

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 10 월 4 일 (04.10.2012)



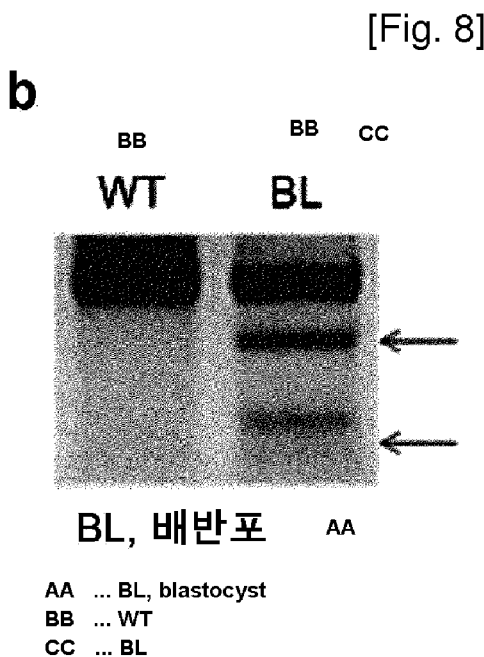
(10) 국제공개번호
WO 2012/134241 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/12 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002419
- (22) 국제출원일: 2012 년 3 월 30 일 (30.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
61/469,171 2011 년 3 월 30 일 (30.03.2011) US
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **주식회사 툴젠 (TOOLGEN INCORPORATION)** [KR/KR]; 서울특별시 금천구 가산디지털 2 로 184, 벽산정인디지털밸리 2 차 제 1208 호 (가산동), 153-783 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김진수 (KIM, Jin Soo)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 낙성대동 산 4-2 번지 교수아파트 122i 동 205 호, 151-851 Seoul (KR). **김석중 (KIM, Seok Joong)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 우성아파트 102 동 203 호, 137-790 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87 길 36, 6 층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ZINC FINGER NUCLEASE TARGETING THE CMAH GENE, AND A USE THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a method for making pig cells from which the swine CMAH (swine cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) gene has been knocked out; a method for making a pig from which the swine CMAH gene has been knocked out; a method for making a pig-derived artificial organ or artificial tissue from which the swine CMAH gene has been knocked out; a zinc finger nuclease targeting the CMAH gene; a polynucleotide coding for the zinc finger nuclease; a vector comprising the polynucleotide; a method for making cells from which the CMAH gene has been knocked out by using the zinc finger nuclease; and an egg of a nonhuman animal from which the CMAH gene has been knocked out, the nonhuman animal and a kit used to make an artificial organ derived from the nonhuman animal. The present invention makes it possible to obtain a large volume of transgenic cells for creating pigs for xenogeneic organ transplantation from which the CMAH gene is eliminated, by using a zinc finger nuclease for CMAH genes.

(57) 요약서 : 본 발명은 돼지 CMAH(swine cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자가 녹아웃된 돼지 세포의 제조방법; 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지의 제조 방법; 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직의 제조 방법; CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제; 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 사용하여 CMAH 유전자가 녹아웃된 세포를 제조하는 방법; 및 CMAH 유전자가 녹아웃된 인간 이외 동물의 난자, 인간 이외 동물, 또는 인간 이외 동물 유래 인공장기 제조용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, CMAH

유전자에 대한 징크 핑거 뉴클레아제를 사용하여, CMAH 유전자가 제거된 이종장기이식용 돼지생산을 위한 형질전환세포를 대량 확보할 수 있다.



공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 돼지 CMAH(swine cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자가 녹아아웃된 돼지 세포의 제조방법; 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지의 제조 방법; 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직의 제조 방법; CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제; 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 사용하여 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하는 방법; 및 CMAH 유전자가 녹아아웃된 인간 이외 동물의 난자, 인간 이외 동물, 또는 인간 이외 동물 유래 인공장기 제조용 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 공여자 장기의 부족은 동종이식 확대적용의 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이종이식에 적합한 동물의 개발이 제시되었으며, 현재로서는 돼지가 가장 뛰어난 후보로 꼽히고 있다. 돼지는 공급 가용성이 높으며, 이들 장기는 인간의 것과 크기가 비슷하다. 게다가, 수세기 동안 사육되어 온 동물이라 취급이 비교적 용이하다. 그러나, 돼지와 인간 세포 간의 탄수화물 조성과 같은 세포 표면 항원의 차이는 수혜 환자에게 장기 이식에 따른 급성 면역반응을 유발하기 쉬워 이종이식의 실패를 야기할 수 있다.
- [3] Halganutziu-Deicher 항원(N-글리코릴뉴라민산, N-glycolylneuraminic acid; NeuGC)은 인간을 제외한 모든 포유류에 존재하는 주요 시알산(sialic acid) 중 하나이다. 대부분의 건강한 인간 개체는 NeuGC에 대한 자연항체를 가지고 있으므로, 이종이식에서 주요한 장벽인 급성 거부반응을 유발할 수 있다. 사이티딘 일인산-N-아세틸뉴라민산 수산화효소(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase; CMAH)는 NeuGC 합성에 필수적인 효소이다. 따라서, 가능한 이종이식 공여 동물(예를 들어 돼지)로부터의 세포나 기관에서 CMAH의 유전적 제거는 이종이식시 자연 인간 NeuGC 항체에 의해 유발될 수 있는 가능한 급성 거부반응을 피할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 이에, CMAH 유전자의 활성을 억제할 수 있는 방법, 및 고효율로 CMAH 유전자의 활성이 억제된 형질전환동물을 제조할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 상태이다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 세포에서 돼지 CMAH 유전자를 인식하고 절단할 수 있도록 변형된 ZFN 쌍을 개발하여 상기 ZFN를 세포 내에서 발현시킨 경우, CMAH 유전자에 효과적으로 돌연변이를 유도하여 번역 프레임 이동 돌연변이를 유발할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 ZFN를 사용하여 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하였다. 나아가 상기 ZFN의 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 이용하여 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 효율적으로 선별하였고, 상기 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돌연변이 세포를 핵이식시킨 난자로부터 배반포를 제조할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[6]

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 하나의 목적은 돼지 CMAH(swine cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자가 녹아아웃된 돼지 세포의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 징크 핑거 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 징크 핑거 도메인은 CMAH 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 징크 핑거 모듈들을 조합시켜 조립한 것이고, CMAH 유전자를 절단시키는 활성을 가지는, CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 징크 핑거 뉴클레아제, 또는 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 얻은 징크 핑거 뉴클레아제에 의해 CMAH 유전자를 절단시키는 단계를 포함하여, CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 CMAH 유전자가 녹아아웃된 인간 이외 동물의 난자, 인간 이외 동물, 또는 인간 이외 동물 유래 인공장기 제조용 키트를 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 발명은 인공 뉴클레아제를 사용하여 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 최초로 개발하였으며, 상기 세포를 고효율로 제조하는데 적용될 수 있는 징크 핑거 뉴클레아제를 새롭게 개발하였다. 또한 형질전환세포를 효율적으로

선별하여 농축하는 방법을 이용하여, 상기 징크 핑거 뉴클레아제에 의해 CMAH가 불활성화된 세포를 고순도로 획득할 수 있고, 이를 난자에 핵이식하여 발생시킨 배반포에서 돌연변이 유전자를 확인함으로써 CMAH 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 돼지를 제작할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이에 따라 CMAH 유전자가 제거된 이종장기이식용 돼지생산을 위한 형질전환세포를 대량 확보할 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17]

도 1은 CMAH 11 L4 ZFN의 아미노산 서열을 나타낸 도이다. 세포 내에서 이들의 발현을 검출하기 위해 포함시킨 HA 태그 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal) 서열은 밑줄로 표시하였다. 표적 염기 서열과 결합할 것으로 예상되는 징크 핑거의 알파 나선 영역(alpha helix region)은 굵은 글씨로 표기하였다.

[18]

도 2는 CMAH 11 R4 ZFN의 아미노산 서열을 나타낸 도이다. 세포 내에서 이들의 발현을 검출하기 위해 포함시킨 HA 태그 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal) 서열은 밑줄로 표시하였다. 표적 염기 서열과 결합할 것으로 예상되는 징크 핑거의 알파 나선 영역(alpha helix region)은 굵은 글씨로 표기하였다.

[19]

도 3은 CMAH 11 ZFN-매개 지놈 변형을 확인하기 위한 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다. ZFN 쌍은 아가로스 젤의 바닥에 나타났다. 생성된 DNA 띠는 화살표

[20]

도 4는 CMAH 11 ZFN 쌍의 목적 유전자 부위의 DNA 서열을 나타낸 도이다. ZFN 인식 요소를 대문자로 표기하였다. 결실은 점선으로 삽입된 염기는 굵은 글씨체 및 밑줄로 표기하였다. wt는 야생형의 서열을 나타낸다.

[21]

도 5는 자성 분류를 위하여 고안된 리포터 구성물을 개략적으로 나타낸 도이다. 리포터 구성물에서 세포 내 발현을 위해 CMV 프로모터를 사용하였고, 유전자 주입 효율을 확인하기 위한 RFP 유전자, ZFN이 결합하여 작용할 수 있는 표적 유전자, 및 ZFN이 제대로 작동하였을 때 발현되도록 설계된 H-2K^b 유전자로 구성되었다.

[22]

도 6은 자성 리포터 선별법을 이용한 형질전환세포주 개발에 대한 개념도이다. ZFN과 리포터 구성물을 동시에 주입한 세포에 48시간 후 H-2K^b에 특이적인 자성구체로 표시한 후 자기력을 이용하여 표지된 세포들을 선별하였다.

[23]

도 7은 자기력을 이용하여 선별한 세포의 형광이미지를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입을 유도한 후 2일째 자성 표지 후 자기력을 이용하여 분리한 세포와 분리 전 세포에 대해 세포 내 RFP 및 GFP 발현 정도를 비교하였다. 분리 전 세포에 비해 분리 후 세포에서 RFP 및 GFP를 발현하고 있는 세포의 비율이 높았다.

- [24] 도 8은 자성 리포터 구성물에 의해 선별된 세포에서 형질전환세포 비율 증가 및 돌연변이 염기서열을 나타낸 도이다. (a)는 ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입 후 48시간 후 자성 표지하여 선별한 세포에 있어서 유전자 변이가 발생한 세포의 비율을 T7E1 분석 방법으로 분석한 결과이다. 선별하기 전의 세포(3.5%)에 비해 선별된 세포(15%)에서 높은 비율의 형질전환세포를 확인하였다. (b)는 선별된 세포 중 GFP가 발현되고 있는 세포를 취하여 핵이식을 시도한 결과이다. 체외 수정(in vitro fertilization)시 40개의 세포 중 3개의 세포에서 배반포(BL)가 형성되었고 이들 세포를 분석하였을 때 높은 비율로 형질전환 되어있는 것을 확인하였다. (c)는 배반포(BL) 단계의 세포에서 도입된 2종의 서로 다른 돌연변이 염기서열이다.
- [25] 도 9는 자성 리포터 선별법을 이용한 형질전환 단일 세포 클론을 나타낸 도이다. (a)는 ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입 후 48시간 후 자성 표지하여 선별한 세포를 1.2×10^3 세포/플레이트의 밀도로 6-웰 플레이트에 부착시킨 후 16일간 배양시켜 단일 세포로부터 형성된 콜로니이다. (b)는 각각의 단일 콜로니에 대해 형질전환된 세포의 비율을 확인하기 위한 T7E1 분석결과이다. (c)는 단일 콜로니에서 얻은 PCR 산물의 염기서열 분석결과이다. 6개 클론 중 4개 클론에 대해 분석하여 모두 형질전환된 서열을 포함하고 있는 것을 확인하였다.
- [26] 도 10은 하이그로마이신 선별을 위하여 고안된 리포터 구성물을 개략적으로 나타낸 도이다. 리포터 구성물에서 세포 내 발현을 위해 CMV 프로모터를 사용하였고, 유전자 주입 효율을 확인하기 위한 RFP 유전자, ZFN이 결합하여 작용할 수 있는 표적 유전자, 및 ZFN이 제대로 작동하였을 때 발현되도록 설계된 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(hygromycin phosphotransferase; HPT) 및 eGFP 유전자로 구성되었다.
- [27] 도 11은 하이그로마이신 리포터 선별법을 이용한 형질전환 세포주 개발을 위한 전체 모식도이다. 0일에 돼지 CMAH 유전자를 녹아웃시킬 수 있는 한 쌍의 ZFN($36 \mu\text{g}$)과 하이그로마이신 선별을 위한 리포터 구성물($9 \mu\text{g}$)을 전기자극을 통해 돼지 귀조직 세포 내로 주입한 후 1×10^6 세포를 100 mm 접시에 각각 분주하여 배양하였다. ZFN 및 리포터 구성물 주입 후 2일째에 세포수는 배양접시 당 3×10^5 개였고 하이그로마이신 B를 $300 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하여, 4일째에 하이그로마이신 B가 제거된 새로운 배양액으로 교체해 주었다. 이때, 하이그로마이신 처리에 의해 살아남은 세포 수는 1.5×10^4 개 이었다. 7일째 초기콜로니를 형성하였고, 18일에 완전한 콜로니를 형성하였으며, 22일에 형성된 콜로니를 새로운 96-웰 플레이트에 옮겨 형질전환 세포주를 제작하였다.
- [28] 도 12는 하이그로마이신 선별 전 후 세포의 형광이미지를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입을 유도한 후 2일째 하이그로마이신 B 처리 전과 4일째 비처리 또는 처리 후의 세포 내 RFP 및 GFP 발현 정도를 비교하였다.

처리 전이나 비처리구에 비해 처리구에서 RFP 및 GFP를 발현하는 세포의 비율이 높았다.

- [29] 도 13은 하이그로마이신 B에 의해 선별된 세포에 대한 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물의 세포내 도입 후 2일째부터 2일 동안 하이그로마이신 B(300 μ g/ml)를 처리하여 선별된 세포에 있어 유전자 변이가 발생한 세포의 비율을 T7E1 assay 방법을 통해 분석하였다. 그 결과, 선별된 세포에 있어서 형질전환된 세포비율이 증가하는 것을 확인하였다. 즉, 비처리된 대조구(3.1%)에 비해 처리구(12.1%)에서 높은 비율의 형질전환된 세포를 확인하였다.
- [30] 도 14는 하이그로마이신 B 리포터 선별법을 이용하여 획득한 형질전환 단일 세포 클론을 나타낸 도이다. (a)는 ZFN과 리포터 구성물의 세포내 도입 후 2일째부터 2일 동안 하이그로마이신 B(300 μ g/ml)를 처리하여 선별된 세포를 30일간 배양하여 형성된 단일세포로부터의 콜로니이다. (b)는 각각의 단일 콜로니에 대한 형질전환된 세포의 비율을 확인하기 위한 T7E1 분석 결과이다. (c)는 단일 콜로니에서 얻은 PCR 산물의 염기서열 분석결과이다. 9개 클론 중 2개 클론에 대해 분석하여 모두 형질전환된 서열을 포함하고 있는 것을 확인하였다.
- [31] 도 15는 유세포 분석법을 이용한 선별을 위하여 고안된 리포터 구성물을 개략적으로 나타낸 도이다. 리포터 구성물은 세포 내 발현을 위해 CMV 프로모터를 사용하였고, 유전자 주입 효율을 확인하기 위한 RFP 유전자, ZFN이 결합하여 작용할 수 있는 표적 유전자, 및 ZFN이 제대로 작동하였을 때 발현되도록 설계된 eGFP 유전자로 구성되었다.
- [32] 도 16은 ZFN과 리포터 구성물을 이용한 FACS 분류 결과를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물을 동시에 주입한 세포에 48시간 후 WT에서는 보이지 않던 RFP 및 GFP를 동시에 발현하는 세포(1%)를 FACS를 이용하여 선별하였다.
- [33] 도 17은 FACS 선별 전 후 세포의 형광이미지를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입을 유도한 후 3일째 FACS를 이용하여 분리한 세포와 분리되지 않은 세포를 형광현미경으로 관찰하여 RFP와 GFP의 발현정도를 확인하였다.
- [34] 도 18은 FACS에 의해 선별된 세포에 대한 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물을 동시에 주입한 세포에 48시간 후 RFP 및 GFP에 대해 양성인 세포들을 FACS를 이용하여 선별한 후 유전자 변이가 발생한 세포의 비율을 T7E1 분석을 통해 확인하였다. 선별하기 전 세포(0.5% 미만)에 비해 선별된 세포(13%)에서 높은 비율의 형질전환된 세포를 확인하였다.
- [35] 도 19는 CMAH 녹아웃 세포를 이식한 난자로부터 발달된 배반포의 유전자 돌연변이를 나타낸 도이다. ZFN과 리포터 구성물을 통해 FACS sorting한 세포를 이용하여 돼지의 난자에 핵이식을 실시하였고 체외수정(in vitro fertilization)을 실시하였다. 이를 통해 발달된 배반포에서 ZFN의 작용에 의해 돌연변이가

도입된 것을 확인할 수 있었다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 하나의 양태로서, 본 발명은 CMAH 유전자를 표적으로 하는 뉴클레아제를 제공한다.

[38] 본 발명에서, "CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase)"는 시알산(sialic acid)의 생합성에 관여하는 효소이다. 시알산은 리간드-수용체, 세포-세포 및 세포-병원체 상호작용과 관련된 당포합체(glycoconjugate)의 탄수화물 사슬의 말단 요소(terminal component)이다. 포유류 세포에서 발견되는 가장 보편적인 시알산의 두 가지 형태는 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid; NeuAc) 및 이의 수산화유도체(hydroxylated derivative)인 N-글리코릴뉴라민산(N-glycolylneuraminic acid; NeuGc)이다. 다른 포유류에는 시알산이 풍부하게 존재하는 반면 정상 인간조직에서는 NeuGc가 검출되지 않으며, 실제로 NeuGc는 인간에서 면역성을 갖는다. 인간에서 NeuGc의 부재는 인간에서 NeuGc 생합성에 관여하는 효소인 CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase)를 코딩하는 인간 유전자 CMAH 내의 결실로 인할 수 있다. 마우스, 돼지 및 침팬지 수산화효소를 코딩하는 서열은 cDNA 클로닝에 의해 얻어지며 높은 상동성을 갖는다. 그러나, 이에 상응하는 인간 cDNA는 이들과 달리 5' 영역에 92 bp의 결실이 존재한다. 상기 결실은 마우스 수산화효소 유전자의 엑손 6에 해당하는 것으로 인간에서 프레임 이동(frameshift) 돌연변이와 폴리펩티드 사슬의 조기종결을 야기한다. 이와 같이 결실로 인간 수산화효소 mRNA는 활성효소를 코딩할 수 없다. 따라서, 정상 인간 조직에서는 NeuGc가 검출되지 않는다.

[39] 본 발명에 따른 뉴클레아제는 지놈(genome)상의 DNA의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 인공 뉴클레아제를 포함한다. 상기 뉴클레아제는 지놈 상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인과 절단하는 도메인이 융합된 뉴클레아제가 포함될 수 있으며, 그 예로 메가뉴클레아제(meganuclease), 지놈 상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인인 식물 병원성 유전자에서 유래한 TAL 작동자(transcription activator-like effector) 도메인과 절단 도메인이 융합된 융합 단백질, 또는 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease)가 제한 없이 포함될 수 있다.

[40] 바람직하게는, 상기 뉴클레아제는 징크 핑거 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 징크 핑거 도메인은 CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 징크 핑거 모듈들을 조합시켜 조립한 것이고, CMAH 유전자를 절단시키는 활성을 가지는, CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거

뉴클레아제일 수 있다.

- [41] 본 발명에서, "징크 핑거 뉴클레아제 (zinc finger nuclease)"란 징크 핑거 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합단백질을 의미하며, 공지의 또는 상용의 징크 핑거 뉴클레아제 모두를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "징크 핑거 뉴클레아제" 와 "ZFN"은 혼용될 수 있다.
- [42] 일반적으로 ZFN의 징크 핑거 도메인은 ZFN의 아미노 말단(N-말단) 근처에, 뉴클레오티드 절단 도메인(또는 절단 하프 도메인)은 카르복시 말단(C-말단) 근처에 위치하는데, 바람직하게 본 발명의 ZFN 역시 N-말단에 징크 핑거 도메인이 위치하며, C-말단에는 뉴클레오티드 절단 도메인(또는 절단 하프 도메인)이 위치할 수 있다.
- [43] 각각의 단량체(monomer) 징크 핑거 뉴클레아제는 정방향 염기가닥(forward strand)과 역방향 염기가닥(reverse strand)에서 5 내지 6개의 염기 간격을 두고 9 내지 12개의 특정 염기서열을 인식하여 붙는다. 두 징크 핑거 뉴클레아제가 특정 염기서열에 붙으면 카르복실기 말단에 위치한 절단 도메인이 이량체(dimer)를 형성하여 염기서열에 이중가닥손상(double-strand break)을 일으키게 되고(Smith J. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27:674-681, 1999), 다세포 동물의 세포는 이와 같은 이중가닥손상을 받았을 때, 신속하게 상동 재조합(homologous recombination)과 비상동 말단 결합(non-homologous end joining) 같은 염기서열 복구 기작(DNA repair system)에 의해서 복구된다. 이러한 복구 기작 중에서 비상동 말단 결합이 주요 복구 기작으로 작용하는데, 상동성(homology)이 없이 또는 미세상동성(microhomology)만으로 단면을 이어 붙이기 때문에 종종 염기서열이 손실되거나 삽입되는 오류가 발생한다(Kristoffer V. & Lawrence F. P., *Oncogene*, 22:5792-5812, 2003). 즉, 변이가 발생하게 된다. 이와 같은 방법으로 징크 핑거 뉴클레아제를 이용하여 유전자를 녹아웃시킬 수 있다.
- [44] 본 발명에서, "CMAH 유전자를 표적으로 하는"은 CMAH 유전자의 특정 핵산 서열을 특이적으로 인식하여 절단하는 것을 의미한다. 본 발명에서는 징크 핑거 도메인이 CMAH 유전자의 특정 핵산 서열을 특이적으로 인식하고, 상기 징크 핑거 도메인과 펩티드 결합으로 연결된 뉴클레오티드 절단 도메인에 의해 CMAH 유전자에 절단이 발생될 수 있다. 상기 "서열"이란 그 길이와 무관하게 뉴클레오티드 서열을 의미하며, 이는 직선형, 원형 또는 가지형의 DNA 또는 RNA가 될 수도 있고, 단일 나선형이거나 이중 나선형일 수 있다.
- [45] 본 발명에 따른 징크 핑거 뉴클레아제의 CMAH 표적 서열의 위치는 특별히 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는, CMAH 유전자의 엑손 4(coding region 4)에 위치하는 것일 수 있다.
- [46] 본 발명에서 용어, "표적 서열" 또는 "표적 부위"란 뉴클레아제가 특정 유전자에 결합하여 절단할 수 있는 특정 서열 또는 부위를 의미하는 것으로서, 뉴클레아제의 특정 인식 서열 또는 인식 부위, 및 뉴클레아제가 절단하는 서열 또는 부위가 포함된 것일 수 있다.

- [47] 본 발명에서 용어, "인식 서열" 또는 "인식 부위"란 뉴클레아제가 결합할 수 있는 핵산의 부분을 한정하는 핵산 서열일 수 있다.
- [48] 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 제1 징크 핑거 뉴클레아제 및 제2 징크 핑거 뉴클레아제로 된 쌍을 포함할 수 있으며, 각 징크 핑거 뉴클레아제는 독립적으로 징크 핑거 도메인을 포함할 수 있다.
- [49] 상기 징크 핑거 도메인(zinc finger domain)은 하나 또는 수 개의 징크 핑거 모듈을 통하여 서열 특이성을 갖는 방식으로 CMAH 유전자의 DNA 염기서열과 결합하는 단백질을 의미한다. 상기 징크 핑거 도메인은 징크 핑거 모듈을 조합하여 돼지 CMAH 유전자의 선택된 서열에 결합하도록 설계할 수 있다.
- [50] 상기 징크 핑거 모듈이란 아연 이온과 배위결합을 하는 동안에 구조가 안정적인 도메인의 내부에 있는 아미노산 서열을 의미한다.
- [51] 상기 CMAH 유전자의 특정 서열을 인식하는 징크 핑거 도메인의 설계는 툴젠(ToolGen)에서 개발한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 상기 징크 핑거 도메인은 표 1의 징크 핑거 모듈들을 조합하여 조립할 수 있다.
- [53] 상기 징크 핑거 도메인은 DNA 3bp(염기쌍)를 인식하는 징크 핑거 모듈을 2개 이상 연결한 구조로 되어 있다. 바람직하게, 상기 징크 핑거 모듈은 아미노산 링커로 연결될 수 있으며, 이때 아미노산 링커는 3개 내지 20개의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 바람직하게는 3개 내지 9개의 아미노산으로 이루어질 수 있다.
- [54] CMAH 유전자의 특정 염기서열에 결합하는 징크 핑거 도메인은 적절한 개수의 아미노산으로 이루어진 아미노산 링커를 사용하여 2개 이상의 징크 핑거 모듈을 연결하여 제작할 수 있다. 이때, 징크 핑거 모듈과 모듈 사이를 연결하는 아미노산 링커의 아미노산의 개수를 적절하게 조절하여 각 징크 핑거 모듈이 결합하는 CMAH 유전자 상의 염기서열, 염기서열 사이의 간격 등을 조절함으로써, CMAH 유전자 중 선택된 서열에 결합하는 활성을 갖는 징크 핑거 도메인을 제작할 수 있다. 보다 바람직하게는 표 1에 기재된 2개 이상의 징크 핑거 모듈들을 조합하여 조립하는 것이다.
- [55] 각각의 징크 핑거 모듈들은 독립적으로 CMAH 유전자의 DNA 염기서열을 인식하기 때문에, 예를 들어 3 또는 4개의 모듈로 구성된 징크 핑거 도메인은 CMAH 유전자의 9 또는 12 bp 서열에 결합할 수 있다. 따라서, 이량체(dimer)로 작용하는 징크 핑거 뉴클레아제의 경우, 각각 3 또는 4개의 징크 핑거 모듈로 구성된 징크 핑거 뉴클레아제 한 쌍은 18 내지 24 bp를 특이적으로 인식할 수 있다. 상기 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제를 제작하기 위하여 표 2에 기재된 6개의 징크 핑거 모듈의 표적 부위를 고려하여 적절한 종류 및 개수의 징크 핑거 모듈을 선택하여, 돼지 CMAH 유전자의 특정 염기서열에 결합하는 활성을 가지는 징크 핑거 도메인을 제작할 수 있다.
- [56] 본 발명에 따른 CMAH 유전자의 특정 서열에 결합하는 징크 핑거 도메인은

AAG, CAG, GAC, CGA를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하거나, CGA, GGA, TGG, TGG를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 제1 징크 핑거 뉴클레아제의 제1 징크 핑거 도메인이 AAG, CAG, GAC, CGA를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하고, 제2 징크 핑거 뉴클레아제의 제2 징크 핑거 도메인이 CGA, GGA, TGG, TGG를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것일 수 있다.

[57] 이에 따라, 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제의 CMAH 유전자 내 표적 서열은 AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 및 TGG로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 또는 TGG는 각각 독립적으로 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 징크 핑거 모듈에 의해 결합되고, 상기 선택된 징크 핑거 모듈을 하나 이상 포함하는 것일 수 있다.

[58] 바람직하게, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 1, 2, 3 및 4로 표시되는 징크 핑거 모듈을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 융합 단백질의 N-말단으로부터 서열번호 1, 2, 3 및 4로 표시되는 징크 핑거 모듈을 순차적으로 포함할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 서열번호 35의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 도메인일 수 있다.

[59] 또한, 바람직하게 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 5, 5, 6 및 1로 표시되는 징크 핑거 모듈을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 융합 단백질의 N-말단으로부터 서열번호 5, 5, 6 및 1로 표시되는 징크 핑거 모듈을 순차적으로 포함할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 서열번호 36의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 도메인일 수 있다.

[60] 본 발명에서 용어, "절단"은 돼지 CMAH 유전자 뉴클레오티드 분자의 공유결합된 백본의 연결을 해제하는 것을 의미하며, "뉴클레오티드 절단 도메인"은 이러한 돼지 CMAH 유전자의 뉴클레오티드 절단을 위한 효소적 활성을 갖는 폴리펩티드 서열을 의미한다.

[61] 상기 뉴클레오티드 절단 도메인은 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 얻을 수 있다. 뉴클레오티드 절단 도메인을 얻어낼 수 있는 엔도뉴클레아제의 예로는 제한성 엔도뉴클레아제, 회귀성 엔도뉴클레아제 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 효소들은 뉴클레오티드 절단 도메인의 기원으로 사용할 수 있다. 또한, 상기 뉴클레오티드 절단 도메인은 단일 뉴클레오티드 서열을 절단할 수 있을 뿐만 아니라, 그 절단 도메인의 기원에 따라 이중 결합의 뉴클레오티드 서열을 절단할 수 있다. 이러한 의미에서 이중 결합된 뉴클레오티드 서열을 모두 절단하는 절단 도메인을 절단 하프 도메인으로 사용하기도 한다.

[62] 상기 제한성 엔도뉴클레아제는 많은 부류의 중에 존재하고, DNA(인식 부위)와 서열 특이적 결합이 가능하며, 결합 부위 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 어떤 제한성 엔도뉴클레아제, 예를 들어 타입 II는 인식 부위가 제거된 부위에서도

DNA를 절단하여 분리된 결합 도메인과 절단 도메인을 가진다. 예를 들어, 타입 IIs 효소인 *FokI*는 하나의 나선에서 인식 부위와 9 뉴클레오티드 떨어진 장소 및 다른 하나의 나선에서 인식 부위로부터 13 뉴클레오티드 떨어진 장소에서 DNA의 이중 나선 절단을 촉진한다.

- [63] 상기 뉴클레오티드 절단 도메인은 타입 IIs 제한 엔도뉴클레아제 유래일 수 있으며, 상기 타입 IIs 제한 엔도뉴클레아제는 이에 제한되는 것은 아니나 *FokI*, *AarI*, *AceIII*, *Acil*, *AloI*, *BaeI*, *Bbr7I*, *CdiI*, *CjePI*, *Ecil*, *Esp3I*, *FinI*, *MboI*, *SapI* 또는 *SspD5I* 일 수 있고, 바람직하게는 *FokI* 일 수 있다.
- [64] 또한, 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제는 핵 위치 신호(nuclear localization signal) 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 핵 위치 신호는 본 발명의 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제에 의하여 돼지 CMAH 유전자를 녹아웃시키기 위하여 징크 핑거 뉴클레아제를 핵 내로 이동시키기 위한 수단으로 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 핵 위치 신호는 서열번호 39의 아미노산 서열(PPKKKRKV)로 표시되는 핵 위치 신호일 수 있다.
- [65] 또한, 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제는 서열번호 37 또는 서열번호 38의 아미노산 서열로 표시되는 징크 핑거 뉴클레아제일 수 있다.
- [66]
- [67] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [68] 상기 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥으로서, 본 발명에 따른 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [69] 상기 폴리뉴클레오티드는 공지된 형태로 세포 내 전달될 수 있으며, 일 예로 종래의 유전자 운반체로 이용되어 온 레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 아데노 연관 바이러스 벡터(adenoviral-associated viral vector)를 포함하는 바이러스성 벡터, 리포솜, 폴리라이신(polylysine), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine(PEI)), 프로타민(protamine), 히스톤(histone), 폴리에스테르아민(polyester amine) 및 이들 각각의 변형체를 포함하는 양이온성 고분자를 비롯하여, 미셀, 에멀전, 나노입자 등의 비바이러스성 벡터를 사용할 수 있으며, 벡터 시스템 외에도 공지된 세포 내 물질전달 펩티드 등을 활용하여 효율적으로 세포 내로 전달될 수 있다.
- [70]
- [71] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [72] 상기 벡터는 세포 내에 도입하여 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제를 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 등 공지의 발현벡터를 사용할 수 있으며, 벡터는 DNA 재조합 기술을

이용한 임의의 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있다.

- [73] 본 발명의 벡터는 본 발명에 따른 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 재조합 벡터일 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된"은 발현 조절 서열이 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 전사 및 해독을 조절하도록 연결된 것을 말하며, 발현 조절 서열(프로모터 포함)의 조절하에 폴리뉴클레오티드 서열이 발현되어 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 징크 핑거 뉴클레아제가 생성되도록 정확한 해독 프레임을 유지시키는 것을 포함한다.

[74]

- [75] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포 및 이의 제조방법을 제공한다.

- [76] 상기 세포의 제조 방법은 CMAH 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 인공 뉴클레아제에 의해 세포에서 CMAH 유전자를 절단시키는 단계를 포함한다.

- [77] 상기 세포는 세포 내 CMAH 유전자 중 하나 또는 두개의 대립유전자가 녹아아웃된 세포일 수 있다.

- [78] 본 발명에서 용어, "녹아아웃(knockout)"은 돼지 CMAH 유전자의 발현을 억제하는 것을 의미하며, 본 발명에서는 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제에 의하여 돼지 CMAH 유전자에 돌연변이를 유발하여 녹아아웃시키게 된다.

- [79] 상기 뉴클레아제는 CMAH 유전자의 지놈(genome)상의 DNA의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 인공 뉴클레아제일 수 있다. 상기 뉴클레아제는 지놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인과 절단하는 도메인이 융합된 뉴클레아제가 포함될 수 있으며, 그 예로 메가뉴클레아제(meganuclease), 지놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인인 식물 병원성 유전자에서 유래한 TAL 작동자(transcription activator-like effector) 도메인과 절단 도메인이 융합된 융합 단백질, 또는 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease)가 제한 없이 포함될 수 있다.

- [80] 바람직하게는, 상기 뉴클레아제는 징크 핑거 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 징크 핑거 도메인은 CMAH 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 징크 핑거 모듈들을 조합시켜 조립한 것이고, CMAH 유전자를 절단시키는 활성을 가지는, CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제일 수 있다.

- [81] 상기 뉴클레아제의 표적 서열은 돼지 CMAH 유전자의 엑손 4에 위치하는 것일 수 있다.

- [82] 또한, 상기 뉴클레아제는 한쌍 또는 두쌍 이상의 징크 핑거 뉴클레아제일 수 있다.

- [83] 상기 뉴클레아제는 징크 핑거 뉴클레아제이고, 돼지 CMAH 유전자의 표적서열

내, 상기 징크 핑거 뉴클레아제에 의해 절단된 부위에 NHEJ(non-homologous end joining)에 의해 번역 프레임 이동 돌연변이가 형성되어 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃될 것일 수 있다.

- [84] 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 AAG, CAG, GAC, CGA를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하거나, CGA, GGA, TGG, TGG를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 징크 핑거 도메인을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 제1 징크 핑거 뉴클레아제의 제1 징크 핑거 도메인이 AAG, CAG, GAC, CGA를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하고, 제2 징크 핑거 뉴클레아제의 제2 징크 핑거 도메인이 CGA, GGA, TGG, TGG를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [85] 이에 따라, 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제의 CMAH 유전자 내 표적 서열은 AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 및 TGG로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 또는 TGG는 각각 독립적으로 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 징크 핑거 모듈에 의해 결합되고, 상기 선택된 징크 핑거 모듈을 하나 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [86] 바람직하게, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 1, 2, 3 및 4로 표시되는 징크 핑거 모듈을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 융합 단백질의 N-말단으로부터 서열번호 1, 2, 3 및 4로 표시되는 징크 핑거 모듈을 순차적으로 포함할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 서열번호 35의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 도메인일 수 있다.
- [87] 또한, 바람직하게 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 5, 5, 6 및 1로 표시되는 징크 핑거 모듈을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 융합 단백질의 N-말단으로부터 서열번호 5, 5, 6 및 1로 표시되는 징크 핑거 모듈을 순차적으로 포함할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 서열번호 36의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 도메인일 수 있다.
- [88] 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 서열번호 37 또는 서열번호 38의 아미노산 서열로 표시되는 징크 핑거 뉴클레아제일 수 있으며, 또는 서열번호 37의 아미노산 서열로 표시되는 징크 핑거 뉴클레아제 및 서열번호 38의 아미노산 서열로 표시되는 징크 핑거 뉴클레아제의 쌍일 수 있다.
- [89] 상기 세포는 본 발명의 징크 핑거 뉴클레아제에 의하여 CMAH 유전자를 녹아아웃시키고자 하는 세포로서, E. coli와 같은 원핵세포; 이스트, 진균, 원생 동물, 고등 식물, 곤충과 같은 진핵 세포; 양서류 세포; 어류 세포; CHO, HeLa, COS-1, HEK, HCT116, K562, BJ fibroblast와 같은 포유류 세포, 예를 들어 배양된 세포(시험관 내), 이식편 및 1차 배양물(시험관 내 및 생체 외) 및 생체 내 세포; 또는 인간 공여자 및 환자로부터 분리된 혈액 및 다양한 조직 유래의 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 돼지 유래 세포, 보다 구체적으로 돼지 유래의 프라이머리 섬유아세포, 돼지 귀조직 세포 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [90] 바람직하게, 본 발명의 돼지 CMAH 유전자를 녹아웃시키는 방법은 (a) 본 발명에 따른 징크 핑거 뉴클레아제를 세포 내에서 발현시키거나 세포 외에서 발현하여 상기 세포 내로 도입하는 단계; (b) 상기 세포 내에서 발현되거나 도입된 징크 핑거 뉴클레아제가 세포 내 돼지 CMAH 유전자에 이중 가닥 손상을 일으키는 단계; 및 (c) 상기 이중 가닥 손상에 의해 돼지 CMAH 유전자에 돌연변이가 유발되는 단계를 포함할 수 있다.
- [91] 또한, 구체적인 일 양태로서, 상기 방법에는 상기 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 돼지 유래 세포에 도입하는 단계; 및 상기 리포터 구성물 상의 상기 표적 서열이 상기 뉴클레아제에 의해 절단된 돼지 유래 세포를 상기 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하여, 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 상기 뉴클레아제에 의해 녹아웃된 돼지 유래 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [92] 상기 돼지 유래 세포에 리포터 구성물을 도입시키는 단계에서, 상기 리포터 구성물은 뉴클레아제에 의해 인식되는 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하며, 상기 뉴클레아제가 상기 표적 서열에 결합하여 리포터 구성물을 절단하는지 여부에 따라 상기 리포터 유전자의 발현 여부가 결정되도록 설계될 수 있다.
- [93] 상기 리포터 구성물은 PCT/KR2012/001367호에 기재된 것일 수 있으며, 본원발명의 범위는 상기 출원에 기재된 내용을 포함한다.
- [94] 본 발명의 일 구현예에 따른 리포터 구성물은 상기 뉴클레아제가 상기 표적 서열에 결합하여 리포터 구성물을 절단하지 않으면 리포터 유전자가 발현되지 않으나, 상기 뉴클레아제가 상기 표적 서열에 결합하여 리포터 구성물을 절단하면 절단된 DNA는 세포 또는 생체 내 존재하는 상동 재조합(homologous recombination, HR) 또는 단일 가닥 중합(single strand annealing, SSA) 기작 또는 NHEJ로 복구되어 리포터 유전자가 발현되게 할 수 있다. 예를 들어, 상기 리포터 구성물은 도 5, 10, 15에 기재된 구성을 가질 수 있다.
- [95] 뉴클레아제를 사용하여 형질전환 세포를 만듦에 있어서, 뉴클레아제를 수정란 내에 직접 주입하게 되면 돼지나 소 같은 대동물은 수정란의 발생과정에서 발생하는 모자이크 현상으로 인해 형질전환 효율이 낮아지는 문제점이 있다. 따라서, 주로 핵이식에 의한 복제 기법이 주로 이용되게 되는데, 이때 형질전환된 세포의 대량생산 및 고순도 획득법이 요구되나, 일반적으로 인공 뉴클레아제에 의해 유도되어 유전적인 변형을 가지고 있는 돌연변이 세포와 야생형 세포를 표현형적으로 구분하기는 매우 어려우므로, 돌연변이 세포만을 분리하는데 제약이 많다.
- [96] 이에 본 발명에서는 뉴클레아제가 표적 서열에 결합하여 리포터 구성물을 절단하는지 여부에 따라 리포터 유전자의 발현 여부가 결정되도록 설계된 리포터 구성물을 사용하여, 리포터 유전자가 발현된 세포만을 분리하였다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 설명한 리포터 구성물을 돼지 유래 세포 내 도입시켜, 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하는 단계를 포함한 경우에,

상기 단계를 포함하지 않은 경우에 비하여 CMAH 유전자가 돌연변이된 세포의 분리 비율이 현저히 높았다. 즉, 본 발명의 상기 방법을 사용하면 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 세포를 고순도로 획득할 수 있다.

[97] 상기 뉴클레아제에 의해 표적 서열이 변형된, 돌연변이된 세포를 분리하는데 있어서, 상기 돌연변이는 국지적 돌연변이 뿐만 아니라, 결실, 삽입, 역위, 중복, 전좌와 같은 염색체 재배열과 같은 돌연변이도 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[98]

[99] 또 다른 양태로서, 본 발명은 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 뉴클레아제를 준비하는 단계; 상기 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 돼지 유래 세포에 도입시키는 단계; 리포터 구성물이 도입된 상기 돼지 유래 세포에서 지놈 상 돼지 CMAH 유전자를 상기 뉴클레아제로 절단하여 녹아웃시키는 단계; 상기 리포터 구성물 상의 상기 표적 서열이 상기 뉴클레아제에 의해 절단된 돼지 유래 세포를 상기 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하여, 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 상기 뉴클레아제에 의해 녹아웃된 돼지 유래 세포를 분리시키는 단계; 및 핵이식 수용체 돼지 난자에서 핵을 제거하고, 상기 분리된 돼지 유래 세포의 핵을 이식하는 단계를 포함하여, 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 난자 세포의 제조방법을 제공한다.

[100] 상기 "핵이식(nuclear transfer)"이란, 세포의 핵을, 이미 핵을 제거한 난자에 넣어 이식시키는 것을 의미하며, 이런 핵이식된 수정란을 착상시켜서 태어난 개체는 핵공여 세포의 유전적 물질이 핵수여 세포질로 그대로 전달되었기 때문에 유전적으로 완전히 동일한 복제 개체이다.

[101] 난자의 유전 물질을 제거하는 방법에는, 물리적인 방법, 화학적인 방법, Cytochalasin B를 사용한 원심분리법 등이 있다(Tatham *et al.*, *Hum. Reprod.*, 11(7):1499-1503, 1996). 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 체세포는 세포막융합법, 세포질 내 미세주입법 등을 이용하여 핵이 제거된 난자 내로 도입될 수 있다. 세포막융합법은 간단하며 대규모 수정한 생산에 적합하다는 장점이 있으며, 세포질 내 미세주입법은 핵과 난자 내 물질들과의 접촉을 극대화시킨다는 장점이 있다. 체세포와 핵이 제거된 난자와의 융합은 전기자극을 통하여 세포막의 점도를 변화시켜 융합시키는 방법을 통하여 제조한다. 이때, 미세전류·전압을 자유롭게 조절할 수 있는 전기융합기를 이용하면 편리하다.

[102]

[103] 또 다른 양태로서, 본 발명은 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지의 제조 방법을 제공한다.

[104] 상기 방법은 돼지 CMAH 유전자내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 뉴클레아제를 준비하는 단계; 상기 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 돼지 유래 세포에 도입시키는 단계; 상기 돼지 유래 세포에서 지놈 상 돼지 CMAH 유전자를 상기 뉴클레아제로 절단하여 녹아웃시키는 단계;

상기 리포터 구성물 상의 상기 표적 서열이 상기 뉴클레아제에 의해 절단된 돼지 유래 세포를 상기 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하여, 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 상기 뉴클레아제에 의해 녹아웃된 돼지 유래 세포를 분리시키는 단계; 핵이식 수용체 돼지 난자에서 핵을 제거하고, 상기 분리된 돼지 유래 세포의 핵을 이식하여 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 난자 세포를 제조하는 단계; 및 상기 돼지 난자 세포로부터 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

- [105] 본 발명에서는 상기 기술한 방법으로 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 난자 세포를 제조한 후, 상기 돼지 난자 세포로부터 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지를 제조하는 방법을 제공한다.
- [106] 상기 돼지 난자 세포로부터 형질전환 돼지의 제조는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 핵이식된 난자는 활성화시켜 이식 가능한 단계까지 발생시킨 후 대리모로 착상되어, 형질전환 돼지가 제조될 수 있다.
- [107] 상기 돼지는 CMAH 유전자가 결손된 돼지로서, 인간에 이종장기이식시 면역거부반응을 일으키지 않은 돼지일 수 있다.
- [108] 본 발명에서 용어, "장기이식(transplantation)"은 기능이 손상된 또는 부재하는 조직 또는 장기를 대체할 목적으로 하나의 개체(공여자)로부터 다른 개체(수혜자)로 또는 환자 본인의 공여부위로부터 이를 필요로 하는 자리로 조직 또는 장기를 옮기는 것을 의미한다. 조직 재생의학이 발달함에 따라, 해당 위치에서 성장하여 장기를 생성할 수 있는 환자 본인의 세포(예를 들어 줄기세포, 해당 장기로부터 추출한 세포 등)를 사용할 수 있다. 이와 같이 동일한 사람의 세포 및/또는 조직을 본인에게 이식하는 것을 자가이식 autograft), 동일한 종의 두 개체 간에 이식하는 것을 동종이식(allograft)이라 한다. 나아가 하나의 종으로부터 다른 종의 개체로 세포, 조직 또는 장기의 이식 또한 가능하다. 이를 "이종이식(xenograft or xenotransplantation)"이라 하며, "이종장기이식"이라고도 한다. 인간에 있어서 이종장기이식은 말기 장기 이상을 치료할 수 있는 가능성을 제공하지만, 면역거부반응 등의 의학적 문제와 법적, 윤리적 문제점이 뒤따른다. 이러한 이종장기이식을 위한 최적의 후보 동물은 돼지이다. 돼지는 인간의 장기와 비슷한 크기의 장기를 가지며, 계통발생적으로 인간과 소원하여 교차종 질병전이(cross-species disease transmission) 위험이 낮다.
- [109] 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 세포 내로 도입되었을 때 돼지 CMAH 유전자 상의 원하는 부위에 이중 가닥 손상을 유도할 수 있으며, 돼지 CMAH 유전자 상에 이중 가닥 손상이 발생하면 세포는 자체적으로 가지고 있는 수리 기작을 이용하여 손상된 부위를 고치게 된다. 이때, 세포는 비상동 말단 결합(non-homologous end joining; NHEJ) 방식으로 손상된 부위를 고치게 되고, 끊어진 DNA 가닥 말단에서 삽입(insertion)이나 결실(deletion)이 일어나는 오류가 발생하기 쉬운(error-prone) 방향으로 수리가 진행된다. 따라서, 돼지 CMAH 유전자에 돌연변이가 유발되고, 궁극적으로 돼지 CMAH 유전자를 녹아웃시킬

수 있다.

[110]

[111] 또 다른 양태로서, 본 발명은 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직의 제조 방법을 제공한다.

[112] 상기 방법은 돼지 CMAH 유전자내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 뉴클레아제를 준비하는 단계; 상기 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 돼지 유래 세포에 도입시키는 단계; 상기 돼지 유래 세포에서 지놈 상 돼지 CMAH 유전자를 상기 뉴클레아제로 절단하여 녹아웃시키는 단계; 상기 리포터 구성물 상의 상기 표적 서열이 상기 뉴클레아제에 의해 절단된 돼지 유래 세포를 상기 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하여, 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 상기 뉴클레아제에 의해 녹아웃된 돼지 유래 세포를 분리시키는 단계; 핵이식 수용체 돼지 난자에서 핵을 제거하고, 상기 분리된 돼지 유래 세포의 핵을 이식하여 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 난자 세포를 제조하는 단계; 상기 돼지 난자 세포로부터 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지를 제조하는 단계; 및 상기 돼지로부터 돼지 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[113] 상기 장기 또는 조직은 장기 또는 조직 그 자체 뿐만 아니라 혈액이 포함된 상태일 수 있으며, 심장, 위, 소장, 대장, 신장, 간, 폐, 췌장 등을 제한없이 포함할 수 있다. 상기 장기 또는 조직은 CMAH 유전자가 녹아웃된 돼지로부터 유래된 것이므로, 인간 또는 인간 이외의 동물에 상기의 장기 또는 조직을 이식할 시 면역거부반응이 일어나지 않거나 완화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 장기 또는 조직은 장기 또는 조직 이식이 필요한 개체에게 이식될 수 있으며, 목적하는 장기의 종류에 따른 질환을 치료할 수 있다. 상기 장기 이식이 필요한 개체는 동물 또는 인간일 수 있다.

[114]

[115] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 전술한 징크 핑거 뉴클레아제, 상기 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 및 상기 뉴클레아제가 인식하는 CMAH 유전자내 특정 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 포함하는, CMAH 유전자가 녹아웃된 인간 이외 동물의 난자, 인간 이외 동물, 또는 인간 이외 동물 유래 인공장기 제조용 키트를 제공한다.

[116] 상기 동물은 포유동물로서 그 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 돼지이다.

[117]

발명의 실시를 위한 형태

[118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가

이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[119]

[120] 실시예 1: 징크 핑거 뉴클레아제를 포함하는 플라스미드 제작

[121] 돼지 CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease; ZFN) 쌍을 개발하기 위하여, 툴젠(ToolGen)에서 개발한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 돼지 유전자인 CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 엑손 4(coding region 4)의 DNA 서열에서 잠재적인 ZFN 표적 부위(target site)를 탐색하였다(표 1).

[122] 표 1

[Table 1]

모듈이름	아미노산 서열	인식서열	서열번호
QSHV	YECDHCGKSFSQSSHLNVHKRTH	YGA	1
DSNR	YRCKYCDRSFSDSSNLQRHVRIH	GAC	2
rdne	YKCPECGKSFSRADNLTEHQRTTH	CAG	3
rdnq	FACPECPKRFMRSDNLQHIKTH	AAG	4
RDHT	FQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTH	HGG	5
QSHR	YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKIH	GGA	6
QSHR2	YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKIH	GGA	7
RSHR	YKMECGKAFNRRLSHLTRHQRIH	GGG	8
DSCR	YTCSDCGKAFRDKSCLNRHRRTH	GCC	9
dghr	YKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTTH	GGC	10
QSNV3	YKCDECGKNFTQSSNLIVHKRIH	CAA	11
DSAR2	YSCGICGKSFSDSAKRRHICILH	GTC	12
ISNR	YRCKYCDRSFSISSNLQRHVRIH	GAT	13
KSNR	YGCHLCGKAFSKSSNLRRHEMIH	GAG	14
QNTQ	YTCSYCGKSFTQSNLTQKHTRIH	ATA	15
QSNT	YECVQCGKGFTQSSNLITHQRVH	AAA	16
QSNR1	FECKDCGKAFIQKSNLIRHQRTTH	GAA	17
QSSR1	YKCPDCGKSFSQSSSLIRHQRTTH	GYA	18
QTHQ	YECHDCGKSFRQSTHLTQHRRIH	AGA	19
RDER2	YHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKH	GYG	20
VDYK	FHCGYCEKSFSVKDYLTKHIRTH	TAT	21
VSNV	YECDHCGKAFSVSSNLNVHRRIH	MAT	22
WSNR	YRCEEKGAFRWPSNLTRHKRIH	GGT	23
dgnv	FQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTH	AAC	24
thse	YKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTTH	CCA	25
tnse	YKCPECGKSFSSTKNSLTEHQRTTH	CCT	26
hghe	YKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTTH	CGC	27
srt a	YKCPECGKSFSRRRCRAHQRTTH	CGT	28
qste	YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTTH	CTA	29
rdnt	YKCPECGKSFSREDNLHTHQRTTH	TAG	30
sadr	YKCPECGKSFSPPADLTRHQRTTH	ACA	31
tl dr	YKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTTH	ACT	32
skae	YKCPECGKSFSKKALTEHQRTTH	CAC	33
VSTR	YECNYCGKTFVSSTLIRHQRIH	GCT	34

- [123] 상기 ZF 표적 부위 쌍은 반대 가닥 상에 3 또는 4개의 징크 핑거 어레이가 결합할 수 있으며, 5 또는 6개의 뉴클레오티드로 분리될 수 있다. 이후, 탐색 결과를 기초로 하여 예시적으로 모듈 조합 방법에 의해 6개의 ZF 모듈(zinc-finger module)을 조합하여 하나의 특이적 표적 부위에 대한 한 쌍의 ZFN 단위체를 구성하였고(표 2), 조합된 이들 ZF 모듈을 *FokI* 핵산분해효소 도메인과 융합하여 ZFN 단위체를 합성하였다. 이들 한 쌍의 ZFN 단위체를 이용하여 돼지 CMAH 유전자 상에 돌연변이를 유발할 수 있는지 여부를 실험하였다. 실험에 사용한 한

쌍의 ZFN 단위체의 징크 핑거 모듈(F1 내지 F4) 및 징크 핑거의 표적부위 아미노산 서열을 각각 표 2, 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[124] 표 2

[Table 2]

징크 핑거 조성 및 CMAH 11 ZFN의 인식 서열

ZFN Name		F1	F2	F3	F4	Half -Site Sequence (5'~3')
CMAH 11	L4	QSHV	DSNR	rdne	rdnq	AAG CAG GAC CGA
	R4	RDHT	RDHT	QSHR	QSHV	CGA GGA TGG TGG

[125]

[126] 실시예 2: 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 ZFN을 처리한 돼지 섬유아세포에서 돌연변이 탐색

[127] 유전자 가위(인공적인 DNA 제한효소)인 ZFN에 의해 유도된 두 가닥 파손(double strand break; DSB)은 오류발생이 쉬운(error-prone) 비상동말단연결(non-homologous end joining; NHEJ)에 의해 복구될 수 있다. 결과산물인 DNA는 DSB가 일어난 부위 가까이 조그마한 DNA 염기서열의 삽입/결실(insertion/deletion; indel) 돌연변이를 포함한다. 이러한 특정 부위의 DNA 염기서열의 삽입/결실 돌연변이들은 증폭된 DNA 조각들을 불일치-감응 T7 엔도뉴클레아제 I(mismatch-sensitive T7 endonuclease I; T7E1)로 처리함으로써 실험적(in vitro)으로 탐색할 수 있다.

[128] 이를 위하여, 프라이머리 돼지 섬유아세포(primary pig fibroblast)를 10% FBS 및 2 ng/ml hbFGF를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지에서 시험관 내 배양하고 TransITLT1 시약(Mirus Bio)을 이용하여 CMAH 11 ZFN 발현 플라스미드로 형질전환시켰다. 3일 후 G-spin 지놈 DNA 추출 키트(G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit; Intron Bio)를 이용하여 형질전환 세포로부터 지놈 DNA를 분리하였다. ZFN 표적 부위 주위의 서열을 돼지 CMAH 유전자 엑손 4에 대해 특이적인 프라이머(표 3)를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. ZFN 표적 부위를 포함하는 PCR 앰플리콘(amplicon)을 불일치-감응 T7 엔도뉴클레아제 절단 분석((mismatch-sensitive T7 endonuclease cleavage assay)하였다. 간략히, CMAH 표적 부위가 ZFN에 의해 절단되면, 상기 DNA DSB는 오류발생이 쉬운(error-prone) NHEJ(비상동말단연결) 메커니즘에 의한 복구되고 이에 따라 형질전환 세포의 부차집단(subpopulation)내의 표적 부위에서 indel을 유발될 수 있다. 증폭된 DNA를 37°C에서 15분간 5 유닛(unit)의 T7E1으로 처리한 후 2.5배의 에탄올을 첨가하여 침전시켰다. 상기 돌연변이화된 대립인자(mutated alleles)를 확인하기 위하여 야생형 대립인자와 T7E1 효소로 처리된 증폭된 CMAH 엑손 4 단편을 2% 아가로스 젤 전기영동 상에서 분석하였다. 그 결과, 프라이머리 돼지 섬유아세포에서 CMAH 11 ZFN의 발현으로 CMAH 유전자의 엑손 4에 위치한 표적 부위에 돌연변이가 효과적으로 도입되었음을

확인하였다(도 3).

- [129] 도 3에 나타난 바와 같이, 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 CMAH 11 ZFN쌍이 처리된 세포로부터 증폭된 DNA의 작은 조각들은 T7E1에 의해 절단되었으며, ZFN 쌍은 그들이 표적으로 했던 부위에서 특유의 절단 유형을 발생시켰다(도 3).

[130]

- [131] 실시예 3: 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 ZFN에 의해 유도된 돌연변이 DNA 서열 분석

- [132] 돼지 CMAH 유전자를 표적으로 하는 CMAH 11 ZFN에 의해 유도된 돌연변이의 특성 및 발생비율을 측정하기 위하여 상기 실시예 2에 언급된 방법으로 형질전환 3일 후 형질전환 세포로부터 지놈 DNA를 분리하여 그 염기서열을 분석하였다. ZFN 표적 부위 주변 서열을 돼지 CMAH 유전자 엑손 4에 대해 특이적인 프라이머(표 3)를 이용하여 PCR로 증폭시키고 T-벡터에 복제시킨 후 CMAH 11 ZFN 표적 부위에서 돌연변이의 빈도(frequency) 및 정체성(identity)을 결정하기 위하여 개별 클론을 서열분석하였다. 그 결과, CMAH 11 ZFN의 발현에 의해 유도되는 돌연변이의 빈도는 4%임을 확인하였고, 다양한 삽입, 결실 또는 이들의 조합과 관련된 다양한 돌연변이를 동정하였다(도 4). 본 발명에서 동정된 모든 돌연변이는 해독 프레임 이동(translational frameshift)을 야기할 수 있으며, 따라서 돌연변이화된 대립인자로부터 발현된 기능적 CMAH 단백질의 손실을 쉽게 유발할 수 있었다.

- [133] 표 3

[Table 3]

CMAH 엑손 4 프라이머 서열

프라이머	올리고 서열 (5'~3')
CMAH ZFN - F	CAGAGGTCTGCCATAACATC
CMAH ZFN - R	TCCATATGCCACAGGTTTCAG

[134]

- [135] 실시예 4: 자성-활성화 세포 분류(MACS)를 이용한, 표적 유전자가 변형된 세포의 농축

- [136] 돼지 CMAH 유전자가 변형된 세포를 분류하고 농축시키기 위하여, 자성-활성화 세포 분류(magnetic-activated cell sorting)법을 사용하였다.

- [137] 리포터 구성물은 mRFP 유전자, 인공 뉴클레아제의 표적 서열, 2A-펩타이드 서열 및 마우스 MHC 클래스 I 분자 H-2K^b 유전자로 구성하였다(도 5). 상기 구조의 리포터 시스템에서는 mRFP는 CMV 프로모터에 의해 발현되는 반면, H-2K^b는 인공 뉴클레아제가 활성을 가지지 않을 때에는 프레임 밖에 존재하므로 발현되지 않는다. 인공 뉴클레아제에 의해 표적 서열에서 DSB가 발생하는 경우, DNA의 손상은 NHEJ에 의해 복구되나, 이는 프레임 이동 돌연변이를 수반한다.

이러한 돌연변이는 2A-펩타이드 및 H-2K^k가 mRFP와 함께 프레임 내에 존재할 수 있게 하여, 기능적인 H-2K^k 단백질의 발현을 유도할 수 있다. 리포터 플라스미드 및 뉴클레아제를 인코딩하는 플라스미드로 형질감염시킨 후 3일 또는 4일 후에, 세포를 H-2K^k 특이적 자성구체(magnetic beads)로 표지하고, MACS 컬럼 상에서 자기력에 의해 분리할 수 있다(도 6).

[138] 상기의 실험 설계를 바탕으로, 프라이머리 돼지 섬유아세포들은 2 µg의 리포터 플라스미드 및 2 µg의 CMAH 11 ZFN을 인코딩하는 플라스미드로 공동 형질감염시켰다. 상기 리포터 플라스미드는 mRFP 유전자, CMAH 11 ZFN의 표적 서열, 2A-펩타이드 서열 및 마우스 MHC 클래스 I 분자 H-2K^k 유전자로 구성하였다. 형질감염시킨 후 3일째에, MACSelect K^k(miltenyi Biotech)를 이용하여 세포들을 자기적으로 표지하고 분리하였으며, 이로부터 지놈 DNA를 추출하였다.

[139] 먼저, 자기력(magnetic force)을 이용하여 선별하여 돌연변이 농축을 형광으로 확인하였다. ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입을 유도한 후 2일째에 세포를 트립신 처리하여 회수하고 PBE 완충액에 재현탁시켰다. MACSelect microbeads(MACSelect K^k microbeads; Miltenyi Biotech)를 단일 세포 현탁액에 가하여 4°C에서 15분간 반응시켰다. 자성표지된 세포들을 컬럼(MACS mini MS column; Miltenyi Biotech)에 통과시켜 선별하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 자성비드를 이용하여 선별한 후 세포내 RFP 및 GFP를 발현하는 세포의 비율이 분리 전과 비교하여 증가되었다. 이를 수치화하여 표 4에 나타내었다. 더불어 자성비드에 의해 선별된 세포에서 유전자 변이가 발생한 세포의 비율을 T7E1 분석으로 재확인하였고, 그 결과는 도 8에 도시하였다.

[140] 표 4

[Table 4]

형질전환세포 선별에 있어 자성 분류의 효과

	형광 발현된 세포 수		
	RFP/Total (%)	GFP/Total (%)	GFP/RFP (%)
선별전	15/50 (30)	7/50 (14)	7/15 (47)
선별후	104/114 (91)	77/114 (67)	77/104 (74)

[141]

[142] 실시예 5: 하이그로마이신(hygromycin) 리포터 구성물을 이용하여 유전자를 변형시킨 세포들의 농축 및 분류

[143] 리포터 구성물은 세포 내 발현을 위해 CMV 프로모터를 사용하였고, 유전자 주입 효율을 확인하기 위한 RFP 유전자, ZFN이 결합하여 작용할 수 있는 표적 유전자, 및 ZFN이 제대로 작동하였을 때 발현되도록 설계된 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(hygromycin phosphotransferase, HPT) 및 eGFP 유전자로

구성하였다(도 10).

- [144] 돼지 CMAH 유전자를 녹아아웃시킬 수 있는 한 쌍의 ZFN(36 μ g)과 하이그로마이신 선별을 위한 상기 리포터 구성물(9 μ g)을 전기자극을 통해 돼지 귀조직 세포내로 주입한 후 1×10^6 개의 세포를 100 mm 배양접시에 각각 분주하여 배양하였다. ZFN 및 리포터 구성물 주입 후 2일째에 세포수는 배양접시 당 3×10^6 개였고 하이그로마이신 B를 300 μ g/ml의 농도로 48시간 동안 처리하여, 4일째에 하이그로마이신 B가 제거된 새로운 배양액으로 교체해 주었다. 이때 하이그로마이신 처리에 의해 살아남은 세포수는 1.5×10^4 개 이었다. 7일째 초기콜로니를 형성하였고, 18일에 완전한 콜로니를 형성하였으며, 22일에 형성된 콜로니를 새로운 96-웰 배양접시로 옮겨 뉴클레아제에 의해 유전자가 변형된 형질전환 세포주를 제작하였다(도 11).
- [145] ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입을 유도한 후 2일째 하이그로마이신 B 처리 전과 4일째 비처리 또는 처리 후의 세포 내 RFP와 GFP의 발현 정도를 비교하였다. 처리 전이나 비처리구에 비해 처리구에서 RFP 및 GFP를 발현하고 있는 세포의 비율이 높았다(표 5 및 도 12).

[146] 표 5

[Table 5]

형질전환세포 선별에 있어 하이그로마이신 B의 처리효과

하이그로마이신 B 처리구	형광발현된 세포수		
	RFP / Total (%)	GFP / Total (%)	GFP / RFP (%)
처리전(2일째)	120/339 (35.4)	69/339 (20.0)	69/120 (57.5)
0 ug/ml 처리(4일째)	58/165 (35.2)	26/165 (15.8)	26/58 (44.8)
300 ug/ml 처리(4일째)	47/48 (97.9)	38/48 (79.2)	38/47 (80.9)

[147]

- [148] 또한, ZFN과 리포터 구성물의 세포 내 도입 후 2일째부터 2일 동안 하이그로마이신 B(300 μ g/ml)를 처리하여 선별된 세포에 있어서 유전자 변이가 발생한 세포의 비율을 T7E1 분석 방법을 통해 분석하였다. 비처리된 대조구(3.1%)에 비해 처리구(12.1%)에서 높은 비율의 형질전환된 세포를 확인하였다(도 13). 상기 하이그로마이신 B를 처리하여 선별한 세포를 30일간 배양하여 단일 세포로부터 콜로니를 형성하도록 하였다(도 14a). 상기 형성된 단일 콜로니 각각에 대해 형질전환된 세포의 비율을 T7E1 분석을 통해 분석하였고 단일 콜로니로부터 얻은 PCR 산물의 염기서열을 분석하여 형질전환 양상을 확인하였다. 9개의 클로 중 2개 클론에 대해 분석한 결과, 모두 높은 비율로 형질전환된 서열을 포함하는 것을 확인할 수 있었다(도 14 b 및 c).

[149]

- [150] 실시예 6: FACS를 이용하는 유전체 변이된 세포의 분류

- [151] 리포터 플라스미드는 단량의 적색 형광 단백질(monomeric red fluorescent protein; mRFP)-향상된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; eGFP)의 융합 단백질을 인코딩하는 리포터 플라스미드에, 상기 mRFP 및 eGFP를 인코딩하는 DNA 서열 사이에 인공 뉴클레아제 표적 서열을 삽입하여, eGFP 서열이 mRFP 서열의 프레임 밖으로 융합되도록 하였다. 정지 코돈은 eGFP 서열의 업스트림에 삽입하였다(도 15).
- [152] 상기 리포터 플라스미드 및 ZFN을 돼지 귀조직 섬유아세포(primary porcine adult ear fibroblast)에 형질감염시킨 후, 유세포 분석법으로 세포를 분류하였다(도 16). 그 결과, mRFP는 CMV 프로모터에 의해 발현되는 반면, 기능적 eGFP는 인공 뉴클레아제가 활성을 가지지 않을 때에는 프레임 밖에 존재하므로 발현되지 않았다. 인공 뉴클레아제에 의해 표적 서열에서 DSB가 발생하는 경우, DNA의 손상은 NHEJ에 의해 복구되나, 이는 프레임 이동 돌연변이를 일으키게 되고, 이러한 돌연변이는 eGFP와 mRFP가 함께 프레임 내에 존재할 수 있게 함으로, 기능적인 mRFP-eGFP 융합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 원리를 이용하여 인공 뉴클레아제에 의해 유전체가 변형된 세포들을 농축시키고, 분류할 수 있었다. 이와 같이 유세포 분석법을 이용한 선별과정 전 후의 세포를 현광현미경으로 계수하여 RFP와 GFP를 동시에 발현하는 즉, 형질전환된 세포의 비율이 증가하는 것을 것을 확인하였으며(도 17), T7E1 분석을 통해 이를 다시 한번 확인하였다(도 18). 그 결과, 선별하기 전 0.5% 미만이었던 형질전환 세포의 비율은 선별된 세포에 대해 13%로 증가하였다.
- [153]
- [154] 실시예 7: CMAH 유전자 녹아웃 세포를 핵이식시킨 난자로부터 발달된 돌연변이가 도입된 배반포의 형성
- [155] Magnetic separation에 의해 선별된 세포들 중 GFP를 발현하고 있는 세포들을 취하여 핵 이식을 진행하였다. 핵을 제거한 난자에 체세포를 융합시킨 후 *in vitro* 상에서 세포분열을 유도하여 배반포를 형성하도록 하였다. 총 40개의 난자에서 실험을 수행하였을 때 정상적으로 형성된 배반포 3개를 얻을 수 있었다. 배반포의 유전자 서열을 분석하여 돌연변이 서열을 확인하였고 이를 도 19에 나타내었다.

청구범위

- [청구항 1] 돼지 CMAH (cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 인공 뉴클레아제에 의해 돼지 유래 세포에서 CMAH 유전자를 절단시키는 단계를 포함하는, 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 돼지 유래 세포에 도입하는 단계; 및
상기 리포터 구성물 상의 상기 표적 서열이 상기 뉴클레아제에 의해 절단된 돼지 유래 세포를 상기 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 분리하여, 지놈 상 돼지 CMAH 유전자가 상기 뉴클레아제에 의해 녹아아웃된 돼지 유래 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 뉴클레아제는 징크 핑거 뉴클레아제인 것인 방법.
- [청구항 4] 제1항의 방법에 의하여 제조된 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포.
- [청구항 5] 돼지 CMAH 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 인공 뉴클레아제에 의해 돼지 유래 세포에서 CMAH 유전자를 절단시켜 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하는 단계; 및
상기 세포를 난자에 핵이식하는 단계를 포함하여, 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지를 제조하는 방법.
- [청구항 6] 돼지 CMAH 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 인공 뉴클레아제에 의해 돼지 유래 세포에서 CMAH 유전자를 절단시켜 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하는 단계; 상기 세포를 난자에 핵이식하여, 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지를 제조하는 단계; 및
상기 돼지로부터 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지 인공장기 또는 인공조직을 분리하는 단계를 포함하여, 돼지 CMAH 유전자가 녹아아웃된 돼지 유래 인공장기 또는 인공조직의 제조방법.
- [청구항 7] 징크 핑거 도메인 및 뉴클레오티드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 징크 핑거 도메인은 CMAH(cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 유전자 내 특정 표적 서열을 특이적으로 인식하는 징크 핑거 모듈들을 조합시켜 조립한 것이고, CMAH 유전자를 절단시키는 활성을 가지는,

- CMAH 유전자를 표적으로 하는 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 CMAH 유전자는 돼지 CMAH 유전자인 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 표적 서열은 CMAH 유전자의 엑손 4에 위치하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 제1 징크 핑거 뉴클레아제 및 제2 징크 핑거 뉴클레아제로 된 쌍을 포함하며, 제1 징크 핑거 뉴클레아제의 제1 징크 핑거 도메인은 AAG, CAG, GAC, CGA 를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하고, 제2 징크 핑거 뉴클레아제의 제2 징크 핑거 도메인은 CGA, GGA, TGG, TGG 를 각각 인식하는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, CMAH 유전자 내 표적 서열은 AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 및 TGG로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, AAG, CAG, GAC, CGA, GGA 또는 TGG는 각각 독립적으로 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 징크 핑거 모듈에 의해 결합되고, 상기 선택된 징크 핑거 모듈을 하나 이상 포함하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 1, 2, 3 및 4로 표시되는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 서열번호 37의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 15] 제7항에 있어서, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 5, 5, 6 및 1로 표시되는 징크 핑거 모듈들을 순차적으로 포함하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 징크 핑거 도메인은 서열번호 36의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 징크 핑거 뉴클레아제는 서열번호 38의 아미노산 서열로 표시되는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 18] 제7항에 있어서, 핵 위치 신호(nuclear localization signal) 서열을 추가로 포함하는 것인 징크 핑거 뉴클레아제.
- [청구항 19] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 20] 제19항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 21] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 징크 핑거 뉴클레아제, 또는

제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 얻은 징크 핑거 뉴클레아제에 의해 CMAH 유전자를 절단시키는 단계를 포함하여, CMAH 유전자가 녹아아웃된 세포를 제조하는 방법.

[청구항 22]

제21항에 있어서, 상기 세포는 돼지 유래 세포인 방법.

[청구항 23]

제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 징크 핑거 뉴클레아제, 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 징크 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 및 상기 뉴클레아제가 인식하는 CMAH 유전자내 특정 표적 서열 및 리포터 유전자를 포함하는 리포터 구성물을 포함하는, CMAH 유전자가 녹아아웃된 인간 이외 동물의 난자, 인간 이외 동물, 또는 인간 이외 동물 유래 인공장기 제조용 키트.

[청구항 24]

제23항에 있어서, 상기 동물은 돼지인 키트.

[Fig. 1]

HA태그 핵 위치 신호

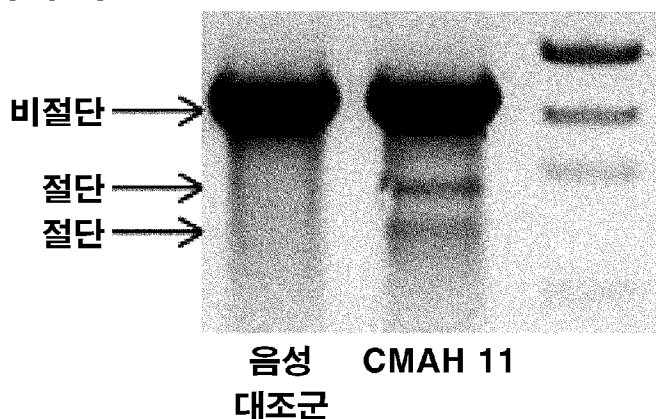
MVYPYDVPDYAELPPKKKRKVGIRIPGEKPYECDHCGKSFS
QSSHLNVHKRTHHTGEKPYRCKYCDRSFSD**SSNLQR**HVRNIH
 TGEKPYKCPECCKGSFS**RADNLTE**HQRTHTGEKPFACPECPK
 RFMR**SDNL**TQHICKTHHTGEKQLVKSELEEKSELRHKLKYVP
 HEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGS
 RKPDAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQR
 YVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNY
 KAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVR
 RKFNNGEINF

[Fig. 2]

HA태그 핵 위치 신호

MVYPYDVPDYAELPPKKKRKVGIRIPGEKPFQCKTCQRKFS
RSDHLKTHTRTHHTGEKPFQCKTCQRKFS**RSDHLK**THTRTHHT
 GEKPYKCGQCGKFYS**QVSHLTR**HQKIHTGEKPYECDHCGKS
 FS**QSSHLNV**HKRTHHTGEKQLVKSELEEKSELRHKLKYVPH
 EYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSR
 KPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRY
 VEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYK
 AQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVR
 KFNNGEINF

[Fig. 3]



[Fig. 4]

결시 :

gttcgatccttggttaaTCGGTCCTGCTTttgCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat (wt)
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTTttg-gCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTTtt--gCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTT----gCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGC-----GATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCC-----TGGttactacacgagcctccat

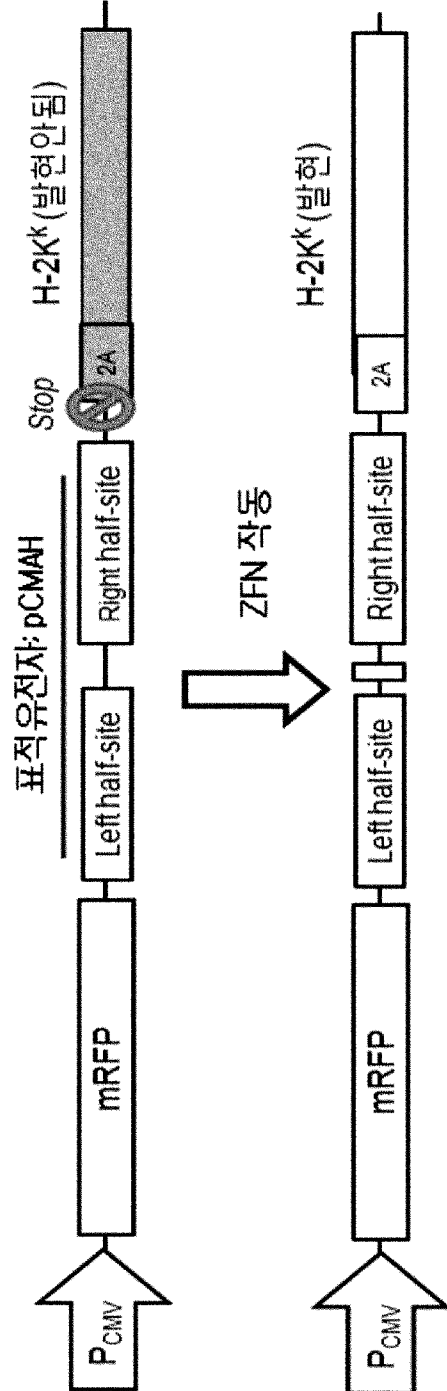
삽입 :

gttcgatccttggttaaTCGGTCCTGCTTttgCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat (wt)
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTTttgccc**gg** CGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTTttg**ctccgg**CGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCTTttg**gtgggg**CGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat

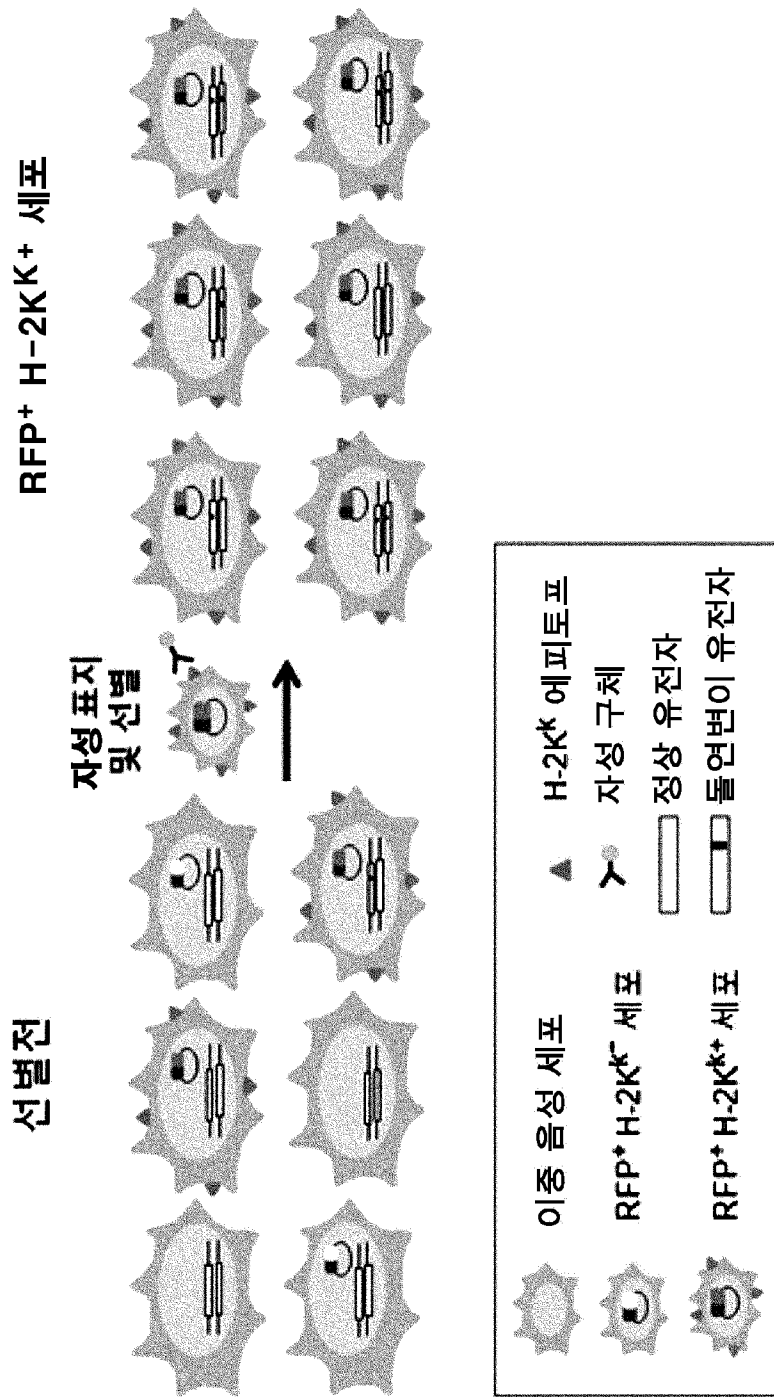
복합 :

gttcgatccttggttaaTCGGTCCTGCTTttgCGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat (wt)
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCC---**ccaac**--CGAGGATGGTGGttactacacgagcctccat
 gttcgcgaccttggttaaTCGGTCCTGCT-----**ccttaaaagggtatgggaaa**-----cctccat

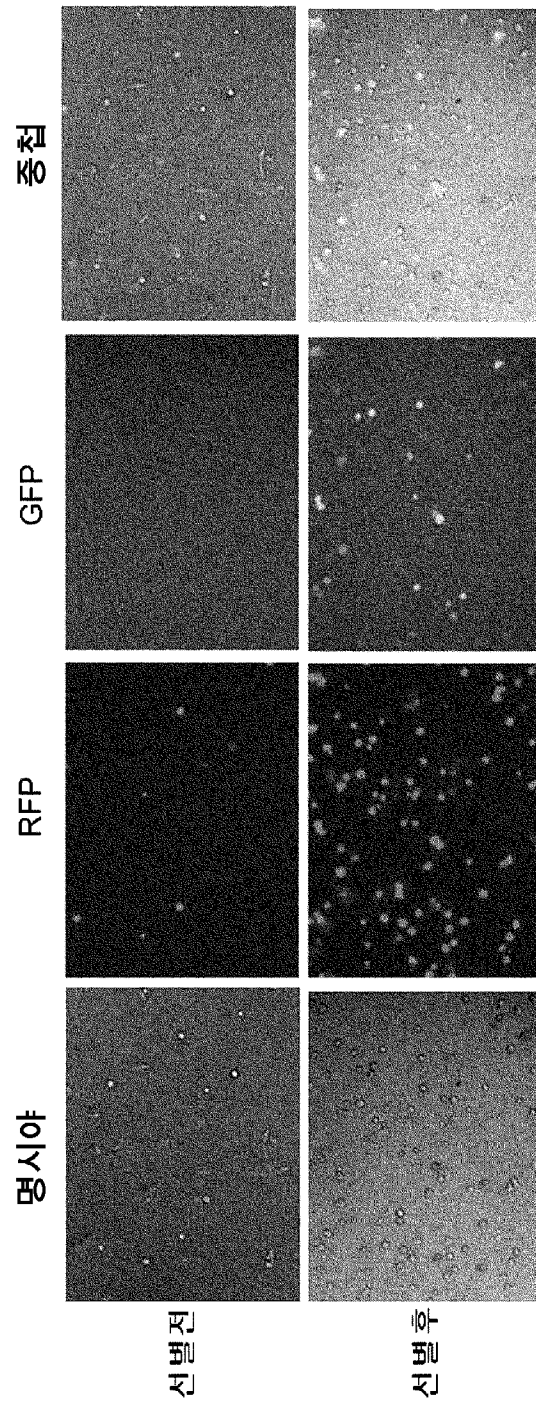
[Fig. 5]



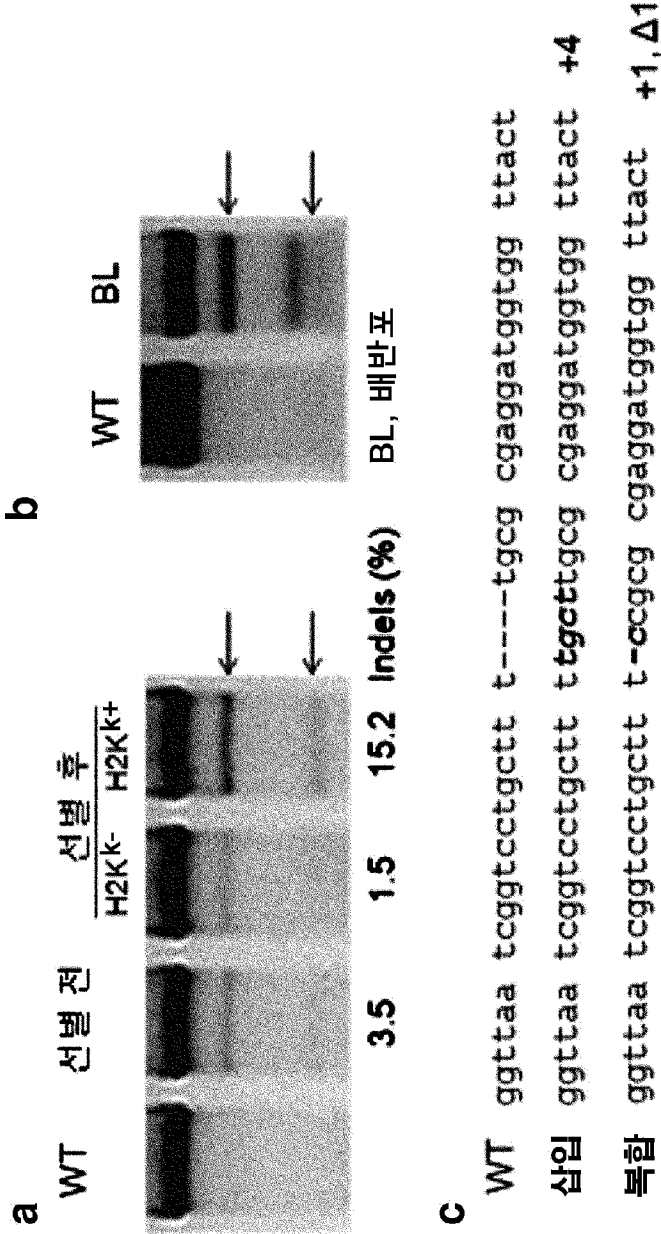
[Fig. 6]



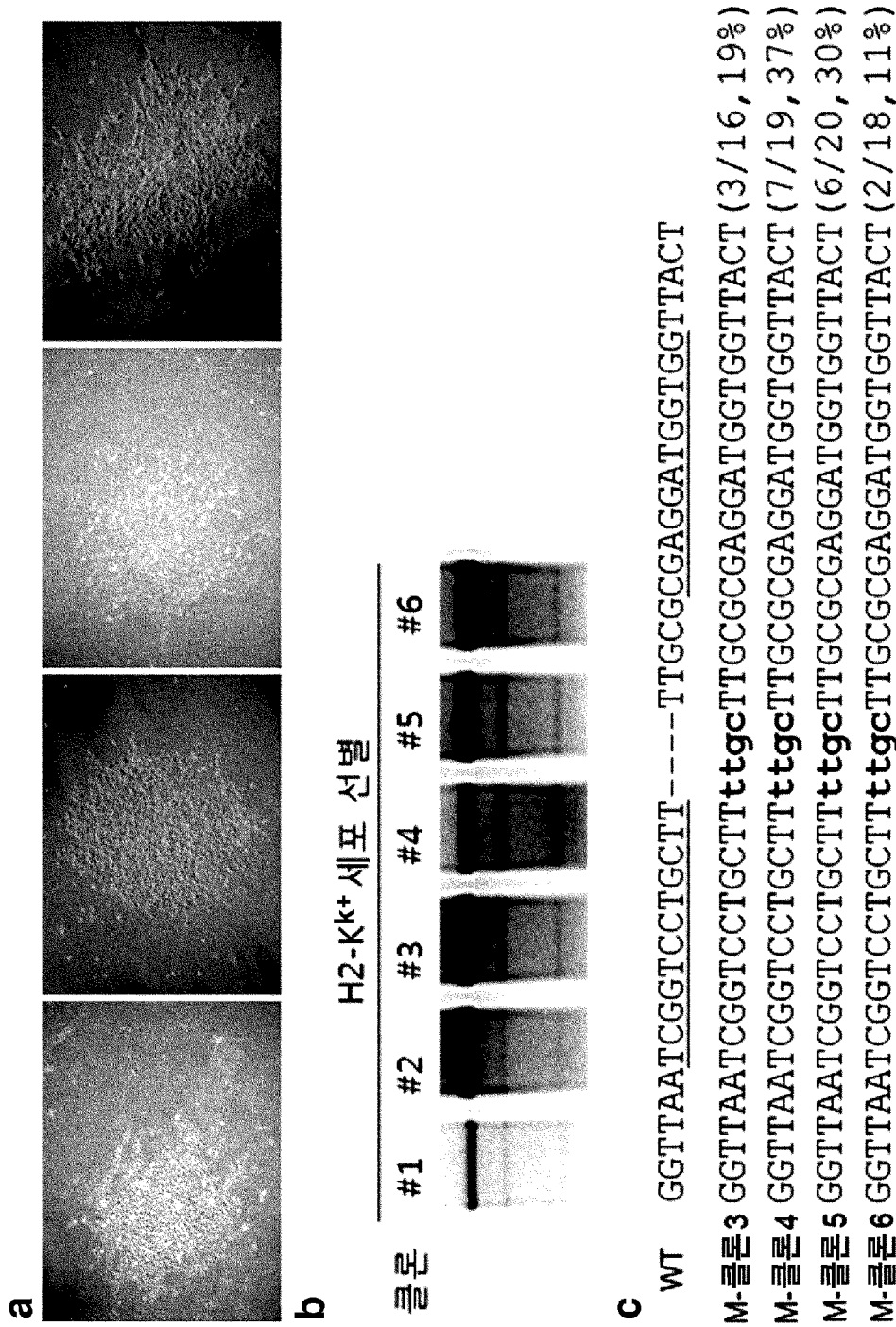
[Fig. 7]



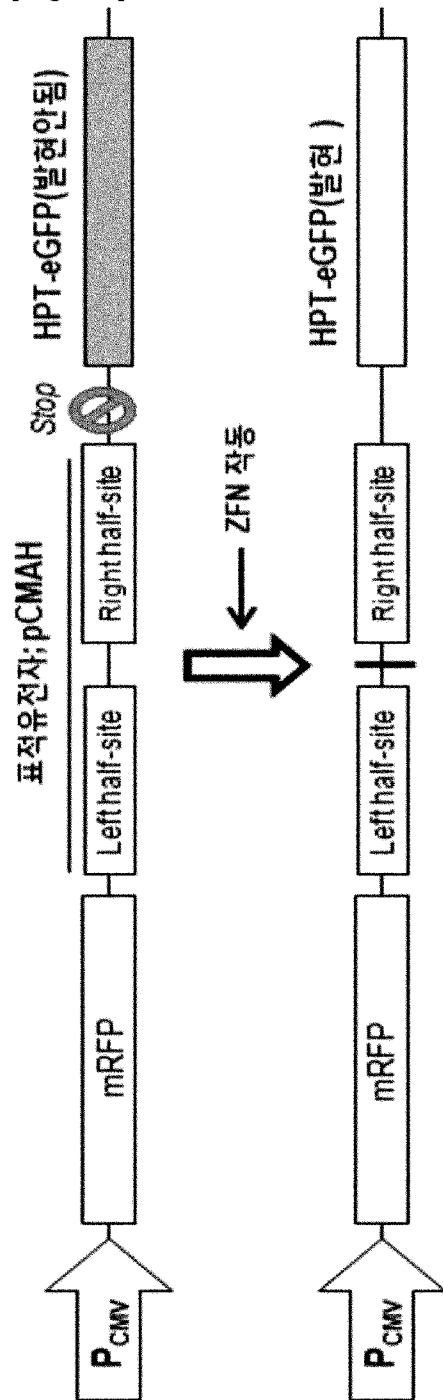
[Fig. 8]



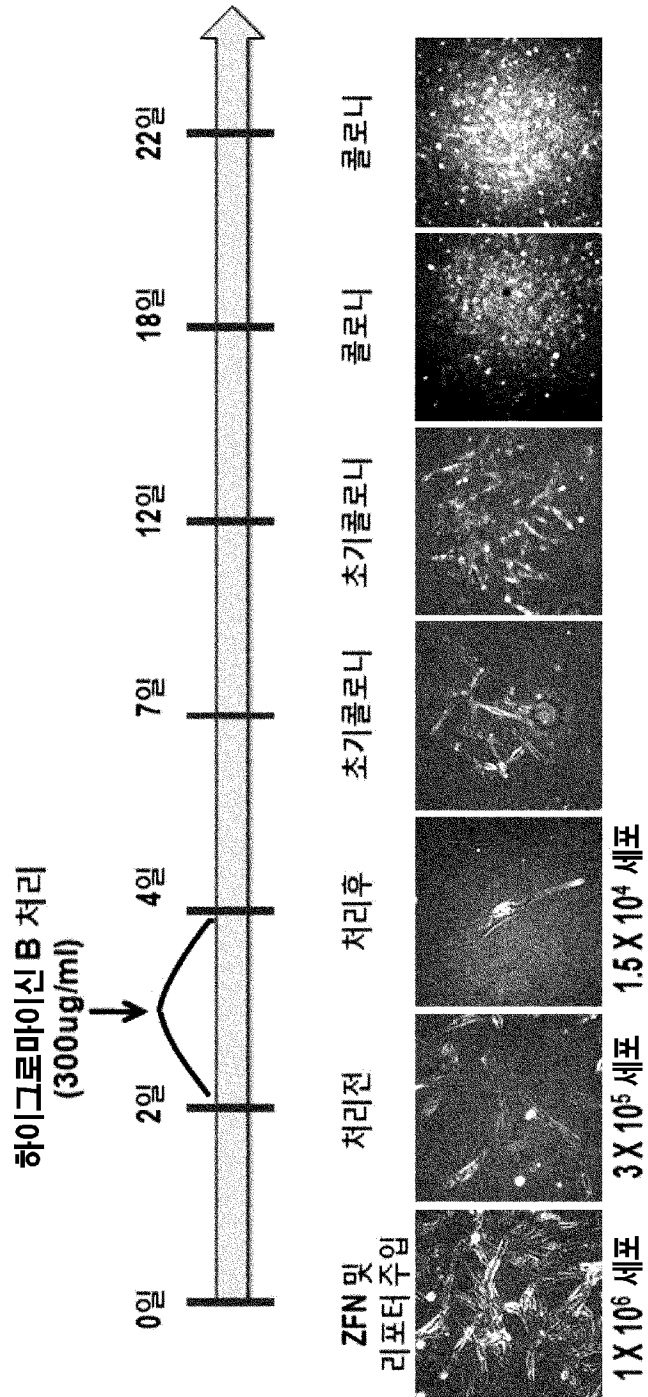
[Fig. 9]



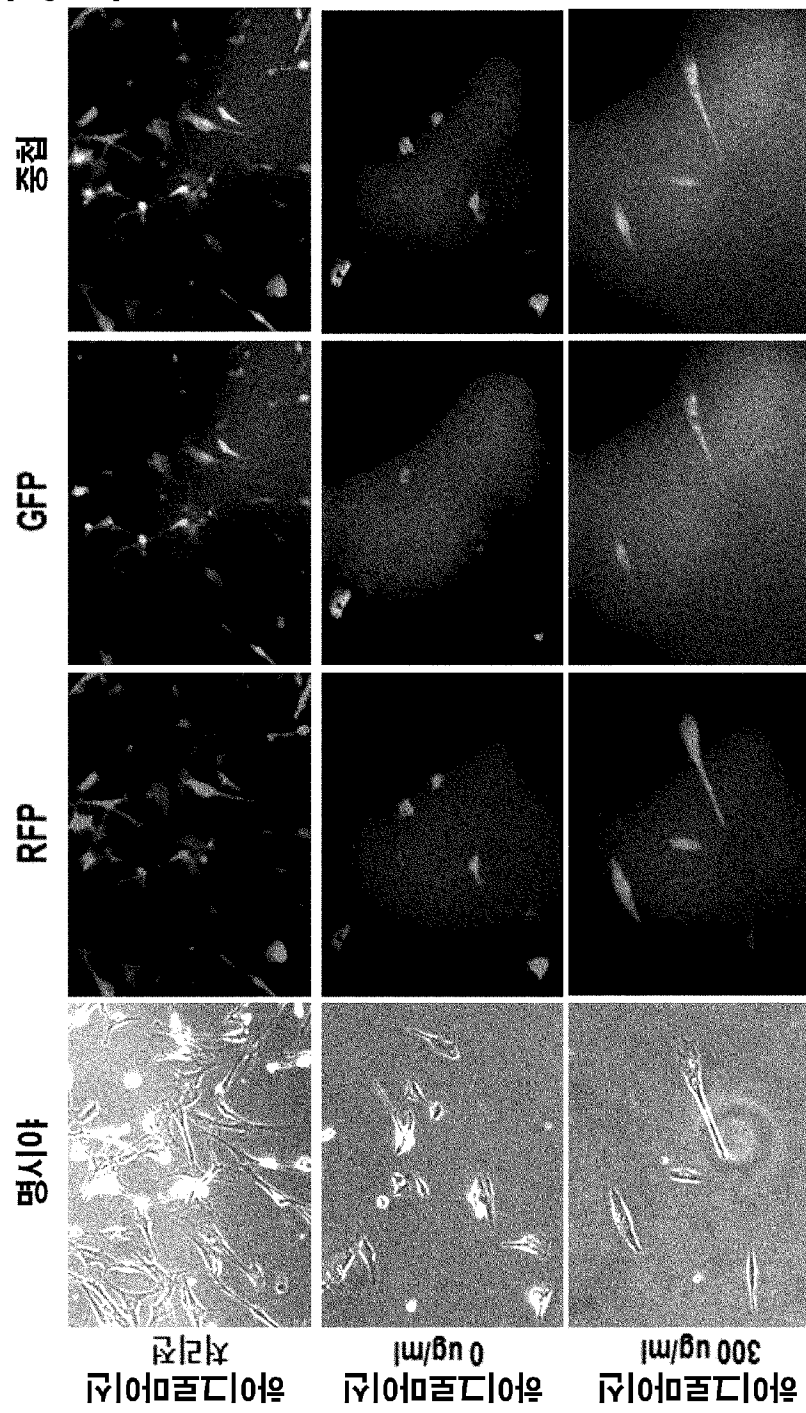
[Fig. 10]



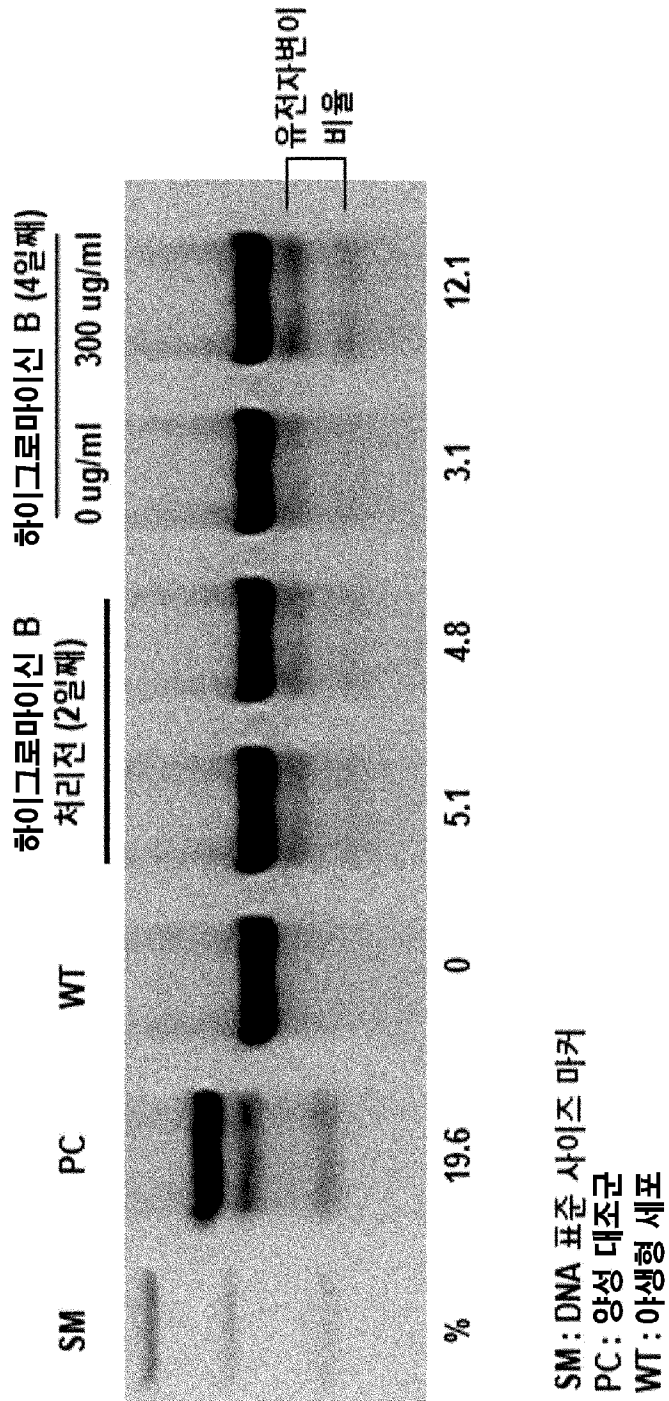
[Fig. 11]



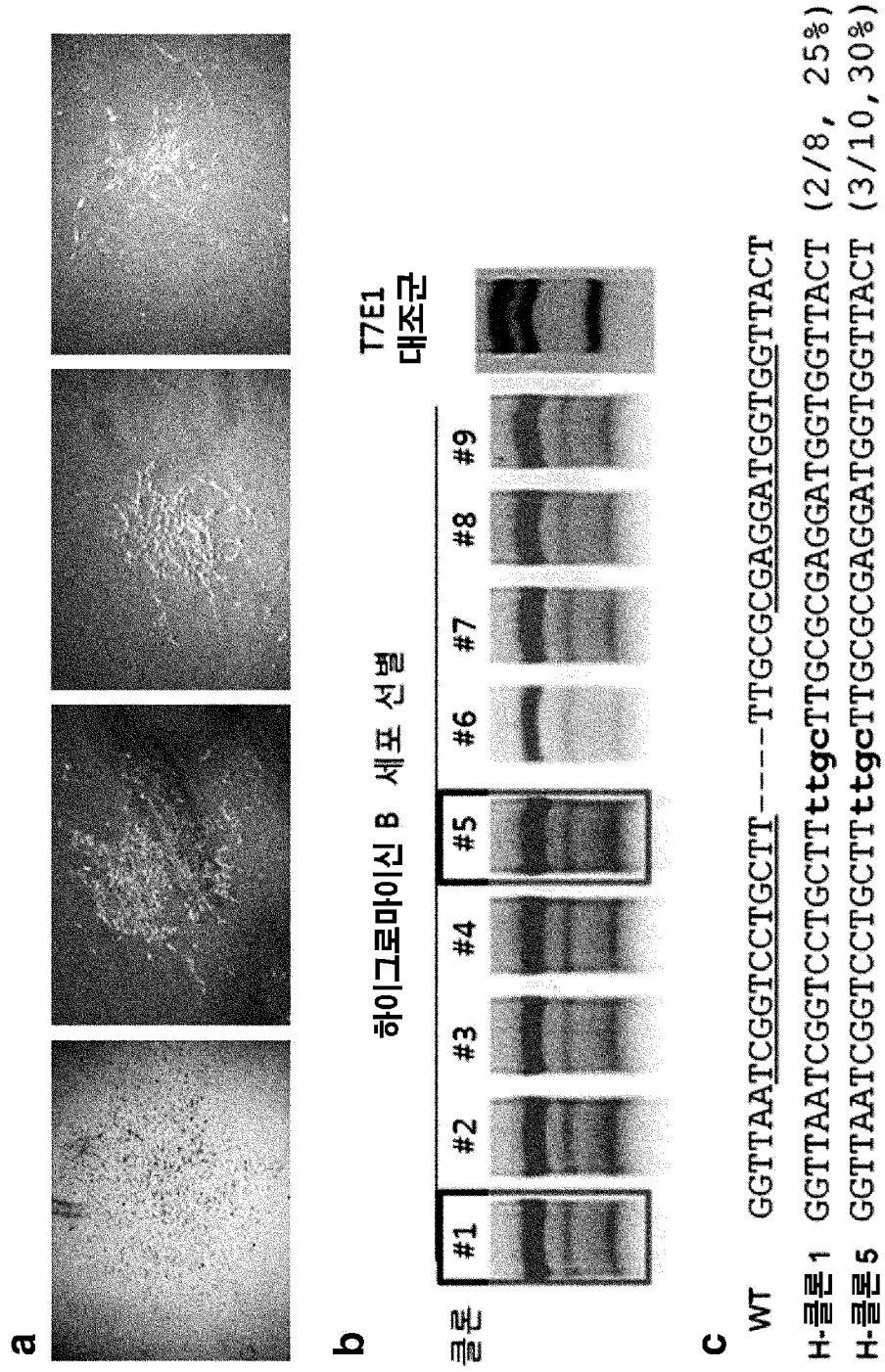
[Fig. 12]



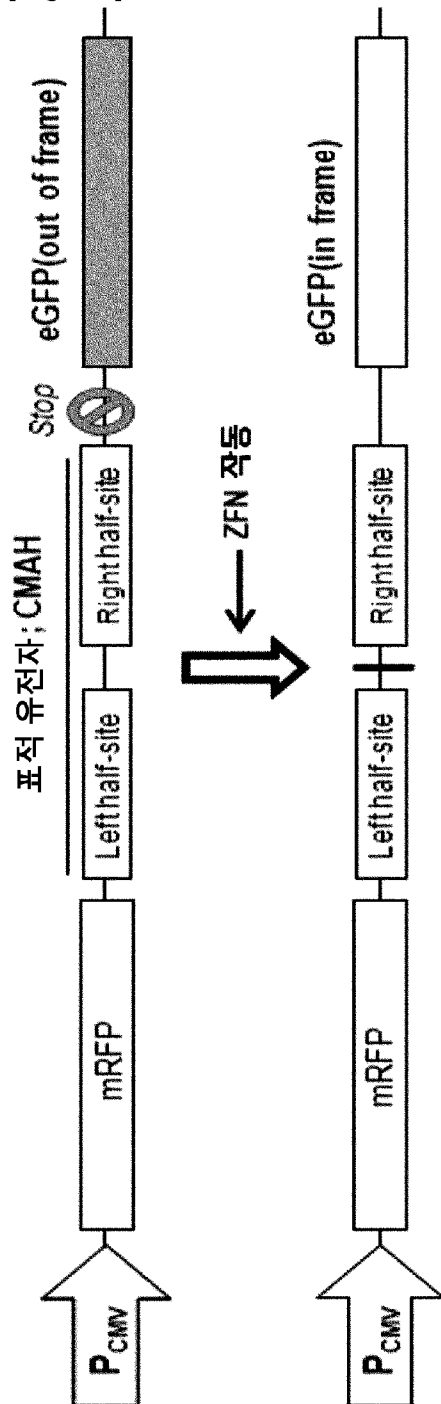
[Fig. 13]



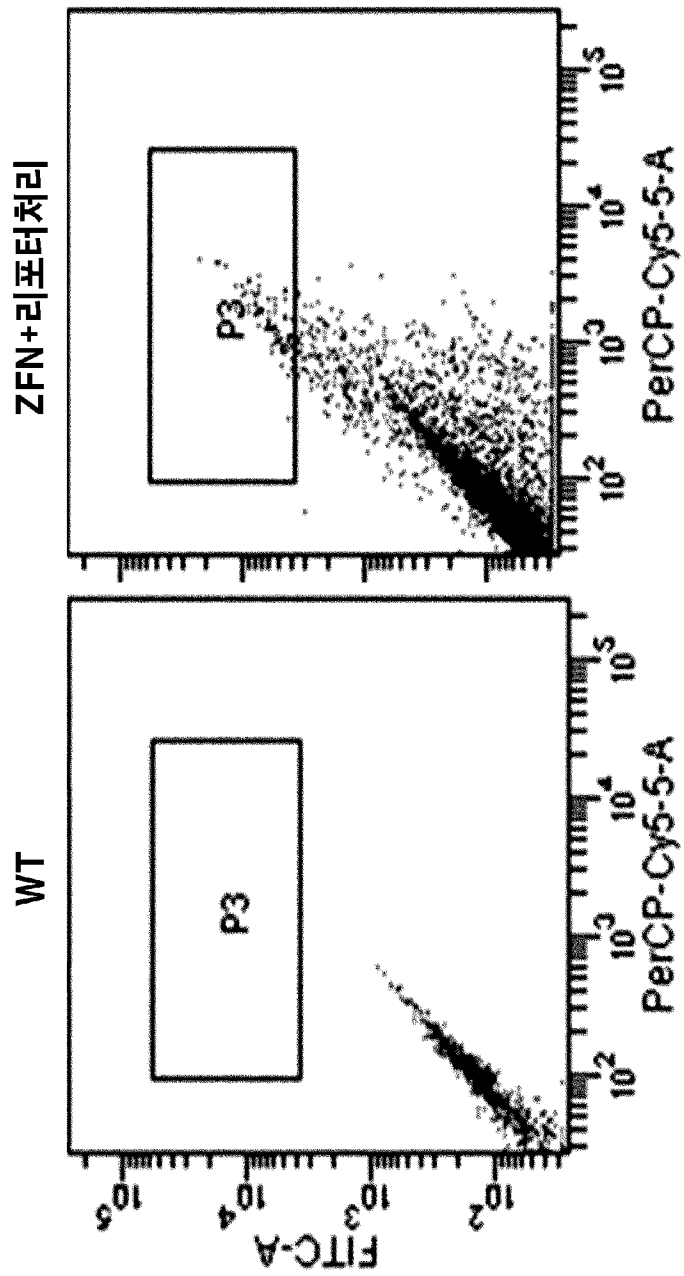
[Fig. 14]



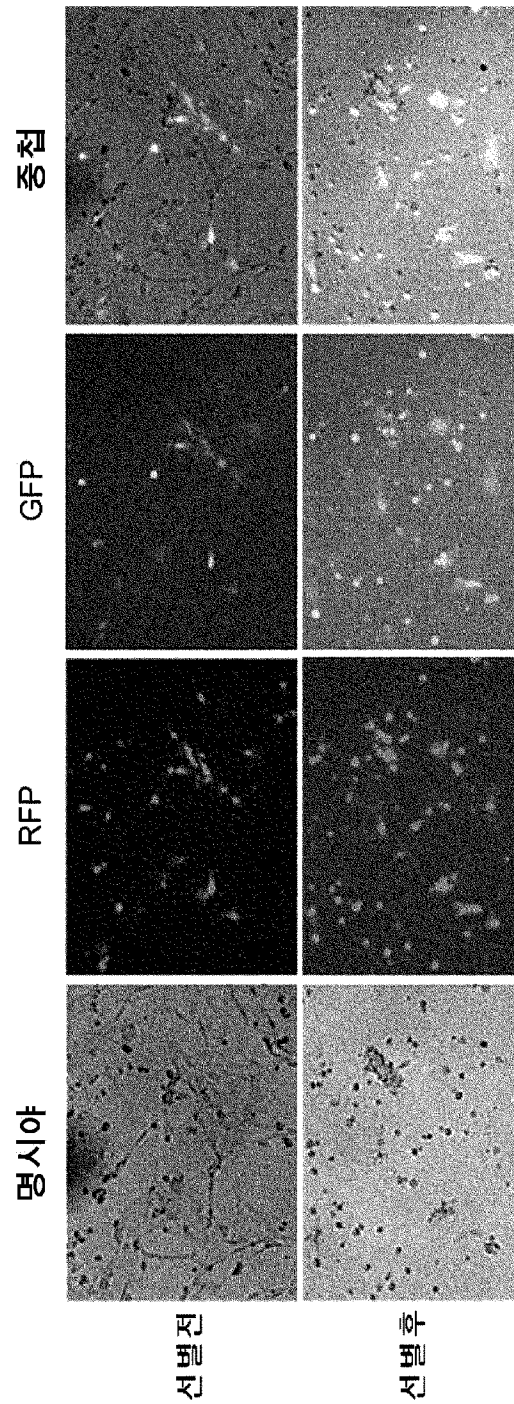
[Fig. 15]



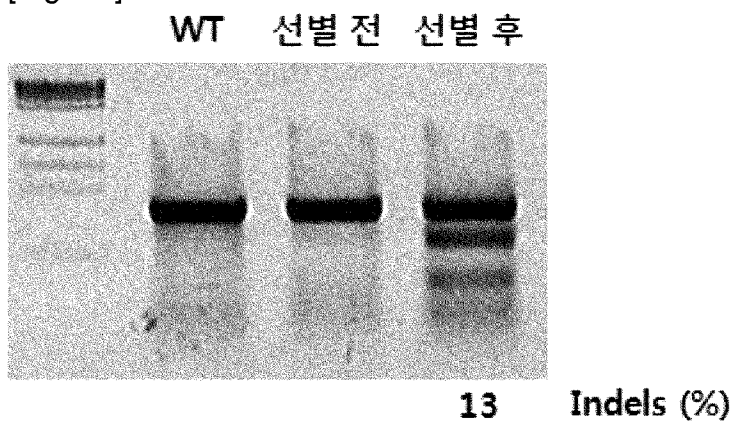
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]

WT 5'-ggtcctgctt ttgcg cgaggatggt ggtta -3'
배반포 5'-ggtcctgct- ----g cgaggatggt ggtta -3' △5 (결실)