



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월05일
(11) 등록번호 10-1997116
(24) 등록일자 2019년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/82 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(52) CPC특허분류
C07K 14/82 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)

(72) 발명자
김형범
서울특별시 마포구 토정로18길 12, 107동 1702호 (신수동)

(21) 출원번호 10-2017-0133485
(22) 출원일자 2017년10월13일
심사청구일자 2017년10월13일
(65) 공개번호 10-2018-0041606
(43) 공개일자 2018년04월24일

김원주
서울특별시 관악구 남부순환로 1728 (봉천동)
김한상
서울특별시 용산구 원효로90길 11, 103동 1603호 (원효로1가, 용산더프라임)

(30) 우선권주장
1020160133777 2016년10월14일 대한민국(KR)

(74) 대리인
리앤목특허법인

(56) 선행기술조사문헌
W02016095931 A1*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 17 항

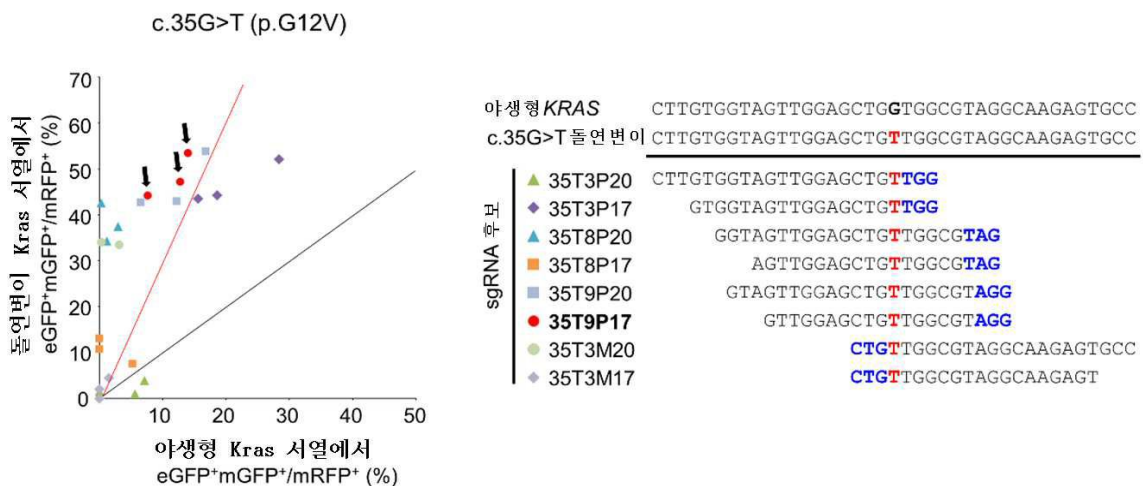
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 KRAS 유전자에 상보적인 가이드 RNA 및 이의 용도

(57) 요약

일 양상에 따른 가이드 RNA, 이를 포함한 벡터, 이를 포함한 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물, 이를 포함한 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이들을 이용한 방법을 제공한다. 이에 따르면, 세포 또는 개체의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이시킬 수 있고, 특히 맞춤형요 또는 정밀의료로서, 암을 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

World Journal of Gastroenterology,
(2012.10.07), Vol. 18, NO. 37, pp 5171-5180.

US20160017301 A1

W02015179540 A1

Pathology-Research and Practice (2009),
Vol.205, pp858-862.*

W02016095931 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2015R1A2A1A15052668
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 한국연구재단-중견연구자지원사업-핵심연구
 연구과제명 CRISPR/Cas9 유전자가위를 이용한 long intergenic noncoding RNA (linc RNA) 녹아웃 라이
 브러리의 제조 및 이를 이용한 lincRNA 기능 규명
 기여율 1/5
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI14C2019
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 한국보건산업진흥원-세계선도의생명과학자육성사업
 연구과제명 질환 치료를 위한 유전자 교정 기반 기술 개발
 기여율 1/5
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2015.11.01 ~ 2017.10.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2014R1A1A1A05006189
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 한국연구재단-신진연구자지원사업
 연구과제명 상동 제조합과 유전자 가위 기술을 이용한 세포의 유전적 변환
 기여율 1/5
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2017.04.30
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2013M3A9B4076544
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 한국연구재단-바이오. 의료기술개발사업
 연구과제명 유전자가위를 이용한 생체 외 및 생체 내 안전한 유전자 교정법 개발
 기여율 1/5
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2015.07.26 ~ 2016.07.25
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 HI14C1324
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 보건산업진흥원
 연구사업명 연구중심병원 육성R&D
 연구과제명 글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
 기여율 1/5
 주관기관 연세대학교 세브란스병원
 연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31
-

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 표적 핵산 서열에 상보적인 2개 이상의 연속 폴리뉴클레오티드를 포함하는 가이드 RNA로서,

상기 가이드 RNA는 서열번호 48의 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 표적 핵산 서열은 야생형 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 5'-말단으로부터 35번째 핵산이 구아닌으로부터 티민으로 변경된 것인 가이드 RNA.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 표적 핵산 서열은 프로토스페이스 인접 모티프(proto-spacer adjacent motif: PAM)를 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 PAM은 5'-TGG-3', 5'-TAG-3', 5'-AGG-3', 및 5'-CTG-3'으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열을 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 가이드 RNA는 길이가 17 뉴클레오티드 내지 30 뉴클레오티드인 것인 가이드 RNA.

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 1의 가이드 RNA를 포함하는 벡터.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 벡터는 바이러스성 벡터인 것인 벡터.

청구항 11

청구항 1의 가이드 RNA, 청구항 9의 벡터, 또는 이들의 조합을 포함하는, 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 조성물은 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo) 투여용인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서, Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 Cas 폴리펩티드는 Cas9 폴리펩티드 또는 Cpf1 폴리펩티드인 것인 조성물.

청구항 15

청구항 1의 가이드 RNA, 청구항 9의 벡터, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 암은 췌장암, 대장암, 폐암, 유방암, 피부암, 두경부암, 결장직장암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군 (myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병(Hodgkin's Disease), 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 15에 있어서, Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 18

세포와 청구항 1의 가이드 RNA, 청구항 9의 벡터, 또는 이들의 조합을 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 세포의 유전체로부터 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이시키는 방법.

청구항 19

개체에 청구항 1의 가이드 RNA, 청구항 9의 벡터, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법으로서,

상기 개체는 인간을 제외한 포유동물인 것인 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 개체는 돌연변이 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전체를 갖는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] KRAS 유전자에 상보적인 가이드 RNA, 이를 포함한 벡터, 이를 포함한 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물, 이를 포함한 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이들을 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 가위는 유전자에 결합하여 특정 DNA 부위를 절단하여 사용하는 효소 또는 이를 이용한 유전체 편집 (genome editing) 기법을 말한다. 유전자 가위를 이용하여 줄기세포 또는 체세포에서 유전병의 원인이 되는 돌연변이 교정, 항암 세포 치료제와 같이 다양한 분야에서 활용할 수 있다. 유전자 가위로서, ZFN(zinc finger nuclease), TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease), 및 제2형 CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced repeat/CRISPR-associated) 원핵생물 획득 면역 시스템 유래 RGEN(RNA-guided engineered nuclease) 등이 알려져 있다. Cas9 뉴클레아제와 적절한 가이드 RNA를 세포 내로 전달함으로써, 세

포의 유전체는 원하는 위치에서 절단되고 기존 유전자를 제거하고 새로운 유전자를 삽입할 수 있다. 유전자 가위를 이용하여 특정 DNA를 절단할 때, Cas9 뉴클레아제는 가이드(Guide) RNA의 서열에 의해 특정된 DNA 표적 서열을 절단한다. 유전자 가위를 이용하여 유전체를 편집하는 방법은 한국 공개 번호 10-2015-0101478(2015.09.03) 등에 다수의 문헌을 통해 알려져 있다.

- [0003] KRAS는 인간 종양에서 빈번하게 돌연변이 되는 암유전자(oncogene) 중 하나이다. 정상 KRAS는 정상 조직의 신호전달에 필수적인 기능을 수행하지만 KRAS 유전자의 돌연변이는 다양한 암의 발생에 관여하기 때문에, KRAS 유전자의 돌연변이는 중요한 치료적 표적이다.
- [0004] 따라서, KRAS 유전자 돌연변이를 특이적으로 제거하기 위해, KRAS 유전자 돌연변이를 표적으로 하는 가이드 RNA를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 표적 핵산 서열에 상보적인 2개 이상의 연속 폴리뉴클레오티드를 포함하는 가이드 RNA를 제공한다.
- [0006] 상기 가이드 RNA를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0007] 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0008] 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 세포의 유전체로부터 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이시키는 방법을 제공한다.
- [0010] 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 표적 핵산 서열에 상보적인 2개 이상의 연속 폴리뉴클레오티드를 포함하는 가이드 RNA를 제공한다.
- [0012] 상기 KRAS 폴리펩티드는 야생형 KRAS 폴리펩티드 또는 돌연변이 KRAS 폴리펩티드일 수 있다. 상기 야생형 KRAS 폴리펩티드는 인간의 경우 GenBank Accession No. NP_203524.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 야생형 KRAS 폴리펩티드는 인간의 경우 GenBank Accession No. NM_033360.3의 핵산 서열로부터 암호화되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 표적 핵산 서열은 야생형 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 5'-말단으로부터 34번째 핵산, 35번째 핵산, 38번째 핵산, 또는 이들의 조합이 변경된 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 34번째 핵산이 구아닌(G)으로부터 티민(T) 또는 시토신(C)으로 변경되거나, 35번째 핵산이 구아닌(G)으로부터 티민(T), 아데닌(A), 및 시토신(C) 중 어느 하나로 변경되거나, 38번째 핵산이 구아닌(G)으로부터 아데닌(A)으로 변경된 것일 수 있다.
- [0014] 상기 표적 핵산 서열은 프로토스페이스 인접 모티프(protospacer adjacent motif: PAM)를 포함할 수 있다. 상기 PAM은 Cas9 뉴클레아제가 특이적으로 인식하는 부위일 수 있다. 상기 PAM은 5'-TGG-3', 5'-TAG-3', 5'-AGG-3', 및 5'-CTG-3'으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 표적 핵산 서열은 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열과 동일하거나 이에 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0016] 용어 "가이드(guide) RNA"는 RNA 편집(editing)을 통해 세포내에서 표적 DNA를 절단, 삽입, 또는 연결시키는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 가이드 RNAsms 단일-사슬 가이드 RNA(single-chain guide RNA: sgRNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 표적 핵산 서열에 특이적인 crRNA(CRISPR RNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 Cas9 뉴클레아제와 상호작용하는 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 더 포함할 수 있다. 상기 tracrRNA는 루프(loop) 구조를 형성하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 길이가 10 뉴클레오티드 내지 30 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 길이가 예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오티드일 수 있다.

- [0017] 상기 가이드 RNA는 서열번호 42 내지 84로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열에서 2개 이상의 연속 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 핵산 서열 중 PAM 서열을 제외한 나머지 핵산 서열에 상보적인 2 이상 연속 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 핵산 서열 중 PAM 서열을 제외한 나머지 핵산 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0018] 상기 가이드 RNA는 RNA, DNA, PNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 가이드RNA는 유전자 가위(programmable nuclease)의 구성요소일 수 있다. 유전자 가위는 유전체 상의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 모든 형태의 뉴클레아제를 말한다. 상기 유전자 가위는 예를 들어, TALEN(transcription activator-like effector nuclease), 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), 메가 뉴클레아제(meganuclease), RGEN(RNA-guided engineered nuclease), Cpf1, 및 아고 상동체(Ago homolog, DNA-guided endonuclease)이다. 상기 RGEN은 표적 DNA에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 구성요소로 포함하는 뉴클레아제를 말한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 RGEN의 구성요소이다.
- [0020] 상기 가이드RNA는 세포의 유전체에서 비상동성 말단-접합(non-homologous end-joining: NHEJ)에 의해 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거할 수 있다.
- [0021] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드RNA를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0022] 상기 벡터는 바이러스성 벡터일 수 있다. 상기 바이러스성 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스(adeno-associated viral: AAV)일 수 있다. 상기 벡터는 발현용 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible) 발현 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 패키징 신호, RRV(rev response element), WPRE(우드척(woodchuck) 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element)), cPPT(central polypurine tract), 프로모터, 항생제 저항성 유전자, 오퍼레이터, 억제자, T2A 펩티드, 리포터 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 U6 폴리머라제 III 프로모터, 신장 인자 1α 프로모터, H1 프로모터, 사이토메갈로바이러스의 프로모터, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 항생제 저항성 유전자는 퓨로마이신 저항성 유전자, 블라스티시딘 저항성 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 억제자는 테트라사이클린 오퍼레이터일 수 있다. 상기 리포터 유전자는 증강된(Enhanced) 녹색 형광 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0023] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합을 포함하는, 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 가이드RNA, 벡터, KRAS 폴리펩티드, 및 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 전술한 바와 같다.
- [0025] 상기 세포는 암세포, 줄기세포, 혈관내피 세포, 백혈구, 면역 세포, 상피 세포, 생식 세포, 섬유아세포, 근육 세포, 골수 세포, 표피 세포, 골아세포, 및 신경세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0026] 상기 "제거"는 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 변경됨으로써 KRAS 폴리펩티드의 기능이 없어지거나 감소되는 모든 변형을 말한다. 용어 "제거"는 "돌연변이"와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 제거 또는 돌연변이는 예를 들어 결실, 치환, 삽입, 또는 프레임 시프트 돌연변이일 수 있다.
- [0027] 상기 조성물은 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo) 투여용일 수 있다.
- [0028] 상기 조성물은 Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 CRISPR/Cas 시스템의 단백질 구성 요소 중 하나로서, 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 닉(nick) 형성 효소일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)와 복합체를 형성하여 그의 활성을 나타낼 수 있다.
- [0029] 상기 Cas 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 스트렙토코커스 속(예, Streptococcus pyogenes), 네이세리아 속(예, Neisseria meningitidis), 파스테우렐라 속(예, Pasteurella multocida), 프란시셀라 속(예, Francisella novicida), 또는 캄필로박터 속(예, Campylobacter jejuni)의 세균으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 GenBank Accession No. Q99ZW2.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 GenBank Accession No. KT031982.1의 핵산 서열로부터 암호화되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0030] 상기 Cas 폴리펩티드는 야생형 Cas 폴리펩티드, 또는 돌연변이 Cas 폴리펩티드일 수 있다. 상기 돌연변이 Cas 폴리펩티드는 예를 들어 촉매적 아스파라긴산 잔기(catalytic aspartate residue)가 다른 아미노산(예, 알라닌)으로 변경된 폴리펩티드일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 재조합 단백질일 수 있다.
- [0031] 상기 Cas 폴리펩티드는 Cas9 폴리펩티드 또는 Cpf1 폴리펩티드일 수 있다.
- [0032] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 상기 가이드RNA 및 벡터는 전술한 바와 같다.
- [0034] 상기 암은 원발성 종양 또는 전이성 종양일 수 있다. 상기 암은 예를 들어 췌장암, 대장암, 폐암, 유방암, 피부암, 두경부암, 결장직장암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병(Hodgkin's Disease), 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0035] 상기 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0036] 상기 약학적 조성물은 Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다. 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합과 제2 폴리뉴클레오티드는 단일 조성물 또는 별개의 조성물일 수 있다.
- [0037] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 풍미제, 유화제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들면, 경구 투여 제형(예, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 알약, 또는 과립), 또는 비경구 제형(예, 주사제)으로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 진신 제형 또는 국부 제형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 피하, 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다.
- [0039] 상기 약학적 조성물은 일 양상에 따른 가이드RNA, 벡터 또는 이들의 조합을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 유효한 양은 당업자가 선택되는 세포 또는 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 사용된 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 0.1 μg 내지 약 2 g, 약 0.5 μg 내지 약 1 g, 약 1 μg 내지 약 500 mg, 약 10 μg 내지 약 100 mg, 또는 약 100 μg 내지 약 50 mg일 수 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.
- [0041] 다른 양상은 세포와 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합을 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 세포의 유전체로부터 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이시키는 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 가이드RNA, 벡터, 세포, KRAS 폴리펩티드, KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 돌연변이는 전술

한 바와 같다.

- [0043] 상기 인큐베이션은 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다.
- [0044] 상기 방법은 상기 세포와 Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드와 인큐베이션하는 제2 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 단계는 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합을 인큐베이션하는 단계와 동시, 그 이전, 또는 그 이후에 수행될 수 있다.
- [0045] 다른 양상은 개체에 일 양상에 따른 가이드RNA, 일 양상에 따른 벡터, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 개체는 돌연변이 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전체를 갖는 개체일 수 있다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 암을 앓거나 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.
- [0047] 상기 가이드RNA, 벡터 또는 이들의 조합은 경구, 정맥내, 근육내, 경구, 경피, 점막, 코안, 기관내 또는 피하 투여될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 이들의 조합의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0048] 일 양상에 따른 가이드RNA, 이를 포함한 벡터, 이를 포함한 세포의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거하기 위한 조성물, 이를 포함한 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이들을 이용한 방법에 따르면, 세포 또는 개체의 유전체에서 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이시킬 수 있고, 특히 맞춤형요 또는 정밀의료로서, 암을 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1a는 인간 유전체에서 암 발생과 강하게 연관된 KRAS 돌연변이를 나타내는 모식도이고, 도 1b는 대용 NHEJ 리포터 시스템을 나타내는 모식도이고, 도 1c는 제조된 대용 NHEJ 리포터 시스템의 작용 메카니즘을 나타내는 모식도이다.
- 도 2a 내지 도 2f는 mRFP 만을 발현하는 세포의 수에 대한 mRFP 및 eGFP 모두를 발현하는 세포의 백분율(%)을 나타내는 그래프(왼쪽) 및 각 가이드 RNA의 표적 서열이다(오른쪽).
- 도 3은 내재적 표적 KRAS 서열에서 삽입/결실 빈도를 심층(deep) 염기서열분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4a 내지 도 4c는 암세포를 Cas9-암호화 렌티바이러스 벡터 및 가이드 RNA-암호화 벡터로 순차적으로 형질전환시킨 후, 형질전환된 세포를 각각 콜로니 형성 분석법, 연한천(soft agar) 분석법, 및 MTS 분석법으로 분석한 결과를 나타내는 이미지 및 그래프이다.
- 도 5a 내지 도 5c는 암세포를 Cas9-암호화 렌티바이러스 벡터 및 가이드 RNA-암호화 벡터로 순차적으로 형질전환시킨 후 누드 마우스에 상기 암세포를 이식한 경우, 35T9P17 가이드 RNA 발현에 따른 종양의 크기 및 중량을 측정된 결과를 나타내는 이미지 및 그래프이다.
- 도 6은 누드 마우스에 암세포 또는 일반 세포주를 이식한 후, Cas9-암호화 렌티바이러스 벡터 및 가이드 RNA-암호화 벡터를 종양 내 주사한 경우, 35T9P17 가이드 RNA 발현에 따른 종양의 부피(mm³) 및 중량(g)의 그래프, 및 종양의 이미지이다.
- 도 7은 누드 마우스에 암세포 또는 일반 세포주를 이식한 후, Cas9-암호화 AAV 벡터 및 가이드 RNA-암호화 벡터를 종양 내 주사한 경우, 35T9P17 가이드 RNA 발현에 따른 종양의 부피(mm³) 및 중량(g)의 그래프, 및 종양의 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명

하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051]

실시예 1. 가이드 RNA의 스크리닝 및 확인

[0052]

1. 표적 KRAS 돌연변이의 선정

[0053]

인간 유전체 상에서 KRAS 유전자는 5개의 엑손을 갖는 것으로 알려져 있다. 인간 유전체에서 암 발생과 강하게 연관된 KRAS 돌연변이를 나타내는 모식도를 도 1a에 나타내었다. 도 1a에서 "E"는 엑손을 나타내고, "E2"는 엑손 2를 나타낸다. 도 1a에 나타낸 바와 같이, KRAS 유전자(GRCh38.p7 (GCF_000001405.33))의 엑손 2에 위치하는 KRAS 점 돌연변이 6개를 표적으로 선정하였다. 선정된 KRAS 점 돌연변이는 c.35G>T (p.G12V), c.35G>A (p.G12D), c.38G>A (p.G13D), c.34G>T (p.G12C), c.34G>C (p.G12R), 및 c.35G>C (p.G12A)이다. 예를 들어, "c.35G>T (p.G12V)"는 KRAS 유전자의 5'-말단으로부터 35번째 핵산이 구아닌(G)에서 티민(T)으로 돌연변이되고, KRAS 단백질의 아미노산 서열에서 N'-말단으로부터 12번째 아미노산이 글리신(G)에서 발린(V)으로 돌연변이된 것을 의미한다.

[0054]

2. 가이드 RNA 선별을 위한 벡터의 제조

[0055]

가이드 RNA를 선별하기 위해, 가이드 RNA 이름을 총 7글자로 명명하였다. 도 2a 내지 도 2f에 각 가이드 RNA의 표적 서열을 나타내었다(오른쪽). 도 2a 내지 도 2f에서 표적 KRAS 돌연변이는 빨간색으로 표시하고, PAM 서열은 파란색으로 표시하였다. 가이드 RNA 이름에서 첫 3글자는 표적 KRAS 돌연변이를 나타내고, 표적 KRAS 돌연변이가 c.35G>T인 경우 "35T"로 기재하였다. 4번째 글자는 PAM에서 돌연변이 위치까지의 거리(bp)를 나타낸다. 5번째 글자는 돌연변이 위치에 대해 상대적인 PAM의 위치를 나타내고, 돌연변이 위치가 PAM의 왼쪽에 위치하면 P(plus)로 표기하고, 돌연변이 위치가 PAM의 오른쪽에 있으면 M(minus)로 표기하였다. 6번째 및 7번째 글자는 PAM 서열을 제외한 가이드 RNA의 길이(bp)를 나타낸다. 예를 들어, "35T9P17"은 KRAS 돌연변이 c.35G>T를 표적으로 하고, 돌연변이 위치에서 PAM까지의 거리는 9 bp이고, 돌연변이는 PAM의 왼쪽에 위치하고, PAM 서열을 제외한 가이드 RNA의 길이는 17 bp임을 의미한다. 가이드 RNA는 표적 서열에서 PAM 서열을 제외한 나머지 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖도록 디자인하였다.

[0056]

가이드 RNA(sgRNA)의 활성을 평가하기 위해, 대용 NHEJ 리포터 시스템을 이용하였다(Kim, H. et al., Nature methods, vol.8, pp.941-943, 2011; 및 Nature communications, vol.5, p.3378, 2014). 사용된 대용 NHEJ 리포터 시스템의 모식도를 도 1b에 나타내었다. 도 1b에서, "렌티_gRNA-퓨로"는 구성적으로(constitutive) 가이드 RNA(guide RNA: sgRNA)를 발현시키는 렌티바이러스 벡터를 나타내고, "렌티_gRNA-독시-유도성_GFP"는 독시사이클린의 존재에 따라 가이드 RNA의 발현이 유도되는 유도성 렌티바이러스 벡터를 나타내고, 및 렌티_SpCas9-Blast는 Cas9 뉴클레아제를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 나타낸다(Psi: 패키징 신호, RRE: rev 반응 요소, WPRE: 우드척(woodchuck) 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element), cPPT: 센트랄 폴리퓨린 트랙(central polypurine tract), U6: 폴리머라제 III 프로모터, gRNA: 가이드 RNA, EF1 α : 신장 인자 1a 프로모터, PuroR: 퓨로마이신 저항성 유전자, H1: H1 프로모터, TetO: 테트라사이클린 오퍼레이터, Ub: 유비퀴틴 프로모터, TetR: 테트라사이클린 억제자, T2A: T2A 펩티드; EGFP: 증강된(Enhanced) 녹색 형광 단백질, CMV: 사이토메갈로바이러스의 프로모터, BlastR: 블라스티딘 저항성 유전자).

[0057]

제조된 대용 NHEJ 리포터 시스템의 작용 메커니즘을 도 1c에 나타내었다. 도 1c에 나타낸 바와 같이, 모노머 적색 형광 단백질(mRFP)가 CMV 프로모터(P_{CMV})에 의해 구성적으로 발현되고, 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP)은 프레임이 맞지 않는 서열이기 때문에 CRISPR/Cas9 활성이 없으면 발현되지 않는다. CRISPR/Cas9에 의해 이중가닥 절단이 표적 서열에 도입되면, 이 절단은 오류-유발(error-prone) 비상동적 말단 접합에 의해 수선되고, 삽입/결실(indel) 부위를 형성하게 된다. 삽입/결실은 2개의 eGFP 유전자의 프레임-시프트를 야기하여 eGFP의 발현을 일으키게 된다.

[0058]

3. 가이드 RNA의 스크리닝

[0059]

표적 KRAS 돌연변이를 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 선별하기 위해, 야생형 KRAS 서열 또는 돌연변이 KRAS 서열을 포함하는 리포터 플라스미드, Cas9을 암호화하는 플라스미드, 및 가이드 RNA를 암호화하는 플라스미드를 HEK293T 세포에 공-형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 유세포 분석법으로 분석하고, mRFP 만을 발현하는 세포의 수에 대해 정규화하여 mRFP 및 eGFP 모두를 발현하는 세포의 백분율을 결정하였고, 그 결과를 도 2a 내지 도 2f에 나타내었다. 이 비율은 표적 서열에 대한 가이드 RNA의 활성을 나타낸다. 도 2a 내지 도 2f에서, 검은색 선 및 빨간색 선은 돌연변이 KRAS 서열 대 야생형 KRAS 서열에 대해 eGFP+mRFP+/eGFP+ 세포의 비가 각각 1 및 3 임을 나타낸다. 각 가이드 RNA의 표적 서열을 오른쪽에 나타내었고, KRAS 점 돌연변이 부위를 빨간색 글자로 표

시하고, PAM(protospacer adjacent motif)을 파란색 글자로 표시하였다.

[0060] 도 2a 내지 도 2f의 오른쪽 그래프에 나타난 바와 같이, 일부 가이드 RNA는 돌연변이 KRAS 서열에 대해 높은 GFP 발현을 나타내고 야생형 KRAS 서열에 대해 낮은 GFP 발현을 나타내어, 이들이 돌연변이 KRAS 서열에 특이적인 가이드 RNA임을 확인하였다. 1차로 선별된 가이드 RNA를 도 2a 내지 도 2f의 그래프에서 검은색 화살표로 표시하였다. 돌연변이 KRAS에 대해 높은 선택성을 갖는 2개의 가이드 RNA(35T9P17 및 38A6P17) 및 낮은 선택성을 갖는 1개의 가이드 RNA(35A9P17)를 2차로 선별하고, 도 2a 내지 도 2f에 굵은 글씨로 표시하였다.

[0061] **4. 선별된 가이드 RNA의 기능 검증**

[0062] 3.에서 선별된 가이드 RNA가 내재적 표적 KRAS 서열에 대해 기능을 하는지 여부를 확인하기 위해, KRAS 돌연변이를 갖는 암세포를 Cas9 및 상응하는 가이드 RNA를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질전환시켰다.

[0063] 암세포로 SW403(이형(heterozygous) c.35G>T 돌연변이), SW480(동형(homozygous) c.35G>T 돌연변이), SW620(동형 c.35G>T 돌연변이), LS513(이형 c.35G>A 돌연변이), LoVo(이형 c.38G>A 돌연변이), 및 HT29 세포주(야생형 KRAS)를 사용하였다. 내재적 표적 KRAS 서열에서 삽입/결실 빈도를 심층(deep) 염기서열분석에 의해 평가하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 a 내지 f는 삽입/결실 빈도를 나타내는 그래프이고(오차 막대: 표준 평균 오차, "untreated": 가이드 RNA 미처리), g는 평균 서열 빈도를 나타내는 그래프이다(빨간색; 삽입/결실, 녹색: 야생형 KRAS, 보라색: 돌연변이 KRAS).

[0064] 도 3에 나타난 바와 같이, Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA의 형질전환은 SW403 세포에서 50%, SW480 및 SW620에서 각각 81% 및 80%의 삽입/결실 빈도를 나타내었다. 또한, Cas9 및 35A9P17의 형질 전환은 LS51336에서 36%의 삽입/결실 빈도를 나타내고, Cas9 및 38A6P17의 형질전환은 LoVo에서 28%의 삽입/결실 빈도를 나타낸다. 이 가이드 RNA들이 HT29 세포에 형질전환된 경우, 35T9P17에 대해 0.2%, 35A9P17에 대해 77%, 및 38A6P17에 대해 0.3%의 삽입/결실 빈도로 나타나(도 2f), 35A9P17은 야생형 KRAS 서열에 특이도가 높고 35T9P17 및 38A6P17은 돌연변이 KRAS 서열에 특이도가 높다는 것을 확인하였다.

[0065] **5. 암세포에서 돌연변이 KRAS 서열의 제거에 의한 효과의 확인**

[0066] 선별된 가이드 RNA를 이용하여 암세포의 돌연변이 KRAS 서열을 제거한 경우, 암세포의 생존, 증식, 및 발암성에 대한 효과를 확인하였다.

[0067] 암세포를 Cas9-암호화 렌티바이러스 벡터((Addgene #52962)로 형질전환한 후, 가이드 RNA-암호화 벡터(Addgene #52961)로 형질전환시켰다. 음성 대조군으로서 활성이 없고 서열이 완전히 상이한 가이드 RNA를 사용하였다.

[0068] 형질전환된 세포를 콜로니 형성 분석법, 연한천(soft agar) 분석법, 및 MTS 분석법으로 분석하고, 그 결과를 각각 도 4a 내지 도 4c에 나타내었다(오차 막대: 표준 평균 오차, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, "Mock": 음성 대조군).

[0069] 도 4a의 a 내지 d에서 위의 이미지는 2% 크리스탈 바이올렛 염색 후 웰의 이미지를 나타내고, 도 4b의 e 내지 h에서 위의 이미지는 형성된 콜로니의 이미지이다(막대 눈금= 100 μm).

[0070] 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, SW403 세포에서 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA의 발현은 콜로니 형성 분석법 및 연한천 분석법에서 콜로니의 수를 각각 94% 및 70% 감소시켰고, SW480 및 SW620 세포에서도 유사한 결과가 확인되었다. 또한, LS513 세포에서 Cas9 및 35A9P17 가이드 RNA의 발현은 콜로니 형성 분석법 및 연한천 분석법에서 콜로니의 수를 각각 91% 및 96% 감소시켰다. 한편, 암세포에서 Cas9 및 38A6P17 가이드 RNA의 발현은 콜로니 형성 분석법 및 연한천 분석법에서 콜로니의 수를 감소시켰지만 각각 25% 및 61%에 불과하였다. 따라서, 38A6P17 가이드 RNA는 KRAS 돌연변이 암세포의 생존 및 발암성을 부분적으로만 저해하지만, 35T9P17 및 35A9P17 가이드 RNA는 암세포의 생존 및 발암성을 현저하게 저해할 수 있음을 확인하였다. 가이드 RNA를 독시사이클린-유도성 방법으로 발현시킨 경우에도 유사한 결과가 나타났다.

[0071] MTS 세포 증식 분석법을 이용하여 세포 증식에 대한 Cas9 및 가이드 RNA의 효과를 평가하였다. 암세포를 Cas9 및 가이드 RNA로 형질전환하고, 다음날 살아있는 세포를 계수하였다. 시료 당 5000개의 세포를 96 웰 플레이트에 접종하고, 형질전환되지 않은 세포를 프로마이신 선별법으로 24 시간 동안 제거하였다. 접종 후, MTS 시약을 가하고 48 시간 동안 인큐베이션하여 세포 증식을 결정하였다. MTS 반응을 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 측정된 흡광도를 음성 대조군의 흡광도에 대해 정규화하였다. 음성 대조군 가이드 RNA로 형질전환된 세포의 수에 대한 가이드 RNA로 형질전환된 세포의 상대적인 비를 산출하고, 그 결과를 도 3c에 나타내었다. 도 3c에 나타난 바와 같이, SW403, SW480, 및 SW620 세포에서 Cas9 및 35T9P17 RNA를 발현하는 세포 중 살아있는 세포

의 비는 각각 평균 0.34, 0.46, 및 0.71이었다. 한편, HT29 세포에서 Cas9 및 가이드 RNA의 발현은 MTS 세포 증식 분석법에서 세포의 수에 영향을 미치지 않았다. 따라서, Cas9 및 가이드 RNA를 이용한 돌연변이 KRAS를 제거하면 암세포의 증식 또는 생존은 저해되지만, 야생형 KRAS 서열을 갖는 세포의 증식 또는 생존은 저해되지 않음을 확인하였다.

[0072] 6. 생체 내에서 돌연변이 KRAS 서열의 제거에 의한 효과의 확인

[0073] 선별된 가이드 RNA가 생체 내에서 종양의 성장을 억제할 수 있는지를 확인하였다.

[0074] Cas9-발현 SW403 세포를 렌티바이러스 벡터로 형질전환시키고, 그 후 35T9P17 가이드 RNA를 독시사이클린 유도성으로 발현하는 렌티바이러스 벡터로 형질전환시켰다. 순차로 형질전환된 암세포를 누드 마우스에 피하로 이식하고, 14일 동안 종양 형성을 유도하였다. 그 후, 독시사이클린을 마우스에 투여하여 종양 세포에서 35T9P17 가이드 RNA 발현을 유도하였다. 암세포의 이식 후 35T9P17 가이드 RNA 발현에 따른 종양의 크기 및 중량을 측정하고 그 결과를 도 5a 내지 도 5c에 나타내었다(도 5a 및 도 5b의 그래프에서, 빨간색 선: 독시사이클린을 투여하지 않음, 파란색 선: 독시사이클린을 투여함, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001).

[0075] 도 5a 내지 도 5c에 나타난 바와 같이 35T9P17 가이드 RNA의 발현은 야생형 KRAS 서열을 갖는 세포가 주사된 마우스에서는 종양의 크기에 영향이 없었지만, 돌연변이 KRAS 서열을 갖는 세포가 주사된 마우스에서는 종양 성장을 유의하게 저해하고 종양의 중량을 감소시켰다. 따라서, CRISPR-Cas9으로 돌연변이 KRAS를 표적화하는 방법을 이용하면 생체 내에서 종양 성장을 조절할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0076] 7. 돌연변이 KRAS를 표적으로 하는 Cas9 및 가이드 RNA의 종양 내 전달

[0077] (1) 렌티바이러스 벡터의 사용

[0078] 실시예 1.6의 경우 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA가 형질전환된 암세포를 누드 마우스에 이식하여 종양 형성을 유도하여, 항암 효과를 확인하였다. 더 나아가, 종양 세포에 대해 외부에서 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA를 주입한 경우에도 항암 효과가 있는지 여부를 확인하였다.

[0079] 5주령의 흉선이 제거된 수컷 BALB/c 누드 마우스를 준비하였다. 준비된 누드 마우스의 옆구리에(각 군 당 6 마리) 2×10^6 세포의 KRAS c.35G>T 돌연변이를 함유한 SW403 암세포를 피하 주사하고, 그 후 종양이 형성하도록 2주 이상 두었다. 한편, 비교군으로, 야생형 KRAS를 함유한 HT29 세포주를 흉선이 제거된 마우스에 피하 주사하였다.

[0080] 암세포에 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA를 전달하기 위해, 마우스의 종양내에 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA를 발현하는 렌티바이러스($50 \mu\text{l}$ PBS 중 1×10^8 TU 렌티바이러스)를 인슐린 주사기(BD Biosciences, 31 게이지)를 사용하여 3일 간격으로 3회 주사하였다. 음성 대조군으로 Cas9만을 발현하는 렌티바이러스를 종양내 주사한 마우스를 사용하였다. 그 후 캘리퍼를 사용하여 3일 마다 종양의 크기를 측정하였다. 암세포 주사 후 5주에 마우스를 희생시키고, 마우스에서 종양 조직을 절제하였다.

[0081] 절제된 종양 조직의 부피(mm^3), 중량(g), 및 이미지를 도 6에 나타내었다(a 내지 c: SW403 암세포 이식, d 내지 f: HT29 세포주 이식, 오차 막대: 측정 표준 오차, sgRNA: 35T9P17 가이드 RNA, 검정색 삼각형: 렌티바이러스 주입시, ***: p<0.001, ns: 유의하지 않음(not significant), 적색 막대: 1 cm).

[0082] 도 6에 나타난 바와 같이, Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA를 발현하는 렌티바이러스를 종양내 주사한 경우 종양의 성장이 저해되었다. 이에 반해, 음성 대조군은 암의 성장이 왕성하였다. 돌연변이 KRAS를 함유하지 않는 암세포를 사용하여 생성된 종양에 Cas9 및 35T9P17 가이드 RNA를 전달한 경우는 종양 성장에 영향이 없었고, 이는 Cas9만을 발현하는 렌티바이러스로 주사한 경우와 유사하였다.

[0083] 따라서, 35T9P17 가이드 RNA는 KRAS c.35G>T 돌연변이를 함유한 암세포에 대해 특이성이 있고, 종양 세포에 대해 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외부에서 유전자가위를 주입한 경우에도 항암 효과가 있다는 것을 확인하였다.

[0084] (2) 아데노-관련 바이러스 벡터의 사용

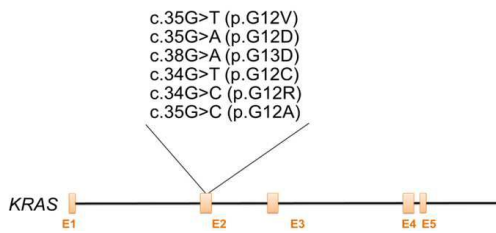
[0085] 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viral: AAV) 벡터를 사용한 경우에도 렌티바이러스와 유사한 효과가 나타나는지 여부를 확인하기 위해, PX552 벡터(Addgene #60958)에 35T9P17 가이드 RNA를 클로닝하였다. Cas9 전달을 위해서는 미니CMV-Cas9-shortPolyA 플라스미드(독일, 하이델베르크 대학 병원, Dr. Dirk Grimm 제공)를

사용하였다.

- [0086] 35T9P17 가이드 RNA를 포함한 AAV 벡터와 미니CMV-Cas9-shortPolyA 플라스미드를 pAAV-RC2(Cell Biolabs, VPK-402) 및 헬퍼 DNA (Cell Biolabs, VPK-402)와 함께 HEK293T 세포에 공형질감염하고, 그후 약 48 시간 동안 배양된 세포로부터 바이러스 함유 상층액을 수득하였다. 수득된 AAV 벡터(50 μ l PBS 중 1×10^{12} gc/ml AAV)를 렌티 바이러스와 마찬가지로 홍선이 제거된 누드 마우스의 종양 내에 주사하였다. 음성 대조군으로 녹색 형광 단백질 (GFP)만을 암호화하는 AAV 벡터를 사용하였다. 캘리퍼를 사용하여 2일 마다 종양의 크기를 측정하였다. AAV 주사 후 12일에 마우스를 희생시키고, 마우스에서 종양 조직을 절제하였다.
- [0087] 절제된 종양 조직의 부피(mm³), 중량(g), 및 이미지를 도 7에 나타내었다(a 내지 c: SW403 암세포 이식, 오차 막대: 측정 표준 오차, sgRNA: 35T9P17 가이드 RNA, 검정색 삼각형: AAV 주입시, **: p<0.01, *: p<0.1, 적색 막대: 1 cm).
- [0088] 도 7에 나타난 바와 같이, AAV를 사용한 경우에도, 렌티바이러스를 이용한 경우보다 적은 경우이긴 하지만, 종양 성장을 유의하게 조절하였다.
- [0089] 따라서, 바이러스 벡터의 종류에 상관없이, 종양 세포에 대해 외부에서 유전자가위를 주입한 경우에 항암 효과가 있다는 것을 확인하였다.

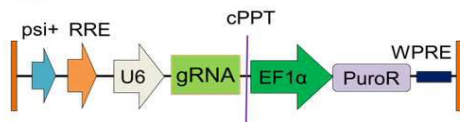
도면

도면1a

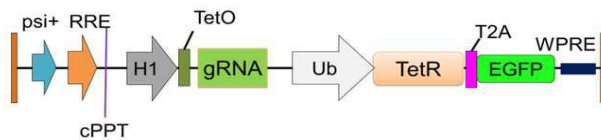


도면1b

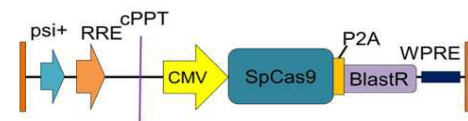
렌티_gRNA-퓨로



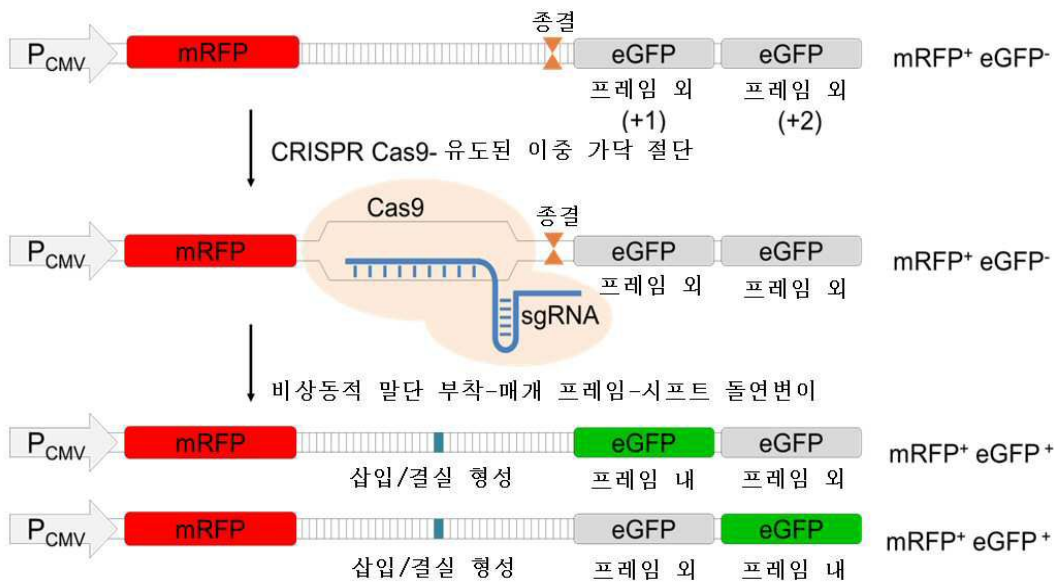
렌티_gRNA-독시-유도성_GFP



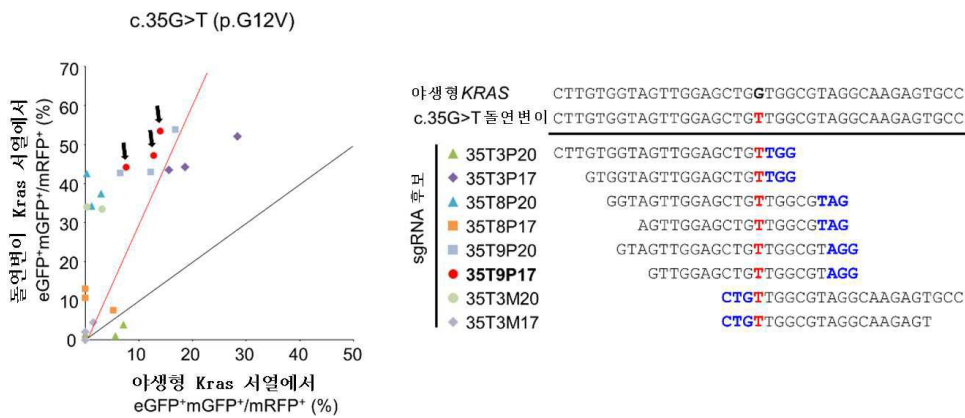
렌티_SpCas9-Blast



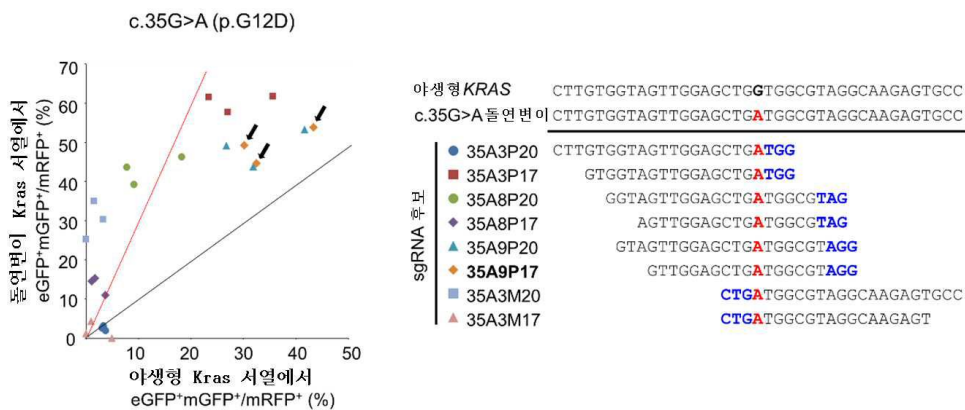
도면1c



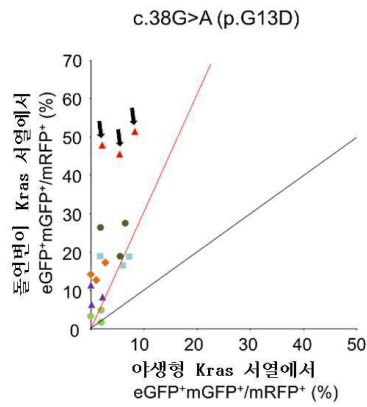
도면2a



도면2b



도면2c

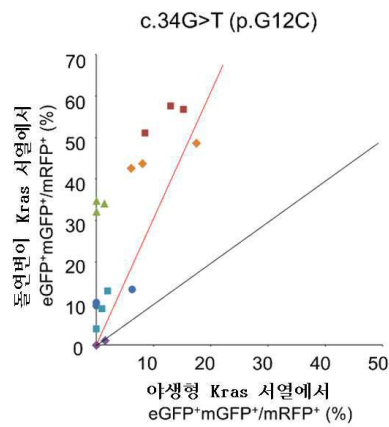


야생형 KRAS CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC
 c.38G>A 돌연변이 CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGT**AC**GTAGGCAAGAGTGCC

Candidate sgRNAs

- ▲ 38A6P20 GTAGTTGGAGCTGGT**AC**G**TAGG**
- ▲ 38A6P17 GTTGGAGCTGGT**AC**G**TAGG**
- 38A5P20 GGTAGTTGGAGCTGGT**AC**G**TAG**
- ◆ 38A5P17 AGTTGGAGCTGGT**AC**G**TAG**
- 38A6M20 **CTG**GT**CA**CGTAGGCAAGAGTGCC
- 38A6M17 **CTG**GT**CA**CGTAGGCAAGAGT

도면2d

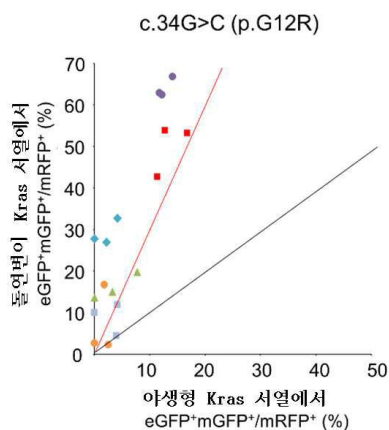


야생형 KRAS CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
 c.34G>T 돌연변이 CTTGTGGTAGTTGGAGCT**T**GTTGGCGTAGG

sgRNA 후보

- 34T4P20 CTTGTGGTAGTTGGAGCT**T**G**TGG**
- 34T4P17 GTGGTAGTTGGAGCT**T**G**TGG**
- ▲ 34T9P20 GGTAGTTGGAGCT**T**GTTGGCG**TAG**
- ◆ 34T9P17 AGTTGGAGCT**T**GTTGGCG**TAG**
- 34T10P20 GTAGTTGGAGCT**T**GTTGGCG**TAGG**
- ◆ 34T10P17 GTTGGAGCT**T**GTTGGCG**TAGG**

도면2e

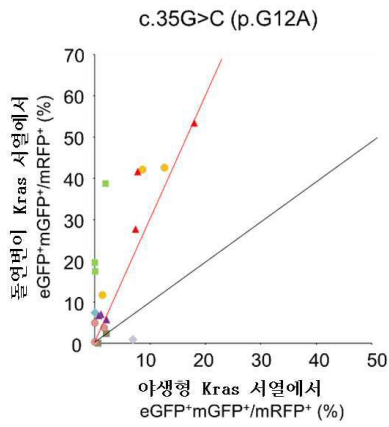


야생형 KRAS CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
 c.34G>C 돌연변이 CTTGTGGTAGTTGGAGCT**CG**TGGCGTAGG

sgRNA 후보

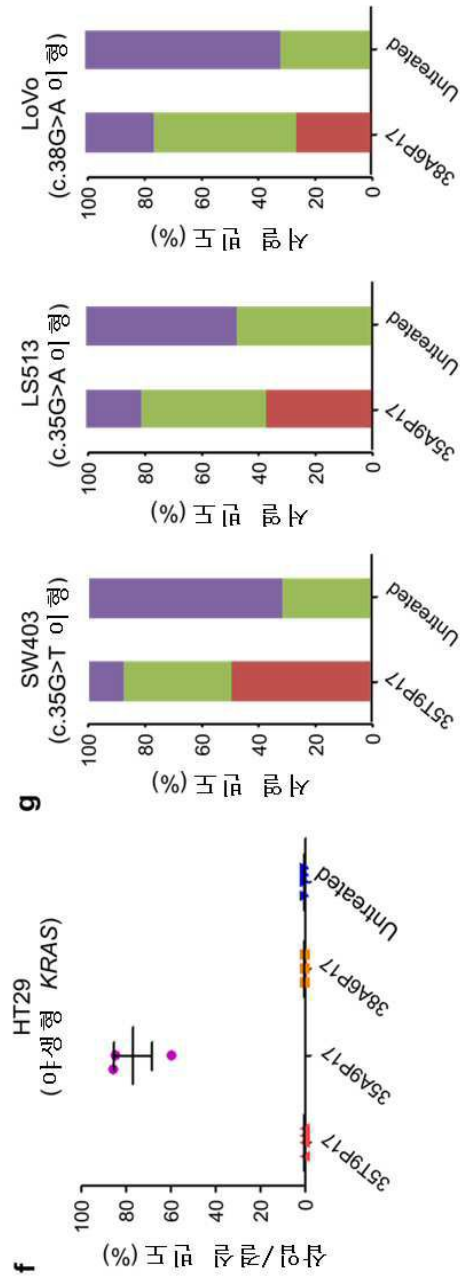
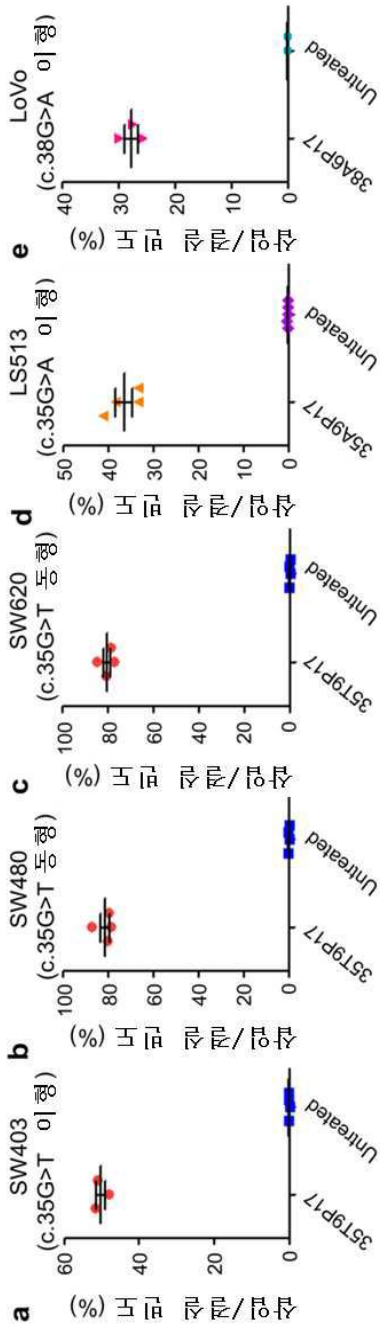
- ▲ 34C4P20 CTTGTGGTAGTTGGAGCT**CG**T**G**G
- 34C4P17 GTGGTAGTTGGAGCT**CG**T**G**G
- ◆ 34C9P20 GGTAGTTGGAGCT**CG**TGGCG**TAG**
- ◆ 34C9P17 AGTTGGAGCT**CG**TGGCG**TAG**
- 34C10P20 GTAGTTGGAGCT**CG**TGGCG**TAGG**
- 34C10P17 GTTGGAGCT**CG**TGGCG**TAGG**

도면2f

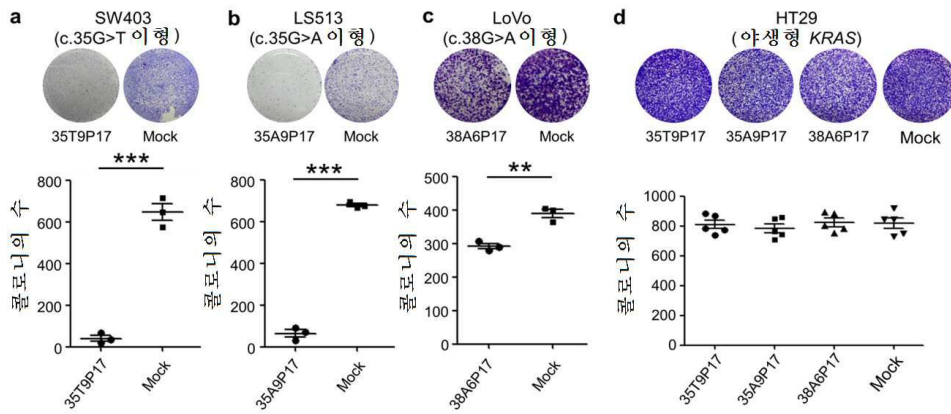


야생형 KRAS	CTTGTGGTAGTTGGAGCTG GT GGCGTAGGCAAGAGTGCC
c.35G>C 돌연변이	CTTGTGGTAGTTGGAGCTG CT GGCGTAGGCAAGAGTGCC
sgRNA 후보	
35C3M20	CTG CT GGCGTAGGCAAGAGTGCC
35C3M17	CTG CT GGCGTAGGCAAGAGT
35C3P20	CTTGTGGTAGTTGGAGCTG CTGG
35C3P17	GTGGTAGTTGGAGCTG CTGG
35C8P20	GGTAGTTGGAGCTG CTGGCGTAG
35C8P17	AGTTGGAGCTG CTGGCGTAG
35C9P20	GTAGTTGGAGCTG CTGGCGTAGG
35C9P17	GTTGGAGCTG CTGGCGTAGG

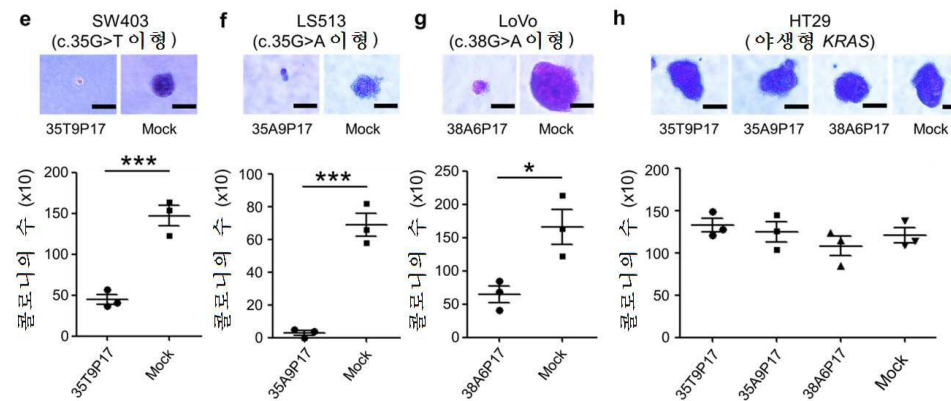
도면3



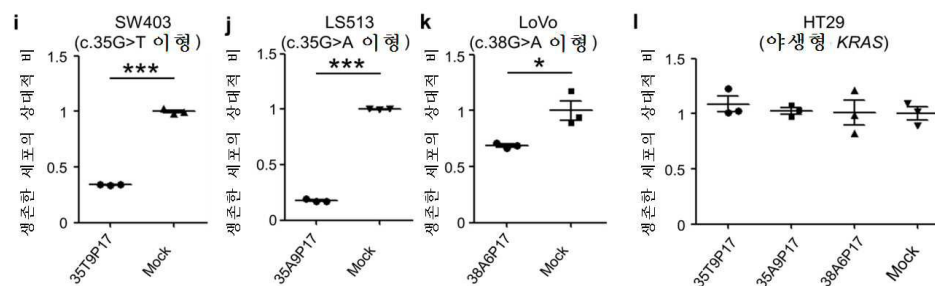
도면4a



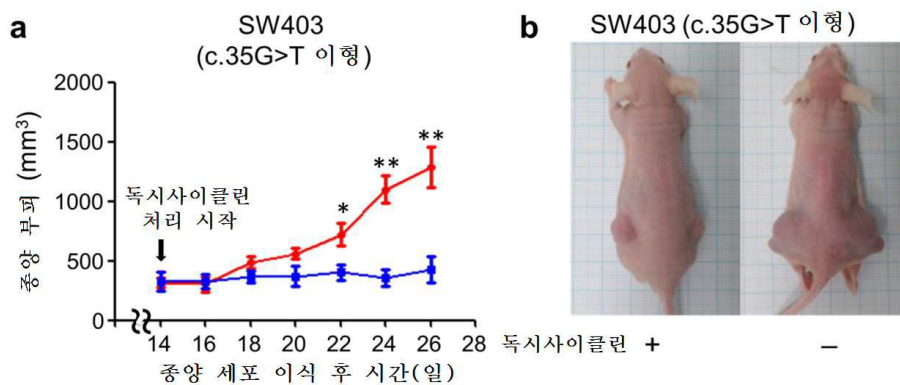
도면4b



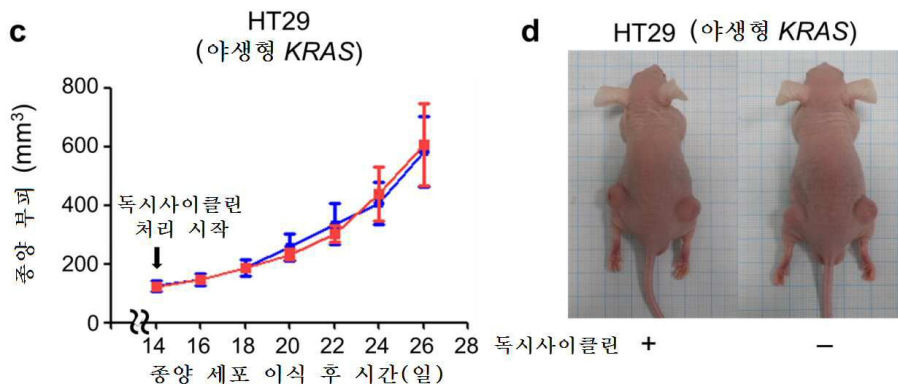
도면4c



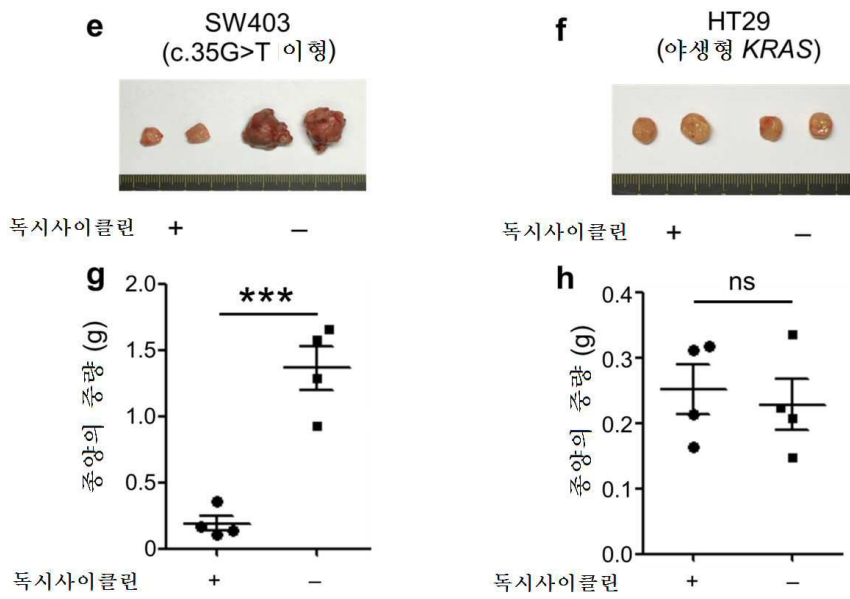
도면5a



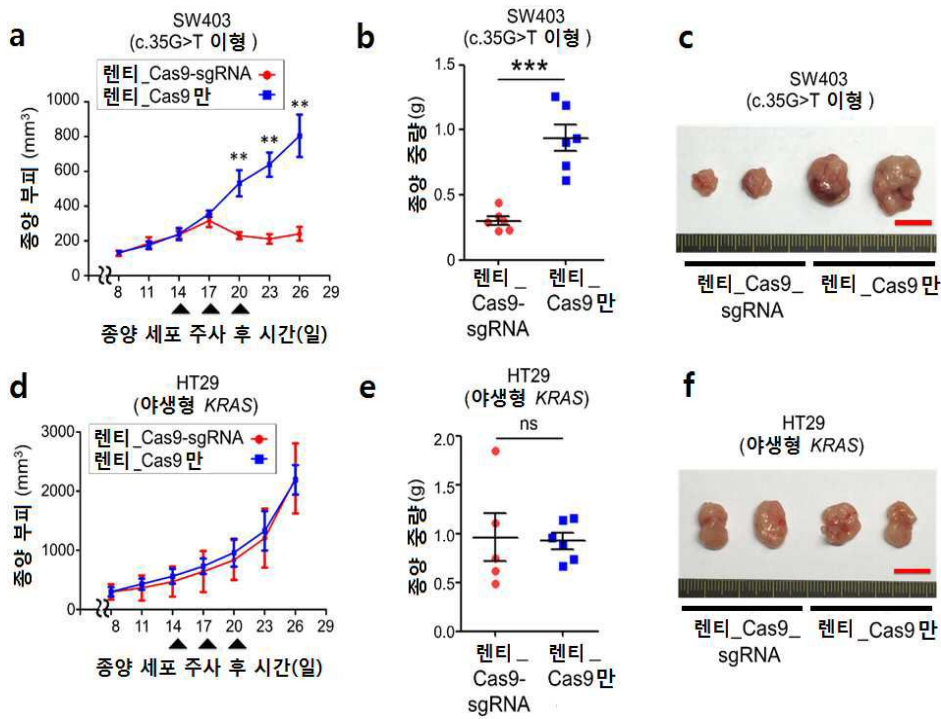
도면5b



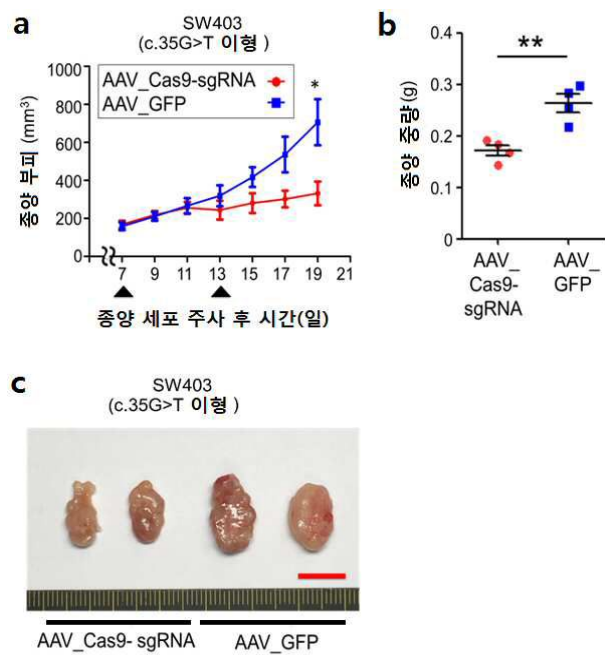
도면5c



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Guide RNA complementary to KRAS gene and use thereof
- <130> PN119196KR
- <160> 84
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T3P20
 <400> 1
 cttgtgtag ttgagctgt tgg 23
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T3P17
 <400> 2
 gtgtagttg gagctgttg 20
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T8P20
 <400> 3
 gtagttgga gctgttgcg tag 23
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T8P17
 <400> 4
 agttggagct gttggcgtag 20
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T9P20

<400> 5
 gtagttggag ctgttggcgt agg 23

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T9P17

<400> 6
 gttggagctg ttggcgtagg 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T3M20

<400> 7
 ctgttggcgt aggcaagagt gcc 23

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35T3M17

<400> 8
 ctgttggcgt aggcaagagt 20

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A3P20

<400> 9
 cttgtgtag ttggagctga tgg 23

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A3P17
 <400> 10
 gtggtagttg gagctgatgg 20
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A8P20
 <400> 11
 ggtagttgga gctgatggcg tag 23

 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A8P17
 <400> 12
 agttggagct gatggcgtag 20
 <210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A9P20
 <400> 13
 gtagttggag ctgatggcgt agg 23
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A9P17
 <400> 14
 gttggagctg atggcgtagg 20
 <210> 15

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A3M20
 <400> 15
 ctgatggcgt aggcaagagt gcc 23
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35A3M17
 <400> 16
 ctgatggcgt aggcaagagt 20
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A6P20
 <400> 17
 gtagttggag ctggtgacgt agg 23
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A6P17
 <400> 18
 gttggagctg gtgacgtagg 20
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A5P20
 <400> 19

ggtagttgga gctggtagc tag 23

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A5P17

<400> 20

agttggagct ggtgacgtag 20

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A6M20

<400> 21

ctggtgacgt aggcaagagt gcc 23

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 38A6M17

<400> 22

ctggtgacgt aggcaagagt 20

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T4P20

<400> 23

cttggtag ttggagcttg tgg 23

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T4P17
 <400> 24
 gtggtagtgtg gagcttgtgg 20
 <210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T9P20
 <400> 25
 ggtagtggga gcttgtggcg tag 23
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T9P17
 <400> 26
 agttggagct tgtggcgtag 20
 <210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T10P20
 <400> 27
 gtagttggag cttgtggcgt agg 23
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34T10P17
 <400> 28
 gttggagcctt gtggcgtagg 20
 <210> 29
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C4P20
 <400> 29
 cttgtgtag ttggagctcg tgg 23
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C4P17
 <400> 30
 gtggtagttg gagctcgtgg 20
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C9P20
 <400> 31
 gtagttgga gctcgtggcg tag 23
 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C9P17
 <400> 32
 agttggagct cgtggcgtag 20
 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C10P20
 <400> 33
 gtagttggag ctcgtggcgt agg 23

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 34C10P17
 <400> 34
 gttggagctc gtggcgtagg 20
 <210> 35
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C3M20
 <400> 35
 ctgctggcgt aggcaagagt gcc 23
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C3M17
 <400> 36
 ctgctggcgt aggcaagagt 20
 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C3P20
 <400> 37
 cttgtgtag ttggagctgc tgg 23
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C3P17

<400> 38
 gtggtagttg gagctgctgg 20
 <210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C8P20
 <400> 39
 ggtagttgga gctgctggcg tag 23

 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C8P17
 <400> 40
 agttggagct gctggcgtag 20
 <210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C9P20
 <400> 41
 gtagttggag ctgctggcgt agg 23
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Target KRAS sequence targeted by guide RNA 35C9P17
 <400> 42
 gttggagctg ctggcgtagg 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T3P20
 <400> 43
 cttgtgtag ttggagctgt 20
 <210> 44
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T3P17
 <400> 44
 gtgtagttg gagctgt 17

 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T8P20
 <400> 45
 ggtagttgga gctgttgcg 20
 <210> 46
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T8P17
 <400> 46
 agttggagct gttggcg 17
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T9P20
 <400>
 > 47
 gtagttggag ctgttggcgt 20
 <210> 48

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T9P17
 <400> 48
 gttggagctg ttggcgt 17
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T3M20
 <400> 49
 ttggcgtagg caagagtgcc 20
 <210> 50
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35T3M17
 <400> 50
 ttggcgtagg caagagt 17
 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35A3P20
 <400> 51
 cttgtgtag ttggagctga 20
 <210> 52
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35A3P17
 <400> 52

gtgtagttg gagctga	17
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> guide RNA 35A8P20	
<400> 53	
gtagttgga gctgatggcg	20
<210> 54	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> guide RNA 35A8P17	
<400> 54	
agttggagct gatggcg	17
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> guide RNA 35A9P20	
<400>	
> 55	
gtagttggag ctgatggcgt	20
<210> 56	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> guide RNA 35A9P17	
<400> 56	
gttgagctg atggcgt	17
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> guide RNA 35A3M20
 <400> 57
 atggcgtagg caagagtgcc 20
 <210> 58
 <211> 17

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35A3M17
 <400> 58
 atggcgtagg caagagt 17
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A6P20
 <400> 59
 gtagttggag ctggtgacgt 20
 <210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A6P17
 <400> 60
 gttggagctg gtgacgt 17

 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A5P20
 <400> 61
 ggtagttgga gctggtgacg 20
 <210> 62
 <211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A5P17
 <400> 62
 agttggagct ggtgacg 17
 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A6M20
 <400>
 > 63
 gtgacgtagg caagagtgcc 20
 <210> 64
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 38A6M17
 <400> 64
 gtgacgtagg caagagt 17
 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T4P20
 <400> 65
 cttgtgtag ttggagcttg 20
 <210> 66
 <211> 17

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T4P17
 <400> 66
 gtgtagttg gagcttg 17

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T9P20
 <400> 67
 ggtagttgga gcttgtggcg 20
 <210> 68
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T9P17
 <400> 68
 agttggagct tgtggcg 17

 <210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T10P20
 <400> 69
 gtagttggag cttgtggcgt 20
 <210> 70
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34T10P17
 <400> 70
 gttggagcctt gtggcgt 17
 <210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34C4P20
 <

400> 71
 cttgtggtag ttggagctcg 20
 <210> 72
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34C4P17
 <400> 72
 gtggtagttg gagctcg 17
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34C9P20
 <400> 73
 ggtagttgga gctcgtggcg 20
 <210> 74
 <211>
 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34C9P17
 <400> 74
 agttggagct cgtggcg 17
 <210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 34C10P20
 <400> 75
 gtagttggag ctctggcgt 20
 <210> 76
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA 34C10P17
 <400> 76
 gttggagctc gtggcgt 17

 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C3M20
 <400> 77
 ctggcgtagg caagagtgcc 20
 <210> 78
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C3M17
 <400> 78
 ctggcgtagg caagagt 17
 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C3P20
 <400>
 > 79
 cttgtgtag ttggagctgc 20
 <210> 80
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C3P17
 <400> 80
 gtgtagttg gagctgc 17
 <210> 81
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C8P20
 <400> 81
 ggtagttaga gctgctggcg 20
 <210> 82
 <211> 17

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C8P17
 <400> 82
 agttggagct gctggcg 17
 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C9P20
 <400> 83
 gtagttggag ctgctggcgt 20
 <210> 84
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA 35C9P17
 <400> 84
 gttggagctg ctggcgt 17