



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0074227
(43) 공개일자 2021년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0172888
(22) 출원일자 2020년12월11일
심사청구일자 2020년12월11일
(30) 우선권주장
1020190164837 2019년12월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
채영규
경기도 안산시 상록구 해양1로 11, 604동 603호
(사동, 안산고잔6차푸르지오)
최해인
경기도 안산시 상록구 삼리로 24 (사동, 숲속마을
아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

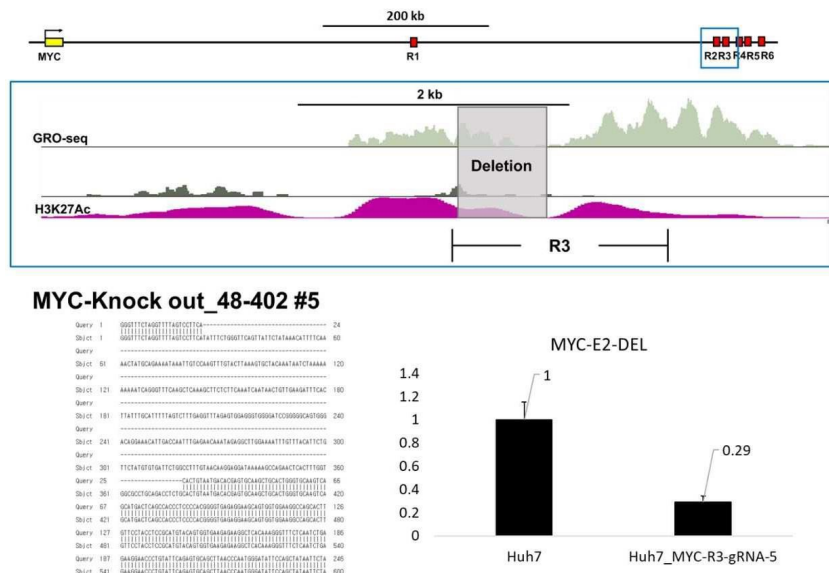
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 MYC 인핸서 결실용 가이드 RNA 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 간암세포에서 MYC 발현을 조절하는 신규 인핸서 영역을 제공하고, 상기 인핸서 영역의 결실을 유도할 수 있는 가이드 RNA를 제공함으로써 암의 진행을 막아, 궁극적으로는 간암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

(72) 발명자

안가영

경기도 안산시 상록구 학사2길 4, 304호 (사동)

김락균

서울특별시 강남구 삼성로57길 42, 202호 (대치동, 라이프라인)

김태수

서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호 (돈암동, 브라운스톤 돈암 아파트)

최선심

강원도 춘천시 영서로 2169, 104동 1604호(퇴계동, 퇴계이안아파트)

이연수

경기도 김포시 김포한강3로 290-16, 802동 401호(장기동, 고창마을 이니스터원)

이용선

경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 402호(마두동, 백마마을1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105267
과제번호	2017M3A9G7073033
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업 원천기술개발사업
연구과제명	eRNomics 기반 간암 특이적 발병기전 연구 및 신규 바이오마커 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.02.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083951
과제번호	2017R1A2B4012905
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비1.5억초과~3억이하)

연구과제명	미세아교세포에서 신경염증 반응 유전자 발현에 관련된 enhancer RNA (eRNA)에 대한
연구	

기 여 율	1/2
과제수행기관명	한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

MYC enhancer Nick아웃용 가이드 RNA(guide RNA: gRNA)로서,
상기 gRNA는 R2 또는 R3 영역을 타겟으로 하는 것을 특징으로 하고,
상기 R2 영역은 서열번호 2의 염기서열로 이루어져 있으며,
상기 R3 영역은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, gRNA.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 gRNA는 서열번호 9 또는 10의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, gRNA.

청구항 3

제1항의 gRNA에 대응하는 DNA 서열 또는 이와 상보적인 서열을 포함하는, 발현벡터.

청구항 4

제3항의 발현벡터 및 Cas9 발현 벡터를 포함하는, MYC enhancer Nick아웃용 조성물.

청구항 5

제3항의 발현벡터 및 Cas9 발현 벡터를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 각 발현벡터는 아데노바이러스에 패키징된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MYC 유전자의 신규 인핸서 영역을 발견하고, 상기 인핸서 영역의 결실을 통해 MYC 유전자 발현 감소와 암세포의 증식능 및 shpere 형성능 감소 효과를 확인하여, MYC 결실용 gRNA를 간암의 예방 또는 치료 용도에 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암을 유발하는 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 요인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0003] 지난 수십 년간 암을 정복하기 위해 세포주기나 세포사멸(apoptosis)의 조절과 발암유전자나 종양억제유전자를 포함하는 새로운 표적을 모색함에 있어서 눈에 띄는 발전을 거듭해 왔음에도 불구하고 암의 발생률은 문명이 발달됨에 따라 증가하고 있다.

[0004] 한편, MYC은 여러 세포의 성장 촉진 신호경로들의 교차지점에 놓여있어서, 여러 리간드-막수용체 복합체들의 하류 유전자에 대해 즉각적으로 반응하여 세포의 성장과 증식을 조절하는 원발암유전자로서, 암세포에서 과발현되는 것이 보고되었다. MYC의 발현은 그 발현 수준이 그 근위 프로모터 부위 내에 있는 여러 전사 조절 모티프가 포함되는 다양한 기전에 의해 정교하게 조절되는데, BET(bromodomain and extraterminal domain protein) 억제제를 통한 MYC 조절 시도가 있었다. BET 억제제로서 JQ1, GSK525762, Birabresib (OTX-015) 및 ABBV-075 등이 보고되었고, JQ1 및 OTX-015는 MYC 발현 감소와 함께 항암효과가 있음이 보고되었으나 그 부작용으로 인해 암 치료에 제한적으로 사용되고 있는 실정이다.

[0005] MYC 유전자의 발현을 조절하는 인핸서 영역은 조직 특이적(tissue-specific)인 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 간암 세포에서 MYC 유전자의 발현을 효과적으로 조절하는 신규 인핸서 영역을 발굴하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Trends Cancer. 2018 December ; 4(12): 810-822 "The MYC enhancer-ome: Long-range transcriptional regulation of MYC"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 간암세포에서 MYC 발현을 조절하는 인핸서 영역을 새롭게 발굴하여 완성된 것으로서, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 상기 인핸서 영역의 결실을 유도할 수 있는 gRNA와 이를 발현하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터가 CRISPR-Cas9 system과 결합한 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 R2 또는 R3 영역을 타겟으로 하는 MYC enhancer Nick아웃용 가이드 RNA(guide RNA: gRNA)를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 R2 영역은 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있고, 상기 R3 영역은 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 gRNA는 상기 R3 영역을 타겟으로 하고, 서열번호 9 또는 10의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 gRNA에 대응하는 DNA 서열 또는 이와 상보적인 DNA 서열을 포함하는, 발현벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 발현벡터는 gRNA와 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 발현벡터는 Cas9 유전자를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 Cas9 유전자는 gRNA와 작동가능하게 연결된 프로모터와 작동가능하게 연결되거나 gRNA와 별도의 프로모터와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터와 Cas9 발현벡터를 포함하는 MYC enhancer Nick아웃용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 발현벡터 및 Cas9 발현벡터를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 간암 세포에서 MYC의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 PVT1의 발현을 억제하지 않는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 암세포의 증식능력 및 sphere 형성능력을 감소시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 간암 세포에서 MYC 발현을 조절하는 강력한 인핸서 영역을 제공하고, 상기 인핸서 영역의 결실을 유도하는 gRNA를 제공함으로써 암의 진행을 막아, 궁극적으로는 간암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 MYC enhancer 후보 영역과 루시페라아제 활성 분석을 통해 확인된 MYC enhancer 영역을 나타낸 도면이다.

도 2는 JQ1, OTX-015, C646 또는 DRB를 처리한 간암세포의 MYC mRNA 발현 수준을 비교확인한 도면이다.

도 3은 JQ1, OTX-015, C646 또는 DRB를 처리한 간암세포에서 MYC enhancer RNA 발현 수준을 비교확인한 도면이다.

도 4는 MYC enhancer R3 영역의 결실 유도를 위한 gRNA 설계와 설계된 gRNA로 R3 enhancer 영역을 결실시킨 세포주를 나타낸 도면이다.

도 5는 R3 enhancer 영역 결실 세포주에서 MYC 발현 감소 및 증식능력 감소를 확인한 도면이다.

도 6은 R3 enhancer 영역 결실이 MYC 유전자의 TAD에 포함된 lncRNA 발현과 MYC에 의해 발현이 조절되는 유전자(FAM49B, CCAT1, 및 IRF2) 발현에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 7은 R3 enhancer 영역 결실 세포주의 sphere 형성능력 감소를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명자들은 부작용 없이 MYC 유전자 발현 감소를 유도하여 암의 치료가 가능한 방법에 대해 예의 연구하여, 간암세포에서 MYC의 발현을 촉진하는 인핸서 영역을 발굴하여, 본 발명을 완성하였다.

[0027] 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 간암세포에서 MYC 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 영역으로 R2 및 R3 영역을 발굴하고, 발굴된 MYC enhancer 영역(R3)을 타겟팅할 수 있는 gRNA를 설계하고, 설계된 gRNA와 CRISPR-Cas9 system을 이용하여 R3 영역이 결실된 세포주를 제작하였다. R3 영역이 결실된 세포주는 MYC mRNA의 발현도 현저하게 감소되었으며, 증식능력과 sphere 형성능이 현저하게 감소하였음을 확인하였다.

[0028] 이에, 본 발명은 MYC R2 또는 R3 enhancer 영역을 타겟팅하는 gRNA와, 상기 gRNA를 발현하는 발현벡터 및 상기 발현벡터와 CRISPR-Cas9 system 이 결부된 MYC enhancer Nick아웃용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 MYC enhancer Nick아웃용 조성물은 숙주세포에 형질감염될 수 있도록 바이러스 벡터로 패키징 될 수 있으며, 상기 바이러스 벡터에 패키징된 MYC enhancer Nick아웃용 조성물은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제공될 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 '항암'은 간암세포의 증식을 억제하거나 사멸하는 작용 및 간암세포의 전이를 억제하거나 차단하는 작용을 의미하는 것으로, 간암의 예방 및 치료 모두를 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 '예방'은 조성물의 투여로 암 형성을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하는 것이며, '치료'란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하는 것이다.

[0031] 본 발명의 gRNA 발현 벡터는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비-바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 벡터(viral vector)로서, 예를 들면, 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 벡터 등을 사용할 수

있으며, 바람직하게는 렌티바이러스 벡터이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 렌티바이러스는 레트로바이러스의 일종으로 핵공(nucleopore)이나 완전한 핵막으로의 능동 도입을 가능하게 하는 사전-통합 복합체(바이러스"셸(shell)")의 친핵성으로 인해 분열 세포뿐만 아니라 미분열 세포도 감염시킬 수 있는 특징이 있다.

[0032] 본 발명의 gRNA는 올리고뉴클레오타이드로서 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 '도입'은 형질감염(트랜스펙션; transfection) 또는 형질도입(트랜스덕션; transduction)에 의해 외래 DNA를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 형질감염은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 형질감염법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 해당분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 또는 바이러스 벡터 입자를 사용하여 세포 내로 유전자를 전달시키는 것을 의미한다. 본 명세서에서 형질감염 및 형질도입은 외래 유전자를 세포로 유입시키는 의미로서 혼용될 수 있다.

[0034] 한편, 본 명세서에서 "벡터"는 핵산 분자로서 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 비제한적으로, 단일-가닥, 이중-가닥 또는 부분적 이중-가닥인 핵산 분자; 하나 이상 의 자유 말단, 비 자유 말단(예를 들어, 환형)을 포함하는 핵산 분자; DNA, RNA 또는 이 둘 모두를 포함하는 핵 산 분자; 및 당업계에 공지된 다른 다양한 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 한 유형의 벡터는 "플라스미드"이며, 이는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 것으로서, 여기에 예컨대, 표준 분자 클로닝 기법에 의해 추가적인 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기에서 바이러스-유도된 DNA 또는 RNA 서열은 바이러스(예를 들어, 레트로바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아 데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스) 내로 패키징하기 위한 벡터에 존재한다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포 내로의 형질감염을 위한 바이러스에 의해 운반된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0035] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본원에 기재된 요지의 핵산을 포함할 수 있으며, 이는 재조합 발현 벡터가 발현을 위해 사용되도록 즉, 발현될 핵산 서열에 작동 가능하게-연결되도록 숙주 세포를 기반을 선택될 수 있는 하나 이상의 조절 요소를 포함함을 의미한다.

[0036] 재조합 발현 벡터 내에서, "작동 가능하게 연결된"은 타겟 뉴클레오타이드 서열이 뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용하는 방식으로(예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포 내로 도입되는 경우 숙주 세포에서) 조절 요소(들)에 연결됨을 의미하고자 한다.

[0037] 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용된다. 이들은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태, 테옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 결합 분석으로부터 규정된 로커스(유전자자리), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 쇼트-헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 리 보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후 예컨대, 라벨링 구성요소와의 컨주게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 "상보성"은 전통적인 왓슨-크릭(Watson-Crick) 또는 다른 비-전통적 유형에 의해 다른 핵산 서열과 수소 결합 (들)을 형성하는 핵산의 능력을 지칭한다. 상보성 핵분율은 제 2 핵산 서열과 수소 결합(예를 들어, 왓슨-크릭 염기쌍)을 형성할 수 있는 핵산 분자에서 잔기의 핵분율을 나타낸다(예를 들어, 10개 중 5개, 6개, 7개, 8개, 9 개, 10개가 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 상보적임). "완벽한 상보성"은 핵산 서열의 모든 인접한 잔기가 제2 핵산 서열의 동일한 수의 연속 잔기와 수소 결합한다는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "실질적으로 상보적인"은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 상보성 정도를 지칭하거나, 엄격한 조건하에 혼성화하는 2개의 핵산을 지칭한다.

- [0039] 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 CRISPR-관련("Cas") 유전자의 발현 또는 이의 활성 유도에 관여하는 전사물 및 다른 요소를 집합적으로 지칭하며, Cas 유전자를 인코딩하는 서열, 가이드 서열 또는 CRISPR 로커스로부터의 다른 서열 및 전사물을 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 타입 I, 타입 II 또는 타입 III CRISPR 시스템으로부터 유도된다. 일부 구현예에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체, 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래된다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열(내인성 CRISPR 시스템의 상황에서 프로토스페이서로서 또한 언급됨)의 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키는 요소를 특징으로 한다.
- [0040] CRISPR 복합체의 형성과 관련하여, "표적 서열"은 이에 대한 가이드 서열이 상보성을 갖도록 설계된 서열을 지칭하며, 여기에서 표적 서열과 가이드 서열 사이의 혼성화가 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성화를 유발시키고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키기에 충분한 상보성이 있다면, 완전한 상보성이 반드시 필요한 것은 아니다. 표적 서열은 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드와 같은 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질에 위치한다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 진핵 세포의 소기관, 예를 들어, 미토콘드리아 또는 엽록체 내부에 존재할 수 있다. 표적 서열을 포함하는 표적화된 로커스 내로의 재조합에 사용될 수 있는 서열 또는 주형은 "편집 주형" 또는 "편집 폴리뉴클레오티드" 또는 "편집 서열"로서 언급된다. 본원에 기재된 요지의 양태에서, 외인성 주형 폴리뉴클레오티드는 편집 주형으로서 언급될 수 있다. 본원에 기재된 요지의 양태에서, 재조합은 상동성 재조합이다
- [0041] 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화되고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 지시하도록 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 충분한 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 구현예에서, 적절한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬된 경우, 가이드 서열과 그의 상응하는 표적 서열 사이의 상보성 정도는 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 또는 그 초과이다. 서열을 정렬시키기 위한 임의의 적합한 알고리즘을 사용하여 최적의 정렬이 결정될 수 있으며, 상기 알고리즘의 비제한적 예는 SmithWaterman 알고리즘, Needleman-Wunsch 알고리즘, Burrows-Wheeler Transform을 기반으로 하는 알고리즘 (예를 들어, Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign(Novocraft Technologies, ELAND(Illumina, San Diego, Calif.), SOAP(soap.genomics.org.cn에서 입수가능), 및 Maq(maq.sourceforge.net에서 입수가능)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 또는 그 초과 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 또는 그 미만의 뉴클레오티드 길이이다.
- [0043] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0045] **[실험 방법]**
- [0046] **1. 간암 세포 배양**
- [0047] 간암세포주(HepG2 및 Huh7)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 구입하여 최소 필수 배지 또는 10 % 소태아혈청 (fetal bovine serum: FBS) 및 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 mg/ml) (Life Technologies, USA)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 배지는 3~4일 마다 교체하였으며, 세포는 5% CO₂, 37 °C 조건 하의 가습 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0048] JQ1 및 DRB(5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside)는 Tocris Bioscience (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, JQ1, OTX-015, C646 및 DRB는 10mM의 농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 희석하여 세포에 처리하였다.

[0050] 2. 루시페라아제 리포터 분석 (Luciferase reporter assay)

[0051] 프라이머를 이용하여 BglIII 및 HindIII 부위가 형성된 인헨서 영역 (R1 ~ R6)을 LongAmp® Taq 2X Master Mix (New England BioLabs)로 증폭하고, 각각 KpnI 및 XhoI로 절단하여 pGL4.26에 삽입하였다. 24-well plate에 세포를 분주하고 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)을 이용하여 상기 인헨서 영역이 삽입된 pGL4.26로 형질감염 시켰다. 루시페라아제 활성은 제조사의 지침에 따라 Dual-Glo® Luciferase Assay 키트 (Promega, Fitchburg, WI)를 사용하여 측정하였고, PRL-TK (Renilla luciferase 발현 구조; Promega)를 내부 대조군으로 사용하였다. 루시페라아제 활성은 Renilla luciferase와 대조군(empty vector)으로 정규화하였다.

[0053] 3. RT-qPCR(real-time quantitative PCR)

[0054] 간암세포의 총 RNA를 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하고, PrimeScript 역전사 효소 (Takara, Shiga, Japan)을 이용하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan)로 증폭하였다. 내부 대조군으로는 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 사용하였다. 각 데이터는 독립적인 3회의 실험 결과를 나타낸다 (n=3). PCR 수행 이후 결과는 ABI 7500 소프트웨어를 이용하여 ΔCT (critical threshold)과 $\Delta \Delta CT$ (comparative critical threshold) 방법으로 분석하였다.

표 1

[0055]

qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
MYC	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA	AGTTGTGCTGATGTGTGGAGA
DUSP9	CAGCCGTTCTGTACCGTC	CAAGCTGCGCTCAAAGTCC
VEGFA	TTATGCGGATCAAACCTCACC	GAAGCTCATCTCTCCTATGTGC
MYC-R2-S	ACTGCAGCCACACTTCTGTT	TCTTGCTGCAATCCAGAGGG
MYC-R3-S	GCACTTGTTCTCTACCTCCGC	ATGTAGTGGGACCATCACCC
PVT1-3'	GCCCCCTCTATGGGAATCACTA	GGGGCAGAGATGAAATCGTAAT
CCAT1	GGGCTGGTACAGACTAGGGA	TAAGCAGGTCAGAAAGGGCG
FAM49B	CTCAAGATGACAAATCCTGC	CCGTACATTGTTAATCCTC
ICAM1	ATGCCAGACATCTGTGTCC	GGGTCTCTATGCCCCAACAA
IRF2	AATGCTGCCCTATCAGAACG	CAGGACCGCATACTCAGGAGA
TERT	AAATGCGGCCCTGTTTCT	CAGTGCGTCTTGAGGAGCA

[0056] 4. R3 eRNA 녹아웃(knock-out: KO)을 위한 CRISPR-Cas9 system 설계

[0057] 표적 부위에 대한 gRNA 합성을 위한 정방향 및 역방향 올리고머는 제조업체의 지침에 따라 설계 및 제작되었다. 이어서, 제작된 올리고머를 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (M0531, BioLabs)를 사용하여 100-mer insert DNA로 확장하였다 : 98 °C에서 2 분, 증폭 4회 (98 °C에서 10 초, 53 °C에서 20 초, 72 °C에서 30 초), 72 °C에서 5 분. 100-mer insert DNA를 정제하고 Gibson assembly® Master Mix (E2611, New England BioLabs)를 사용하여 50 °C에서 1 시간 동안 gRNA_Cloning Vector (# 41824, Addgene)에 삽입 후 형질 전환 및 콜로니 PCR을 수행하였다. 이어서, 상기 벡터를 정제하고 재조합을 확인하기 위해 시퀀싱을 하였다(Macrogen). 간암세포주에 형질감염은 제조업체의 지침에 따라 Lipofectamine® 3000 (L3000-001, Life technologies)을 사용하여 95:5 비율의 재조합 gRNA 플라스미드 벡터 및 pCas9_GFP 플라스미드 (# 44719, Addgene)로 수행하였다. 이어서, 형질감염된 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1 개 미만의 세포 비율로 시딩하여 모든 웰이 단일 고유 세포를 포함하도록 하였다. 세포를 2주 동안 배양한 후 24 웰 플레이트로 이동시켰다. 세포가 충분히 성장한 후, Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1125, Promega)를 사용하여 게놈 DNA (gDNA)를 추출하였고, gDNA를 표적 특이적 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하고 시퀀싱하여 결실 돌연변이가 제대로 생성되었는지 확인하였다. 확인된 세포를 100mm 접시에서 이동 및 성장시키고, 간암세포주에서 타겟 유전자의 KO를 qRT-PCR로 재확인하였다.

[0059] 5. 세포 증식능력 및 생존력 분석(WST-1 assay)

[0060] 세포의 수는 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (MK400, Takara)을 이용하여 측정하였다. 간암세포(1×10^3 cells/well)를 96-웰 플레이트에 분주하고 20시간 동안 배양한 후 JQ1 (5 μ M)을 처리하였다. 이어서, 0, 24, 48, 72, 또는 96 시간 동안 배양하고 37℃에서 4시간 동안 WST-1 (10 μ L/well)을 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장률을 결정하였다. 각 세포 성장률은 9개 웰의 평균 흡광도를 24시간 동안 성장한 세포 결과에 대한 상대적인 백분율로 표시하였다.

[0062] 6. 구 형성 분석(Sphere formation assay)

[0063] 24-웰 초저부착 배양접시(24-well ultra-low attachment culture dishes)에 1000 cells/well 밀도로 세포를 분주하고, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin, and 100 ug/ml streptomycin, 20 ng/ml epithelial growth factor (Invitrogen), 10 ng/ml fibroblast growth factor-2 (Invitrogen), N2 (R&D system), 및 B27 (Invitrogen)이 포함된 DMEM/F12 serum-free medium (Gibco) 배지에서 배양하였다. 세포는 CO2 배양기에서 1~2주 동안 배양되었고, 100 μ m 이상의 직경을 갖는 oncosphere 세포를 JuLI™Br (NanoEnTek)를 이용하여 계수하였다.

[0065] 7. 통계 분석

[0066] 데이터는 평균 \pm S.D로 분석되었습니다. 데이터는 SPSS 17.0 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 일원 분산 분석을 사용한 후 Tukey의 HSD test를 이용하여 분석하였다($p < 0.05$).

[0068] [실험 결과]

[0069] 실시예 1. 간암 세포주에서 MYC 유전자의 인핸서 영역 선정

[0070] UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)에 간암세포주의 H3K27A-seq 데이터를 분석하여 MYC의 유전자 발현을 조절하는 인핸서 영역의 후보로 R1~R6를 선정하였다. R1~R6 영역의 구체적인 정보는 하기 표 2에 나타났다.

표 2

[0071]	R1	서열번호 1	>hg19_dna range=chr8: 129197046-129198471 (1425 bp)
	R2	서열번호 2	>hg19_dna range=chr8:129566391-129568191 (1800 bp)(E2-1 416 bp, E2-2 400 bp, E2-3 429 bp, E2-4 404 bp, E2-5 451 bp)
	R3	서열번호 3	>hg19_dna range=chr8: 129568305-129569922 (1594 bp)(E3-1 401 bp, E3-2 394 bp, E3-3 404 bp, E3-4 488 bp)
	R4	서열번호 4	>hg19_dna range=chr8: 129594870-129596100 (1230 bp)
	R5	서열번호 5	>hg19_dna range=chr8: 129596820-129598027 (1207 bp)
	R6	서열번호 6	>hg19_dna range=chr8: 129613863-129615792 (1929 bp)

[0072] 이어서, 선정된 후보 인핸서 부분을 pGL4.2 벡터에 삽입하고 HepG2 세포에 형질감염시켜 루시퍼라아제 분석을 수행하였다.

[0073] 그 결과, R2 및 R3 부분의 루시퍼라아제 활성이 가장 높게 확인되었다. 이어서, R2와 R3 부분을 500bp 크기로 잘라서 동일한 실험을 수행한 결과 R2-3와 R3-2 부분의 루시퍼라아제 활성이 가장 높게 나타났다(도 1). 이에, R2 및 R3 영역을 MYC 유전자의 인핸서 영역으로 선정하였다.

표 3

[0074]	R2-3	서열번호 7	>hg19_dna range=chr8: 129567608-129568037
	R3-2	서열번호 8	>hg19_dna range=chr8: 129569085-129569479

[0075] 실시예 2. MYC 유전자의 발현 억제 약물 처리에 따른 인핸서 RNA(enhancer RNA: eRNA) 발현 감소 확인

[0076] 2-1. MYC 발현 억제 약물 확인

[0077] BRD1~4는 BET(bromodomain and extraterminal domain)의 subfamily로서, 간암 세포는 BRD4(bromodomain-containing protein 4)가 과발현됨이 알려져 있다. BET의 억제제로 알려진 JQ-1 및 OTX-015과, Histone Acetyltransferase p300의 억제제인 C646 및 RNA polymerase II의 억제제로 알려진 DRB(5,6-dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside)을 각각 HepG2 세포에 처리하고 MYC, DUSP9, VEGFA의 유전자의 발현을 분석한 결과 MYC의 발현이 감소함을 확인하였다(도 2).

[0079] 2-2. 약물 처리에 따른 eRNA 발현 감소 확인

[0080] 실시예 1에서 선정된 인핸서 영역(R2~3)이 m-MYC 유전자 발현 조절 영역임을 검증하기 위하여, 상기 MYC 발현 감소 약물 처리에 따른 R2 및 R3 영역의 eRNA 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, MYC 발현 감소 약물(JQ-1, OTX-015, C646, 또는 DRB)을 HepG2 세포에 처리하고 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 RT-qPCR을 수행하여 eRNA 발현량을 확인하였다.

[0081] 그 결과, JQ1 및 OTX-015 처리시 R2 및 R3 영역의 eRNA의 발현이 감소되고, DRB 처리시 R3 영역의 eRNA 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[0083] 실시예 3. R3 enhancer 영역 결실에 따른 효과 확인

[0084] 3-1. R3 enhancer 영역 결실 세포주 제작

[0085] R3 enhancer 영역의 결실을 통해 m-MYC 유전자의 발현 감소를 유도하고 간암세포의 성장을 억제할 수 있는지 확인하고자, CRISPR-Cas9 system을 이용하여 R3 enhancer 영역을 결실시킨 세포주를 제작하였다. gRNA의 서열은 하기 표 4에 나타내었고, gRNA cloning primer 정보는 하기 표 5에 나타내었다.

표 4

gRNA	No.	Sequence (5'-3')
48	서열번호 9	CCTTCATATTTCTGGGTTTCAGTT
402	서열번호 10	CCTCTGCACTGTAATGACACGAG

표 5

primer	No.	Sequence (5'-3')
MYC 2_48_gRNA_F	R3-서열번호 11	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGACTGAACCCAGAAATATGA
MYC 2_48_gRNA_R	R3-서열번호 12	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACCTCATATTTCTGGGTTTCAGTC
MYC 2_402_gRNA_F	R3-서열번호 13	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTCGTGTCATTACAGTGCAG
MYC 2_402_gRNA_R	R3-서열번호 14	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACCTGCACTGTAATGACACGAC

[0088] 구체적으로, 합성한 guide RNA를 gRNA cloning 벡터에 클로닝한 후 Cas9-GFP 벡터와 함께 간암세포에 co-transfection 하여 R3 영역(서열번호 15)의 결실을 유도하였다. 형질감염된 세포를 9-웰 플레이트에 단일 세포로 분리하여 배양하고, 배양된 세포에서 genomic DNA를 분리하여 타겟영역을 PCR로 증폭하여 염기서열을 결정하였다(도 4).

[0090] 3-2. MYC mRNA 발현 및 세포증식력 감소 확인

[0091] 상기 실시예 3-1에서 R3 영역 결실이 확인된 세포(48-402)에서 MYC mRNA 발현 수준을 측정하고 WST-1 assay 수행한 결과, R3 영역 결실 간암세포에서 MYC의 발현이 감소하고 간암 세포의 성장이 현저하게 감소함을 확인할

수 있었다(도 5).

[0092] 한편, R3 영역 결실 유도에 따라 MYC 발현이 감소되는 것과 달리, MYC 유전자의 TED에 포함된 long noncoding RNA (lncRNA) PVT1의 발현은 변화가 없었고, MYC에 의해 발현이 조절되는 FAM49B와 CCAT1의 발현은 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, ASO 처리시 MYC에 의해 발현이 감소하는 IRF2의 유전자의 발현은 증가함을 확인하였다(도 6).

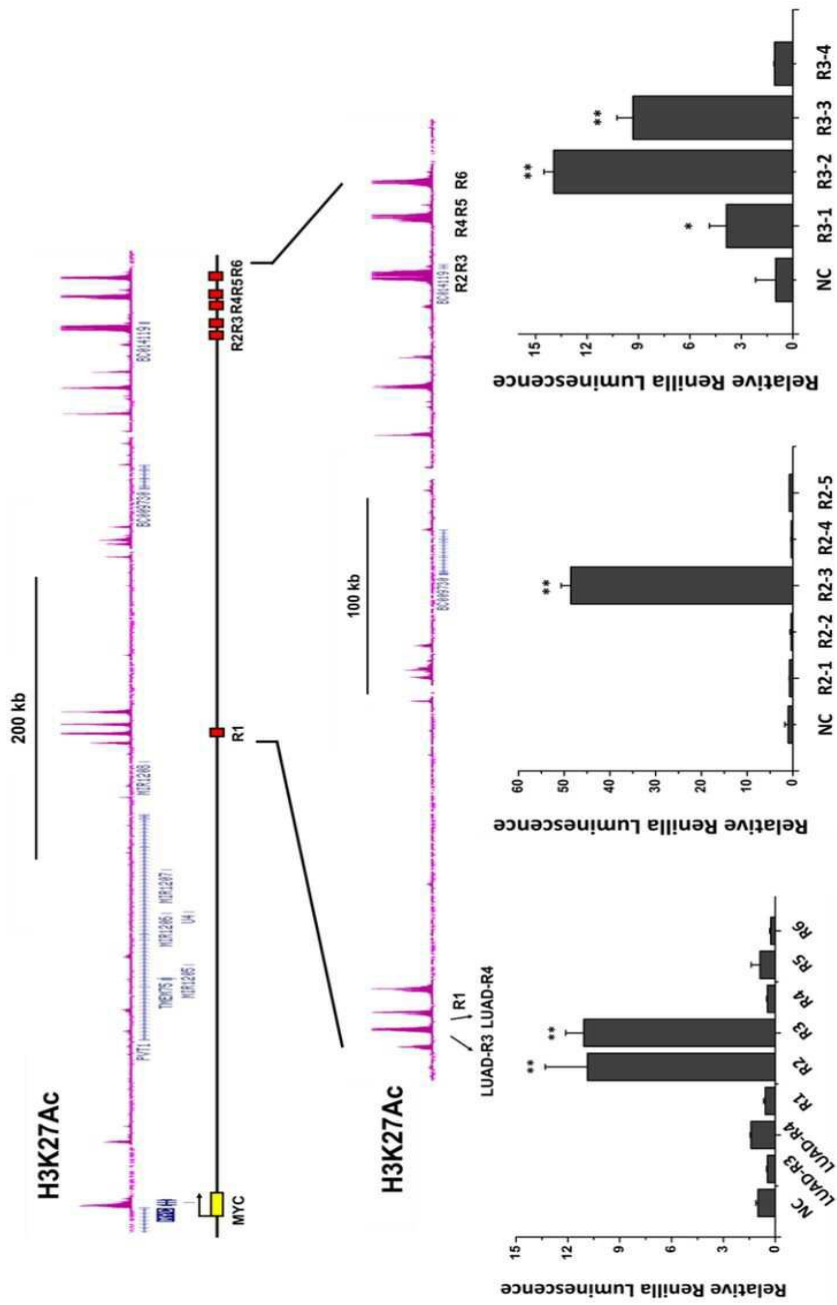
[0094] 3-3. Sphere 형성능 감소 확인

[0095] 이어서, R3 영역 결실 간암 세포주의 sphere 형성능을 분석한 결과 wild-type의 세포에 비해 sphere 형성능이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 7).

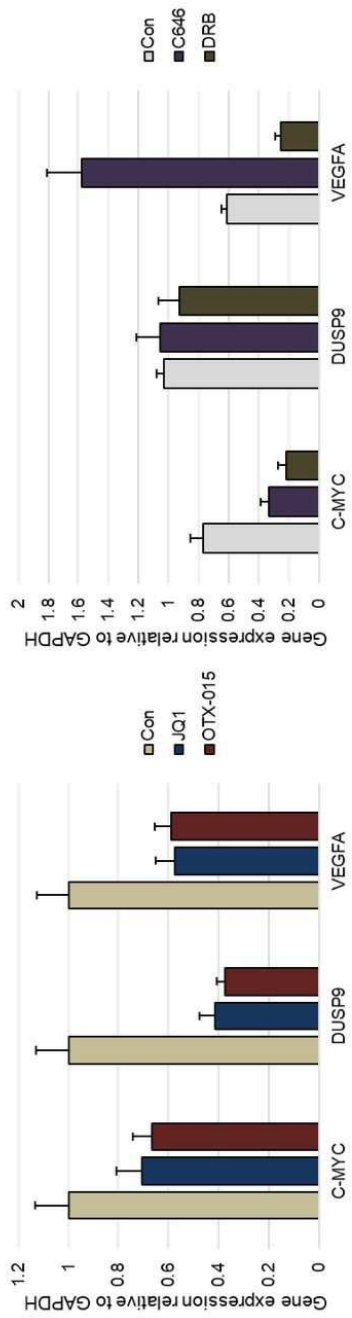
[0097] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

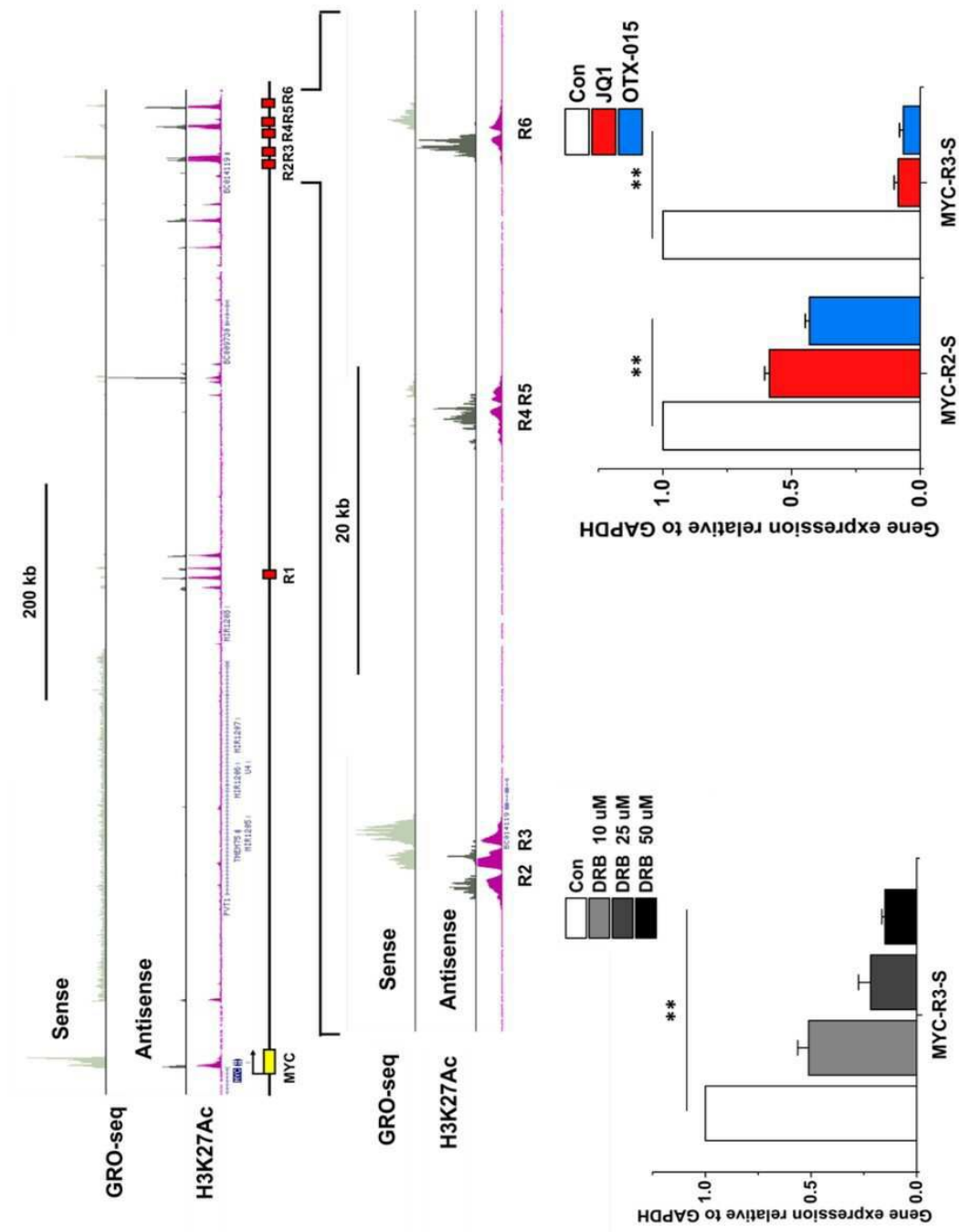
도면1



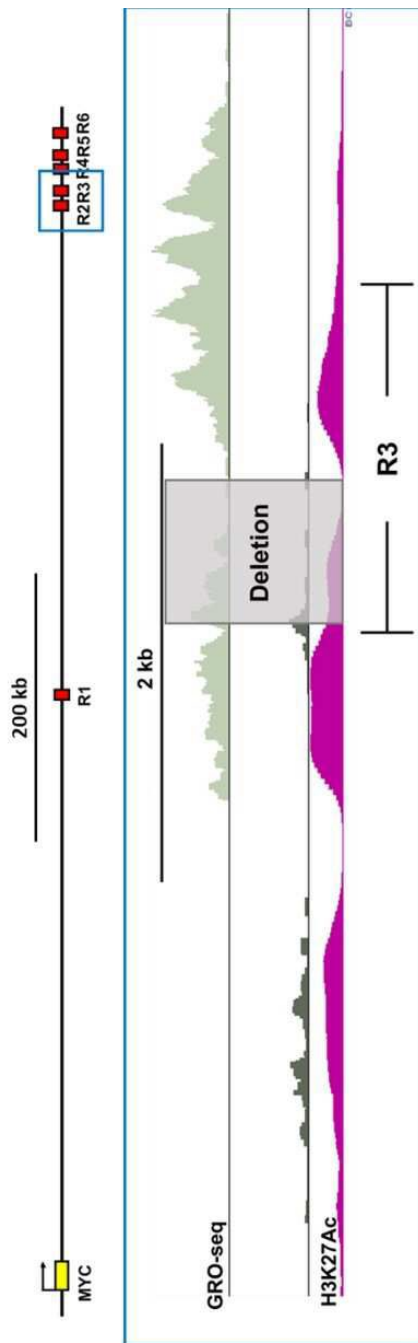
도면2



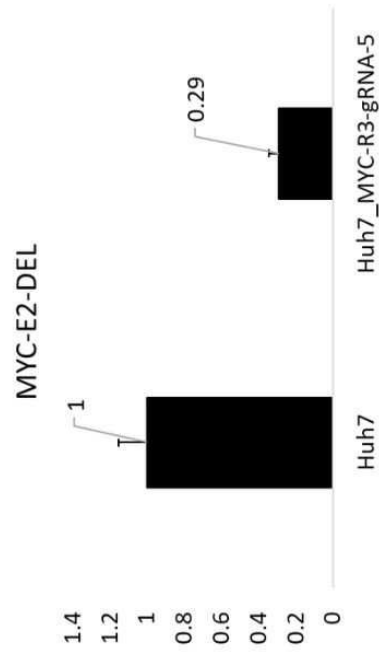
도면3



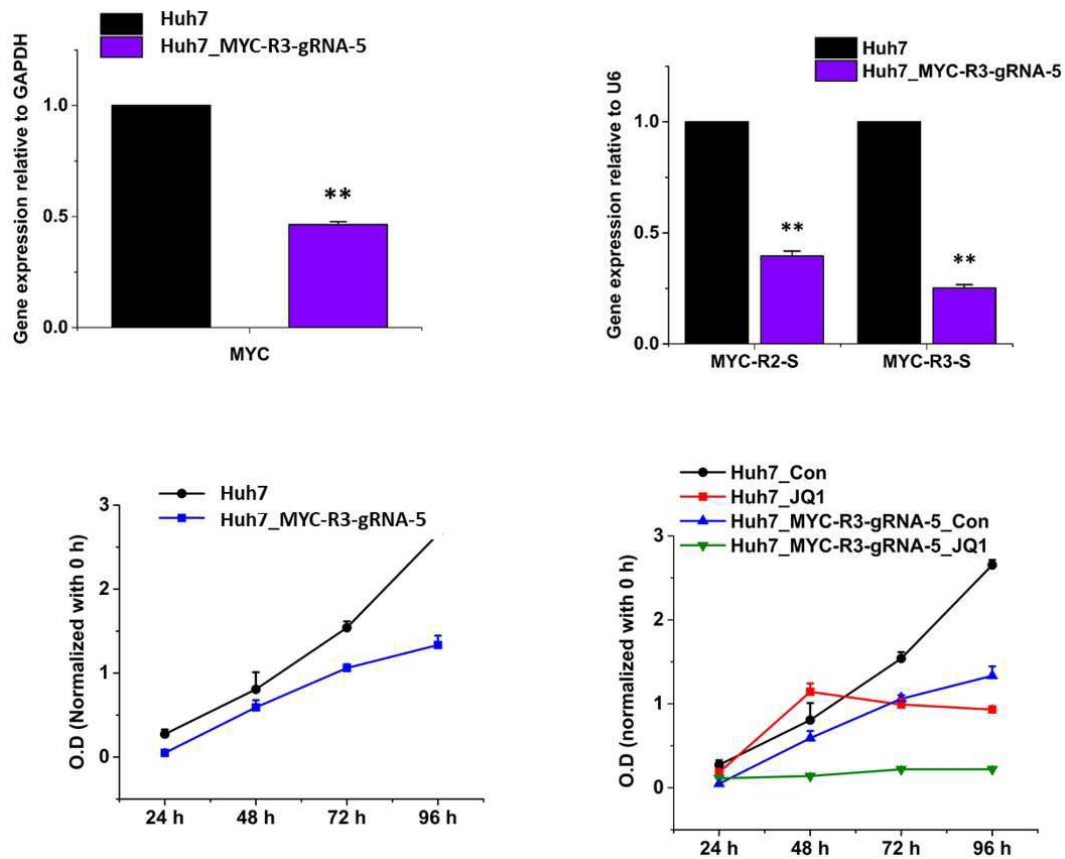
도면4



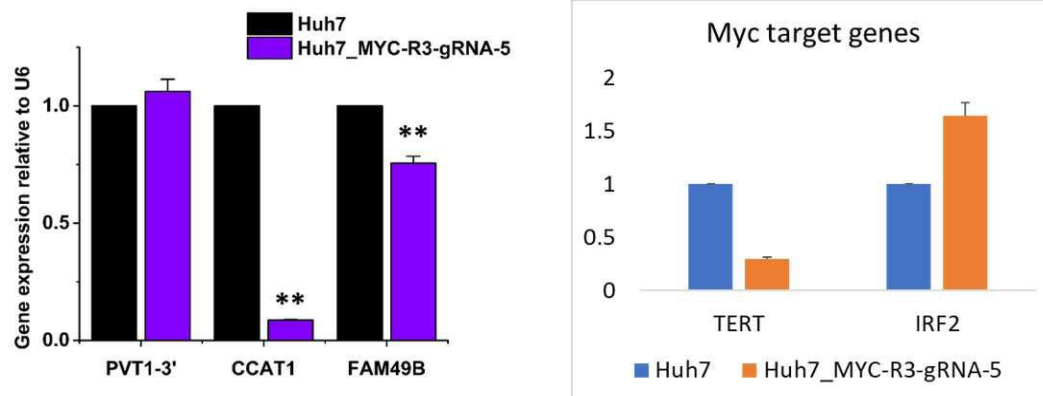
MYC-Knock out_48-402 #5

[illegible]

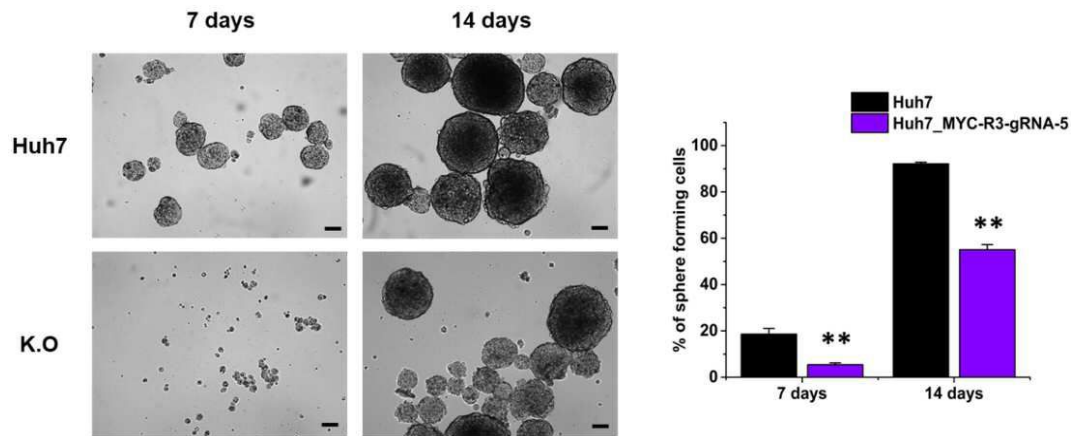
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University ERICA Campus
- <120> Guide RNA for deleting MYC enhancer and use thereof
- <130> DHP19-737-P2
- <150> KR 10-2019-0164837
- <151> 2019-12-11
- <160> 14
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1425
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

gcgtttcctg aaacaccacc attgatgagc cagtccttta gggtatatca ttgctagata      60
aaacaaaaca aaacacactt tagtagtgat ttgcatgttc atacaagttt gctaaatagc      120
agtgtttagt tctagacctt taaatagatc ttgttcagcc ctgacattca agacaattga      180

aatattctgt gagcagaact gtgaccacaa ctataataag gtttaagtga tccatatttg      240
gggatagttc ttctgagggc tggctgggtg tgtctagtga agaggacca caaaagccct      300
ggagaagggg caagtttagc cactggaagg ggcaaggtca agggcagtta cacaacagaa      360
ctcccagagt taactcatat cttttcctac tgttctaat ctatttcctt cccccctcca      420
cgtacacgga tggccctttt aaatatttat ttgccacctt ttgcagtgtg cggtagactt      480
tgtctcaca gtcagcttga tccctttgaa ggtgtttact aattaaatca ggctgggagg      540
ttaggaaagt tcagatatat ttatcctgta taaagtagtc cctggacca ggacccttaa      600
  
```

acagccctag ggaggtcagc tacagtttcc ctgcttactt tctttgttgg aggaagtcct 660
aatcattgcc caattaagct gaataacgct gcttcttttt ctaccattgg ctccctggcac 720
aattctaaga cagacatcgg aatggctgga gccagaaagc taaatgctct taacaagtat 780
gtttatgggc cagtttccca cacagccgta tgaattctc actcagtaac acagcatctg 840
agccacagac actgactcaa atacaatatt ggcttggaag gaagagtgtc gctgtagcac 900
aggatcattc cctctaatat tttaaaatag tatttgttcc agaagaatct gtgcacattc 960
atggatgtat gtgtctgagt gtatatgagt agtgcctgtg tgtatgtgtt tgtatatatc 1020

ttcagctaag agagctttct gaagaggcga aacacaaagt gagtgggaga tctctgttgt 1080
attgggtctt agggcagcct ctgcctcaat acaactccat tgtattaagt tcaggcttat 1140
ttgattccct tcatccactt tgttcatttt cactggctctg atagagagtg agaaatagct 1200
gatcatgatt acatgaaatg tctggttttg gtctcaggga atccccttag agattcttgt 1260
cttaaaggtc tcatctagtt ccaacagcaa ggccaaccac ttcccatttc tggagcagtg 1320
gcatgaagca ctgggggtg cctgaaagca cactgagaat catgcagtta gcactgtgac 1380
aaagctgtgg gtgcccatgg gcttttctag gcatggcctt cctct 1425

<210> 2
<211> 1800
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2

aggttaatgc agagcctcct cccaccccg ctccctgaaat ggtgcttctc ctgggctctg 60
ggcagtagcc atccattcac atgacaacc acttttgttt tgcaggcaca taggtttttc 120
atatttctg tagaacaatc atgcatgtca gacaaggatt gacagctcca ttttatgggt 180
agagaaactg actcagagag cttagataac ctgccaaagc tgatggatgat actcagaggt 240
taacctaatc agaaagtaat taacctcctt ctactctaata acatctctac aaataatccc 300
aattcacttt catccttgat gaaaatctga tttctatgaa gctttgacta aaacttcttt 360

aactttactt catttcatga tccattccat ttatatgcct cggtttcctc atctaataaa 420
aaagcaaaaa gtaattagcg tgagttacct atgcttggtc tgttgaagta gtttgaattt 480
ttctgaatca ggatgaatgc aaattgcctc attatttcac taattaataa tgtctgcttg 540
gaaatgcaac tatcagtgc caataaatga taaagcttat aattatagat gagagcaatt 600
gcttcttttt ttgttcttac cttcatttca gtttatcttc ctgagctata gctacctctg 660
taagggttag gaaaacattt aaaatatcta aacagtgtat cctttctcaa gcgttcggaa 720

attgatgaat catcttactc tgcagcattc aaagtaactg tgtgcttgac acataggagg	780
aaaagtgggc tctttgaaat gtgagcagag caccgatcgt gtcacctgcc cggcgcgtga	840
cctgttactc ttccacctga ccctctgtgc ccaatgtcac ctggagcctg aaacctggaa	900
gggaaaagtc ctigactgga gtcagtggag agaaaatcat cacctgcttg ggcacaaaca	960
tgcttggtga ctgcgtcact gtctgttaag tgggatcagc taatagttag acagcgggcc	1020
ttcaaagcat cacggcagaa ctgatgaagt tctgtaatg cattccctgt gtgaaggcct	1080
tggactttag agctcaagtg cgccaggagc attttgagct tgccgacagg ctctcccatg	1140
gattctatct ggttatacgg cagtggaaaa gaattgactt tcattttcgt cactctctgc	1200
ctgagtctct cgactgcagc cacacttctg tttcccgtat attgcatagg ctattccctc	1260
tacctgggac accctccctc ctggattgca gcaagatttg cttctatgtt tcaactcagtt	1320
atctacttac aaatcacctc cttagggacc ttgcaggctg ctctctttct ccttacctgg	1380
cttcattttc cttcacagca cctgatactt ttacacatat ttacttagtt agtagtccat	1440
gctttttctt cccactgga ccataagttc tctgaaggca agagccacat ttgtgttttt	1500
ccactgatct gtctcagtg tctacaatag tactcaaccc acaatataac cttgagaaac	1560
atttcttaaa gaagtgaata aatgaacgag tgaaggagtg attttttct cattttacaa	1620
atgaaacaag tcaaaaacaa agaggggaag taagctagtc cagctctaca accatttagt	1680
ggcacagcta gtattaacat ttgattttcc taactcacia tctaggattt tattttcgtt	1740
ttattccata caacactgtt ctccagaaat ttggcaactc agacggcact tgacttttca	1800
	1800
<210> 3	
<211> 1594	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
ccctttcaag ggcaaagacg attgaaaatt agttatacaa ttacattttt aaaacatttt	60
tgagtataat gattttaagc atttgttgta taaagggtga tatgcataaa gaacaggtaa	120
aaataataat cattataatc atatatagaa gtcgtcttgg tacattttta acatatttta	180
caattggaat ccgctgtat gccgagtttt ctatctctgt ttataacat tatattttta	240
acatttttct aatgtcacta aaactaacat tgttttaggg atagtatttc aatatataag	300
tgtgtcacia ttccacagtt ttagttgac attttctct tatttatcat taagattgtt	360
tccacttttt atttattggg tttctagggt ttagtccttc atatttctgg gttcagttat	420

tctataaaca ttttcaaac tatgcagaaa ataaattgtc caagtttgta cttaaagtgc	480
tacaaataat ctaaaaaaaaa aatcaggggt tcaagctcaa agcttctctt caaatcaata	540
actgttgaag atttcactta ttgcatTTTT tagtctttga ggtttagagt ggagggtggg	600
gatccggggg cagtgggaca ggaaacattg accaatttga gaacaaatag aggcttggaa	660
aatttgttta cattctgttc tatgtgtgat tctggccttt gtaacaagga ggataaaaag	720
ccagaactca ctttgggtgc gcctgcagac ctctgcactg taatgacacg agtgcaagct	780
gcactgggtg caagtcagca tgactcagcc accctcccca cggggtgaga ggaagcagtg	840
gtggaaggcc agcacttggt cctacctccg catgtacagt ggtgaagaga aggctcacia	900
agggtttctc aatctgagaa ggaaccctgt attcagagtg cagcttaacc caatgggata	960
ttccagctat aattctaata aggggtgatgg tccactaca tacctagcat atttatgaat	1020
ctcaaattga tgccacctct tgtaccttgc acaagtaata atcactgcc a ttgactctggc	1080
acctctacg tgacagctta ctaacctagg cactttcagc tggccaacta atttaattct	1140
caaaacaagt ttgccaggca agtattattg gctgcatttt ccagataaag acattgaagt	1200
ttctaataaa cttcaggtaa agttttattcc agataaactt cactgagggt catgctgtcc	1260
aaagtcacac agcgtctggga tttaatactg gtctatttgt cttcaaagcc tatgcattac	1320
tgcacaccta tgaggttctg cagagaaaag gtctctctt ctgctcagta cctgcaattc	1380
tagggacagt tgcatggaa aaaactgtat tagaataatc tattgatcaa taatctcatt	1440
gactagctat ttaatgagca cttactttgt gccaggctct ctactagttt cactgacag	1500
agttgaatag aacacatttc tgatcataaa acgggaggag ggcgagattc gaagggcagg	1560
attgtgagat acataagcct ccactctcag gaca	1594
<210> 4	
<211> 1230	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
cgctctcagtt tccagagggt tctcctttta ctctctttca gcaatgaagc ttgttggttt	60
tgatgcttct aagaaactag attagcctaa ttcaacccca gtttaacatt ttttaaatgt	120
cagctctcct ttctcttatt aacactaaat tatttttatt ctttatgac tcactttaca	180
gggcagtcca ctatagatag taatagaatc tccaagttt catcttggat agaacaaaag	240
attcagaagt caacatctg ttagtatatt ttatttgttt caaactgggt ggaaacttag	300
cttgtcttta ttaagtattt gtaattgtag atactttgtt catattgtac tgctgacaag	360

tatgctctga agccagaact atagtttttc atgtctgtgg agttctcagc aagtgggtgc	420
atgctaatta ctttgtcttc tgtaagccca aatatataat ggataatagg ttaaggatcc	480
cagcgaaaa atactggcaa gacttcttac ctattatgac atttttatit agctcgggtct	540
ttattttcca atctactttc tttagagtta ctcatgtaa gagtttatta ttcatagtaa	600
gaacattttt tttttctgtt ggcagagaga gtagtctaga gagttcagtt gatgcaaggg	660
caaattcaaa agcaatccaa gtagactctg gcctctgtgt agagccaaat ccatcaaaaa	720
gaggagatga gacagcaaaa tgtactcttt cattagtttc taccacaga gagtggtttt	780
taagggggga gggaacactt ggttgcttta taaaagtgc ttttgtctc tccaggattt	840
cctgttgctt tgaggaaaaa ttgtttgttt gcagattagg tctattcttg ttttaatttg	900
atagaaattt taaagtaggt gtttttaaaa aatccttttt agagacctca tttactaca	960
cattcacaag gctggactcc aaggccttca aagagcaaaa agtacactta attattattc	1020
agagtttata tagctcctag catagtttcc agcatatagt aagggtcttc taagtgtttg	1080
taagtgaag aatggatgaa tcaatgtgtg aataagtaaa taaagtaaat tagtaaatat	1140
ttttctacc tgaatattga taataagaaa ttaataattc tatttgcata attatttgaa	1200
tgtatctcaa ctccctgtct caatctaaga	1230
<210> 5	
<211> 1207	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
taggttgctt gccctagtag tgggtgtgaa ggttcttcta agagtcattt ggtgactctt	60
tttcacctgc aatcttaaac ctgacattta cgtctgcctc caaagaaaag cactgggggt	120
cttaggcaga agcccagcca gctctctcca tgtatccaaa catcttctct tcttttgaga	180
gaatgctgaa catatttatt gagctttcat tgcattgttag gcagcagttt ttacaggcag	240
caattaacce tgtatgttct atatatagg gtggacttta ggcatcaagg tgcaggttca	300
tgctcagtt tccctccctg taatgtggag gtacatactc tttggtgacg gagaagtaga	360
atattttgtt taaatacagt gtagatatgt attcactcaa atacacaacc cacttttaat	420
ggactcttga taccaggaat agaagaataa gaacagtttag atctagcgtt tactgagatt	480
ctttcatgtg ccagggcctt atatttggta ttagtcagct gttgttgcaa taatgctgca	540
taaaaggaaa caaactcaaa caaaaggctt atgatcaaca ataatttgtt ctagggttca	600
tggggttgca ctaccactta gctgattgag gctgagcttg ggggggggct ttgcttcaag	660

ctgtaggttt gctgggcttt gctccaagag tatgtcagt acatatttgc tttttgtatg	720
tttgtttggg ggccagggat gaaaaggcca aagctacctg aaacactctc ctccgaggga	780
aaacacaccc cctacactgt gattctatgg tgtttcttgc tcttctccat cataatctgc	840
ctataattac atagcagggtg tttgtttacc agagcttttg agggacaata agtcctttta	900
cctgagcttt tgagaagcaa ttcactcatt tctgaatcca atacttcaga aatttcattg	960
cacacagaag gagctcaata aatgtttttg agttaacaga tgcataagtg aataaaatct	1020
ttatagatct gtactaatac cttctaaaag ggttgtgcta aaatgatgaa tggttgagtt	1080
acaatttgta attaggacaa gcttgacctg ctggggcagt cactgaatct tttgaagtcg	1140
acatcatgga acacaagtga caaatgatcc tttcatgtca gcattggtgc tgtacaccgg	1200
gtagaat	1207
<210> 6	
<211> 1929	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
ctttctgcca ggcaacatgc tttataatca aacaaaaaca ttgtcagttt tcacagatcc	60
ttctagagga tgagataaag tataataaaa caaccacaca aataattttt aaatagcaaa	120
tgtaattgca tgctactaag gcagctatga gttgttagga gaacatgaat acattcattt	180
actaattcaa tagttattgg ttgaacccta atgtgtaata ggactagcg atatatatat	240
aaggttagtg caaaaaaac tgacagtgtt gcaatataaa ataatggcca aaatcgcaat	300
tacttttgca ccaatctaata acacacacac acactcacac acacacacac acacacacac	360
acacacatat atatatatgt tagctcatgc aaaggtgata tattagcttt tggtaaatag	420
gaaaagggat aggagtgcga aggaggtcat gatttttagac aaagtagcct ggaaaggaag	480
aattcagtgg gaaggtaact ttaagtaggt gaaaaaagcc atctatttag gctttctctc	540
tcctgcatct caatgcataa cactttaaga aaccagggtt gttgcgatga tcaaatgaga	600
taacataaga gaaacctct aaactaggac ctggagtcag ttccaactg aatgaatcta	660
ttccctggat tcagaagagg tgctgaaatg tggctctcat atgcctacat attctcttcc	720
ttgttcacc caacttctaa aacaaataaa tcagcctccc caactcattc ttaatgtgat	780
aagttgtatt tgcttggaac tactactttt gtacctaggc ttgctcctgt tcattcaact	840
cttttacctc tgacgtgtcg cagaagccag acttgcaata tactcttgtt ttttctatgc	900
attgcttgag gcctatagaa aggtgaagaca aataacattc agtggcagtt ctaggtcaga	960

atgcaaaaca ccctggacaa atttccttgt gtgggttaca gtgtctgtag ctagtctgtag 1020
cagattggat agcgctcagt ttgtggggca acttttgtaa gatgcatacc ctttttaaac 1080
ctgtcttctc agccgcaaaa caagaagaaa gctaaccctt tctgaccctc tcaaacata 1140
aagagaggga aataagttaa tgtttgaaa ggcctgtgtg acccttgaag ccaagacatt 1200
atcaaagtac aaagtaaatt acaagaactg ttgtctatcc cattagtaac tcaaatagta 1260

caaggggctc cacctgtcaa atcctagtta ggctttagt gcacacttgc ttgtctcatg 1320
aggataaaaa tggaaataaa agagtggaa actctcattg ggctcatctt tagaaagttt 1380
tgcagtagaa atccttatag gcacagacag gttctcttct ataggtgcat ttagccccag 1440
tcccttcaact gagccttga gcctggaaat aaggtaagga ttggagcttg gaaccagag 1500
acaagatgtg aggacttttg tgactgtagt ctagtctctt agaatcacgc gttctctatc 1560
tctggacgtg taaatgaga atcatcatca ccaacatcat aattactttt tggttatgat 1620
gtctctttaa cataattaaa tagctaaaat atatggactg ttaactctta ccatgttaat 1680

cactctatta tactatctcc ttaaatcccc aaaaaacttt atgagatgtg gcttattatt 1740
atccttaatt ttcacacaaa aaaatgaggc agtgaaaggt tgaataaatt accccatta 1800
acagctctca aaagcaggga gcatgagatt cctttccca caaatctgct gagctgactg 1860
aaaaatgaag ccctacctct ctgagttcca ttgacctta tatacactag aactggcatg 1920
gagtgggtca 1929

<210> 7

<211> 429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tcctttctca agcgttcgga aattgatgaa tcactttact ctgcagcatt caaagtaact 60

gtgtgcttga cacataggag gaaaagtggg ctctttgaaa tgtgagcaga gcaccgatcg 120
tgtcacctgc cggcgcggtg acctgttca tttccacctg acctctgtg cccaatgtca 180
cctggagcct gaaacctgga agggaaaagi ccttgactgg agtcagtga gagaaaatca 240
tcacctgctt gggcacaac atgcctggtg actgcgtcac tgtctgttaa gtgggatcag 300
ctaatagttg cacagcgggc cttcaaagca tcacggcaga actgatgaag ttcctgtaat 360
gcattccctg tgtgaaggcc ttggacttta gagctcaagt gcgccaggag catcttgagc 420
ttgccgaca 429

<210> 8

<211> 394
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 tgggtttcta ggtttttagtc cttcatattt ctgggttcag ttattctata aacattttca 60
 aaactatgca gaaaataaat tgtccaagtt tgtacttaaa gtgctacaaa taatctaaaa 120
 aaaaaatcag ggtttcaagc tcaaagcttc tcttcaaate aataactgtt gaagatttca 180
 cttatttgca ttttttagtct ttgaggttta gaggaggagg tggggatccg ggggcagtgg 240
 gacaggaaac attgaccaat ttgagaacaa atagaggctt ggaaaatttg ttacatttct 300
 gttctatgtg tgattctggc ctttgtaaca aggaggataa aaagccagaa ctcactttgg 360

 tggcgcctgc agacctctgc actgtaatga cacg 394
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gRNA
 <400> 9
 ctttcatatt tctgggttca gtt 23
 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gRNA
 <400> 10
 cctctgcact gtaatgacac gag 23
 <210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> MYC R3-2_48_gRNA_F
 <400> 11
 tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc gactgaaccc agaaatatga 60
 60

<210> 12
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYC R3-2_48_gRNA_R
 <400> 12
 gactagcctt attttaactt gctattttcia gctctaaaac tcatatttct gggttcagtc 60
 60
 <210> 13
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYC R3-2_402_gRNA_F
 <400> 13
 ttctcttggt ttatatactt tgtggaaagg acgaaacacc gtcgtgtcat tacagtcag 60
 60
 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYC R3-2_402_gRNA_R
 <400> 14
 ccttcatatt tctgggttca gtt 23