



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136274
(43) 공개일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0040280
(22) 출원일자 2022년03월31일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020210041875 2021년03월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
성영훈
서울특별시 강북구 도봉로47길 26, 401호(미아동, 오봉예체들안)
강은주
서울특별시 중구 다산로 32, 8동 1606호(신당동, 남산타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

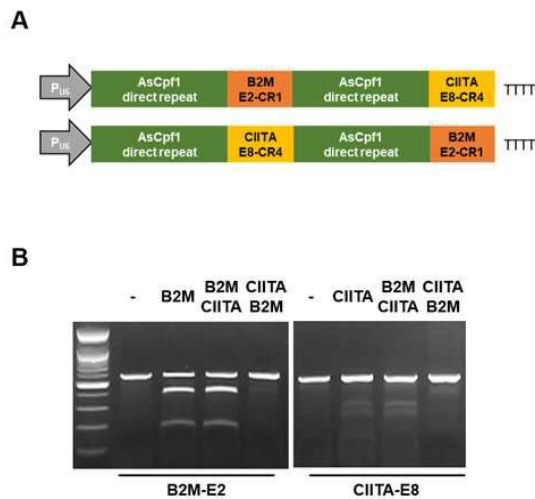
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 제조용 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단일 벡터를 활용하는 경우, 다중 유전자 편집(multiplex gene editing)을 통해 B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 효과적으로 녹아웃시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

김경남

울산광역시 울주군 범서읍 평천길 94, 101동 2007호(천상 청구 그린타운)

이미주

경기도 용인시 기흥구 한보라1로21번길 71(보라동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415169895

과제번호 20012423

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업기술알키미스트프로젝트(R&D)

연구과제명 면역거부반응이 없는 이식용 3차원 소프트임플란트 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울아산병원

연구기간 2020.09.01 ~ 2021.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

(i) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA 및 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA를 포함하는 다중(multiplex) crRNA array 및 (ii) Cpf1을 코딩하는 유전자 또는 Cpf1을 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA이 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA보다 선순위에 위치하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCGATATTCCTCAGGTACTC (서열번호 2)를 포함하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCAGAGCCCATGGGGCAGAG (서열번호 14)를 포함하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 조성물.

청구항 5

B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자가 모두 단일 벡터에 포함되는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA이 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA보다 선순위에 위치하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCGATATTCCTCAGGTACTC (서열번호 2)를 포함하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCAGAGCCCATGGGGCAGAG (서열번호 14)를 포함하는 것인, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터.

청구항 10

(i) 제5항에 따른 벡터, 또는

(ii) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA와 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA; 및 Cpf1 mRNA 또는 Cpf1 단백질을 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포주는 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell)인 것인, 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법.

청구항 12

제10항의 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법으로 제조된, 저면역원성 만능 줄기세포.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 (i) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA 및 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA를 포함하는 다중(multiplex) crRNA array 및 (ii) Cpf1을 코딩하는 유전자 또는 Cpf1을 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 제조용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] CRISPR-Cas9 시스템은 HNH와 RuvC라는 nuclease motif를 가지고 있는 Cas9 단백질을 포함하며, Cas9과 결합하여 표적 DNA 시퀀스를 인식할 수 있도록 하는 CRISPR RNA (crRNA) 및 crRNA와 상호작용하는 transactivating crRNA (tracrRNA)로 구성되어 평활 말단의 이중 가닥 절단(blunt-ended double-strand break; DSB)을 유발한다.
- [0003] Cas9 nucleoprotein complex가 표적 DNA를 인식하기 위해서는 표적 DNA상에 PAM(protospacer-adjacent motif)이라는 특정 염기서열이 존재해야 한다. DSB는 대부분 세포 내에 존재하는 비상동말단연결(Non-homologous End-Joining, NHEJ)을 통해 수선되는데, NHEJ는 error-prone mechanism으로 repair되는 도중에 삽입(insertion) 및 결실(deletion)이 빈번하게 일어나고, 이를 통해 단백질 암호화 서열에 조기 종결코돈(premature stop codon)을 발생시키는 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)가 발생하게 된다.
- [0004] Cpf1은 Cas9과 유사한 CRISPR-Cas 시스템의 하나로, 초기에 AsCpf1과 LbCpf1의 세포주 내 활성이 보고되었고, Cas9과 몇 가지 다른 특성을 나타낸다. 특히, Cpf1 유전자가위는 pre-crRNA 프로세싱 활성을 나타내므로, 여러 개의 crRNA가 연결된 하나의 crRNA를 발현시키더라도 여러 개의 유전자를 동시에 공략할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Cong et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, Science, 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
- (비특허문헌 0002) Mali et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9, Science, 2013 Feb 15, 339(6121):823-26.
- (비특허문헌 0003) Cho et al., Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease, Nat Biotechnol, 2013 Mar, 31(3):230-32.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 Cpf1이 나타내는 pre-crRNA 프로세싱 활성을 이용하여 AsCpf1을 기반으로 하는 하나의 벡터를 통한 다중 유전자 편집(multiplex gene editing) 기술을 구현함으로써, class I 및 class II MHC의 발현에 필수적인 B2M 및 CIITA 유전자가 모두 녹아아웃된 저면역원성 만능 줄기세포 제조가 가능함을 최초로 규명하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, (i) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA 및 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA를 포함하는 다중(multiplex) crRNA array 및 (ii) Cpf1을 코딩하는 유전자 또는 Cpf1을 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 측면은, B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또다른 측면은, (i) 상기 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터 또는 (ii) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA와 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA; 및 Cpf1 mRNA 또는 Cpf1 단백질을 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또다른 측면은, 상기 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법으로 제조된, 저면역원성 만능 줄기세포를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0011] 면역거부반응 유발에 핵심적인 B2M 및 CIITA 유전자를 모두 녹아웃(knockout)시킨 PSC (pluripotent stem cell)는 저면역원성(hypoimmunogenic)을 나타낸다. 본 발명에 따른 조성물 또는 벡터를 활용하는 경우, Cpf1의 pre-crRNA 프로세싱 활성을 이용하여 만능 줄기세포의 B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 효과적으로 녹아웃시킬 수 있으므로, 다중 유전자 편집(multiplex gene editing)을 통해 유전자 녹아웃의 효율을 높이고, 단계를 단순화함으로써 만능 줄기세포의 원치 않는 변형을 최소화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 녹아웃시킬 수 있는 crRNA array (pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR 및 pY108-CIITA E6-B2M E2-2CR)를 제작하여 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR을 이용하는 경우, 오프-타겟 효과 없이 B2M 및 CIITA의 타겟 유전자만 녹아웃되는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 B2M 및 CIITA 동시 녹아웃 hESC 클론을 대식세포(macrophage)로 분화시킨 후 RT-PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 CIITA 유전자 특이적인 crRNA를 제작하여 hiPSC (Human induced pluripotent stem cell)에서 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR 및 pY108-CIITA E8-B2M E2-2CR를 제작하여 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 hESC-B2M/CIITA 동시 녹아웃 세포의 genomic DNA를 추출한 후 target region PCR 및 T7E1 assay를 통해 유전자 가위의 활성 테스트를 진행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 선별된 hESC-B2M/CIITA 동시 녹아웃 클론을 조형모세포로 분화시키고, 염색(staining) 후 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 MHC class I의 발현 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 일 측면은 (i) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA 및 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA를 포함하는 다중(multiplex) crRNA array 및 (ii) Cpf1을 코딩하는 유전자 또는 Cpf1을 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 제조용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 용어 "crRNA (CRISPR RNA)"는 CRISPR-Cas 시스템의 구성요소로서 박테리아 및 고세균에서 침입하는 파지 또는 플라스미드를 표적하는 적응성 RNA-매개 방어 시스템과 관련이 있다. 박테리아 및 고세균은 침입한 바이러스 또는 플라스미드 DNA-유래의 스페이스(target sequence)를 CRISPR 유전자 좌위 내로 통합시켜 보유하고 있다가, 다음에 동일한 침입이 발생할 때에 상기 정보를 방어에 사용한다.
- [0015] crRNA는 CRISPR 유전자 좌위에서 각각의 박테리아 및 고세균 특이적이며 반복적으로 나타나는 염기서열(direct repeat)과 이전에 침입한 바이러스 또는 플라스미드 DNA-유래인 염기서열(spacer)이 연결되어 하나의 단위로

구성되고, 이렇게 구성된 crRNA는 tandem repeat 형태로 모여서 존재하며, 연결되어 하나의 RNA (pre-crRNA)로 발현된다.

- [0016] 본 발명의 용어 "crRNA (CRISPR RNA) array"는 다중의 crRNA가 연속적으로 연결되어 발현 가능한 배열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 용어 "Cpf1"은 CRISPR/Cas 시스템의 한 종류이고, Cas9과 같이 single subunit effector module로 작동하지만 기능적으로 약간의 차이가 있는 단백질 효소인데, Cas9가 유전자를 잘라내기 위해서는 tracrRNA를 필요로 하는데 반해 Cpf1은 tracrRNA를 필요하지 않는다. Cas9의 경우 구아닌 (Guanine) / 시토신 (cytosine) 이 많은 염기서열을 PAM (protospacer-adjacent motif)으로 사용하는 반면, Cpf1은 티민 (Thymine) / 아데닌 (Adenine)이 많은 염기서열을 PAM으로 사용한다. 또한 Cpf1은 유전자를 잘라낼 때 4~5개 뉴클레오티드 오버행 (overhang)을 발생시킨다는 특징을 가진다.
- [0018] 본 발명의 용어 “줄기세포”는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포로서, 특정 분화 자극(환경) 하에서 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 자극의 성격에 따라 다양한 세포로 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.
- [0019] 본 발명이 적용되는 줄기세포는 제한이 없으며, 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 갖는 세포는 본 발명이 적용될 수 있는 세포이다. 구체적으로는, 본 발명의 줄기세포는 만능 줄기세포(pluripotent stem cell)이다.
- [0020] 본 발명의 용어 “만능 줄기세포 (pluripotent stem cell)”는 수정란보다 발생이 진행된 상태의 세포로서 내배엽, 중간엽 및 외배엽을 구성하는 세포로 모두 분화할 수 있는 줄기세포를 의미한다. 예시로서, 만능 줄기세포에는 배아줄기세포(Embryonic Stem Cell, ESC), 배아생식세포(Embryonic Germ Cell), 배아종양세포(Embryonic Carcinoma Cell) 또는 유도만능 줄기세포(induced Pluripotent Stem Cell, iPSC)가 있다.
- [0021] 상기 다중(multiplex) crRNA array는, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA이 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA보다 선순위에 위치하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 예에서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCGATATTCCTCAGGTACTC (서열번호 2)를 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA의 염기서열은 CCAGAGCCCATGGGCGAGAG (서열번호 14)를 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면은, B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터를 제공한다.
- [0024] 일 예에서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA, CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA 및 Cpf1 유전자가 모두 단일 벡터에 포함되는 것일 수 있다.
- [0025] 일 예에서, 상기 B2M 유전자를 타겟하는 crRNA는 상기 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA보다 선순위에 위치하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또다른 측면은, (i) 상기한 저면역원성 만능 줄기세포 제조용 벡터 또는 (ii) B2M 유전자를 타겟하는 crRNA와 CIITA 유전자를 타겟하는 crRNA; 및 Cpf1 mRNA 또는 Cpf1 단백질을 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 상기 crRNA 및 Cpf1 유전자는 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 의해 목적 세포주 내로 주입될 수 있다. 예를 들어, 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), 리포좀-매개 전이방법 및 바이러스 (레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스 등)-매개 전이방법을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 세포주는 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 또다른 측면은, 상기 저면역원성 만능 줄기세포의 제조방법으로 제조된, 저면역원성 만능 줄기세포를 제공한다.

- [0031] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다. 단, 하기 실시예에는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0032] **실시예 1. B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 녹아웃 시킬 수 있는 crRNA array 제작 (pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR 및 pY108-CIITA E6-B2M E2-2CR 제작)**
- [0033] CRISPR-Cpf1 다중 유전자 편집(multiplex genome editing) 기술을 저면역원성 만능 줄기세포(pluripotent stem cell; PSC) 수립에 적용하기 위하여 B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 녹아웃 시킬 수 있는 crRNA array를 제작하였다.
- [0034] 먼저, B2M 및 CIITA의 각 유전자에 대한 유전자가위를 선별하기 위한 유전자가위 활성 테스트를 진행하였다. pY108 벡터를 이용하여 각 유전자에 대한 단일 유전자가위를 클로닝(cloning)하여 렌티바이러스(lentivirus)를 생산한 후, 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cell; hESC)에 감염시켜 gDNA를 확보하였다. T7E1 assay를 통한 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과, B2M을 타겟하는 유전자가위 Exon 2-crRNA 1 (E2-CR1) 및 CIITA 유전자를 타겟하는 유전자가위 Exon 6-crRNA 1 (E6-CR1)가 높은 활성을 나타냈다(도 1A 및 1B).
- [0035] B2M 및 CIITA 유전자를 동시에 녹아웃시킬 수 있는 crRNA array를 제작하기 위해 선별된 유전자가위를 연결하여 pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR 및 pY108-CIITA E6-B2M E2-2CR을 제작하였다(도 1C). 제작된 벡터로부터 렌티바이러스 입자(lentivirus particle)를 생산하여 hEOS17에 감염(infection)시킨 후 gDNA를 확보하였다. gDNA를 이용하여 T7E1 assay를 통한 유전자가위 활성 테스트를 진행한 결과, 두 가지 벡터에서 모두 타겟 유전자에 대한 유전자가위 활성을 나타내는 것을 관찰하였다(도 1D). 본 연구에서는 pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR을 이용하여 이후의 실험을 진행하였다.
- [0036] **실시예 2. B2M 및 CIITA의 타겟 유전자만 녹아웃되는 효과 확인**
- [0037] pY108-B2M E2-CIITA E6-2CR을 이용한 B2M 및 CIITA 녹아웃 단일 세포 유래 클론을 확보하기 위하여 lentivirus를 생산한 후 hESCs에 감염시켰다. 확보한 단일 클론의 gDNA를 이용하여 TA 클로닝(TA cloning)을 통해 타겟 염기서열을 분석한 결과, B2M 및 CIITA 두 유전자에서 모두 in-frame에 의한 단백질 발현 없이 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)가 유도되어 녹아웃된 것을 확인하였다(도 2A).
- [0038] 또한, 유사한 염기서열에 따른 비특이적 녹아웃이 유도되는 오프-타겟(off-target) 효과를 확인하기 위해 그 가능성이 높은 유사 시퀀스(sequence)를 선별하였고, 해당 염기서열을 증폭하는 PCR 프라이머 쌍(primer pair)으로부터 생산된 PCR product를 이용하여 생어 염기서열 분석(sanger sequencing)을 진행한 결과로부터 돌연변이 존재 여부를 분석하였다(도 2B). 그 결과, off-target 효과는 관찰되지 않았으며 off-target으로 인한 돌연변이 발생 없이 타겟 유전자만이 변이된 것을 확인하였다.
- [0039] **실시예 3. 엑손 스킵핑(Exon skipping)으로 인한 CIITA 유전자의 발현 확인**
- [0040] 분화된 세포에서 관찰이 가능한 CIITA의 발현 분석을 위하여, 확보한 B2M 및 CIITA 동시 녹아웃 hESC 클론을 대식세포(macrophage)로 분화시킨 후 RT-PCR을 수행하였다(Gourley et al. A Novel Role for the Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator CIITA in the Repression of IL-4 Production. Cell 10,377-386(1999)) (도 3A). 그 결과, macrophage 분화 후에 B2M 발현은 관찰되지 않았지만 특이적으로 CIITA 발현이 동정되었으며, 그 사이즈는 예상과 다소 차이가 있었다. 도 2A와 같이 gDNA 상에서 동정된 돌연변이는 13-bp 결실(deletion)이지만, RT-PCR product에서는 그보다 큰 45-bp 결실(deletion)이 동정되었다(도 3B). 이러한 결과를 통해, CIITA 유전자의 돌연변이가 엑손 6(exon 6)에 국한되어 있지만, RNA 스플라이싱(splicing)에 영향을 미쳐 엑손 스킵핑(exon skipping)이 일어난 것을 확인하였다. 따라서 CIITA 유전자의 엑손 6이 결실된다고 하더라도 in-frame을 유지할 수 있으므로 유전자가위 Exon 6-crRNA 1 (E6-CR1)은 본 연구에 사용할 수 없는 바, 새로운 유전자 가위를 선별하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0041] **실시예 4. pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR 및 pY108-CIITA E8-B2M E2-2CR 제작 및 유전자가위 활성 확인**
- [0042] Exon skipping으로 인한 CIITA 유전자의 발현을 차단하기 위해, 새로운 CIITA 유전자 특이적인 crRNA를 제작하여 hiPSC (Human induced pluripotent stem cell)에서 유전자가위 활성 테스트를 진행하였다(도 4). CIITA 아이소폼(isoform)을 분석하여 CIITA 유전자 녹아웃에 적합할 것으로 예상되는 Exon 8-crRNA 4 (E8-CR4)를 이용하였고, 기존에 높은 유전자 녹아웃 효율이 증명된 B2M 유전자 특이적인 B2M-E2-CR1 유전자가위를 연결하여 pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR 및 pY108-CIITA E8-B2M E2-2CR을 제작하였다(도 5A). 이후 생산된 lentivirus를 hESC에 감염시킨 후 유전자가위 활성 테스트를 진행하였다. 그 결과, pY108-CIITA E8-B2M E2-2CR에 비하여

pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR의 유전자가위 활성이 높은 것을 확인하였다(도 5B).

실시예 5. B2M 및 CIITA 녹아웃을 통한 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic pluripotent stem cell) 클론 제작

상기 실시예 4.에서 제작한 pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR을 이용한 B2M 및 CIITA 녹아웃 단일 세포 유래 클론을 확보하기 위해 lentivirus를 생산한 후 hESCs에 감염시켰다. puromycin selection을 통해 음성(negative)과 양성(positive)이 섞인 pooled 형태의 hESC-B2M/CIITA 동시 녹아웃 세포를 제작했으며, 세포의 genomic DNA를 추출한 후 target region PCR 및 T7E1 assay를 통해 유전자 가위의 활성 여부를 판단하였다(도 6A). 그 결과 Pooled Num2 및 Pooled Num3 세포에서 유전자 가위가 작동한 것을 확인했고, Pooled Num2 세포를 이용해 단일 세포 유래 클론화 작업을 진행하였다.

단일 세포유래 하나의 colony로부터 11개의 작은 colony로 나누어 클론화 작업을 진행했다(Kang et al. Age-related accumulation of somatic mitochondrial DNA mutations in adult-derived human iPSCs. 2016 May;18(5):625-36). 각각의 클론들을 배양하여 genomic DNA를 추출한 후, PCR 및 T7E1 assay를 통해서 각 클론의 유전자 가위 활성 여부를 판단했다(도 6B). 이전 실험을 통해 효율성이 입증된 B2M 유전자 가위를 제외하고, CIITA에 대하여만 유전자 가위 활성 여부를 확인하였다. 그 결과 모든 클론에서 CIITA 유전자 가위 활성을 확인했다. 11개의 클론 중 hESC-B2M/CIITA 동시 녹아웃 세포 후보군을 정하기 위하여 마이코플라즈마 검출(mycoplasma detection, 도 6B) 및 (주)마크로젠의 시퀀싱 서비스(sequencing service)를 진행하였고, 최종적으로 하나의 클론을 선별하였다(도 7A).

선별된 클론이 저면역원성 만능 줄기세포(hypo-immunogenic PSC)임을 확인하기 위해 먼저 조혈모세포로 분화를 진행하였다. 분화 16 일째 조혈모세포를 human CD34,45 antibody 및 human MHC I, II antibody로 염색(staining) 진행 이후 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 MHC class I 및 II의 발현을 확인하였다(도 7B). 그 결과 MHC class I의 발현이 98.8% 감소한바, pY108-B2M E2-CIITA E8-2CR을 이용한 B2M 녹아웃은 효과적임을 확인하였다.

실험예 1. crRNA 클로닝(cloning) 및 분석

crRNA 분석은 web-based software를 사용해서 수행되었다(benchling.com). 유전체 DNA 시퀀스(Genomic DNA sequence)는 Genebank를 통해 획득한 후, Snapgene software (GSL Biotech LLC)를 사용해서 분석하였다. 각각의 crRNA에 대한 정보는 하기 표 1, 2 및 3에 기재된 바와 같다. 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결(Non-homologous end joining, NHEJ) 활성을 평가하기 위해서, 클로닝에 필요한 올리고머(oligomer)를 (주)마크로젠에서 합성하였고, 합성된 oligomer는 어닐링(annealing) 후에 pY108 (Addgene #84739)의 BsmBI site에 클로닝하여, (주)마크로젠의 시퀀싱 서비스를 통해 검증했다.

crRNA array를 발현하는 벡터를 제작하기 위해서 하기 표 4 및 5의 올리고머를 (주)마크로젠에서 주문생산한 후 pY108의 BsmBI site에 클로닝하여, (주)마크로젠의 시퀀싱 서비스를 통해 검증했다.

표 1

B2M-특이적 crRNA 목록

Name	Position	Strand	Sequence	PAM	Specificity	서열 번호
hB2M-E1-CR1	44711613	1	TGGCCTGGAGGCTATCCAGC	TTTC	97.6072684	1
hB2M-E2-CR1	44715428	1	CCGATATTCCTCAGGTACTC	TTTC	94.4039144	2
hB2M-E2-CR2	44715464	1	CTCACGTCATCCAGCAGAGA	TTTA	95.6774519	3
hB2M-E2-CR3	44715449	-1	CATTCTCTGCTGGATGACGT	TTTC	95.0210504	4

표 2

[0051]

CIITA-특이적 crRNA 목록(1차 선별)

Name	Position	Strand	Sequence	PAM	Specificity	서열 번호
hCIITA-E3-CR1	10895681	1	CTCCCAGAACCCGACACAGA	TTTC	96.1451615	5
hCIITA-E4-CR1	10898676	1	CTTGCTGGGCAGCGAACT	TTTC	96.4755404	6
hCIITA-E5-CR1	10898967	-1	TGCCCCAACTTCTGCTGGCAT	TTTC	94.995521	7
hCIITA-E5-CR2	10898976	-1	TGACTTTTCTGCCCAACTTC	TTTC	85.4540533	8
hCIITA-E5-CR3	32728	1	TCAAAGTAGAGCACATAGGA	TTTC	46.8219523	9
hCIITA-E6-CR1	35319	1	TCTGCAGCCTTCCCAGAGGA	TTTC	46.4952819	10
hCIITA-E8-CR1	36460	1	TCTCTGCAGTGCCTTTCTC	TTTG	44.1246709	11
hCIITA-E8-CR2	36530	1	TCCCCACCATCTCCACTCTG	TTTG	46.4102234	12

표 3

[0052]

CIITA-특이적 crRNA 목록(2차 선별)

Name	Position	Strand	Sequence	PAM	Specificity	서열 번호
hCIITA-E8-CR 3	36478	1	TCCAGTTCCTCGTGTGAGCTG	TTTC	49.2300132	13
hCIITA-E8-CR 4	36527	-1	CCAGAGCCCATGGGGCAGAG	TTTG	47.9860774	14
hCIITA-E10-C R1	38575	-1	GAAGCTTGTGGAGACCTCT	TTTG	49.5620558	15
hCIITA-E11-C R1	10906515	1	CAGAGCCGGTGGAGCAGTTC	TTTG	97.8345329	16
hCIITA-E11-C R2	10906733	-1	CCCAGCACAGCAATCACTCG	TTTG	97.9889133	17
hCIITA-E11-C R3	10906854	1	TCTTCTCTGTCCCCTGCCAT	TTTG	79.1057119	18
hCIITA-E11-C R4	10906964	1	AGCCACATCTTGAAGAGACC	TTTC	95.7985891	19
hCIITA-E11-C R5	10907111	1	CAGAAGAAGCTGCTCCGAGG	TTTC	97.0397986	20
hCIITA-E11-C R6	10907205	1	AGCTGTCCGGCTTCTCCATG	TTTG	98.5762515	21
hCIITA-E11-C R7	10907259	1	AGAGCTCAGGGATGACAGAG	TTTG	92.4080787	22
hCIITA-E11-C R8	10907351	1	TGCCGGGCAGTGTGCCAGCT	TTTG	98.3835784	23
hCIITA-E11-C R9	10907487	-1	ATGTCTGCGGCCAGCTCCC	TTTG	97.7421807	24
hCIITA-E11-C R10	10907546	-1	GCCATCGCCAGGTCCTCAC	TTTG	98.0579548	25
hCIITA-E11-C R11	10907652	-1	GCCACTCAGAGCCAGCCACA	TTTC	97.6592194	26
hCIITA-E11-C R12	10907784	1	TGGCTGGGCTGATCTTCCAG	TTTC	96.8415355	27
hCIITA-E11-C R13	10907977	1	GCAGCACGTGGTACAGGAGC	TTTG	99.349309	28

표 4

[0053]

이량체(dimeric) crRNAs 클로닝에 사용되는 올리고머(oligomer) 1차 목록

2CR array	strand	sequence	서열 번호
B2M-CIITA	F	AGATCCGATATTCTCAGGTACTCAATTTCTACTCTTGTAGATTCTGCAGCCTTCCCAGAGGA	29

CIITA-B2M	R	AAAATCCTCTGGGAAGGCTGCAGAATCTACAAGAGTAGAAATTGAGTACCTGAGGAATATCGG	30
	F	AGATTCTGCAGCCTTCCCAGAGGAAATTTCTACTCTTGTAGATCCGATATTCCTCAGGTACTC	31
	R	AAAAGAGTACCTGAGGAATATCGGATCTACAAGAGTAGAAATTTCTCTGGGAAGGCTGCAGA	32

표 5

[0054] 이량체(dimeric) crRNAs 클로닝에 사용되는 올리고머(oligomer) 2차 목록

2CR array	strand	sequence	서열번호
B2M-CIITA	F	AGATCCGATATTCTCAGGTACTCAATTTCTACTCTTGTAGATCCAGAGCCCATGGGGCAGAG	33
	R	AAAACCTCTGCCCCATGGGCTCTGGATCTACAAGAGTAGAAATTGAGTACCTGAGGAATATCGG	34
CIITA-B2M	F	AGATCCAGAGCCCATGGGGCAGAGAATTTCTACTCTTGTAGATCCGATATTCCTCAGGTACTC	35
	R	AAAAGAGTACCTGAGGAATATCGGATCTACAAGAGTAGAAATTTCTCTGCCCCATGGGCTCTGG	36

[0055] 실험예 2. 렌티바이러스(Lentivirus) 제작 및 감염

[0056] 렌티바이러스 입자(Lentivirus particle)는, pY108-crRNA array를 psPAX2 (Addgene #12260) 및 pMD2.G (Addgene #12259)와 함께 Lipofectamine Plus Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하고, 제작사의 매뉴얼에 따라서 293TA cell로 형질감염(transfection)시켜 제작하였다.

[0057] 실험예 3. T7E1 assay

[0058] 확립된 세포 배양(cell culture)에서 유전체(genomic) DNA 샘플을 준비하고, 하기 표 6에 나타난 PCR 프라이머 쌍(primer pair)을 사용하여 각 crRNA의 표적 부위(target region)를 증폭하였다. 상기 PCR 산물(product)을 기존에 알려진 보고대로 이질듀플렉스(heteroduplex)를 형성시키고(Zhu, X. et al. 2014), T7 Endonuclease I (T7E1; NEB)를 처리한 후 아가로스 겔(agarose gel)에서 전개하여 유전자가위 활성 여부를 동정하였다.

표 6

[0059] PCR 프라이머(primers)

Target gene	ACC No.	Oligomer name	Sequence	서열번호	Size (bp)
B2M	NC_000015	hB2M-E2-F1	GCTATGAGTGCTGAGAGGGC	37	589
		hB2M-E2-R2	CACGGCAGGCATACTCATCT	38	
CIITA	NC_000016	hCIITA-E8-F2	CAACTGCTCTGCTAGGTGCT	39	543
		hCIITA-E8-R1	GAAGCCACACAACCACTCT	40	

[0060] 실험예 4. hESC lentivirus infection 및 antibiotic selection

[0061] hESC는 VTN 코팅된 세포 배양 용기(VTN(Sigma) coated cell culture plate, SPL)에 시딩(seeding) 이후 stemMACS media (Milteny), Polybrene (Sigma) 및 제작된 렌티바이러스를 이용해 감염시켰다. Positive selection 은 puromycin (Sigma)를 이용하며, 살아남은 세포를 새로운 VTN coated cell culture plate에 split 하여 pooled 형태의 hESC-B2M-CIITA-K.O. 세포를 제작했다.

[0062] 실험예 5. Clonal cell 제작

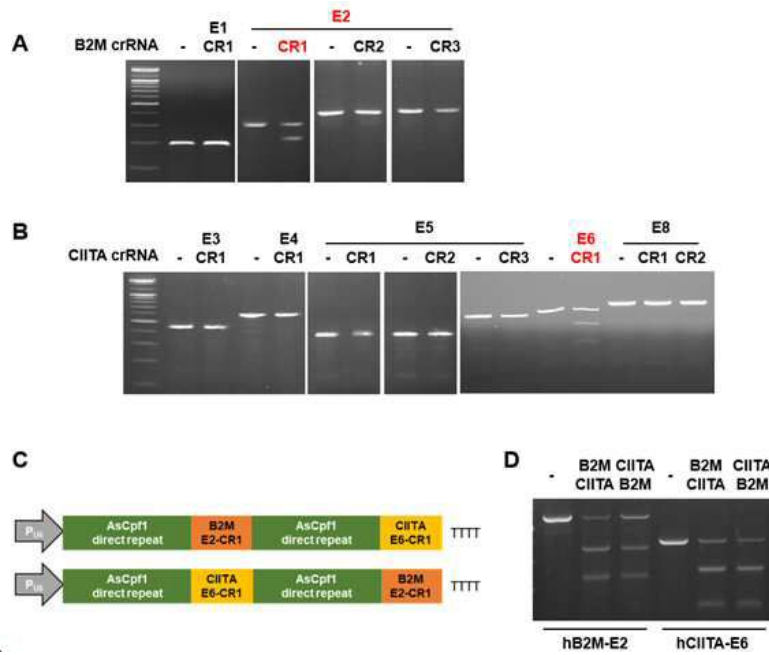
[0063] Pooled 형태의 hESC-B2M-CIITA-K.O. 세포의 단일 콜로니에서 11개의 작은 콜로니로 나누어 각각 새로운 VTN coated cell culture plate에 seeding했으며 세포는 stemMACS 배지에서 배양했다.

[0064] 실험예 6. 조혈모세포(hematopoietic stem cell) 분화 및 유세포 분석(flow cytometry)

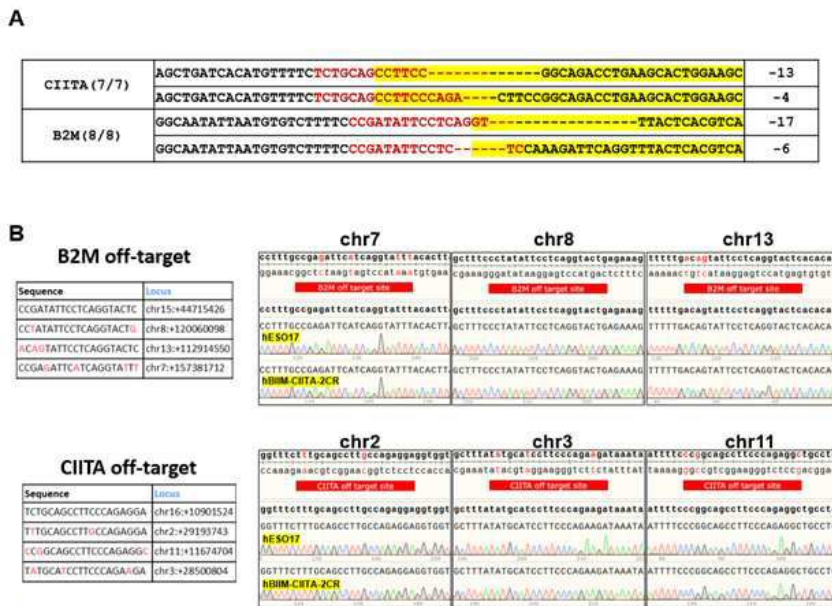
[0065] 제작한 clonal cell을 이용해서 CD34,45 positive HSC(hematopoietic stem cell) 로 분화를 진행했다. 분화된 HSC를 conjugated antibody(BD pharmingen)로 염색(staining) 및 flow cytometry 분석을 통해 MHC class I 및 II 발현 정도를 측정하였다.

도면

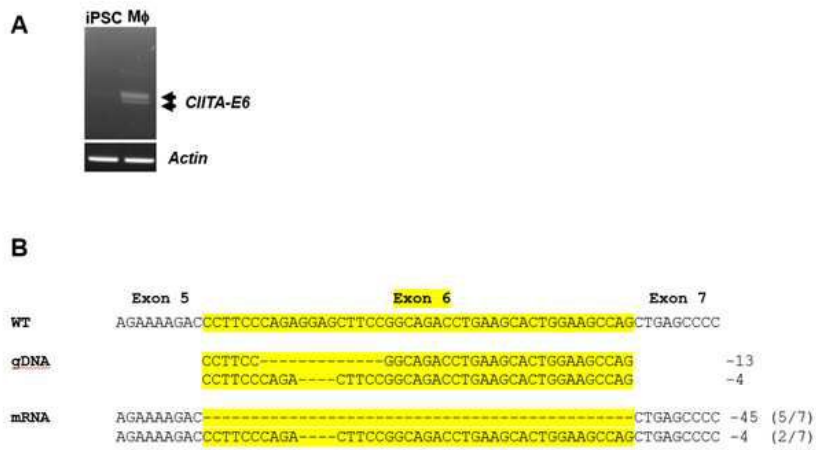
도면1



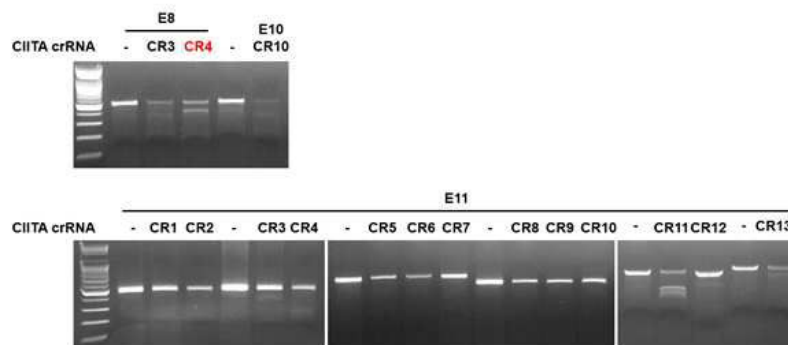
도면2



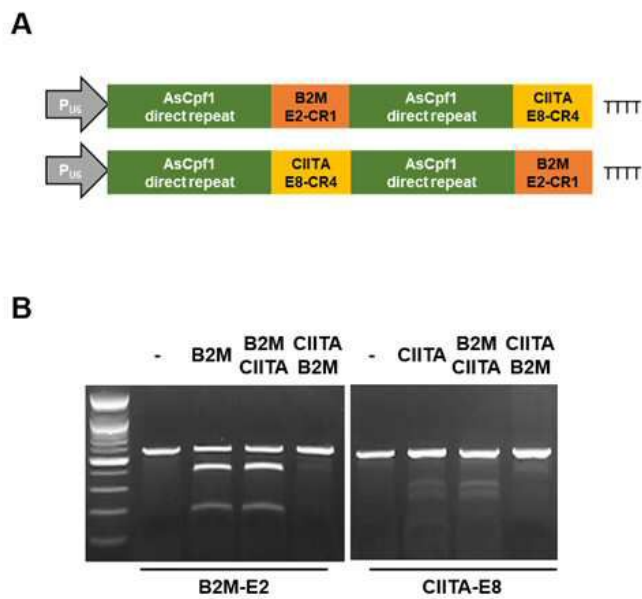
도면3



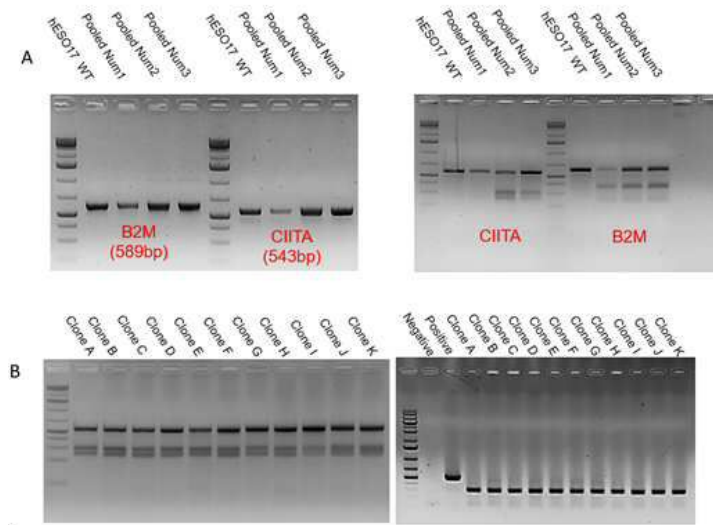
도면4



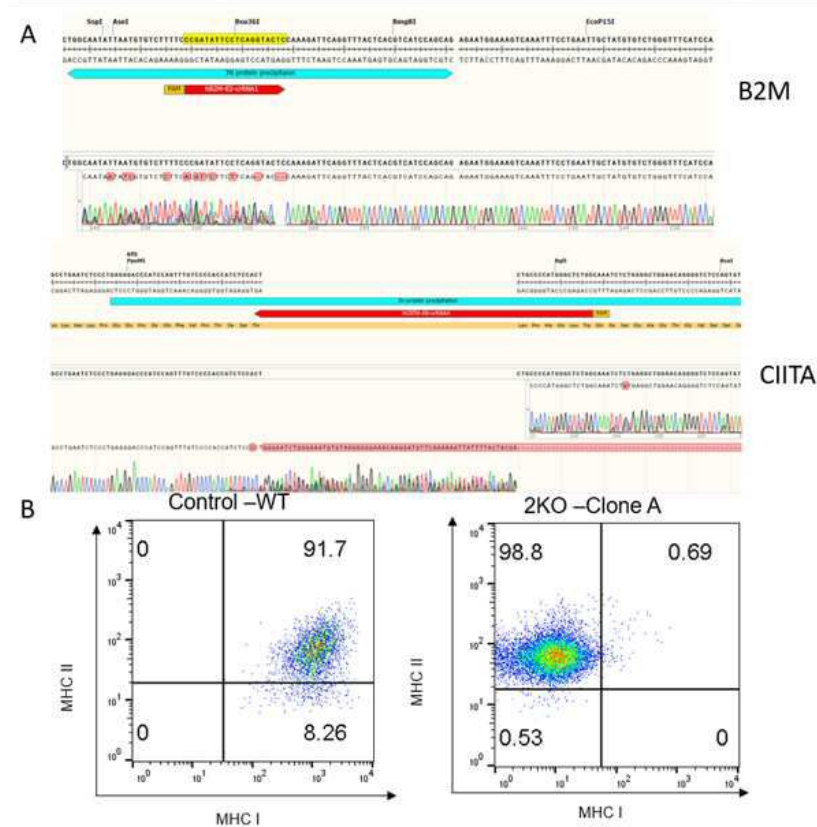
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> COMPOSITION FOR MANUFACTURING HYPO-IMMUNOGENIC PLURIPOTENT STEM CELL COMPRISING CRRNA ARRAY AND CPF1 AND USE THEREOF

<130> FPD/202203-0024/C

<150> KR 10-2021-0041875

<151> 2021-03-31

<160> 40

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB2M-E1-CR1

<400> 1

tggcctggag gctatccagc

20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB2M-E2-CR1

<400> 2

ccgatattcc tcaggtactc

20

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB2M-E2-CR2

<400> 3

ctcacgtcat ccagcagaga

20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB2M-E2-CR3

<400> 4

cattctctgc tggatgacgt

20

<210> 5

<211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E3-CR1
 <400> 5
 ctcccagaac ccgacacaga 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E4-CR1
 <400> 6
 cttgtctggg cagcggaact 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E5-CR1
 <400> 7
 tgcccaactt ctgctggcat 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E5-CR2
 <400> 8
 tgacttttct gcccaacttc 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E5-CR3
 <400> 9
 tcaaagtaga gcacatagga 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E6-CR1
 <400> 10
 tctgcagcct tcccagagga 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-CR1
 <400> 11
 tctcttgcag tgcctttctc 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-CR2
 <400> 12
 tccccacat ctccactctg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-CR3
 <400> 13
 tccagttcct cgttgagctg 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-CR4

<400>	14	
ccagagccca tggggcagag		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCIITA-E10-CR1	
<400>	15	
gaagcttggt ggagacctct		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCIITA-E11-CR1	
<400>	16	
cagagccggt ggagcagttc		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCIITA-E11-CR2	
<400>	17	
cccagcacag caatcactcg		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCIITA-E11-CR3	
<400>	18	
tcttctctgt cccctgcat		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCIITA-E11-CR4

<400> 19

agccacatct tgaagagacc

20

<210> 20

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCIITA-E11-CR5

<400> 20

cagaagaagc tgctccgagg

20

<210> 21

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCIITA-E11-CR6

<400> 21

agctgtccgg cttctccatg

20

<210> 22

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCIITA-E11-CR7

<400> 22

agagctcagg gatgacagag

20

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCIITA-E11-CR8

<400> 23

tgccgggcag tgtgccagct

20

<210> 24

<211> 20

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E11-CR9
 <400> 24

atgtctgcgg cccagctccc 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E11-CR10
 <400> 25

gccatcgccc aggtcctcac 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E11-CR11
 <400> 26

gccactcaga gccagccaca 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E11-CR12
 <400> 27

tggtgggct gatcttcag 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E11-CR13
 <400> 28

gcagcacgtg gtacaggagc 20

<210> 29
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B2M-CIITA_F_1
 <400> 29
 agatccgata ttctcaggt actcaatttc tactcttgta gattctgcag cttccaga 60

 gga 63
 <210> 30
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B2M-CIITA_R_1
 <400> 30
 aaaatcctct gggaaggctg cagaatttc aagagtagaa attgagtacc tgaggaatat 60
 cgg 63
 <210> 31
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CIITA-B2M_F_1
 <400> 31
 agattctgca gcctccag aggaaatttc tactcttgta gatccgatat tctcaggta 60

 ctc 63
 <210> 32
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CIITA-B2M_R_1
 <400> 32
 aaaagagtac ctgaggaata tcggatctac aagagtagaa attcctctg ggaaggctgc 60
 aga 63
 <210> 33

<211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B2M-CIITA_F_2
 <400> 33
 agatccgata ttcttcaggt actcaatttc tactcttgta gatccagagc ccatggggca 60

 gag 63
 <210> 34
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B2M-CIITA_R_2
 <400> 34
 aaaactctgc cccatgggct ctggatctac aagagtagaa attgagtacc tgaggaatat 60
 cgg 63
 <210> 35
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CIITA-B2M_F_2
 <400> 35
 agatccagag cccatggggc agagaatttc tactcttgta gatccgatat tcctcaggta 60

 ctc 63
 <210> 36
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CIITA-B2M_R_2
 <400> 36
 aaaagagtac ctgaggaata tcggatctac aagagtagaa attctctgcc ccatgggctc 60
 tgg 63
 <210> 37
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hB2M-E2-F1
 <400> 37
 gctatgagtg ctgagagggc 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hB2M-E2-R2
 <400> 38
 cacggcaggc atactcatct 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-F2
 <400> 39
 caactgctct gctaggtgct 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCIITA-E8-R1
 <400> 40
 gaaggccaca caaccactct 20