1) PARP 억제제와 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물이 모두 전달되고, 2) 표적 핵산이 3개 이상인 경우 모두에서 일정 수준 이상의 세포 사멸 효과가 관찰되었다. 이는, PARP 억제제의 종류와 상관 없이, 1) PARP-매개 DNA 수선 기전을 억제하고, 2) CRISPR/nCas 조성물로 세포 유전체 내 3군데 이상에 단일가닥 절단을 일으키면, 세포가 사멸함을 증명한다. 더 나아가, 모든 종류의 PARP 억제제를 단독으로 투여한 실시예에서는 세포 사멸 효과가 거의 일어나지 않는 것으로 보아, 세포 독성을 거의 보이지 않은 농도의 PARP 억제제를 사용해도 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 조합하면 세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있다.

[659]

[660] **실험예 6. CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제 투여 시 돌연변이 도입 여부 확인**

[661] 실험예 6.1. 실험 구성 및 실험 방법

[662] 세포에 1) 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 조성물, 2) CRISPR/nCas 조성물, 그리고 3) CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 투여하는 경우, 유전체 내에 돌연변이가 도입되는 정도를 비교하기 위해 다음 실험을 수행하였다: 구체적으로, 실험예 1.1에 따라 배양한 HeLa 세포, 그리고 HCT-116 세포에 다음 표에 따른 구성의 물질을 처리하였다:

[663] [표11]

RNP transfected	Target Gene	Form	Cas / nCas protein	Scaffold of guide RNA	Guide domain of guide RNA
Cas9^{WT}	HPRT1	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	CUAGAAUGACCAGUC AACAG (SEQ ID NO: 41)
Cas9^{WT}	BCR	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	GCUACCUAAGCACAG CCACA (SEQ ID NO: 42)

$Cas9^{WT}$	DNA JC6	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	AUGGACCCCUAGGUC UCCGG (SEQ ID NO: 43)
$Cas9^{WT}$	PLX DC2	RNP	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	UGUUUGGUGGGUACU CACCC (SEQ ID NO: 44)
$nCas9^{D10A}$	HPRT1	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 41
$nCas9^{D10A}$	BCR	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 42
$nCas9^{D10A}$	DNA JC6	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 43
$nCas9^{D10A}$	PLX DC2	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	HPRT1	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 41
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	BCR	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 42
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	DNA JC6	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 43
$nCas9^{D10A}$ + Olaparib	PLX DC2	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44

[664] 실험에 사용한 Cas 단백질 및 nCas 단백질은 실험예 1.2에 따라 제조하였고, 사용한 sgRNA는 실험예 1.3에 따라 제조하였으며, nCas 단백질과 sgRNA를 실험예 1.7에 따라 RNP 형태로 세포에 투여하였다. 각각의 PARP 억제제는 위 표에 개시된 농도를 실험예 1.6에 따라 각각의 세포에 처리하였다.

[665] 그 후, 인델 도입 여부를 확인하기 위해 실험예 1.10에 따라 시퀀싱하였다. 시퀀싱에 사용한 프라이머는 다음 표에 나타내었다:

[666] [표12]

Label	**DNA Sequence (5' to 3')**
HPRT1-Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTG TACATAAGGATATACATATACA (SEQ ID NO: 45)

HPRT1-Backward	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATACCTTTCCAGTTAAAGTT (SEQ ID NO: 46)
BCR-Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCCATGCTGCTGTCTGTA (SEQ ID NO: 47)
BCR-Backward	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGCCTGGAGGAGTCTTAGC (SEQ ID NO: 48)
DNAJC6-Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGAGGATTCTGGGGTTTT (SEQ ID NO: 49)
DNAJC6-Backward	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCGCAATAGGAAGGAAGG (SEQ ID NO: 50)
PLXDC2-Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAAGAGGGCAGAAGGATGG (SEQ ID NO: 51)
PLXDC2-Backward	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATTGCCCAGAAAACACAGG (SEQ ID NO: 52)

[667] 실험예 6.2. 실험 결과

[668] 실험예 6.1에 따른 실험 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9에 대한 정량 데이터는 다음 표에 나타내었다:

[669] [표13]

CellLine	**CRISPR**	**Target**	**Mutation Efficiency (%, Average, n=3)**
HeLa	$Cas9^{WT}$	HPRT1	10.79
HeLa	$Cas9^{WT}$	BCR	0.74
HeLa	$Cas9^{WT}$	DNAJC6	22.96
HeLa	$Cas9^{WT}$	PLXDC2	0.42
HeLa	$nCas9^{D10A}$	HPRT1	2.40
HeLa	$nCas9^{D10A}$	BCR	0.50
HeLa	$nCas9^{D10A}$	DNAJC6	10.52
HeLa	$nCas9^{D10A}$	PLXDC2	0.12
HeLa	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	HPRT1	0.17
HeLa	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	BCR	0.06
HeLa	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	DNAJC6	0.19
HeLa	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	PLXDC2	0.05

HCT-116	$Cas9^{WT}$	HPRT1	14.63
HCT-116	$Cas9^{WT}$	BCR	0.19
HCT-116	$Cas9^{WT}$	DNAJC6	2.22
HCT-116	$Cas9^{WT}$	PLXDC2	0.06
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	HPRT1	11.08
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	BCR	0.20
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	DNAJC6	0.83
HCT-116	$nCas9^{D10A}$	PLXDC2	0.08
HCT-116	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	HPRT1	0.14
HCT-116	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	BCR	0.06
HCT-116	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	DNAJC6	0.07
HCT-116	$nCas9^{D10A}$+Olaparib	PLXDC2	0.08

[670] 실험 결과, 이중가닥 절단 활성을 가지는 CRISPR/Cas 조성물이 돌연변이를 가장 많이 일으키고, 그 다음 CRISPR/nCas 조성물이 돌연변이를 일으키고, 그리고 CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 투여하면 돌연변이를 거의 도입하지 않음이 관찰되었다. 이는, CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제를 함께 투여할 때, 1) 위 CRISPR/nCas 조성물에 의해 발생한 단일가닥 절단이 이중가닥 절단으로 변환되고, 2) 해당 손상이 HR 수선기전을 통해 복구되므로 돌연변이를 일으키는 비율이 낮아진다고 설명할 수 있다. 이에 대한 내용을 도 10에 모식적으로 나타내었다. 또한, 위 실험 결과는 CRISPR/nCas 조성물에 의해 발생한 단일가닥 절단이 이중가닥 절단으로 변환된다는 사실 그 자체도 시사한다. 따라서, CRISPR/nCas 조성물과 PARP 억제제가 함께 투여되어 세포 사멸을 일으킬 때, 세포 유전체 내 복수의 (즉, 3개 이상의) 단일가닥 절단이 이중가닥 절단으로 변환됨이 원인이라고 추정할 수 있다.

[671]

[672] **실험예 7. HCT-116 종양 이종 이식 마우스 모델에서 종양 성장 억제 실험**

[673] 실험예 1.10에 따라 준비한 종양 이종 이식 마우스 모델을 무작위로 4개 군으로 나누어 실험예 1.11에 따라 PARP 억제제와 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 투여하여 종양 성장 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, PBS에 희석한 Olaparib 28.5 μg, 그리고 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물을 투여하였다. 각 군별 투여한 물질은 다음 표에 나타내었다:

[674] [표14]

Label	Form	nCas protein	Scaffold of guide RNA	Guide domain of guide RNA	PARP inhibitor
PBS	-	-	-	-	-
Olaparib only	-	-	-	-	Olaparib 28.5 μg
RNP (Hmix-4) only	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	-
RNP (Hmix-4) + Olaparib	RNP	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 35 to 38	Olaparib 28.5 μg

[675] 이후, 실험예 1.13에 따라 Ki67 및 Caspase-3에 대한 면역 염색을 수행하였고, 실험예 1.14에 따라 TUNEL 조직병리학 분석을 수행하였다.

[676] 실험 결과를 다음 표 및 도 11 내지 도 13에 나타내었다.

[677] [표15]

RNP	Day	Volume of Tumor (mm^3, Average, n=4)	Standard Deviation
PBS	0	80.4	10.39
PBS	2	115.1	20.13
PBS	4	166.5	14.04
PBS	6	262.1	56.75
PBS	8	295.0	35.49
PBS	10	375.5	19.19
PBS	12	439.3	63.37
PBS	14	525.7	111.00
PBS	16	603.3	156.96
PBS	18	720.1	276.37
PBS	20	817.8	292.37
PBS	22	925.5	291.58
PBS	24	1075.6	357.24
Olaparib only	0	82.1	9.96
Olaparib only	2	117.0	20.33
Olaparib only	4	172.6	16.94
Olaparib only	6	241.8	53.08

Olaparib only	8	320.3	41.45
Olaparib only	10	371.2	12.62
Olaparib only	12	476.0	48.06
Olaparib only	14	542.7	86.33
Olaparib only	16	610.7	134.58
Olaparib only	18	702.9	238.54
Olaparib only	20	847.8	252.78
Olaparib only	22	907.4	262.77
Olaparib only	24	996.7	318.71
RNP (Hmix-4) only	0	83.3	9.51
RNP (Hmix-4) only	2	116.3	24.49
RNP (Hmix-4) only	4	141.2	18.31
RNP (Hmix-4) only	6	175.6	47.83
RNP (Hmix-4) only	8	233.2	36.15
RNP (Hmix-4) only	10	306.0	11.75
RNP (Hmix-4) only	12	383.8	27.26
RNP (Hmix-4) only	14	443.8	72.23
RNP (Hmix-4) only	16	470.1	125.88
RNP (Hmix-4) only	18	486.6	219.26
RNP (Hmix-4) only	20	520.7	247.54
RNP (Hmix-4) only	22	559.7	239.88
RNP (Hmix-4) only	24	609.1	207.15
RNP (Hmix-4) + Olaparib	0	79.3	6.28
RNP (Hmix-4) + Olaparib	2	103.8	27.79
RNP (Hmix-4) + Olaparib	4	133.9	19.41
RNP (Hmix-4) + Olaparib	6	153.4	31.27

RNP (Hmix-4) + Olaparib	8	184.9	38.04
RNP (Hmix-4) + Olaparib	10	223.0	13.37
RNP (Hmix-4) + Olaparib	12	280.9	33.36
RNP (Hmix-4) + Olaparib	14	306.5	75.11
RNP (Hmix-4) + Olaparib	16	311.2	128.59
RNP (Hmix-4) + Olaparib	18	328.7	185.91
RNP (Hmix-4) + Olaparib	20	357.3	221.87
RNP (Hmix-4) + Olaparib	22	356.5	203.91
RNP (Hmix-4) + Olaparib	24	405.6	151.13

[678] 이를 실험예 1.12에 따라 종양 성장 억제율을 구한 결과를 다음 표에 나타내었다:

[679] [표16]

RNP	**Tumor Inhibition Rate (%)**
Olaparib_only	8.10%
Hmix-4_only	47.16%
Hmix-4+Olaparib	67.21%

[680] 실험 결과, PARP 억제제 (올라파립) 함께 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물 ($nCas^{D10A}$)를 처리하면 매우 효율적으로 종양을 억제함을 보였다. 나아가, 위 조합에 의한 종양 성장 억제는 관찰 가능한 부작용이나 체중 감소 없이 나타났으며, 이는 종양 세포만을 선택적으로 사멸시킴을 시사한다. 또한, 세포 사멸 수준(Caspase-3 및 TUNEL 양성)이 증가하고, 증식 세포 수준(Ki67 양성)이 감소한 것으로 나타났는데 (도 12), 이는 종양 성장 억제가 DNA 손상과 그에 따른 세포 사멸에 의해 유도되었음을 나타낸다.

[681]

산업상 이용가능성

[682] 이 명세서에서 개시하는 세포 사멸 방법은 표적 세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 또한, 표적 세포가 아닌 세포에 돌연변이를 도입하는 등의 원치 않은 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, 상기 세포 사멸 방법은 암 환자의 종양만을 선택적으로 사멸시키는 등, 환자에게 좋지 않은 특정 세포군을 사멸시키는 데 활용할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 3개 이상의 표적 핵산을 포함하고,
상기 방법은 다음을 포함함:
세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 표적 세포 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 세포를 사멸시키며,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 1 종류 이상의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하고,
각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 또는 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고
가이드 도메인과 스캐폴드를 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산;
여기서, 상기 스캐폴드는 상기 Cas 단백질과 상호작용하여 상기 가이드 RNA가 상기 Cas 단백질과 복합체를 이루도록 하고,
상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[청구항 2] 제1항의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 표적 세포는 서로 다른 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 3 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 서로 다른 핵산 서열을 표적하고,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[청구항 3] 제1항의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 표적 세포는 같은 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 1 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,
상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열을 표적함.

[청구항 4] 제2항 또는 제3항 중 어느 하나의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음 중 선택된 형태임:
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 그리고 가이드 RNA를 포함하며, 상기 Cas 단백질과 가이드 RNA가 결합하여 RNA-단백질 복합체를 이룸; 또는
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 가이드 RNA를 포함함.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 PARP 억제제는 i) 올라파립 (Olaparib); ii) 루카파립 (Rucaparib); iii) 니라파립 (Niraparib); iv) 벨리파립 (Veliparib); v) 이니파립 (Iniparib); 또는 vi) i) 내지 v)의 조합 중 선택됨.

[청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 표적 핵산들은 표적 가닥과 비표적 가닥을 포함하는 이중가닥 DNA이고,
상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함은 다음 중 선택된 것임:
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 비표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 동등한 RNA 서열을 가짐;
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 혼성화될 수 있음; 또는
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 상보적인 RNA 서열을 가짐.

[청구항 7] 환자의 암 세포를 선택적으로 사멸시키는 암 치료 방법으로,
상기 환자의 암 세포는 정상 세포에는 포함되지 않은 3개 이상의 표적 핵산을 포함하고,
상기 암 치료 방법은 다음을 포함함:
세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 환자에게 투여하는 과정,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 상기 환자의 암 세포의 유전체 내 3개 이상의 표적 핵산에서 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 암 세포를 사멸시키며,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 1 종류 이상의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하고,
각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 또는 상기 Cas 단백질을 암호화하는 핵산; 그리고

가이드 도메인과 스캐폴드를 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 핵산;
여기서, 상기 스캐폴드는 상기 Cas 단백질과 상호작용하여 상기 가이드 RNA가 상기 Cas 단백질과 복합체를 이루도록 하고,
상기 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[청구항 8] 제7항의 암 치료 방법에 있어서,
상기 암 세포는 서로 다른 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 3 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 서로 다른 핵산 서열을 표적하고,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함.

[청구항 9] 제7항의 암 치료 방법에 있어서,
상기 암 세포는 같은 핵산 서열을 가지는 적어도 3개의 표적 핵산을 포함하고,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 적어도 1 종류의 CRISPR/nCas 조성물을 포함하며,
상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인은 상기 표적 핵산들의 핵산 서열을 표적함.

[청구항 10] 제7항 내지 제9항 중 어느 하나의 암 치료 방법에 있어서,
상기 PARP 억제제는 i) 올라파립 (Olaparib); ii) 루카파립 (Rucaparib); iii) 니라파립 (Niraparib); iv) 벨리파립 (Veliparib); v) 이니파립 (Iniparib); 또는 vi) i) 내지 v)의 조합 중 선택됨.

[청구항 11] 제7항 내지 제10항 중 어느 하나의 암 치료 방법에 있어서,
상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 상기 PARP 억제제는 각각 독립적으로 환자에게 투여됨.

[청구항 12] 제8항 또는 제9항 중 어느 하나의 암 치료 방법에 있어서,
상기 각 종류의 CRISPR/nCas 조성물은 다음 중 선택됨:
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질, 그리고 가이드 RNA를 포함하며, 상기 Cas 단백질과 가이드 RNA가 결합하여 RNA-단백질 복합체를 이룸; 또는
단일가닥 절단 활성을 가지는 Cas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 가이드 RNA를 포함함.

[청구항 13] 제7항 내지 제12항 중 어느 하나의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,

상기 표적 핵산들은 표적 가닥과 비표적 가닥을 포함하는 이중가닥 DNA이고,
상기 CRISPR/nCas 조성물의 가이드 RNA의 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 핵산 서열 중 하나를 표적함은 다음 중 선택된 것임:
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 비표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 동등한 RNA 서열을 가짐;
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 혼성화될 수 있음; 또는
상기 가이드 도메인이 상기 표적 핵산들의 표적 가닥의 DNA 서열 중 하나와 상보적인 RNA 서열을 가짐.

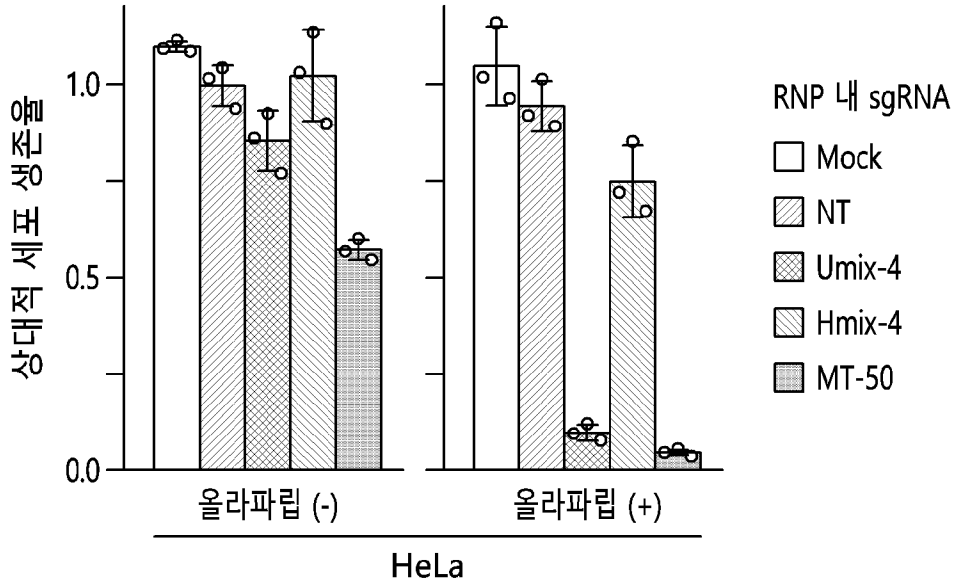
[청구항 14] 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함하고,
상기 방법은 다음을 포함함:
세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:
제1 nCas 단백질, 그리고 제1 가이드 RNA를 포함하는 제1 CRISPR/nCas 복합체;
제2 nCas 단백질, 그리고 제2 가이드 RNA를 포함하는 제2 CRISPR/nCas 복합체; 그리고
제3 nCas 단백질, 그리고 제3 가이드 RNA를 포함하는 제3 CRISPR/nCas 복합체;
여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제1 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 제2 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제2 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 제3 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제3 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 사멸시킴.

[청구항 15] 표적 세포 사멸 방법으로, 상기 표적 세포는 유전체 내에 제1 표적 핵산, 제2 표적 핵산, 그리고 제3 표적 핵산을 포함하고,
상기 방법은 다음을 포함함:
세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물, 그리고 PARP 억제제를 표적 세포에 전달함,
여기서, 상기 세포 사멸용 CRISPR/nCas 조성물은 다음을 포함함:
제1 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제1 가이드 RNA를 포함하는 제1 CRISPR/nCas 조성물;

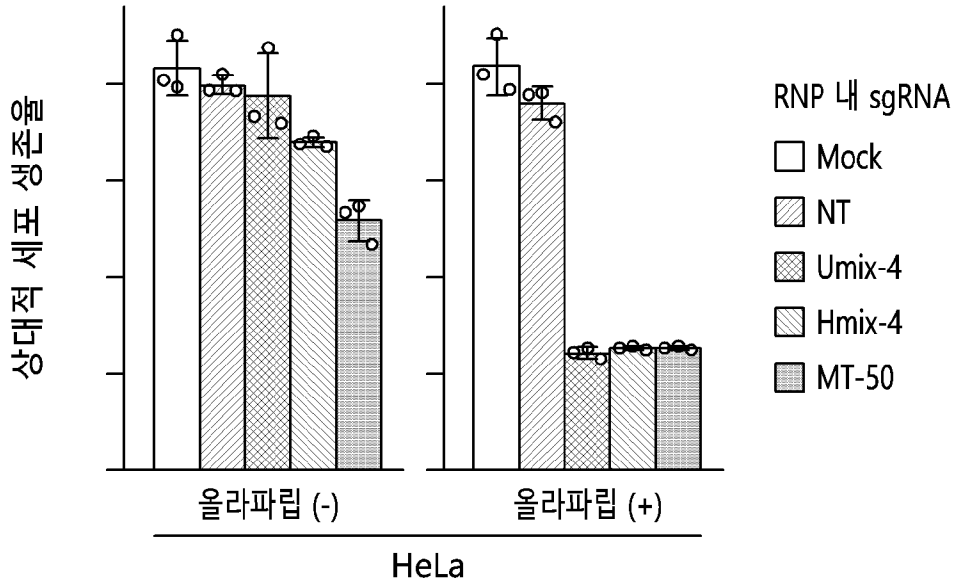
제2 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제2 가이드 RNA를 포함하는 제2 CRISPR/nCas 조성물; 그리고
제3 nCas 단백질을 암호화하는 mRNA, 그리고 제3 가이드 RNA를 포함하는 제3 CRISPR/nCas 조성물;
여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제1 nCas 단백질과 상기 제1 가이드 RNA가 결합한 제1 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,
상기 제2 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제2 nCas 단백질과 상기 제2 가이드 RNA가 결합한 제2 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,
상기 제3 CRISPR/nCas 조성물은 표적 세포 내에서 제3 nCas 단백질과 상기 제3 가이드 RNA가 결합한 제3 CRISPR/nCas 복합체가 형성되도록 유도하고,
여기서, 상기 제1 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제1 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 제2 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제2 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 제3 CRISPR/nCas 복합체는 상기 제3 표적 핵산에 단일가닥 핵산 절단을 일으키고,
상기 CRISPR/nCas 조성물과 상기 PARP 억제제가 함께 작용하여 상기 표적 세포를 사멸시킴.

[청구항 16] 제14항 내지 제15항 중 어느 하나의 표적 세포 사멸 방법에 있어서,
상기 표적 세포는 암 세포이고, 상기 제1 표적 핵산, 상기 제2 표적 핵산, 그리고 상기 제3 표적 핵산은 암 세포 특이적인 표적 핵산임.

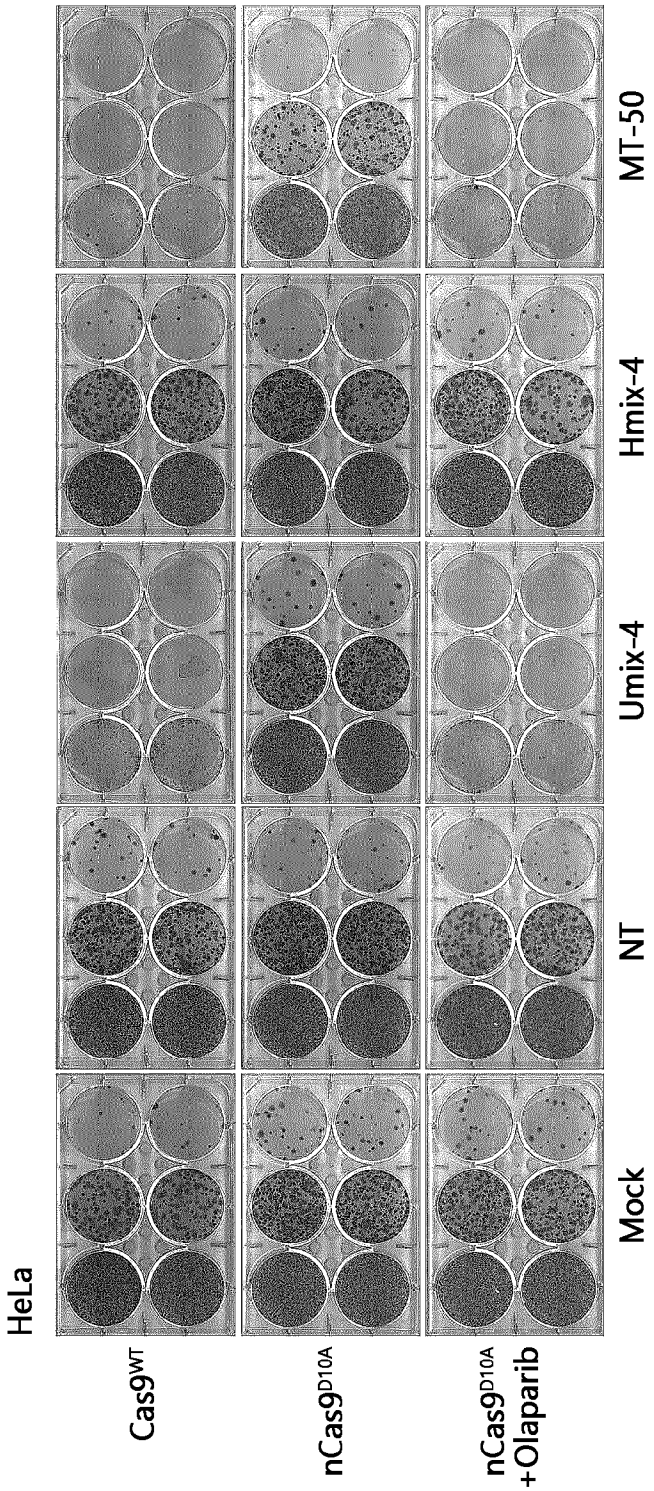
[도1]


상대적 세포 생존율
1.0
0.5
0.0
올라파립 (-)
올라파립 (+)
HeLa
RNP 내 sgRNA
Mock
NT
Umix-4
Hmix-4
MT-50

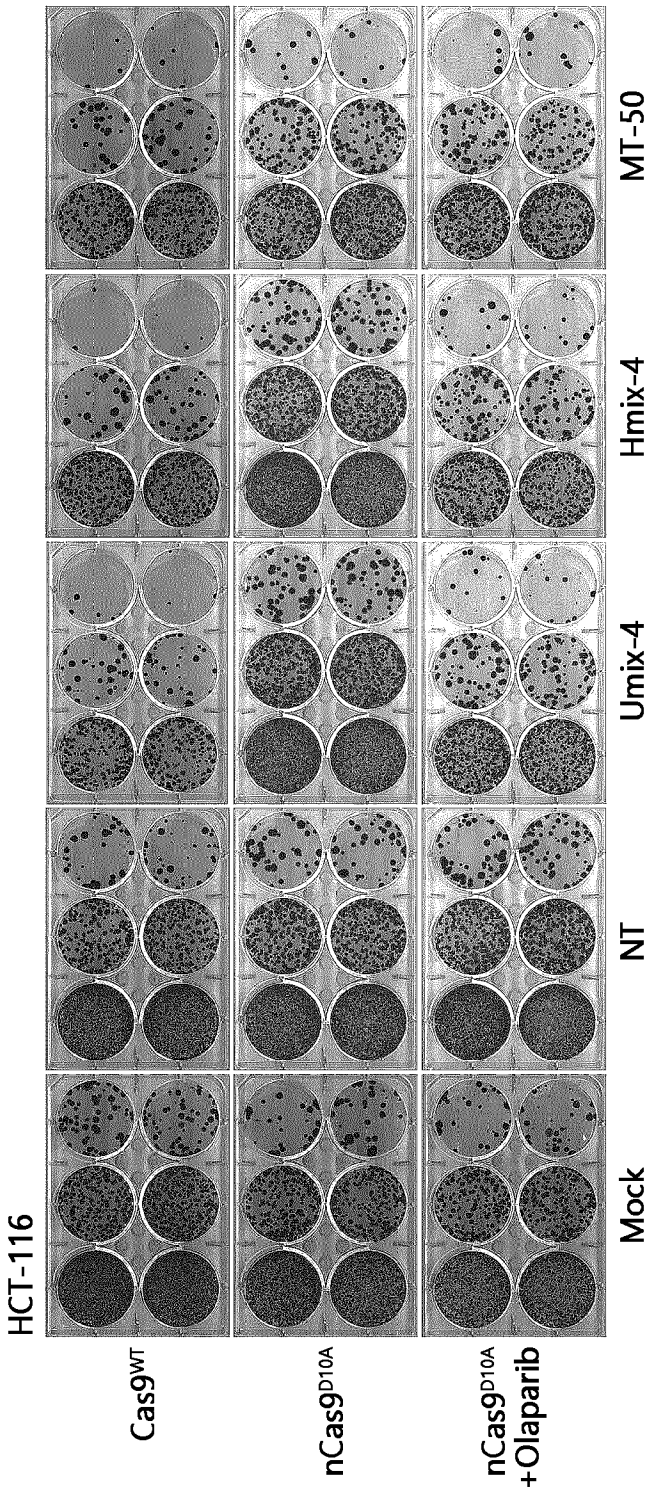
[도2]



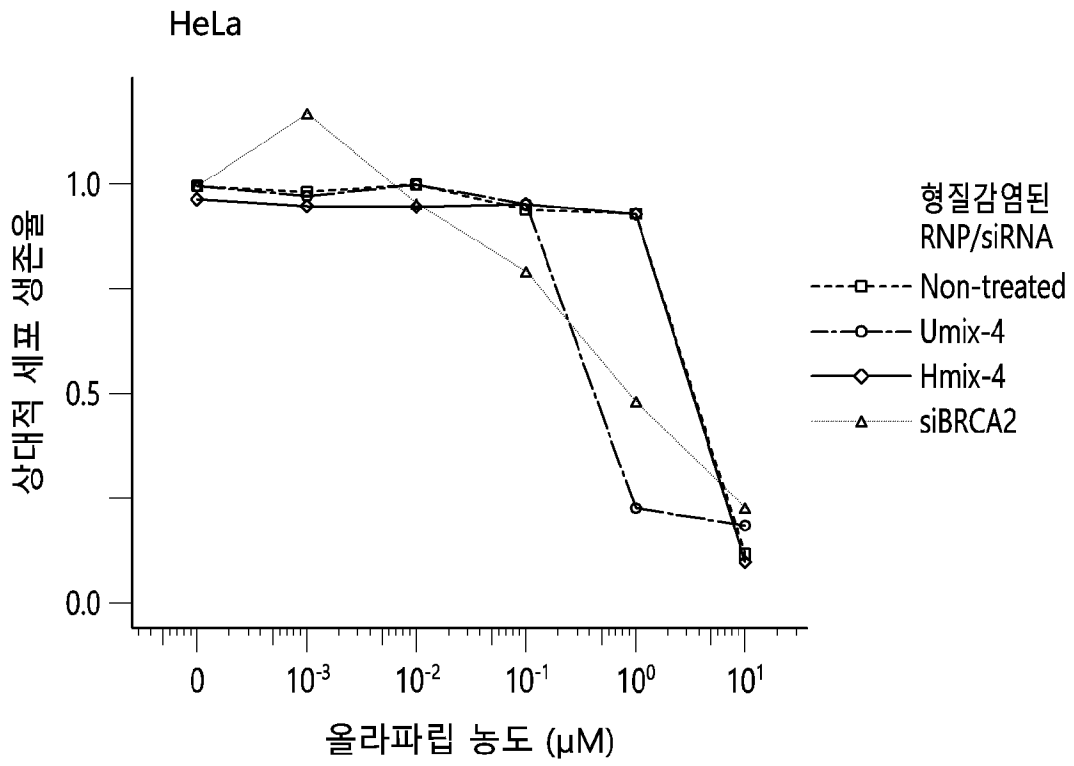
[도3]


HeLa
Cas9WT
nCas9D10A
nCas9D10A +Olaparib
Mock
NT
Umix-4
Hmix-4
MT-50

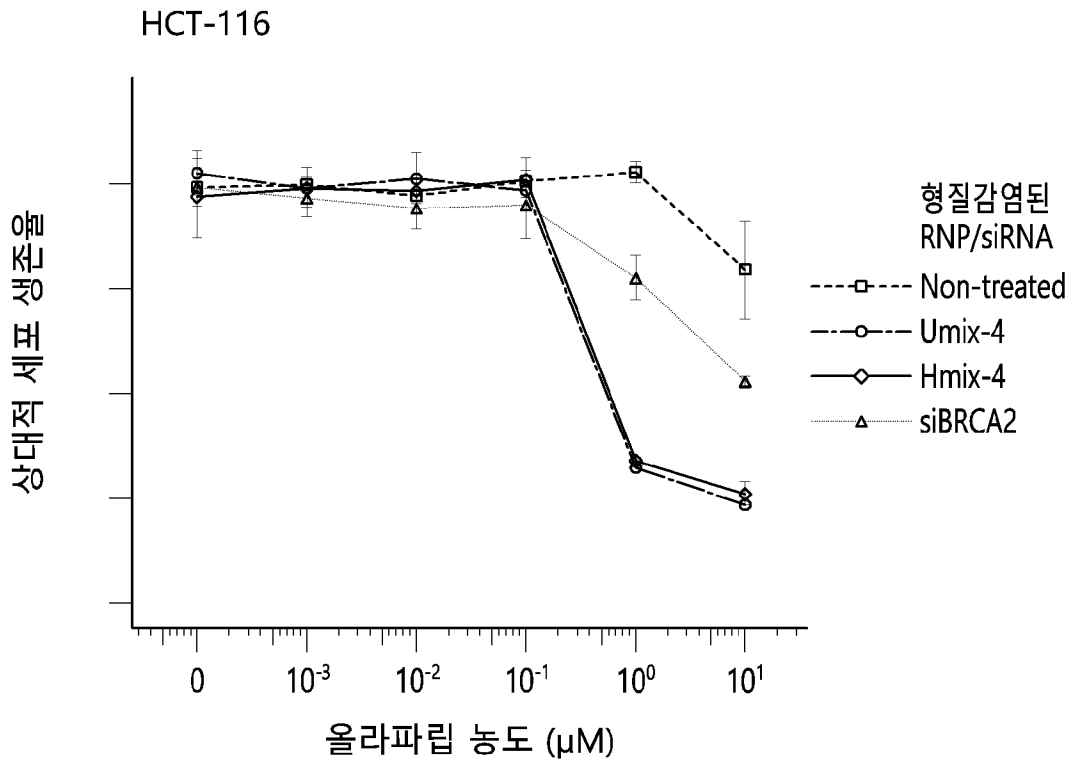
[도4]


HCT-116
Cas9WT
nCas9D10A
nCas9D10A +Olaparib
Mock
NT
Umix-4
Hmix-4
MT-50

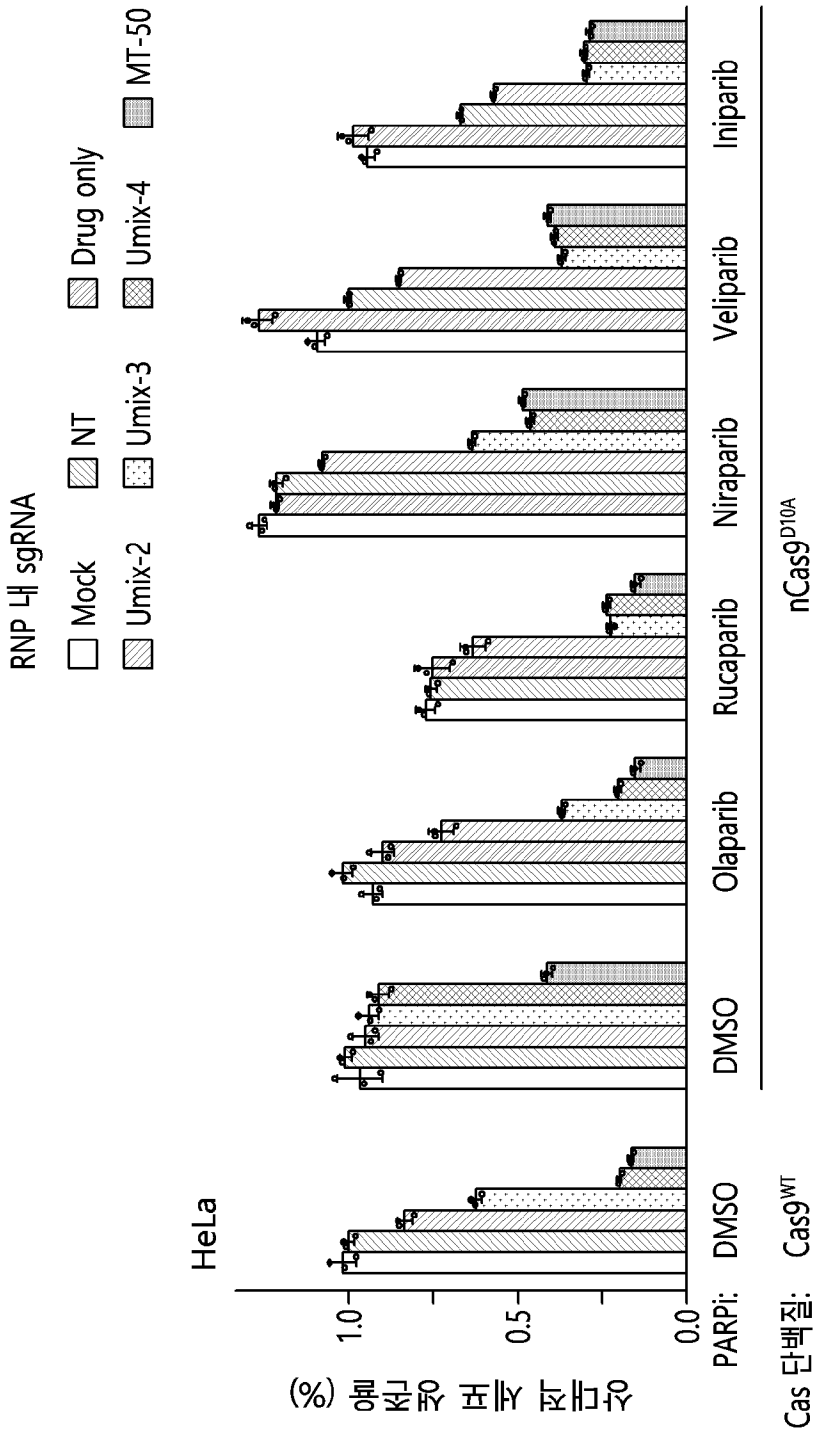
[도5]


HeLa
상대적 세포 생존율
1.0
0.5
0.0
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
올라파립 농도 (μM)
형질감염된
RNP/siRNA
Non-treated
Umix-4
Hmix-4
siBRCA2

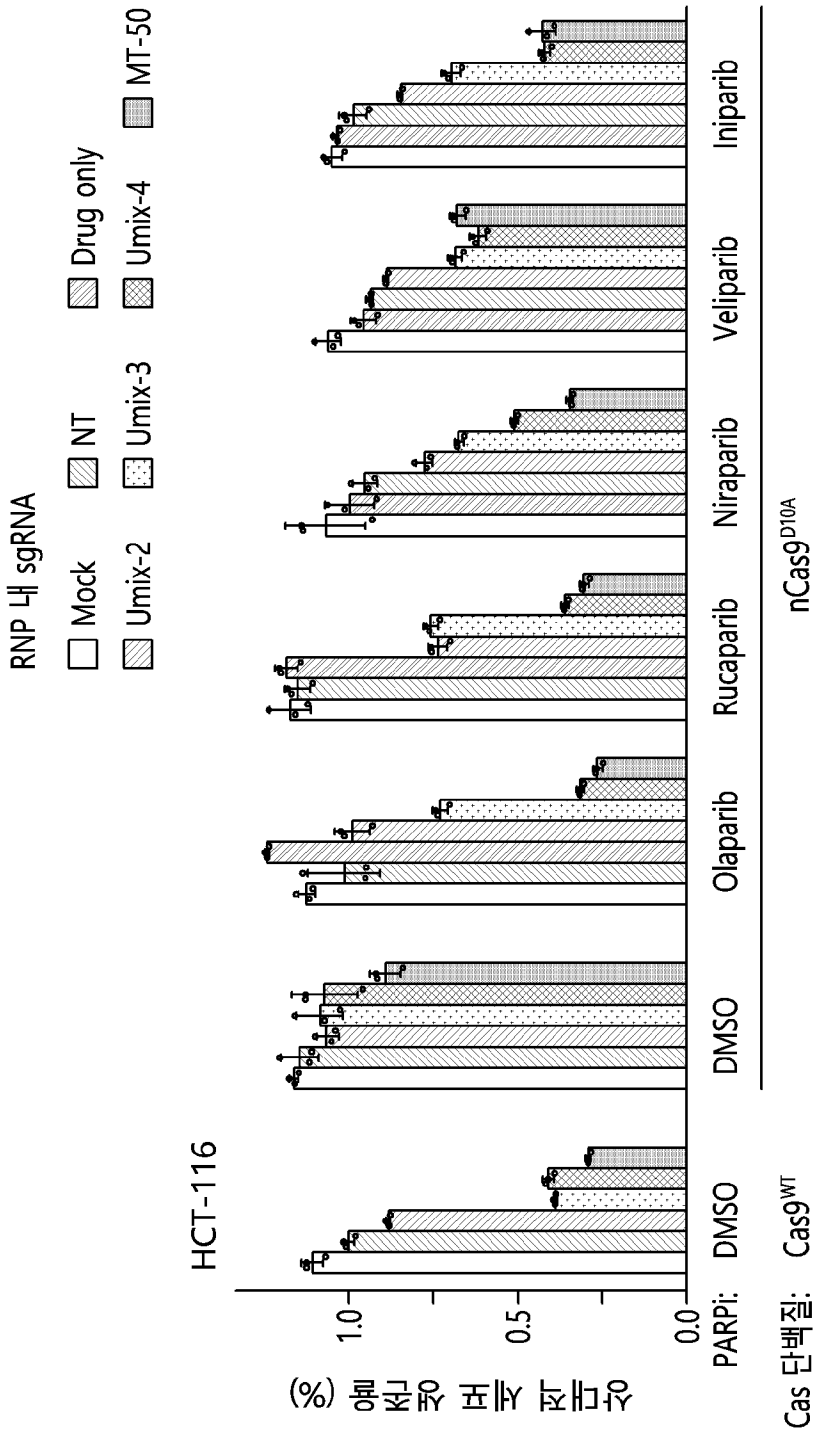
[도6]


HCT-116
상대적 세포 생존율
0
10-3
10-2
10-1
100
101
올라파립 농도 (μM)
형질감염된
RNP/siRNA
Non-treated
Umix-4
Hmix-4
siBRCA2

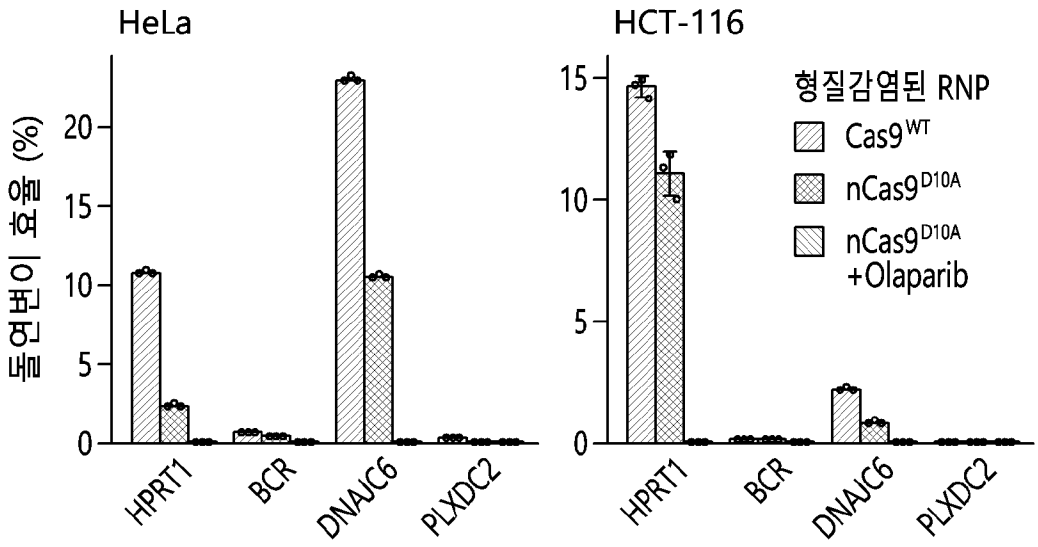
[도7]


RNP 내 sgRNA
Mock
NT
Drug only
MT-50
Umix-2
Umix-3
Umix-4
HeLa
상대적 세포 생존율 (%)
1.0
0.5
0.0
PARPi: DMSO DMSO Olaparib Rucaparib Niraparib Veliparib Iniparib
Cas 단백질: Cas9WT nCas9D10A

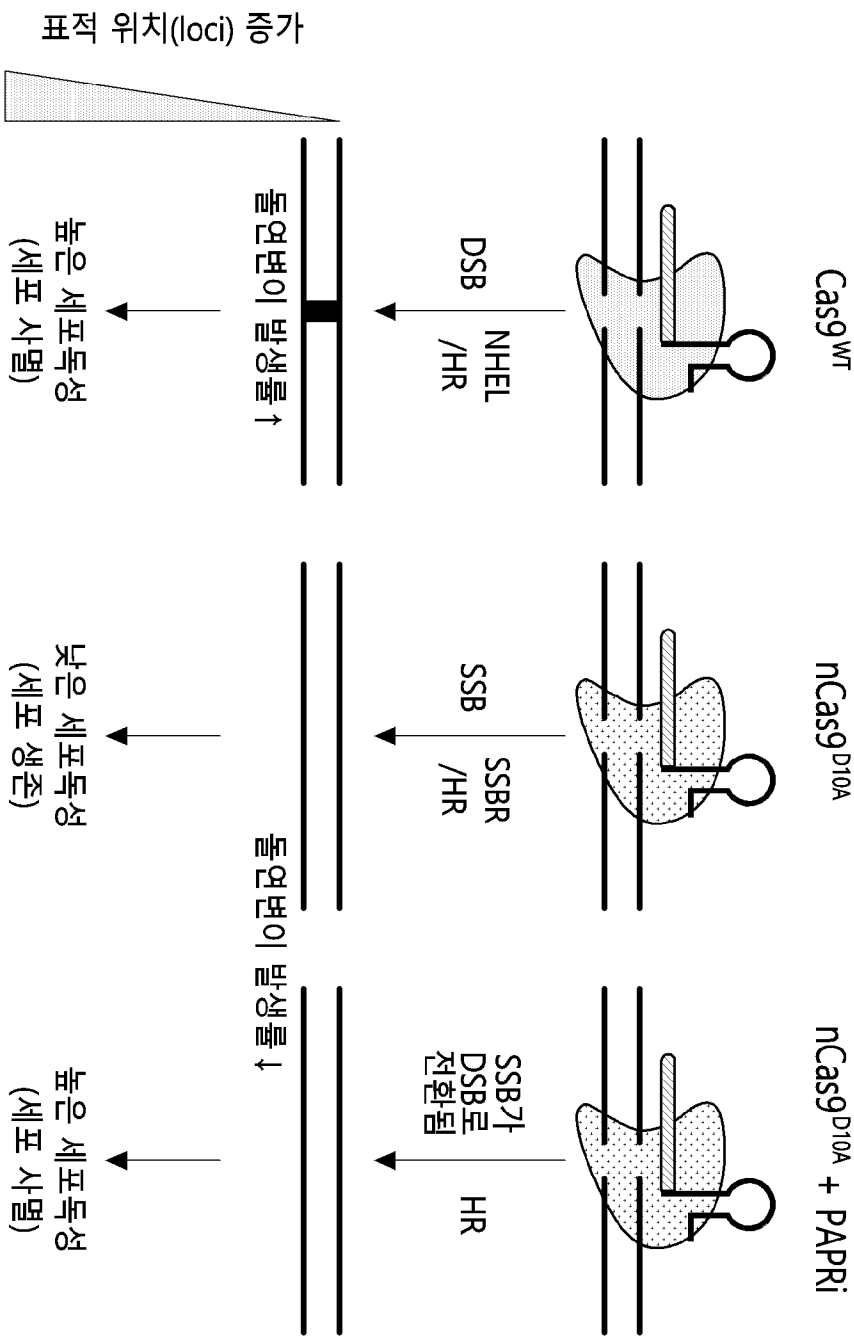
[도8]


RNP 내 sgRNA
Mock
NT
Drug only
Umix-2
Umix-3
Umix-4
MT-50
HCT-116
상대적 세포 생존율 (%)
1.0
0.5
0.0
PARPi: DMSO DMSO Olaparib Rucaparib Niraparib Veliparib Iniparib
Cas 단백질: Cas9WT nCas9D10A

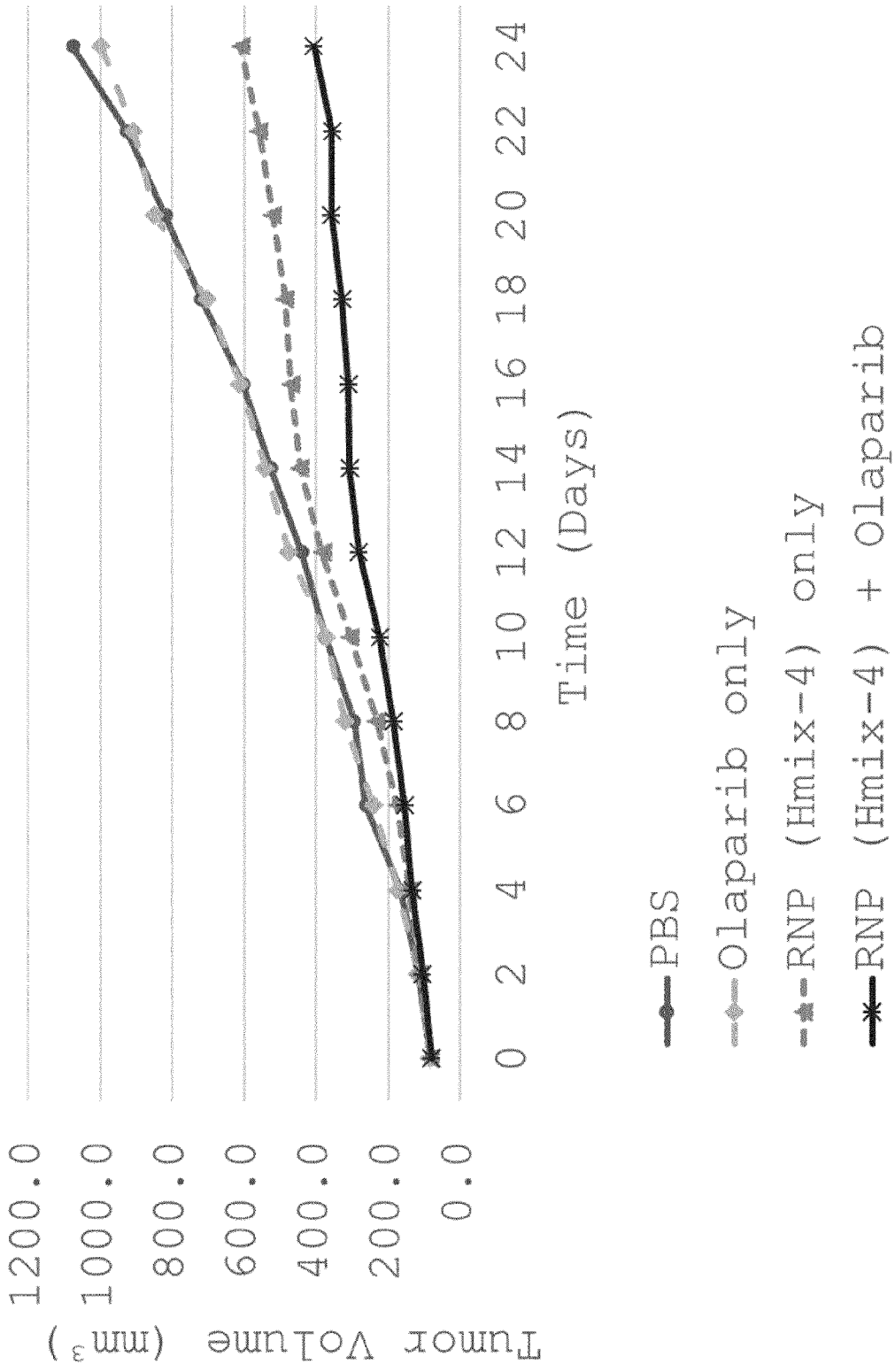
[도9]


HeLa
HCT-116
돌연변이 효율 (%)
0
5
10
15
20
HPRT1
BCR
DNAJC6
PLXDC2
형질감염된 RNP
Cas9WT
nCas9D10A
nCas9D10A +Olaparib

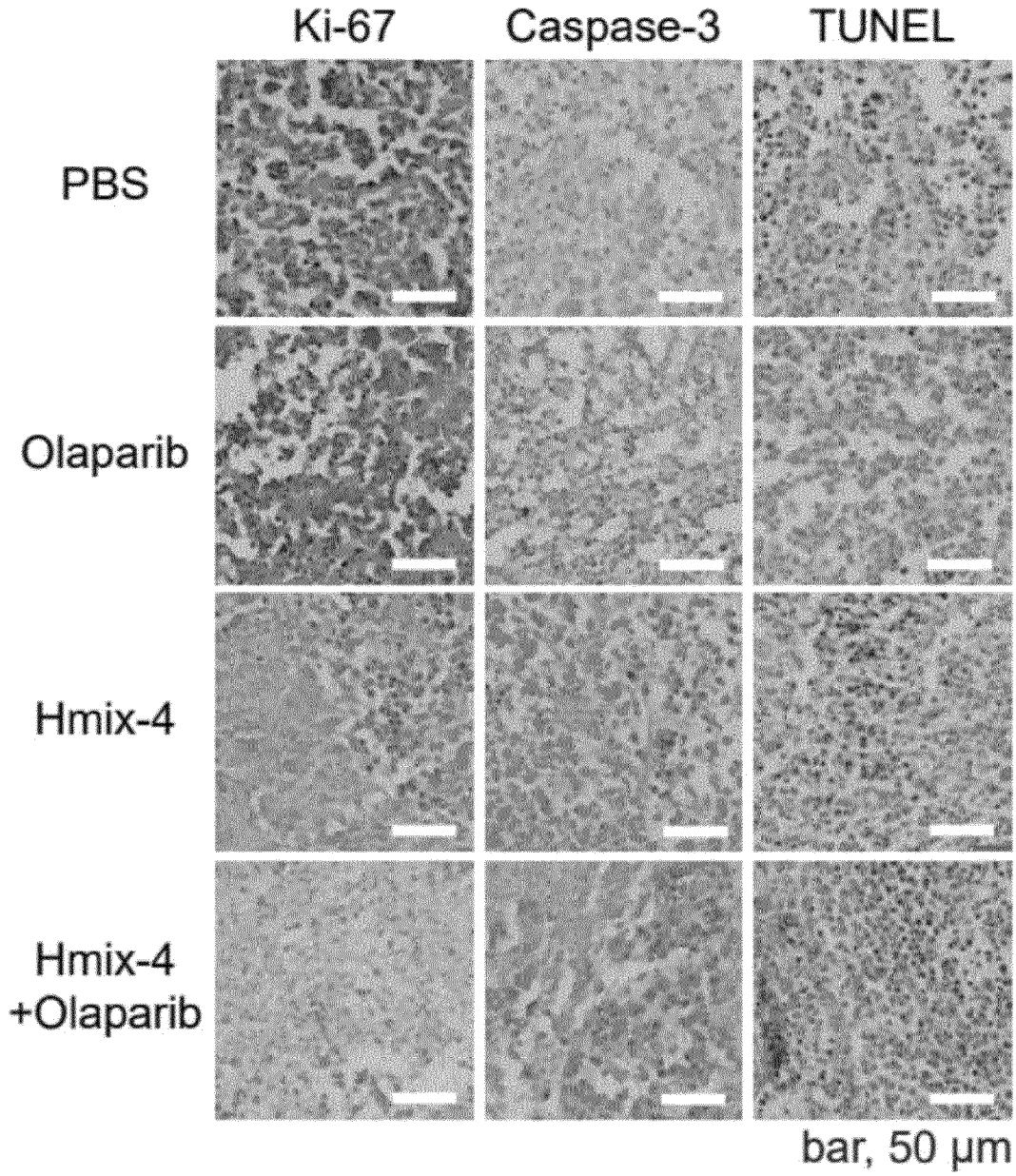
[도10]


표적 위치(loci) 증가
Cas9WT
nCas9D10A
nCas9D10A + PAPRi
DSB
NHEJ
/HR
SSB
SSBR
/HR
SSB가
DSB로
전환됨
HR
돌연변이 발생률 ↑
돌연변이 발생률 ↑
돌연변이 발생률 ↑
목적 세포 사멸)
목적 세포 생존)
목적 세포 사멸)

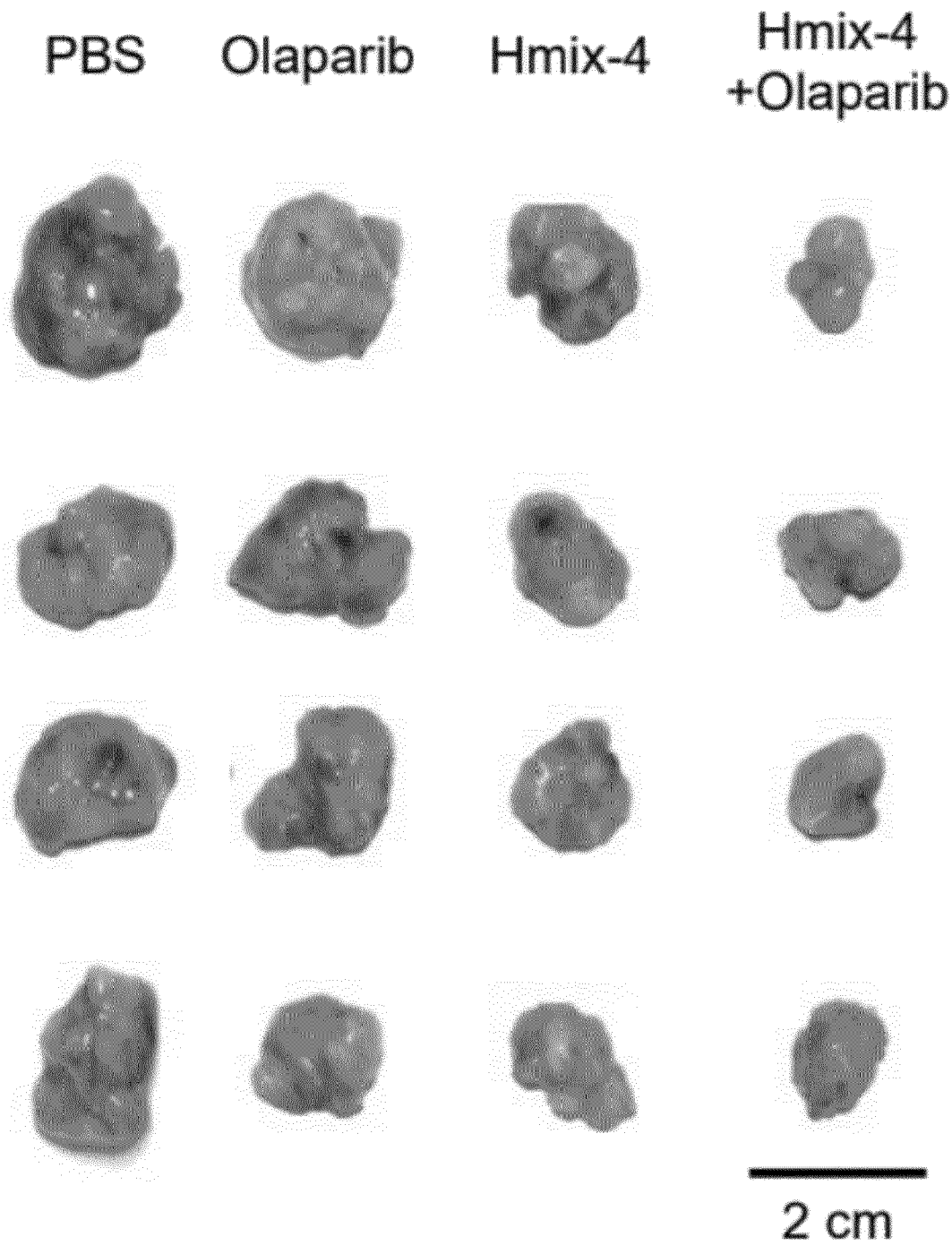
[도11]


Tumor Volume (mm³)
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Time (Days)
PBS
Olaparib only
RNP (Hmix-4) only
RNP (Hmix-4) + Olaparib

[도12]


Ki-67
Caspase-3
TUNEL
PBS
Olaparib
Hmix-4
Hmix-4
+Olaparib
bar, 50 μm

[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/22(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/22(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/64(2006.01); C12N 15/85(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12N 9/12(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 표적 핵산(target nucleic acid), 세포 사멸(cell death), CRISPR-관련 단백질(CRISPR-related protein, Cas), 가이드 RNA(guide RNA), 단일 가닥(single strand), 폴리(ADP-리보스) 중합효소 억제제(poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) inhibitor)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022-140572 A1 (MAMMOTH BIOSCIENCES, INC.) 30 June 2022 (2022-06-30) See paragraphs [0004]-[0128]; and claim 1.	1-4,14-16
A	US 2018-0298392 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 18 October 2018 (2018-10-18) See entire document.	1-4,14-16
A	US 2014-0242702 A1 (SIGMA ALDRICH CO. LLC et al.) 28 August 2014 (2014-08-28) See entire document.	1-4,14-16
A	US 2020-0002731 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 02 January 2020 (2020-01-02) See entire document.	1-4,14-16
A	KR 10-2021-0049859 A (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI, LLC) 06 May 2021 (2021-05-06) See entire document.	1-4,14-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 November 2024	**20 November 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012084

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012084

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **7-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7-13 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☑ Claims Nos.: **5,6,11,13**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/012084

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022-140572 A1	30 June 2022	EP 4267252 A1	01 November 2023
		US 2024-0084275 A1	14 March 2024
US 2018-0298392 A1	18 October 2018	EP 3215617 A2	13 September 2017
		EP 3274453 A2	31 January 2018
		EP 3851530 A1	21 July 2021
		US 11680268 B2	20 June 2023
		US 2016-0281111 A1	29 September 2016
		US 2023-0018543 A1	19 January 2023
		WO 2016-073990 A3	11 August 2016
		WO 2016-154579 A2	29 September 2016
US 2014-0242702 A1	28 August 2014	EP 2958996 A1	30 December 2015
		JP 2016-509063 A	24 March 2016
		JP 2019-112432 A	11 July 2019
		JP 6812478 B2	13 January 2021
		US 10227610 B2	12 March 2019
		WO 2014-130955 A1	28 August 2014
US 2020-0002731 A1	02 January 2020	CN 107208078 A	26 September 2017
		CN 113444747 A	28 September 2021
		EP 3221457 A2	27 September 2017
		EP 3521437 A1	07 August 2019
		JP 2017-535271 A	30 November 2017
		JP 6727199 B2	22 July 2020
		JP 7101211 B2	14 July 2022
		KR 10-2017-0102234 A	08 September 2017
		KR 10-2022-0093013 A	04 July 2022
		KR 10-2531016 B1	10 May 2023
		US 11697828 B2	11 July 2023
		US 2016-0145646 A1	26 May 2016
		US 2020-0002730 A1	02 January 2020
		WO 2016-081923 A3	07 July 2016
KR 10-2021-0049859 A	06 May 2021	CN 113286880 A	20 August 2021
		EP 3844272 A1	07 July 2021
		JP 2021-534798 A	16 December 2021
		US 12031129 B2	09 July 2024
		US 2020-0109398 A1	09 April 2020
		WO 2020-047124 A1	05 March 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012084

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/22(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/22(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/64(2006.01); C12N 15/85(2006.01); C12N 15/90(2006.01); C12N 9/12(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 표적 핵산(target nucleic acid), 세포 사멸(cell death), CRISPR-관련 단백질(CRISPR-related protein, Cas), 가이드 RNA(guide RNA), 단일 가닥(single strand), 폴리(ADP-리보스) 중합효소 억제제(poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) inhibitor)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2022-140572 A1 (MAMMOTH BIOSCIENCES, INC.) 2022.06.30 단락 [0004]-[0128]; 및 청구항 1	1-4,14-16
A	US 2018-0298392 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 2018.10.18 전체 문헌	1-4,14-16
A	US 2014-0242702 A1 (SIGMA ALDRICH CO. LLC 등) 2014.08.28 전체 문헌	1-4,14-16
A	US 2020-0002731 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2020.01.02 전체 문헌	1-4,14-16
A	KR 10-2021-0049859 A (플레그쉽 파이어니어링 이노베이션스 브이아이, 엘엘씨) 2021.05.06 전체 문헌	1-4,14-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년11월19일(19.11.2024)	**2024년11월20일(20.11.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012084

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012084

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **7-13**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 7-13은 치료에 의한 사람의 처치 방법에 해당됩니다(PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☑ 청구항: **5,6,11,13**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/012084

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2022-140572 A1	2022/06/30	EP 4267252 A1	2023/11/01
		US 2024-0084275 A1	2024/03/14
US 2018-0298392 A1	2018/10/18	EP 3215617 A2	2017/09/13
		EP 3274453 A2	2018/01/31
		EP 3851530 A1	2021/07/21
		US 11680268 B2	2023/06/20
		US 2016-0281111 A1	2016/09/29
		US 2023-0018543 A1	2023/01/19
		WO 2016-073990 A3	2016/08/11
		WO 2016-154579 A2	2016/09/29
US 2014-0242702 A1	2014/08/28	EP 2958996 A1	2015/12/30
		JP 2016-509063 A	2016/03/24
		JP 2019-112432 A	2019/07/11
		JP 6812478 B2	2021/01/13
		US 10227610 B2	2019/03/12
		WO 2014-130955 A1	2014/08/28
US 2020-0002731 A1	2020/01/02	CN 107208078 A	2017/09/26
		CN 113444747 A	2021/09/28
		EP 3221457 A2	2017/09/27
		EP 3521437 A1	2019/08/07
		JP 2017-535271 A	2017/11/30
		JP 6727199 B2	2020/07/22
		JP 7101211 B2	2022/07/14
		KR 10-2017-0102234 A	2017/09/08
		KR 10-2022-0093013 A	2022/07/04
		KR 10-2531016 B1	2023/05/10
		US 11697828 B2	2023/07/11
		US 2016-0145646 A1	2016/05/26
		US 2020-0002730 A1	2020/01/02
		WO 2016-081923 A3	2016/07/07
KR 10-2021-0049859 A	2021/05/06	CN 113286880 A	2021/08/20
		EP 3844272 A1	2021/07/07
		JP 2021-534798 A	2021/12/16
		US 12031129 B2	2024/07/09
		US 2020-0109398 A1	2020/04/09
		WO 2020-047124 A1	2020/03/05