



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0018425

(43) 공개일자 2016년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/85 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

C12N 15/85 (2013.01)
C12N 15/111 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0111293

(22) 출원일자 2015년08월06일

심사청구일자 2015년08월06일

(30) 우선권주장

1020140101203 2014년08월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

차의과학대학교 산학협력단

경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)

기초과학연구원

대전광역시 유성구 유성대로1689번길 70 (전민동, KT대덕2연구센터)

(72) 발명자

김진수

서울특별시 관악구 신림동 관악로 1길 교수아파트 122i 동 205호

황동연

경기 성남시 분당구 분당로 212, 203동 301호 (분당동, 셋별마을동성아파트)

(74) 대리인

손민

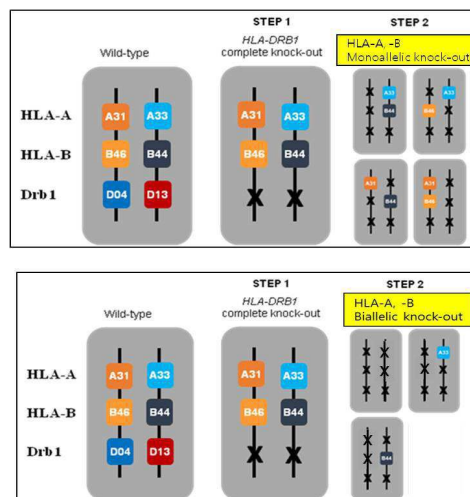
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 조직적합성항원 유전자들의 교정을 통하여 구축한, 면역적합형 세포

(57) 요약

본 발명은 HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자를 포함하는 분리된 세포에서, 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포 또는 세포 집단의 제조 방법, 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포 및 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 포함하는, 세포 집단에 관한 것이다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
C12N 5/0606 (2013.01)
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
-

특허청구의 범위

청구항 1

HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 (immune-compatible) 세포의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제조 방법은 면역적합항원 유전자인 HLA-A, 또는 HLA-B가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 유전자 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전자 결손은 유전자 제거(knock-out)를 통하여 수행되는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유전자 변형은 유전자 낙인(knock-in)을 통하여 수행되는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유전자 교정은 HLA-A 특이적인 유전자 가위(engineered nuclease), HLA-B 특이적인 유전자 가위(engineered nuclease) 또는 HLA-DR 특이적인 유전자 가위(engineered nuclease)를 이용하여 수행되는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유전자 가위는 ZFN(zinc finger nuclease), TALEN(transcription activator-like effector nuclease), 및 RGEN(RNA-guided engineered nuclease)으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 RGEN은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-DR 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 포함하는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

유전자 교정은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-DR 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas 단백질을 세포에 도입하여 수행되는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중 RNA (dualRNA) 또는 단일-사슬 가이드 RNA 형태인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, Cas 단백질은 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속 유래인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 면역적합형 세포는 면역적합항원 유전자가 동형접합 유사 (homozygous-like 또는 hemizygous)인 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자 모두가 이형접합(heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자 각각의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 교정으로 제거(knockout)하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

HLA-DR 유전자의 대립 유전자 한 쌍 모두가 제거 (knock-out)되고, HLA-A 또는 HLA-B 유전자 하나 이상이 이형접합인 분리된 세포에서 HLA-A 또는 HLA-B 유전자 각각의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 교정으로 제거 또는 변경하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 세포는 줄기세포 또는 체세포인 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 줄기세포는 유도만능줄기세포, 배아줄기세포, 핵치환기술 유래 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 제조 방법은 HLA-C, HLA-DP 및 HLA-DQ 중 하나 이상의 유전자의 대립 유전자를 유전자 교정으로 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 방법은 면역적합형 세포를 포함하는 세포 집단을 제조하기 위한 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 방법은 제조된 세포에서 HLA형을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 면역적합성 세포의 제조 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 포함하는, 세포 집단.

청구항 21

(a) HLA(human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합(heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 제조된 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포 집단의 제조 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 제조 방법은 (a) 단계 수행 후 (b) 단계 수행 전에,

(a') 상기 (a) 단계에서 수득된 분리된 세포의 HLA 유전자형을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것인,

면역적합형 세포 집단의 제조 방법.

청구항 23

HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자를 포함하는 분리된 세포에서, 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 (immune-compatible) 세포의 제조 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 분리된 세포는 면역적합항원 유전자가 이형접합 (heterozygous) 또는 동형접합 (homozygous)인 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 교정하는 단계는 상기 유전자의 대립 유전자 둘을 교정하는 것인, 면역적합형 세포의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자를 포함하는 분리된 세포에서, 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포 또는 세포 집단의 제조 방법, 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포 및 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 포함하는, 세포 집단에 관한 것이다.

배경기술

[0003]

인간 배아줄기세포 (hESC)는 무제한 증식이 가능한 만능성 (pluripotent) 세포로, 삼배엽 (three germ layer)의 모든 세포로 분화할 수 있다. hESC는 적절한 조건 하에서 외부 신호에 반응하여 기능성 있는 심근세포 및 췌장 β 세포와 같은 특정 세포로 분화할 수 있으므로, hESC를 최초로 확립한 이래 재생 의학의 새 시대가 도래하였다. 즉, 무제한 증식 및 만능성과 같은 특성들은 hESC를 재생 의학 분야에서 유용한 세포 자원으로 만들었다. 신경퇴화질환, 자가면역질환, 심혈관계질환 또는 조혈질환을 앓고 있는 환자들이 줄기세포 치료의 잠재적 대상이 된다. 이와 같이 굉장한 잠재력에도 불구하고, 타가 유래 hESC 세포는 이식 시 면역 거부반응을 일으킬 수 있어 임상적으로 hESC를 사용하는데 주요한 장애가 된다. 특히, 주요 조직적합성 복합체 (major histocompatibility complex) 유전자에 의해 코딩되는 조직적합성 항원 (HLA)의 세포 표면 발현은 주요 면역학적 장벽이 된다.

[0004]

hESC의 독특한 특성은 체세포 핵치환 기술 (somatic nuclear transfer)에 의해 체세포로부터 만들어질 수 있고, 또한 체세포에 Oct4 (O), Sox2 (S), Klf4 (K), 및 c-Myc (M) 4 가지 전사 인자를 과발현시켜 유도만능줄기세포 (iPSC)라 명명된, ESC-유사 세포 (ESC-like cell)를 제조할 수도 있다. 상기 두 가지 접근방식은 환자 맞춤형 만능줄기세포를 제조할 수 있게 하였다. 중요한 것은, 상기 세포들은 환자 자신의 세포로부터 만들어지기 때문에, 이식 시 면역거부반응을 일으키지 않을 수 있다는 것이다.

[0005]

그러나, 인간 체세포의 SNT 매개 리프로그래밍 (reprogramming)은 초기 단계의 기술로서 효율이 낮고 난자 제공을 필요로 하여, 현재까지 실질적인 해결책을 제시하지는 못하고 있다. 반면에 iPSC는 상대적으로 유도가 간편하여 잠재성이 있어 보이나, 최근 보고에 따를 때 전사 인자 기반의 리프로그래밍은 후생유전학적 (epigenetic)인 관점에서 불완전하다는 문제가 있다. 따라서, 이러한 세포를 임상에서 사용하는 것은 iPSC 클론에 대한 상세한 조사를 필요로 한다는 점에서 번잡할 수 있다. 나아가, GMP (good manufacturing practices) 시설에서 개별 환자를 위한 만능줄기세포를 생산하는 것은 상당히 많은 비용이 요구될 수 있다.

- [0007] 줄기세포 이식에서 면역학적인 장벽을 극복하기 위한 하나의 접근방식은 전체 인구의 상당 부분과 일치하는 HLA 반수체 (haplotype)를 가지는 임상 등급의 hESC/iPSC/SNT-hESC 은행을 확립하는 것이다. 그러나 cGMP (current Good Manufacturing Practice) 시설 하에서 hESC/iPSC/SNT-hESC 세포주를 제조하는 것 역시 상당한 자본 및 시간을 필요로 한다.
- [0008] hESC 유도체의 면역 거부반응을 피할 수 있는 또 다른 방안은 HLA 분자를 유전적으로 조작하는 것이다. Torikai 등은 ZFN (zinc finger nuclease)을 이용하여 ESC에서 HLA (human leukocyte antigen) 클래스 I을 선택적으로 제거하여, 상기 세포가 HLA-제한적 세포독성 T 림프구로부터 용해되는 것을 피할 수 있음을 확인하였다. 그러나 HLA 클래스 I이 완전히 제거 (knock out)된 세포는 NK-세포 매개 세포독성의 표적이 되었다 (Oberg L etc., Eur J Immunol., 2004, 34(6): 1646-1653).
- [0009] 다른 연구에서, Rioloobos 등은 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자의 액세스리 체인 (accessory chain)을 코딩하고 이들의 표면 발현에 필요한 B2M (beta-2 microglobulin)를 파괴하였다 (Laura Rioloobos etc., 2013, 21(6): 1232-1241). 이에 따라, B2M 유전자의 동형 접합성 결손은 클래스 I HLA 분자의 표면 이동을 막고 면역원성을 감소시켰다. 그러나 B2M 유전자가 결손된 조혈모세포가 NK 세포에 의해 제거된다는 것이 보고되었기 때문에 이러한 접근방식은 제한적인 해결 수단을 제공하는데 그친다. 나아가, 다형성이 덜 나타나는 HLA-E 또는 HLA-G와 B2M의 융합 단백질을 과발현 시킨 경우 생체 외에서 클래스 I 음성 세포의 NK-세포 매개 용해를 막을 수 있다는 보고가 있었으나, 생체 내에서 이러한 효과를 확인한 데이터는 현재까지 보고된 바 없다.
- [0010] 더욱 최근에는 CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4)-면역글로불린 및 PDL1 (programmed cell death 1 ligand 1)이 낙인 (knock-in)된 인간 ESC (hESC)가 인간화된 마우스에서 T 세포 상호작용 경로를 지속적으로 파괴하고 T 세포 억제 경로를 활성화시키는 것을 확인하였다. 또한, 감염된 세포는 면역 반응의 대상이 된다는 것 잘 알려져 있다. 그러나, 상기 CTLA4 및 PDL1이 이중 낙인 (knock-in)된 세포가 감염되었을 때 면역 세포에 의해 제거될 수 있는지 여부에 대한 생체 내 연구 결과는 보고된 바 없다.
- [0012] HLA 분자의 단일 대립인자 (monoallelic) 변이 및 그에 따른 HLA 동형접합 (homozygous) hESC의 제조는 hESC의 면역 거부반응을 극복할 수 있는 방안을 제공할 수 있다. 현존하는 hESC 세포주에 대한 동형접합 hESC의 소규모 라이브러리를 생성함으로써 전체 인구의 대부분을 커버할 수 있다.
- [0014] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 HLA 유전자를 동형접합 유사 (hemizygous)로 보유하여 수혜자 내에서 면역거부 반응을 일으키지 않을 수 있는 이식용 세포 및 이를 포함하는 세포 집단을 구축하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자, 즉 3 종의 핵심 HLA형 결정 유전자들을 교정함으로써, 많은 수혜자에게 면역적합한 이식용 세포 및 이를 포함하는 세포 집단을 제작할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 하나의 목적은 HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자를 포함하는 분리된 세포에서, 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 (immune-compatible) 세포의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 (immune-compatible) 세포의 제조 방법을 제공하는 것이다.

- [0019] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 포함하는, 세포 집단을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 제조된 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포 집단의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자를 포함하는 분리된 세포에서, 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 (immune-compatible) 세포의 제조 방법을 제공한다. 상기 분리된 세포는 상기 면역적합항원 유전자가 이형접합 (heterozygous) 또는 동형접합 (homozygous)일 수 있고, 상기 교정하는 단계는 상기 유전자의 대립 유전자 둘을 교정하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명은 다른 하나의 양태로서, HLA (human leukocyte antigen)-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포의 제조 방법을 제공한다. 또한, 상기 제조 방법은 면역적합형 세포를 포함하는 세포 집단을 제조하는 방법일 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 방법은 면역적합항원 유전자인 HLA-A, 또는 HLA-B가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 유전자 교정하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포의 제조 방법일 수 있다. 상기 기술된 바와 같이 상기 방법은 면역적합형 세포를 포함하는 세포 집단을 제조하는 방법일 수 있다. 다만, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 모든 세포치료제가 치료 목적으로 사용되기 위해 극복해야 할 가장 큰 장벽은 면역거부반응이다. 이 면역거부반응을 일으키는 실체는 주요면역적합항원 (Major Histocompatibility Antigen Complex, MHC)이라고도 불리는 6종의 HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) 세포 표면 단백질이며, 사람은 부계 유전자에서 유래한 6종과 모계 유전자에서 유래한 6종, 즉 총 6쌍이 발현되고 있는 것으로 알려져 있다. 좀 더 자세히 구분해 보면 일반 체세포는 MHC 클래스 I에 속하는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, 총 3쌍만을 발현하며, 면역세포들은 MHC 클래스 I과 MHC 클래스 II, 모두 합하여 총 6쌍을 발현한다.
- [0031] HLA 표면항원의 역할은 세포 내에 존재하는 단백질들의 조각들을 세포의 표면에 전시 (display)하여, 혹시 생체 내에서 발생했는지 모를 감염이나 돌연변이가 면역세포에 의해 감지되도록 하는 것이며, 이런 이유로 항원제공 단백질 (antigen presenting protein) 이라고도 한다.
- [0032] 골수이식을 포함하는 세포치료가 조직이식 시, 이들 항원제공단백질들은 자가세포 (autologous cell)가 아닌 경우 이식 수혜자 몸 안에 존재하는 면역세포들의 주요 공격대상이 된다. 그 이유는 사람마다 각 HLA 유전자들 상에 수많은 유전적 다형성 (polymorphism)을 가지고 있기 때문이다. 예를 들어, 공여자의 HLA-A 유전자와 수혜자의 HLA-A 유전자는 동일하지 않기 때문에 수혜자의 체내 면역세포들이 그 차이를 인식하여 공여자 세포를 공격하게 되고, 결국 면역거부 반응에 의한 이식의 실패로 이어지게 된다. 이러한 현상은 HLA-A 유전자뿐만 아니라 HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR 유전자들 모두에 해당된다. 지금까지 축적된 임상적 경험으로 인해, HLA 유전자 6쌍 (MHC class I 과 class II)을 모두 맞추지 않고, 가장 다형성이 많은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1의 3쌍 (혹은 여기에 HLA-C까지 포함해 4쌍)의 일치 만으로도 상당한 이식 성공률을 확보할 수 있음이 알려진 바 있다.

- [0033] 이와 관련하여 본 발명은 유전자 결손 또는 변형을 통하여 면역적합항원이 동형접합 유사 (homozygous-like or hemizygous)인 면역적합형 세포를 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명에서, "면역적합항원 동형접합"이란, 공여자의 부계와 모계에서 물려받은 각각의 HLA-A, HLA-B, HLA-DR 유전자들 중 하나, 둘 또는 세 개의 유전형이 완전히 동일한 HLA 유전형을 가진 것을 의미한다. 구체적으로 상기 면역적합항원 동형접합은 각각의 HLA-A 및 HLA-B 유전자들의 유전형이 완전히 동일한 것일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한, HLA-DR 유전자를 포함하는 경우에 각각의 HLA-A, HLA-B, HLA-DR 유전자들의 유전형이 완전히 동일한 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 보다 구체적인 비제한적인 예를 들면, [HLA-A*11 (이하 HLA 생략), B*51, DRB1*16 (부계) / A*11, B*51, DRB1*16 (모계)]를 가진 공여자 (부계와 모계의 HLA 유전형이 동일)로부터 유래된 세포는 면역적합항원 동형접합이라 할 수 있으며 이 경우에는 [A*11, B*51, DRB1*16 (부계) / A*24, B*34, DRB1*08 (모계)]인 수혜자, 혹은 [A*11, B*15, DRB1*04 (부계) / A*24, B*51, DRB1*16 (모계)]인 수혜자, [A*03, B*08, DRB1*16 (부계) / A*11, B*51, DRB1*09 (모계)]인 수혜자, [A*02, B*51, DRB1*07 (부계) / A*11, B*44, DRB1*16 (모계)] 등 6 쌍 중에 단 3개가 동일한 모든 HLA 유전형 조합의 수혜자에게 이식이 가능하다. 전체의 90 % 이상의 사람들에게 대한 면역적합 세포치료를 위해서는 면역적합 동형접합 항원을 보유하는 200 여 종의 세포주가 필요함이 보고된 바 있다 (Taylor C, Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching, 2005, Lancet, 366: 2019-2025). 따라서, HLA 유전형 스크리닝을 통해 서로 다른 면역적합 동형접합을 가진 공여자 200 명을 찾게 되면 이들로부터 90 % 이상의 사람들에게 이식할 수 있는 면역적합 세포주를 미리 확보가 하는 것이 가능하나, 많은 사람에 대하여 HLA 유전자 스크리닝을 하는 것에 큰 어려움이 있다.
- [0036] 이에 본 발명에서는, 상기 기술한 문제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 유전자교정 (gene editing), 유전체교정 (genome editing) 혹은 유전체공학 (genome engineering) 기술이라고 불리는 방법을 이용하여 동형접합 유사인 세포를 제조하는 방법을 개발하였다.
- [0038] 본 발명에서 상기 "동형접합 유사"란, 이형접합성인 특정 대립 유전자 한 쌍에서, 하나의 대립 유전자를 제거 (knock-out) 또는 변경 (knock-in)하는 등으로 하나의 대립 유전자만을 가지는 것을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 동형접합 유사는 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-DR 로 이루어진 군에서 선택된 하나, 둘 또는 세 개의 유전자가 하나의 대립 유전자만을 가지는 상태를 의미한다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 동형접합 유사는 HLA-A 및 HLA-B, 선택적으로 HLA-DR 유전자가 하나의 대립 유전자만을 가지는 상태일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 본 발명에서 상기 "면역적합형 세포"는 특별히 이에 제한되지 않으나, 면역적합항원, 구체적으로 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나, 둘, 또는 세 개가 동형접합 유사로 존재하는 세포일 수 있다. 보다 구체적으로, HLA-A 및 HLA-B, 선택적으로 HLA-DR 유전자가 동형접합 유사로 존재하는 세포일 수 있다.
- [0040] 나아가, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 면역적합형 세포에서 상기 HLA-DR 유전자는 두 개의 대립 유전자가 모두 제거 (knock-out)될 수 있다. 이 경우 상기 면역적합형 세포는 HLA-DR 유전자 한 쌍 모두가 제거 (knock-out)된 세포에서, HLA-A 또는 HLA-B 유전자 하나 이상이 이형접합인 분리된 세포에서 HLA-A 또는 HLA-B 유전자 각각의 대립 유전자 하나를 유전자 교정으로 제거 또는 변경하여 제조되는 것일 수 있다. 반대로, HLA-A 또는 HLA-B 유전자 하나 이상이 이형접합인 분리된 세포에서 HLA-A 또는 HLA-B 유전자 각각의 대립 유전자 하나를 유전자 교정으로 제거 또는 변경하고, HLA-DR 유전자 한 쌍을 모두 제거할 수 있다. 또한, 본 발명에서는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자 중 하나 이상의 유전자의 두 개의 대립 유전자가 모두 제거 (knock-out)될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 의해 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 이를 통해, 6 쌍 중에 단 2 개 또는 단 1 개가 동일한 모든 HLA 유전형 조합의 수혜자에게 이식이 가능한 세포를 수득할 수도 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 방법에 따라, 중요 조직적합성항원 유전자들의 한 쪽 (부계 혹은 모계) 대립 유전자를 유전자 교정으로 제거 또는 변경하는 경우, 상기 기술한 바와 같이 유전자 동형접합 유사인 세포를 수득할 수 있다. 따라서, 이렇게 수득된, 각 대립유전자들이 한 개씩 낙아웃 또는 낙인된 세포를 만들어서 모으게 되면 결국 한 명의 공여자 세포로부터 동형접합 효과를 내는 여러 종류의 세포를 얻을 수 있어 (도 1 내지 3), 90 % 이상의 사람들에게 이식할 수 있는 200 종 이상의 면역적합 세포를 손쉽게 얻을 수 있는 큰 장점을 제공해 줄 수 있다.

- [0044] 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 면역적합형 세포는 이형접합 유전형인 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변형을 통하여 교정되는 것일 수 있으며, 특히 상기 결손은 낙아웃 (knock-out), 변형은 낙인 (knock-in)에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 유전체 교정 / 유전자 교정 기술은, 인간세포를 비롯한 동식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지형적 변이를 도입할 수 있는 기술로서, 특정 유전자를 낙아웃 (knock-out) 또는 낙인 (knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩 DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있다. 본 발명의 방법은 상기 유전체 교정 / 유전자 교정 기술을 통하여 면역적합형 세포를 제조할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 하나의 구현 예에서, 상기 유전자 교정 기술은 표적 특이적 뉴클레아제를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0048] 본 발명에서 용어, "표적 특이적 뉴클레아제"란 목적하는 게놈상의 DNA의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 뉴클레아제일 수 있다. 상기 뉴클레아제는 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인과 절단하는 도메인이 융합된 뉴클레아제가 포함될 수 있으며, 그 예로 메가뉴클레아제 (meganuclease), 또는 유전자 가위 (engineered nuclease), 특히 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인인 식물 병원성 유전자에서 유래한 TAL 작동자 (transcription activator-like effector) 도메인과 절단 도메인이 융합된 TALEN (transcription activator-like effector nuclease), 징크-핑거 뉴클레아제 (zinc-finger nuclease), 또는 미생물 면역체계인 CRISPR에서 유래한 RGEN (RNA-guided engineered nuclease)이 제한 없이 포함될 수 있다. 본 발명의 목적상 RGEN을 이용한 방법은 간단하면서도 보다 바람직한 결과를 수행할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 목적상 상기 유전자 교정은 HLA-A 특이적인 뉴클레아제, HLA-B 특이적인 뉴클레아제 또는 HLA-DR 특이적인 뉴클레아제를 이용하여 수행될 수 있으며, 상기 뉴클레아제는 유전자 가위 (engineered nuclease)임이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 뉴클레아제, 구체적으로는 유전자 가위를 이용하여 낙아웃 또는 낙인을 수행할 때, 뉴클레아제 외에 Donor DNA가 필수적으로 사용되지 않는 낙아웃과 달리, 낙인의 경우, 뉴클레아제와 함께 Donor DNA를 사용한다. 상기 Donor DNA는 뉴클레아제에 의해 절단된 염색체 상의 위치에 도입하고자 하는 유전자를 포함하는 DNA로서, 재조합을 위하여 왼쪽 Flanking Arm 및 오른쪽 Flanking Arm을 포함할 수 있으며, 또한 선별마커 (selection marker) 등을 선택적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 상기 표적 특이적 뉴클레아제들은 인간세포를 비롯한 동식물 세포의 유전체에서 특정 염기서열을 인식해 이중나선절단 (double strand break, DSB)을 일으킨다. DSB는 세포 내에서 상동재조합 (homologous recombination) 또는 비상동재조합 (non-homologous end-joining, NHEJ) 기작에 의해 효율적으로 수선되는데 이 과정에 연구자가 원하는 변이를 표적 장소에 도입할 수 있다. 상기 표적 특이적 뉴클레아제는 인공적인, 혹은 조작된 비자연적으로 발생된(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [0052] 상기 뉴클레아제는 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN)일 수 있다.
- [0053] 상기 ZFN은 선택된 유전자, 및 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인의 표적 부위에 결합하도록 조작된 징크-핑거 단백질을 포함한다. 상기 ZFN은 징크-핑거 DNA 결합 도메인 및 DNA 절단 도메인을 포함하는 인공적인 제한효소일 수 있다. 여기서, 징크-핑거 DNA 결합 도메인은 선택된 서열에 결합하도록 조작된 것일수 있다. 예를 들면, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al, (2001) Nature Biotechnol. 19: 656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416이 본 명세서 참고자료로서 포함될 수 있다. 자연 발생된 징크 핑거 단백질과 비교하여, 조작된 징크 핑거 결합 도메인은 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작 방법은 합리적 설계 및 다양한 타입의 선택을 포함하나 이에 국한되지는 않는다. 합리적 설계는, 예를 들어 삼중 (또는 사중) 뉴클레오티드 서열, 및 개별 징크 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스의 이용을 포함하며, 이때 각 삼중 또는 사중 뉴클레오티드 서열은 특정 삼중 또는 사중 서열에 결합하는 징크 핑거의 하나 이상의 서열과 연관된다.
- [0054] 표적 서열의 선택, 융합 단백질 (및 그것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드)의 설계 및 구성은 당업자에 공지되어

있으며, 참고자료로 미국특허출원 공개 2005/0064474 및 2006/0188987의 전문에 상세하게 설명되며, 상기 공개 특허의 전문이 본 발명의 참고자료로서 본 명세서에 포함된다. 또한, 이러한 참고문헌 및 당업계의 다른 문헌에 개시된 대로, 징크 핑거 도메인 및/또는 다중-핑거 징크 핑거 단백질들이 임의의 적절한 링커 서열, 예를 들면 5 개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 링커에 의해 함께 연결될 수 있다. 6 개 이상의 아미노산 길이의 링커 서열의 예는 미국등록특허 6,479,626; 6,903,185; 7,153,949을 참고한다. 여기 설명된 단백질들은 단백질의 각 징크 핑거 사이에 적절한 링커의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0055]

또한, ZFN과 같은 뉴클레아제는 뉴클레아제 활성 부분 (절단 도메인, 절단 하프-도메인)을 포함한다. 주지된 대로, 예를 들면 징크 핑거 DNA 결합 도메인과 상이한 뉴클레아제로부터의 절단 도메인과 같이, 절단 도메인은 DNA 결합 도메인에 이중성일 수 있다. 이중성 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제나 엑소뉴클레아제로부터 얻어질 수 있다. 절단 도메인이 유래할 수 있는 예시적인 엔도뉴클레아제는 제한 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0056]

유사하게, 절단 하프-도메인은, 상기 제시된 바와 같이, 절단 활성을 위하여 이량체화를 필요로 하는 임의의 뉴클레아제 또는 그것의 일부로부터 유래될 수 있다. 융합 단백질이 절단 하프-도메인을 포함하는 경우, 일반적으로 2 개의 융합 단백질이 절단에 필요하다. 대안으로, 2 개의 절단 하프-도메인을 포함하는 단일 단백질이 이용될 수도 있다. 2 개의 절단 하프-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 그것의 기능적 단편들)로부터 유래할 수도 있고, 또는 각 절단 하프-도메인이 상이한 엔도뉴클레아제 (또는 그것의 기능적 단편들)로부터 유래할 수도 있다. 또한, 2 개의 융합 단백질의 표적 부위는, 2 개의 융합 단백질과 그것의 각 표적 부위의 결합에 의해 절단-하프 도메인들이 서로에 대해 공간적으로 배향되어 위치됨으로써, 절단 하프-도메인이, 예를 들어 이량체화에 의해 기능성 절단 도메인을 형성할 수 있도록 하는 관계로 배치되는 것이 바람직하다. 따라서, 일 구현예에서, 5-8 개 뉴클레오타이드 또는 15-18 개 뉴클레오타이드에 의해 표적 부위의 이웃 가장자리가 분리된다. 그러나, 임의의 정수의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 쌍이 2 개의 표적 부위 사이에 개재될 수 있다(예, 2 내지 50 개 뉴클레오타이드 쌍 또는 그 이상). 일반적으로, 절단 부위는 표적 부위 사이에 놓인다.

[0057]

제한 엔도뉴클레아제 (제한 효소)는 많은 종에 존재하며, DNA에 서열-특이적으로 결합하여(표적 부위에서), 바로 결합 부위나 그 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 어떤 제한 효소 (예, Type IIS)는 인식 부위로부터 제거된 부위에서 DNA를 절단하며, 분리가능한 결합과 절단가능한 도메인을 가진다. 예를 들면, Type IIS 효소 FokI은 한 가닥 상의 인식 부위로부터 9개 뉴클레오타이드에서 그리고 나머지 한 가닥 상의 인식 부위로부터 13개 뉴클레오타이드에서 DNA의 이중가닥 절단을 촉매한다. 따라서, 한 구현예에서, 융합 단백질은 최소 1개의 Type IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인 (또는 절단 하프-도메인)과 하나 이상의 아연-핑거 결합 도메인 (조작될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는)을 포함한다.

[0059]

본 발명의 용어 "TALEN"는 DNA의 타겟 영역을 인식 및 절단할 수 있는 뉴클레아제를 가리킨다. TALEN은 TALE 도메인 및 뉴클레오타이드 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질을 가리킨다. 본 발명에서, "TAL 이펙터 뉴클레아제" 및 "TALEN"이라는 용어는 호환이 가능하다. TAL 이펙터는 크산토모나스 (*Xanthomonas*) 박테리아가 다양한 식물 종에 감염될 때 이들의 타입 III 분비 시스템을 통해 분비되는 단백질로 알려져 있다. 상기 단백질은 숙주 식물 내의 프로모터 서열과 결합하여 박테리아 감염을 돕는 식물 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있다. 상기 단백질은 34개 이하의 다양한 수의 아미노산 반복으로 구성된 중심 반복 도메인을 통해 식물 DNA 서열을 인식한다. 따라서, TALEN은 게놈 엔지니어링의 도구를 위한 신규 플랫폼이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 다만 게놈-교정 활성을 갖는 기능 TALEN을 제작하기 위해서 다음과 같이 현재까지 알려지지 않았던 소수의 주요 매개변수가 정의되어야 한다. i) TALE의 최소 DNA-결합 도메인, ii) 하나의 타겟 영역을 구성하는 2 개의 절단-자리 사이의 스페이스의 길이, 및 iii) FokI 뉴클레아제 도메인을 dTALE에 연결하는 링커 또는 융합 접합 (fusion junction).

[0060]

본 발명의 TALE 도메인은 하나 이상의 TALE-반복 모듈을 통해 서열-특이적 방식으로 뉴클레오타이드에 결합하는 단백질 도메인을 가리킨다. 상기 TALE 도메인은 적어도 하나의 TALE-반복 모듈, 보다 구체적으로는 1 내지 30 개의 TALE-반복 모듈을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, "TAL 이펙터 도메인" 및 "TALE 도메인"이라는 용어는 호환가능하다. 상기 TALE 도메인은 TALE-반복 모듈의 절단을 포함할 수 있다. 상기 TALEN과 관련하여 국제공개특허 WO/2012/093833호 또는 미국공개특허 2013-0217131호에 개시된 내용 전문이 본 명세서에 참고자료로서 포함된다.

- [0062] 본 발명에서 용어, "RGEN"은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 구성요소로 포함하는 뉴클레아제를 의미한다.
- [0063] 본 발명에서 상기 RGEN은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA; 및 분리된 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 세포에 적용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 보다 구체적인 양태로서, 본 발명에서 상기 RGEN은 1) 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 및 분리된 Cas 단백질, 2) 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA 및 Cas 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 세포에 적용될 수 있다.
- [0065] 상기 1)의 형태로 세포에 전달하는 것을, RNP delivery로도 명명하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 분리된 가이드 RNA 형태로 적용할 경우, 상기 가이드 RNA는 생체 외 (in vitro) 전사된(transcribed) 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 또한, 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA 및 Cas 단백질을 코딩하는 핵산은 분리된 핵산 자체로 이용될 수도 있지만, 상기 가이드 RNA, 또는/및 Cas 단백질을 발현하기 위한 발현 카세트를 포함하는 벡터 형태로 존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 상기 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 또는 아그로박테리움 벡터일 수 있으며, 상기 바이러스 벡터의 종류로는 AAV (Adeno-associated virus)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 Cas 단백질을 암호화하는 핵산은 개별적인 벡터에 각각 존재하거나, 하나의 벡터에 존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 상기에서 기술된 각 적용 양태는 명세서에 기술된 보다 구체적인 양태에 대해서도 모두 적용될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서 상기 RGEN은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-DR 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 guide RNA 또는 이를 코딩하는 DNA, 및 Cas 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 용어, "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템의 주요 단백질 구성 요소로, 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 nickase를 형성할 수 있는 단백질이다.
- [0072] 상기 Cas 단백질은 crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)와 복합체를 형성하여 이의 활성을 나타낼 수 있다.
- [0073] Cas 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있다. 구체적으로, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질일 수 있다. 또한, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 보다 구체적으로 스트렙토코커스 피요젠스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas 단백질, 보다 구체적으로 Cas9 단백질일 수 있다. 또한, 상기 Cas 단백질은 캄필로박터 속 (*Campylobacter*) 속, 보다 구체적으로 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas 단백질, 보다 구체적으로 Cas9 단백질일 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 또한, 상기 Cas 단백질은 천연형 단백질 외에도 가이드 RNA와 협동하여 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 nickase로 작용할 수 있는 변이체를 모두 포함하는 개념으로 본 발명에서 사용된다. 상기 Cas9 단백질의 변이체는 촉매적 아스파라긴산 잔기 (catalytic aspartate residue)가 임의의 다른 아미노산으로 변경된 Cas9의 돌연변이 형태일 수 있다. 구체적으로, 다른 아미노산은 알라닌 (alanine)일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명에서 상기 Cas 단백질은 재조합 단백질일 수 있다.
- [0077] 상기 용어 "재조합"은, 예컨대 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터 등을 언급하며 사용될 때, 이종 (heterologous) 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연형 (native) 핵산 또는 단백질의 변경, 또는 변형된 세포로부터 유래한 세포에 의해 변형된 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터를 나타낸다. 따라서, 예컨대, 재조합 Cas 단백질은 인간 코돈 표 (human codon table)를 이용하여 Cas 단백질을 암호화하는 서열을 재구성함으로써 만들 수 있다.
- [0079] 상기 Cas 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산은 Cas 단백질이 핵 내에서 작용할 수 있게 하는 형태일 수 있다.
- [0080] 상기 분리된 Cas 단백질은 또한 세포 내로 도입되기에 용이한 형태일 수 있다. 그 예로 Cas 단백질은 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인 (protein transduction domain)과 연결될 수 있다. 상기 단백질 전달 도메인

은 폴리-아르기닌 또는 HIV 유래의 TAT 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인은 상기 기술된 예 외에도 다양한 종류가 당업계에 공지되어 있으므로, 당업자는 상기 예에 제한되지 않고 다양한 예를 본 발명에 적용할 수 있다.

[0081] 또한, 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산은 추가적으로 핵 위치 신호 (nuclear localization signal, NLS) 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트는 상기 Cas 단백질을 발현시키기 위한 프로모터 서열 등 조절 서열 외에도 NLS 서열을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] Cas 단백질은 분리 및/또는 정제에 유리한 태그와 연결될 수 있다. 그 예로, His 태그, Flag 태그, S 태그 등과 같은 작은 펩타이드 태그, 또는 GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그 등을 목적에 따라 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0084] 본 발명에서 용어, "가이드 RNA (guide RNA)"는 표적 DNA 특이적인 RNA를 의미하며, Cas 단백질과 결합하여 Cas 단백질을 표적 DNA로 인도할 수 있다.

[0085] 본 발명에서 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)를 구성요소로 포함하는 이중 RNA (dual RNA); 또는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 포함하는 제1 부위 및 Cas 단백질과 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 형태, 보다 구체적으로 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분이 융합된 형태인 sgRNA (single-chain RNA)일 수 있다.

[0086] 상기 sgRNA는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열 부분 (이를 Spacer region, Target DNA recognition sequence, base pairing region 등으로도 명명함) 및 Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 가지는 부분, Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조 및 Terminator 서열을 포함할 수 있다. 상기 기술된 구조는 5' 에서 3' 순으로 순차적으로 존재하는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분 및 표적 DNA의 상보적인 부분과 염기 쌍을 형성할 수 있는 부분을 포함하는 경우라면 어떠한 형태의 가이드 RNA도 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0088] 상기 crRNA는 표적 DNA와 혼성화된 것일 수 있다.

[0089] RGEN은 Cas 단백질 및 dual RNA로 구성되거나, Cas 단백질 및 sgRNA로 구성될 수 있다. 또한, 상기 RGEN은 Cas 단백질을 코딩하는 핵산 및 dual RNA를 코딩하는 핵산; 또는 Cas 단백질을 코딩하는 핵산 및 sg RNA를 코딩하는 핵산을 구성요소로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 상기 가이드 RNA, 구체적으로 crRNA 또는 sgRNA는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 포함하며, crRNA 또는 sgRNA의 업스트림 부위, 구체적으로 sgRNA 또는 dualRNA의 crRNA의 5' 말단에 하나 이상의 추가의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 추가의 뉴클레오티드는 구아닌 (guanine, G)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 보다 구체적으로, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 유전자 교정은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-DR 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas 단백질을 세포에 도입하여 수행되는 것일 수 있다. 즉, 뉴클레아제 중 하나인 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 RGEN 방법을 이용하여 앞에서 기술한 바 대로 중요 조직적합성항원 유전자들의 한 쪽 (부계 혹은 모계) 대립 유전자를 제거함으로써 한 개의 대립 유전자만 남게 되어 결과적으로 유전자 동형접합과 같은 효과를 가진 세포들을 구축할 수 있다.

[0092] 상기 RGEN 방법으로 HLA-DRB1 유전자의 대립 유전자 낙아웃을 위해 사용할 수 있는 표적 서열 (target sequence)은 모든 인간에 공통적으로 존재하는 보존된 서열을 사용하는데 예를 들어 HLA-DRB1에 존재하는 5'-ATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGG-3' (서열번호 1), 혹은 5'-CCAGGCAGCATTGAAGTCAGGTG-3' (서열번호 2), 혹은 5'-CCTTCAGACCTGGTGATGCTG-3' (서열번호 3), 혹은 5'-CCAGACCTGGTGATGCTGGAAA-3' (서열번호 4) 일 수 있으나, 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.

[0093] 또한, RGEN 방법으로 HLA-A 유전자의 대립 유전자 낙아웃을 위해 사용할 수 있는 표적 서열은, 예를 들어 HLA-A 엑손 4에 존재하는 5'-CCCTGCGGAGATCACACTGACCT-3' (서열번호 5), 혹은 5'-CCTGCGGAGATCACACTGACCTG-3' (서열번호 6), 혹은 5'-GAGACCAGGCCTGCAGGGGATGG-3' (서열번호 7), 혹은 5'-CACCTGCCATGTGCAGCATGAGG-3' (서열번호

8)일 수 있으나 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.

- [0094] 그리고 RGEN 방법으로 HLA-B 유전자의 대립 유전자 낙아웃을 위해 사용할 수 있는 표적 서열은, 예를 들어 HLA-B 엑손 4에 존재하는 5'-ACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGG-3' (서열번호 9), 혹은 5'-GATCACACTGACCTGGCAGCGGG-3' (서열번호 10), 혹은 5'-ACACTGACCTGGCAGCGGGATGG-3' (서열번호 11), 혹은 5'-GACCTGGCAGCGGGATGGCGAGG-3' (서열번호 12), 혹은 5'-CCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATA-3' (서열번호 13)일 수 있으나 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0095] 본 발명의 실시예에서는, HLA 유전자들의 대립 유전자를 낙아웃 시키기 위해 Cas9 단백질과 교정하고자 하는 특정 HLA 유전자 표적 서열을 인지하는 sgRNA를 세포 안에 전달하는 방법을 사용하였다.
- [0097] 구체적으로, 상기 방법은 (1) 박테리아에서 과발현시킨 후 정제한 Cas9 단백질과 특정 HLA 타겟 시퀀스를 인지하는 sgRNA (single guided RNA)를 *in vitro* 전사에 의해 제조하여 전달해주는 방법 일 수도 있다. (2) 혹은 이들 Cas9 단백질과 sgRNA를 발현시키는 플라스미드 DNA들을 세포 안에 전달하여 세포 내에서 발현 하도록 하는 방법을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0098] 또한, 본 발명에 필요한 단백질, RNA, 혹은 플라스미드 DNA들의 세포 내 전달방법은 전기천공법 (electroporation), 리포좀, 바이러스벡터, 나노파티클 (nanoparticles) 뿐만 아니라 PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등 당업계에 공지된 다양한 방법들을 사용할 수 있으며, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0100] 또한, 본 발명의 방법은 역분화줄기세포 (induced pluripotent stem cells), 배아줄기세포뿐만 아니라 및 모든 세포에 적용할 수 있다. 즉, 다양한 세포에 적용할 수 있는 기술로서 이점을 가진다.
- [0101] 즉, 상기 방법은 줄기세포 (유도만능줄기세포, 배아줄기세포, 핵치환기술 유래 배아줄기세포, 성체줄기세포) 및 체세포에 적용될 수 있다. 또한, 상기 세포는 인간 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 여기에서 말하는 성체줄기세포는 배아 (embryo), 신생아 및 성체로부터 얻을 수 있는 모든 성체줄기세포들 뿐만 아니라 체대혈유래 줄기세포 (cord blood stem cells), 태반유래 줄기세포 (placenta stem cells), 탯줄줄기세포 (Wharton's jelly stem cells), 양수줄기세포 (amniotic fluid stem cells), 양막상피줄기세포 (amniotic epithelial cells) 등 배외줄기세포 (extraembryonic stem cells)들과 이들로부터 파생된 유전자변형 세포들을 포함한다.
- [0103] 또한, 여기에서 말하는 체세포는 배아뿐만 아니라 어린아이와 성인의 몸에서 얻을 수 있는 모든 세포들은 물론이고, 이들 세포들로부터 유래된 모든 유전자변형 세포들까지 포함한다.
- [0105] 본 발명의 면역적합형 세포의 제조 방법은, HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 중 둘 이상의 유전자가 이형접합 유전형인 경우, 또는 HLA-A, 및 HLA-B 유전자가 이형접합 유전형인 경우, 해당 세포에서 이형접합인 유전자들의 대립 유전자들을 순차적으로 또는 동시에 유전자 교정으로 제거 또는 변경할 수 있으며, 구체적으로 순차적으로 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0106] 또한, 상기 제조 방법은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자 모두가 이형접합 유전형인, 또는 HLA-A, 및 HLA-B 유전자가 이형접합 유전형인 경우, 분리된 세포에서, 상기 유전자들 각각의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 교정으로 제거 또는 변경할 수 있으며, 각 유전자들의 대립 유전자를 순차적 또는 동시에 유전자 교정으로 제거 또는 변경할 수 있다. 또한, 상기 제조 방법은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자 모두가 이형접합 (heterozygous) 유전형인 분리된 세포에서, HLA-DR 유전자의 대립 유전자 한 쌍 모두를 유전자 교정으로 제거하고, HLA-A 및 HLA-B 유전자 각각의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 교정으로 제거 또는 변경하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. DRB1은 MHC 클래스 II 단백질 중 하나로 B 세포 등 일부 세포에서만 발현되기 때문에 biallelic 낙아웃시킬 수 있으며, HLA 조합의 종류를 단순화시킬 수 있는 이점을 가지나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 방법에 따르는 경우, 한 종류의 세포에서 4 가지 각기 다른 동형접합 유사 세포들을 제조할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포에 Drb1을 biallelic 낙아웃 시킨 뒤

(도 9), HLA-A 및 HLA-B 유전자 각각의 대립 유전자 하나를 유전자 교정으로 제거하여 4 가지 다른 동형접합 유사 세포들을 제조하였다 (도 14 및 15).

[0109] 또한, 본 발명의 제조 방법은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 유전자 외에도 HLA-C, HLA-DP 및 HLA-DQ 중 하나 이상의 유전자의 대립 유전자를 유전자 교정으로 제거 또는 변경하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 유전자 교정에 대해서는 앞서 기술한 바가 모두 적용됨이 자명하다.

[0111] 또한, 본 발명의 제조 방법은 제조된 세포에서 HLA형을 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 단계는 유전자형을 분석하는 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 예컨대 목적하는 HLA 유전자의 표적 서열 부위를 PCR로 증폭시킨 후 이의 서열을 분석하는 방법을 통하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0113] 또한, 상기 방법은 제조된 면역적합형 세포 군으로부터 이식하고자 하는 HLA형을 가지는 세포를 선별하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 선별 과정에 있어서 HLA 유전자형을 분석하는 단계를 선행할 수 있고, HLA 유전자형이 분석된 경우에는 분석된 결과를 통하여 선별할 수 있다. 이러한 과정을 통하여 수혜자에게 적합한 HLA형 세포를 제공할 수 있다.

[0115] 본 발명은, 다른 하나의 양태로서, 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 제공한다.

[0116] 상기 제조 방법에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0118] 본 발명은, 다른 하나의 양태로서, 상기 제조 방법으로 제조된 면역적합형 세포를 포함하는, 세포 집단을 제공한다.

[0119] 상기 제조 방법에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다. 상기 세포 집단은 세포 은행으로도 명명될 수 있다.

[0121] 본 발명은, 다른 하나의 양태로서, (a) HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 유전형인 분리된 세포; 또는 HLA-A, 또는 HLA-B 중 하나 이상의 면역적합항원 유전자가 이형접합 유전형인 분리된 세포에서, 이형접합 유전형인 상기 유전자의 대립 유전자 하나 또는 둘을 유전자 결손 또는 변경을 통하여 교정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 제조된 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 면역적합형 세포 집단의 제조 방법을 제공한다.

[0122] 상기 (a) 단계에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다. 또한, 상기 세포 집단은 세포 은행으로도 명명될 수 있다.

[0123] 상기 (b) 단계에서는 (a) 단계에서 제조된 세포를 수집하여 다양한 HLA형을 가지는 세포들의 집단을 구축할 수 있다.

[0124] 또한, (a) 단계 수행 후 (b) 단계 수행 전에, (a') 상기 (a) 단계에서 획득된 분리된 세포의 HLA 유전자형을 확인하는 단계를 추가로 포함하여, HLA형이 확인된 세포 집단, 즉 세포 집단을 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0126] 본 발명에 따르면, 이식용 타가세포에서 면역거부반응을 야기하는 핵심적인 조직적합성 항원(HLA) 유전자들을 교정하여 많은 수의 사람들에게 면역적합한 세포를 구축할 수 있다. 따라서, 이 방법을 이용하여 여러 종류의 다양한 세포를 구축하고, 이를 बैं킹 (banking)해 놓으면 필요할 때에 즉시 타가세포 이식 (allogeneic transplantation)에 사용할 수 있는 매우 중요한 세포치료 기반을 제공하여 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0128]

도 1은, HLA-A 와 HLA-B 유전자의 부계 혹은 모계 유래의 한 쪽 혹은 두 쪽 대립유전자를 낙아웃 시키고 HLA-DRB1 유전자는 두 대립유전자 모두 낙아웃 시키는 과정으로 면역적합성 세포를 제조하고 세포 집단을 구축하는 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는, HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 유전자의 부계 혹은 모계 유래의 한 쪽 대립유전자를 낙아웃 시켰을 때 한 공여자의 세포로부터 HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 유전자들에 대해 총 8가지의 각기 다른 동형접합 유사성 세포들이 생성될 수 있음을 보여주는 예시도이다.

도 3은, HLA-A 와 HLA-B 유전자의 부계 혹은 모계 유래의 한 쪽 대립유전자를 낙아웃 시키고 HLA-DRB1 유전자는 두 대립유전자 모두 낙아웃 시키는 경우, 한 공여자의 세포로부터 HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 유전자들에 대해 총 4 가지의 각기 다른 동형접합 유사성 세포들이 생성될 수 있음을 보여주는 예시도이다.

도 4는, 인간유도만능줄기세포 #12 내에 Cas9 단백질과 DRB1 가이드 RNA를 발현하는 플라스미드들을 전기천공법으로 도입한 다음, DRB1 유전자 안의 표적 서열 부위에 인델 (Indel)이 유도되었는지를 분석한 결과이다.

도 5는, 인간유도만능줄기세포 #8 내에 Cas9 단백질과 DRB1 가이드 RNA를 전기천공법으로 도입한 다음, DRB1 유전자 안의 표적 서열 부위에 인델 (Indel)이 유도되었는지를 분석한 결과이다.

도 6은, 도 5에서 확인된 클론 중 클론 #8의 대립 유전자 2에 인델 (Indel) 유무를 서열분석을 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은, 인간유도만능줄기세포 #12 내에 Cas9 단백질과 DRB1 가이드 RNA를 전기천공법으로 도입한 다음, DRB1 유전자 안의 표적 서열 부위에 인델 (Indel)이 유도되었는지를 분석한 결과이다.

도 8은, 도 7에서 확인된 클론 중 클론 #4의 대립 유전자 1에 인델 (Indel) 유무를 서열분석을 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는, 인간배아줄기세포 H9 #85, CHA15 #34 및 인간유도만능줄기세포 hiPSC12 #13 내에 Cas9 단백질과 DRB1 가이드 RNA를 전기천공법으로 도입한 다음, DRB1 유전자 안의 표적 서열 부위에 인델 (Indel)이 유도되었는지를 서열분석을 통하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은, 도 9에서 확인된 클론의 만능성 (pluripotency)을 확인한 결과이다.

도 11은, DRB1 유전자의 두 대립 유전자를 모두 낙아웃 시킨 세포에서 HLA-A 유전자의 한 쪽 대립 유전자를 Cas9 단백질 및 HLA-A sgRNA를 이용하여 낙아웃 시키는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 12는, A#69 및 A#300 클론의 HLA-A 유전형질 및 서열을 분석한 결과이다.

도 13은, 도12에서 확인한 클론에 Cas9 단백질 및 HLA-B sgRNA를 이용하여 HLA-B 유전자의 한 쪽 대립 유전자를 낙아웃 시키는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 14는, #53, #34, #98 및 #134 클론의 HLA-B 유전형질을 분석한 결과이다.

도 15는, #53, #34, #98 및 #134 클론의 HLA-B 서열을 분석한 결과이다.

도 16은, DRB1 유전자의 두 대립 유전자가 모두 낙아웃되고, HLA-A*02/*03⁺ 및 HLA-B*35/*44⁺ 유전형질을 가지 는 H9 클론의 만능성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0129]

이하 본 발명을 하기 예에 의해 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0131]

이식 시 일치되어야 하는 가장 중요한 HLA 분자는 클래스 I HLA-A, HLA-B 및 클래스 II HLA-DR인 것으로 알려져 있다. HLA 동형접합 인간 만능줄기세포 라이브러리를 생성하기 위해, 본 발명자들은 Drb1, HLA-A 및 HLA-B 유전자에 대한 표적 Cas9의 gRNA를 제작하고 ES 세포 및 iPS 세포에서 직접 위치-특이적 변이 능력을 시험하였다. 도 1은 상기 전략의 모식도를 보여준다.

[0133]

재료 및 방법

[0135]

세포 배양

[0136]

hESC 및 iPSC는 Geltrex (Invitrogen)로 코팅한 배양접시에서 10 μ M ROCK 억제제인 Y27632 (Santa Cruz)를 함유하는 E8 배지 (Invitrogen)로 24 시간 동안 배양하였다. 세포는 4 내지 5일 간격으로 EDTA를 이용하여 계대배양 하였다.

[0138]

가이드 RNA

[0139]

RNA는 MEGAshortscript T7 키트 (Ambion)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 생체 외 전사하였다. sgRNA에 대한 주형 (template)은 두 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 결합 (annealing) 및 신장 (extension)을 통해 제조하였다. gRNA 서열은 표적 서열과 동일하며 3' 말단이 "NGG"로 끝나는 23 nt 서열이다.

[0141]

형질도입 (Transfection)

[0142]

hESC 및 iPSC는 제조사의 지침에 따라 Program CB-150을 이용하여 Amaxa P3 Primary Cell 4DNucleofector 키트로 형질도입하였다. 구체적으로, 2×10^5 개의 세포에 생체 외 전사된 sgRNA (40 μ g)와 함께 미리 혼합된 Toolgen의 Cas9 단백질 (30 μ g)을 형질도입하였다. Cas9 단백질을 뉴클레아제-비함유수 (nuclease-free water)에 용해된 sgRNA와 혼합하고 상온에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. Cas9-sgRNA 혼합물 10 μ l를 Nucleofection 용액 100 μ l에 첨가하였다. 형질도입 3 일 후에 세포를 분석하였다.

[0144]

T7E1 분석

[0145]

DNeasy Blood & Tissue 키트 (QIAGEN)를 이용하여 유전체 (genomic) DNA를 추출하였다. PicoMaxx High Fidelity PCR 시스템 (Agilent)을 이용하여 Cas9 표적 위치를 포함하는 PCR 앰플리콘 (amplicon)을 제조하였다. 상기 PCR 앰플리콘을 가열하여 풀고 유전자증폭기 (thermocycler)를 이용하여 이형2중가닥 (heteroduplex) DNA 형태로 결합시켰다. 그 다음 T7 endonuclease 1 (New England Biolabs)으로 37 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 반응시킨 뒤 아가로스 겔 전기영동을 이용하여 분석하였다. 서열 분석 (sequencing analysis)을 위해, 상기 PCR 산물을 TA 클로닝 벡터 (pGEM-T Easy Vector; Promega)를 이용하여 서브-클로닝 (sub-cloning)에 사용하였다. 상기 제조한 플라스미드를 정제하고 각각의 클론의 서열을 분석하였다 (MacroGen Inc.).

[0147]

알칼리 포스파타아제 (Alkaline phosphatase) 염색

[0148]

제조사의 지침에 따라 Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent)를 사용하여 알칼리 포스파타아제 염색을 수행하였다. 세포를 4 % 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 고정하고, Tris-buffered saline/ 0.05 % Tween 20 (Sigma)으로 세척한 뒤 AP 염색 용액으로 염색하였다.

[0150]

면역형광분석

[0151]

4 % 포름알데히드 (formaldehyde)로 hESC를 고정하고 0.1 % Triton X-100을 함유하는 PBS (phosphate-buffered saline; Invitrogen)로 상온에서 30 분 동안 투과화 (permeabilization)시켰다. 그 다음 세포를 0.03 % Triton X-100을 함유하는 PBS (세척 완충액)로 세척하였다. 고정된 표본을 세척 완충액에 5 % BSA (bovine serum albumin)를 녹인 용액으로 1 시간 동안 블록킹한 다음, 일차 항체로 4 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 표본을 세척 완충액으로 세척한 뒤 FITC가 결합된 이차 항체 (Molecular Probes)로 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 핵을 염색하기 위해 슬라이드를 DAPI (Vector Laboratories)로 카운터-염색하였다.

- [0153] **표적화 딥시퀀싱 (Targeted deep sequencing)**
- [0154] Phusion polymerase (New England BioLabs)를 이용하여 표적 및 잠재적인 비표적 위치를 포괄하는 유전체 DNA 절편 (segment)을 증폭시켰다. Illumina MiSeq를 이용하여 상기 PCR 앰플리콘 산물을 쌍-말단 서열분석 (paired-end sequencing)하였다.
- [0156] **핵형분석**
- [0157] 핵형분석은 GenDix Inc.에 의해 수행되었다.
- [0159] **실시예 1: HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자의 한 쪽 대립유전자 낙아웃을 통한 동형접합 유사성 세포의 제조**
- [0161] HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자가 이형접합인 세포에서 유전체 교정을 통하여 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자의 한 쪽 대립유전자를 뉴클레아제를 이용하여 낙아웃시켜 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자가 동형접합 유사 성격을 가지는 8 종의 세포를 구축하였다. 상기 과정은 도 2에 모식도로 나타내었다.
- [0163] **실시예 2: HLA-A 및 HLA-B 유전자의 한 쪽 대립유전자 낙아웃, 및 HLA-DRB1 유전자의 두 대립유전자 낙아웃을 통한 동형접합 유사성 세포의 제조**
- [0165] HLA-A, HLA-B 및 HLA-DRB1 유전자가 이형접합인 세포에서 유전체 교정을 통하여, HLA-DRB1 유전자의 대립 유전자 한 쌍을 모두 제거하고, HLA-A 및 HLA-B 유전자의 한 쪽 대립유전자를 뉴클레아제를 이용하여 낙아웃시켜 HLA-A 및 HLA-B 유전자가 동형접합 유사 성격을 가지는 4 종의 세포를 구축하였다. 상기 과정은 도 3에 모식도로 나타내었다.
- [0167] **실시예 3: Cas9 단백질 및 HLA-DRB1 특이적인 가이드 RNA (DRB1 gRNA)를 발현하는 플라스미드의 인간유도만능줄기세포로의 도입**
- [0169] 인간유도만능줄기세포 #12번 (iPSC#12) 내에 Cas9 단백질과 DRB1 gRNA를 발현하는 플라스미드 DNA들을 전기천공법으로 전달하였다. 이후 얻어진 iPSC#12 유래 콜로니들의 유전체 DNA를 추출한 후 DRB1 유전자 안의 타겟 시퀀스 부위에 indel (insertion or deletion)이 유도되었는지를 T7 endonuclease I (T7E1) mutation detection assay로 분석을 하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0170] 도 4에 나타난 바와 같이, 분석 결과 23 개의 iPSC 세포주들 중에 DRB1 유전자의 양 쪽 (부계와 모계 유래) 대립유전자에 indel이 유도된 iPSC는 7 개 세포주 (빨간색 화살표), 그리고 대립유전자 #1 (allele 1로 표시)에 indel이 유도된 iPSC는 1 개 세포주 (보라색 화살표), 대립유전자 #2 (allele 2로 표시)에 indel이 유도된 iPSC는 4 개 세포주 (파란색 화살표)로 판명되었다.
- [0172] **실시예 4: 전기천공법 (electroporation)을 이용한 Cas9 단백질 및 HLA-DRB1 특이적인 가이드 RNA (DRB1 gRNA)의 인간유도만능줄기세포로의 도입**
- [0174] 인간유도만능줄기세포 #8번 (iPSC#8) 내에 플라스미드 DNA가 아닌 Cas9 단백질과 HLA-DRB1 gRNA를 전기천공법으로 전달하였다. 이후 얻어진 iPSC#8 유래 콜로니들의 유전체 DNA를 추출한 후 HLA-DRB1 유전자 안의 타겟 시퀀스 부위에 indel (insertion or deletion)이 유도되었는지를 T7 endonuclease I (T7E1) mutation detection assay로 분석을 하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

- [0175] 도 5에 나타난 바와 같이, 분석 결과 총 75 개의 iPSC 세포주들 중에 DRB1 유전자의 대립유전자 #1 (allele 1로 표시)에 indel이 유도된 iPSC는 7 개 세포주 (빨간색 화살표), 대립유전자 #2 (allele 2로 표시)에 indel이 유도된 iPSC는 2 개 세포주 (파란색 화살표)로 판명되었다. 도 5는, 분석된 총 75 개 iPSC 세포주들 중에서 42 개 세포주의 아가로스 겔 분석 결과를 나타난 것이다.
- [0177] 또한, 상기 도 5에서 인간유도만능줄기세포 #8번 (iPSC#8)을 이용하여 indel을 유도한 결과 클론 #8이 대립유전자 2에 indel이 있는 것으로 파악되었기에 (도 5 참조), 이를 검증하기 위하여 표적 서열 부위를 PCR로 증폭시킨 후 서열을 분석하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0178] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 대립유전자 1에는 변화가 없지만 대립유전자 2에 뉴클레오티드 한 개 ("A")가 삽입되어 있음을 확인하였다.
- [0180] 또한, 인간유도만능줄기세포 #12번 (iPSC#12) 내에 플라스미드 DNA가 아닌 Cas9 단백질과 HLA-DRB1 gRNA를 전기천공법으로 전달하였다. 이후 얻어진 iPSC#12 유래 콜로니들의 유전체 DNA를 추출한 후 HLA-DRB1 유전자 안의 타겟 시퀀스 부위에 indel (insertion or deletion)이 유도되었는지를 T7 endonuclease I (T7E1) mutation detection assay로 분석을 하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0181] 도 7에 나타난 바와 같이, 분석 결과 클론 #4, 6, 9, 10 에서 대립유전자 1에 indel이 있는 것으로 파악되었고 대립유전자 2에는 변화가 없는 것으로 나타났다.
- [0183] 상기 도 7에서, 대립유전자 1에 indel이 있는 것으로 나타난 클론들 #4, 6, 9, 10 중에서 clone #4를 선택하여 indel 여부를 검증하였다. 이를 위하여 대립 유전자 1과 2의 표적 서열 부위를 PCR로 증폭시킨 후 서열을 분석하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0184] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 대립유전자 1에 뉴클레오티드 한 개 ("A")가 삽입되어있고 대립유전자 2에는 변화가 없는 것으로 확인되었다.
- [0186] **실시예 5: Drb1이 완전히 녹아웃된 만능줄기세포주의 확립**
- [0188] 클래스 II 단백질은 B 림프구 (lymphocyte), 대식세포 (macrophage), 및 수지상세포 (dendritic cell)의 조대세포에서 발현된다. 클래스 I과 다르게, 클래스 II 단백질의 발현 상실은 NK 세포 매개 세포 용해를 유발하지 않는다. 따라서 본 발명자들은 Drb1이 완전히 녹아웃된 hESC를 제조하였다.
- [0189] 이를 위해, Drb1 영역을 표적화하는 생체 외 전사된 sgRNA와 정제된 재조합 Cas9 단백질의 복합체를 형성하였다. 전기천공법 (electroporation)을 통해 상기 단백질-RNA 복합체를 H9, CHA15 hES 및 hiPSC12 세포주에 도입하였다. 형질도입 72 시간 후 세포를 회수하고, ROCK (Rho kinase) 억제제를 함유하는 hESC 배지 조건에서 매우 낮은 밀도로 단일 세포 상태로 세포를 접종하였다.
- [0190] 녹아웃을 평가하기 위해, 딥시퀀싱 (deep sequencing) 및 Sanger 시퀀싱을 수행하였다. 선택된 대표적인 클론 중에서, H9 #85는 5 및 13 nt 결손 패턴, CHA15 #34는 두 대립유전자 모두 1 nt 삽입 패턴, 그리고 hiPSC12 클론 #13에서는 1 nt 삽입 및 32 nt 결손 패턴이 관찰되었다 (도 9). 모든 Drb1-녹아웃 클론은 안정적으로 성장했고 각 세포는 원형의 형상을 유지했으며, 세포들은 10 세대까지 단단하게 밀집된 형상을 유지했다.
- [0191] 상기 클론들의 만능성 (pluripotency)을 평가하기 위해, 면역염색을 수행하였다. 면역세포화학 분석 (immunocytochemical analysis)을 통해 Drb1 KO 클론이 만능성 마커인 Oct4, Nanog, 및 AP를 적절히 발현하는 것을 확인하였고, 핵형에 비정상이 없음을 확인하였다 (도 10).

[0193] **실시예 6: Drb1 낙아웃, 및 HLA-A 및 HLA-B 동형접합 만능줄기세포주의 확립**

[0195] HLA-A 및 B 동형접합 세포주를 제조하기 위해, 본 발명자들은 다음으로 Drb1 KO 클론에서 HLA-A 및 HLA-B를 표적으로 하였다.

[0196] Cas9 단백질 및 생체 외 전사된 sgRNA 전달 방법을 다시 사용하여, 먼저 HLA-A 단일 대립인자 (monoallelic) 변이 세포를 확립하였다. 단일 세포 유래 클론이 표적 지역에 단일 대립인자 인델 (indel) 패턴을 가지는지를 확인하기 위해 상기 클론을 서열 분석하였다. 도 11은 상기 실험과정을 요약한 것으로, Drb1 KO CHA 15 hES 세포주 유래 HLA-A 단일 대립인자 변이 클론의 변이 패턴을 나타낸 것이다.

[0197] 형질 특이적으로 증폭된 PCR 산물의 T7E1 분석은 하나의 형질에만 특이적인 절단을 보여준다. 서열분석 결과 클론 A#69는 A*31 형질에서 1 nt 삽입이 있고 클론 A#300은 A*33 형질에서 1 nt 결손이 있는 것을 확인하였다 (도 12).

[0198] HLA-A 변이를 평가한 뒤, 다음으로 HLA-B 유전자를 표적으로 하는 sgRNA를 도입하였다 (도 13). 형질 특이적인 T7E1 및 서열분석으로 클론을 조사하였다. 도 14 및 도 15에서는 CHA15 hES 세포주에서 유래된 대표적인 클론을 보여준다. H9 hES 및 iPS12에서도 같은 실험을 수행하였다.

[0199] 상기 클론들에서는 어떠한 비정상적인 세포 형태 또는 세포 성장도 관찰되지 않았다. 마지막으로, Drb1이 완전히 낙아웃되었고, HLA-A*02+/*03- 및 HLA-B *35+/*44- 유전형질을 가지는 H9 클론의 만능성을 분석하였다. 면역세포화학적 분석으로 상기 세포가 만능성 마커인 Oct4 및 Nanog를 발현하는 것을 확인하였다.

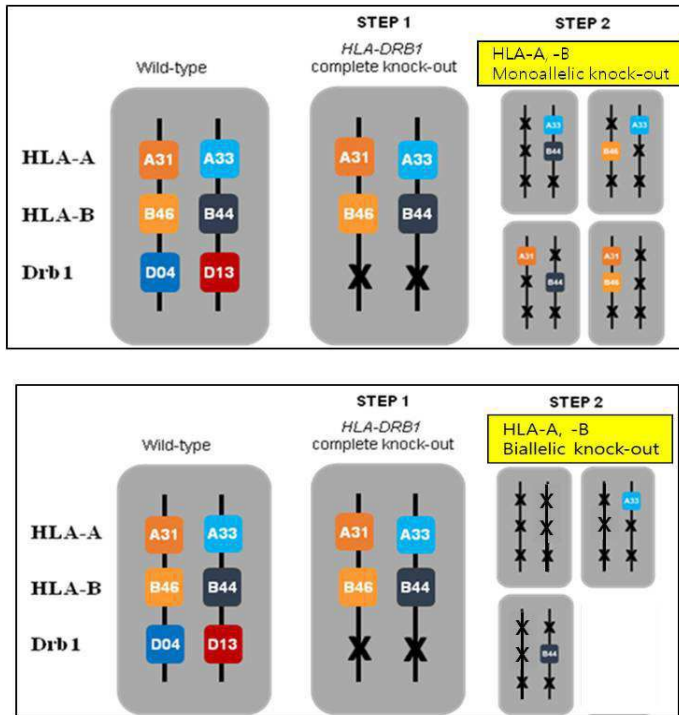
[0201] 본 발명에서는 Crispr-Cas9 매개 유전자 조작을 통해 HLA 동형접합 인간 만능줄기세포가 제조될 수 있음을 확인하였다. 여기서 본 발명자들은 현존하는 만능줄기세포주로부터 상기 클론들의 소규모 라이브러리를 생성하였다. 본 발명은 공여자-수여자가 면역학적으로 맞는 세포주를 제조하기 위해 일반적으로 세포 분리 절차에 시간 및 비용이 과하게 소요되는 SNT 또는 전사인자 매개 리프로그래밍의 단점을 배제할 수 있다는데 상당한 의의가 있다. 본 발명은 환자에게 면역 적합형 만능줄기세포를 제공함으로써 세포 기반 치료분야 발전에 많은 기여를 할 것으로 판단된다. 특히, GMP 시설에서 제조된 특성 분석이 잘 된 세포주를 이용하는 것이 초기 비용을 상당히 감소시킬 수 있을 것이다. 나아가, 플라스미드 형태 보다 단백질 기반의 Cas9 전달 방식을 이용함으로써 플라스미드 벡터가 유전체 내에 삽입될 가능성을 배제할 수 있다.

[0202] 종합하면, 본 발명을 통해 쉽게 이용 가능한 hES 또는 iPSC 세포주로부터 환자에 대한 면역 적합형 만능줄기세포를 제조할 수 있다.

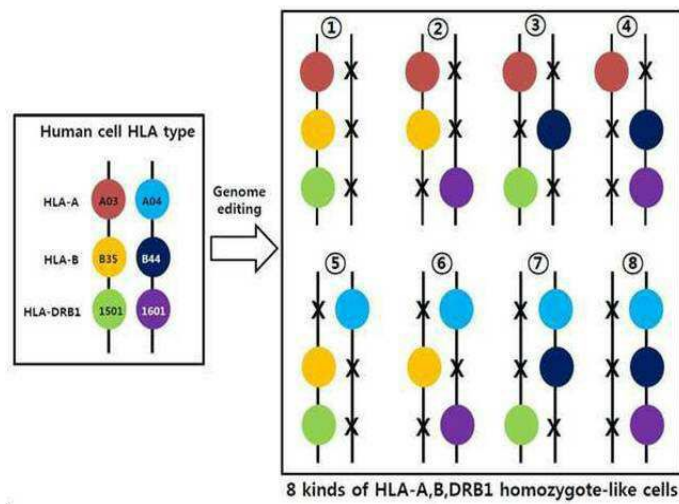
[0204] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

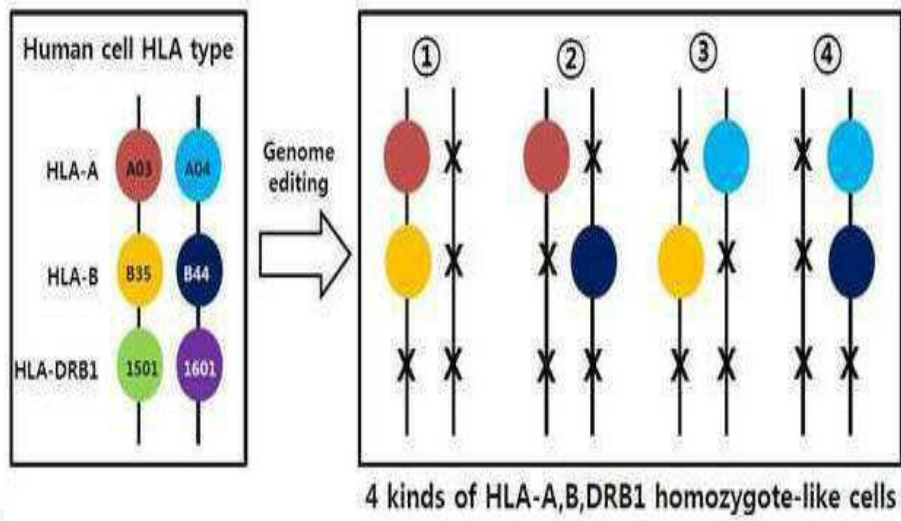


도면2

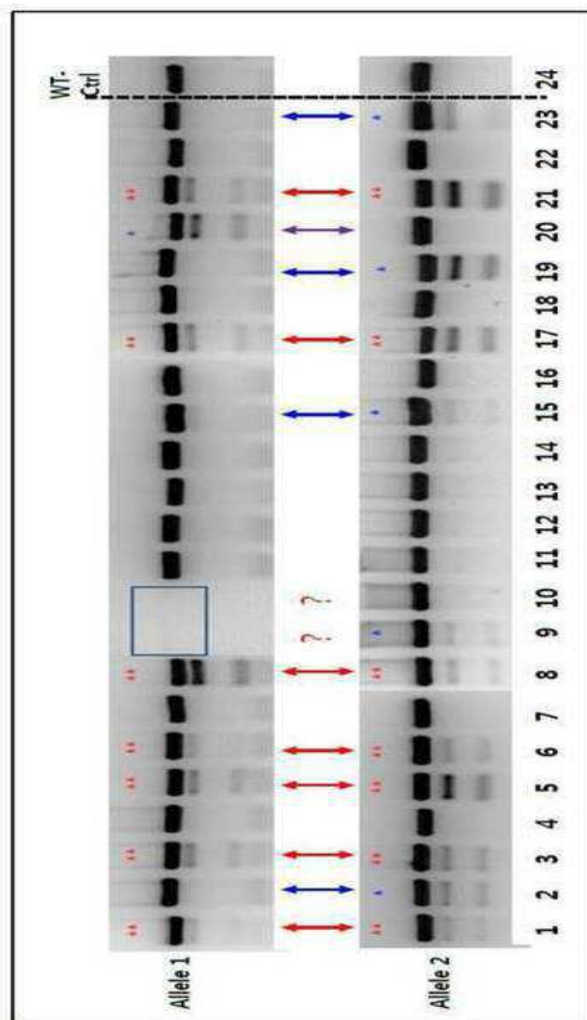


20

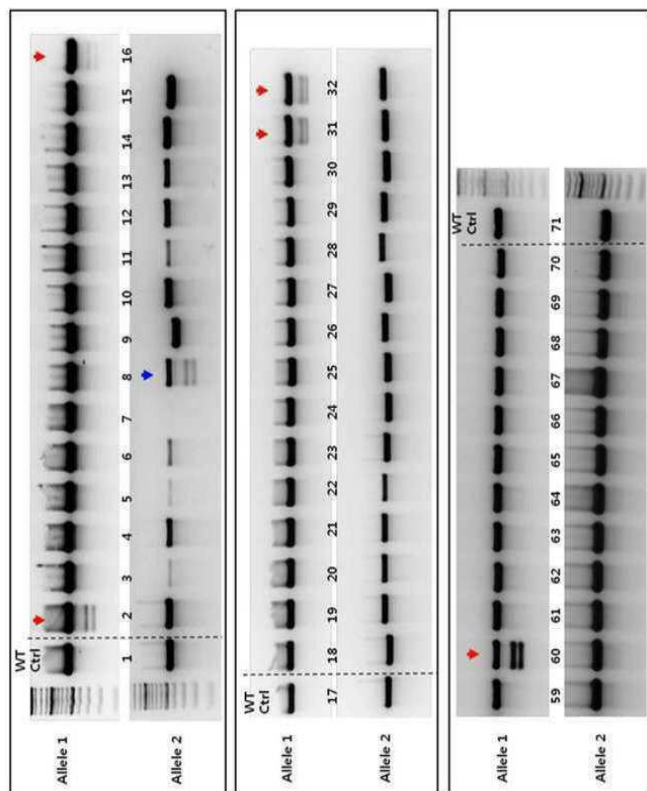
도면3



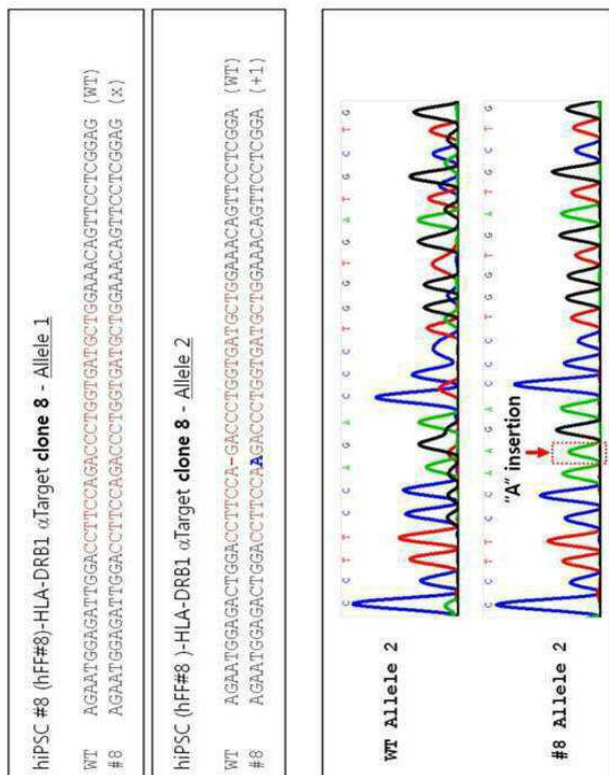
도면4



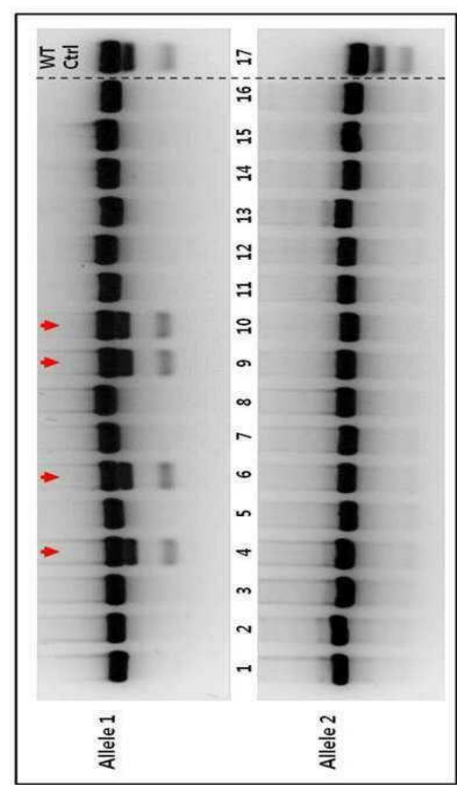
도면5



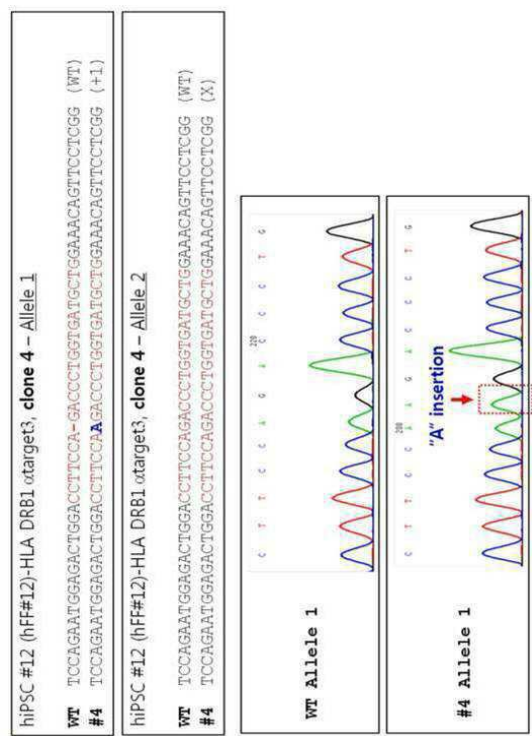
도면6



도면7



도면8



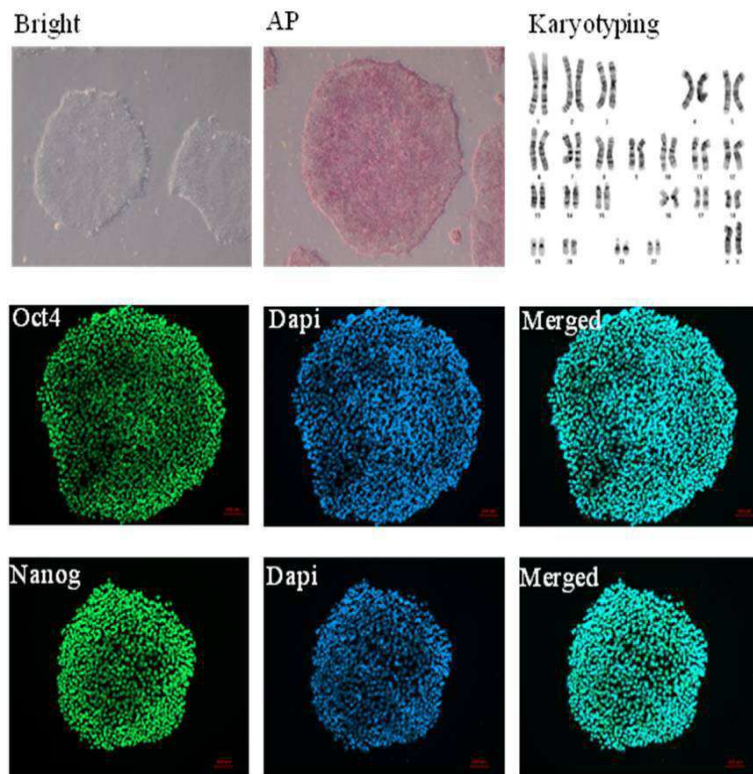
도면9

H9#85	WT	GAGTCAGGTGGTTCTGAAAGGCCAGGAGAGAGGCTGGGATGCTGTC	
	Drbl *15	GAGTCAGGTGGTTCTGAAAGGCC-----TGGGATGCTGTC	(-13bp)
	Drbl *16	GAGTCAGGTGGTTCTGAAAGGCCAGGAG-----GCTGGGATGCTGTC	(-5bp)

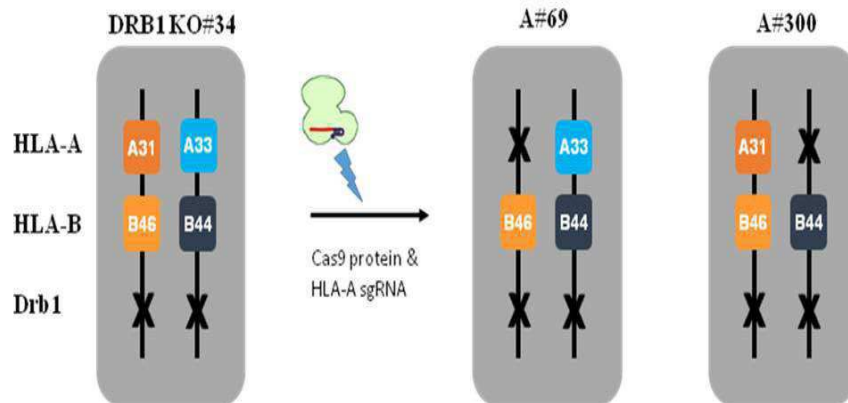
CHA15#34	WT	TCCAGARTGGAGACTGGACCTTCCA-GACCTGGTGATGCTGGAACAGTT	
	Drbl *04	TCCAGARTGGAGACTGGACCTTCCAGACCTGGTGATGCTGGAACAGTT	(+1bp)
	Drbl *13	TCCACARTGGAGACTGGACCTTCCAGACCTGGTGATGCTGGAACAGTT	(+1bp)

hiPSC12#13	WT	TCCAGARTGGAGACTGGACCTTCCAGACCTGGTGATGCTGGAACAGTT	
	Drbl *04	TCCAGARTGGAGAC-----AGTT	(-32bp)
	Drbl *14	TCCACARTGGAGACTGGACCTTCCAGACCTGGTGATGCTGGAACAGTT	(+1bp)

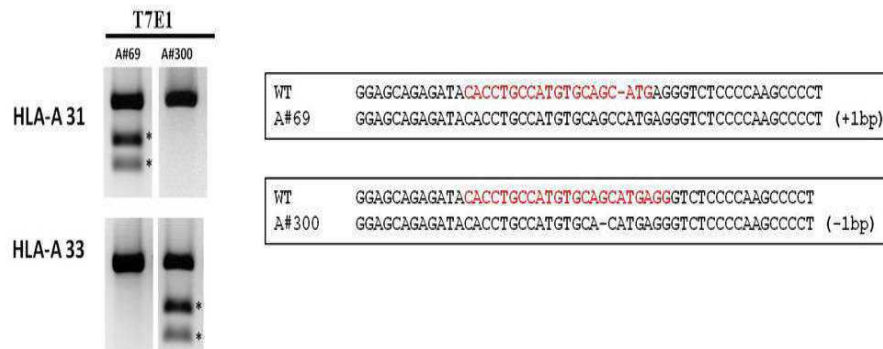
도면10



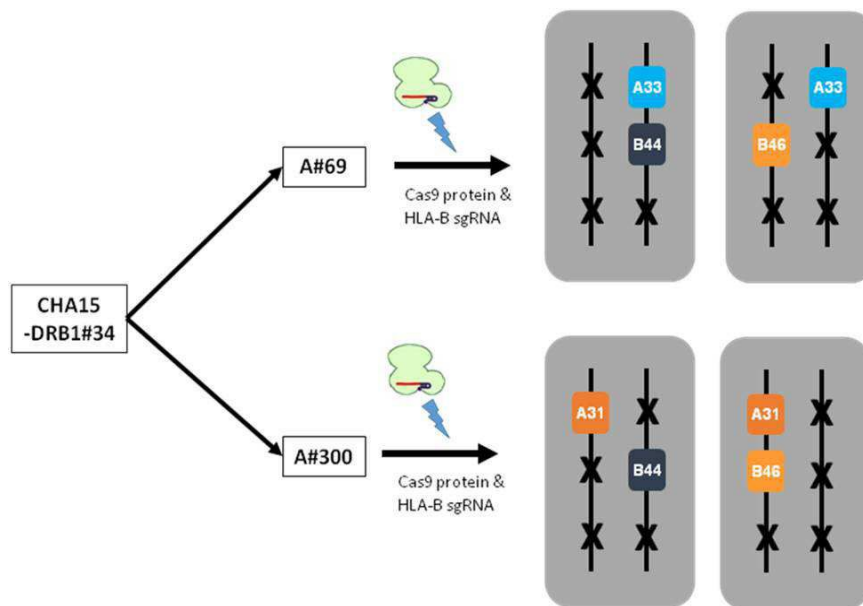
도면11



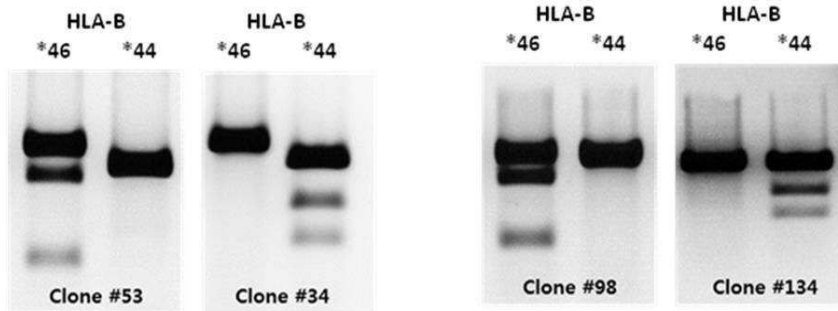
도면12



도면13



도면14



도면15

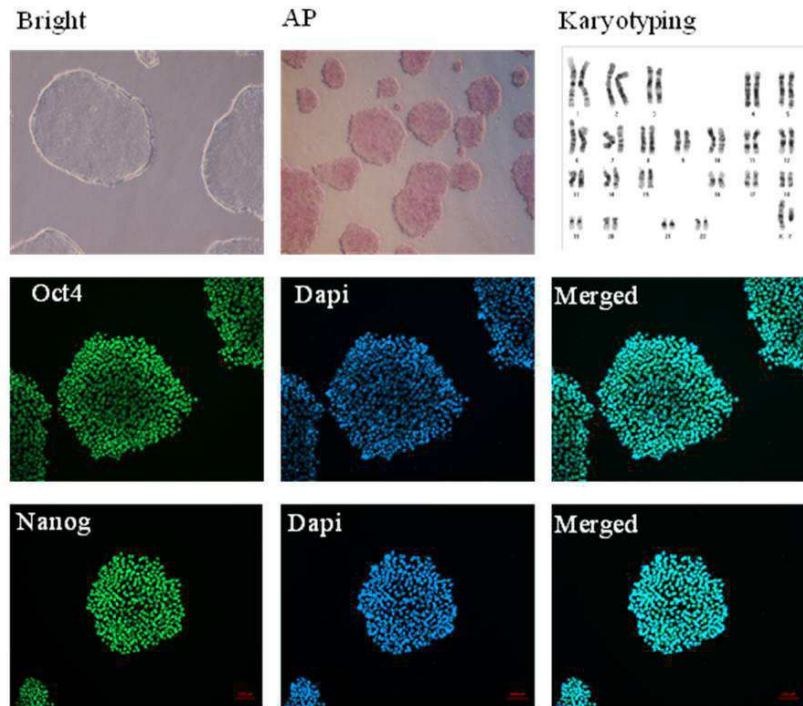
WT	TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATG
B#53	TGGGC-----AGCAGAGATACACATGCCATG (-26bp)

WT	TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATG
B#34	TGGGCAGCTGTGG-----CAGAGATACACATGCCATG (-20bp)

WT	TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATG
B#98	TGGGCAGCTGT-----GAAGAGCAGAGATACACATGCCATG (-16bp)

WT	TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATG
B#134	TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTT-----GAAGAGCAGAGATACACATGCCATG (-5bp)

도면16



서 열 목 록

- <110> College of Medicine Pochon CHA University Industry-Academic Cooperation Foundation
INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE
- <120> Immune-compatible cells created by nuclease-mediated editing of
genes encoding Human Leukocyte Antigens
- <130> KPA140664-KR-P1
- <150> KR 10-2014-0101203
- <151> 2014-08-06
- <160> 13
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HLA-DRB1 target sequence
- <400> 1
atccaggcag cattgaagtc agg

23

<210> 2

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HLA-DRB1 target sequence
 <400> 2
 ccaggcagca ttgaagtcag gtg 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HLA-DRB1 target sequence
 <400> 3
 ccttcagac cctggtgatg ctg 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HLA-DRB1 target sequence

 <400> 4
 ccagaccctg gtgatgctgg aaa 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HLA-A target sequence
 <400> 5
 ccctgcggag atcacactga cct 23
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HLA-A target sequence
 <400> 6
 cctgcggaga tcacactgac ctg 23

<210>	7	
<211>		
>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HLA-A target sequence	
<400>	7	
	gagaccaggc ctgcagggga tgg	23
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HLA-A target sequence	
<400>	8	
	cacctgccat gtgcagcatg agg	23
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HLA-B target sequence	
<400>	9	
	accctgaggt gctgggcctt ggg	23
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HLA-B target sequence	
<400>	10	
	gatcacactg acctggcagc ggg	23
<210>	11	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HLA-B target sequence	

<400> 11
acactgacct ggcagcggga tgg 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HLA-B target sequence
<400> 12
gacctggcag cgggatggcg agg 23
<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HLA-B target sequence
<400> 13
ccttctggag aagagcagag ata 23