

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 12월 1일 (01.12.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/250503 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/46 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/007599

(22) 국제출원일: 2022년 5월 27일 (27.05.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0068113 2021년 5월 27일 (27.05.2021) KR

(71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 허원도 (HEO, Won Do); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 유다슬이 (YU, Daseuli); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 유정혜 (YU, Jeonghye); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울특별시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

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

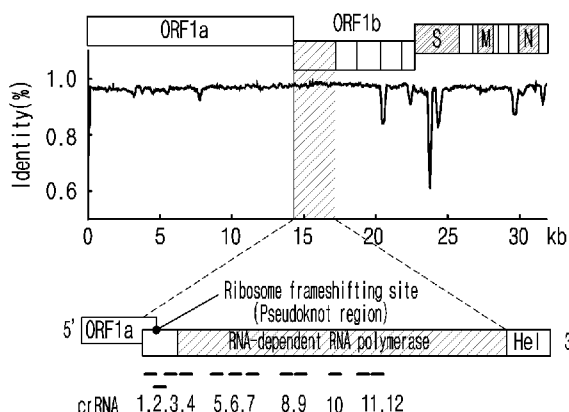
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CORONAVIRUS-19, COMPRISING CAS13 PROTEIN AND CRRNA

(54) 발명의 명칭: CAS13 단백질 및 CRRNA를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating coronavirus-19, comprising Cas13 proteins and crRNA. Particularly, Cas13b and scRNA, which targets the RdRp gene region of ORF1b of SARS-CoV-2, of the present invention, are not cytotoxic and have the excellent ability to degrade SARS-CoV-2 RNA, and thus can be effectively used as therapeutic agents for coronavirus disease 19.

(57) 요약서: 본 발명은 Cas13 단백질 및 crRNA를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 Cas13b 및 SARS-CoV-2의 ORF1b의 RdRp 유전자 부분을 표적으로 하는 scRNA는 세포 독성이 없고, SARS-CoV-2의 RNA를 분해하는 능력이 우수하므로 코로나바이러스감염증-19의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2022/250503 A1

명세서

발명의 명칭: CAS13 단백질 및 CRRNA를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 Cas13 단백질 및 crRNA를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 심각한 호흡기 질환을 유발하여 사망을 초래하는 코로나바이러스감염증은 Coronaviridae에 속하는 RNA 바이러스로 분류되며, 코로나바이러스 감염에 의한 호흡기 증후군으로 정의된다. Coronaviridae에 속하는 바이러스 중 사람에게 감염을 일으키다고 알려진 바이러스는 총 7종으로 감기를 일으키는 4종(229E, OC43, NL63, HKU1), 중증 폐렴을 일으키는 2종(SARS-CoV, MERS-CoV) 및 이번 팬데믹 사태의 원인 바이러스인 SARS-CoV-2가 있다. 중증 폐렴을 일으키는 3종의 바이러스(SARS-CoV, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2)는 2002년 SARS-CoV를 시작으로 2012년 MERS-CoV에 이어 SARS-CoV와 유전자 서열의 상동성이 높은 현재의 SARS-CoV-2까지 전세계적 대유행이 진행되고 있다.
- [3] SARS-CoV-2는 2019년 후반에 최초 보고되었다. 2002년 발생한 SARS-CoV와 비교했을 때 중증도는 SARS-CoV가 높지만 전파력은 SARS-CoV-2가 월등히 높는데, 이는 SARS-CoV-2의 세포 수용체 결합부위인 스파이크 단백질의 돌연변이에 의한 것으로 분석하고 있다. 이러한 결과로 전세계적인 대유행을 초래하게 되었다. 감염의 일반적인 징후로는 호흡기 증상, 발열, 기침, 호흡 곤란 및 호흡 곤란이 있다. 더 심한 경우 감염은 폐렴, 심각한 급성 호흡기 증후군, 신부전 및 심지어 사망을 유발할 수 있다.
- [4] SARS-CoV-2의 스파이크 단백질과 숙주세포의 анги오텐신전환효소2(ACE2) 수용체와 결합하면 바이러스가 숙주 세포 내로 침투할 수 있다. ACE2는 심장 기능과 혈압조절에 작용하는 효소로 심장과 콩팥, 위장 점막 또는 폐에 많이 존재한다. 그중에서 혈류를 타고 가야 하는 내장기관보다 호흡기를 통해 감염될 확률이 더 높다. 숙주 내로 바이러스 유전체가 유입되면 바이러스 중합효소에 의하여 SARS-CoV-2 유전체 복제 및 단백질이 합성되고, 바이러스 입자가 형성되어 세포 외로 배출되어 바이러스 감염증 증상이 나타난다.
- [5] 현재 수많은 국가와 기관에서 COVID-19 팬데믹 사태를 근절하기 위한 백신 개발에 진력하고 있어, 단백질 서브유닛 백신(subunit vaccine), 바이러스 벡터 기반 백신(viral vector based vaccine), DNA 백신, mRNA 백신과 같은 백신이 개발중이거나 이미 개발되어 있다. 그러나 COVID-19 예방 백신은 코로나바이러스의 변이에 빠르게 대처할 수 없고, 기존 백신 개발 시장은 이미 포화상태이다. 현재 COVID-19의 치료제로 공식화된 것은 없는 상황이고, 기존

치료제로 환자에게 투여하여 치료 효과를 기대하고 있는 실정이다.

- [6] 바이러스 감염에 대응하는 박테리아의 대응 체계에는 CRISPR/Cas 시스템이 있는데, CRISPR-Cas 시스템은 CRISPR RNA(crRNA)를 통해 타겟에 대한 특이성을 가지고 실험적으로 사용되는 경우에는 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)로 약간 변형되어 사용된다. crRNA의 스페이서(spacer)라는 부분이 타겟서열을 인지하고 결합하는데, 이 때 타겟서열은 Protospacer Adjacent Motif (PAM) 라는 서열에 인접하여 존재해야한다. crRNA와 타겟이 결합한 이후, Cas 단백질이 타겟 유전체를 절단한다.
- [7] CRISPR-Cas13은 단일 가닥 RNA를 타겟으로 하여 RNA 바이러스에 대한 치료제로 사용될 수 있는 가능성이 있다. 실제로 CRISPR/Cas13 시스템이 식물 바이러스 감염에 대한 치료 방법으로 사용됨(Plant J. 2018 Jun;94(5):767-775.)과 단일 가닥 RNA(ssRNA) 바이러스에 효과적인 항 바이러스제가 될 수 있음(Molecular Cell, Volume 76, Issue 5, 5 December 2019, Pages 826-837.e11)이 개시된 바 있다. 그러나 CRISPR/Cas13b 시스템을 SARS-CoV-2에 직접적으로 적용하여 치료효과를 확인한 예는 개시된 바 없다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 SARS-CoV-2의 타겟 RNA를 인지할 수 있는 crRNA와 Cas13 효소가 SARS-CoV-2의 유전체를 분해하여 COVID-19를 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA(CRISPR RNA)를 포함하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 Cas13 단백질 및 crRNA를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 Cas13b 및 SARS-CoV-2의 ORF1b의 RdRp 유전자 부분을 표적으로 하는 crRNA 또는 RdRp의 상류에 위치한 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA는 SARS-CoV-2의 RNA를 분해하는 능력이 우수하므로 코로나바이러스감염증-19의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 crRNA의 표적이 되는 SARS-CoV-2 ORF1b의 ① 절편: RNA-dependent RNA polymerase(2.7kb), ② 절편: Helicase(1.8kb), ③ 절편:

- exonuclease+endoRNase+2'O-ribose methyltransferase(3.5kb)을 나타낸 모식도이다.
- [13] 도 2는 코로나 바이러스의 서열 상동성 분석 결과 및 SARS-CoV-2 ORF1b 유전자 내의 crRNA 표적 부위를 나타낸 모식도이다.
- [14] 도 3a는 dual-luciferase assay 모식도이다.
- [15] 도 3b는 본 발명의 crRNA에 대한 dual-luciferase assay 모식도이다.
- [16] 도 3c는 2, 5, 9, 11번 crRNA가 상대적으로 낮은 발광 정도를 보여 SARS-CoV-2의 RNA 분해 능력이 우수한 것을 확인한 도이다.
- [17] 도 3d는 2, 5, 11, 9번 순서로 우수한 SARS-CoV-2의 RNA 분해 능력을 보여 유력한 crRNA 후보로 선별한 결과를 나타낸 도이다.
- [18] 도 4는 2번 crRNA가 가장 우수한 RNA 분해 활성을 나타나는 것을 확인한 도이다.
- [19] 도 5는 합성한 PspCas13b mRNA 및 2'-O-methyl 3'phosphorothioate로 변형된 crRNA를 나타낸 모식도이다.
- [20] 도 6a는 PspCas13b 단백질은 형질감염 후 2시간부터 발현이 꾸준히 증가함을 나타낸 도이다.
- [21] 도 6b는 HA tag 염색을 통해서 대부분의 세포에서 균일한 PspCas13b 발현이 유도됨을 확인한 도이다.
- [22] 도 7은 PspCas13b mRNA 발현 세포는 24, 48 시간 후 점차 세포 분열을 하여 하나의 이미지 화면에 보이는 세포의 수가 증가하여 세포독성이 없음을 확인한 도이다.
- [23] 도 8a는 RT-qPCR 프라이머로 SARS-CoV-2 ORF1b 유전자 내의 crRNA 표적 부위를 증폭시킬 수 있는 위치를 나타낸 모식도이다.
- [24] 도 8b는 각 crRNA (spacer 1, 2, 3 및 4)가 RdRp mRNA의 표적하는 부분을 PspCas13b와 함께 분해할 수 있음을 확인한 도이다.
- [25] 도 8c는 각 crRNA(spacer 5, 6, 7 및 8)가 RdRp mRNA의 표적하는 부분을 PspCas13b와 함께 분해할 수 있음을 확인한 도이다.
- [26] 도 8d는 각 crRNA(spacer 9, 10, 11 및 12)가 RdRp mRNA의 표적하는 부분을 PspCas13b와 함께 분해할 수 있음을 확인한 도이다.
- [27] 도 9a는 타겟하지 않는 NT (Non-target) 실험군 대비 4가지 crRNA(2, 5, 9, 11번) 모두 PspCas13b에 의한 RdRp mRNA 분해가 이루어져 유의미한 RdRp mRNA 수준 감소를 보이는 것을 확인한 도이다.
- [28] 도 9b는 PspCas13b와 2번 또는 5번 crRNA의 비율에 따른 mRNA 분해 활성을 확인한 도이다.
- [29] 도 10a는 각 crRNA가 스파이크 단백질의 발현하는 지 확인하기 위해 면역염색을 수행한 결과를 나타내는 도이다.
- [30] 도 10b는 SARS-CoV-2 감염 Vero E6 세포의 세포 배양액 (supernant) 혹은 세포 용해물 (cell)에서 각 crRNA가 SARS-CoV-2 RNA 유전자 수준에 미치는 영향을 분석한 도이다.

- [31] 도 10c는 SARS-CoV-2 감염 Vero E6 세포에서 각 crRNA가 SARS-CoV-2 유전체 수에 미치는 영향을 분석한 도이다.
- [32] 도 10d는 SARS-CoV-2 감염 Vero E6 세포에서 각 crRNA가 SARS-CoV-2 RNA 유전자 수준에 미치는 영향을 분석한 도이다.
- [33] 도 10e는 SARS-CoV-2 감염 Calu-3 세포에서 각 crRNA가 SARS-CoV-2 RdRp, nucleotide 유전자 수준에 미치는 영향을 분석한 도이다.
- [34] 도 11a는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA의 구조를 나타낸 도이다.
- [35] 도 11b는 pseudoknot-targeting crRNA가 스파이크 단백질 발현을 억제하는 지 면역염색을 통해 확인한 도이다.
- [36] 도 11c는 pseudoknot-targeting crRNA가 스파이크 단백질의 발현을 억제하는 지 웨스턴블랏을 통해 확인한 도이다.
- [37] 도 11d는 SARS-CoV-2 감염 Vero E6 세포의 세포 배양액 (supernant) 혹은 세포 용해물 (cell)에서 각 crRNA가 RdRp, nucleocapsid 유전자 수준에 미치는 영향을 분석한 도이다.
- [38] 도 12a는 dead PspsCas13b을 이용하여 스파이크 단백질 발현 억제 여부를 확인한 도이다.
- [39] 도 12b는 dead PspsCas13b을 이용하여 처리군에서는 SARS-CoV-2의 RdRp, nucleocapsid 유전자 수준감소 여부를 확인한 도이다.
- [40] 도 12c는 Cas13b mRNA와 crRNA 농도별 처리에 따른 살아있는 SARS-CoV-2 복제 수준 변화를 측정한 plaque assay 이다.
- [41] 도 12d는 Cas13b mRNA와 crRNA 농도별 처리에 따른 살아있는 SARS-CoV-2 복제 수준 변화를 측정한 plaque assay를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [42] 도 13a는 SARS-CoV-2 변이체 (알파, 베타, 감마 및 델타) 간의 서열 변이를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [43] 도 13b는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA가 SARS-CoV-2 변이체에 감염된 세포에서 스파이크 단백질의 발현을 감소시키는지 확인한 도이다.
- [44] 도 13c는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA가 SARS-CoV-2 변이체 바이러스 감염된 세포에서 N 및 nsp2 유전자의 subgenomic RNA 수준을 감소시키는지 확인한 도이다.
- [45] 도 14는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA가 SARS-CoV-2 변이체 바이러스 감염된 마우스에서 바이러스 감염을 억제시키는지 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [47] 본 발명은 Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA(CRISPR RNA)를 포함하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [48] 상기 Cas13 단백질은 Cas 단백질의 일종이다. Cas 단백질은 CRISPR 연관

단백질로, DNA 또는 RNA와 같은 핵산이 이중 가닥 혹은 단일 가닥을 가질 경우(dsDNA/RNA 및 ssDNA/RNA) 이를 인식하여 절단할 수 있는 효소이다. 구체적으로, 이들은 crRNA 또는 가이드 RNA와 결합된 이중가닥 혹은 단일가닥 핵산을 인식하여 이를 절단할 수 있다. 즉, crRNA가 표적 부위와 결합된 것을 인식하여 엔도뉴클레아제 기능이 활성화된다. 또한, 엔도뉴클레아제 기능이 활성화됨에 따라, 이중가닥 및/또는 단일가닥 DNA 및/또는 RNA를 비특이적 절단할 수 있는 엑소뉴클레아제 활성을 가지는 것일 수 있다.

- [49] Cas13 단백질은 Cas13a, Cas13b, Cas13c 및 Cas13d로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단백질일 수 있고, 자연적으로 'RNA'를 인지하여 자를 수 있고, 박테리아에서 "C2c2" 라고 알려져 있다. Cas13은 클래스2, 타입 VI CRISPR 단백질인데, ssRNA 타겟을 인지하여 활성화된다. *Leptotrichia wadei*에서 발견된 Cas13a와 *Prevotella sp.* P5-125에서 발견된 Cas13b (PspCas13b)가 대표적이며, 이들은 PAM과 같은 특정 모티프를 필요로 하지 않는다.
- [50] Cas13b 단백질은 하나 이상의 기능성 도메인과 연합되고, 이펙터 단백질은 HEPN 도메인 내에 하나 이상의 돌연변이를 함유하며, 그리하여 복합체가 후생유전적 변형인자 또는 전사 또는 번역 활성화 또는 억제 신호를 전달할 수 있다. 복합체는 시험관 내 또는 생체 외에서 형성될 수 있고, 세포 내로 도입되거나 RNA와 접촉될 수 있으며; 또는 생체 내에서 형성될 수 있다.
- [51] 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 mRNA일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 mRNA 이다.
- [52] 상기 crRNA는 CRISPR RNA로, 단일 가닥 RNA (single strand RNA) 일 수 있다. 또한, crRNA는 tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA)와 결합된 가이드 RNA (guide RNA) 형태로 이용될 수 있다. 이때, crRNA는 타겟에 특이적으로 존재하는 유전자 서열에 상보적인 서열을 가질 수 있다. 상기 crRNA는 15 내지 40개의 핵산으로 구성된 RNA 일 수 있다. 이 때, 상기 폴리뉴클레오티드는 18 내지 30개의 핵산으로 구성될 수 있다. 일 구체예로 crRNA는 30개의 핵산으로 구성될 수 있다. 또한, crRNA는 크리스퍼 연관 단백질이 활성을 갖게 하기 위해 3'에 추가적인 서열을 포함할 수 있다.
- [53] 상기 crRNA는 화학적으로 변형될 수 있다. 화학 변형의 예로는, 이로 제한되지는 않지만, 하나 이상의 말단 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트(2'-O-methyl 3'phosphorothioate, MS), 2'-O-메틸(M), 또는 2'-O-메틸 3'티오 PACE(MSP)의 혼입을 포함한다. 이러한 화학적으로 변형된 crRNA는, 온-표적 (on-target; 표적상, 표적-적중) 특이성 대 오프-표적 (off-target; 표적외, 표적-외) 특이성은 예측가능하지 않지만, 비변형된 crRNA에 비하여 증가된 안정성 및 증가된 활성을 포함할 수 있다. 화학적으로 변형된 crRNA는 포스포로티오에이트 연결 및 리보스 고리의 2' 및 4' 탄소 사이의 메틸렌 브릿지를 포함하는 잠금 핵산 (LNA) 뉴클레오티드를 갖는 RNA를 제한없이 포함한다.

- [54] 상기 SARS-CoV-2 유전자의 표적 RNA 서열은 ORF1b 내의 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp), RdRp의 상류에 위치한 리보솜 해독틀 변위 부위 (ribosomal frameshift site), Helicase, 3' to 5' exonuclease, endoRNase 또는 2'O-ribose methyltransferase일 수 있고, 바람직하게는 RdRp 또는 RdRp의 상류에 위치한 리보솜 해독틀 변위 부위일 수 있다.
- [55] 일 실시예로 상기 crRNA는 서열번호 1 내지 12 중에서 선택되는 핵산 서열을 포함하는 표적 부위에 혼성화 가능하다.
- [56] 일 실시예로 상기 가이드 RNA는 서열번호 13 내지 24로 표시되는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [57] 본 발명의 조성물에 포함된 Cas13b 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 crRNA를 합성하기 위하여 벡터를 이용할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "벡터"는 엔티티를 하나의 환경에서 또 다른 환경으로 전달하는 것을 허용 또는 촉진하는 도구이다. 이는 레플리콘, 예컨대 플라스미드, 파지, 또는 코스미드로, 또 다른 DNA 분절이 그 안에 삽입될 수 있어서, 삽입된 분절의 복제를 유발한다. 일반적으로, 벡터는 적절한 제어 요소와 관련되었을 때 복제가 가능하다.
- [58] 일반적으로, 용어 "벡터"는 그것이 연결되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 제한 없이, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 부분 이중 가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 자유 말단을 포함하는, 자유 말단을 포함하지 않는 (예: 환형) 핵산 분자; DNA, RNA 또는 둘 다를 포함하는 핵산 분자; 및 당업계에 공지된 다른 종류의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 유형의 벡터는 "플라스미드"이며, 이는 추가의 DNA 절편이 예를 들어, 표준 분자 클로닝 기술에 의해 삽입될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 다른 종류는 바이러스 벡터로서, 바이러스-유래된 DNA 또는 RNA 서열이 바이러스에 봉입되는 벡터에 존재한다(예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결합 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스(AAV)) 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포 내로의 트랜스펙션을 위한, 바이러스가 보유하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포에서 자율적 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 가진 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터) 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 게놈에 통합되며, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 그것이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 재조합 DNA 기술에 유용한 통상적인 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함할 수 있는데, 이는 재조합 발현 벡터가 하나 이상의 조절 요소를 포함하는 것을 의미하며, 하나 이상의 조절 요소는 발현에 사용될 숙주 세포에 기반하여 선택될 수 있고, 발현될 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동가능하게

연결된"은 대상 뉴클레오타이드 서열이 (예를 들어, 시험관 내 전사/번역 시스템 내에서, 또는 벡터가 숙주 세포 내로 도입되는 경우 숙주 세포 내에서) 뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 하는 방식으로 조절 요소에 연결된 것을 의미하는 의도이다.

[59] 상기 벡터는 플라스미드는 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종일 수 있다.

[60] 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pCMV3, pET28a, pUC57 및 pET 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드(pUC57, pCMV3, pET28a, pET, pGEX, pQE, pDEST 및 pCOLD), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 이러한 플라스미드는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주 세포를 선택하여 사용하면 된다.

[61]

[62] 본 명세서에 개시된 임의의 방법의 실시예에 있어서, 적합한 벡터가, 이로 제한되지는 않지만, 미세주입, 전기천공, 소노포레이션(sonoporation), 바이오리스틱스, 칼슘 포스페이트-매개 트랜스펙션, 양이온 트랜스펙션, 리포솜 트랜스펙션, 덴드리머 트랜스펙션, 열 충격 트랜스펙션, 뉴클레오펙션 트랜스펙션, 마그네토펙션, 리포펙션, 임페일펙션, 광학 트랜스펙션, 핵산의 전용 제제-증진 흡수, 및 리포솜, 면역리포솜, 비로솜 또는 인공 비리온을 통한 전달을 포함하는 해당 분야에 알려진 하나 이상의 방법을 통해서 세포에 도입될 수 있다.

[63] 일부 방법에서, 벡터는 마이크로인젝션에 의해서 세포에 도입된다. 벡터 또는 벡터들은 핵 또는 세포질에 마이크로인젝션될 수 있다. 일부 방법에서, 벡터 또는 벡터들은 뉴클레오펙션에 의해서 세포에 도입될 수 있다.

[64] 벡터는 원핵 또는 진핵 세포에서 CRISPR 전사물(예를 들어, 핵산 전사물, 단백질 또는 효소)의 발현을 위해 디자인될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 전사물은 박테리아 세포, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이, 곤충 세포(배클로바이러스 발현 벡터 사용), 효모 세포 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다.

[65] 제조합 발현 벡터는 예를 들어, T7 프로모터 조절 서열 및 T7 폴리머라제를 사용하여 시험관내에서 전사되고 번역될 수 있다.

[66] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 코로나바이러스감염증-19를 치료하는 방법을 제공한다.

[67] 본 발명에 있어서, "개체"란 코로나바이러스에 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 백신을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효율적으로 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물로

코로나바이러스감염증-19을 치료할 수 있다.

- [68] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [69] 용어 "유효한 양"은 치료되는 대상자에게 요망되는 치료 효과를 제공하기에 충분한, 예를 들어, 이의 수용체에서의 병원체 또는 항원에 대항하는 면역 반응을 생성시키거나 유도하기에 충분한 용량을 나타낸다. 유효량은 다양한 이유, 예컨대, 투여 경로 및 빈도, 상기 약제를 수용하는 개체의 체중 및 종, 및 투여 목적에 따라서 변화될 수 있다. 당업자는 본원에서의 개시내용, 확립된 방법 및 그들 자신의 경험을 기초로 하여 각각의 경우에서의 투여량을 결정할 수 있다.
- [70] 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 비경구용일 수 있다. 특히, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [71] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 종양내 투여, 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 복강내, 소동맥내, 심실내, 병변내, 척추강내, 국소, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 경로로 투여될 수 있다.
- [72] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물을 1일 0.01 ug/kg 내지 100 mg/kg으로, 구체적으로는 1 ug/kg 내지 1 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [73] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 주형으로 사용할 수 있도록 crRNA의 표적이 되는 SARS-CoV-2의 ORF1b mRNA를 합성하였다 (도 1 참조). 분해하고자 하는 SARS-CoV-2의 표적 부위를 선별하기 위해, SARS-CoV2, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2 간의 서열 변이를 분석하여 서열변이가 적은 비구조 단백질의

유전자에 초점을 맞추었다 (도 2 참조). 특히, 표적부위로 해독틀 변위 부위 (ribosomal frameshift site)에서 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)에 이르는 ORF1b의 앞쪽 유전자를 선정하였고 (표2 참조), 상기 표적 부위에 혼성화할 수 있는 crRNA 12개를 디자인하였다 (표 3 참조). 이 중 1번 내지 3번은 pseudoknot 영역을 표적으로 하고, 4번 내지 12번은 RdRp를 표적으로 한다. 상기 crRNA 중 2, 5, 11, 9번 crRNA가 상대적으로 SARS-CoV-2의 RNA 분해 능력이 우수한 것으로 나타났으며 (도 3a 내지 도 3d 참조), 특히, 2번 crRNA가 가장 우수한 RNA 분해 활성을 나타내었다 (도 4 참조). 다음으로, Cas13b 단백질을 코딩하는 mRNA를 합성하고 (도 5 참조), 합성된 PspCas13b mRNA를 세포에 형질감염시켜 형질감염 효율이 높음을 확인하였으며 (도 6a 및 도 6b 참조), PspCas13b mRNA가 세포독성이 없음을 확인하였다 (도 7 참조).

- [74] 본 발명의 구체적인 실험예에서는 상기 Cas13b mRNA 및 crRNA의 SARS-CoV-2 mRNA 분해 효능을 확인하였다. 먼저, crRNA가 표적하는 부분을 증폭시키는 프라이머를 사용하여, crRNA가 RdRp mRNA의 표적하는 부분을 PspCas13b와 함께 분해할 수 있음을 확인하였다 (도 8a 및 도 8d 참조). 또한, 2, 5, 9, 11번 crRNA가 PspCas13b에 의해 RdRp mRNA 분해를 유도하여 RdRp mRNA 수준 감소를 보이는 것을 확인하였으며 (도 9a 참조), 2번 crRNA는 PspCas13b와 crRNA가 1:20의 비율로 처리되었을 때, 가장 높은 mRNA 분해 활성을 보이고, 5번 crRNA는 1:36의 비율로 처리되었을 때, 가장 높은 mRNA 분해 활성을 보임을 확인하였다 (도 9b 참조).
- [75] 본 발명의 Cas13b mRNA 및 crRNA가 SARS-CoV-2 복제를 억제하는 지 확인하기 위해, SARS-CoV-2를 두번 감염시킨 Vero E6 세포에서 그 효능을 관찰하였다. 그 결과, crRNA #2 처리군에서 스파이크 단백질이 거의 발현되지 않았으며 (도 10a 및 도 10b 참조), SARS-CoV-2의 envelope (E), non-structural protein 2(nsp2), nucleocapsid (N) RNA 유전자수준이 크게 감소하였고 (도 10c 참조), SARS-CoV-2 유전체 수가 완벽하게 억제되었다 (도 10d 참조). Vero E6 뿐만 아니라 human 폐세포 유래종인 Calu-3 세포에서도 SARS-CoV-2 RdRp, nucleotide 유전자 수준이 감소됨을 확인하였다 (도 10e 참조).
- [76] ORF1b의 리보솜 해독틀 변위 부위의 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA #1, #2, #3 (도 11a 참조) 및 Cas13b mRNA로 형질감염된 세포에서 스파이크 단백질 및 뉴클레오펜시드 단백질의 발현이 거의 나타나지 않았으며 (도 11b 및 도 11c 참조), SARS-CoV-2의 RdRp, nucleocapsid의 RNA 수준이 감소를 확인하였다 (도 11d 참조).
- [77] 또한, 절단효과가 없는 dead PspCas13b mRNA 처리군에서는 crRNA #2, #5 처리군 모두에서 스파이크 단백질의 감소가 관찰되지 않았으며, RdRp 및 nucleocapsid 유전자 수준의 감소도 관찰되지 않았는데, 이러한 결과들은 PspCas13b 단백질이 pseudoknot 부위와 결합하여 frameshifting site의 기능을 저해하는 것이 아닌 SARS-CoV-2 유전체를 절단하여 SARS-CoV-2 증식을

억제시키는 것임을 증명한다 (도 12a 내지 도 12b 참조).

[78] 또한, Cas13b mRNA와 crRNA 처리한 군은 농도에 관계없이 대조군에 대비하여 plaque가 형성되지 않음을 확인하였는데, 이는 Cas13b mRNA와 crRNA 처리한 군에서 SARS-CoV-2 복제가 일어나지 않음을 의미한다 (도 12c 내지 도 12d 참조).

[79] 본 발명의 Cas13b mRNA 및 crRNA가 SARS-CoV-2 변이체 바이러스에 대해 분해 효능이 있는 지 확인하였다. 먼저, SARS-CoV-2 변이체 (알파, 베타, 감마 및 델타)간에 ORF1b 영역에서는 서열 변이가 적음을 확인하였다 (도 13a 참조). pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA #2로 형질감염된 세포에서는 모든 유형의 변이체에서 스파이크 단백질로 염색되는 세포 수가 명확하게 감소하였고, N 및 nsp2 유전자의 RNA 수준도 감소하였다 (도 13b 및 도 13c 참조). 따라서, 상기의 결과를 통해 SARS-CoV-2 돌연변이에서도 효과적으로 바이러스 복제를 억제할 수 있음을 시사한다.

[80] 마지막으로, SARS-CoV의 동물모델을 이용하여 본 발명의 PspCas13b mRNA와 crRNA의 치료 효과를 확인한 결과, pseudoknot 부분을 타겟하는 crRNA #2는 대조군 마우스와 비교하여 바이러스 검출이 미미함을 확인하였다 (도 14 참조).

[81] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 코로나바이러스감염증-19의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[83] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[84] <실시예 1> SARS-CoV-2의 ORF1b 클로닝

[85] 주형으로 사용할 수 있도록 crRNA의 표적이 되는 SARS-CoV-2 ORF1b 부분을 클로닝하였다. ORF1b의 cDNA 라이브러리에서 전체(약 8kb, 8,135bp)를 3개의 절편(① 절편: RNA-dependent RNA polymerase(2.7kb), ② 절편: Helicase(1.8kb), ③ 절편: exonuclease+endoRNase+2'O-ribose methyltransferase(3.5kb))으로 나누어 PCR 클로닝을 수행하였다 (도 1).

[86] 구체적으로, ①, ②, ③ 절편을 PCR 할 수 있는 하기 표 1의 프라이머를 이용해 cDNA 라이브러리에서 PCR 과정을 통해 각 절편을 추출하였다. ① 절편의 정방향 프라이머와 ③ 절편의 역방향 프라이머를 이용하여 모든 절편이 섞인 조건에서 PCR을 진행하여 DNA 형태의 ORF1b 를 합성하였다.

[87] 그 결과, ORF1b의 ① 절편 및 ② 절편을 포함한 RdRp+Helicase 부분의 mRNA를 합성하였다.

[88] [표1]

	서열(5'→3')	서열번호
① 절편 정방향 프라이머	GCTACCGGACTCAGATCTCGAGaccatg CGGGTTTGC GG GTGTAAGTGCAGCC	서열번호 25
① 절편 역방향 프라이머	CCCAACAGCCTGTAAGACTGTATGCG GTGTGTACATAGCC	서열번호 26
② 절편 정방향 프라이머	CTTACAGGCTGTTGGGGCTTGTGTTCT TTGCA	서열번호 27
② 절편 역방향 프라이머	TTTCAGCTTGTAAGTTGCCACATTCC TACGTGGAATTTCAAGAC	서열번호 28
③ 절편 정방향 프라이머	GCAACTTTACAAGCTGAAAATGTAAC AGGACTCTTTAAAGATTGTAGTAAGG TAATCAC	서열번호 29
③ 절편 역방향 프라이머	GGGCCCCGCGGTACCGTCGACccGTTGT TAACAAGAACATCACTAGAAATAACA ACTCTGTTGTTTCTCTAATT	서열번호 30

[89] <실시예 2> SARS-CoV-2 RNA 분해를 위한 crRNA의 선별

[90] <2-1> 코로나바이러스 균주 간의 서열 변이 분석

[91] SARS-CoV-2 감염에 대한 CRISPR-Cas13 시스템을 개발하기 위해 먼저 코로나바이러스 균주 (SARS-CoV2, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2) 간의 서열 변이를 분석하였다.

[92] 구체적으로, 오픈소스테이터 (GISAID)를 이용하여 코로나바이러스 환자 샘플의 전체 유전체를 얻어 유전체 서열 사이의 연관성을 위해 MAFFT 방법을 이용해 서열정렬을 수행하였다.

[93] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 코로나바이러스의 구조 단백질은 비구조 단백질에 비해 상대적으로 많은 양의 서열 변이를 가지고 있었다. 이에, 본 발명자들은 바이러스 게놈 복제를 완전히 차단하기 위해 바이러스 복제 시스템에 관여하는 비구조 단백질의 유전자에 초점을 맞추었다.

[94] <2-2> SARS-CoV-2 RNA 분해를 위한 ORF1b 유전자 내의 표적 부위 예측

[95] 실시예 2-1의 서열 상동성 분석에 기초하여 crRNA 표적 부위로 리보솜 해독틀 변위 부위(ribosomal frameshift site)에서 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)에 이르는 ORF1b의 앞쪽 유전자를 선택하였다 (도 2). Cas13a와 Cas13d의 crRNA를 예측하는 프로그램 (CHOPCHOP, Benchling)을 이용하여 표적 서열을 도출 후, Cas13b crRNA에 적합하도록 임의로 30bp의 길이로 맞추었다.

[96] 그 결과, 하기 표 2의 SARS-CoV-2 ORF1b 유전자 내의 서열번호 1 내지 12의

표적 부위 12개를 선별하였다 (도 2).

[97] [표2]

서열(5'→3')	서열번호
CGGGTTTGCGGTGTAAGTGCAGCCCGTCTT	서열번호 1
AAGTGCAGCCCGTCTTACACCGTGCGGCAC	서열번호 2
GGCACTAGTACTGATGTCGTATACAGGGCT	서열번호 3
GCTGGTTTTGCTAAATTCCTAAAACTAAT	서열번호 4
GATATATTACGCGTATACGCCAACTTAGGT	서열번호 5
CAATTCTGTGATGCCATGCGAAATGCTGGT	서열번호 6
CGGTGATTTTCATACAAACCACGCCAGGTAG	서열번호 7
GGATACCACTTCAGAGAGCTAGGTGTTGTA	서열번호 8
TCAGGATGTAACTTACATAGCTCTAGACT	서열번호 9
TGATAAGTACTTTGATTGTTACGATGGTGG	서열번호 10
AAAGAATAGAGCTCGCACCGTAGCTGGTGT	서열번호 11
AAATCAATAGCCGCCACTAGAGGAGCTACT	서열번호 12

[98] <2-3> SARS-CoV-2 ORF1b 유전자 내의 표적 부위를 타겟으로 하는 crRNA의 제작

[99] 실시예 2-2의 표적 부위를 타겟으로 하는 crRNA를 제작하였다.

[100] 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 1번 내지 12번 (서열번호 13 내지 24)의 12개 crRNA를 제작하였다. crRNA 1번 내지 3번은 RdRp의 상류에 위치한 리보솜 해독틀 변위 부위의 pseudoknot 영역을 표적으로 제작되었고, crRNA 4번 내지 12번은 RdRp를 표적으로 제작되었다 (도 2). 또한, crRNA의 5',3' 말단 각각의 3개 뉴클레오타이드에 2'-O-methyl 3'phosphorothioate modification 을 도입하였다.

[101] [표3]

no.	서열(5'→3')	서열번호
1	CGGGTTTGCGGTGTAAGTGCAGCCCGTCTTggtgtgga aggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 13
2	AAGTGCAGCCCGTCTTACACCGTGCGGCACggtgtgg aaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 14
3	GGCACTAGTACTGATGTCGTATACAGGGCTggtgtgg aaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 15
4	GCTGGTTTTTGCTAAATTCCTAAAACTAAT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 16
5	GATATATTACGCGTATACGCCAACTTAGGT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 17
6	CAATTCTGTGATGCCATGCGAAATGCTGGT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 18
7	CGGTGATTCATACAAACCACGCCAGGTAG ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 19
8	GGATACCACTTCAGAGAGCTAGGTGTTGTA ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 20
9	TCAGGATGTAACTTACATAGCTCTAGACT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 21
10	TGATAAGTACTTTGATTGTTACGATGGTGG ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 22
11	AAAGAATAGAGCTCGCACCGTAGCTGGTGT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 23
12	AAATCAATAGCCGCCACTAGAGGAGCTACT ggtgtggaaggtccagttttgaggggctattacaac	서열번호 24

[102] <2-3> 루시퍼레이즈 분석을 통한 SARS-CoV-2 mRNA 수준 측정

[103] HEK293T 세포에 PspCas13b와 crRNA를 발현할 수 있는 DNA를 RdRp 단편 (firefly-conjugated RdRp fragment)을 암호화하는 DNA와 함께 형질 감염시켰다. 48시간 후, dual-luciferase reporter assay system을 이용해 발광도를 측정하였다 (도 3a 및 도 3b).

[104] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, RdRp 또는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 모든 crRNA는 발광이 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 특히 2, 5, 9, 11번 crRNA가 상대적으로 낮은 발광 정도를 보여 SARS-CoV-2의 RNA 분해

능력이 우수한 것으로 나타났다.

- [105] 또한, 도 3d에 나타난 바와 같이, 2, 5, 11, 9 순서로 우수한 SARS-CoV-2의 RNA 분해 능력을 보였다.
- [106] HEK293T 세포에 RdRp DNA와 Cas13b DNA, crRNA DNA를 유입 후 24시간 후 해당 세포의 total RNA를 추출하여 qRT-PCR을 통해 RdRp mRNA 값을 측정하였다. 이때 각각의 crRNA가 표적으로 하는 RdRp 부분을 감지할 수 있는 qRT-PCR primer들을 이용하였고, RdRp를 표적으로 하지 않는 crRNA (NT) 처리군의 RdRp mRNA 값을 기준으로 crRNA #2, #5, #9, #11 처리군의 값을 정규화 (normalization)하였다.
- [107] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 2번 crRNA가 가장 우수한 RNA 분해 활성을 나타나는 것을 확인하였다.
- [108] <실시예 3> Cas13b mRNA의 제작
- [109] <3-1> PspCas13b RNA 합성
- [110] CRISPR-Cas13 시스템의 안전하고 치료적인 사용을 위해 mRNA로 인코딩된 Cas13b 단백질을 합성하였다.
- [111] 구체적으로, T7 promoter를 가진 PspCas13b DNA를 PCR을 통해 합성하고, Hiscribe T7 ARCA mRNA synthesis kit (with tailing)을 사용하여 RNA 합성을 하였다. T7 RNA polymerase mix와 ARCA/NTP mix를 T7 promoter를 가진 PspCas13b DNA를 함께 섞어 37°C에서 반응하였다. DNase를 처리해 PspCas13b DNA를 없애고, poly(A) tailing을 진행하였다. 합성된 RNA는 RNA 정제 키트를 이용해 정제하였다.
- [112] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 PspCas13b mRNA를 합성하였다.
- [113] 상기 mRNA로 인코딩된 Cas13b 단백질은 세포에서 Cas13b 단백질의 빠르고 일시적인 발현을 유도할 수 있다.
- [114] <3-2> 웨스턴블롯을 이용한 형질감염 효율 측정
- [115] 상기 실시예 3-1에서 합성한 PspCas13b mRNA를 세포에 형질감염시켜 시간대별로 형질감염 효율을 측정하기 위하여 웨스턴블롯을 수행하였다.
- [116] 구체적으로, HEK293T 세포에 PspCas13b mRNA를 유입시키고 2, 4, 8, 12시간별로 세포를 모아 단백질을 추출하였다. 단백질 정량을 통해 시간대별 동일한 양을 웨스턴블롯하였다. 이때 rabbit anti-HA tag antibody를 이용해 PspCas13b 단백질, mouse anti-GAPDH antibody를 이용해 GAPDH 단백질을 표적하였다. 이후 goat anti-rabbit IgG H&L (IRDye 680RD)과 goat anti-mouse IgG H&L (IRDye 800CW)를 이용해 각각의 단백질을 2차 표적하여 이미징하였다.
- [117] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, PspCas13b 단백질은 형질감염 후 2시간부터 발현이 꾸준히 증가함을 확인하였다.
- [118] <3-3> 형광 현미경을 이용한 형질감염 효율 측정
- [119] 또한, PspCas13b mRNA로 형질감염된 HEK293T 세포는 형질감염 48시간 후 HA tag 염색을 통해서 PspCas13b 발현을 확인하였다.

- [120] 구체적으로, 4% 폼알데하이드 (formaldehyde)로 PspCas13b mRNA가 유입된 HEK293T를 고정한 후 0.2% Triton X-100을 이용해 permeabilization하였다. Rabbit anti-HA tag antibody를 이용해 24시간 동안 PspCas13b 단백질을 표적하였고, goat anti-rabbit IgG (H+L), alexa fluor 488을 이용해 2차 표적하여 ImagExfluorol 을 이용해 이미징하였다.
- [121] 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이, 대부분의 세포에서 균일한 PspCas13b 발현이 유도됨을 확인하였다.
- [122] **<3-4> 세포 독성 측정**
- [123] 형질감염 후 세포 독성이 나타나면 세포는 분열하지 않으므로, 세포가 분열하는지 여부를 확인하였다.
- [124] 구체적으로, HEK293T 세포에 PspCas13 mRNA를 발현시키고 현미경을 이용하여 48시간 동안 관찰하였다.
- [125] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, PspCas13b mRNA 발현 세포는 24, 48 시간 후 점차 세포 분열을 하여 하나의 이미지 화면에 보이는 세포의 수가 증가하는 것을 확인하였다.
- [126] 상기의 결과는 PspCas13 mRNA가 세포 독성이 없음을 시사한다.
- [127] **<실험예 1> Cas13b 및 crRNA의 SARS-CoV-2 RdRp mRNA 분해 수준 측정**
- [128] **<1-1> 역전사 정량적 중합효소연쇄반응 (RT-qPCR)을 통한 SARS-CoV-2 RdRp mRNA 수준 측정**
- [129] HEK293T 세포에 PspCas13b와 crRNA를 발현하는 DNA를 형질감염 시킨 후 48시간 뒤에 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 RNA를 추출하고, random hexamer와 oligo dT를 프라이머로 이용해 cDNA를 합성하였다. 도 8a에 나타난 바와 같이 RT-qPCR detection region을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하여 cDNA를 주형으로 RT-qPCR을 수행하였다. 해당 crRNA로 인지되어 PspCas13b에 의해 분해된 실험군의 경우 RT-qPCR 프라이머로 감지되지 않기 때문에 각 crRNA 및 PspCas13b가 SARS-CoV-2의 RNA를 분해할 수 있는지 여부를 확인하였다.
- [130] 그 결과, 도 8b 내지 도 8d에 나타난 바와 같이, 회색 bar는 타겟되지 않은 실험군 (Non-target crRNA 이용), 파란색 bar는 타겟된 실험군으로, 그 중 빨간색 bar는 해당 crRNA가 표적하는 부분을 증폭시키는 프라이머가 사용된 군을 표시한 것이며 대부분의 경우 RT-qPCR 결과 군에서 가장 낮은 RdRp mRNA 발현 수준을 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [131] 상기 결과는 각 crRNA가 RdRp mRNA의 표적하는 부분을 PspCas13b와 함께 분해할 수 있음을 제시한다.
- [132] **<1-2> 선별한 crRNA에 대한 SARS-CoV-2 RdRp RNA 분해 활성 측정**
- [133] HEK29T 세포에 PspCas13b mRNA, crRNA, RdRp mRNA를 형질감염시킨 후, 24시간 뒤 해당 세포를 수확하여 RNA를 추출하였다. RNA에서 cDNA를 합성한 후 해당 crRNA가 표적하는 부위를 감지하는 프라이머를 이용해 RT-qPCR을

수행하였다.

- [134] 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이, 타겟하지 않는 NT (Non-target) 실험군 대비 4가지 crRNA (2, 5, 9, 11번) 모두 PspCas13b에 의한 RdRp mRNA 분해가 이루어져 유의미한 RdRp mRNA 수준 감소를 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [135] 또한, 도 9b에 나타난 바와 같이, 2번 crRNA는 PspCas13b와 crRNA가 1:20의 비율로 처리되었을 때, 가장 높은 mRNA 분해 활성을 보였으나, 1:36 및 1:50의 비율로 처리되었을 때와 통계적으로 유의한 차이는 없었고, 5번 crRNA는 1:36의 비율로 처리되었을 때, 가장 높은 mRNA 분해 활성을 보였으나, 1:20 및 1:50의 비율로 처리되었을 때와 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
- [136] **<실험예 2> SARS-CoV-2 복제 억제 효과 확인**
- [137] Cas13b mRNA 및 crRNA가 SARS-CoV-2 복제를 억제하는 지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [138] 구체적으로, Cas13b mRNA 및 crRNA (2, 5, 9, 11번) 형질감염된 Vero E6 세포를 SARS-CoV-2의 MOI = 0.05(1×10^6 TCID₅₀/ml)으로 감염시켰다. 감염 24시간 후 세포 배양액 혹은 세포 용해물에서 수확한 SARS-CoV-2를 수득하여 두번째로 감염시켰으며, 이 때 Cas13b mRNA 및 crRNA (2, 5, 9, 11번)을 다시 형질감염시켰다. 두번째 감염 24시간 후 세포 배양액 또는 세포 용해물에서 수확한 SARS-CoV-2를 분리하였다.
- [139] **<2-1> 스파이크 단백질의 발현 확인**
- [140] 두번째 감염군의 세포 배양액 (supernant) 혹은 세포 용해물 (cell)에서 분리된 바이러스를 새로운 Vero E6세포에 감염시킨 후 24시간 뒤 먼저, 스파이크 단백질의 발현을 확인하기 위하여 면역염색을 수행하였다.
- [141] 4% 포르말알데하이드 (formaldehyde)로 세포를 고정 후 2% Triton X-100으로 permeabilization하였다. Rabbit anti-2019-nCoV spike protein을 이용해 스파이크 단백질을 1차 표적하였고, goat anti-rabbit IgG (H+L), alexa fluor 488로 2차 표적하였다. 해당 세포를 DAPI로 염색한 후 DAPI와 GFP 이미징을 하였으며, **DAPI 염색된 세포 수 대비 DAPI와 GFP 함께 염색된 세포 수를 측정하여 이를 백분율로 나타내었다.**
- [142] 그 결과, 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이, crRNA #2, #9 처리군은 아무 처리하지 않은 대조군 (Non)에 비하여 스파이크 단백질 발현 세포 수가 현저하게 줄어들었고, 특히 crRNA #2 처리군에서는 99.9% 스파이크 단백질이 발현되지 않음을 확인하였다.
- [143] 상기의 결과는, pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA #2의 바이러스 복제 억제 효과가 우수함을 시사한다.
- [144] **<2-2> SARS-CoV-2 유전자 수준 확인**
- [145] 또한, qPCR을 통해 SARS-CoV-2 유전자를 분석하였다.
- [146] 두번째 감염군의 세포 배양액 (supernant) 혹은 세포 용해물 (cell)에서 분리된 바이러스를 이용한 새로운 Vero E6 세포에 감염시킨 후 24시간 뒤 감염 세포에서

total RNA 를 추출하여 SARS-CoV-2의 envelope (E), nucleocapsid (N) 또는 non-structural protein 2 (nsp2)를 증폭시키는 프라이머를 이용해 qRT-PCR 을 진행하였다.

[147] 그 결과, 도 10c에 나타난 바와 같이, pseudoknot 영역을 표적하는 crRNA #2 처리군에서 99.9%의 SARS-CoV-2 유전자의 감소를 확인하였다.

[148] **<2-3> SARS-CoV-2 유전체 수확인**

[149] 또한, bulk RNA-시퀀싱 (sequencing)을 통해 SARS-CoV-2 유전체 수를 정밀 분석하였다.

[150] SARS-CoV-2 감염 Vero E6 세포에서 total RNA를 추출 후 조각내어 fragment 양 끝단에 시퀀싱에 필요한 서열들을 붙여 라이브러리를 만들었다. 시퀀싱 이후 생성된 데이터는 샘플 유래 생물종인 Vero cell (GCF_015252025.1_Vero_WHO_p1.0) 및 SARS-CoV-2 (MW466791.1)을 추가한 서열을 reference 삼아 STAR과 HTSeq tool을 이용해 mapping을 진행하였다. Read coverage 수를 확인하기 위해 BAM 파일을 활용하였으며 SARS-CoV-2 유전체 내의 위치별로 cover 할 수 있도록 맞추었다.

[151] 그 결과, 도 10d에 나타난 바와 같이, RdRp 타겟하지 않는 crRNA (NT) 처리군에 비해 crRNA #2, 9, 11 처리군에서 유의미한 SARS-CoV-2 유전체 감소를 확인하였다. 특히 pseudoknot 부분을 타겟하는 crRNA #2 처리군에서는 완벽한 SARS-CoV-2 유전체 감소가 나타났다.

[152] **<2-4> Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2 RdRp 또는 nucleocapsid 유전자 수준 확인**

[153] Vero E6 뿐만 아니라 human 폐세포 유래종인 Calu-3 세포에서 Cas13b mRNA 및 crRNA #2가 SARS-CoV-2 복제를 억제하는 지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[154] 구체적으로, Cas13b mRNA 및 crRNA #2 형질감염된 Calu-3 세포를 SARS-CoV-2 감염시켜 24시간 후 감염세포에서 total RNA 를 추출하여 qRT-PCR을 통해 SARS-CoV-2 유전자를 분석하였다.

[155] 그 결과, 도 10e에 나타난 바와 같이, RdRp 표적하지 않는 crRNA (NT) 처리군에 비해 crRNA #2 처리군에서 유의미한 SARS-CoV-2 RdRp, nucleocapsid 유전자 저해 효과를 보았다.

[156] **<실험예 3> pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA의 SARS-CoV-2 복제 억제 효과 확인**

[157] 실험예 2에서 강력한 바이러스 억제 효과를 보인 crRNA #2는 ORF1b의 리보솜 해독틀 변위 부위의 pseudoknot 영역을 표적으로 한다. 리보솜 해독틀 변위 부위는 SARS-CoV-2에서 고도로 보존된 3-stemmed pseudoknot 구조를 가지고 있는데 crRNA #1과 #3도 pseudoknot 영역을 표적으로 하여 전체 3-stemmed 구조를 덮고 있다 (도 11a). crRNA #1은 stem 1과 3을 형성하는 서열을 표적으로 하였고, crRNA #2와 #3은 각각 stem 1-3과 stem 2의 서열을 표적으로 하였다. 이에, 본 발명자들은 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 것이 바이러스 복제를

차단하는 데 중요함을 확인하기 위해 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA (#1, #2, #3) 및 Cas13b mRNA로 형질감염된 세포에서 스파이크 단백질의 발현 및 subgenomic RNA 수준을 확인하였다.

[158] **<3-1> 면역염색을 이용한 스파이크 단백질의 발현 확인**

[159] Cas13b mRNA 및 pseudoknot-targeting crRNA가 스파이크 단백질 발현을 억제하는 지 확인하기 위하여, 실험예 2-1과 같은 방법으로 면역염색을 수행하였다.

[160] 그 결과, 도 11b에 나타난 바와 같이, crRNA 를 처리하지 않거나, 타겟하지 않는 crRNA (Non-target)를 처리한 대조군에 비하여 crRNA #1, #2 및 #3으로 형질감염된 세포의 배양액 및 세포 용해물에서는 스파이크 단백질이 나타나지 않음을 확인하였다.

[161] 상기의 결과는 crRNA #1, #2 및 #3 및 PspCas13b가 SARS-CoV-2의 바이러스 복제를 억제함을 시사한다.

[162] **<3-2> 웨스턴블롯을 이용한 스파이크 및 뉴클레오캡시드 단백질의 발현 확인**

[163] 또한, Cas13b mRNA 및 pseudoknot-targeting crRNA가 스파이크 단백질의 발현을 억제하는 지 확인하기 위하여, 웨스턴블롯 실험을 수행하였다.

[164] 단백질 정량을 통해 시간대별 동일한 양을 웨스턴블롯 하였다. 이때 Rabbit anti-2019-nCoV spike protein, rabbit anti-2019-nCoV nucleotide 를 이용해 각각 스파이크 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질을 표적하고 mouse anti-GAPDH 를 이용해 GAPDH 단백질을 표적하였다. 이후 goat anti-rabbit IgG H&L (IRDye 680RD)과 goat anti-mouse IgG H&L (IRDye 800CW)를 이용해 각각의 단백질을 2차 표적하여 이미징하였다.

[165] 그 결과, 도 11c에 나타난 바와 같이, crRNA 를 처리하지 않거나 (Non), 타겟하지 않는 crRNA (NT)를 처리한 대조군에 비하여 crRNA #1, #2 및 #3으로 형질감염된 세포의 배양액 및 세포 용해물에서는 스파이크 단백질 및 뉴클레오캡시드 단백질의 발현이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

[166] 상기의 결과는 crRNA #1, #2 및 #3 및 PspCas13b가 SARS-CoV-2의 바이러스 복제를 효과적으로 억제함을 시사한다.

[167] **<3-3> RNA 유전자 수준 확인**

[168] 또한, qPCR을 통해 subgenomic RNA 수준을 확인하였다.

[169] 두번째 감염군의 세포 배양액 (supernant) 혹은 세포 용해물 (cell)에서 분리된 바이러스를 이용한 새로운 Vero E6세포에 감염시킨 후 24시간 뒤 감염 세포에서 total RNA 를 추출하여 SARS-CoV-2의 RdRp, nucleocapsid를 증폭시키는 프라이머를 이용해 qRT-PCR을 진행하였다.

[170] 그 결과, 도 11d에 나타난 바와 같이, crRNA 를 처리하지 않거나 (Non), 타겟하지 않는 crRNA (NT)를 처리한 대조군에 비하여 crRNA #1, #2 및 #3으로 형질감염된 세포의 배양액 및 세포 용해물에서는 subgenomic RNA의 양이 감소하였다. 특히, crRNA #2 및 #3을 통한 바이러스 복제는 완벽하게

차단되었음을 확인하였다.

[171] 상기의 결과는 pseudoknot 영역과 같은 번역 시작점이 ORF의 다른 영역을 대상으로 하는 것보다 SARS-CoV-2의 복제를 억제하는 가장 좋은 표적이 될 수 있음을 시사한다.

[172] <실험예 4> dead PspCas13b를 이용한 SARS-CoV-2 유전체 절단 효과의 확인

[173] SARS-CoV-2 내 pseudoknot 부위는 3-stemmed RNA 구조를 가지며 frameshifting site에 위치하여 바이러스 단백질 발현에 중요한 기능을 한다. PspCas13b 단백질이 pseudoknot 부위와 결합하여 frameshifting site의 기능을 저해해 SARS-CoV-2 증식을 억제하는 것이 아닌 SARS-CoV-2 유전체의 절단에 의해 SARS-CoV-2 증식이 억제됨을 증명하기 위하여 절단효과가 없는 dead PspCas13b를 제작하였고 SARS-CoV-2 억제 여부 실험을 진행하였다. 이때 crRNA #5는 대조군으로 사용하였다.

[174] <4-1> 면역염색을 이용한 스파이크 단백질의 발현 확인

[175] Vero E6 세포에 PspCas13b mRNA와 crRNA #2, dead PspCas13b mRNA와 crRNA #2를 각각 유입하고 SARS-CoV-2 감염 후 24시간 뒤 스파이크 단백질을 염색하였다.

[176] 4% formaldehyde로 세포를 fixation 후 2% Triton X-100으로 permeabilization 하였다. Rabbit anti-2019-nCoV spike protein을 이용해 스파이크 단백질을 1차 표적하였고, goat anti-rabbit IgG (H+L), alexa fluor 488로 2차 표적하였다. 해당 세포를 DAPI staining을 한 후 DAPI와 GFP 이미징을 하였다.

[177] 그 결과, 도 12a에 나타난 바와 같이, PspCas13b mRNA와 crRNA #2, #5 처리군에서 스파이크 단백질 발현 세포수가 감소한 것과 달리, dead PspCas13b mRNA 처리군에서는 crRNA #2, #5 처리군 모두에서 스파이크 단백질로 염색된 세포수가 전혀 감소되지 않았다.

[178] <4-2>RNA 수준 확인

[179] 또한, 감염된 Vero E6 세포의 total RNA를 추출하여 SARS-CoV-2의 RdRp, nucleotide 유전자를 증폭시키는 프라이머를 이용해 qRT-PCR을 진행하였다.

[180] 그 결과, 도 12b에 나타난 바와 같이, dead PspCas13b mRNA를 처리한 군에서는 SARS-CoV-2 유전자 감소가 전혀 관찰되지 않았다.

[181] 이는 PspCas13b 단백질에 의한 SARS-CoV-2 유전체 절단이 있어야 SARS-CoV-2 증식 억제가 가능하다는 것을 의미한다.

[182] <실험예 5> PspCas13b mRNA 또는 crRNA의 농도에 따른 살아있는 SARS-CoV-2 복제 수준 변화 확인

[183] Cas13b mRNA와 crRNA 농도별 처리에 따른 살아있는 SARS-CoV-2 복제 수준 변화를 측정하기 위해 플라그 에세이(plaque assay)를 수행하였다.

[184] 구체적으로, Vero E6 세포에 Cas13b mRNA와 crRNA를 각각 0 ng:0 ng, 50 ng: 25 ng, 100 ng:50 ng, 200 ng:100 ng, 400 ng: 200 ng 처리 후 SARS-CoV-2 감염을 유도하였다. 24시간 뒤 감염 세포에서 SARS-CoV-2를 분리 후 이를 새로운 Vero

E6 세포에 감염을 유도하였다. 이 세포를 plaque assay 하였다.

- [185] 그 결과, 도 12c와 같이 RdRp 타겟하지 않는 crRNA의 경우 Cas13b mRNA와 crRNA 처리 농도에 관계없이 세포 사멸에 의한 플라그가 형성되었다. 하지만 crRNA #2의 경우 처리 농도가 높아지면서 플라그의 형성이 감소하였다.
- [186] 플라그의 수를 분석하여 0 ng Cas13b mRNA:0 ng crRNA 균을 기준 (100%)으로 하여 백분율로 나타낸 결과, 도 12d와 같이 RdRp 타겟하지 않는 crRNA에 비해 crRNA #2를 처리한 균의 플라그 수가 현저히 감소함을 확인하였다. 이는 Cas13b mRNA와 crRNA 처리한 균에서 살아있는 SARS-CoV-2 복제가 일어나지 않는 것을 의미한다.
- [187] <실험예 6> SARS-CoV-2 변이체에 대한 바이러스 분해 효능 확인
- [188] <6-1> SARS-CoV-2 변이체 간의 서열 변이 분석
- [189] SARS-CoV-2 변이체 (알파, 베타, 감마 및 델타) 간의 서열 변이를 분석하였다.
- [190] 구체적으로, 오픈소스데이터 (GISAID)를 이용하여 변이체에 해당하는 SARS-CoV-2 전체 유전체를 각 10명의 환자 샘플에서 얻었고, 유전체 서열 사이의 연관성을 확인하기 위해 MAFFT 방법을 이용해 서열정렬을 수행하였다.
- [191] 그 결과, 도 13a에 나타난 바와 같이, SARS-CoV-2 변이체의 ORF1a 및 구조 단백질은 ORF1b에 비해 상대적으로 많은 양의 돌연변이를 가지고 있었다.
- [192] ORF1b는 SARS-CoV-2 게놈에서 가장 잘 보존된 영역이며, 또한 ORF1b의 pseudoknot 영역의 서열과 구조는 코로나바이러스에서 고도로 보존된 것으로 알려져 있다. SARS-CoV-2의 변이형이 빠르게 출현하면서 바이러스 게놈 기반 항바이러스제는 돌연변이를 극복해야 하는 과제에 직면해 있는데, 구조 단백질의 유전자를 인식하도록 설계된 약물은 돌연변이율이 높아 표적화 효율이 떨어질 위험이 있다. 따라서, 본 발명의 ORF1b 내 RdRp 또는 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA는 SARS-CoV-2 돌연변이에서도 효과적으로 바이러스 복제를 억제할 수 있음을 시사한다.
- [193] pseudoknot 영역을 표적으로 하는 SARS-CoV-2 변이체에 대한 효과를 확인하기 위하여 SARS-CoV-2 변이체에 감염된 세포에서 스파이크 단백질의 발현을 분석하였다.
- [194] 구체적으로, Vero E6 세포에 PspCas13b mRNA와 crRNA #2를 유입하고 SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 alpha, SARS-CoV-2 beta, SARS-CoV-2 gamma, SARS-CoV-2 delta 변이주를 각각 감염시킨 후 24시간 뒤 스파이크 단백질을 염색하였다. 4% formaldehyde로 세포를 fixation 후 2% Triton X-100으로 permeabilization 하였다. Rabbit anti-2019-nCoV spike protein을 이용해 스파이크 단백질을 1차 표적하였고, goat anti-rabbit IgG (H+L), alexa fluor 488로 2차 표적하였다. 해당 세포를 DAPI staining을 한 후 DAPI와 GFP 이미징을 하였다.
- [195] 그 결과, 도 13b에 나타난 바와 같이, crRNA를 처리하지 않거나 (non-treated), 타겟하지 않는 (Non-target) crRNA를 처리한 대조군에서는 대부분의 세포가 변이체 감염에 의해 스파이크 단백질을 발현하였다. 그러나, crRNA #2로

형질감염된 세포에서는 모든 유형의 변이체에서 스파이크 단백질로 염색되는 세포 수가 명확하게 감소함을 확인하였다.

[196] <6-3> SARS-CoV-2 변이체 바이러스 감염된 세포에서 N 및 nsp2 유전자의 subgenomic RNA 수준 확인

[197] Nucleocapsid (N) 및 non-structural protein 2 (nsp2) 유전자의 subgenomic RNA 수준을 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다.

[198] 구체적으로, Vero E6 세포에 각 SARS-CoV-2 변이체 바이러스를 감염시키고, 24시간 뒤 감염 세포에서 total RNA 를 추출하여 SARS-CoV-2의 nucleocapsid (N) 또는 non-structural protein 2 (nsp2)를 증폭시키는 프라이머를 이용해 qRT-PCR 을 진행하였다.

[199] 그 결과, 도 13c에 나타난 바와 같이, N 및 nsp2 유전자의 서브게놈 양은 crRNA를 처리하지 않거나 (non-treated), 타겟하지 않는 (Non-target) crRNA를 처리한 대조군에 비하여 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 crRNA #2의 Cas13 매개 분해에 의해 모든 유형의 SARS-CoV-2 바이러스에서 감소됨을 확인하였다.

[200] <실험예 7> SARS-CoV-2 감염된 마우스에서 치료 효과 확인

[201] Pseudoknot 부위 타겟 PspCas13b 단백질의 SARS-CoV-2 감염병 치료 효과를 보기 위한 실험을 진행하였다.

[202] SARS-CoV의 동물모델로서 Human ACE2 형질전환 마우스에 PspCas13b mRNA와 crRNA #2를 기관내삽입을 통해 유입하고 SARS-CoV-2 감염을 유도하였다. 24시간 뒤 감염마우스의 폐조직에서 SARS-CoV-2를 분리하여 TCID₅₀ 분석을 통해 바이러스를 정량하였다.

[203] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, mRNA가 처리되지 않은 마우스 (Non)와 RdRp를 타겟하지 않는 마우스 (NT)와는 달리 pseudoknot 부분을 타겟하는 마우스 (#2)에서는 바이러스 검출이 매우 미미하였다.

[204] 상기의 결과는 본 발명의 PspCas13b mRNA와 crRNA #2를 코로나바이러스감염증-19의 치료제로 유용하게 사용할 수 있음을 시사한다.

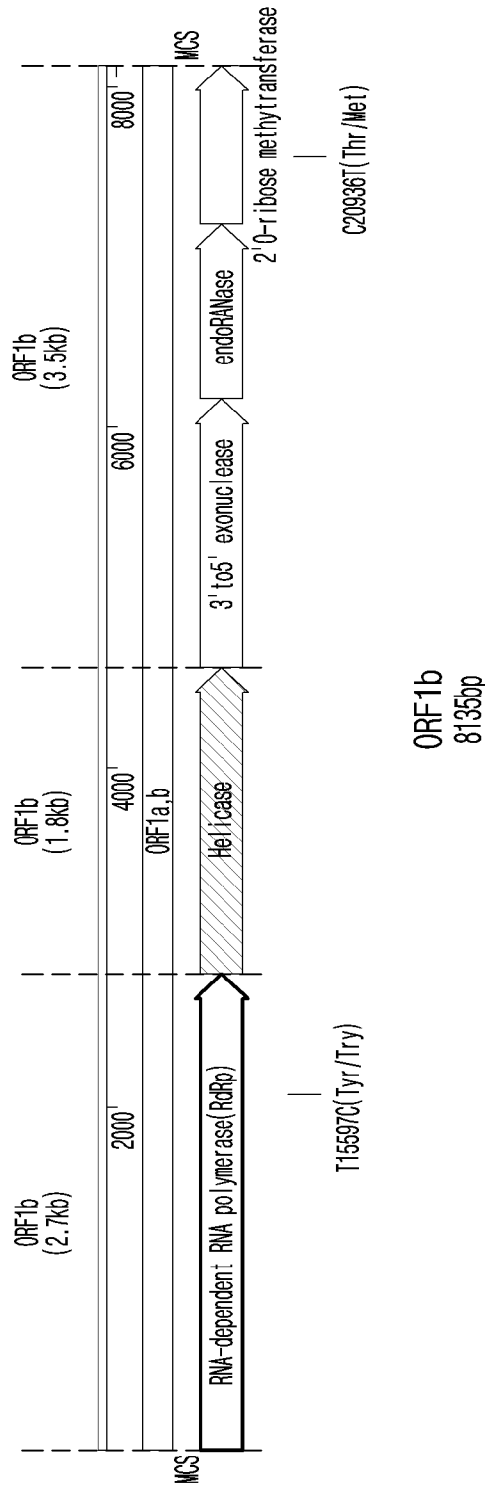
청구범위

- [청구항 1] Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA (CRISPR RNA)를 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 crRNA와 복합체를 형성하는 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 Cas13 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 mRNA인 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 crRNA는 tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA)와 결합된 가이드 RNA (guide RNA) 형태인 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 Cas13 단백질은 Cas13a, Cas13b, Cas13c 및 Cas13d로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 crRNA는 SARS-CoV-2 유전자의 ORF1b를 표적으로 하는 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 crRNA는 SARS-CoV-2 유전자의 ORF1b 내의 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)를 표적으로 하는 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 crRNA는 SARS-CoV-2 유전자의 ORF1b 내의 리보솜 리보솜 해독틀 변위 부위 (ribosomal frame shifting site)의 pseudoknot 영역을 표적으로 하는 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 crRNA는 서열번호 1 내지 12 중에서 선택되는 핵산 서열을 포함하는 표적 부위에 혼성화 가능한 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제4항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 13 내지 24 중에서 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인,

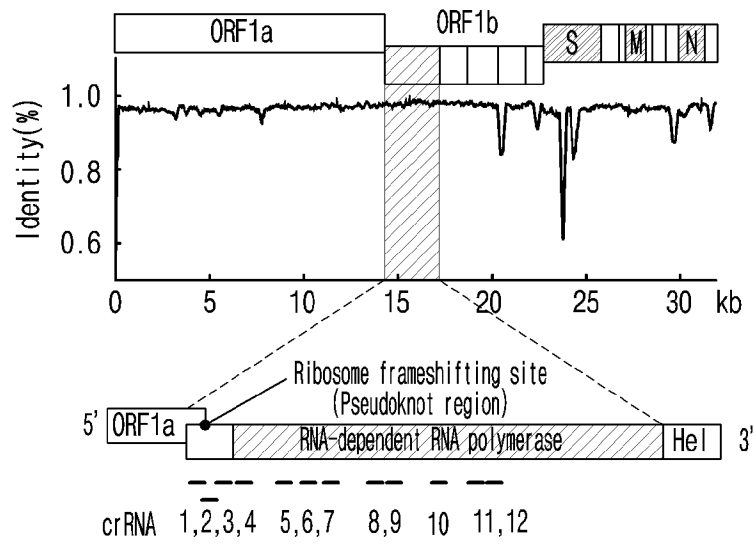
코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 복합체는 SARS-CoV-2의 RNA 유전체를 분해하여 코로나바이러스감염증-19의 치료 효과를 나타내는 것인, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA (CRISPR RNA)를 포함하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA (CRISPR RNA)를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 14] 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 Cas13 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 crRNA (CRISPR RNA)의 용도.

[도 1]

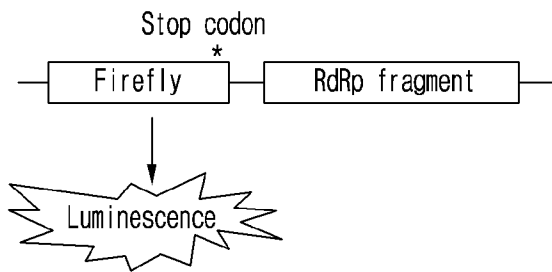


[도2]

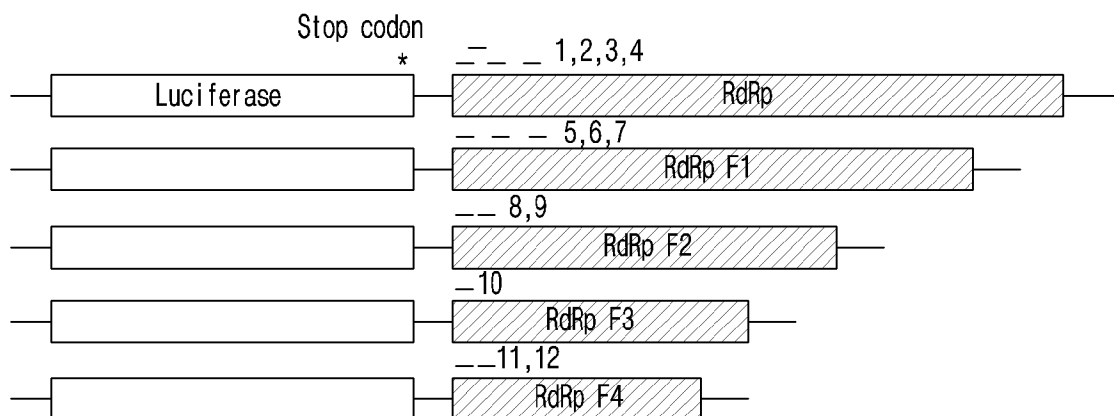


[도3a]

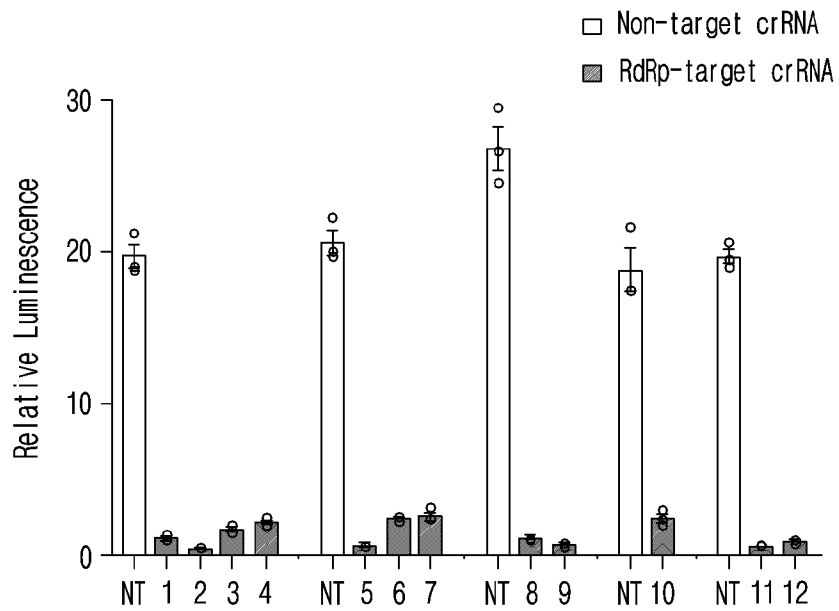
Experimental validation by Dual-luciferase assay



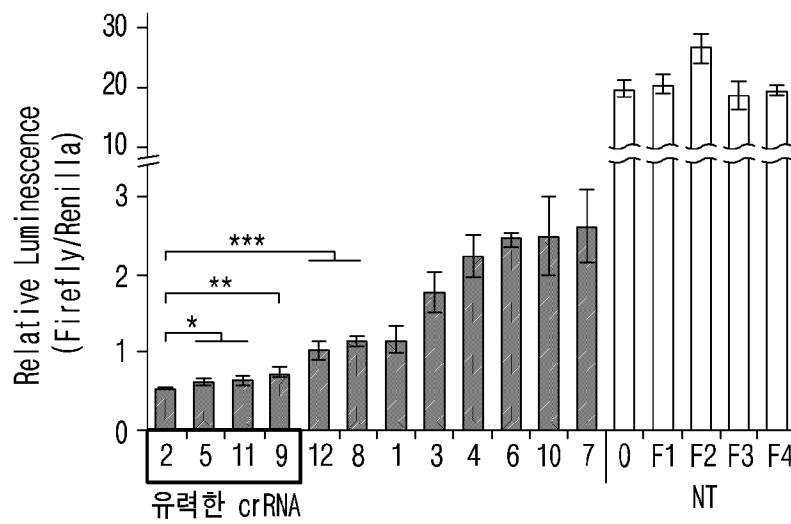
[도3b]



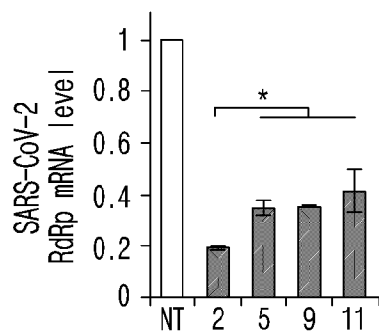
[도3c]



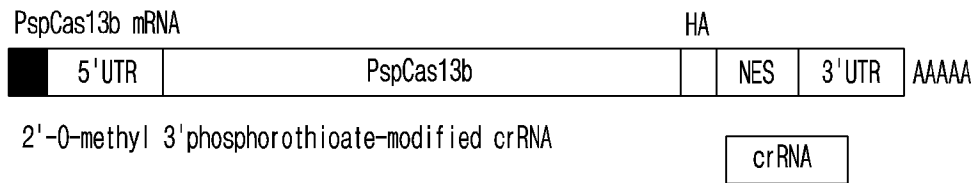
[도3d]



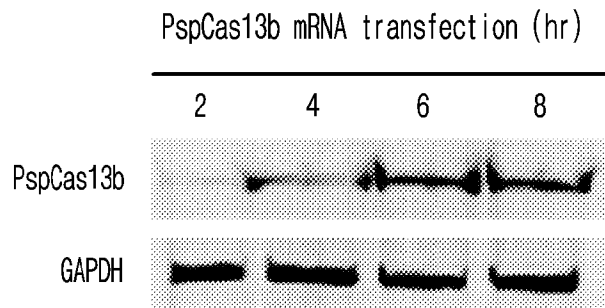
[도4]



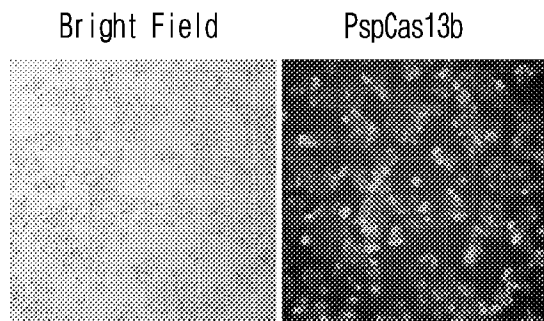
[도5]



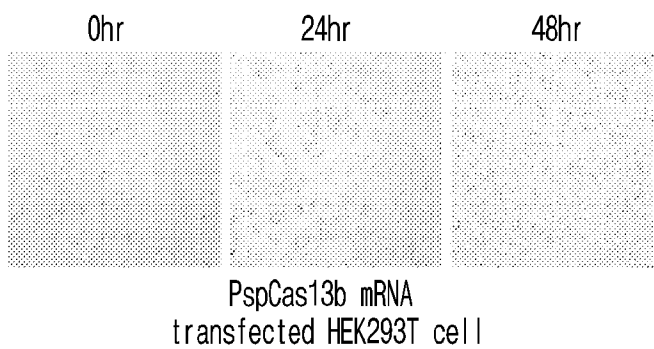
[도6a]



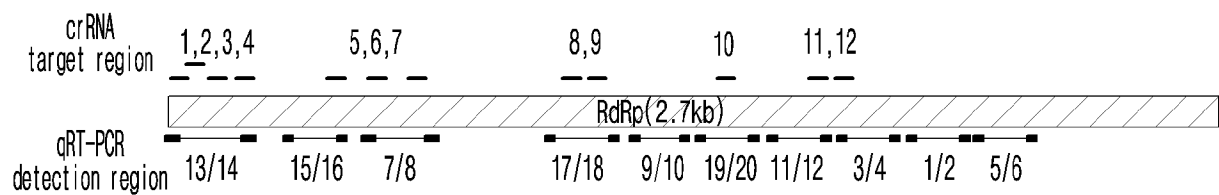
[도6b]



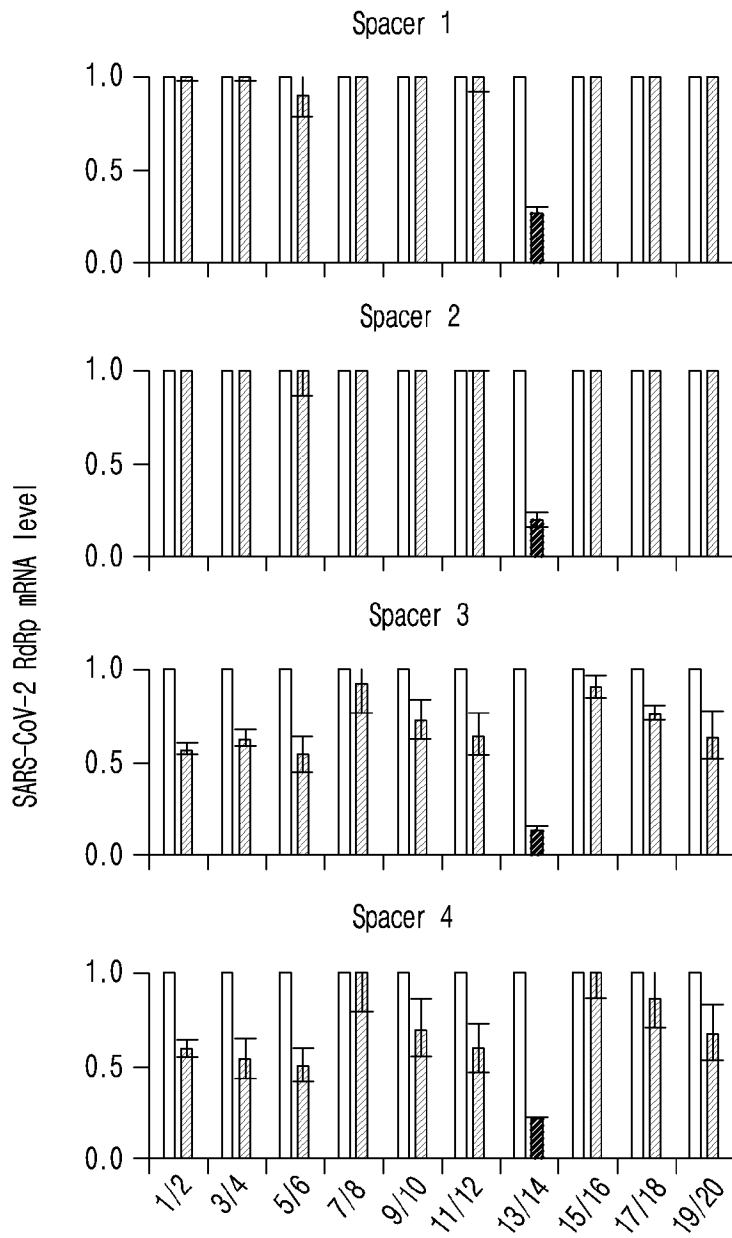
[도7]



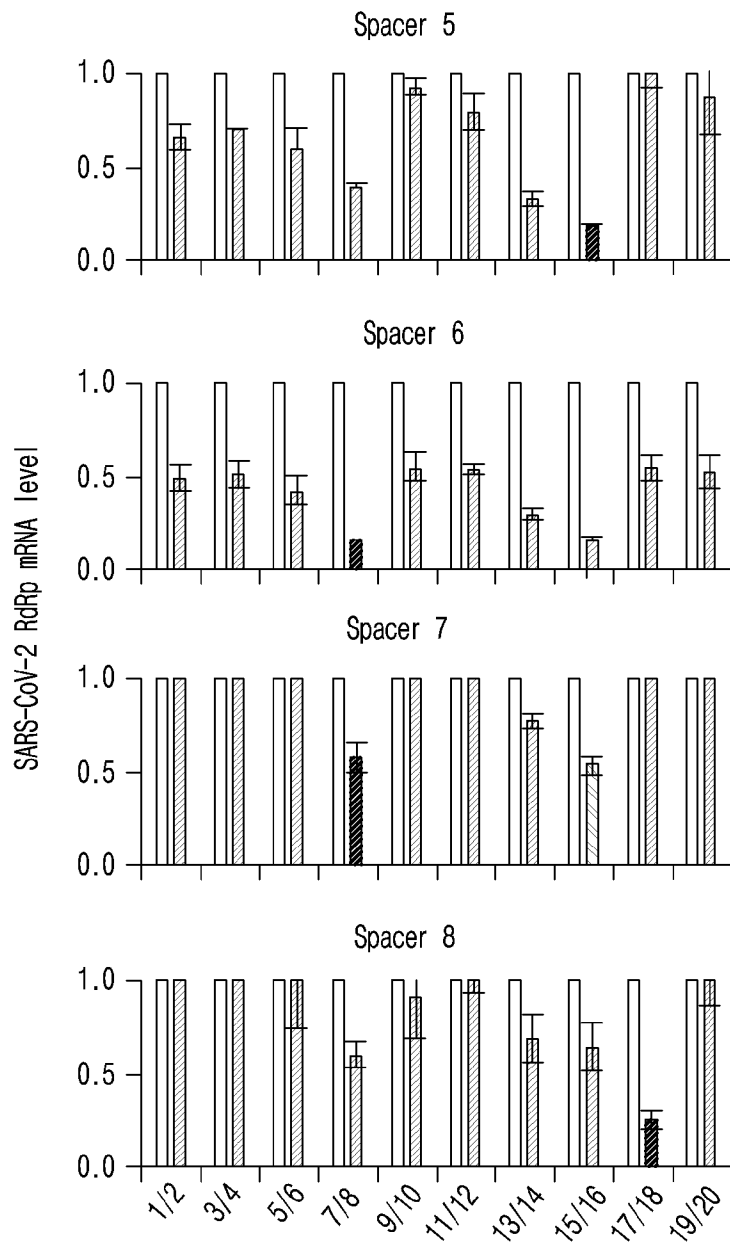
[도8a]



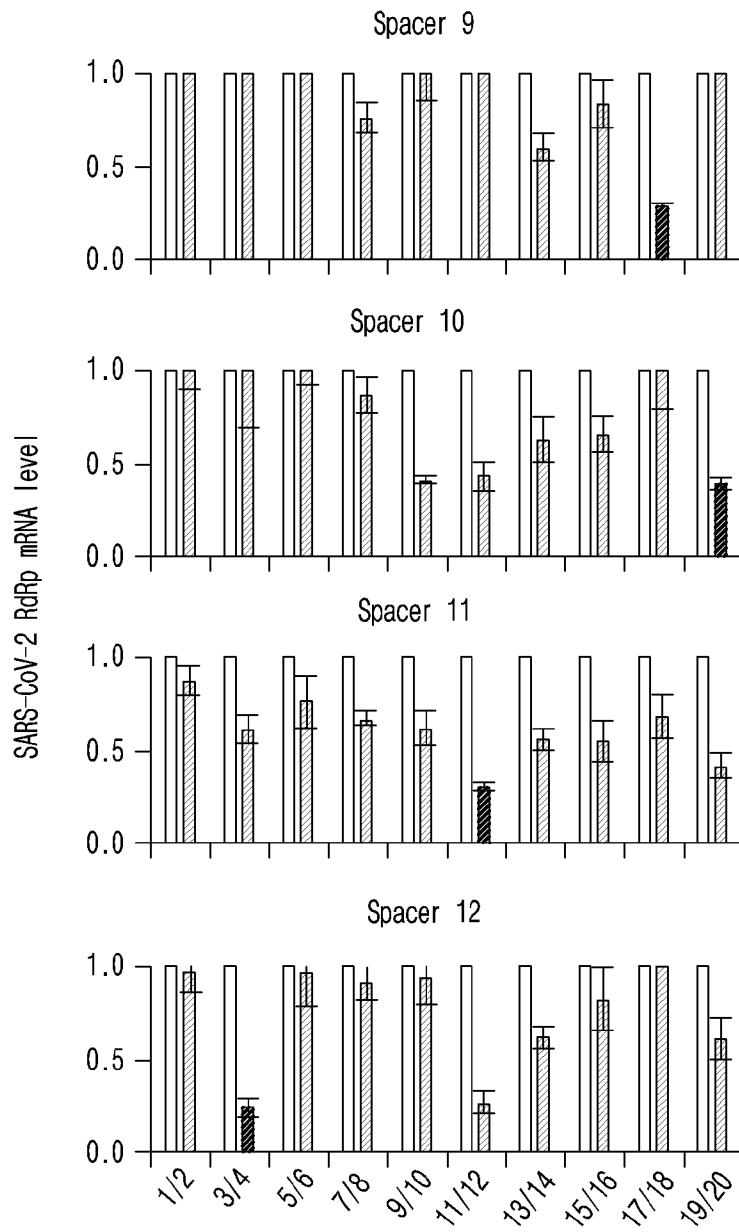
[도8b]



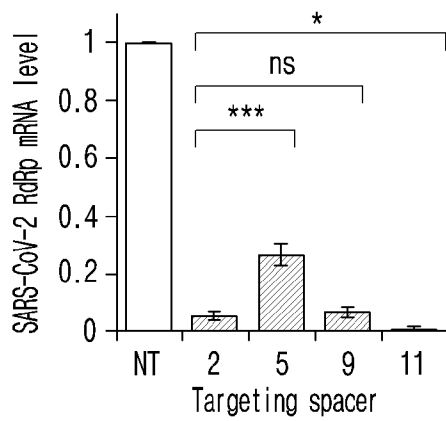
[도8c]



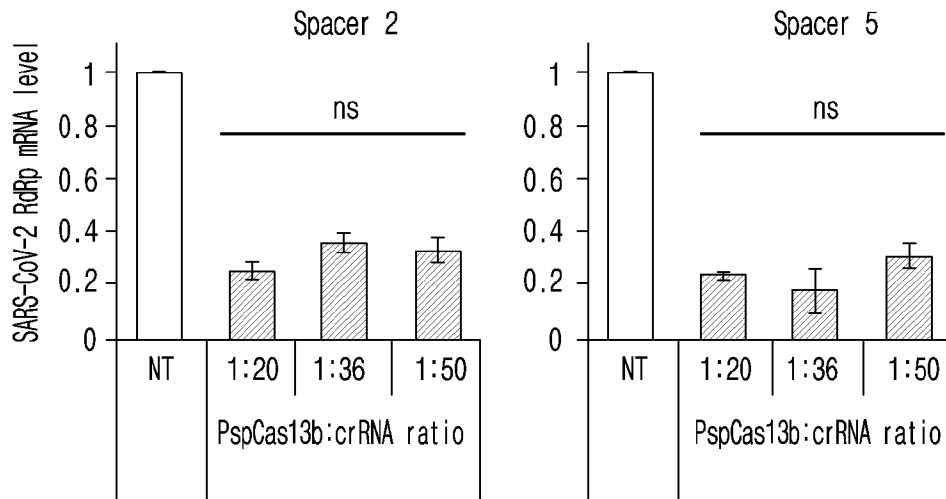
[도8d]



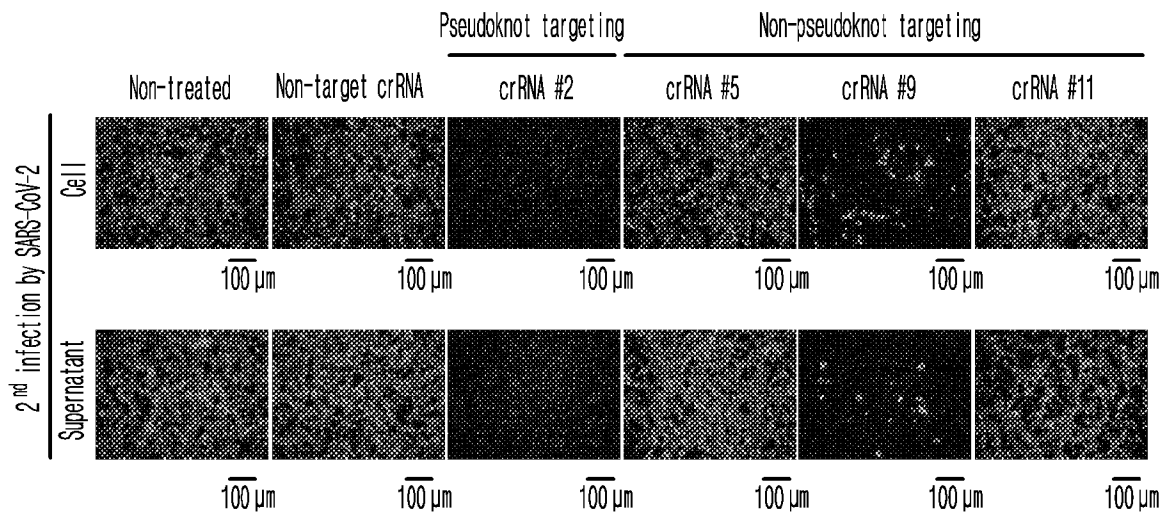
[도9a]



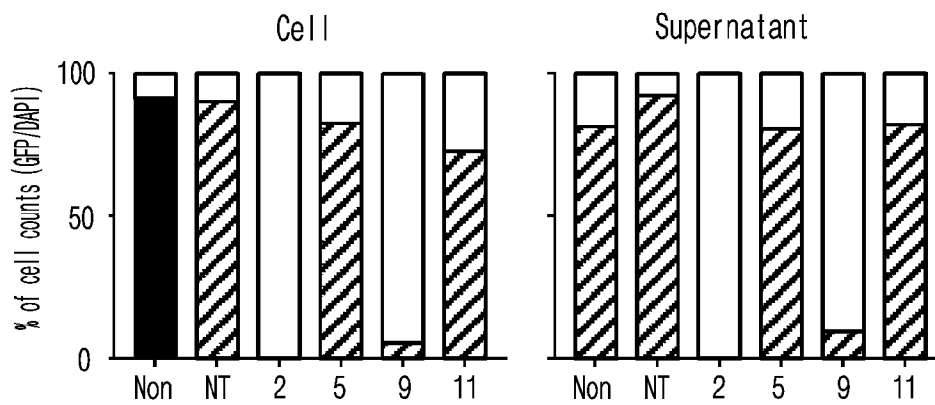
[도9b]



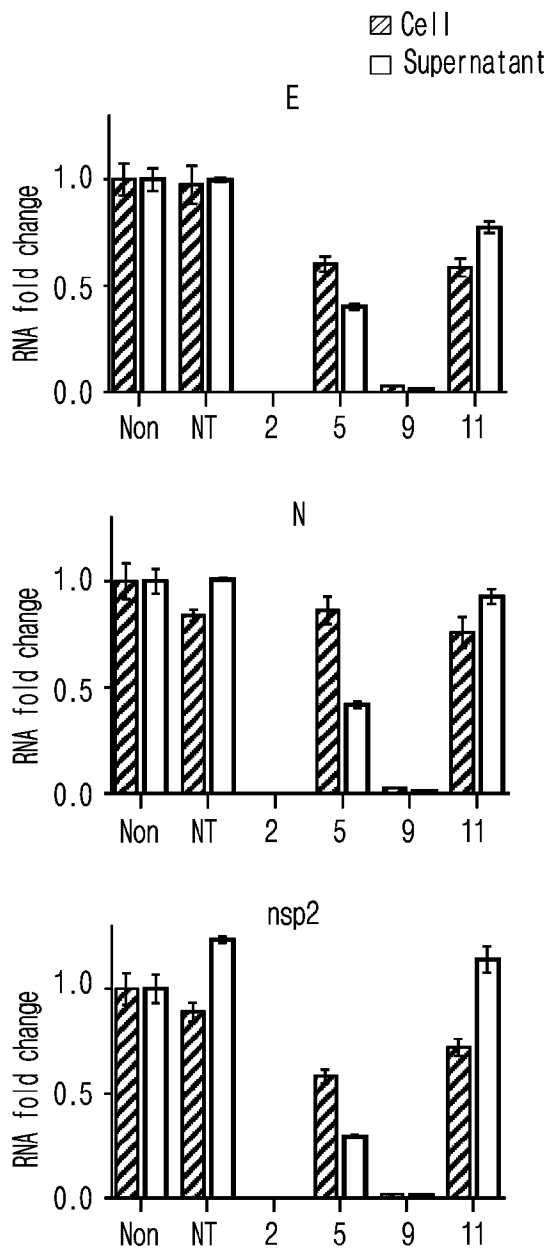
[도10a]



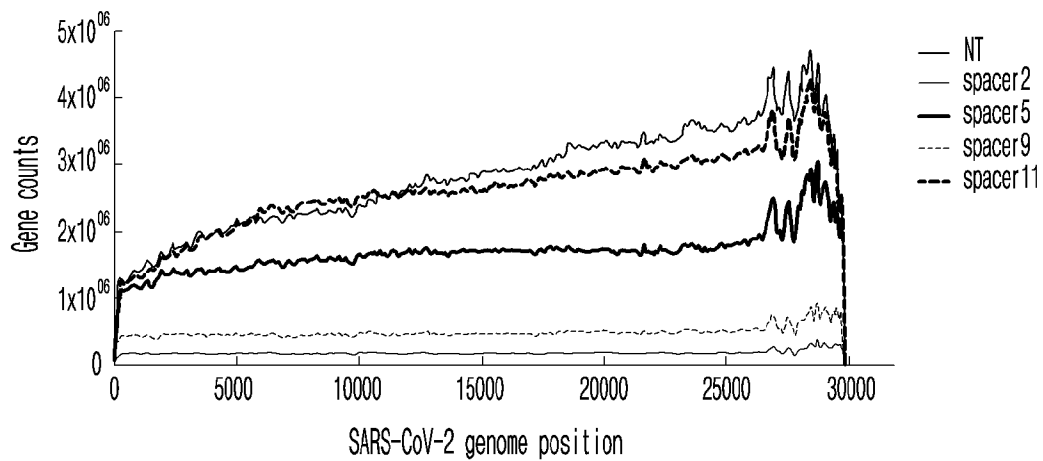
[도10b]



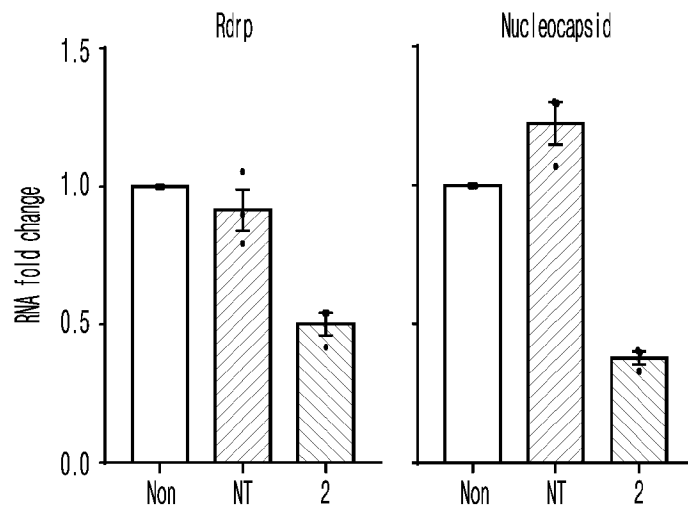
[도10c]



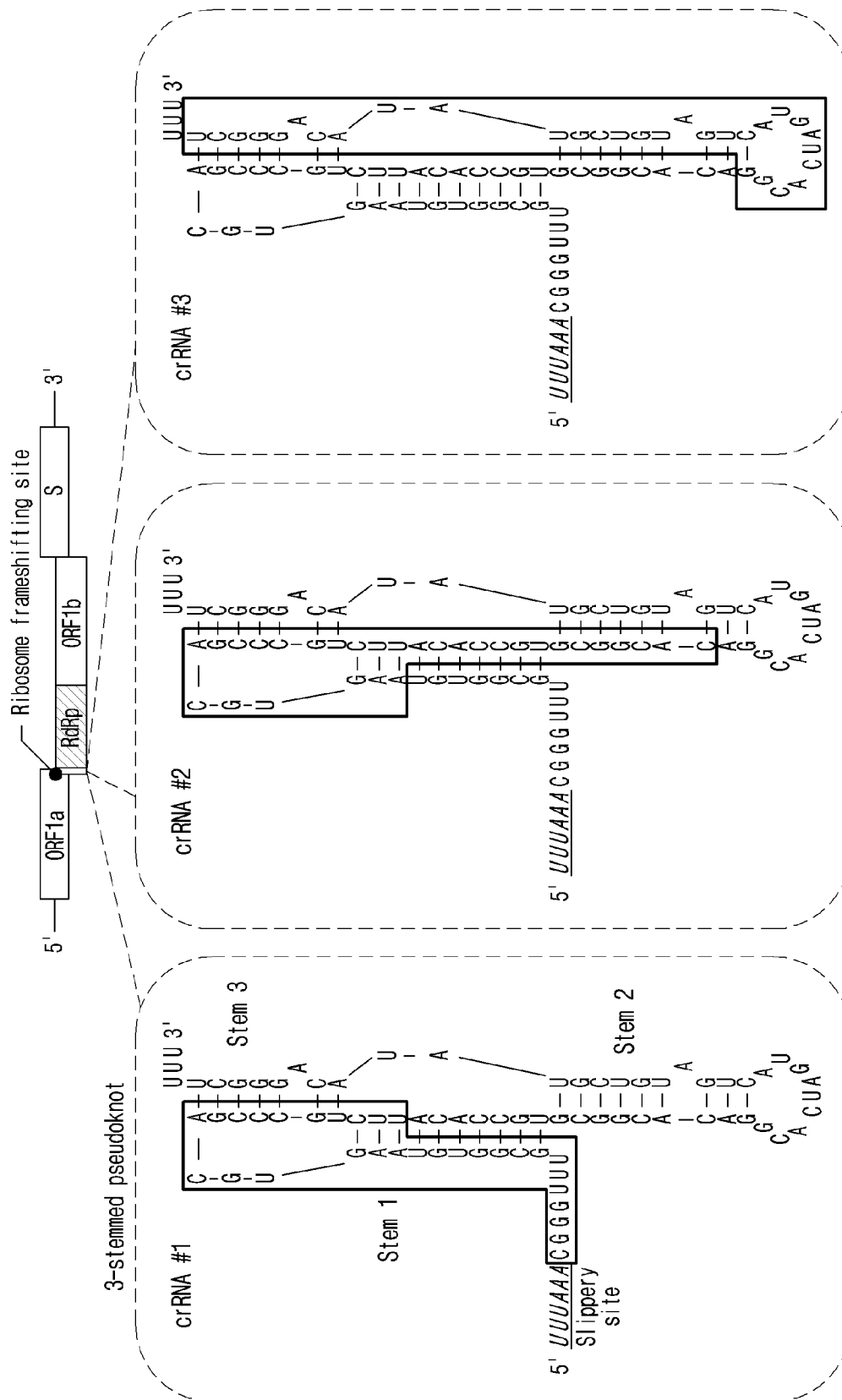
[도10d]



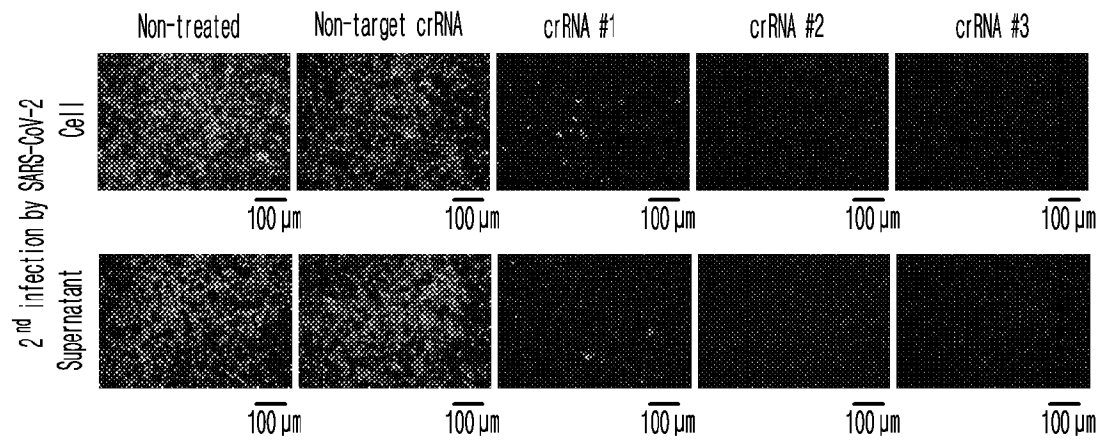
[도 10e]



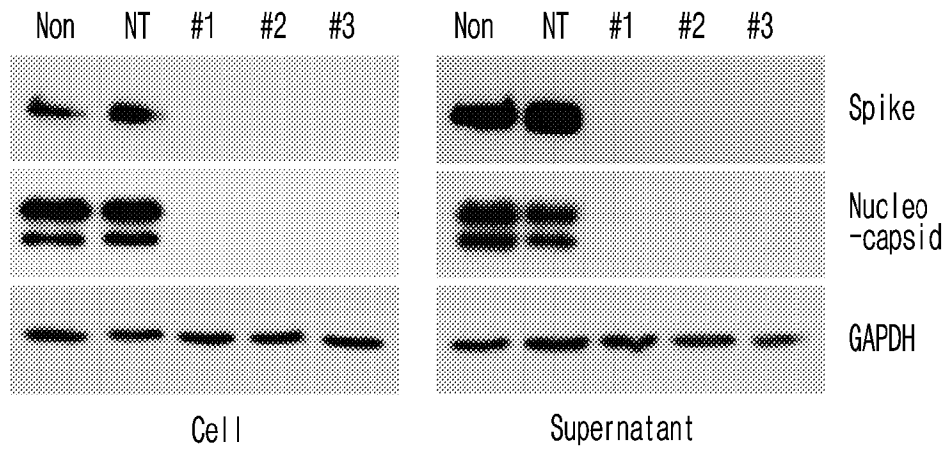
[도11a]



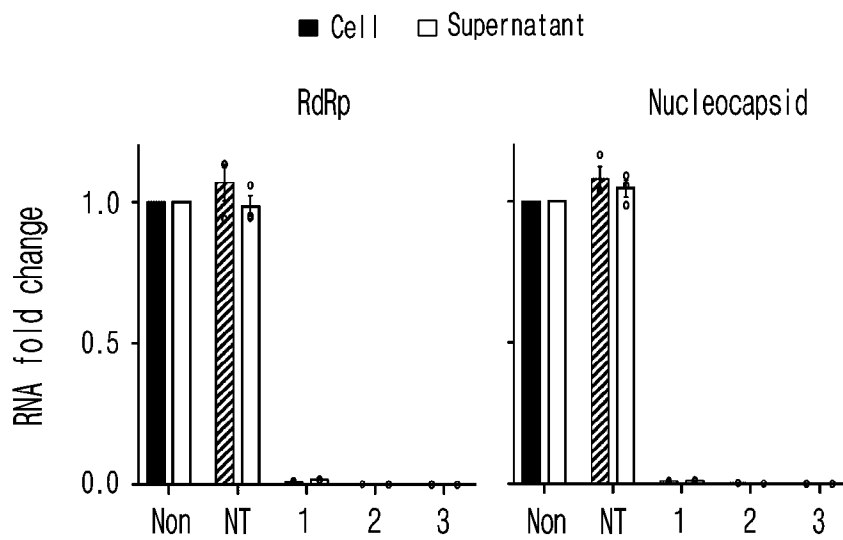
[도11b]



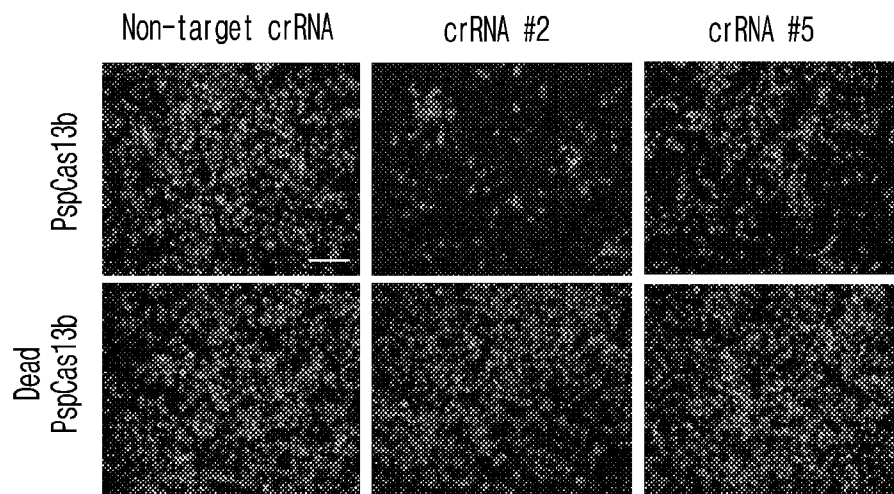
[도11c]



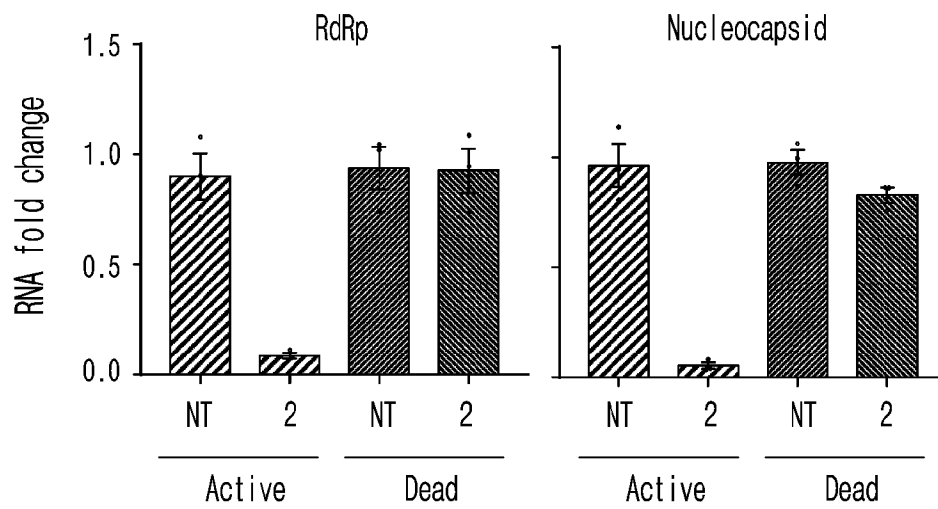
[도11d]



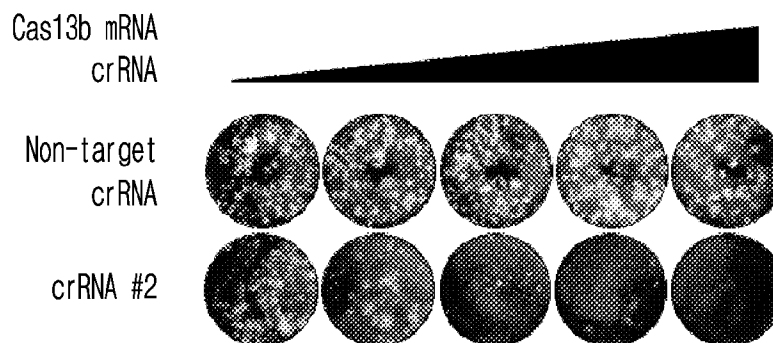
[도 12a]



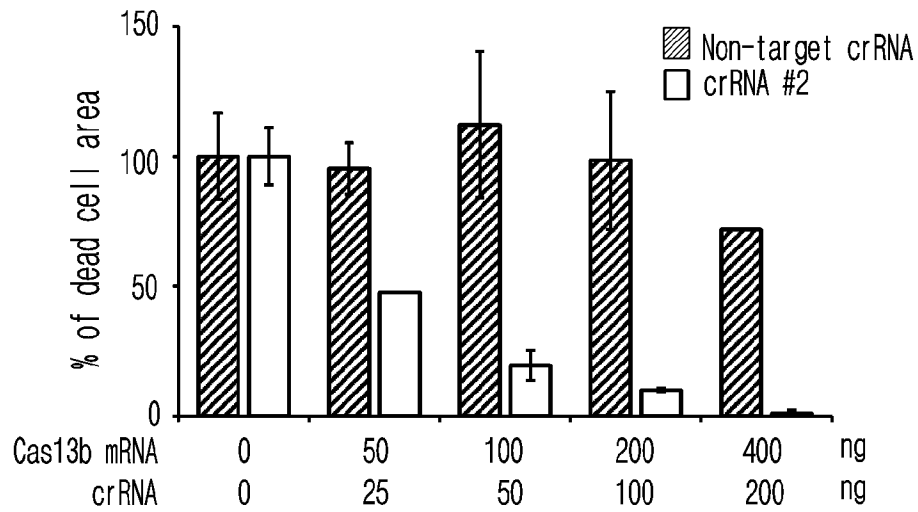
[도 12b]



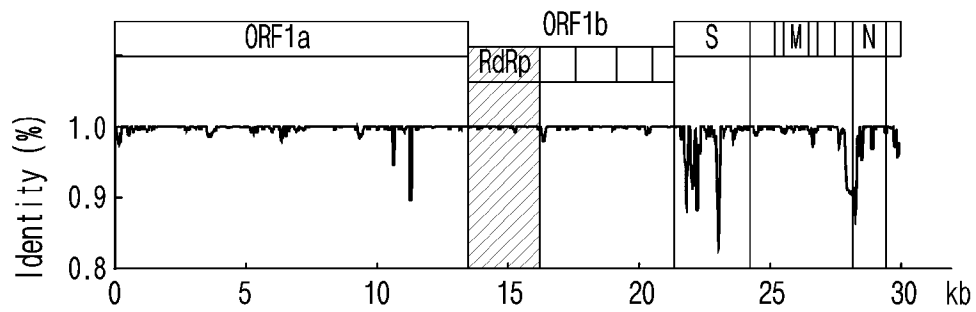
[도 12c]



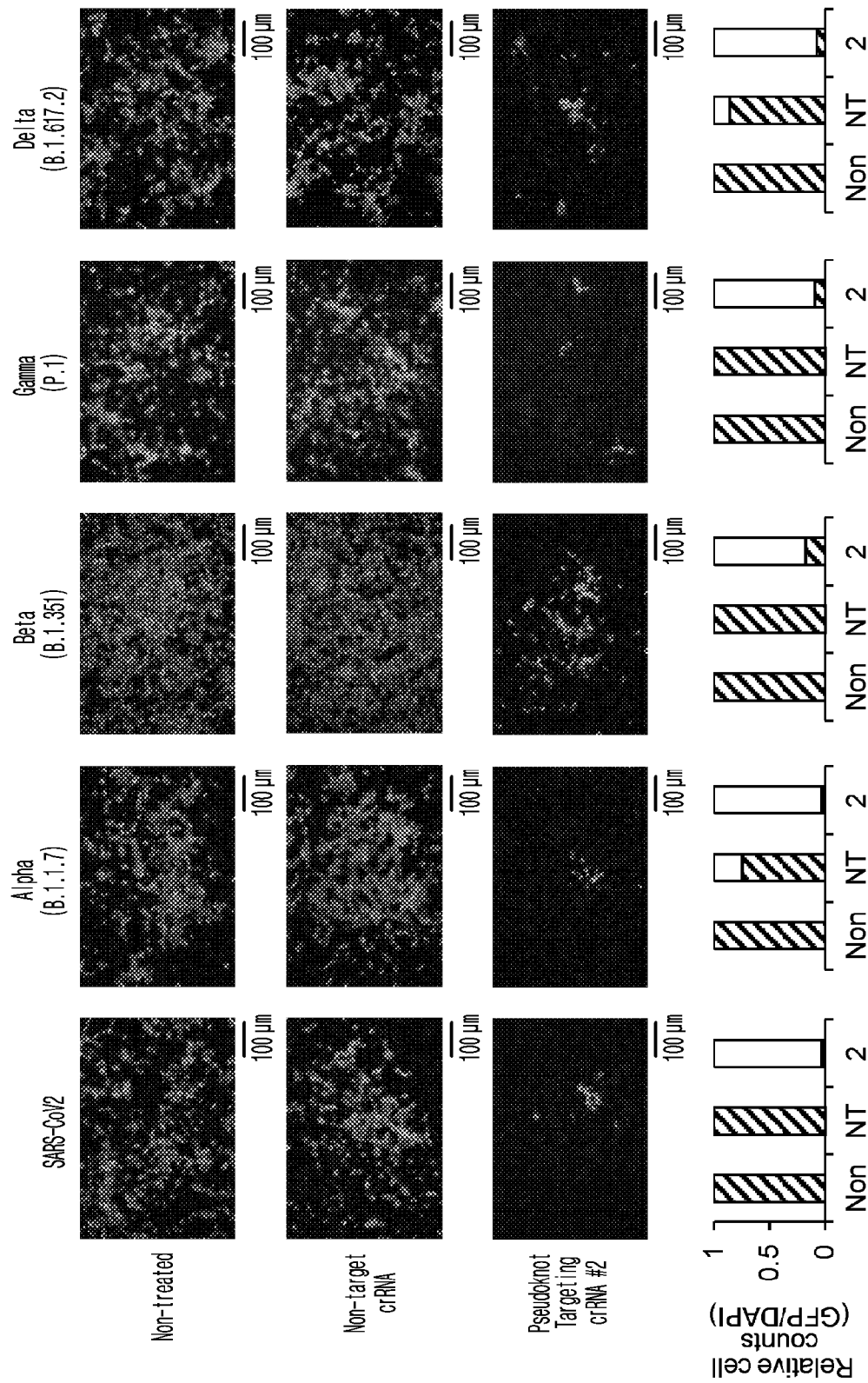
[도12d]



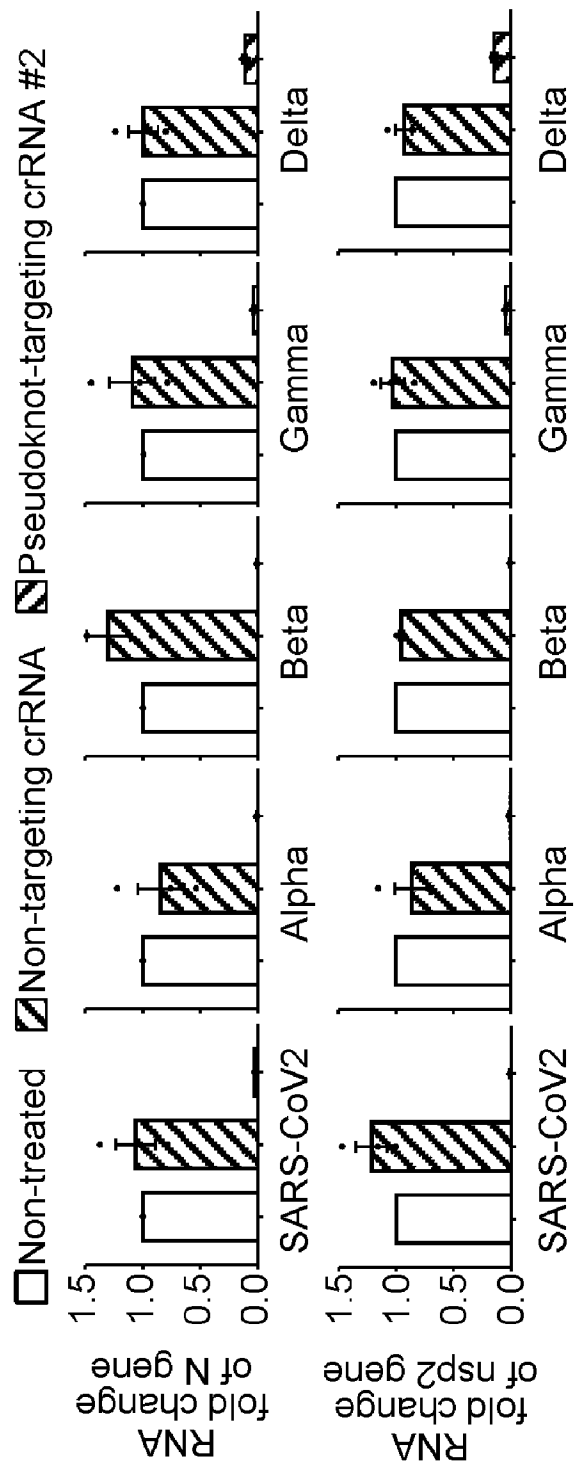
[도13a]



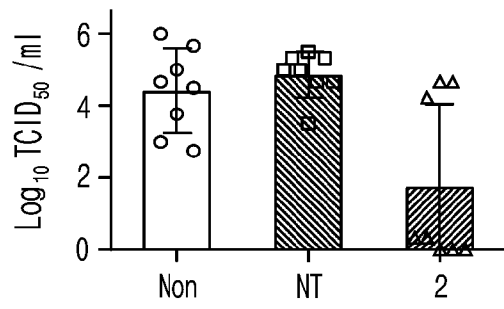
[도 13b]



[도 13c]



[도 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/007599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/46(2006.01); A61P 31/14(2006.01)

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)

A61K 38/46(2006.01); C12N 15/50(2006.01); C12N 15/62(2006.01); C12N 15/867(2006.01); C12N 9/22(2006.01);
C12Q 1/6844(2018.01); C12Q 1/70(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: 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 크리스퍼-카스13(CRISPR-Cas13), 크리스퍼 RNA(CRISPR RNA, crRNA), ORF1b, DNA-의존성 RNA 중합효소(DNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 리보솜 해독틀 변위 부위(ribosomal frame shifting site), 슈도노트(pseudoknot)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ABBOTT, T. R. et al. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. Cell. 14 May 2020 (publication date), vol. 181, pp. 865-876 and e1. See abstract; pages 866, 867, 873 and e1; and figures 1B and 2A.	1-7,11,12,14 8-10
Y	KELLY, J. A. et al. Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS-CoV-2. BioRxiv. 15 June 2020 (publication date), inner pp. 1-13. See inner pages 2 and 5; and figure 1B.	8-10
X	WO 2021-016453 A1 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 28 January 2021 (2021-01-28) See claims 1, 13 and 41; and page 11, lines 19-20.	1,12,14
X	CN 112159817 A (TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY GENERAL HOSPITAL) 01 January 2021 (2021-01-01) See claims 1-3 and 8.	1,12,14



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

05 September 2022

Date of mailing of the international search report

05 September 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/007599**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111363847 A (GUANGZHOU VISION GENE TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 03 July 2020 (2020-07-03) See claims 1 and 7.	1-12, 14
PX	FAREH, M. et al. Reprogrammed CRISPR-Cas13b suppresses SARS-CoV-2 replication and circumvents its mutational escape through mismatch tolerance. Nature Communications. 2021, vol. 12, article no. 4270, inner pp. 1-16 (online publication date: 13 July 2021). See abstract; inner pages 1-14; and figures 1-7.	1-12, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/007599

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/007599

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.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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.:
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/KR2022/007599

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021-016453	A1	28 January 2021	AU	2020-208346	A1	29 July 2021
				CA	3126481	A1	23 July 2020
				CN	113544267	A	22 October 2021
				EP	3911741	A1	24 November 2021
				EP	4004206	A1	01 June 2022
				JP	2022-523632	A	26 April 2022
				KR	10-2021-0126014	A	19 October 2021
				WO	2020-150287	A1	23 July 2020
				WO	2021-195519	A1	30 September 2021
				WO	2021-195525	A1	30 September 2021
CN	112159817	A	01 January 2021	None			
CN	111363847	A	03 July 2020	CN	111363847	B	29 June 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/46(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/46(2006.01); C12N 15/50(2006.01); C12N 15/62(2006.01); C12N 15/867(2006.01); C12N 9/22(2006.01); C12Q 1/6844(2018.01); C12Q 1/70(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: 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 크리스퍼-카스13(CRISPR-Cas13), 크리스퍼 RNA(CRISPR RNA, crRNA), ORF1b, DNA-의존성 RNA 중합효소(DNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 리보솜 해독틀 변위 부위(ribosomal frame shifting site), 슈도노드(pseudoknot)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	ABBOTT, T. R. 등, Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza, Cell, 2020년 5월 14일(공개일), 181권, 페이지 865-876, e1 요약; 페이지 866, 867, 873, e1; 및 그림 1B, 2A	1-7,11,12,14 8-10
Y	KELLY, J. A. 등, Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS-CoV-2, BioRxiv, 2020년 6월 15일(공개일), 내부페이지 1-13 내부페이지 2, 5; 및 그림 1B	8-10
X	WO 2021-016453 A1 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 2021.01.28 청구항 1, 13, 41; 및 페이지 11, 단락 19-20	1,12,14
X	CN 112159817 A (TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY GENERAL HOSPITAL) 2021.01.01 청구항 1-3, 8	1,12,14
A	CN 111363847 A (GUANGZHOU VISION GENE TECHNOLOGY CO., LTD. 등) 2020.07.03 청구항 1, 7	1-12,14
☒ 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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년09월05일(05.09.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년09월05일(05.09.2022)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	FAREH, M. 등, Reprogrammed CRISPR-Cas13b suppresses SARS-CoV-2 replication and circumvents its mutational escape through mismatch tolerance, Nature Communications, 2021년, 12권, 기사번호 4270, 내부페이지 1-16 (온라인 공개일: 2021.07.13.) 요약; 내부페이지 1-14; 및 그림 1-7	1-12,14

제1기제란 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. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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: **13**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(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:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2021-016453 A1	2021/01/28	AU 2020-208346 A1	2021/07/29
		CA 3126481 A1	2020/07/23
		CN 113544267 A	2021/10/22
		EP 3911741 A1	2021/11/24
		EP 4004206 A1	2022/06/01
		JP 2022-523632 A	2022/04/26
		KR 10-2021-0126014 A	2021/10/19
		WO 2020-150287 A1	2020/07/23
		WO 2021-195519 A1	2021/09/30
		WO 2021-195525 A1	2021/09/30
CN 112159817 A	2021/01/01	없음	
CN 111363847 A	2020/07/03	CN 111363847 B	2021/06/29