(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0076398
(43) 공개일자 2023년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2021-0163275
(22) 출원일자 2021년11월24일
심사청구일자 2022년10월12일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김헌식
서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 201동 501호(구의동, 구의현대2단지아파트)
이은비
서울특별시 강동구 올림픽로62길 23-16, 큰나무집 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

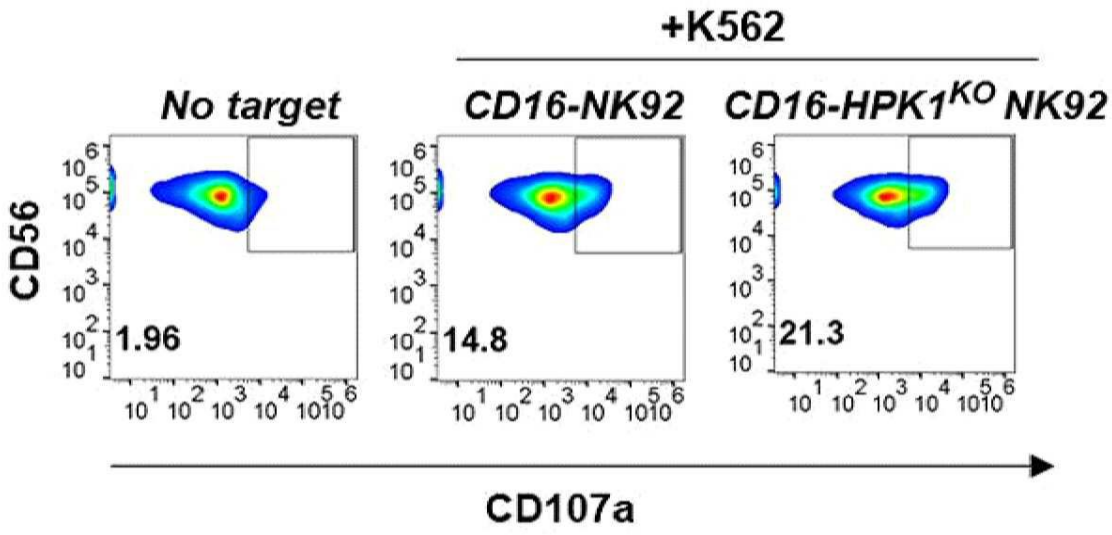
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법**

(57) 요 약

본 발명은 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법 등에 관한 것이다. 본 발명의 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법이 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 항암 효과가 우수할 뿐만 아니라, 생체 내 B16F10 암세포에 대한 항암 효과가 우수한 것을 확인하였고, 본 발명의 방법으로 사람 유래 NK92 세포주에서 세포 독성 탈 과립화 및 CD16 매개 탈과립화가 증가하는 것을 확인하였는 바, 본 발명을 CAR-NK, 면역관문억제제 등에 적용해서 항암효과를 극대화 시킬 수 있고, 여러 난치성 암 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Y 207/11001 (2013.01)
(72) 발명자
김효정
서울특별시 송파구 강동대로7길 21, 303호(카멜리아빌)
김정민
경기도 안성시 공도읍 공도로 150, 111동702호(케이씨씨스위첸)

명 세 서

청구범위

청구항 1

NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 녹아웃은 NK세포에 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 포함하는 RNP 혼합물을 넣는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, NK세포 항암 활성증진 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 하기의 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는, NK세포 항암 활성증진 방법:

(a) 세포독성 활성 증가;

(b) 탈과립화 활성 증가; 및

(c) CD16 수용체 매개 탈과립화 활성 증가.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 CD107a의 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는, NK세포 항암 활성증진 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 가이드 RNA는 서열번호 2, 3, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 4 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA; 또는

서열번호 5, 7, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는, NK세포 항암 활성증진 방법.

청구항 6

NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부의 녹아웃을 위한 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 유효성분으로 포함하는, NK세포 항암 활성증진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 가이드 RNA는 서열번호 2, 3, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 4 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA; 또는

서열번호 5, 7, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는, NK세포 항암 활성증진용 조성물.

청구항 8

제6항의 조성물을 포함하는, NK세포 항암 활성증진 키트.

청구항 9

NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 암은 비만세포종, 흑색종, 및 림프종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] NK세포는 암세포에 대한 생체 내 면역감시에 중요한 역할을 하며 특정 암항원을 표적하는 T세포와 달리 다양한 암세포를 인지하여 즉각적으로 제거하는 특성을 가지고 있다. 또한, NK세포는 T세포와 달리 자가 및 동종세포 치료가 가능하여 제조 프로세스를 간소화할 수 있으며, 동결 보존하여 환자가 필요할 때 즉시 사용할 수 있다. 또한, NK세포를 활용한 치료제는 이식편대숙주병(GvHD) 또는 사이토카인 폭풍 증후군과 같이 위험하고 잠재적으로 생명을 위협하는 반응의 위험이 상대적으로 적다. 또한, NK세포는 특정 암 항원보다는 다양한 활성화수용체를 통하여 암을 인지한다. 이러한 장점으로 NK세포는 암 면역세포치료제 또는 면역항암제 분야에서 상당한 주목을 받아왔으며, 현재 NK세포를 기반으로한 난치성 암에 대한 세포치료제의 개발 및 엔지니어링을 위한 많은 노력이 진행되고 있다.

[0004] 조혈 전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)은 세린/트레오닌 키나제의 MAP4K

계열이다. 이는 주로 T세포, B세포, 수지상 세포에 높게 발현하여 면역반응의 음성 조절자 역할을 한다. 특히, T세포 증식과 신호전달, 수지상 세포의 활성을 조절한다고 알려져있다. 그러나, NK세포에서의 역할은 잘 알려져 있지 않다.

[0005] CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 시스템은 대부분 바이러스 같은 외부 침입자에 대한 저항성을 제공하는 원핵 생물, 고세균의 면역 시스템으로서, 보통 타입 I, 타입 II, 타입 III 등으로 분류된다. CRISPR/Cas9 시스템은 이를 구성하는 Cas9 및 가이드 RNA에 의하여 타겟 DNA 상에 이중가닥절단(double-strand break, DSB)을 생성시키고, 세포는 이를 손상부위로 인식하여 비상동적 말단접합(non-homologous end joining, NHEJ) 또는 상동성 기반수복(homology-directed repair, HDR)에 의한 통상적인 DNA repair 과정을 유도한다. 이 과정에서 변이 또는 유전자 교체에 의한 정상화가 가능하기 때문에, 이를 활용하여 게놈 편집을 유도할 수 있다.

[0006] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 생쥐와 인간 NK 세포주에서 NK세포의 HPK1 유전자를 CRISPR/Cas9 시스템을 통해 녹아웃시켜 항암 효과가 우수한 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-1168789호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 항암 효과가 우수할 뿐만 아니라, 생체 내 B16F10 암세포에 대한 항암 효과가 우수한 것을 확인하였고, 본 발명의 방법으로 사람 유래 NK92 세포주에서 세포 독성 탈과립화 및 CD16 매개 탈과립화가 증가하는 것을 실험적으로 입증하여, 여러 난치성 암 예방 및 치료 효과를 확인한 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에 본 발명의 목적은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부의 녹아웃을 위한 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 유효성분으로 포함하는, NK세포 항암 활성증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 조성물을 포함하는, NK세포 항암 활성증진 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공하는 것이다.

[0015] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic

progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부의 녹아웃을 위한 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 유효성분으로 포함하는, NK세포 항암 활성증진용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는, NK세포 항암 활성증진 키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에서 상기 녹아웃은 NK세포에 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 포함하는 RNP 혼합물을 넣는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 하기의 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0024] (a) 세포독성 활성 증가;

[0025] (b) 탈과립화 활성 증가; 및

[0026] (c) CD16 수용체 매개 탈과립화 활성 증가.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 CD107a의 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 가이드 RNA는 서열번호 2, 3, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 4 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA; 또는 서열번호 5, 7, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 암은 비만세포종, 흑색종, 및 림프종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법이 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 항암 효과가 우수할 뿐만 아니라, 생체 내 B16F10 암세포에 대한 항암 효과가 우수한 것을 확인하였고, 본 발명의 방법으로 사람 유래 NK92 세포주에서 세포 독성 탈과립화 및 CD16 매개 탈과립화가 증가하는 것을 확인하였는 바, 본 발명을 CAR-NK, 면역관문억제제 등에 적용해서 항암효과를 극대화 시킬 수 있고, 여러 난치성 암 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 생쥐 유래 HPK1 유전자를 나타낸 것이다.

도 2는 야생형과 HPK1 녹아웃 생쥐의 비장 내 NK 세포($NK1.1^{+}$ $CD3\varepsilon^{-}$)에서 HPK1 발현을 유동세포계측기로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3는 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 NK세포의 세포독성(Cytotoxicity) 활성을 유동세포계측기로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 생체 내 B16F10 암세포에 대한 NK세포의 세포독성 활성을 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 사람 유래 HPK1 유전자를 나타낸 것이다.

도 6은 CD16 과발현 사람 유래 NK92 세포주에서 가이드 RNA #3, 및 #4를 이용한 HPK1 발현을 FACS 염색을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 야생형 NK92 세포주와 HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 탈과립화 활성을 확인하기 위해, CD107a의 발현량을 유동세포계측기로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 야생형 NK92 세포주와 HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 CD16 수용체 매개 탈과립화 활성을 확인하기 위해, CD107a의 발현량을 유동세포계측기로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 세포독성(Cytotoxicity) 활성을 유동세포계측기로 분석하여, HPK1 녹아웃 NK세포의 항암효과가 야생형 NK세포보다 우수하다는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0035] 본 발명의 다른 실시예에서는 생쥐 모델에서 B16F10 암세포에 대한 NK 세포독성 활성을 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System으로 분석하여, 야생형에 비하여 HPK1 녹아웃 생쥐에서 루시퍼라제 강도가 감소한 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0036] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 야생형 NK92와 HPK1 녹아웃 NK92 세포주에서 CD107a의 발현을 유동세포계측기로 분석하여, HPK1 녹아웃 NK92 세포의 세포독성 탈 과립화가 증가한 것을 확인하였다(실시예 6 참조).

[0037] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 야생형 NK92와 HPK1 녹아웃 NK92 세포주에서 CD107a의 발현을 유동세포계측기로 분석하여, HPK1 녹아웃 NK92 세포의 CD16 매개 탈과립화가 증가한 것을 확인하였다(실시예 7 참조).

[0038] 따라서 본 발명의 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법은 암세포에 대한 항암 효과가 우수한 바, 여러 난치성 암의 예방 및 치료에 사용 가능할 것으로 기대된다.

[0040] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0042] 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명에 있어서, "NK세포" 또는 "자연살해세포(Natural Killer cells)"는 선천성 면역을 담당하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구(large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고, 림프계 전구세포(common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성한다. 상기 NK세포는 임의의 조직 공급원(source)으로부터 유래된 추가적인 변형이 없는 자연살해세포를 포함하고, 성숙한 자연살해세포뿐만 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 NK세포는 다양한 활성화 수용체 조합을 통해 강력히 활성화되는 고유의 특성이 있으며, 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화될 수 있다. 자연살해세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 지라, 간 등으로부터의 조혈세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다.

[0044] 본 발명에서, 상기 "조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)"은 세린/트레오닌 키나제의 MAP4K 계열이다. 이는 주로 T세포, B세포, 수지상 세포에 높게 발현하여 면역반응의 음성 조절자 역할을 한다. 구체적으로, T세포 증식과 신호전달, 수지상 세포의 활성을 조절한다. 본 발명의 방법으로 상기 HPK1 유전자를 녹아웃시켜 NK세포의 항암 활성을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에서, 상기 "녹아웃(knockout)"은 유전자의 전부 또는 일부의 결실, 치환, 또는 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입에 의한 유전자 활성 조절을 의미한다. 또한, 상기 녹아웃은 CRISPR-Cas9 시스템을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에서, 상기 "CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9(CRISPR-

associated protein 9) 시스템"은 원핵생물에 존재하는 일종의 면역 시스템이자 유전자 교정 수단으로, 외부 침입 DNA를 빠르게 인지하여 절단한다. 크리스퍼(CRISPR)는 20-50bp의 반복 염기 서열이 연속적으로 배치된 구조를 의미한다. 상기 CRISPR-Cas9 시스템의 각 반복 서열의 쌍은 고유 서열을 가진 삽입 서열(spacer)에 의해 분리되어 있고, 상기 삽입 서열들은 박테리오파지 유전체 일부와 유사하며, 이로부터 만들어진 RNA는 가이드 RNA(guide RNA)가 되어 침입한 파지 DNA에 결합한 뒤, Cas9 단백질(카스 핵산 내부 가수 분해 효소)이 파지 DNA를 절단한다. 이러한 원리를 이용하여 배아, 세포 등에 유전자를 삽입 또는 제거할 수 있다. 상기 Cas9은 원핵생물의 면역 체계 구성 성분인 바, 진핵세포에서의 유전자 제거(gene knockout)는 Cas9 효소를 발현하는 세포주를 만든 후, 가이드 RNA를 형질 주입(transfection)하거나, Cas9과 가이드 RNA를 동시에 세포 내에 형질 주입하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명에서 상기 녹아웃은 NK세포에 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 포함하는 RNP 혼합물을 넣는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에서, 상기 녹아웃은 NK세포를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 배양은 MEM-α 배지에서 이루어질 수 있고, 상기 RNP 혼합물은 인핸서를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 녹아웃에 용액 R을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 혼합물을 넣는 방법은 제한되지 않으나, 일 실시예에서는 전기천공을 사용하였다.

[0049] 본 발명에서, 상기 MEM-α 배지는 20% FBS(Gibco), 1% 비타민 용액(vitamin solution, Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 0.1mM의 2-메르캅토 에탄올(2-Mercaptoethanol, Gibco), 및 200 Unit/mL의 IL-2(Roche)로 보충할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 Cas 단백질을 타케팅 도메인으로 유도하는 RNA를 의미한다. 본 발명에서, 타케팅 도메인은 가이드 RNA가 상보적으로 결합하는 영역을 의미하며, 상기 상보적 결합은 완전한 상보성이거나, 혼성화를 야기하여 CRISPR-Cas9 시스템이 작동할 수 있는 정도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 2, 3, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 4 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA; 또는 서열번호 5, 7, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 세 영역을 포함한다. 구체적으로, 염색체 서열 내에 표적 부위에 상보적인 5' 단부의 첫 번째 영역; 줄기 루프 구조를 형성하는 두 번째 영역; 및 본질적으로 단일 가닥으로 남아있는 3' 단부의 세 번째 영역이다. 상기 첫 번째 영역은 가이드 RNA가 Cas 단백질을 타케팅 도메인으로 유도하기 위한 것으로, 가이드 RNA 마다 상이하며, 두 번째와 세 번째 영역은 모든 가이드 RNA에서 동일할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에서, 가이드 RNA의 첫 번째 영역은 가이드 RNA의 첫 번째 영역이 타케팅 도메인과 염기쌍을 이룰 수 있도록, 염색체 서열 내에 타케팅 도메인 서열에 상보적이다. 상기 첫 번째 영역은 약 10 내지 25개, 또는 25개보다 많은 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 20개이나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명에서, 가이드 RNA의 두 번째 영역은 헤어핀, 루프 등의 이차구조를 포함한다. 루프는 길이에서 약 3 내지 약 10개 뉴클레오티드 범위에서 변할 수 있으며, 줄기는 길이에서 약 6 내지 약 20개 뉴클레오티드 범위에서 변할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 두 번째 영역의 전반적인 길이는 약 16 내지 약 60개 뉴클레오타이드 범위에서 변할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명에서, 가이드 RNA의 세 번째 영역은 NK 세포 내에 임의의 염색체 서열에 대한 상보성을 갖지 않고, 가이드 RNA의 나머지 부분에 대해 상보성을 갖지 않는다. 세 번째 영역의 길이는 길이에서 약 5 내지 약 60개 뉴클레오타이드 범위에서 변할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 본 발명에서, 상기 타케팅 도메인은 HPK1 유전자의 엑손 1, 3 또는 4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 HPK1 유전자의 엑손 1은 서열번호 6으로, 상기 HPK1 유전자의 엑손 3은 서열번호 4로, 상기 HPK1 유전자의 엑손 4는 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 본 발명에서, 상기 HPK1 유전자의 엑손 4 영역은 생쥐 유래 HPK1 유전자의 엑손 4 영역일 수 있으며, HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역은 사람 유래 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 50 내지 1000pmoles, 100 내지 1000pmoles, 200 내지 1000pmoles, 300 내지 1000pmoles, 400 내지 1000pmoles, 50 내지 900pmoles, 100 내지 900pmoles, 200 내지 900pmoles, 300 내지 900pmoles, 400 내지 900pmoles, 50 내지 800pmoles, 100 내지 800pmoles, 200 내지 800pmoles, 300 내지 800pmoles, 400 내지 800pmoles, 50 내지 700pmoles, 100 내지 700pmoles, 200 내지 700pmoles, 300 내지 700pmoles, 400 내지 700pmoles, 50 내지 600pmoles, 100 내지 600pmoles, 200 내지 600pmoles, 300 내지 600pmoles, 또는 400 내지 600pmoles로 상기 RNP 혼합물에 포함될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 500pmoles로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명에서, 상기 Cas 단백질은 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 그의 상동체, 또는 그의 변형된 버전일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 Cas 9일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명에서, 상기 NK세포는 용액 R 100㎕ 당 1×10^6 내지 1×10^7 개, 1×10^6 내지 9×10^6 개, 1×10^6 내지 8×10^6 개, 1×10^6 내지 7×10^6 개, 1×10^6 내지 6×10^6 개, 1×10^6 내지 5×10^6 개, 1×10^6 내지 4×10^6 개, 1×10^6 내지 3×10^6 개, 1×10^6 내지 2×10^6 개, 또는 약 1.2×10^6 개로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명에서, 상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 하기의 특징 중 하나 이상을 만족할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0062] (a) 세포독성 활성 증가;

[0063] (b) 탈과립화 활성 증가;

[0064] (c) CD16 수용체 매개 탈과립화 활성 증가.

[0065] 본 발명에서, 상기 방법에 의해 활성화된 NK세포는 CD107a의 발현이 증가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부의 녹아웃을 위한 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 유효성분으로 포함하는, NK세포 항암 활성증진용 조성물을 제공한다.

[0068] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 2, 3, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 4 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA; 또는 서열번호 5, 7, 또는 이의 상보서열을 포함하며 HPK1 유전자의 엑손 1 또는 3 영역에 상보적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 가이드 RNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, NK세포 활성증진 키트를 제공한다.

[0070] 본 발명에서, 상기 키트는 (a) NK세포를 배양; (b) 가이드 RNA, 및 Cas 단백질을 포함하는 RNP 혼합물을 제조; (c) 상기 NK세포에 RNP 혼합물을 넣을 것이 기재된 지시서를 포함하는 NK세포 항암 활성증진 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0073] 본 발명은 NK세포의 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1)의 전부 또는 일부를 녹아웃 시키는 단계를 포함하는, NK세포 항암 활성증진 방법에 의해 활성화된 NK세포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[0074] 본 발명에서, "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 발명에서, 상기 암의 종류에는 제한이 없으며, 비만세포종, 흑색종, 림프종, 갑상선암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암,

혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 직장암, 대장암, 골암, 구강암, 인두암, 후두암, 및 결장암 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 발명에서, "세포치료제"는 조직의 기능을 복원하기 위하여 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 이용한 치료제로, 암의 억제를 위해 사용되는 치료제를 의미한다.

[0076] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0079] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0080] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용

될 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0087] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0088] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0090] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0091] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0092] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0093] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0094] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0095] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0097] **[실시예]**

[0098] **실시예 1. 녹아웃 생쥐 제작**

[0099] 생쥐 유래 유전자 엑손 4(Exon 4)를 표적으로하는 가이드 RNA(#1, #2)와 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 C57BL6/N 유래 수정란에 전기천공(electroporation) 한 뒤, ICR 대리모에 착상시켜 조혈전구 인산화효소 1(HPK1; Hematopoietic progenitor kinase 1) 이형접합체(heterozygote)들을 얻었다. 생식선 전이(Germline transmission)가 확인된 개체를 선택하고 이형접합체 교배(heterozygote mating)하여, HPK1 녹아웃 개체를 얻었다. 생쥐 유래 HPK1 유전자를 도 1에 나타내었다. 또한, 실시예 1에 사용한 엑손 4, 가이드 RNA(#1, #2) 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0101]

서열 1. Accession Number: NC_000073	5'-3'	서열번호
Exon 4	ATGATGACGTCGCCACCCTTCAGAAGGAGATTCTCATGCTGAAAACTTGCCGGCACGCCAACATCGTGGCTTACCATGGCAGTTACCTCTG	1
Guide RNA #1	CCCTTCAGAAGGAGATTCTC	2
Guide RNA #2	GCACGCCAACATCGTGGCTT	3

[0103] **실시예 2. 비장 내 NK세포에서 HPK1 발현 확인**

[0104] 야생형과 HPK1 녹아웃 생쥐의 비장 내 NK 세포($NK1.1^+$ $CD3\varepsilon^-$)에서 HPK1 발현 패턴을 확인하였다. 구체적으로, 야생형 생쥐와 HPK1 녹아웃 생쥐의 비장을 단일세포로 분리한 뒤, 동량의 세포를 분석하였다. FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 완충액으로 Fc 수용체를 Rat Anti-Mouse CD16/CD32(BD Bioscience, 2.4G2)로 4℃에서 15분간 인큐베이션 한 후, CD3ε-PerCP(BD Bioscience, 145-2C11)와 NK1.1-PE(BD Bioscience, PK136)로 4℃ 암실에서 60분간 인큐베이션 하였다. FACS 완충액으로 2회 세척 후, Fix/Perm 버퍼(BD Bioscience)로 4℃ 암실에서 20분 인큐베이션 한 후, Perm/Wash 버퍼(BD Bioscience)를 보충하여 2회 세척하였다. Perm/Wash 버퍼에 희석된 5% Normal goat serum(Thermo)을 넣어 4℃ 암실에서 20분 인큐베이션 한 후, 1:100으로 희석된 HPK1 항체(Cell signaling) 또는 1:1000 희석된 Normal rabbit IgG(Cell signaling)로 4℃ 암실에서 12시간 이상 인큐베이션 하였다. Perm/Wash buffer로 2회 세척한 뒤, 1:500으로 희석된 Goat anti-Rabbit IgG-Alexa488(Jackson ImmunoResearch)로 4℃ 암실에서 60분간 인큐베이션 하였다. 그런 다음, Perm/Wash buffer로 2회 세척한 후, FACS 완충액에 담아 HPK1 발현을 유동세포계측기로 분석하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0105] 도 2에 나타난 바와 같이, 비장 내 NK세포에서 HPK1 발현량을 확인한 결과, 야생형 생쥐대비 HPK1 녹아웃 생쥐의 HPK1 발현이 관찰되지 않았다. 또한 야생형 생쥐의 비장 내 NK세포는 2.65% 정도이나, HPK1 녹아웃 생쥐의

비장 내 NK세포는 3.88%로 증가한 것으로 나타났다.

[0107] **실시예 3. 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 세포독성(Cytotoxicity) 활성 증가 확인**

[0108] 대표적인 NK세포의 타켓인 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 NK세포 항암효과를 확인하였다. 구체적으로, B16F10(CRL-6475)과 YAC-1(TIB-160) 암세포주는 ATCC에서 구매하였다. B16F10 세포주는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, Gibco)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 2 내지 3일간 배양하였다. YAC-1 세포주는 5% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 첨가된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium)에서 2 내지 3일간 배양하였다. B16F10 또는 YAC-1 세포들을 배양 용기에서 떼어내고 FBS 제거 배양액으로 2회 세척 후, 1μM의 원적색(Far red) 형광 시료(Invitrogen)로 상온 암실에서 20분간 염색하였다. 그 후, FBS 첨가 배양액으로 2회 세척 후, 단일세포로 분리된 야생형 또는 HPK1 녹아웃 생쥐의 비장세포와 1:100의 비율로 96-웰 V bottom 플레이트에서 4시간 배양하였다. 이 후 세포들은 DBPS(Disinfection by-products)로 2회 세척되었고, Live/Dead Fixable Green Cell Stain Kit(Invitrogen)로 상온 암실에서 30분간 염색하였다. 그 후, FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 유동세포계측기로 분석하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0109] 도 3에 나타난 바와 같이, 야생형 생쥐보다 HPK1 녹아웃 생쥐에서 암세포주의 사멸을 나타내는 Live/dead 염색 강도가 증가하였다. 이는 HPK1 녹아웃 NK세포의 항암효과가 야생형 NK세포보다 우수하다는 것을 의미한다.

[0111] **실시예 4. 생체 내 B16F10 암세포에 대한 NK 세포독성 활성 확인**

[0112] 루시퍼라제(Luciferase) 유전자가 삽입된 B16F10(Imanis Life science, CL052) 암세포 $5x10^5$개를 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 준비하였다. 야생형 생쥐와 HPK1 녹아웃 생쥐의 꼬리에 B16F10 암세포를 정맥주사한 뒤, 6일, 12일 뒤에 암세포의 크기를 관찰하였다. 암세포의 크기를 측정하기 위하여 DBPS에 녹인 3mg의 루시페린(luciferin, Promega)을 복강 주사하고, 10분 뒤 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System(PerkinElmer)로 분석하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0113] 도 4에 나타난 바와 같이, 야생형에 비하여 HPK1 녹아웃 생쥐에서 암세포주의 루시퍼라제 강도가 감소한 것을 확인하였다. 이는 HPK1이 NK세포의 항암활성에 음성피드백을 주며, NK세포의 HPK1 발현 조절이 NK세포 매개 항암효과를 증진시킬 수 있는 새로운 인자임을 시사한다.

[0115] **실시예 5. HPK1 녹아웃 NK92 세포주 제작 및 HPK1 발현 확인**

[0116] CD16 과발현 사람 유래 NK92 세포주(PTA-6967)는 ATCC에서 구매하였다. 그 후, 20% FBS(Gibco), 1% 비타민 용액(vitamin solution, Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 0.1mM의 2-메르캅토 에탄올(2-Mercaptoethanol, Gibco), 200 Unit/mL의 IL-2(Roche)가 보충된 MEM-α 배지(Gibco)에서 배양하였다. 사람 유래 HPK1 유전자 엑손 1 및 3을 표적으로 하는 500pmoles의 가이드 RNA(#3, #4), 104pmoles의 CRISPR/Cas9(SYNTHEGO), 및 100pmoles의 인핸서(Enhancer, SYNTHEGO)를 상온에서 10분간 인큐베이션하여 RNP(Ribonucleoprotein) 혼합물을 만들었다. $1.2x10^6$개의 NK92 세포주를 100㎕의 용액 R(Solution R, Lonza)에 풀고, 상기 RNP 혼합물을 첨가하여 전기천공(AMAXA, program A-024) 하였다. 72시간 후, HPK1 발현정도를 FACS 염색을 통하여 확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다. 사람 유래 HPK1 유전자를 도 5에 나타내었다. 또한, 실시예 5에 사용한 엑손 1 및 3, 가이드 RNA(#3, #4) 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

[0117] 도 6에 나타난 바와 같이, HPK1 유전자를 타겟으로 하는 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 HPK1 단백질이 상당량 감소하였는데, 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI) 기준으로 가이드 RNA #3의 경우 약 80%, 가이드 RNA #4의 경우 약 75% 감소하였다. 따라서, 상대적으로 효율이 더 좋은 가이드 RNA #3으로 녹아웃이 된 세포주를 대표로 사용하였다.

표 2

[0119]

서열 2. Accession Number: NC_000019	5'-3'	서열번호
Exon 3	ATGATGATGTCTCCACCCTTCAGAAGGAAATCCTCATATTGAAAACTTGCCGGCACGCCAACATCGTGGCCTACCATGGGAGTTATCTCTG	4
Guide RNA #3	AGGCCACGATGTTGGCGTGC	5
Exon 1	AGTTGAGCCCTGAGGCCCTGCTGGCCCCTGGGCGCAGGCCCAGCTCAGGCCCCCAGGGATGGACGTCGTGGACCCTGACATTTTCAATAGAGACCCCCGGGACCACTATGACCTGCTACAGCGGCTGGGTGGCGGCACGTATGGGGAAGTCTTTAAG	6
Guide RNA #4	GGGTCCACGACGTCCATCCC	7

[0121] **실시예 6. HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 탈과립화(degranulation) 활성 증가 효과 확인**

[0122] HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 탈과립화(degranulation) 활성은 CD107a의 발현량을 통해 확인하였다. 구체적으로, K562 표적세포주는 10% FBS(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)에서 2 내지 3일간 배양하였다. NK92 세포주는 IL-2가 없는 배지에서 18시간 동안 휴면을 시킨 후, K562 세포주와 1:1 비율로 96-웰 V bottom 플레이트에 항 CD107a-FITC(BD Bioscience, H4A3) 항체와 6 ㎍/mL의 모네신(monensin, Sigma Aldrich)이 첨가된 배지에서 2시간 배양하였다. 이 후 세포의 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다중클론항체(Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody, Invitrogen)로 4℃에서 15분간 인큐베이션하고, 세포 표면 마커를 CD56-PE(BD Bioscience, NCAM16.2)로 4℃ 암실에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 후, FACS 완충액으로 세포를 2회 세척하고 유동세포계측기로 탈과립화 활성을 분석하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0123] 도 7에 나타난 바와 같이, K562 세포에 대한 항암능력을 비교하기 위하여 야생형 NK92와 HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 탈과립화 활성을 분석한 결과, 야생형 NK92 세포의 $CD107a^{+}$ cells은 14.8%, HPK1 녹아웃 NK92 세포에서는 21.3%로 나타났다. 이는 HPK1 녹아웃 NK92 세포의 세포독성 탈 과립화가 증가하였는 바, K562 세포에 대한 항암능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[0125] **실시예 7. HPK1 녹아웃 NK92 세포주의 CD16 매개 탈과립화(degranulation) 활성 증가 효과 확인**

[0126] P815 세포주는 10% FBS(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 IMDM 배지에서 2 내지 3일간 배양하였다. P815 세포에 10㎍/mL의 항 CD16 항체(BD bioscience, 3G8) 또는 IgG1 항체(Biolegend, MOPC-21)를 4℃에서 30분간 코팅하였다. IL-2가 없는 배지에서 18시간동안 휴면을 시킨 NK92 세포주와 1:1 비율로 96-웰 V bottom 플레이트에 항 CD107a-FITC(BD Bioscience, H4A3) 항체와 6㎍/mL의 모네신(Sigma Aldrich)이 첨가된 배지에서 2시간 배양하였다. 이 후, 세포의 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다중클론항체(Invitrogen)로 4℃에서 15분간 인큐베이션하고, 세포 표면 마커를 PE-CD56(BD Bioscience, NCAM16.2)로 4℃ 암실에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 후, FACS 완충액으로 세포를 2회 세척하고, CD16 수용체 매개 탈과립화 활성을 유동세포계측기로 분석하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0127] 도 8에 나타난 바와 같이, CD16 수용체 매개 탈화립화 활성을 측정하기 위하여 항 CD16 항체가 코팅된 P815 세포에 대한 탈과립화 활성을 측정한 결과, 야생형 NK92 세포주의 $CD107a^{+}$ cells은 9.13%, HPK1 녹아웃 NK92 세포에서는 21.0%로 나타났다. 즉, HPK1 녹아웃 NK92 세포의 CD16 매개 탈과립화가 증가 하였다. 이는 마우스와 더불어 사람 유래 NK92 세포주뿐만 아니라 동종 또는 자가유래 인체 NK세포에도 본 발명이 적용 가능한 기술이라는 것을 의미하며, CAR-NK(Chimeric Antigen Receptor NK) 등 다양한 방식의 항암 치료에 적용가능함을 시사한다.

[0129] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 조혈전구 인산화효소 1 조절에 의한 NK세포 활성증진 방법이 시험관 내 B16F10 및 YAC-1 암세포에 대한 항암 효과가 우수할 뿐만 아니라, 생체 내 B16F10 암세포에 대한 항암 효과가 우수한 것을 확인하였고, 본 발명의 방법으로 사람 유래 NK92 세포주에서 세포 독성 탈 과립화 및 CD16 매개 탈

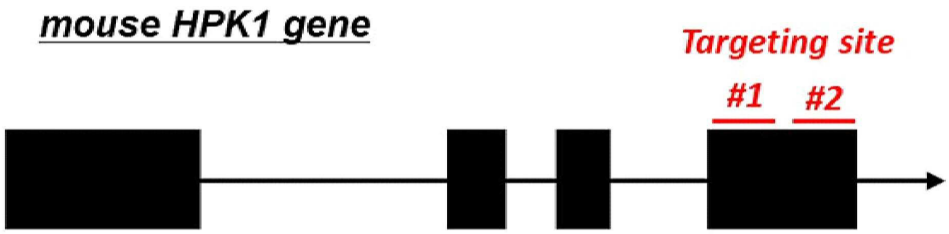
과립화가 증가하는 것을 확인하였는 바, 본 발명을 여러 난치성 암 예방 및 치료에 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0130]

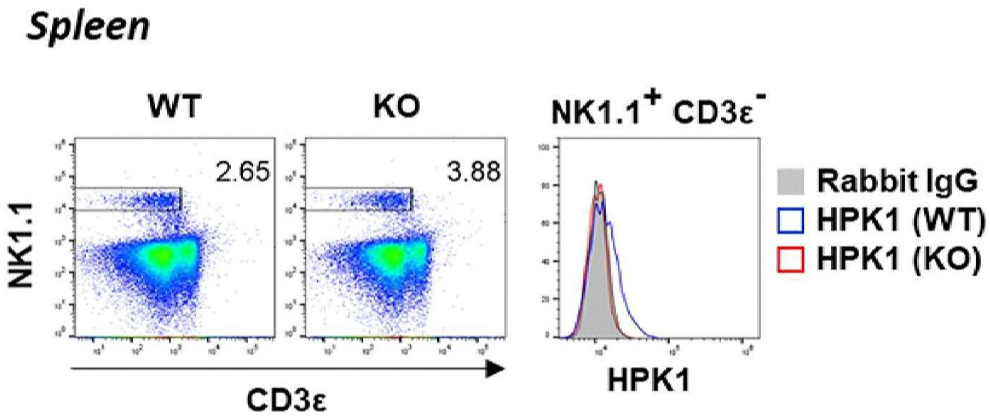
[0131] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

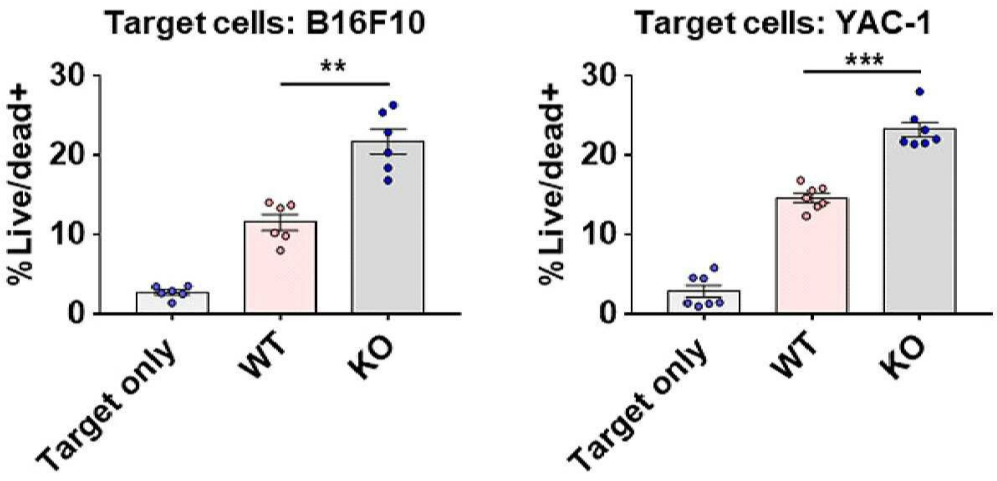
도면1



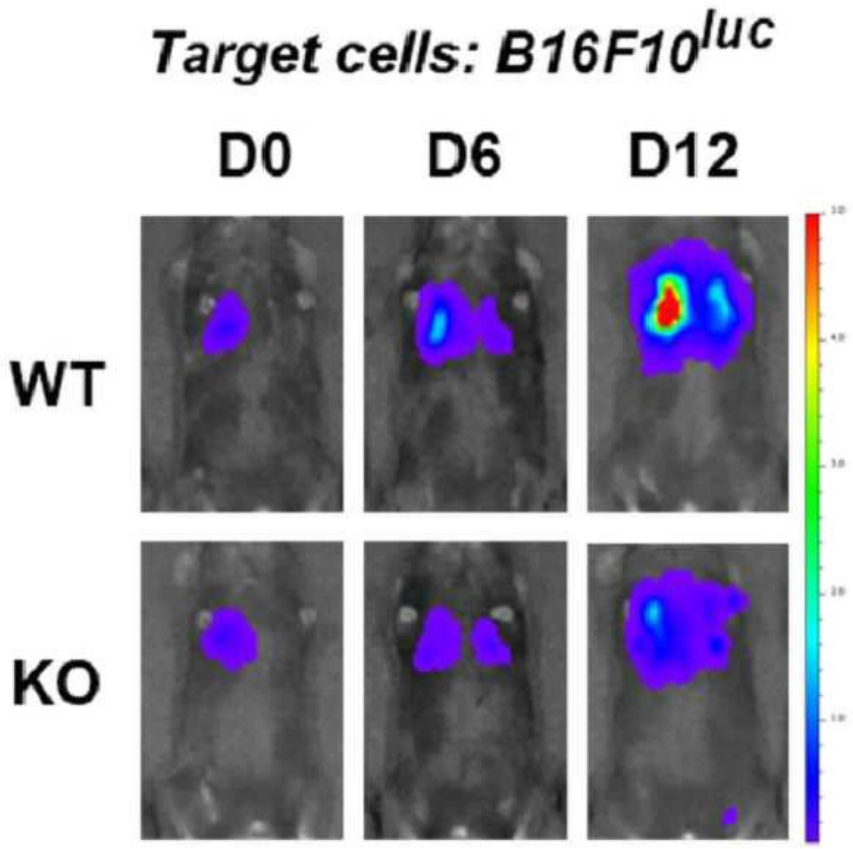
도면2



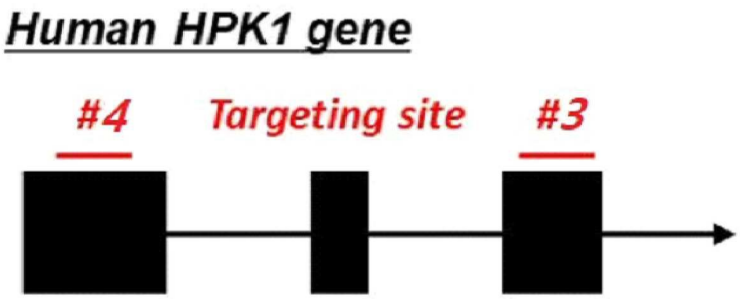
도면3



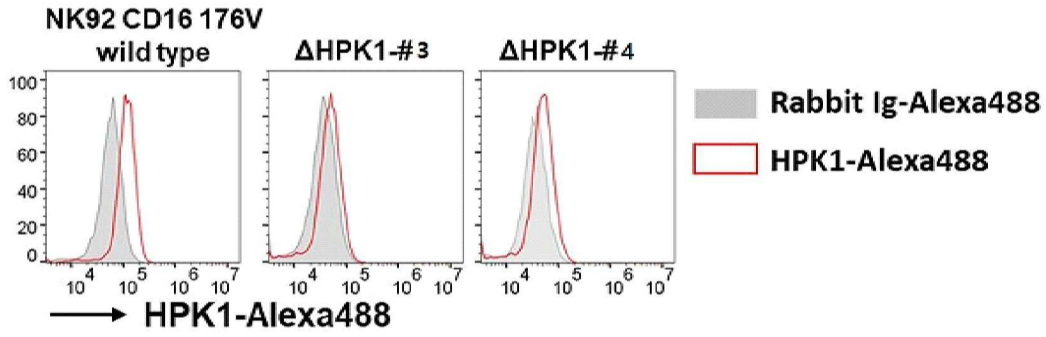
도면4


Target cells: B16F10luc
D0
D6
D12
WT
KO

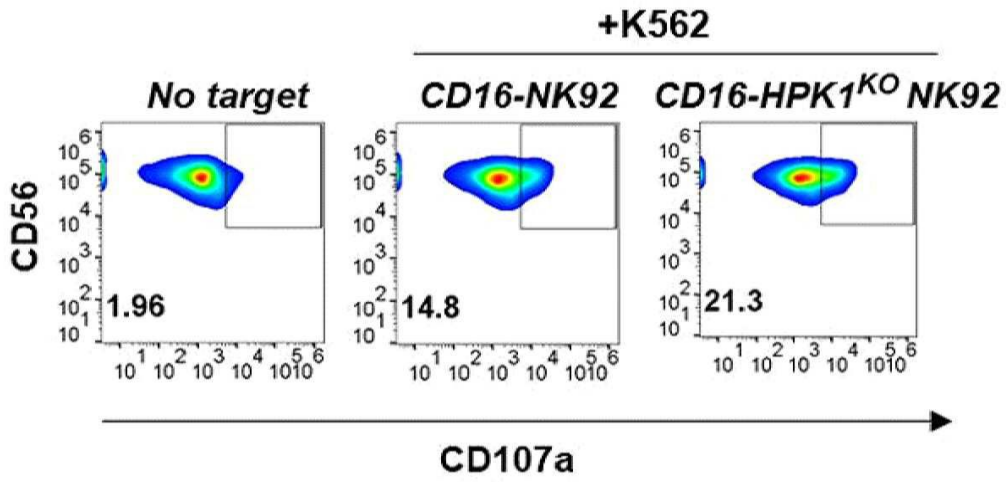
도면5


Human HPK1 gene
#4
Targeting site
#3

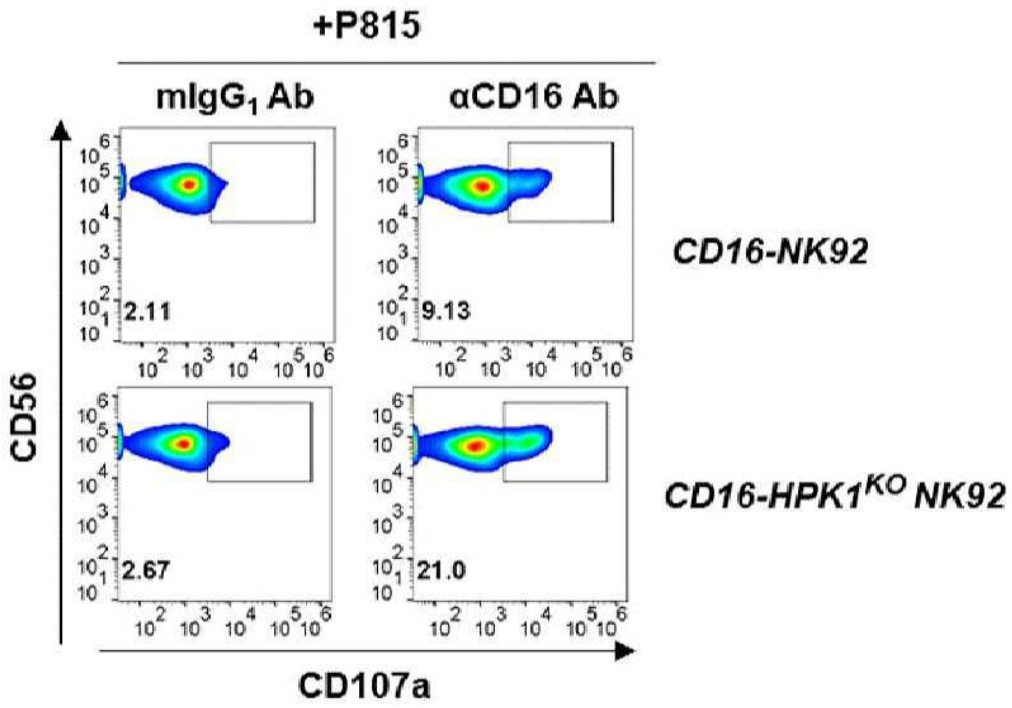
도면6


NK92 CD16 176V
wild type
ΔHPK1-#3
ΔHPK1-#4
Rabbit Ig-Alexa488
HPK1-Alexa488
HPK1-Alexa488

도면7


+K562
No target
CD16-NK92
CD16-HPK1KO NK92
CD56
1.96
14.8
21.3
CD107a

도면8



서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Method for enhancing activation of NK cells by regulation of

Hematopoietic progenitor kinase 1

<130> MP21-179

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon 4

<400> 1

atgatgacgt cgccaccctt cagaaggaga ttctcatgct gaaaacttgc cggcacgcca 60

acatcgtggc ttaccatggc agttacctct g 91

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Guide RNA #1

<400> 2

cccttcagaa ggagattctc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Guide RNA #2

<400> 3

gcacgccaac atcgtggctt 20

<210> 4

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon 3

<400> 4

atgatgatgt ctccaccctt cagaaggaaa tcctcatatt gaaaacttgc cggcacgcca 60

acatcgtggc ctaccatggg agttatctct g 91

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Guide RNA #3

<400> 5

aggccacgat gttggcgtgc 20

<210> 6

<211> 157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon 1

<400> 6

agttgagccc tgaggccctg ctggcccctg ggcgcaggcc cagctcaggc ccccagggat 60

ggacgtcgtg gaccctgaca ttttcaatag agacccccgg gaccactatg acctgctaca 120

gcggctgggt ggcggcacgt atggggaagt ctttaag 157

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Guide RNA #4

<400> 7

gggtccacga cgtccatccc 20