(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월15일
(11) 등록번호 10-2684690
(24) 등록일자 2024년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) *C07K 14/47* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0271 (2024.01)
C07K 14/4705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7027376
(22) 출원일자(국제) 2016년03월03일
심사청구일자 2021년02월16일
(85) 번역문제출일자 2017년09월27일
(65) 공개번호 10-2017-0121262
(43) 공개일자 2017년11월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/020768
(87) 국제공개번호 WO 2016/141234
국제공개일자 2016년09월09일
(30) 우선권주장
62/127,330 2015년03월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009104794 A1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자
리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 스위트 600 오크 스트리트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터
(72) 발명자
개리, 다니엘 제이.
미국 55122 미네소타주 이건 리버톤 포인트 1660
개리, 메리 지.
미국 55122 미네소타주 이건 리버톤 포인트 1660
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

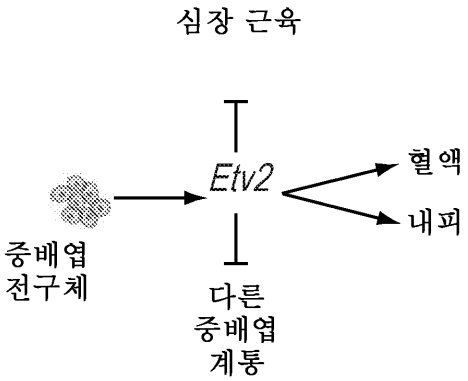
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **ETV2 및 그의 용도**

(57) 요 약

a) 비-인간 ETV2 유전자의 양쪽 카피가 비-인간 동물에서 기능적 ETV2 단백질의 생성을 억제하는 돌연변이를 갖는 ETV2 널 비-인간 세포를 생성하는 단계; b) a)의 상기 ETV2 널 비-인간 동물 세포로부터의 핵을 제핵된 비-인간 난모세포에 융합시키고 상기 난모세포를 활성화시켜 ETV2 널 비-인간 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 ETV2 널 비-인간 배반포를 생성하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 ETV2 널 비-인간 배반포 내로 도입하는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 배반포를 가임신 대리모 비-인간 동물 내에 이식하여 인간 ETV2를 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 ETV2 유전자를 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법이 본원에서 기재된다.

대 표 도 - 도2



도 2

(52) CPC특허분류
A01K 2227/108 (2013.01)
A01K 2267/025 (2013.01)
(72) 발명자
라스무센, 타라
미국 55378 미네소타주 새비지 오타와 애비뉴 12723
고야노-나카가와, 나오코
미국 55126 미네소타주 쇼어뷰 틸러 레인 980

(56) 선행기술조사문헌
WO2015168125 A1
Stem Cells vol.30 pp.1521-1531(2012.07.31.)*
Cell Stem Cell. vol.15 no.4 pp.406-409(2014).
PNAS vol.106 no.3 pp.814-9(2009).
WO2017075276 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 세포를 포함하고, 인간 ETV2를 발현하며 비-인간 동물 ETV2의 발현이 결여된 키메라 비-인간 동물 또는 배반포로서, 상기 비-인간이 돼지, 소, 말, 양 또는 염소인 것인 비-인간 동물 또는 배반포.

청구항 2

제1항에 있어서, 비-인간 동물이 백혈구, 적혈구, 혈소판 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 혈액 세포를 발현하는 것인 키메라 비-인간 동물.

청구항 3

제1항에 있어서, 키메라 비-인간 동물이 인간 내피를 발현하는 것인 키메라 비-인간 동물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본 출원은 그에 대한 우선권이 본원에서 주장되고 그 전문이 본원에 참고로 포함된, 2015년 3월 3일 출원된 미국 특허 가출원 62/127,330의 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 명세서는 EFS-Web을 통해 전자 형식으로 제출된 전자 서열 목록 텍스트 파일을 참고로 포함한다. 텍스트 파일의 명칭은 "1552048.txt"이고, 12,288 바이트이며, 2016년 3월 1일에 생성되었다.

배 경 기 술

[0005] 혈액은 인체의 주요 기관이다. 이것은 세포 및 혈장으로 구성된다. 세포 부분은 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함한다. 혈장 성분은 물 및 용해된 화합물, 예컨대 특히 단백질, 당 또는 전해질로 이루어진다.

[0006] 혈액의 형성은 낭배형성 동안 시작된다. 제1 조혈 계통은 난황낭의 혈액 섬에 나타난다. 조혈 전구 세포의 분화는 유전 프로그램에 의해 조절된다. 이 유전 프로그램의 핵심 요소는 유전자 Ets 변이체 유전자 2 (Etv2)로 최근에 제시되었다 (Stem cells. 2012 August; 30(8):1611-1623. doi:10.1002/stem.1131)이다. 마우스에서 Etv2 유전자의 절제는 난황낭에서 조혈 및 내피 계통의 손실을 초래하였다. Etv2-돌연변이체에서 Etv2 유전자의 강제 과다발현은 혈액 및 내피 계통을 회복시켰다 (Genesis 2013 Jul:51(7):471-480. Doi: 10.1002/dvg.22396).

[0007] 혈액 장애는 적혈구의 생성 (즉, 빈혈), 백혈구의 증식 (즉, 백혈병) 또는 혈소판의 응고 (즉, 응고병증)에 영향을 줄 수 있다. 기증된 혈액은 이러한 다양한 장애를 치료하기 위해 사용된다. 적혈구는 겸상 적혈구 빈혈, 지중해빈혈, 재생불량성 빈혈, 백혈병 또는 암과 연관된 만성 빈혈 환자를 치료하기 위해 사용된다. 혈소판은 수술을받는 환자의 출혈을 조절하는데 사용된다. 현재, 인간 혈액의 유일한 공급원은 인간 공여자이다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 돼지에서 Etv2 유전자의 결실이 조혈내피 발달의 초기 단계에서 조혈 및 내피 계통의 절제를 유도한

다는 새로운 발견을 기초로 한다. 본 발명은 돼지 Etv2 유전자가 결핍된 (따라서 돼지 혈관계 및 혈액이 결핍된) 돼지 배반포를 생성한다. 인간 줄기 세포, 예컨대 Etv2 유전자에 양성인 iPS 세포를 돌연변이체 돼지 (Etv2가 결핍된) 배반포에 주입함으로써, 본 발명은 인간 줄기 세포, 예컨대 iPS 세포로부터 유래된 인간 또는 인간화된 혈액 및 혈관계를 생성하는 돼지를 생성한다. 매년 300,000명 초과의 미국인이 관상 동맥 우회로 이식술을 받고, 이러한 조작된 관상 혈관의 사용으로부터 혜택을 볼 것이다.

[0009] 임상 적용을 위한 개인화된 인간/인간화된 혈액 및 혈관계의 생산을 위한 숙주로서 ETV2 녹아웃 돼지 또는 다른 동물, 예컨대 소 또는 염소의 개발이 본원에서 기재된다. 혈액을 생성하는 전구 세포는 또한 혈관 내막을 나타내는 내피를 생성한다. 내피가 없는 경우, 혈관계가 없고, 발달 중인 배아는 생존할 수 없다. 심혈관 및 조혈 질환의 치료를 위한 인간/인간화된 조직의 새로운 공급원으로 기능하는 것 이외에, 인간화된 돼지는 또한 인간 계통의 재생 및/또는 약리학적 작용제에 대한 반응(들)을 연구하기 위한 대형 동물 모델로서 작용할 것이다. Etv2는 기존 심혈관 및 조혈내피 전사 인자 및 신호전달 캐스케이드의 표적으로 밝혀졌고, Etv2가 조혈내피 계통의 특성 및 분화를 조절한다는 것이 증명되었다. 또한, Etv2 돌연변이체 마우스 배아는 생존할 수 없고 내피/혈관 및 조혈 계통이 결여되어 있음이 주목되었다. 유전자 편집 기술을 사용하여, ETV2 돌연변이체 돼지 배아는 조혈 및 내피 계통이 결여된다는 사실이 확립되었다. 그 결과를 바탕으로, Etv2는 발생 동안 조혈내피 계통의 주된 조절인자이다. 인간화된 유전자 변형 동물 대리모의 조작이 본원에서 기재된다.

[0010] 한 실시양태는 비-인간 동물 세포 또는 배반포에 기능적 ETV2 단백질이 결여되도록 게놈이 ETV2 유전자의 양쪽 대립유전자에 돌연변이를 보유하는 것인 비-인간 동물 세포 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 ETV2 유전자의 결실이다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 동물 세포 또는 배반포는 돼지, 소, 말 또는 염소이다.

[0011] 한 실시양태는 인간 ETV2를 발현하며 비-인간 동물 ETV2의 발현이 결여된 키메라 비-인간 동물 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 백혈구, 적혈구, 혈소판 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 혈액 세포를 발현한다. 또 다른 실시양태에서, 키메라 비-인간 동물은 인간 내피를 발현한다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 돼지, 소, 말 또는 염소이다.

[0012] 한 실시양태는 a) ETV2 널(null) 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 ETV2 유전자의 양쪽 카피는 비-인간 동물에서 기능적 ETV2 (그 단독으로 또는 다른 유전자와 함께) 단백질의 생성을 억제하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 ETV2 널 비-인간 동물 세포로부터의 핵을 제핵된 비-인간 난모세포에 융합시키고 상기 난모세포를 활성화시켜 ETV2 널 비-인간 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 ETV2 널 비-인간 배반포를 생성하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 ETV2 널 비-인간 배반포 내로 도입하는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 배반포를 가임신 대리모 비-인간 동물 내에 이식하여 인간 ETV2를 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 ETV2 유전자를 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0013] 또 다른 실시양태는 a) ETV2 널 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 ETV2 유전자의 양쪽 대립유전자는 기능적 ETV2 단백질의 생성을 억제하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 ETV2 널 비-인간 동물 세포로부터의 핵을 제핵된 비-인간 난모세포에 융합시키고 상기 난모세포를 활성화시켜 ETV2 널 비-인간 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 ETV2 널 비-인간 배반포 또는 상실배를 생성하는 단계; c) 인간 공여자 줄기 세포를 b)의 ETV2 널 비-인간 배반포 내로 도입하는 단계; 및 d) 인간 및/또는 인간화된 혈액 세포 또는 혈관을 발현하는 비-인간 동물을 생성하도록 c)로부터의 상기 배반포 또는 상실배를 가임신 대리모 비-인간 동물 내에 이식하는 단계를 포함하는, 비-인간 동물에서 인간 및/또는 인간화된 혈액 세포 또는 혈관을 생성하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 혈액 세포는 인간 유도된 만능 또는 인간 제대혈 줄기 세포-유래 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판이다.

[0014] 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 돼지, 소, 말 또는 염소이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 공여자 줄기 세포는 조직 특이적 줄기 세포, 만능 줄기 세포, 다능 성체 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포 (UCBSC)이다. 한 실시양태에서, 줄기 세포를 제공하는 공여자는 생산된 인간화된 조직 또는 기관의 수여자이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 유도된 만능 세포는 섬유모세포로부터 형성된다.

[0015] 한 실시양태는 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 비-인간 동물을 제공한다. 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 방법으로부터 생성된 2종의 비-인간 동물의 교배에 의해 생산된 자손체 비-인간 동물을 제공하며, 여기서 상기 자손체 비-인간 동물은 인간 ETV2를 발현하고, 상기 자손체 비-인간의 게놈은 상기 비-인간 동물 ETV2 유전자의 동형접합성 결실을 보유한다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 돼지, 소, 말 또는 염소이다.

[0016] 한 실시양태는 돼지 세포 또는 배반포에 기능적 ETV2 단백질이 결여되도록 게놈이 ETV2 유전자의 결실을 포함하는 유전자 녹아웃 돼지 세포 또는 배반포를 제공하며, 여기서 돼지 세포 또는 배반포는 결실에 대해 동형접합성이다. 한 실시양태에서, 야생형 돼지 (수스 스크로파(*Sus scrofa*)) ETV2 (ets 변이체 2)의 서열은 ENSSSCG00000002906에서 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 예측된 수스 스크로파 ets 변이체 2 (ETV2) mRNA 및 단백질 서열은 아래에 제시된다:

```
   1 tgagtcattg gaaacaaata cagacatcat aacacttcac tcctaaatac ctgtttcata
  61 accttataaa gatagcttcc atatcataat accattatca catctaagaa aatgactaat
 121 tatctcatat tcagttcata ctctaatttc ctcatgtgcc taaactatga cagcatggaa
 181 gggcatgatg gattctggag atgaagaaaa gtaggaggaa acgcacctca atttcccctt
 241 tcataaagtc agggtaagac tagtacccac ttcctaagag aattaaacaa aggcccatgg
 301 cacagttagt agcaagcaat gagccctcaa gaaatgttaa ccattattgt cactgttgtt
 361 attgtttata ttgttgatgt tactgtctgc tgaagcagcc ccagaacttc ctcctcaaag
 421 ccctcgaagg ggaaaacagc ctggtggaag atcccaggtc gaccaaccaa cccccaccat
 481 atcccccgca ggcccccctgc ggattgtgac gtctgctgac caggggtctg gccggaaatc
 541 ccccttcctg ttgcagataa gcctggtgca gcccagctga ccccaggccc tcctccccca
 601 tcacctccct tgtcacagga tcaagtcccc aagccccctt cccctcccca ttccagtcaa
 661 cccagaaaca cccctctgca ccccaggtca tgcccatccc attgtttccc aggctcctgc
 721 tcaagtccaa gacaccccaa agctaccgtg gaggcttgag gccatcccag ggggcagagg
 781 tgggtgggga gggggtggca cagcttggcc ccgcctcggc ccctgcaact tgacccgggc
 841 tgcgaccccc gctctgacgt cttggaaaat tccccccctgc ccaggccccc agaggagggg
 901 gtatgtggta tgaaatgggg ctgagacccc tggctggggg cacagggatc tgccagagaa
 961 cattcactac tggcatccat ggacttgtgg aactgggatg aagcatcgcc acaggaagtg
1021 cccctgggga acagactgtc agggctggaa ggagctgaat tcgacttcta tttccctgaa
1081 ctggcactcc cagggacag gctgacagcg gagacatact ggaaaactgg ctcttcatcc
1141 ttatctgtcc cagggattcc acagccggac tgggtctccg cattaccgaa cccagaagct
1201 ccatggggcg cggaacccgt ccctcaggct cttccgtggt ccggagattg gacagacctg
1261 ccgtacagcg gctcggtccc ttggagccgg gtctcccagg ccctggggtc tggctgccta
1321 gatttccaag gtcccattca gctgtggcag ttcctcctgg agctgctcca cgacgggacg
1381 cgtagcagct gcatccgctg gacgggcaac agccgcgagt tccaactgtg cgaccccaaa
1441 gaggtggcgc ggctgtgggg cgaacgcaag aggaagcccg gcatgaatta tgagaagctg
1501 agccgaggcc tgcgttacta ctaccgccgc gacatcgtgc tcaagagcgg ggggcgcaag
1561 tacacgtacc gcttcggagg ccgagtgcca ggcctagcct atcccgaccg catggggac
1621 ggacagggag cagcgaccca ataaaaatat ctggtcaagc c (SEQ ID NO: 20)

MDLWNWDEASPQEVPLGNRLSGLEGAEFDFYFPELALPGDRLTA
ETYWKTGSSSLSVPGIPQPDWVSALPNPEAPWGAEPVPQALPWSGDWTDLPYSGSVPW
SRVSQALGSGCLDFQGPIQLWQFLLELLHDGIRSSCIRWTGNSREFQLCDPKEVARLW
GERKRKPGMNYEKLSRGLRYYYRRDIVLKSGGRKYTYRFGGRVPGLAYPDRMGDGQGA ATQ (SEQ ID
NO: 21)
```

[0017]

[0018] 한 실시양태는 (Etv2가 결핍된) ETV2 돌연변이체 돼지를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 키메라 ETV2 돌연변이체 돼지는 백혈구, 적혈구, 혈소판 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 또는 인간화된 혈액 세포, 및 인간 또는 인간화된 내피를 발현한다.

[0019] 한 실시양태는 a) ETV2 널 돼지 세포를 생성하는 단계; b) a)의 상기 ETV2 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵된 돼지 난모세포에 융합시키고 상기 난모세포를 활성화시켜 ETV2 널 돼지 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식 (SCNT)에 의해 ETV2 널 돼지 배반포를 생성하는 단계; 및 c) 인간 줄기 세포를 돼지 ETV2 널 배반포 내로 도입하는 단계를 포함하는, ETV2 돌연변이체 돼지를 생산하는 방법을 제공한다.

[0020] 또 다른 실시양태는 a) ETV2 널 돼지 세포를 생성하는 단계; b) a)의 상기 ETV2 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵된 돼지 난모세포에 융합시키고 상기 난모세포를 활성화시켜 ETV2 널 돼지 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식 (SCNT)에 의해 ETV2 널 돼지 배반포를 생성하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 돼지 ETV2 널 배반포 (포배강) 내로 도입하는 단계, 및 d) 인간/인간화된 혈액 세포 및 인간/인간화된 내피를

갖는 돼지를 생성하도록 c)로부터의 상기 배반포를 가임신/대리모 돼지 내에 이식하는 단계 (인간 줄기 세포는 유전자 편집된 배반포에 첨가됨)를 포함하는, 돼지에서 인간 또는 인간화된 혈액 세포 및 인간 또는 인간화된 내피를 생산하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 혈액 세포 및 내피는 iPS- 또는 인간 제대혈 줄기 세포-유래 백혈구, 적혈구, 혈소판 및/또는 내피이다.

[0021] 인간 또는 인간화된 조직 및 기관을 각각의 수여자의 면역 복합체에 대해 개인화하는 것이 유용할 것이다. 본원에 개시된 바와 같이, 표적 기관의 성장 및/또는 분화를 담당하는 유전자를 녹아웃시키거나 약하게 만들기 위해 그의 게놈을 편집하는 숙주로서 대형 동물을 사용하고, 기관의 성장 및 발달에 대한 누락된 유전 정보를 보완하기 위해 배반포 또는 접합자 단계에서 상기 동물에게 공여자 줄기 세포를 접종함으로써 그렇게 할 수 있다. 그 결과는 보완된 조직 (인간/인간화된 기관)이 공여자의 유전자형 및 표현형과 일치하는 키메라 동물이다. 이러한 기관은 단일 세대에서 만들어질 수 있고, 줄기 세포는 환자 자신의 몸에서 채취되거나 생성될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 세포에서 여러 유전자를 동시에 편집함으로써 그렇게 할 수 있다 (예를 들어, 본원에 참고로 포함된 WO 2015/168125 참조). 여러 유전자는 척추동물 세포 또는 배아에서 표적화된 뉴클레아제 및 상동성 유도 복구 (HDR) 주형을 사용한 편집을 위해 표적화될 수 있다.

[0022] 한 실시양태는 i) 세포 또는 배아에서 숙주의 원하는 조직 또는 기관의 성장 및/또는 발달을 담당하는 하나 이상의 유전자를 유전적으로 편집하는 단계; ii) 인간화된 조직 또는 기관을 생산하기 위한 키메라 동물을 생성하도록 (세포 (예를 들어, 줄기 세포) 보완의 사용을 통해 키메라 동물을 생산하도록) 유효량의 공여자로부터의 줄기 세포를 세포, 배아, 접합자 또는 배반포 (예를 들어, 인간-돼지 배반포)에 주사함으로써 숙주의 상실된 유전 정보를 보완하는 단계를 포함하는, 비-인간 숙주 동물에서 인간화된 조직을 생산하는 방법을 제공한다.

[0023] 한 실시양태에서, 줄기 세포는 인간 유도된 만능 줄기 세포 (iPS 세포) 또는 인간 제대혈 줄기 세포이다. 한 실시양태에서, 인간 iPS 세포는 섬유모세포 또는 임의의 성체 또는 체세포 (예를 들어, 인간 세포)로부터 형성되었다. 한 실시양태에서, ETV2 널 돼지 세포는 TALEN (Gene: ETV2 ENSSSCG00000002906)를 이용한 유전자 편집을 사용하여 생성되었다.

[0024] 키메라 돼지를 생산하는 방법 및 본 발명의 키메라 돼지로부터 조직을 생산하는 방법이 추가로 기재된다. 한 실시양태는 본원에서 기재되는 방법으로부터 생성된 2종의 돼지의 교배로부터 생산된 자손체 돼지를 제공하며, 여기서 상기 자손체 돼지는 인간 ETV2를 발현하고, 상기 자손체 돼지의 게놈은 돼지 ETV2 유전자의 동형접합성 결실을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1A-D. Etv2는 조혈 및 내피 계통의 주된 조절인자이다. (A) Etv2 돌연변이체 및 야생형 한배새끼 배아를 E8.5에서 수집하고, 절편화하고, 헤마톡실린-에오신 염색 및 엔도뮤신 항체 (α-엔도뮤신)를 사용한 면역조직화학으로 분석하였다. 이 단계에서, 1차 심장 정맥 (PHV), 등 대동맥 (DA) 및 심장 내막 (End)이 야생형 배아에서 형성되는 반면, Etv2 돌연변이체 마우스에는 이러한 구조가 결여되어 있다. 항-엔도뮤신 염색을 통해, 돌연변이체 배아에 없는 혈관 (화살촉) 및 심장 내막 (화살표)을 확인한다. (B) E 8.5에서 Etv2 야생형 (Wt), 이형접합성 (Het) 및 돌연변이체 배아로부터의 난황 세포를 사용한 메틸셀룰로스 콜로니 형성 검정. Etv2에 대한 야생형 및 이형접합성 동물은 유사한 콜로니 형성 활성을 갖는 반면, Etv2 돌연변이체 난황 세포는 아무런 활성도 갖지 않음에 주목한다. (C) 안정적으로 형질감염된 ES 세포주는 독시사이클린 (Dox)-유도성 방식으로 Etv2를 발현하도록 조작되었다. ES 세포는 4일 동안 분화되고, Etv2는 Dox의 첨가에 의해 유도되었다. 유도 5일 후 유세포 계측 분석을 시행한 결과, Etv2 유도시에 조혈 ($CD45^+$) 및 내피 ($PECAM^+$ 또는 $Tie2^+$) 계통 둘 다가 유의하게 증가하는 것으로 밝혀졌다. (D) 제3일부터 제6일까지 Etv2를 유도한 후 EB의 콜로니 형성 활성. Etv2 유도시 증가된 조혈 활성에 주목한다. 열린 막대: 유도 없음, 채워진 막대: Dox 유도.

도 2. 중배엽 계통의 기준에서 Etv2의 제안된 역할.

도 3A-G. Flk1은 그렇지 않지만 Etv2는 Etv2 돌연변이체 ESC/EB의 내피 및 조혈 표현형을 구조할 수 있다. Etv2 및 Flk1이 Flk1-/- ESC/EB의 내피 분화를 구조할 수 있지만 (A), Etv2만이 Etv2-/- ESC/EB를 구조할 수 있음 (B)을 입증하는 FACS 분석의 정량화. 조혈 마커를 사용하여 동일한 결과가 얻어졌다 (데이터는 제시되지 않음). Etv2 및 Flk1에 대한 계통 및 구조 연구의 요약은 패널 (C)에 제시되어 있다. Gata2는 Etv2 활성과 물리적으로 상호작용하고 증폭시킨다. (D) Etv2-Gata2 구조의 개략도. Etv2 및 Gata2는 2A 펩티드 서열을 통해 연결되고, 동등하게 발현된다. 융합 구축물은 리보솜 스키핑 메카니즘을 통해 2개의 단백질, 즉 Etv2 및 Gata2로 번역되었다. (E-F) EB에서 Etv2 및 Gata2의 동시 발현은 조혈 및 내피 계통 분화를 향상시킨다. EB는 독시

사이클린 (+ Dox)으로 처리되거나 EB 제3일부터 제4일까지 처리되지 않은 (-Dox) 상태로 유지되고 제6 일에 FACS 분석을 위해 수거되었다. 조혈 계통은 c-Kit^{+}/CD41^{+} 세포 집단 (E)이고, 내피 계통은 Flk1^{+}/CD31^{+} (F)로 표시된다. 패널 G는 내피 및 조혈 계통에서 Etv2에 대한 상류 조절인자 및 하류 표적을 강조한 것이다.

도 4A-B. ETV2의 TALEN 매개 녹아웃. (A) 유전자 편집을 검출하기 위해 사용되는 3단계 PCR 검정. 프라이머 a-d로부터의 증폭은 결실 대립유전자가 존재함을 나타내었다. 이형접합성 클론과 동형접합성 클론을 구별하기 위해, 프라이머 a-b 및 c-d를 사용하여 야생형 대립유전자를 증폭하였다. a-d 생성물이 존재하고 a-b, c-d 생성물 둘 다가 클론에 존재하지 않는 경우에만, 클론은 결실 대립유전자에 대해 동형접합성인 것으로 간주된다. (B) 이 기준에 맞는 클론은 녹색 상자로 둘러싸여 있다.

도 5A-H. 돼지 ETV2의 상실은 마우스 Etv2 돌연변이체 표현형을 재현하였다. 동일한 발달 단계에서 야생형 E18.0 돼지 배아 (A) 및 (B) ETV2 녹아웃 배아. 삽입도는 요막의 확대도를 제시한다. 돌연변이체에서 혈관총 형성의 결여와 함께 비정상적인 전체 모폴로지 (삽입도)를 주목한다. (C-H) A 및 B에 각각 제시된 배아의 요막 (C, D), 심장 수준 (E, F) 및 몸통 수준 (G, H)을 통한 절편은 내피 마커인 Tie2; 심장 계통 마커인 Gata4; 및 핵 역염색제인 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)에 대해 염색되었다. 야생형 요막은 Tie2 양성 내피 내막에 혈관이 고도로 형성되어 있고, 혈액을 함유하는 반면 (C, 화살표), 돌연변이체에는 이 집단이 결여되었다 (D). 심장 내막, 주정맥 (CV), 및 등 대동맥 (DA)은 야생형 배아에서 분명하게 볼 수 있다 (E, G). 이와 대조적으로, Gata4 (녹색)로 표시된 심장 전구체 및 창자 (각각 F 및 H)가 있었지만, ETV2 널 배아에는 상기 구조가 완전히 결여되었다. 스케일 막대: 1000 μm (A, B), 200 μm (A, B 내의 삽입도), 100 μm (C-H).

도 6A-H. 야생형 ES 세포를 사용한 Etv2 돌연변이체 마우스 배아의 보완. Etv2$^{-/+}$ 및 Etv2$^{dFl/+}$ 마우스의 교배를 통해 얻은 배반포에 10-15개의 EYFP 표지된 야생형 ES 세포를 주입하였다. E10.5에서 배아를 수거하고, 유전자형을 결정하였다. A, B: 야생형 ES 세포 자손체의 분포를 제시하는 배아의 전체 조직 에피형광 이미지. C-H: A 및 B에 각각 제시된 배아의 심장 (심실)을 통한 절편. 패널은 EYFP (C, D), 엔도뮤신 (E, F) 면역조직화학, 및 오버레이 이미지 (G, H)를 제시한다. 스케일 막대: 1000 μm (A, B) 및 100 μm (C-H).

도 7A-C. Etv2 돌연변이체 및 야생형 ES 세포의 동시 분화. 7AC5, EYFP-표지된 야생형 ES 세포 및 Etv2 돌연변이체 ES 세포 (Etv2$^{-/-}$)는 현적 방법에 의해 별개로 분화되거나 (상단 2개의 줄) 또는 혼합되어 동시 분화되었다 (하단 줄). 세포를 제4일에 해리하고, 세포 표면 마커에 대해 분석하였다. EYFP 음성 Etv2 돌연변이체 세포는 내피 및 조혈 계통에 기여하지 않고, 이것은 야생형 ES 세포로부터 최소의 주변분비 효과가 있음을 나타냄에 유의해야 한다.

도 8A-C. 야생형 래트 ES 세포는 Etv2 돌연변이체 마우스 ES 세포의 내피 잠재력을 구조한다. 야생형 마우스 ES 세포 (A), Etv2 돌연변이체 마우스 ES 세포 (B), 또는 1:1 비율의 Etv2 돌연변이체 마우스 ES 세포와 야생형 래트 ES 세포 (C)를 EB 형성에 의해 분화되도록 유도하였다. 야생형 마우스 ES 세포는 돌연변이체 EB (B)에서 상실된 혈관-유사 구조의 내막을 형성하는 CD31^{+} 세포를 생성함 (A)에 주목한다. 야생형 래트 ES 세포와의 동시 분화는 CD31^{+} 집단을 회복시켰다 (C).

도 9A-B. 키메라 인간-돼지 배반포. (A) ICM에 hUCBSC가 있는 배반포. 배반포가 탈출하기 시작함에 주목한다. (B) ICM에 DiI-표지된 hiPSC가 있는 배반포. DiI-표지된 hiPSC가 있는 인접한 부화된 배반포를 주목한다. ZP: 투명대; ICM: 내부 세포 덩어리.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 임상 및 전임상 적용을 위한 개인화된 인간/인간화된 혈액 및 혈관계의 생산을 위한 숙주로서 ETV2 (또는 다른 유전자 녹아웃과 조합된 ETV2) 녹아웃 동물, 예컨대 돼지의 개발이 본원에서 기재된다. 돼지와 같은 인간화된 동물은 심혈관 및 조혈 질환의 치료를 위한 인간/인간화된 조직의 새로운 공급원으로서의 기능 외에도, 인간 계통의 재생 또는 약리학적 작용제에 대한 반응(들)을 연구하기 위한 대형 동물 모델의 기능할 것이다.

[0027] 혈액 및 심혈관 질환은 둘 다 흔하고 치명적이다 (1-3). 이들 질환은 만성적이고, 심신을 쇠약하게 만들고, 치명적이며, 새로운 요법을 필요로 한다. 혈액 및 심혈관 발달 프로그램은 둘 다 측판 중배엽 유도체이고 둘 다 전사 인자, 신호전달 캐스케이드 및 세포외 신호의 교차 네트워크에 의해 동시에 조절되는 다수의 중첩하는 특징을 갖는다. 최근의 연구는 공통적인 전구체 딸세포가 조혈내피 계통을 생성함을 제시하고 있다. Etv2/Etsrp71/ER71은 Mesp1, Flk1/Creb 및 Nkx2-5를 포함하는 전통적인 심혈관 및 조혈내피 전사 인자 및 신호

전달 캐스케이드의 표적이다. Etv2가 조혈내피 계통의 특성 및 분화를 조절한다는 것이 증명되었다 (4-17). 또한, Etv2 돌연변이체 마우스 배아는 생존할 수 없고, 중배엽 (조혈 및 내피) 계통 발달을 교란하였다 (9, 10). 본원에서 기재되는 데이터는 ETV2 돌연변이체 돼지 배아가 또한 생존할 수 없고 조혈 및 내피 계통이 결여된다는 것을 지지한다. 그 결과를 기초로 할 때, Etv2는 발달 동안 조혈내피 계통의 주된 조절인자이다. 본원에서 기재되는 것은 임상 적용을 위한 개인화된 인간 혈액 및 혈관계의 생산을 위한 숙주로서의 ETV2 녹아웃 돼지이다. 이 인간화된 대형 동물 모델은 재생 의학의 중요한 자원이 될 것이고, 개인화된 인간화 돼지 기관을 생성하기 위한 플랫폼으로 사용될 것이다. 이 전략은 만성 심혈관 및 조혈 질환 및 이식을 위한 새로운 요법 개발에 큰 영향을 미칠 수 있는 역량을 갖추고 있다. 심혈관 및 조혈 질환의 치료를 위한 인간 조직의 새로운 공급원으로서 기능을 하는 것 외에, 인간화 된 돼지는 인간 계통의 재생 또는 약리학적 작용제에 대한 반응(들)을 연구하기 위한 대형 동물 모델로서 기능할 것이다.

[0028] **정의:**

[0029] 본 발명을 기재하고 청구할 때, 하기의 용어가 아래에 제시된 정의에 따라 사용될 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 기재되는 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 라디칼, 치환체 및 범위에 대해 아래에서 나열되는 특정 및 바람직한 값은 단지 예시를 위한 것이고, 이들은 다른 정의된 값 또는 라디칼 및 치환체에 대해 정의된 범위 내의 다른 값을 배제하지 않는다.

[0030] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 용어는 하나 또는 하나 초과, 즉 적어도 하나의 문법적 대상을 지칭한다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0031] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 개략적으로, 범위 내의, 대략 또는 그 부근을 의미한다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용될 때, 제시된 수치 값의 위 및 아래의 경계를 확장함으로써 해당 범위를 수식한다. 일반적으로, 용어 "약"은 20%의 편차로 언급된 값의 위 및 아래로 수치 값을 수식하기 위해 본원에서 사용된다.

[0032] 용어 "단리된"은 생체 내에서 인자(들), 세포 또는 세포들과 연관된 하나 이상의 인자, 세포 또는 하나 이상의 세포 성분과 연관되지 않은 인자(들), 세포 또는 세포들을 지칭한다.

[0033] "세포"는 인간을 포함하는 포유동물과 같은 척추동물에서 유래한 세포를 포함하거나, "대상체"는 이 척추동물이다. 포유동물은 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 반려 동물을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. "동물"이라는 용어에는 개, 고양이, 어류, 저빌, 기니피그, 햄스터, 말, 토끼, 돼지, 마우스, 원숭이 (유인원, 고릴라, 침팬지 또는 오랑우탄), 래트, 양, 염소, 소 및 새가 포함된다.

[0034] "피그(pig)" 및 "스와인(swine)" 및 "포사인(porcine)"이라는 용어는 돼지로서 교환가능하게 사용되고, 성별, 크기 또는 품종에 관계없이 동일한 유형의 동물을 언급하는 총칭이다.

[0035] 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시켜 생성된 인공적인 제한 효소이다. 이 시약은 계내 게놈 편집을 위한 효율적이고 프로그래밍이 가능하고 특이적인 DNA 절단을 가능하게 한다. 전사 활성화인자-유사 이펙터 (TALE)는 서열 특이적 방식으로 DNA에 결합하는 단백질이다. 상기 TALE를 뉴클레아제 (예를 들어, FokI 엔도뉴클레아제)에 융합시킴으로써, 고도로 특이적인 DNA "가위"가 만들어진다 (이 분자는 임의의 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다). 본원에서 사용되는 용어 TALEN은 광범위하고, 또 다른 TALEN의 도움 없이 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있는 단량체 TALEN을 포함한다. TALEN이라는 용어는 또한 동일한 부위에서 DNA를 절단하기 위해 함께 작용하도록 조작된 한 쌍의 TALEN 중 하나의 구성원 또는 양쪽 구성원 모두를 지칭하기 위해 사용된다. 함께 작용하는 TALEN은 좌측 TALEN 및 우측 TALEN으로 언급될 수 있고, 이것은 DNA의 선성을 나타낸다.

[0036] 일단 TALEN 유전자가 조립되면, 이 유전자는 플라스미드에 삽입되고: 이어서, 플라스미드를 사용하여 유전자 산물이 발현되는 표적 세포를 형질감염시키고, 게놈에 접근하기 위해 핵에 들어간다. TALEN은 이중 가닥 파단 (DSB)을 유도하고 세포가 그에 대해 복구 메카니즘으로 반응하는 화물/미리 선택된 유전자를 선택적으로 삽입하여 게놈을 편집하기 위해 사용할 수 있다. 이 방법으로, 이들은 예를 들어 질환을 일으키는 게놈 내의 돌연변이를 바로잡기 위해 사용할 수 있다.

[0037] 유전자 편집을 포함한 유전자 조작은 통상의 기술자에게 이용가능한 임의의 방법에 의해, 예를 들어 표적화 엔도뉴클레아제 및 상동성 유도 복구 (HDR), TALEN, CRISPR (예를 들어, CAS9/CRISPR), 재조합효소 융합 분자, 합성 돼지 인공 염색체, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 또는 유전자 편집을 위한 rAAV 기반 시스템 (예를 들어, 원

하는 표적 유전자를 녹아웃하기 위한)을 사용하여 수행될 수 있다. 또한, 녹아웃을 위해, 유전자 (예컨대, 간섭 RNA (shRNA, siRNA, dsRNA, RISC, miRNA)의 불활성화를 위해 또는 유전자 발현을 위해 다양한 핵산을 세포 내로 도입할 수 있다.

[0038] 체세포 핵 이식 (SCNT)은 체세포 및 난자로부터 생존가능한 배아를 만들기 위한 실험 기술이다. 체세포 핵 이식의 과정은 두 개의 다른 세포를 수반한다. 제1 세포는 난자 (난세포/난모세포)로 알려진 여성 배우체이다. 제2 세포는 체세포이고, 이것은 인체의 세포를 가리킨다. 피부 세포, 지방 세포 및 간 세포는 단지 몇 가지 예이다. 공여자 난세포의 핵을 제거하고 폐기하여 '탈프로그래밍된' 상태로 만든다. 체세포의 핵은 또한 제거되어 보존되고, 핵이 제거된 체세포는 버린다. 남아있는 것은 혼자 남은 체세포 핵 및 제핵된 난세포이다. 이어서, 이들은 체세포 핵을 '빈' 난자로 분출함으로써 융합된다. 난세포에 삽입된 후, 체세포 핵은 그의 숙주 난세포에 의해 재프로그래밍된다. 체세포의 핵을 이제 포함하는 난자는 충격으로 자극되고, 분열하기 시작할 것이다. 난세포는 이제 생존가능하고, 단지 한 부모로부터 필요한 모든 유전 정보를 보유하고 있는 성체 유기체를 생산할 수 있다. 발달은 정상적으로 일어날 것이고, 많은 유사 분열 후에 이 단일 세포는 원래의 유기체 (즉, 클론)와 동일한 게놈을 갖는 배반포 (대략 100개의 세포를 갖는 초기 단계 배아)를 형성한다. 그런 다음, 줄기 세포는 치료 클로닝에 사용하기 위해 이 클론 배아를 파괴하여 얻을 수 있거나, 생식 클로닝의 경우 클론 배아는 추가의 발달을 위해 숙주 모체 (가임신/대리모) 내에 이식되어 임신이 시작될 수 있다.

[0039] "키메라"는 유전적으로 구별되는 세포로 이루어진 단일 유기체이다.

[0040] "인간화된"은 그의 단백질 서열 및 유전적 보체가 비-인간 숙주보다 인간의 것에 보다 유사한 비-인간 동물로부터 수거된 기관 또는 조직을 말한다.

[0041] "기관"은 공통 기능을 수행하기 위해 구조 단위에 연결된 조직의 집합체를 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 "조직"은 특정 기능을 함께 수행하는, 동일한 기원의 유사한 세포의 집합체를 말한다.

[0042] 무효접합성 유기체는 동일한 유전자에 대해 2개의 돌연변이체 또는 상실 대립유전자를 보유한다. 돌연변이체/상실 대립유전자는 둘 다 완전한 기능 상실 또는 '널' 대립유전자이고, 따라서 동형접합성 널 및 무효접합성은 동의어이다.

[0043] 유전자 녹아웃 (약어: KO)은 유기체의 대립유전자 둘 다가 작동 불능 상태가되는 (유기체의 "녹아웃") 유전자 기술이다. 녹아웃, 불활성화 및 붕괴라는 용어는 본원에서 유전자 발현 산물이 제거되거나 크게 감소되도록 표적 부위가 변경됨을 의미하도록 교환가능하게 사용된다. 또한, 녹아웃 유기체 또는 단순히 녹아웃으로도 알려져 있다. 이 용어는 또한 유전자를 "녹아웃"시키는 것과 같이 상기 유기체를 만드는 과정을 의미한다. 이 기술은 본질적으로 유전자 녹인의 반대이다.

[0044] 유전자라는 용어는 광범하고, 기능성 생성물을 만들기 위해 발현되는 염색체 DNA를 지칭한다. 유전자는 대립유전자를 갖는다. 유전자 편집은 일-대립유전자 또는 이-대립유전자일 수 있다.

[0045] 용어 "포함하다", "포함하는" 등은 미국 특허법에서 그들에게 부여된 의미를 가질 수 있고, "포함한다", "포함한" 등을 의미할 수 있다. 본원에서 사용되는 "포함한" 또는 "포함한다" 등은 비제한적으로 포함하는 것을 의미한다.

[0046] **외인성 기관 생산은 기관 이식에 대한 수요를 충족시키기 위해 필요한다.**

[0047] 현재, 진행된 말기 기관 부전에 대한 유일한 최종 요법은 이식이다. 이식을 위한 제한 요인은 공여자 기관의 이용가능성이다. 수십만 명의 환자가 그러한 치료로 혜택을 받을 수 있지만, 동반 질환으로 인해 적절한 이식 후보자가 되지 못한다. 따라서, 사체 또는 생체 관련 공여자 기관이 심각하게 부족한 상태이다. 또한, 기관 이식에는 해로운 부작용을 또한 갖는 면역 억제가 평생 필요하다. 본원에서, 돼지에서의 인간화된 조직의 생성이 기재되고, 이것은 이식을 위한 기관의 무제한적인 공급원이 될 것이며, 심혈관 및 조혈 질환의 치료를 위한 패러다임 전환 플랫폼을 제공할 것이다.

[0048] 엄청난 관심이 이종 이식에 집중되고 있다. 예를 들어, 배반포 보완 과정에 의해 마우스에서 래트 췌장이 생성되었다 (27). 이 연구에서, 야생형 (Wt) 래트의 만능 줄기 세포 (rPSC)가 췌장 발달의 주요 조절 유전자인 Pdx1에 대한 배반포 돌연변이체에 주입되었다 (27). rPSC-주입된 배반포를 마우스 대리모 내에 이식하면, 래트 세포로 이루어진 기능성 췌장을 갖는 마우스 키메라가 발생하였다. 이 연구는 배아에 표적 기관이 완전히 결여되도록 핵심 발달 조절 인자가 결핍된 배반포를 생성하는 것이 중요함을 강조하였다. 이 돌연변이체 숙주는 이어서 건강한 공여자 줄기 세포가 공여자-유래 기관이 서식하고 이 기관을 생성하기 위해 발달 "니치"를 제공한

다. 배반포 보완 전략은 또한 설치류에서 신장, 흉선 및 간과 같은 기관을 생산하였고, 최근에는 돼지에서 췌장을 생산하였다 (28-31).

[0049] 유전자 편집 플랫폼 또는 통상의 기술자가 이용할 수 있는 임의의 방법을 사용하여, 배반포 보완이 외인성 기관의 생성을 위해 이용될 수 있는 돼지와 같은 기관 결핍 동물을 생성하기 위해 다양한 발달 유전자를 돌연변이시킬 수 있다.

[0050] **Etv2 (ENSSSCG00000002906)는 내피 및 조혈 계통에 대한 주된 조절 유전자이다.**

[0051] Etv2 유전자의 유전자좌는 여러 이유 때문에 내피 및 조혈 결핍 돼지 배아를 생성하기 위해 돌연변이되었다. 먼저, 발명자들은 Etv2가 마우스에서 내피 및 조혈 발달을 위한 주된 조절 유전자임을 입증하였다 (7-9). 유전적 계통 추적 전략을 사용하여, Etv2 발현 세포가 내피 및 조혈 계통을 생성한다는 것이 증명되었다 (9, 10). 두 번째로, 전반적 유전자 결실 전략이 수행되어 Etv2 돌연변이체 마우스 배아가 내피 및 조혈 계통이 결여되어 생존할 수 없음이 증명되었다 (도 1A, B) (8). 트랜스크립톰 분석을 사용하여, Tie2가 Etv2의 부재 하에 현저하게 이상조절된다고 결정되었다 (7, 8). 또한, 트랜스제닉 기술 및 분자생물학 기술 (전사 검정, EMSA, ChIP 및 돌연변이 유발)을 사용하여, Spi1, Tie2 및 Lmo2가 Etv2의 직접적인 하류 표적임이 확인되었다 (7, 8, 11). 셋째, 분화 ES/EB 시스템에서 Etv2의 강제적인 과다발현은 내피 및 조혈 계통의 집단을 유의하게 증가시켰고, 이것은 Etv2가 양쪽 계통을 유도할 분자 캐스케이드를 좌우하는 능력을 갖는 단일 인자임을 입증하였다 (도 1C, D) (8).

[0052] 넷째, Etv2의 기능적 역할은 중배엽 계통 특징에서 정의되었고, Etv2 상류의 분자 경로뿐만 아니라 그 하류 표적도 정의되었다. 야생형 (Wt) 및 Etv2 돌연변이체 마우스의 마이크로어레이 분석 결과, Etv2 돌연변이에서 심장 특이적인 전사체가 과다제시되는 것으로 밝혀졌고, 이것은 Etv2가 심장 계통의 분화를 억제한다는 것을 시사한다 (9). 이 발견을 뒷받침하기 위해, Etv2의 과다발현은 ES/EB 세포에서 심장 분화를 억제하면서 내피 및 조혈 프로그램을 유도하였다. 이러한 연구들로부터, Etv2에 대한 역할은 내피 및 조혈 분화를 위한 필수적이고 충분한 인자뿐만 아니라 심장 분화의 억제제로서 중배엽 계통의 특징에서 정의되었다 (도 2) (9).

[0053] Etv2를 수반하는 분자 경로에 관한 몇 가지 주요 발견이 도 2에 요약되어 있다. 먼저, Flk1 및 Etv2의 유전적 계층 구조가 결정되었다 (12). Flk1 돌연변이체 및 Etv2 돌연변이체 ES 세포를 사용하고, 이들 둘 다는 조혈 및 내피 계통을 생성할 수 없으며, 이들 표현형이 Etv2 또는 Flk1의 과다발현에 의해 구조될 수 있는지를 시험하였다. 결과는 Flk1 돌연변이체 ESC/EB의 내피 및 조혈 능력이 Etv2 및 Flk1 둘 다에 의해 구조되었지만, Etv2 돌연변이체 표현형은 Flk1에 의해서가 아니라 Etv2에 의해서만 구조되었다는 것을 입증하였다. 이 발견은 (1) Etv2가 유전적으로 Flk1의 하류에 존재하고, (2) Etv2의 하류 조절이 Flk1 돌연변이체 표현형의 원인임을 나타낸다. 따라서, 내피 전구체에서 Flk1→Etv2의 계층 구조가 확립되었다. 둘째, Gata2는 Etv2 기능의 보조 인자로 확인되었다 (도 3D-F) (11). ES 세포에서 Gata2와 Etv2를 1:1의 화학량론적으로 과다발현시킴으로써, 조혈 및 내피 분화 둘 다가 Etv2 단독에 비해 향상되었음이 입증되었다. Gata2는 그 자체로 분화를 향상시키지 않았고, 이것은 Etv2 기능의 증폭기로 작용함을 시사한다. 셋째, 마우스 및 제브라피쉬에 대한 최근의 연구는 Etv2가 내피 및 조혈 계통의 특성을 더욱 좌우하는 계통 제한 마이크로RNA를 조절한다는 것을 보여준다 (데이터는 제시되지 않음). 요약하면, 상류 및 하류 요인뿐만 아니라, 조혈 및 내피 계통의 분화를 촉진하기 위해 Etv2와 상호 작용하는 보조 인자가 정의되었다 (도 3G).

[0054] 이들 및 다른 결과는 Etv2 돌연변이체 동물에 내피 및 조혈 계통이 완전히 결여되고 인간 줄기 세포가 서식하기 위한 니치를 제공할 것으로 연구가 예측했기 때문에, Etv2가 돼지 모델에서 유전자 편집을 위한 후보자라는 이론적 근거를 뒷받침한다. 본원에서 기재되는 조성물 및 방법은 인간 내피 세포가 내막을 형성하거나 서식하는 혈관계를 생성하여 이를 이식에 이상적인 조직으로 만든다. 또한, 인간의 혈액은 돼지 대리모 모델에서 생산될 것이다.

[0055] Etv2가 다른 유전자와 구별되는 다섯 번째 이유는 이종 이식 연구에서 나타난다. 이종간 보완 및 외인성 기관의 후속 이식에 대한 원리 증명 연구가 성공적이었지만, 그 기관에 도움을 주는 혈관이 숙주-유래된 것임에 주목하였다 (1, 2). 이러한 발견은 기관 거부 반응, 특히 이종 이식 돼지 조직의 초급성 거부 반응에서 혈관 표면의 잘 알려진 중요성을 고려할 때 중요한 우려를 불러일으킨다 (13). 실제로, 대부분의 외인성 기관의 발달에는 내피 계통의 인간화가 필요하다. Etv2는 이러한 목적에 이상적인 후보이다.

[0056] 인간화된 대형 동물 모델은 재생 의학의 중요한 자원이 될 것이며, 개인화된 기관을 만들기 위한 플랫폼으로 사용될 것이다. 이 전략은 만성 심혈관 및 조혈 질환 및 이식을 위한 현재의 임상 실무 패러다임을 변형시킬 수

있다. 지금까지, 마우스와 래트 사이 (27, 29), 및 돼지와 돼지 사이 (31)의 외인성 기관 이식이 수행되었고, 대형 동물 모델에서 인간화된 기관의 성공적인 개발은 보고된 바 없다. 미국 특허 가출원 62/247,092는 본원에 참고로 포함된다.

[0057] 하기 실시예는 본 발명의 특히 바람직한 특정 실시양태를 추가로 기재하기 위한 것이고, 본 발명의 범위를 어떤 방식으로도 제한하려는 것이 아니다.

[0058] **실시예**

[0059] **재료 및 방법**

[0060] 암퇘지/어린 암퇘지: 사육 모체 암퇘지 (8-12개월령)가 배아 이식 수여자로서 사용되고, 승인된 IACUC 프로토콜에 따라 장래의 임신 및 분만 동안 통상적인 사육 돼지로서 돌보고 유지 관리될 것이다.

[0061] 발정 동기화 및 수정: 암퇘지는 발정을 동기화하기 위해 그 발정 주기의 제11-22일에 그의 아침 사료에 혼합된 6.8 mL의 매트릭스 (알트레노게스트 2.2 mg/mL)가 제공될 것이다. 루탈리제 (2 cc)는 매트릭스 마지막 날 및 4일 후에 IM으로 투여될 것이다. 암퇘지는 매트릭스 투여가 끝난 후 제6일부터 시작하여 매일 2회 발정 검사를 받을 것이다. 암퇘지는 발정기에서 처음 검출된 후 선택된 수퇘지의 정액으로 3회까지 수정될 것이다. 암퇘지는 도플러 초음파 또는 선형 5 mHz 변환기를 사용하는 경복부 초음파를 사용하여 임신 제23-90일 사이에 임신 여부를 검사할 것이다. 어떠한 형태의 초음파도 침습적이지 않고, 암퇘지 또는 태아에게 해를 끼치지 않는다. 수의사의 요청에 따라 또는 유전 분석을 위해 임의의 질환이 있는지 결정하기 위해 혈액 샘플을 임신한 어린 암퇘지/암퇘지로부터 채취할 수 있다.

[0062] 배아 이식: 재구성한 클로닝된 배아를 비동기성 수여자 암컷 돼지의 자궁 내에 외과적으로 이식한다. 외과적 배아 이식을 위해, 케타민 (2 mg/kg), 틸레타민/졸라제팜 (0.25 mg/kg), 크실라진 (1 mg/kg) 및 아트로핀 (0.03 mg/kg; 모두 아이오와 베테리너리 서플라이(Iowa Veterinary Supply) 제품)의 조합으로 마취를 유도한다. 나머지 시술을 위해 이소플루란 또는 세보플루란 (수술 평면에 유지하기 위해 5% 유도, 1-4% 유지)으로 전신 마취를 유지할 것이다. 배횡위에서, 수여자를 수술을 위해 무균 상태로 준비하고, 꼬리 복부 절개를 하여 자궁, 난관 및 난소를 비롯한 생식관을 노출시키고 검사한다. 대개, 150-200개의 재구성한 클로닝된 배아를 5.5-인치 TomCat(톰캣)® 카테테르 (아이오와 베테리너리 서플라이)를 사용하여 난관 협부에 배치한다. 자궁을 복강 내에 다시 넣고, 수여자 동물을 봉합하고 수술 후 회복시킨다. 임신기 동안, 3.5 MHz 복부 탐침이 부착된 알로카(Aloka) 500 초음파 스캐너 (알로카 캄파니 엘티디(Aloka Co. Ltd, 미국 코네티컷주 월링포드))를 사용하는 실시간 초음파 검사를 이용하여 임신을 확인하고 모니터링한다. 수여자 가축은 정상 임신 암퇘지로서 유지될 것이다. 새끼 돼지 생산을 위해, 수여자를 자연 분만시키거나, 임신 제118일 이전에 제왕절개에 의해 분만시킬 것이다. 너팅거 사육 유닛을 포함한 초유 수유 및 신생아 집중 지원은 필요할 때 이용가능하다.

[0063] **ETV2 녹아웃 돼지 배아에는 조혈 및 내피 계통이 결여된다.**

[0064] 이전 연구에 따르면, Etv2가 결여된 배아가 혈관계 및 혈액 부재 하에 약 E9.5에서 치사되기 때문에 Etv2가 마우스에서 혈관 형성 및 조혈에 일정 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다 (7-10). 돼지에서 ETV2 (ENSSSCG00000002906)의 역할을 조사하기 위해, 돼지 섬유모세포에서 유전자에 인접한 2개의 TALEN 쌍을 사용하여 전체 ETV2 코딩 서열을 제거하였다 (도 4).

[0065] 1) ETV2 결실 전략

[0066] TALEN:

[0067] ETV2 5-2 (5'에서 3'로)

[0068] 좌측: CTGGCCGGAAATCCCC (SEQ ID NO: 1)

[0069] 우측: GGGCTGCACCAGGCT (SEQ ID NO: 2)

[0070] ETV2 3-2 (5'에서 3'로)

[0071] 좌측: GATCCCAAGTCACACC (SEQ ID NO: 3)

[0072] 우측: CCCCTAAGGGTCCTG (SEQ ID NO: 4)

[0073] 2) HDR 스티칭 주형: 이 주형은 5 '및 3' TALEN 유도된 파단을 예측가능한 방식으로 융합한다. 이것은 또한 결

실 대립유전자를 회복시키는 효율을 증가시켰다.

[0074] HR 올리고

[0075] **CGTCTGCTGACCAGGGGTCTGGCCGGAAATCCCCCTTCCTGT**GGATCCaacagacacaggacccttagggg acctactgtgtgttcactg (SEQ ID NO:5)

[0076] 밑줄친 소문자 = ETV2 3.2 절단 부위의 우측으로부터 상동성인 42nt

[0077] **볼드체 대문자** = ETV2 5.2 절단 부위의 좌측으로부터 상동성인 42nt

[0078] 밑줄친 대문자 = 삽입된 BamHI 부위

[0079] **ETV2 5' NJ F1부터 ETV2 3' NJ R1까지의 전체 서열:** 이것은 결실 대립유전자가 복구/융합을 위해 상기 주형을 사용할 때 예상되는 PCR 생성물이다.

[0080] tgaagcagccccagaacttcctcctcaaagccctcgaaggggaaaacagcctggtggaagatcccaggtc gaccaaccaaccccccaccatatcccccgcaggccccctgcggattgtga**CGTCTGCTGACCAGGGGTCTG GCCGGAAATCCCCCTTCCTGT**GGATCCaacagacacaggacccttaggggacctactgtgtgttcactgt gtggtgggccatgcagaggaatcaaattcagtagccactggcctgcctgctttgtgcctgccctgtactg ggacttgtacatgaaacagacacaatcaataactttcgaatttacccactgtgtccccctttgagaggac tcaagattccaaagagggcttactgtgtaccctccctgtgccggggccatcagcgaattagacctggtgc ttgccccccagtcacctattctgttttcctacttcaagctaagggccatagaacttagatcccaaggaa agtctaccctgttctgggaacaactgagcgctta(SEQ ID NO:6)

[0081] 3) 스크리닝 프라이머:

[0082] ssETV2 5' NJ F1: TGAAGCAGCCCCAGAACTTC (SEQ ID NO:7)
ssETV2 5' NJ R1: TGGCCTCCAGTGTCCTTTTC (SEQ ID NO:8)
ssETV2 3' NJ F1: TAGCCTATCCCGACCGCAT (SEQ ID NO:9)
ssETV2 3' NJ R1: TAAGCGCTCAGTTGTTCCCA (SEQ ID NO:10)

[0083] 이 과정은 완전한 유전자 제거에서 15%의 효율을 보였고; 유전자형 결정된 클론의 79/528은 ETV2 유전자의 결실에 대해 동형접합성이었다. ETV2 동형접합성 녹아웃 섬유모세포 클론을 대리모 암퇘지에게 이식되는 ETV2 널 배아를 생성하기 위한 핵 클로닝 (체세포 핵 이식; SCNT)에 사용하였다. 클로닝 효율은 29%이었다.

[0084] E18.0에서 배아를 수거하고 분석하였다 (도 5). E18.0에서, 야생형 (Wt) 배아는 요막에서 잘 발달된 혈관총으로 혈관이 형성되었고 (도 3A), 혈액 발생의 증거를 보였다 (도 5C). 이와 대조적으로, ETV2 KO 배아는 명확한 발달 결함을 제시하였다. 양쪽 배아가 24 체절기에 있었지만 성장은 Wt 배아에 비해 ETV2 KO에서 지연되었고 (도 5B), 혈액 및 혈관 계통 둘 다가 결여되었다 (도 7C-H). ETV2 KO 배아는 Wt 배아에서 명확하게 발달된 주정맥, 등 대동맥 및 심장 내막이 결여되었다 (도 5E-H).

[0085] 도 1 및 도 5의 결과는 유사한 표현형을 반영하고, ETV2의 기능이 마우스와 돼지 사이에서 보존됨을 제시한다. 또한, 이 데이터는 하나 초과의 세포 유형에서 인간화될 키메라 기관의 성장을 지지하기 위해 돼지 게놈 내에 여러 돌연변이를 유도할 수 있음을 보여준다.

[0086] ETV2 결실에 대한 대안으로, 생성된 임의의 단백질이 비-기능성으로 되는 프레임쉬프트 돌연변이와 같은 돌연변이를 유전자 내로 도입할 수 있다. 예를 들어:

[0087] 1) 프레임-쉬프트 KO 대립유전자: 이 예에서, 프레임- 쉬프트는 엑손3 및 조기 정지 코돈에서 생성된다.

[0088] 1) TALEN:

[0089] ETV2 3.1 (5'에서 3'로)

[0090] 좌측: TCATCCTTATCTGTCC (SEQ ID NO: 11)

[0091] 우측: GCGGAGACCCAGTCC (SEQ ID NO: 12)

[0092] ETV2 3.3 (5'에서 3'로)

[0093] 좌측: TACCGAACCCAGAAG (SEQ ID NO: 13)

[0094] 우측: ACTGTGGGAGACACTCA (SEQ ID NO: 14)

[0095] 2) HDR 주형:

[0096] ssETV2 3.1 HR-KO

[0097] cctccctaaactcagcttcatccttatctgtcccagggattcTAAGCTTcacagccggactgggtctccg cattaccgaacccagaagct (SEQ ID NO:15)

[0098] **밑줄친 볼드체 소문자** = ssETV2 3.1 절단 부위

[0099] *이탤릭체 대문자* = 정지 코돈

[0100] 대문자 = 삽입된 염기

[0101] 밑줄 = 삽입된 HindIII 제한 부위

[0102] ssETV2 3.3 WT 서열

[0103] cggactgggtctccgcattaccgaacccagaagctccatgGggcgcgggtgagtgtctcccacagtaact ggaggtttcgatt (SEQ ID NO:16)

[0104] **밑줄친 볼드체 대문자** = ssETV2 3.3 절단 부위

[0105] ssETV2 3.3 HR-KO

[0106] cggactgggtctccgcattaccgaacccagaagctccatggTAAGCTTggcgcgggtgagtgtctcccac agtaactggaggtttcgatt (SEQ ID NO:17)

[0107] **밑줄친 볼드체 소문자** = ssETV2 3.3 절단 부위

[0108] *이탤릭체 대문자* = 정지 코돈

[0109] 대문자 = 삽입된 염기

[0110] 밑줄 = 삽입된 HindIII 제한 부위

[0111] 3) 스크리닝 프라이머:

[0112] ssETV2 E3 F4: CACAACTCTCGTCCCGAACA (SEQ ID NO:18)
ssETV2 E3 R4: GAACGGACCCCAAGTGAGAG (SEQ ID NO:19)

[0113] **Etv2 돌연변이체 배아는 야생형 마우스 ES 세포에 의해 구조된다.**

[0114] 돼지에서 인간화된 조직을 생성하기 위한 기본적인 가정은 주입된 세포가 돌연변이체 숙주에서 발달 니치를 우선적으로 채우고 상실된 세포 유형을 생성한다는 것이다. 원리 증명 연구로서 및 Etv2가 이상적인 표적 유전자인지 평가하기 위해, 마우스 Etv2 돌연변이체 배반포를 EYFP로 표지된 야생형 마우스 ES 세포로 보완하였다 (도 6). 야생형 세포의 존재 하에서 돌연변이체 대립유전자를 확실하게 확인하기 위해, Etv2의 2개의 별개의 돌연변이체 계열의 반접합성 마우스를 사육하였다 (미공개된 데이터). 배아를 E10.5 (Etv2 돌연변이체 배아의 치사가 관찰된 것보다 1일 늦은 날)에 수거하고, 유전자형을 결정하고, EYFP 양성 세포 및 내피 마커인 엔도뮤신의 분포를 조사하였다. Etv2 반접합성 및 Etv2 돌연변이체 배아 둘 다에서, 야생형 ES 세포가 성공적으로 배아에 통합되었다 (도 6A, B). 면역조직화학적 분석 결과, EYFP로 표지된 야생형 세포는 반접합성 동물의 모든 배엽의 여러 세포 유형에 무작위로 분포하는 반면 (도 6C, E, G), Etv2 돌연변이체에서는 대다수의 EYFP 양성 세포가 내피, 심장 내막 및 조혈 계통에서 발견되는 것으로 밝혀졌다 (도 6D, F, H). 데이터는 모든 엔도뮤신 양성 내피 세포가 EYFP를 발현한다는 개념을 지지하였고, 이것은 이들이 야생형 ES 세포로부터 유래한 것임을 나타낸다 (도 6D, F, H). Etv2 돌연변이체 배아는 또한 혈관 내에 원시 혈액-유사 모폴로지를 갖는, EYFP로 표지된 Tie2 양성 세포를 갖고 있고, 이것은 조혈 계통 역시 구조되었음을 시사한다 (데이터는 제시되지 않음).

[0115] 상기 발견을 추가로 확인하기 위해, EYFP로 표지된 야생형 및 Etv2 돌연변이체 ES 세포를 이용하여 (8), 개별적으로 또는 함께 분화시키고, FACS를 사용하여 분화 제4일에 조혈 (CD41, CD45) 및 내피 (CD31, Tie2) 계통에 대

한 각각의 계열의 기여를 조사하였다 (도 8). 야생형 7AC5/EYFP 세포는 99% EYFP 양성이었고, 4.54% 내피 세포, 0.36% 조혈 세포를 생성하였다 (상단 줄). Etv2 돌연변이체 세포는 EYFP 음성이었고, 내피 세포 및 조혈 세포를 생성하지 않았다 (가운데 줄). 동시 분화된 EB의 분석은 내피 및 조혈 계통에 대한 EYFP 음성 세포의 기여가 Etv2 돌연변이체 ES 세포의 기여와 구별할 수 없다는 것을 나타내었고, EYFP 양성 세포는 내피 및조혈 계통을 단독으로 배양된 야생형 세포와 유사한 효율로 생성하였다 (하단 줄). 이 결과는 ES/EB 동시 분화 시스템에서 "구조된" 내피 및 조혈 계통이 야생형 ES 세포에서만 유래됨을 나타내었다. 이러한 결과는 인간화된 내피 및 조혈 계통을 위한 숙주 동물을 생성하기 위해 돼지 ETV2를 표적화할 근거를 제공한다.

[0116] **래트 배아 줄기 세포는 Etv2 돌연변이체 마우스 배아체에서 내피 집단을 구조한다.**

[0117] 이어서, 2개의 상이한 종을 사용하여 Etv2 널 ES/EB의 보완이 가능한지 시험하였다. 시험관내 ES/EB 보완 검정은 Etv2 돌연변이체 마우스 ES 세포 및 야생형 래트 ES 세포를 사용하여 수행하였다 (도 7) (22). 야생형 또는 Etv2 돌연변이체 마우스 ES 세포는 분화 배지의 초저 부착 플레이트 상에 ES 세포를 플레이팅함으로써 배상체 (EB) 형성에 의해 분화하도록 유도되었다. 12일간 배양한 후, EB를 고정하고, 절편을 만들고, 내피 마커인 CD31에 대해 염색하였다 (8). 강한 $CD31^+$ 집단이 야생형 마우스 EB에서 혈관-유사 구조의 내막을 형성하는 것으로 관찰되었지만 (도 7A), $CD31^+$ 세포는 Etv2 돌연변이체 EB에서는 관찰되지 않았다 (도 7B). 이와 대조적으로, Etv2 돌연변이체 ES 세포 및 야생형 래트 ES 세포의 동시 분화 배양은 강력한 CD31 발현을 보이는 세포의 패치를 보여주었고, 이것은 $CD31^+$ 집단이 상기 동시 배양 방법에 의해 구조되었음을 나타낸다 (도 7C). 상기 마우스-래트 보완 검정에서의 성공은 돼지-돼지 및 돼지-인간 보완 실험을 추가로 진행하기 위한 개념 증명 및 근거를 제공한다.

[0118] **인간 제대혈 줄기 세포 (hUCBSC) 및 hiPSC는 돼지 반수성개체 (수정 없이 발달하도록 전기적으로 활성화된 배아)의 내부 세포 덩어리 (ICM)에 통합된다.**

[0119] 인간-돼지 키메라를 생성하는 전략의 타당성을 평가하기 위해, hUCBSC 및 hiPSC가 돼지 배반포에 통합되고 배아 발달에 참여하는 능력을 조사하였다. 돼지 단위생식 배반포는 난모세포의 전기적 자극을 이용하여 생성되었다 (42). 활성화 6일 후에, 9-12개의 DiI- 또는 EdU (24시간)-표지된 hUCBSC 또는 hiPSC를 포배강 내로 주입하였다. 배반포를 배양액에서 2일 동안 회복시킨 다음, 영상을 찍었다. 표지된 hUCBSC 및 hiPSC는 90%의 돼지 배반포의 ICM에서 관찰되었다 (도 9A, B, 대표적인 이미지가 제시되어 있음). DiI 분포와 인간 핵 항원 특이적 항체 (HNA)를 이용한 면역조직화학의 비교는 HNA 항체가 주사된 인간 줄기 세포를 검출한다는 것을 보여준다 (도 9A, 화살표). EdU로 표지된 hiPSC가 주입된 배반포를 수거하기 전에 1시간 동안 BrdU로 추가로 펄싱하여 증식하는 세포를 검출하였다. EdU를 사용한 이중 표지는 주입된 인간 줄기 세포가 주사 48시 후에 계속 증식함을 보여준다 (도 9B, 화살표). 이러한 결과는 인간 줄기 세포가 돼지 배반포의 ICM 내에 통합되고, 자궁에 착상되기 위한 준비시에 키메라 배반포가 탈출 단계로 발달상 진행되는 것을 보여준다. 인간 줄기 세포가 돼지의 단위생식 배아에 통합되는지 조사하기 위해, 키메라 배반포를 가임신 암퇘지로 이식하고, E28에서 배아를 분석하였다. 이전에 보고된 바와 같이 (30), 정상적으로 발달한 배아를 얻었고, 그 중 하나는 HNA 항체로 염색된 인간 세포의 집단을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이 결과는 인간 줄기 세포 집단이 ICM 발달에 적합하고/하거나 도움이 되는지 조사하기 위한 신속한 검정을 지지하고 제공한다. 또한, 단위생식 배반포의 착상은 인간 줄기 세포의 발생하는 배아 내로의 통합 및 분화를 조사하는 고효율 방법을 제공한다. 이 전략의 중요한 이점은 돼지 난모세포가 식품 생산의 이중-산물로 풍부하게 이용가능하고, 단위생식 배아가 정기적으로 대량 생산될 수 있다는 것이다. 단위생식 배아는 8주 경과 후에 생존하지 못하고, 따라서 우연히 원하지 않는 인간-돼지 키메라를 출산할 우려가 없어진다는 것을 알아야 한다.

[0120] 참고문헌

1. Garry, DJ, et al. Circ Res. 2004;95(9):852-4.
2. Hoffman, JI. Pediatr Cardiol. 1995;16(3):103-13.
3. Rasmussen, TL, et al. Circulation. 2011;123(16):1771-9.
4. De Val, S, et al. Cell. 2008;135(6):1053-64.
5. Lee, D, et al. Cell Stem Cell. 2008;2(5):497-507. PMCID: 2683414.
6. Ferdous, A, et al. Natl Acad Sci U S A.2009;106(3):814-9. PMCID: 2630085.
7. Kataoka, H, et al. Blood. 2011.
8. Lee, D, et al. Stem Cells. 2011;29(3):539-48.
9. Rasmussen, TL, et al. Development. 2011;138(21):4801-12. PMCID: 3190388.
10. Koyano-Nakagawa, N, et al. Stem Cells. 2012;30(8):1611-23. PMCID: 3651838.
11. Rasmussen, TL, eta l. PLoS One. 2012;7(11):e50103. PMCID: 3501484.

[0121]

12. Behrens, AN, et al. Submitted to Developmental Biology. 2013.
13. Chan, SS, et al. Cell Stem Cell. 2013;12(5):587-601. PMCID: 3646300.
14. Kataoka, H, et al. Exp Hematol. 2013;41(6):567-81 e9.
15. Kobayashi, K, et al. Genes Cells. 2013;18(8):704-21.
16. Rasmussen, TL et al. Genesis. 2013;51(7):471-80.
17. Shi, X, et al. Dev Biol. 2014;389(2):208-18.
18.Carlson, DF, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(43):17382-7. PMCID: 3491456.
19. Tan, W, et al. Proc Natl Acad Sci U S A.2013.
20. Xin, J, et al. PLoS One. 2013;8(12):e84250. PMCID: 3866186.
21. Kure-bayashi, S, et al. Theriogenology. 2000;53(5):1105-19.
22. Caprioli, A, et al. Circulation. 2011;123(15):1633-41. PMCID: 3110259.
23. Borges, L, et al. Blood. 2012;119(23):5417-28.
24. Behrens, AN, et al. Stem Cells and Development. 2013;22(15):2211-20. PMCID: 3715789.
25. Borges, L, et al. Stem Cells. 2013;31(9):1893-901. PMCID: 3795927.
26. Roger, VL, et al. Circulation. 2012;125(1):188-97.
27. Kobayashi, T, et al. Cell. 2010;142(5):787-99.
28. Bort, R, eat l. Dev Biol. 2006;290(1):44-56.
29. Isotani, A, et al. Genes Cells. 2011;16(4):397-405.
30. Usui, J, et al. Am J Pathol. 2012;180(6):2417-26.
31. Matsunari, H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(12):4557-62. PMCID: 3607052.
32. Liu, F, et al. Blood. 2012;119(14):3295-305. PMCID: 3321855.
33. Milland, J, et al. Immunology and cell biology. 2005;83(6):687-93.
34. Carlson, DF, et al. Transgenic Res. 2011;20(5):1125-37.
35. Carlson, DF, et al. Transgenic Res. 2011;20(1):29-45. PMCID: 3516389.
36. Men, H, et al. PLoS One. 2013;8(2):e56518. PMCID: 3577902.
37. Li, P, et al. Cell. 2008;135(7):1299-310. PMCID: 2735113.
38. Hill, MA. Embryology *Carnegie Stage Comparison.* [Website]; 2014 [updated 2014; cited]; Available from: http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie_Stage_Comparison.
39. Adamo, L, Garcia-Cardena, G. Dev Biol. 2011;362(1):1-10.
40. Swiers, G, de Bruijn, M, Speck, Int J Dev Biol. 2010;54(6-7):1151-63.
41. Alishahi, A, et al. Dev Dyn. 2009;238(8):2095-102. PMCID: 2742708.
42. Heinz, M, et al. Exp Hematol. 2002;30(7):809-15.
43. Piriou-Guzylack, L, Salmon, H. Veterinary research. 2008;39(6):54.
44. Nakano, K, PLoS One. 2013;8(4):e61900. PMCID: 3633951.
45. King, TJ, et al. Reproduction. 2002;123(4):507-15.
46. Zhu, J, et al. Cloning Stem Cells. 2003;5(4):355-65.

[0122]

47. Gerhardt, H, et al. J Cell Biol. 2003;161(6):1163-77. PMCID: 2172999.

48. Masino, AM, et al. Circ Res. 2004;95(4):389-97.

49. Inoue, K, Shiga, T, Ito, Y. Neural development. 2008;3:20. PMCID: 2531103.

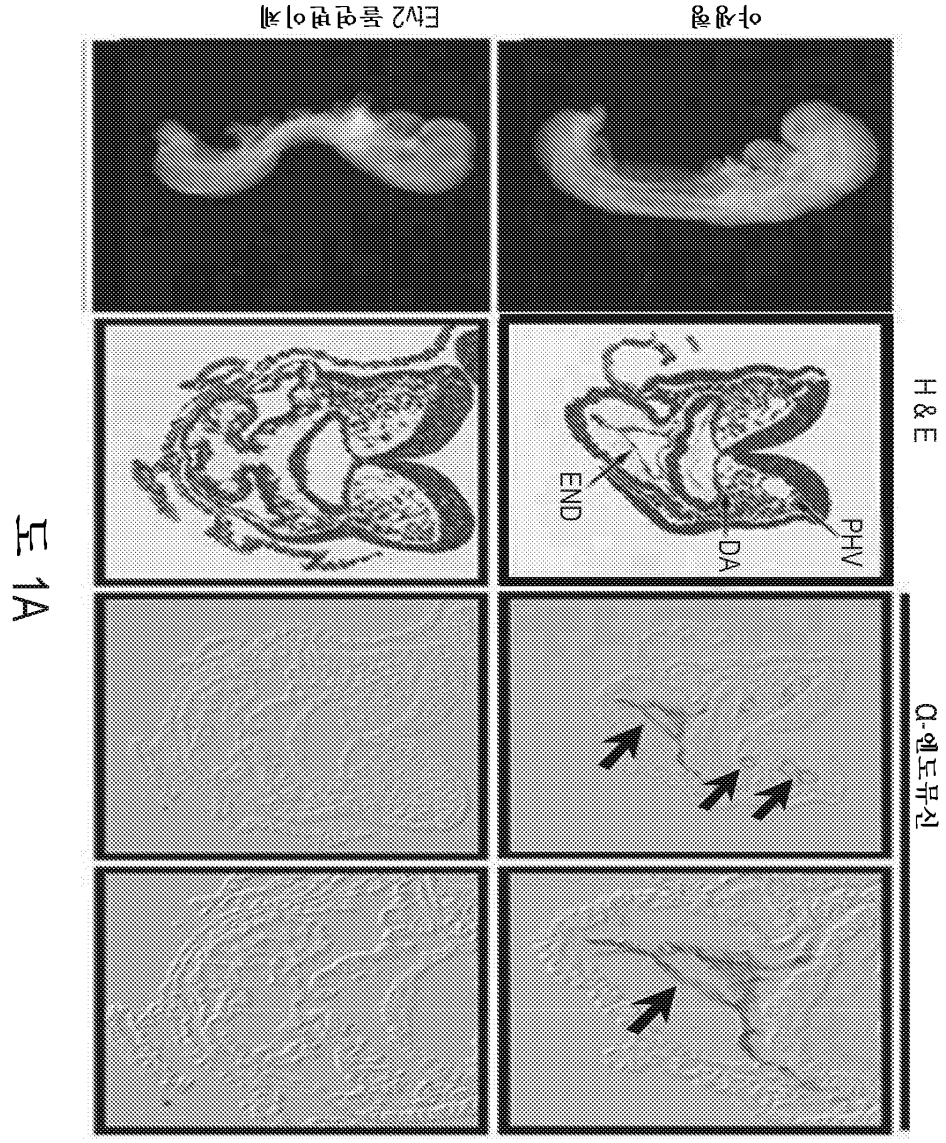
50. Herberth, B, et al. International Society for Developmental Neuroscience. 2005;23(5):449-63.

[0123]

[0124] 본 발명은 다양한 구체적이고 바람직한 실시양태 및 기술을 참고로 하여 기재된다. 그러나, 그 범위 내에서 많은 변형 및 수정이 이루어질 수 있음을 이해하여야 한다. 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 문서는 마치 개별적으로 포함된 것처럼 참고로 포함되는 것이 의도된다.

도면

도면1i



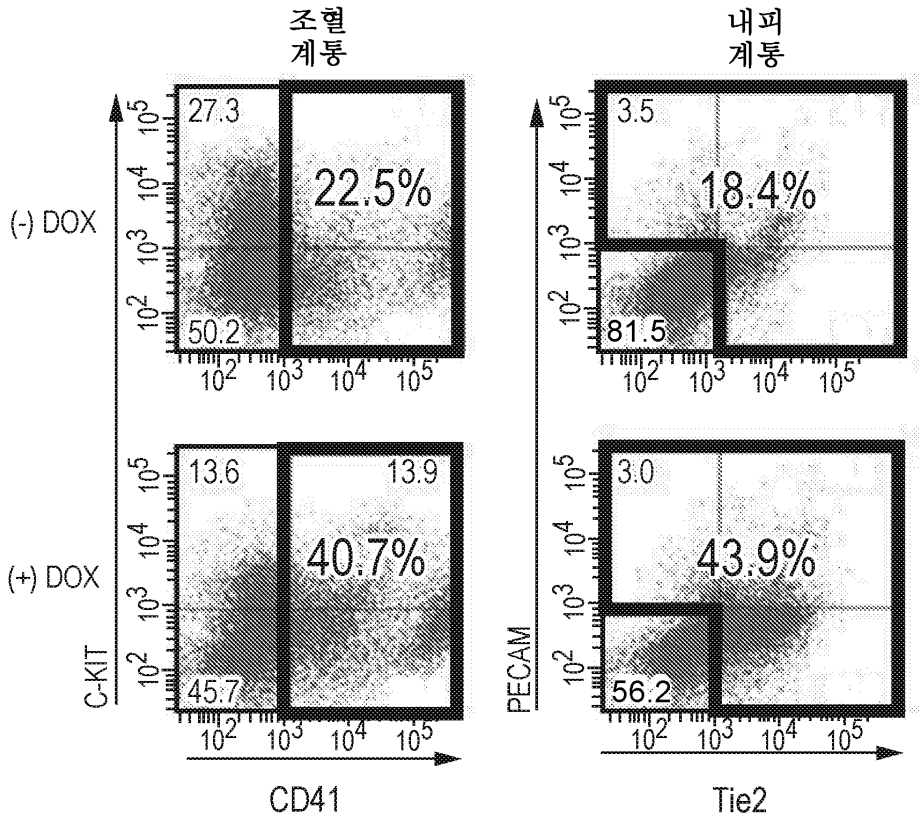
도 1A

도면1ii

유전자형	WT	HET	돌연변이체
Ery-P	14 ± 5	11 ± 5	0
BFU-E	23 ± 8	27 ± 5	0
CFU-GM	9 ± 9	11 ± 6	0
CFU-G	3 ± 3	3 ± 2	0
CFU-M	18 ± 10	28 ± 19	0
CFU-GEMM	63 ± 27	55 ± 19	0
총	116 ± 39	123 ± 39	0

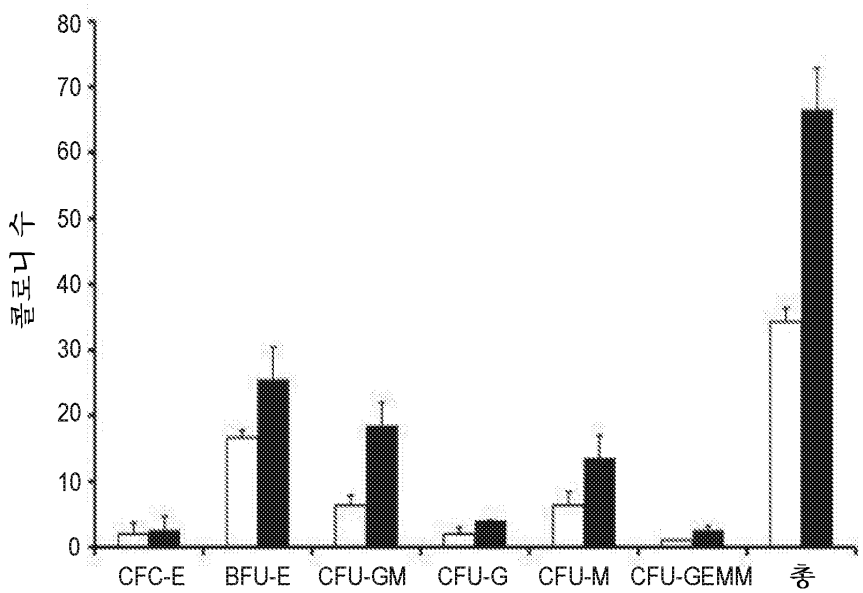
도 1B

도면1iii



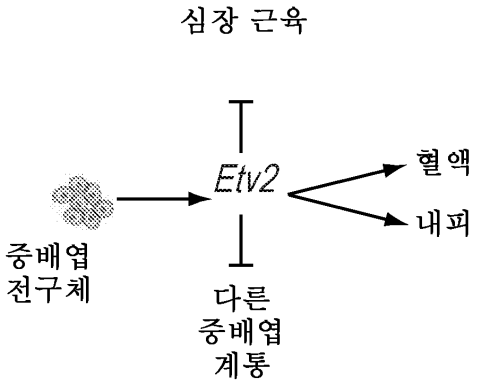
도 1C

도면1iv



도 1D

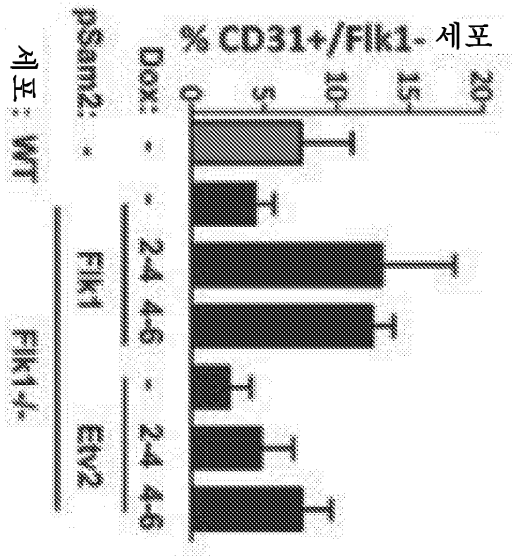
도면2



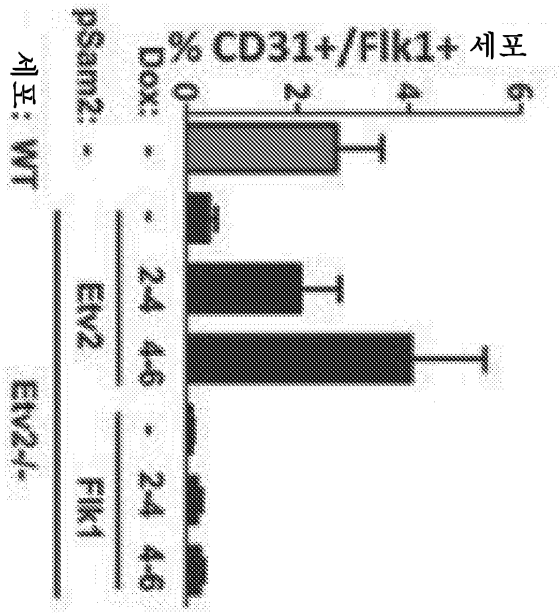
도 2

도면3i

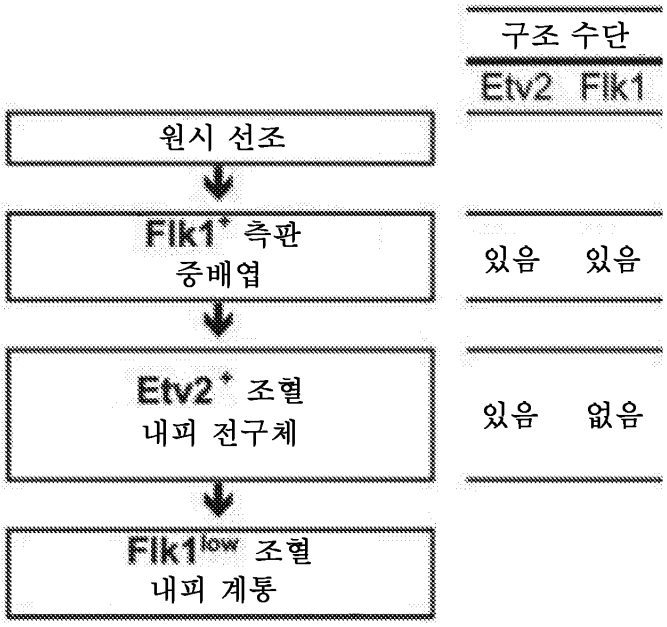
도 3A


% CD31+/Flk1- 세포
0
5
10
15
20
pSam2: -
Dox: - - 2-4 4-6 - 2-4 4-6
Flk1
Etv2
세포: WT
Flk1-/-

도 3B

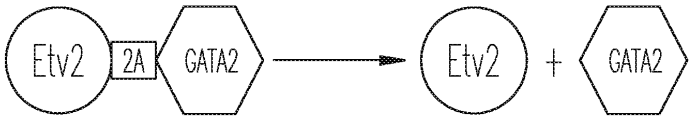

% CD31+/Flk1+ 세포
0
2
4
6
pSam2: -
Dox: - - 2-4 4-6 - 2-4 4-6
Etv2
Flk1
세포: WT
Etv2-/-

도면3ii

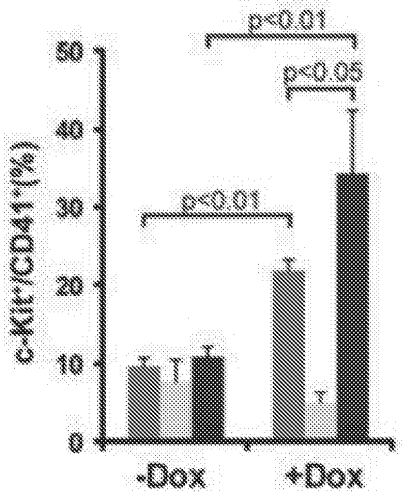

구조 수단
Etv2 Flk1
원시 선조
Flk1+ 측판
중배엽
있음 있음
Etv2+ 조혈
내피 전구체
있음 없음
Flk1low 조혈
내피 계통

도 3C

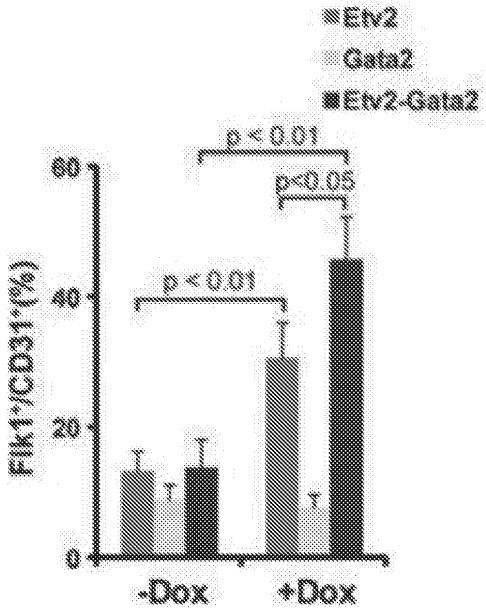
도면3iii



도 3D

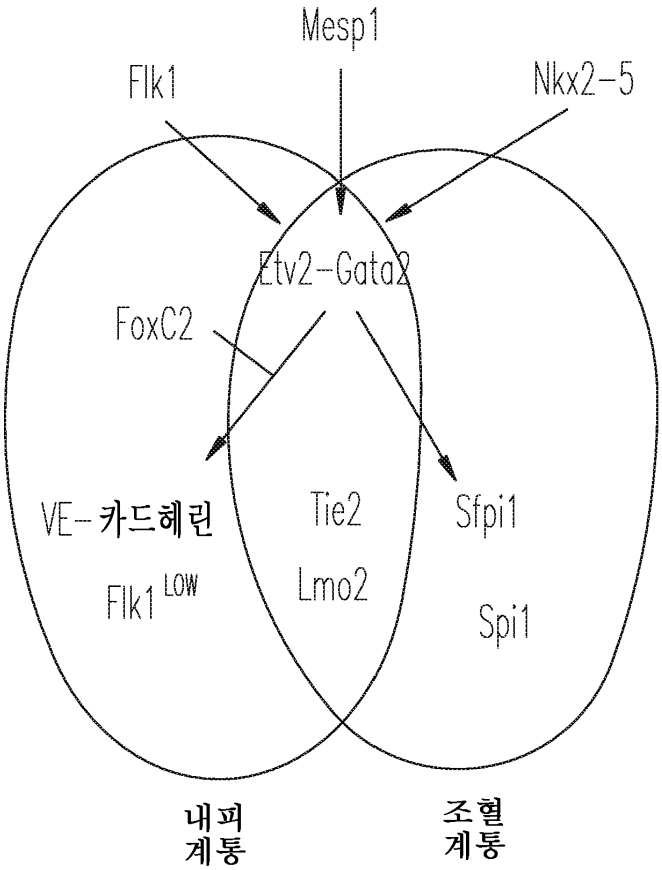


도 3E



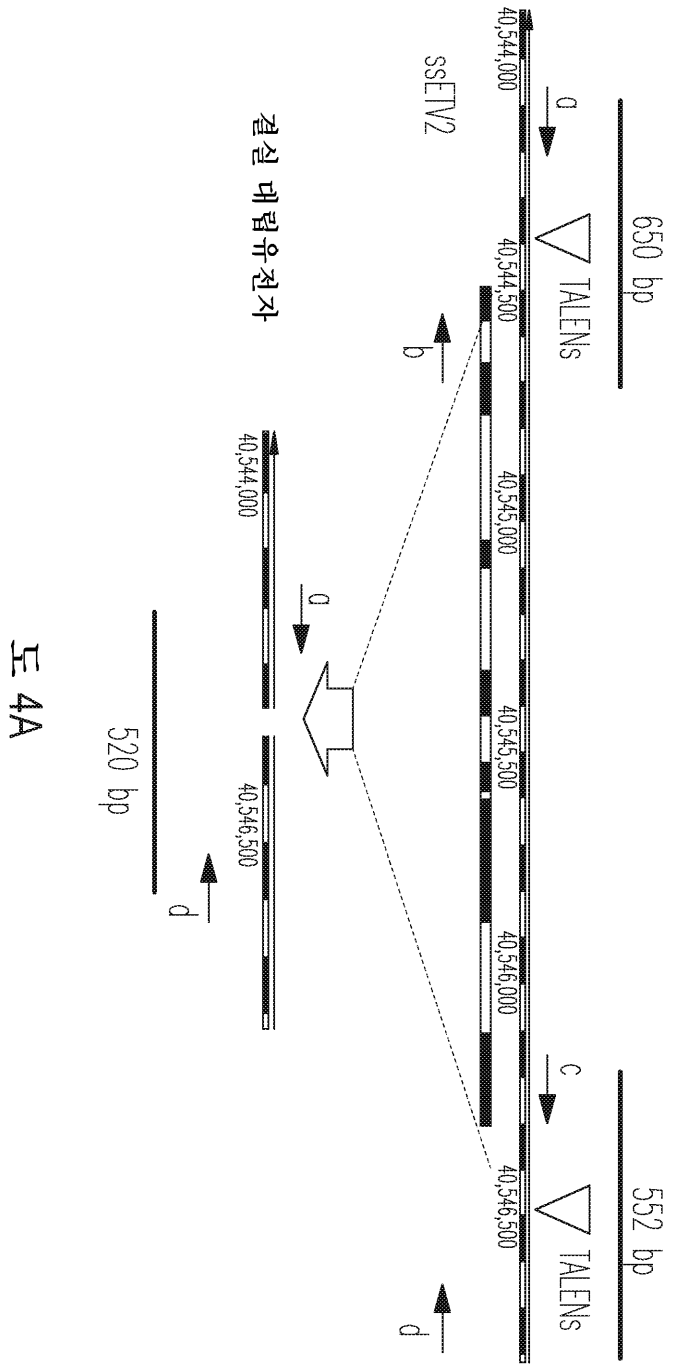
도 3F

도면3iv


Mesp1
Flk1
Nkx2-5
Etv2-Gata2
FoxC2
VE-카드헤린
Flk1 LOW
Tie2
Lmo2
Sfpi1
Spi1
내피
계통
조혈
계통

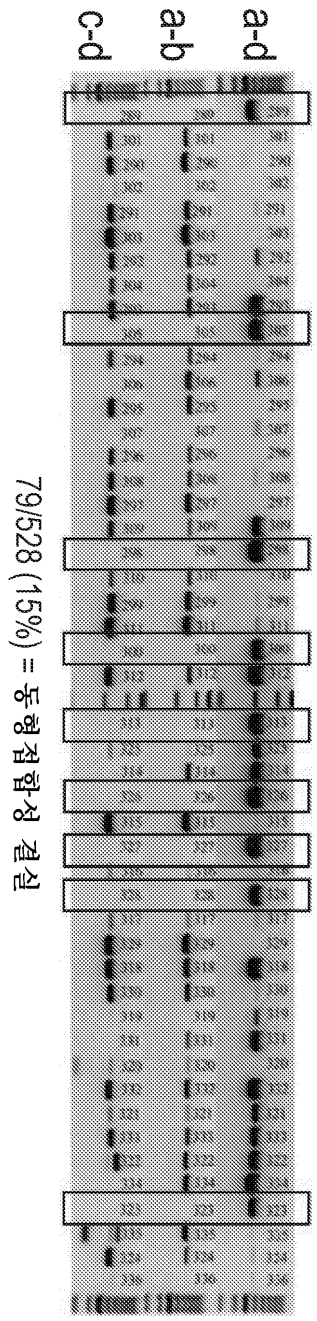
도 3G

도면4i


40,544,000
a
650 bp
TALENs
40,544,500
b
40,545,000
40,545,500
40,546,000
c
552 bp
TALENs
40,546,500
d
SSLTV2
결실 대립유전자
40,544,000
a
520 bp
40,546,500
d

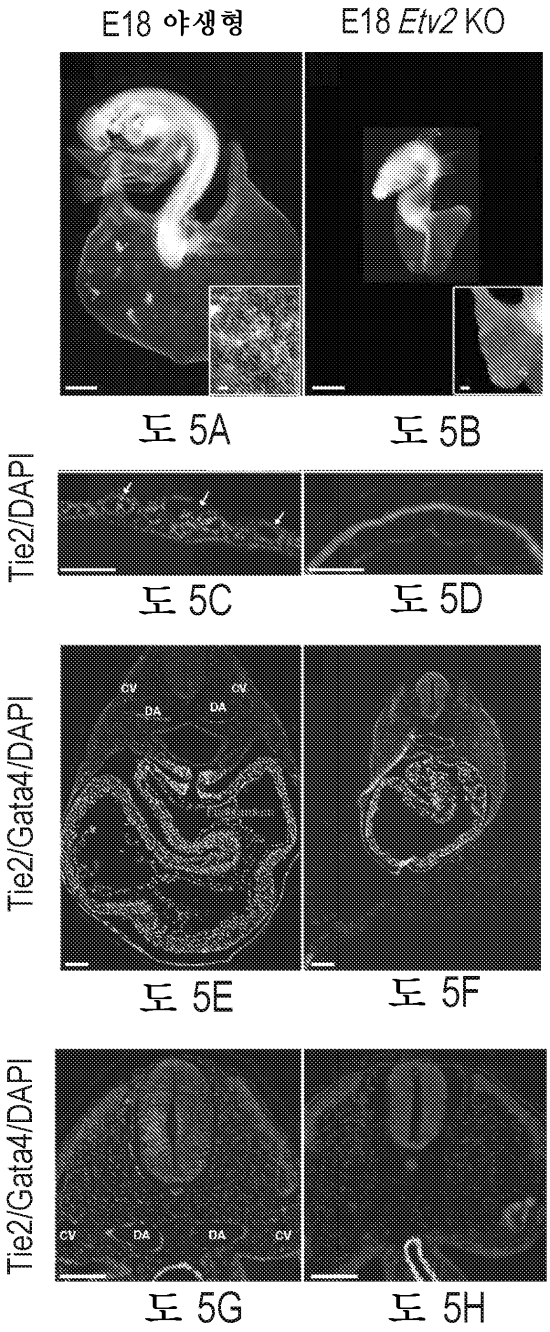
도 4A

도면4ii

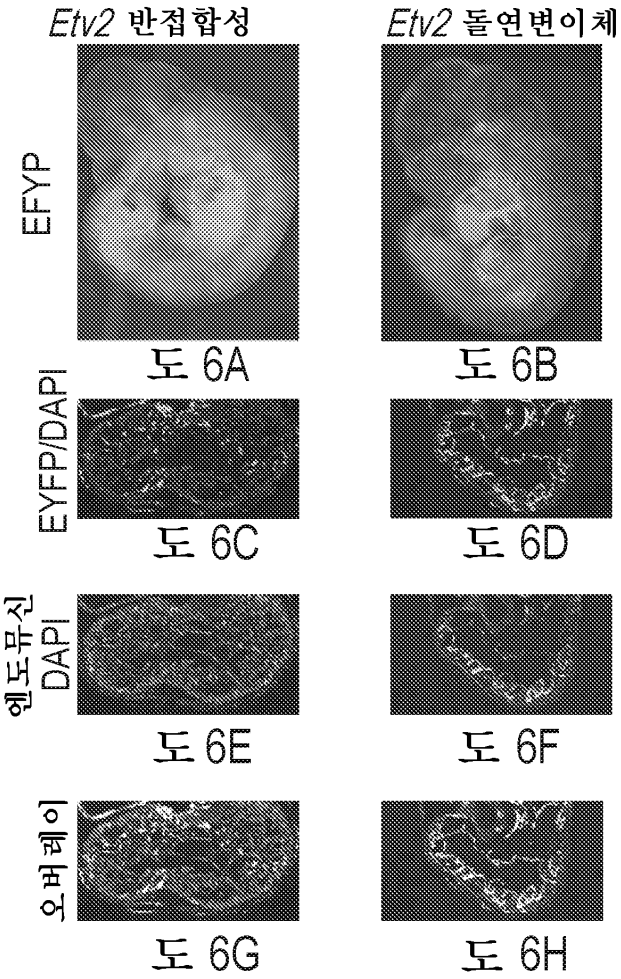


도 4B

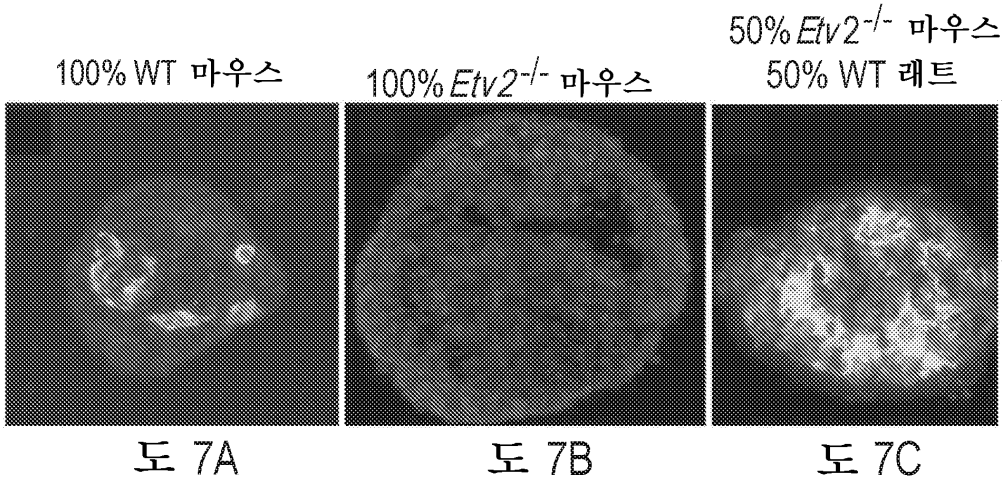
도면5


E18 야생형
E18 Etv2 KO
도 5A
도 5B
Tie2/DAPI
도 5C
도 5D
Tie2/Gata4/DAPI
CV
CV
DA
DA
도 5E
도 5F
Tie2/Gata4/DAPI
CV
DA
DA
CV
도 5G
도 5H

도면6


Etv2 반접합성
Etv2 돌연변이체
EFYP
도 6A
도 6B
EYFP/DAPI
도 6C
도 6D
엔도뮤신
DAPI
도 6E
도 6F
오버레이
도 6G
도 6H

도면7


100% WT 마우스
100% Etv2-/- 마우스
50% Etv2-/- 마우스
50% WT 래트
도 7A
도 7B
도 7C

도면8

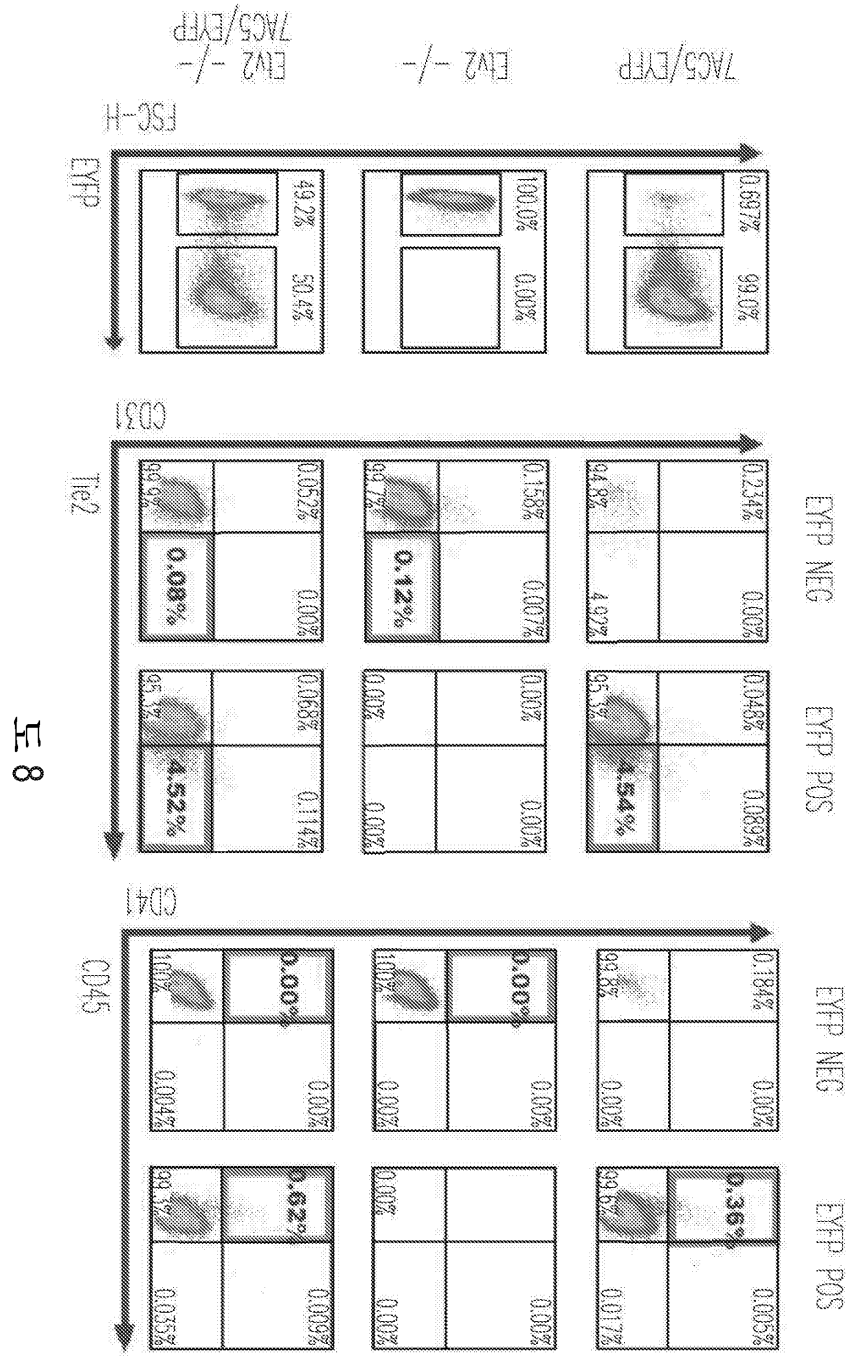
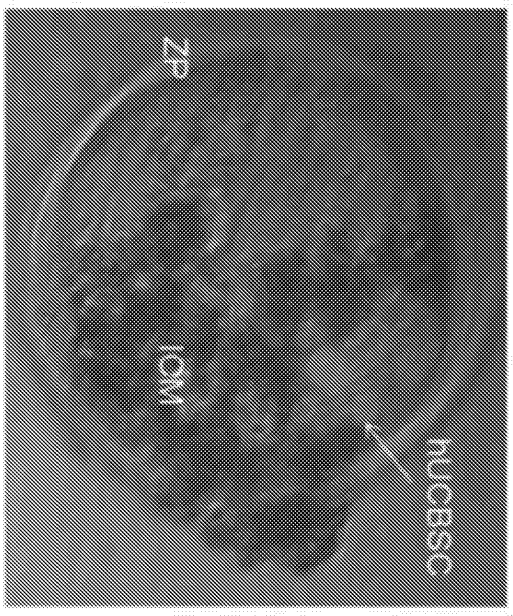

7AC5/EYFP
Elv2 -/-
7AC5/EYFP
Elv2 -/-
FSC-H
EYFP
99.07%
0.69%
100.0%
0.00%
50.42%
49.22%
EYFP NEG
EYFP POS
CD31
Tie2
0.23%
0.00%
4.22%
0.48%
0.15%
0.00%
0.12%
0.72%
0.11%
0.08%
0.08%
0.52%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.08%
0.48%
0.89%
0.00%
1.54%
95.3%
0.11%
0.08%
4.52%
95.4%
EYFP NEG
EYFP POS
CD41
CD45
0.18%
0.00%
0.00%
98.8%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
100%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
100%
0.17%
0.00%
0.35%
99.6%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
99.7%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
99.7%

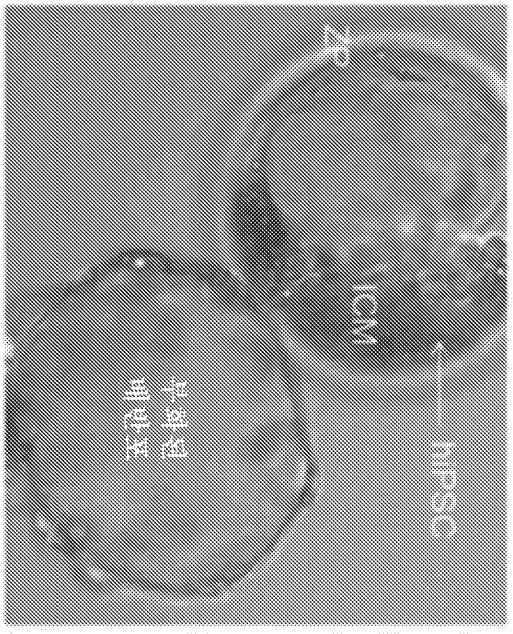
FIG 8

도면9

도 9A



도 9B



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Garry, Daniel J.

Garry, Mary G.

Rasmussen, Tara

Koyano-Nakagawa, Naoko

Regents of the University of Minnesota

<120> ETV2 AND USES THEREOF

<130> 600.938WO1

<150> US 62/127,330

<151> 2015-03-03

<160> 21

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 1

ctggccggaa atcccc 16

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 2

gggctgcacc aggct 15

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 3

gatcccaagt cacacc 16

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 4

cccctaaggg tcctg 15

<210> 5

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 5

cgtctgctga ccaggggtct ggccggaaat ccccttcct gtggatccaa cagacacagg 60

acccttaggg gacctactgt gtgttcactg 90

<210> 6

<211> 524

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 6

tgaagcagcc ccagaacttc ctcctcaaag ccctcgaagg ggaaaacagc ctggtggaag 60

atcccaggtc gaccaaccaa cccccaccat atcccccgca ggcccccctgc ggattgtgac 120

gtctgctgac caggggtctg gccggaaatc ccccttcctg tggatccaac agacacagga 180

cccttagggg acctactgtg tgttcactgt gtggtgggcc atgcagagga atcaaattca 240

gtagccactg gcctgcctgc tttgtgcctg ccctgtactg ggacttgtac atgaaacaga 300

cacaatcaat aactttcgaa tttacccact gtgtcccccct ttgagaggac tcaagattcc 360

aaagagggct tactgtgtac cctccctgtg ccggggccat cagcgaatta gacctggtgc 420

ttgccccccc agtcacctat tctgttttcc tacttcaagc taagggccat agaacttaga 480

tcccaaggaa agtctaccct gttctgggaa caactgagcg ctta 524

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 7

tgaagcagcc ccagaacttc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 8

tggcctccag tgtccttttc 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 9

tagcctatcc cgaccgcat 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 10

taagcgctca gttgttccca 20

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 11

tcatccttat ctgtcc 16

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 12

gcggagaccc agtcc 15

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 13

taccgaaccc agaag 15

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 14

actgtgggag acactca 17

<210> 15

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 15

cctccctaaa ctcagcttca tccttatctg tcccagggat tctaagcttc acagccggac 60

tgggtctccg cattaccgaa cccagaagct 90

<210> 16

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 16

cggactgggt ctccgcatta ccgaacccag aagctccatg gggcgcgggt gagtgtctcc 60

cacagtaact ggaggtttcg att 83

<210> 17

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 17

cggactgggt ctccgcatta ccgaacccag aagctccatg gtaagcttgg cgcgggtgag 60

tgtctcccac agtaactgga ggtttcgatt 90

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 18

cacaactctc gtcccgaaca 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide

<400> 19

gaacggaccc caagtgagag 20

<210> 20

<211> 1661

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 20

tgagtcattg gaaacaaata cagacatcat aacacttcac tcctaaatac ctgtttcata 60

accttataaa gatagcttcc atatcataat accattatca catctaagaa aatgactaat 120

tatctcatat tcagttcata ctctaatttc ctcatgtgcc taaactatga cagcatggaa 180

gggcatgatg gattctggag atgaagaaaa gtaggaggaa acgcacctca atttcccctt 240

tcataaagtc agggtaagac tagtacccac ttcctaagag aattaaacaa aggcccatgg 300

cacagttagt agcaagcaat gagccctcaa gaaatgttaa ccattattgt cactgttgtt 360

attgtttata ttgttgatgt tactgtctgc tgaagcagcc ccagaacttc ctcctcaaag 420

ccctcgaagg ggaaaacagc ctggtggaag atcccaggtc gaccaaccaa cccccaccat 480

atcccccgca ggcccccctgc ggattgtgac gtctgctgac caggggtctg gccggaaatc 540

ccccttcctg ttgcagataa gcctggtgca gcccagctga ccccaggccc tcctccccca 600

tcacctccct tgtcacagga tcaagtcccc aagccccctt cccctcccca ttccagtcaa 660

cccagaaaca cccctctgca ccccaggtca tgcccatccc attgtttccc aggctcctgc 720

tcaagtccaa gacaccccaa agctaccgtg gaggcttgag gccatcccag ggggcagagg 780

tgggtgggga gggggtggca cagcttggcc ccgcctcggc ccctgcaact tgacccgggc 840

tgcgaccccc gctctgacgt cttggaaaat tccccccctgc ccaggccccc agaggagggg 900

gtatgtggta tgaaatgggg ctgagacccc tggctggggg cacagggatc tgccagagaa 960

cattcactac tggcatccat ggacttgtgg aactgggatg aagcatcgcc acaggaagtg 1020

cccctgggga acagactgtc agggctggaa ggagctgaat tcgacttcta tttccctgaa 1080

ctggcactcc caggggacag gctgacagcg gagacatact ggaaaactgg ctcttcatcc 1140

ttatctgtcc cagggattcc acagccggac tgggtctccg cattaccgaa cccagaagct 1200

ccatggggcg cggaacccgt ccctcaggct cttccgtggt ccggagattg gacagacctg 1260

ccgtacagcg gctcggtccc ttggagccgg gtctcccagg ccctggggtc tggctgccta 1320

gatttccaag gtcccattca gctgtggcag ttcctcctgg agctgctcca cgacgggacg 1380

cgtagcagct gcatccgctg gacgggcaac agccgcgagt tccaactgtg cgaccccaaa 1440

gaggtggcgc ggctgtgggg cgaacgcaag aggaagcccg gcatgaatta tgagaagctg 1500

agccgaggcc tgcgttacta ctaccgccgc gacatcgtgc tcaagagcgg ggggcgcaag 1560

tacacgtacc gcttcggagg ccgagtgcca ggcctagcct atcccgaccg catgggggac 1620

ggacagggag cagcgaccca ataaaaatat ctggtcaagc c 1661

<210> 21

<211> 221

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 21

Met Asp Leu Trp Asn Trp Asp Glu Ala Ser Pro Gln Glu Val Pro Leu
1 5 10 15

Gly Asn Arg Leu Ser Gly Leu Glu Gly Ala Glu Phe Asp Phe Tyr Phe
20 25 30

Pro Glu Leu Ala Leu Pro Gly Asp Arg Leu Thr Ala Glu Thr Tyr Trp
35 40 45

Lys Thr Gly Ser Ser Ser Leu Ser Val Pro Gly Ile Pro Gln Pro Asp
50 55 60

Trp Val Ser Ala Leu Pro Asn Pro Glu Ala Pro Trp Gly Ala Glu Pro
65 70 75 80

Val Pro Gln Ala Leu Pro Trp Ser Gly Asp Trp Thr Asp Leu Pro Tyr
85 90 95

Ser Gly Ser Val Pro Trp Ser Arg Val Ser Gln Ala Leu Gly Ser Gly
100 105 110

Cys Leu Asp Phe Gln Gly Pro Ile Gln Leu Trp Gln Phe Leu Leu Glu
115 120 125

Leu Leu His Asp Gly Thr Arg Ser Ser Cys Ile Arg Trp Thr Gly Asn

130 135 140

Ser Arg Glu Phe Gln Leu Cys Asp Pro Lys Glu Val Ala Arg Leu Trp
145 150 155 160

Gly Glu Arg Lys Arg Lys Pro Gly Met Asn Tyr Glu Lys Leu Ser Arg
165 170 175

Gly Leu Arg Tyr Tyr Tyr Arg Arg Asp Ile Val Leu Lys Ser Gly Gly
180 185 190

Arg Lys Tyr Thr Tyr Arg Phe Gly Gly Arg Val Pro Gly Leu Ala Tyr
195 200 205

Pro Asp Arg Met Gly Asp Gly Gln Gly Ala Ala Thr Gln
210 215 220