

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 11월 6일 (06.11.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/178485 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/007592
- (22) 국제출원일: 2013년 8월 23일 (23.08.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0047938 2013년 4월 30일 (30.04.2013) KR
- (71) 출원인: 건국대학교 산학협력단 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) [KR/KR]; 143-701 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김진희 (KIM, Jin Hoi); 143-859 서울시 광진구 능동로 18 이튼타워리버 3차 B-403, Seoul (KR). 권득남 (KWON, Deug Nam); 136-753 서울시 성북구 성북로 4길 52 한진아파트 209-1215, Seoul (KR). 박종이 (PARK, Jong Yi); 638-803 경상남도 고성군 고성읍 동외로 37-10 고려가야빌 101-503, Gyeongsangnam-do (KR). 이기호 (LEE, Ki Ho); 65201 미저리주 콜롬비아 S143 애니멀 사이언스 센터, 920 이스트 캠퍼스 드라이브, Missouri (US). 프래더랜달 (PRATHER, Randall S.); 65201 미저리주 콜롬비아 S143 애니멀 사이언스 센터, 920 이스트 캠퍼스 드라이브, Missouri (US). 김재환 (KIM, Jae Hwan); 156-726 서울시 동작구 상도로 107 쌍용스위트닷홈아파트 105-504, Seoul (KR). 강만중 (KANG, Man Jong); 500-752 광주시 북구 설죽로 320번길 25 삼익 1차아파트 1010-1202, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 특허법인 수 (SU INTELLECTUAL PROPERTY); 135-909 서울시 강남구 논현로 523 2층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: CMP-ACETYLNEURAMINIC ACID HYDROXYLASE TARGETING VECTOR, VECTOR-TRANSFECTED TRANSGENIC ANIMAL FOR XENOTRANSPLANTATION, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭 : CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터, 그 벡터가 도입된 이종간 이식용 형질전환 동물 및 그 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a CMP-acetylneuraminic acid hydroxylase targeting vector, a vector-transfected transgenic animal for xenotransplantation, and a method for producing the same.

(57) 요약서: 본 발명은 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터, 그 벡터가 도입된 이종간 이식용 형질전환 동물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

WO 2014/178485 A1

명세서

발명의 명칭: C M P -아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터, 그 벡터가 도입된 이종간 이식용 형질전환 동물 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터, 그 벡터가 도입된 이종간 이식용 형질전환 동물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 국립장기이식센터에 따르면 국내에서 한해 2만 여명에 달하는 환자들이 장기이식을 기다리고 있으나, 기증 건수는 수요의 10%에도 못 미치는 것으로 보고 되었다. 또한 미국의 경우 장기를 필요로 하는 대기자는 16분에 한명씩 추가 되고 있으나, 하루에 대기자 중 11명은 수술 받지 못하고 사망하는 실정이다. 이러한 상황과 더불어 생명과학기술의 발달은 이종 장기이식 기술개발의 배경이 된다.
- [3] 동물 유전학의 꾸준한 진보는 특정 유전자를 제거 또는 삽입함으로써 각 유전자의 역할 규명과 함께 상업적으로 유용한 형질전환 동물 생산을 가능케 하였다. 형질전환된 동물 제조를 위한 방법으로는 미세주입법 (microinjection) 또는 바이러스 감염법(viral infection)등을 이용한 무작위적인 유전자 조작법과 배아줄기세포(embryonic stem cells) 또는 체세포(somatic cells)를 이용하여 특정 유전자를 타겟팅 시킬 수 있는 유전자 적중법이 있다.
- [4] 미세주입법은 외래 DNA를 수정란의 전핵에 삽입하는 고전적인 방법으로 형질전환 동물을 생산하기 위해 널리 이용되어져 왔다(Harbers et al., Nature, 293(5833): 540-2, 1981; Hammer et al., Nature, 315(6021): 680-683, 1985; van Berkel et al., Nat. Biotechnol., 20(5): 484-487, 2002; Damak et al., Biotechnology(NY),14(2): 185-186, 1996). 그러나 미세주입법으로 외래 DNA가 삽입된 수정란 유래의 형질전환된 산자의 생산 비율은 2 내지 3 % 로 효율이 매우 낮으며(Clark et al., Transgenic Res., 9: 263-275, 2000), 외래 유전자의삽입 위치의 조절 및 특정 내부 유전자의 제거가 불가능하다.
- [5] 바이러스감염법 또한 동물의 유전자 조작을 위해 널리 사용된다(Soriano et al., Genes Dev., 1(4): 366-375, 1987; Hirata et al., Cloning Stem Cells, 6(1): 31-36, 2004). 바이러스 감염법은 삽입하고자 하는 유전자가 바이러스 벡터를 통하여 동물의 유전자로 도입되므로 미세주입법보다 좀더 효율적이거나, 여전히 특정 위치로의 외래 유전자의 삽입 및 특정 내부 유전자의 제거가 불가능하다. 또한, 삽입하고자 하는 유전자의 최대 사이즈는 7 kb로 제한되며, 바이러스에 의해 발현되는 단백질이 문제된다(Wei et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37: 119-141, 1997; Yanez et al., Gene Ther., 5(2): 149-159, 1998).

- [6] 위에서 언급한 문제점들 극복하기 위해서, 특정 유전자를 제거 또는 삽입할 수 있는 유전자 타겟팅 기술이 이용될 수 있다. 유전자 타겟팅 기술은 마우스 배아 줄기세포를 이용한 유전자 기능 연구에서 처음으로 사용되었다. 상동 재조합을 이용하여 특정 유전자가 타겟팅된 마우스 배아 줄기세포를 배반포 단계에 있는 배아에 삽입함으로써 결국 특정 유전자가 조작된 산자 생산이 가능하게 된다. 이러한 마우스 배아줄기세포에 유전자 타겟팅법을 이용하면서, 많은 수의 특정 유전자 타겟팅된 마우스가 생산되었다(Brandon et al., *Curr.Biol.*, 5(6): 625-634, 1995; Capecchi et al., *Science*, 244(4910): 1288-1292, 1989; Thompson et al., *Cell*, 56(2): 313-321, 1989; Hamanaka et al., *Hum. Mol. Genet.*, 9(3): 353-361, 2000; Thomas et al., *Cell*, 51(3): 503-512, 1987; te Riele et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(11): 5182-5187, 1992; Mansour et al., *Nature*, 336(6197): 348-352, 1988; Luo et al., *Oncogene*, 20(3): 320-328, 2001). 유전자타겟팅법이 가축에 적용될 때, 대량의 치료 단백질을 생산하는 동물생체 반응기(animal bioreactor) 또는 면역거부반응에 관여하는 유전자를 제거 또는 특정 위치에서의 과다발현에 의해 이종간 장기이식에 사용될 수 있는 질병 모델 동물 생산이 가능하며, 이는 산업적으로 큰 경제적인 이익을 가져올 것으로 예상되고 있다.
- [7] 유전자 타겟팅된 동물을 생산하기 위해서, 배아줄기세포의 사용이 필수적인 요소로 여겨져 왔다. 그러나 돼지와 소를 포함한 가축에서 배아줄기세포와 유사한 세포 주들이 보고 되었음에도 불구하고, 현재까지 가축에서 배아 줄기 세포의 사용은 제한된다(Doetschman et al., *Dev. Biol.*, 127(1): 224-227, 1988; Stice et al., *Biol. Reprod.*, 54(1): 100-110, 1996; Sukoyan et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 36(2): 148-158, 1993; Iannaccone et al., *Dev. Biol.*, 163(1): 288-292, 1994; Pain et al., *Development*, 122(8): 2339-2348, 1996; Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(17): 7844-7848, 1995; Wheeler et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6(5): 563-568, 1994). 대신에, 핵 공여 세포로서 일반 체세포가 유전자 타겟팅에 사용될 수 있다는 가능성이 제시되면서, 형질전환된 복제 가축 생산이 가능하게 되었다(Brophy et al., *Nat. Biotechnol.*, 21(2): 157-162, 2003; Cibelli et al., *Science*, 280(5367): 1256-1258, 1998; Campbell et al., *Nature*, 380(6569): 64-66, 1996; Akira Onishi et al., *Science*, 289:1188-1190, 2000 Denning et al., *Cloning StemCells*, 3(4): 221-231, 2001; McCreath et al., *Nature*, 405(6790): 1066-1069, 2000).
- [8] 한편, 이종 장기이식의 최적의 제공원으로는 장기의 크기 및 생리적 특징이 인간과 유사하고 다산성에 의해 장기의 대량 공급이 가능한 미니 돼지가 고려된다.
- [9] 돼지 장기의 성공적인 이식은 일련의 면역거부반응(초 급성, 급성 혈관성, 세포 매개성, 및 만성 면역거부반응)의 극복에 의존하다. 이식 후 수분 내에 발생하는 초 급성 면역거부반응은 알파-1,3-갈락토실 항원 결정기합성에 관여하는 유전자를 제거하고 인체 보체 조절 유전자를 과다발현 시킴으로써 극복될 수 있음이 보고되었다.

- [10] 구체적으로, 2002년 영국의 PPL사로부터 세계 최초로 알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라아제(alpha-1,3-galactosyltransferase, 이하, 'GT'로 약칭함) 유전자가 이형접합적으로(heterozygous) 제거된 체세포 복제 돼지가 생산되었다(Yifan Dai et al., Nat. Biotechnology, 20: 251-255, 2002). GT 유전자는 이종간 이식시 급속한 면역거부반응을 일으키는 원인 유전자로서, 이 유전자가 제거될 경우 생체거부반응이 제거된 이종간 장기이식용 질환모델동물 개발이 가능하다.
- [11] 2003년에 동 회사에서 GT 유전자가 동형접합적으로(homozygous) 제거된 공개특허 10-2009-0056922 체세포 복제에 성공함으로써 현 장기부족현상을 해결해 줄 수 있는 장기 이식용 질환모델동물 생산을 위한 획기적인 진보를 가져왔다(Carol J. Phelps, Science, 299: 411-414, 2003). 2005년 GT 유전자 제거된 복제 돼지 유래의 장기는 원숭이로 이식되었으며, 그 결과 급성 면역 거부반응 없이 이식 후 2-6 개월까지 생존이 지연됨을 보고하였다(Kenji Kuwaki et al., Nature Medicine, 11(1): 29-31, 2005). 그러나 GT 유전자가 제거되었음에도 불구하고 다른 경로를 통하는 이종 항원에 의해 인체 보체 유전자들이 활성화됨으로써 장기 이식시 심각한 거부반응이 초래될 수 있음이 보고되었다(Tanemura, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 235: 359-364, 1997; Komoda, H. et al., Xenotransplantation, 11: 237-246, 2004). 그러한 장애를 극복하기 위해, GT 유전자 제거와 함께 분해 촉진 인자(decay-accelerating factor, 이하, 'DAF'로 약칭함), 막 보조인자 단백질(membrane co-factor protein, 이하, 'MCP'로 약칭함), CD59와 같은 인체 보체 억제 유전자를 과발현하는 복제 돼지를 생산하는 방법이 사용되었다(Yoichi Takahagi, Molecular Reproduction and Development 71: 331-338, 2005 Cozzi, Eb et al., Transplant Proc., 26: 1402-1403, 1994; Fodor, W. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11153-11157, 1994; Adams, D. H. et al., Xenotransplantation, 8: 36-40, 2001).
- [12] 한편, 인간을 제외한 대부분의 포유동물에 존재하는 N-글루콜릴뉴라미닌산(N-glycolylneuraminic acid, 이하, 'Neu5Gc'로 약칭함) 항원 결정기 또한 이종장기이식시 면역거부반응을 야기함이 보고되었다(WO20061133356A; Pam Tangvoranuntakul, Proc. Natl. Acad. Soc. USA 100: 12045-12050, 2003; Barbara Bighignoli, BMC genetics, 8: 27, 2007). Neu5Gc는 CMAH에 의해 N-아세틸뉴라미닌산(N-acetylneuraminic acid, 이하, 'Neu5Ac'로 약칭함)로부터 전환된다.
- [13] 보체는 생체 내에서 면역작용에 관계하는 단백질들로 구성된 단백질 복합체(C1-C9)로서 항원-항체 복합체가 형성되면 보체가 세균의 세포막에 결합하여 구멍을 내는 보체고정과 또는 항원-항체 복합체에 보체가 결합되어 식세포작용이 촉진되는 식균작용증진(opsonization)이 있다. 이러한 보체의 활동을 조절할 수 있는 여러가지의 조절 단백질들이 발견되었으며, 보체의 활성화를 막거나 활성화된 보체의 분해를 촉진함으로써 보체의 작용을

조절한다. 숙주의 세포막에 있는 DAF는 C2와 C4b의 결합을 방해할 수 있으며, MCP는 C4b의 분해를 촉진하여 보체가 숙주세포에서 활성화되는 것을 막아줌으로서 보체에 의한 숙주세포 파괴를 방지할 수 있다. 숙주 세포 표면에 있는 CD59는 C7, C8과 C5b6의 결합을 방해하여 막 공격 복합체의 형성을 막을 수 있다.

- [14] 상기 보체 작용 조절 유전자 외에도, 인간 CD39 유전자의 과다발현에 의해, 이종장기이식 시 발생하는 혈전증이 억제됨이 보고되어져 있다(US20080003212A, Karren, M. D., The Journal of Clinical Investigation, 113: 1440-1446, 2004).
- [15] 기존의 보고에 의하면, 외래 유전자의 정규장소 외의 발현은 배 발달에 장애를 야기하고 배아 발달 후기와 출생 후 초기에 대부분 발달하는 신경 시스템에 치명적이라는 문제점이 있다(Gao et al., Neurochem. Res., 24(9): 1181-1188, 1999).
- [16] 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020090104328호는 이식 면역 반응을 억제할 수 있는 C D 7 0 발현신경줄기세포 및 그의 이용에 관한 것으로, CD70을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는, 이식된 장기, 조직 또는 세포에 대한 면역 반응 억제용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 개체의 면역 반응 억제 방법이 기재되어 있다.
- [17] 또 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020010034847호는 보체-매개성 분해를 야기시키지 않는 면역글로불린으로부터 유도된 결합 분자들에 관한 것으로, (i) 표적 분자에 결합할 수 있는 결합 도메인 및 (ii) 사람 면역글로불린의 중쇄 중 불변 도메인의 전부 또는 일부와 실질적으로 동종성이 있는 아미노산 서열을 갖는 효과 인자 도메인(effector domain)을 포함하는 재조합 폴리펩타이드인 결합 분자들로서; 심각한 보체-의존성 분해 또는 표적의 세포-매개성 파괴 없이 상기 결합 분자가 표적 분자에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 효과 인자 도메인이 FcRn 및/또는 FcγRIIb에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 분자들이 개시되어 있다. 일반적으로 상기 결합 분자들은 두 개 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 CH2 도메인들로부터 유도된 키메라 도메인들에 기초한 것이다. 바람직한 실시예에서, 영역 233-236 및 영역 327-331이 수정되어 있으며, 그 이상의 잔기들은 상기 분자를 효력없는(null) 대립형질(allotypic)로 만든다. 결합 도메인은 상기 분자에 (일반적으로 임상적으로) 적용하기에 적절한 임의의 공급원으로부터 유도될 수 있고, 예를들면 항체; 효소; 호르몬; 수용체; 사이토킨 또는 항원; 리간드; 및 점착 분자로부터 유도될 수 있다. 또한, 핵산들, 숙주 세포들, 생성 공정들 및 재료들이 개시되어 있으며, 예를들면, B세포 활성화; 유방세포 탈과립화; 식작용을 방해하거나, 제2의 결합 분자가 표적 분자에 결합하는 것을 방해하기 위한 용도가 개시되어 있다.

[18]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 이중 항원 결정기 합성 유전자 (CMAH)의 녹아웃된 벡터를 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 기존의 사용하던 타겟팅 벡터에 비하여 효율성 및 정확성이 높은 벡터를 사용하여 형질전환 체세포주를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 체세포주의 핵 이식을 통해 제조되는 비인간 복제동물을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 비인간 복제동물을 사육한 후, 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 이중 장기의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [23] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 5'암(arm), PGKneopolyA 및 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 3'암(arm)을 순차적으로 포함하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터를 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 5'암(arm)은 서열번호 1에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [25] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 PGKneopolyA는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [26] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 3'암(arm)은 서열번호 3에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터는 도 4에 기재된 개열지도로 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [28] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터 및 징크-핑거 뉴클레이즈 벡터를 세포에 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 녹아웃 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 징크-핑거 뉴클레이즈 벡터는 도 1에 기재된 개열지도로 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [30] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 녹아웃 세포를 제공한다.
- [31] 상기 본 발명의 녹아웃세포는 기탁번호 KCTC 12439BP로 2013년 7월 2일에 대한민국 대전시 유성구 어은동 소재 한국생명공학연구원 생명자원센터에

기탁하였다.

[32] 또한 본 발명은 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 핵 아웃 세포의 핵이식을 통하여 인간을 제외한 동물을 제조하는 방법을 제공한다.

[33] 또 본 발명은 상기 방법에 의하여 제조된 인간을 제외한 복제동물을 사육한 후, 그 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 이종장기 생산방법을 제공한다.

[34] 본 발명에서 용어, "유전자 타겟팅 벡터(gene targeting vector)"는 게놈의 특정 유전자 위치로 목적하는 유전자를 제거 또는 삽입할 수 있는 벡터를 말하며, 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나도록 타겟팅하고자 하는 특정 유전자에 상동 염기 서열을 포함한다.

[35] 본 발명에서 용어 "상동(homologous)"은 제1영역 또는 제2영역과 이에 해당하는 유전자의 핵산 서열과의 동일성 정도를 나타내는 것으로, 적어도 90% 이상 동일하고, 바람직하게는 95% 이상 동일하다.

[36] 본 발명의 용어 "항원 결정기"는 이종 장기의 이식시 수용체의 면역시스템에 의하여 항원으로 인식되는 부위를 의미하는데, 세포표면 당쇄인 N-글리코릴뉴라민산(N-glycolylneuraminic acid, 이하, 'Neu5Gc'라 약칭함)이며, "항원 결정기 합성 유전자"는 상기 항원 결정기를 생합성하는 효소를 암호화하는 유전자로서, Neu5Gc의 생합성에 관여하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제(이하, 'CMAH'로 약칭함)을 말한다.

[37] 본 발명에서 용어 "선별마커(selection marker)"란 세포로 유전자 타겟팅 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용되며, 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 당해 특정 마커를 발현하는 세포만 생존하도록 하여 양성 선택을 가능하게 하는 마커를 의미하며, "선별 마커 유전자"는 상기 양성 선별 마커를 암호화하는 유전자를 의미하는데, 예를 들어, 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(이하, 'neo'라 약칭함)는 항생제 네오마이신이 첨가된 배지에서 진핵세포가 생존할 수 있도록 하는 항생제 내성을 부여함으로써, 진핵세포에 있어서 안정적 형질감염 세포를 선별하는데 사용된다.

[38] "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가 가능하게 되는 것을 의미한다. 형질전환은 핵산 분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 플라스미드 또는 비플라스미드성 나출(naked DNA)에 의한 진핵세포의 형질전환을 세포의 종양화의 의미로서의 형질전환과 구분하기 위해, '형질감염(transfection)'이라고 부르기도 하는데, 본 문서에서는 동일한 의미로 사용된다.

[39] 본 발명에서 'Zinc-finger nucleases (ZFNs)'란 DNA-절단 도메인에 징크 핑거

DNA-결합 도메인을 융합하여 생성된 인공적인 제한 효소이다. 징크 핑거 도메인은 원하는 DNA 서열들을 타겟하기 위하여 조작될 수 있고, 이것은 징크 핑거 nucleases를 복합체 지놈 내에 독특한 서열을 타겟하게 한다. 내생적인 DNA 리페어 기작을 이용하여, 이들 물질들은 고등 생명체의 지놈을 정확하게 변경하는데 사용될 수 있다.

- [40] 본 발명에서 'DNA-절단 도메인'은 예를 들어, 타입 II 제한 효소 FokI로부터 유래한 비 특이적인 절단 도메인은 ZFNs에 절단 도메인으로서 전형적으로 사용된다. 이 절단 도메인은 DNA를 절단하기 위하여 다이머화가 되어야하고 따라서 한 쌍의 ZFNs가 비 팔린드로믹(non-palindromic) DNA 부위를 타겟하기 위하여 필요하다. 표준 ZFNs는 그 절단 도메인을 각 징크 핑거 도메인의 C-말단에 융합한다. 그 두 절단 도메인이 다이머화하고 DNA를 절단하기 위하여, 그 두 개별 ZFNs는 그들의 C-말단에서 제한된 거리 떨어져서 반대편 가닥의 DNA에 결합하여야 한다. 징크 핑거 도메인과 절단 도메인 사이에 가장 일반적으로 사용된 링커 서열은 각 결합 부위의 5' 엷지로부터 5에서 7 bp로 떨어지는 것이 필요하다.
- [41] 몇몇 다른 단백질 공학 기술은 ZFNs에 사용된 nuclease 도메인의 활성 및 특이성을 개선하기 위하여 채택된다. 증가된 절단 활성을 가지는 FokI 변이체를 생성하기 위하여 방향 진화(Directed evolution)가 채택된다. 단지 의도된 헤테로 다이머 중만이 활성화하기 위하여 다이머화 접촉면을 변형하여 FokI의 절단 특이성을 개선하기 위하여 구조 기반 고안이 채택된다.
- [42] 각 ZFNs의 DNA-결합 도메인은 전형적으로 3에서 6 개의 징크 핑거 리피트를 가지고 각각은 9에서 18 basepairs 사이를 인지할 수 있다. 만약 그 징크 핑거 도메인들이 그들의 의도된 타겟 부위에 완벽하게 특이적이라면, 심지어 전체 18 basepairs를 인지할 수 있는 한 쌍의 3-핑거 ZFNs는 포유류 지놈에서 단일 로커스를 이론적으로 타겟할 수 있다.
- [43] 여러 전략들이 원하는 서열에 결합하기 위하여 Cys2His2 징크 핑거를 조작하는데 개발되었다. 이들은 파지 디스플레이 또는 세포 선택 시스템(cellular selection systems)을 채택하는 "조절 어셈블리(modular assembly)" 및 선택 전략 모두를 포함한다.
- [44] 새로운 징크 핑거 어레이를 생성하는 가장 간단한 방법은 공지된 특이성의 작은 징크 핑거 "모듈(modules)"을 결합하는 것이다. 가장 일반적인 modular assembly 과정은 9 basepair 타겟 부위를 인지할 수 있는 3-핑거 어레이를 제조하기 위하여 각 3bp DNA 서열을 인지할 수 있는 세 개의 분리된 징크 핑거들을 결합하는 것이 관여한다. 다른 방법은 6 개 이상의 개별 징크 핑거들을 가지는 징크 핑거 어레이를 제조하기 위하여 1-finger 또는 2-finger 모듈을 이용할 수 있다.
- [45] 여러 선택 방법들이 원하는 서열을 타겟팅할 수 있는 징크 핑거 어레이를 생성하는데 사용된다. 초창기 선택 시도는 많은 풀의 부분적으로 랜덤화된 징크

핑거 어레이로부터 주어진 DNA 타겟을 결합한 단백질들을 선택하기 위하여 파지 디스플레이를 이용하였다. 더 최근 시도는 효모 one-하이브리드 시스템, 박테리아 one-하이브리드 및 two-하이브리드 시스템 및 포유류 세포들을 이용한다. 새로운 징크 핑거 어레이를 선택하는 더 유망한 새로운 방법은 박테리아 two-하이브리드 시스템을 이용하는 것이고 "OPEN"이라고 명명된다. 이 시스템은 각각 주어진 triplet에 결합하게 선택된 미리 선택된 풀의 각 징크 핑거를 결합한 후 원하는 9-bp 서열에 결합할 수 있는 3-핑거 어레이를 얻기 위하여 두 번째 라운드의 선택을 이용한다. 이 시스템은 조작된 징크 핑거 어레이의 상업적인 소스에 대한 대안으로 Zinc-Finger Consortium에 의하여 개발되었다.

[46] 이하 본 발명을 설명한다.

[47] 본 발명자들은 Neu5Gc 항원 결정기 합성에 관여하는 CMAH 유전자를 제거하면서, CMAH 유전자가 녹아웃된 체세포를 효율적으로 선발할 수 있도록 G418 (Neo) 유전자가 삽입된 체세포주의 제조에 성공하였다.

[48] 본 발명에 의해 제조된 타겟팅 벡터 및 형질전환 세포주는 면역거부반응에 관여하는 유전자들의 발현을 복합적으로 조절함으로써, 효율적으로 이종장기이식용 복제 돼지생산에 이용될 수 있다.

[49] 본 발명에 사용된 벡터는 체세포 내에서 결정기 유전자의 서열을 인식할 수 있는 Zinc Finger Protein과 결정기 내 유전자를 제거하는 Nuclease 기능을 가진 Fox1 단백질을 생산하는 새로운 기술이다.

[50] 본 발명에서 사용된 벡터는 기존의 사용하던 타겟팅 벡터에 비하여 효율성 및 정확성이 높은 벡터이다.

[51] 아울러, 상기 벡터로 타겟팅되는 CMAH 유전자는 소, 양, 염소, 돼지, 말, 토끼, 개, 원숭이 등 포유동물 유래의 CMAH 유전자인 것이 바람직하고, 돼지 유래의 CMAH 유전자인 것이 더욱 바람직하며, 미니어쳐 돼지의 CMAH 유전자인 것이 가장 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 또한, 본 발명의 벡터는 양성 선별마커 유전자를 포함한다.

[53] 양성 선별마커 유전자로는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(neomycin phosphotransferase, Neo), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(hygromycin phosphotransferase, Hyg), 히스티디놀 디하이드로게나제(histidinoldehydrogenase, hisD), 퓨로마이신(puromycin, Puro) 및 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(guanine phosphosribosyltransferase, Gpt) 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 Neo이지만, 이들로 제한되지 않는다.

[54] 본 발명의 유전자 타겟팅 벡터가 숙주 세포 내로 타겟팅되면, 숙주 세포 게놈 상의 내생적(endogeneous) 항원결정기 합성 유전자와 타겟팅 벡터 사이에 상동 재조합이 일어나면서, 염기 서열이 교체된다.

[55] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 타겟팅 벡터가 도입된 형질전환체에 관한 것이다.

- [56] 상기 형질전환은 핵산 분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표적 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온성 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.
- [57] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 체세포주의 핵 이식을 통해 제조되는 비인간 복제동물을 제공한다.
- [58] 상기 비인간 복제동물은 양, 산양, 돼지, 개 등 인간과 체구가 유사한 포유동물이라도 가능하나, 돼지인 것이 더욱 바람직하며, 그 중 미니어치 돼지인 것이 가장 바람직하다.
- [59] 상기 복제동물의 제조에 이용되는 핵이식 방법은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하는 것이 가능하나, 보다 바람직하게는 US6,781,030B, US6,603,059B, US6,235,969B, US7,355,094B, US7,071,372B, KR862298B, KR500412B, KR807644B, JP4153878B, US6,700,037B, US7,291,764B, US6,258,998B, US6,548,741B, WO03/089632A, US7,371,922B 등이 사용될 수 있고, 특히 돼지의 경우에는 KR500412B, KR807644, JP4153878B, US6,700,037B, 공개특허 10-2009-0056922 US7,291,764B, US6,258,998B, US6,548,741B, WO03/089632A 또는 US7,371,922B에 기재된 방법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 특허문헌들은 모두 본 문서에 참조로 삽입된다.
- [60] 아울러, 본 발명은 상기 비인간 복제동물을 사육한 후, 이식에 필요한 장기를 적출하는 단계를 포함하는 이식용 이종 장기의 생산방법을 제공한다. 상기 장기는 수용 대상의 성별, 나이, 체중, 신장 등을 고려하여, 사육시기를 조절하여 공여체 복제동물을 사육한 다음, 통상의 외과적 수술을 통해 적출할 수 있으며, 적출 후 수용 대상에게 바로 이식되거나, 신속하게 냉장보관될 수 있다.
- [61] 이종 장기이식의 최적의 제공원으로는 장기의 크기 및 생리적 특징이 인간과 유사하고 다산성에 의해 장기의 대량 공급이 가능한 미니 돼지가 고려된다. 이를 위해서는 먼저 면역거부반응을 제어하는 미니복제돼지를 생산하여야 한다. 돼지 장기의 성공적인 이식은 일련의 면역거부반응(초급성, 급성 혈관성, 세포 매개성, 및 만성 면역거부반응)의 극복에 의존하다.
- [62] 기존의 보고에 의하면, GT 유전자는 이종간 이식시 급속한 면역거부반응을 일으키는 원인 유전자로서, 이 유전자가 제거될 경우 생체거부반응이 제거된 이종
- [63] 간 장기이식용 질환모델동물 개발이 가능하다. 2005년 GT 유전자 제거된 복제 돼지
- [64] 유래의 장기는 원숭이로 이식되었으며, 그 결과 급성 면역 거부반응 없이 이식 후
- [65] 2-6 개월까지 생존이 지연됨을 보고하였다(Kenji Kuwaki et al., Nature Medicine,

- [67] 11(1): 29-31, 2005). 그러나 GT 유전자가 제거되었음에도 불구하고 다른 경로를
 [68] 통하는 이중 항원에 의해 인체 보체 유전자들이 활성화됨으로써 장기 이식시
 심각
- [69] 한 거부반응이 초래될 수 있음이 보고되었다(Tanemura, M. et al., Biochem.
 [70] Biophys. Res. Commun., 235: 359-364, 1997; Komoda, H. et al.,
 [71] Xenotransplantation, 11: 237-246, 2004). 한편, 인간을 제외한 대부분의 포유동
 [72] 물에 존재하는 N-글루콜릴뉴라미닌산(N-glycolylneuraminic acid, 이하,
 'Neu5Gc'
 [73] 로 약칭함) 항원 결정기 또한 이중장기 이식시 면역거부반응을 야기함이
 보고되었
- [74] 다(WO20061133356A; Pam Tangvoranuntakul, Proc. Natl. Acad. Soc. USA 100:
 [75] 12045-12050, 2003; Barbara Bighignoli, BMC genetics, 8: 27, 2007). Neu5Gc는
 [76] CMAH에 의해 N-아세틸뉴라미닌산(N-acetylneuraminic acid, 이하, 'Neu5Ac'로
 약칭
 [77] 함)로부터 전환된다. 이에 따라, CMAH 유전자가 제거된 돼지의 경우
 급성면역거부
 [78] 반응을 제어할 수 있으며 GalT가 제거된 돼지와 함께 이중간 장기이식시
 장기이식
 [79] 용 질환모델동물 개발뿐 아니라 활용이 가능하다. 기존의 보고에
 의하면(Basnet NB
 [80] et al., Xenotransplantation, 17: 440-448, 2010; Lutz AJ et al,
 [81] Xenotransplantation, 20: 27-35, 2013), double knock-out 마우스 (GalT and
 [82] CMAH)와 double knock-out 돼지(GalT and CMAH)의 PBMC(Peripheral Blood
 [83] Mononuclear Cell) 또는 thymocyte와 사람의 혈청내 natural xenoreactive 항체에
 [84] 대한 결합능을 조사한 결과 control 돼지와 GalT knock-out에 비해 double knock-
 [85] out 마우스와 돼지에서 그 결합능이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이러한
 결과
- [86] 로 미루어볼 때 이중항원에 의한 급성면역거부반응이 제어될 것이다.
 [87] 기존의 보고에 의하면(Kavaler et al., FASEB J, 25: 1887-1893, 2011), 비만인
 [88] CMAH knock-out 마우스에서 pancreatic beta-cell failure 에 따라 췌장의 사이즈
 [89] 와 인슐린을 분비하는 세포의 수가 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
 [90] 따라서 본 발명의 돼지의 경우 obesity나 diabetes 모델로도 이용할 수 있다.
 [91] 또한 기존의 보고에 의하면 (Chandrasekharan et al., Sci Transl Med., 28:
 [92] 42-54), CMAH knock-out 마우스의 특성상 사람의 듀켄씨근이영양증 (Duchenne
 [93] muscular dystrophy)의 실험모델동물로서의 가능성에 대하여 설명하였다.
 [94] 이러한 보고에 따라, 본 발명의 돼지의 경우 muscular dystrophy 모델로도
 이용할
 [95] 수 있다.

발명의 효과

- [96] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명은 Neu5Gc 항원 결정기 합성에 관여하는 CMAH 유전자를 제거하면서, CMAH 유전자가 녹아웃된 체세포를 효율적으로 선발할 수 있도록 G418 (Neo) 유전자가 삽입된 체세포주를 제조하였으며, 본 발명에 의해 제조된 타겟팅 벡터 및 형질전환 세포주는 면역거부반응에 관여하는 유전자들의 발현을 복합적으로 조절함으로써, 효율적으로 이종장기이식용 복제 돼지생산에 이용될 수 있다.
- [97] 또한 본 발명의 벡터는 돼지 CMAH 단백질 발현을 제거하기 위해 Zinc finger Nuclease (ZFN)를 이용하여 CMAH 적중 벡터와 homologous recombination에 의해 게놈상에 삽입될 수 있도록 NEO 선발인자가 포함된 공여 DNA를 동시에 제작한 것으로, 기존의 conventional 적중 벡터에 비하여 ZFN의 경우 적중 효율이 아주 높은 것을 확인할 수 있었고, 위 ZFN 및 donor DNA를 이용하여 다수의 CMAH 적중 체세포를 선발하여 최근 이를 수정란 이식하여 CMAH 유전자가 적중된 미니돼지가 태어날 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- [98] 도 1은 ZFN 플라스미드의 지도.
- [99] 도 2는 ZFN 활성을 나타낸 그래프.
- [100] 도 3은 ZFN이 ZFN 타겟팅 forward & Reverse 플라스미드에 의하여 피그 CMAH 엑손 8을 타겟팅하는 것을 보여주는 그림.
- [101] 도 4는 Donor DNA (CMAH neo targeting vector) 지도를 나타낸 그림.
- [102] 도 5는 CMAH targeting vector 서열을 나타낸 그림으로, 노란색; 5', 흰색; PGK-neo-PolyA, 회색; 3'arm'을 나타내며, pBSK- sequence 은 포함되어 있지 않음 (DNA는 pBSK-의 XbaI-KpnI site에 삽입되어 있음)
- [103] 도 6은 돼지에서 CMAH 녹아웃 체세포의 스크리닝 전략을 나타낸 그림.
- [104] 도 7은 CMAH neo vector transfection 결과를 확인한 사진.
- [105] 도 8은 CMAH 녹아웃 돼지의 형질전환 여부를 확인하기 위한 프라이머 조합의 위치를 나타낸 모식도
- [106] 도 9는 핵치환으로 생산된 CMAH 녹아웃 돼지의 형질전환 여부를 분석한 PCR 결과
- [107] 도 10은 핵치환으로 생산된 CMAH 녹아웃 돼지의 사진
- [108] 도 11은 핵치환으로 생산된 CMAH 녹아웃 돼지에서 구축한 체세포주에서 CMAH의 발현 여부를 분석한 결과
- [109] 도 12는 CMAH knock-out 마우스 모델과 사람 혈청과의 면역인식반응 사진
- [110] 도 13은 CMAH knock-out 마우스 모델에서 aging에 따른 hearing loss

발명의 실시를 위한 형태

- [111] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 기재한 것으로서 본 발명의 범위는

하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[112]

[113] 실시예 1:ZFN 플라스미드 구축

[114] 본 발명의 구조물은 CMV 구동되고(driven) 인 비트로 전사 반응에서 사용하기 위하여 T7 프로모터를 함유하였다. 모든 ZFNs은 N-말단에서 triple FLAG이다. 제한 효소 Xho I 및 Xba I이 스탭 코돈 직후에서 절단하고 mRNA 생산을 위한 주형을 직선화하는데 사용되어진다.

[115]

[116] 실시예 2:ZFN 활성 측정

[117] ZFN 활성은 효모 MEL-1 리포터 어세이에 의하여 측정되어진다(Doyon et al., *N at Biotechnol*,2008,26(6):702). ZFN 절단 활성은 유도 전(0 h, 청색 바) 및 ZFN 발현의 유도 후(6h, 적색 바)에 측정되었다. MEL1 레벨은 원하던 타겟 부위에서 이중 가닥 절단을 생성하는 ZFN 활성과 포지티브하게 상관관계를 가진다. 유도 후(6시간) 양성 대조군 ZFN과 비교하여 >50% 신호를 나타내는 ZFNs를 지놈 에디팅 실험에 유용한 것으로 간주한다(심지어 비유도된 상태(0h)에서 활성을 나타내는 ZFN이 우수할 수 있음).

[118]

[119] 실시예 3:Donor DNA의 제작

[120] CMAH 5'arm-PGKneopolyA-3'arm vector 구축

[121] 1) 5'의 PCR cloning

[122] 5'arm은 먼저 XbaI 제한효소 site을 포함하고 있는 sense primer (TCTAGACTCTCTATTTGGTGGCTCTGTTT)와 EcoRI 제한효소 site을 포함하고 있는 anti-sense primer (GAATTCAGGAGTTTCTTCCTTTCTGTTTT)을 이용하여 시카코 미니어처 미니배지의 지놈 DNA를 이용하여 PCR 증폭에 의하여 확보한 다음 T-vector에 ligation 하였다. cloning된 DNA는 염기배열 결정에 의하여 CMAH 유전자 영역임을 확인하였다.

[123] 2) 3'의 PCR cloning

[124] 3'arm은 시카코 미니어처 미니배지의 지놈 DNA를 주형으로 이용하고 XhoI 제한효소 site을 포함하는 sense primer (CTCGAGCCTACAACCCAGAATTTACTGCC)와 KpnI 제한효소 site을 포함하는 anti-sense primer (GGTACCAACAGGGACCTGCCAAGAGGCCA)을 이용하여 PCR 증폭하여 T-vector에 subcloning 하였다. cloning된 DNA는 염기배열 결정에 의하여 CMAH 유전자 영역임을 확인하였다.

[125] 3) CMAH 5'arm-PGKneopolyA-3'arm vector 구축

[126] CMAH 5'arm-PGKneopolyA-3'arm vector 구축은 먼저 pKJ2 neo plasmid를 EcoRI과 XhoI으로 절단하여 PGKneoPolyA fragment (약 2kb)을 분리한 다음 EcoRI과 XhoI으로 절단한 pBluscriptII SK-의 vector에 ligation하여 pBSK-PGKneoPolyA plasmid를 확보하였다. 5'의 연결은 앞에 확보된

5plasmid(T-easy vector)로부터 XbaI과 EcoRI으로 절단하여 789bp의 fragment을 확보한 다음 pBSK-PGKneoPoyA plasmid을 XbaI과 EcoRI으로 절단한 vector에 ligation 하여 pBSK-5'arm-PGKneoPolyA plasmid을 구축하였다. 그리고 최종적으로 3'의 연결은 앞에서 PCR에 의하여 확보한 3plasmid(T-easy vector)을 XhoI과 KpnI으로 절단하여 763bp fragment을 확보한 다음 pBSK-5'arm-PGKneoPolyA plasmid을 XhoI과 KpnI으로 절단한 vector에 삽입하여 최종 pBSK-5'arm-PGKneoPolyA-3'arm plasmid을 구축하였다.

[127]

[128] 실시에 4:ZFN Vector 및 Donor DNA의 transfection 및 selection 방법

[129] 미니돼지 체세포에 gene targeting 벡터의 도입은 electroporation 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. electroporation 방법에서는 배양한 세포를 Trypsin 처리에 의하여 회수한 후 세포 수가 5×10^6 cell/0.4ml F10 배양액이 되도록 현탁한 다음 0.1ml F10 배양액에 녹인 4.5 μ g의 직선화 Donor DNA 벡터와 각각 2.6 μ g의 pZFN1와 pZFN2 DNA을 혼합하여 4mm gap cuvette에 세포벡터 혼합액을 넣었다. 이 cuvette을 BTX Electro-cell manipulator(ECM 2001)에 장착한 다음 480V, 4 pulses, 1ms 조건에서 전기 충격을 실시하였다. 전기 충격 후 cuvette을 얼음 위에 10분 간 방치 한 다음 10ml 배양액으로 옮겨 잘 현탁한 다음 48well에 well 당 1250 cell이 되도록 접종하였다. DNA 도입 24시간 후 300 μ g/ml G418을 이용하여 11일간 선별과정을 거쳤다. 형성된 neo 양성 클론 체세포는 cloning cylinder를 통해 24-well culture plate로 계대 배양하여 분석에 이용하였다. 이렇게 계대된 체세포는 3-4일 후에 90% confluent 하면 12-well plate로 계대하였다. 그리고 3-4일 간격으로 6-well, 60mm culture dish, 100mm culture dish로 계대 배양하여 동결보존하거나 실험에 이용하였다.

[130]

[131] 실시에 5:targeting된 세포의 PCR 선별

[132] knock-out된 세포의 선별을 위한 PCR 분석은 아래와 같이 수행 하였다. PCR 수행을 위하여 주형은 세포로부터 분리한 지놈 DNA 100ng을 이용하였으며 primer는 Neo3-1 primer (GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT)와 CMAH Sc AS3 primer (AAGACTCCCACTTTAAAGGGTGGTGTGTAG)을 이용하고 Takara Ex Taq을 이용하여 DNA을 증폭하였다. PCR 조건은 98°C 2분 1 cycle, 95°C 30초, 68°C 30초, 72°C 2분 40 cycle, 72°C 15분 1 cycle로 수행하였다. PCR 수행 후 0.8% agarose gel에서 DNA을 전기영동하여 약 2kb의 DNA band 검출 여부를 가지고 최종 확인하였다.

[133] CMAH neo vector transfection 결과는 5×10^6 cell transfection (CMAH neo vector, ZFN plasmid), 48well 528개에 culture하여, single colony 78개 passage, Single colony 64개 PCR 분석, 1st PCR에서 28개 positive, 2nd PCR에서 최종 19개 positive이다.

[134] 표 1

[Table 1]

트랜스펙션된 세포 수	G418 ^R 콜로니 수	PCR에 의하여 분석된 G418 ^R 콜로니 수	PCR -양성 콜로니 수
5X10 ⁶	78	64	19

[135]

[136] 실시예 6: 체세포의 핵치환

[137] 핵치환을 위해 ART (Madison, WI)로부터 난자를 구입하여 체외에서 성숙시킨 후 난자로부터 핵을 제거한 후 CMAH knockout(KO) 벡터가 타겟팅 된 공여세포 (Donor DNA [pBSK-5'arm-PGKneoPolyA-3'arm plasmid]와 pZFN1와 pZFN2 DNA[CMAH knock-out] 벡터)를 이식하였고 1.2kV/cm에서 두 번의 DC pulse 전기 자극으로 융합을 실시하였다. 생존한 융합난자만을 선별하여 대리모의 난관에 [표2]와 같이 이식하였다.

[138] 표 2

[Table 2]

Recipients numbers	Donor cells	No.of embryos transferred	Day of heat	Comments
1	Male ZFN C3	192	1	2 live
2	Male ZFN C3	239	0	9 live 2 stillborn
3	Female A5	212	0	-
4	Female A9	221	0	1 live
5	Male D11	205	1	-
6	Male C5	238	1	3 live
7	Female H10	246	1	-
8	Male B2	240	1	1 with abnormality
9	Female D1	257	1	2 live

[139] 표 2는 CMAH KO세포를 이용한 핵치환 결과를 나타낸 표로, # 1 및 2는 donor DNA 없이 ZFN transfection만 한 것이고, # 3-9은 donor DNA와 함께 ZFN transfection 을 한 것.

[140]

[141] 실시예 7:CMAH knockout 벡터가 타겟팅된 형질전환 돼지의 생산

[142] 자연분만으로 출생한 자손의 귀조직을 채취 후 GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich)로 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA로부터 정확한 분석을 위해 아래의 그림에서와 같이 레프트암 영역, 라이트암 영역과 레프트와 라이트암을 포함하는 영역의 프라이머 조합으로 PCR

분석을 실시한 후 유전자 도입여부를 확인하였다.

[143] 라이트암 프라이머 조합

[144] 정방향 Neo 3-1: TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT,

[145] 역방향 ScAS3: AAGACTCCCACCTTTAAAGGGTGGTGTGTAG

[146] 레프트암 프라이머 조합

[147] 정방향 ScS5: CCCTTCCATCCCACCCGTCCTCATCCTTAC,

[148] 역방향 CMAHR: ACTCTCTGTTTTTCAGGCTGCTTGTT

[149] 레프트와 라이트암 프라이머 조합

[150] 정방향 ScS5: CCCTTCCATCCCACCCGTCCTCATCCTTAC,

[151] 역방향 ScAS3: AAGACTCCCACCTTTAAAGGGTGGTGTGTAG

[152]

[153] 실시예 8:CMAH knockout 돼지에서 CMAH 발현 유무 확인

[154] CMAH knockout 돼지에서 CMAH 발현 유무를 확인하기 위해 먼저 heterozygous와 homozygous CMAH knockout 돼지로부터 체세포 라인을 구축하였다. 이후 세포에서 RIPA protein extract (Thermo Scientific, USA)용액으로 단백질을 추출하였고, 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 homozygous CMAH knockout 돼지에서는 CMAH 단백질이 전혀 발현되지 않고 heterozygous한 CMAH knockout 돼지에서는 와일드 타입과 비교시 발현이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[155]

[156] 실시예 9:CMAH knock-out 마우스 모델과 사람 혈청과의 면역인식반응

[157] 본 발명자들이 CMAH knock-out 마우스 모델의 thymocyte와 사람의 혈청내
[158] natural xenoreactive 항체에 대한 결합능을 조사한 결과, homozygote 유래의 세포

[159] 와 IgG와의 결합능은 모든 혈액형(A, B, O와 AB형)에서 그 결합능이 WT- 과
[160] heterozygote 유래의 세포와 비교시 줄어든 반면 IgM과의 결합능은 A, O와 AB에

[161] 서는 유의적 차이를 가지지 않았다(도 12).

[162]

[163] 실시예10:CMAH knock-out 마우스 모델에서 aging에 따른 hearing loss

[164] 본 발명자들이 CMAH knock-out 마우스 모델의 달팽이관을 분리후 조직학적
[165] 분석을 한 결과 CMAH -/- old에서 cochlear sensory epithelium의 이상을 발견하였

[166] 다(도 13).

[167] 이러한 결과에 따라, 1) Aging 따른 hearing loss 모델, 2) wound healing 모델로
[168] 도 이용할 수 있다.

[169]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제양식

원기탁에 대한 수탁증

하기 국제기탁 당국에 의하여 7.1조의 규정에 따라 발행됨.

기탁자: 김진희

143-701 대한민국 서울시 광진구 능동로 120 건국대학교

I. 미생물의 표시	
기탁자가 부여한 식별을 위한 표시 : Sus scrofa(SNU miniature pig) CMAH knock-out mini-pig fibroblast cell line	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호 : KCTC 12439BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
I 난에 지정된 미생물은 다음 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다. ☒ 과학적 성질 ☐ 분류학상의 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제 기탁 기관은, 2013년 7월 2일에 수령한 I 난의 미생물을 수탁한다.	
IV. 전환요구의 수령	
I 난에 표시된 미생물은 (원기탁일)에 수탁되었고, 오리지널 기탁을 부다페스트 조약에 부합하는 기탁으로 전환하고자 하는 요청을 (전환요구의 수령일)에 받았다.	
IV. 국제 기탁 기관	
명칭 : 한국생명공학연구원 생물자원센터 주소 : 한국 생명공학연구원(KRIBB) 대전광역시, 유성구 과학로 125, 한국생명공학연구원, 305-806	하기 서명자는 국제기탁기관을 대표하여 서명할 권한을 갖는다. 서명인 : 배경숙 서명일 : 2013. 7. 3.

원본과 상위없음

특허법인 주



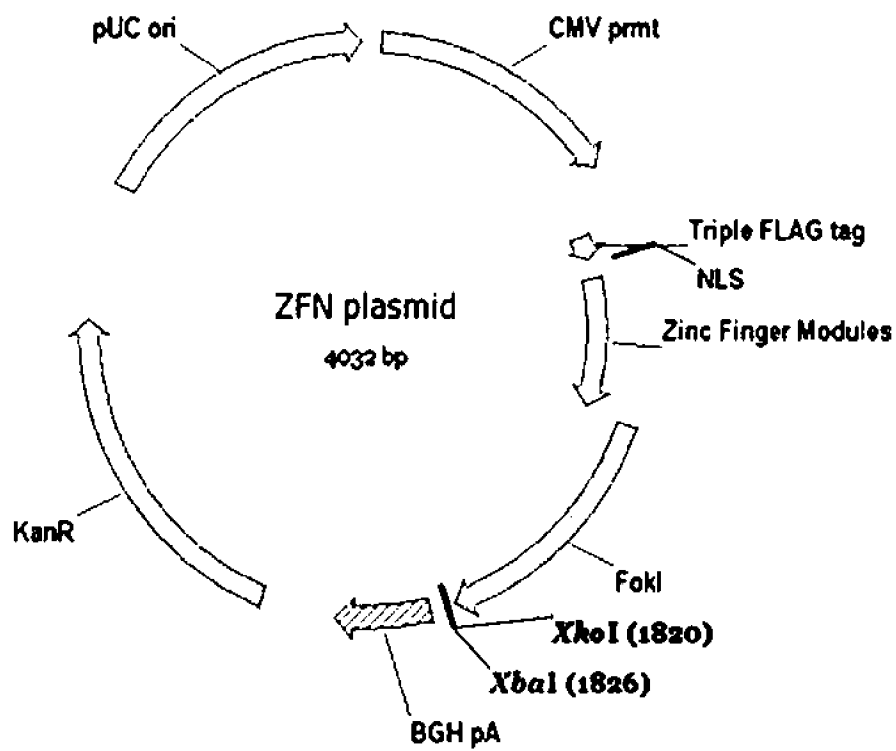
청구범위

- [청구항 1] CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 5'암(arm), PGKneopolyA 및 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 3'암(arm)을 순차적으로 포함하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 5'암(arm)은 서열번호 1에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 PGKneopolyA는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 3'암(arm)은 서열번호 3에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터는 도 4에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 타겟팅 벡터.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제5항의 벡터 및 징크-핑거 뉴클레이즈 벡터를 세포에 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 닉 아웃 세포를 제조하는 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 징크-핑거 뉴클레이즈 벡터는 도 1에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 닉 아웃 세포를 제조하는 방법.
- [청구항 8] 제 6항 또는 제7항의 방법에 의하여 제조된 CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제 닉 아웃 세포.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 닉아웃세포는 기탁번호 KCTC 12439BP로 기탁된 것을 특징으로 하는 닉 아웃 세포.
- [청구항 10] 난자를 구입하여 체외에서 성숙시킨 후 난자로부터 핵을 제거한 후 제8항 또는 제9항의 세포를 이식하고 융합을 실시한 후 생존한 융합난자만을 선별하여 대리모의 난관에 이식하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물을 제조하는 방법.
- [청구항 11] 제 10항의 방법에 의하여 제조된 인간을 제외한 복제동물을 사육한 후, 그 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 이종장기 생산방법.

[청구항 12]

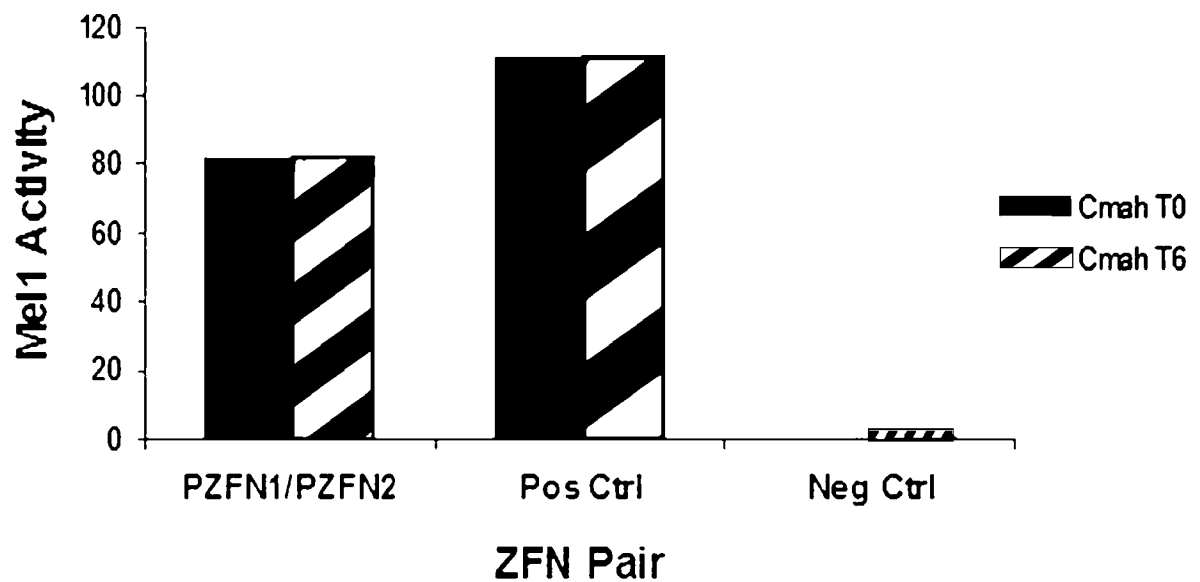
제 10항의 제조방법에 의하여 제조된 동물을 노화에 따른
청각상실 모델 또는 상처 치유 모델로 사용하는 방법.

[Fig. 1]

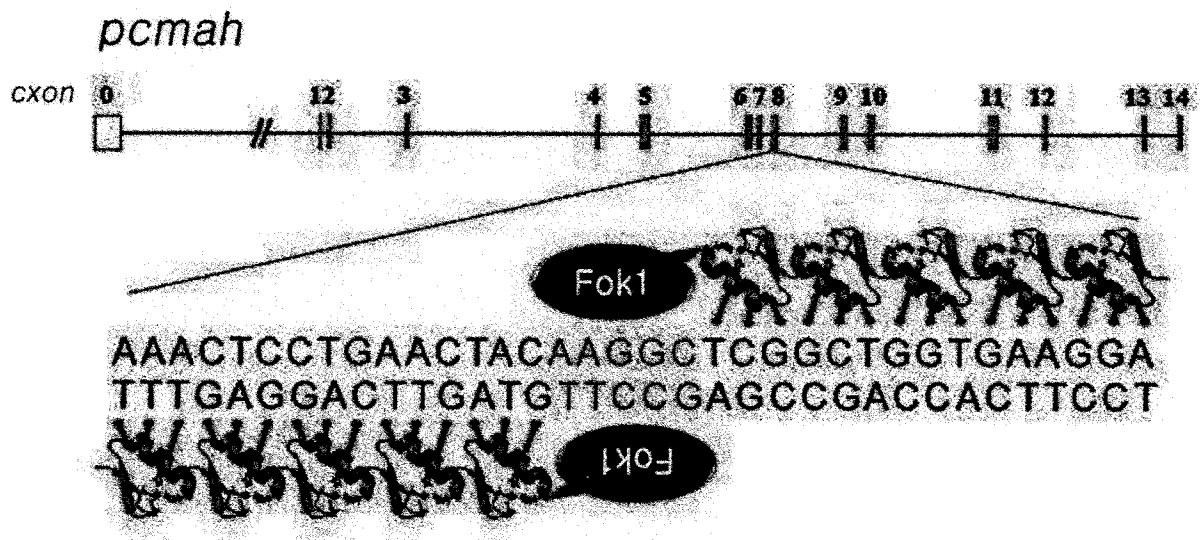


[Fig. 2]

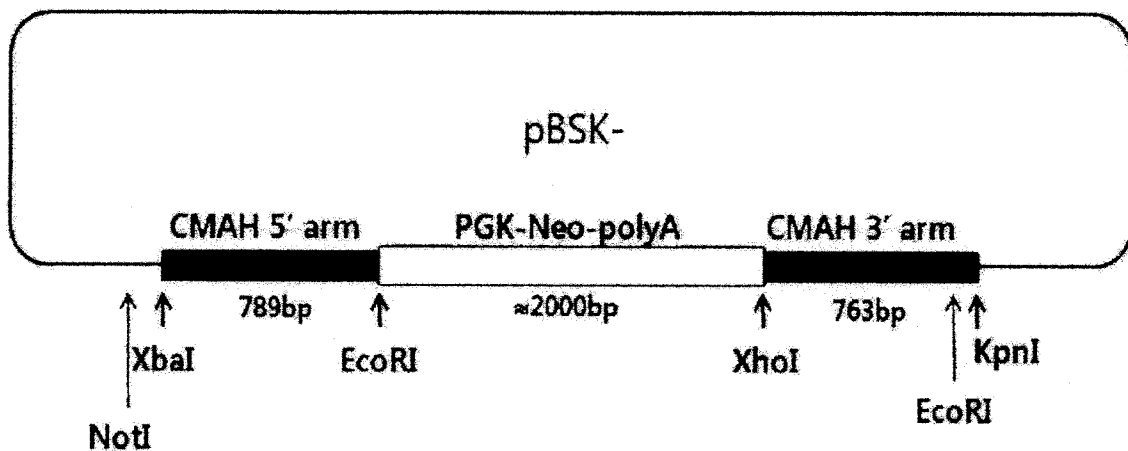
ZFN Activity for Cmah (Pig)



[Fig. 3]



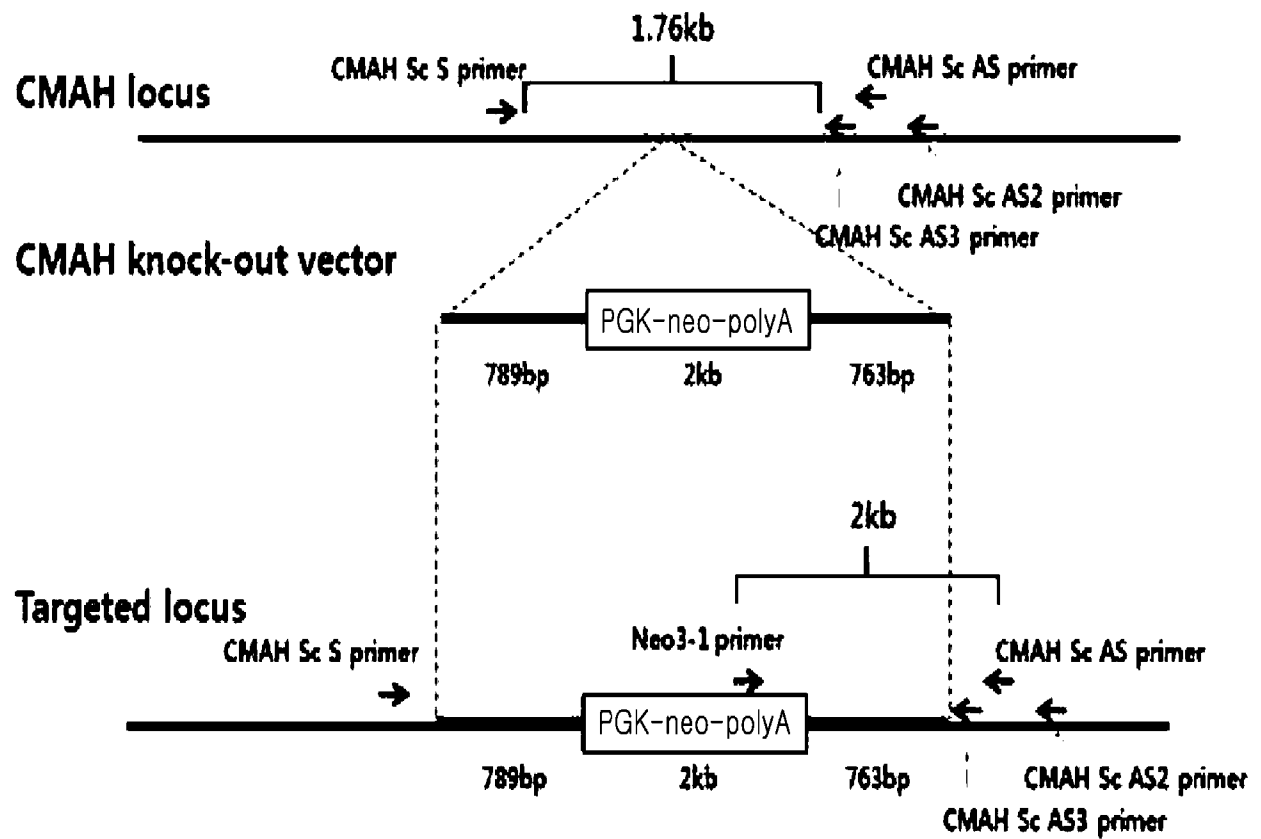
[Fig. 4]



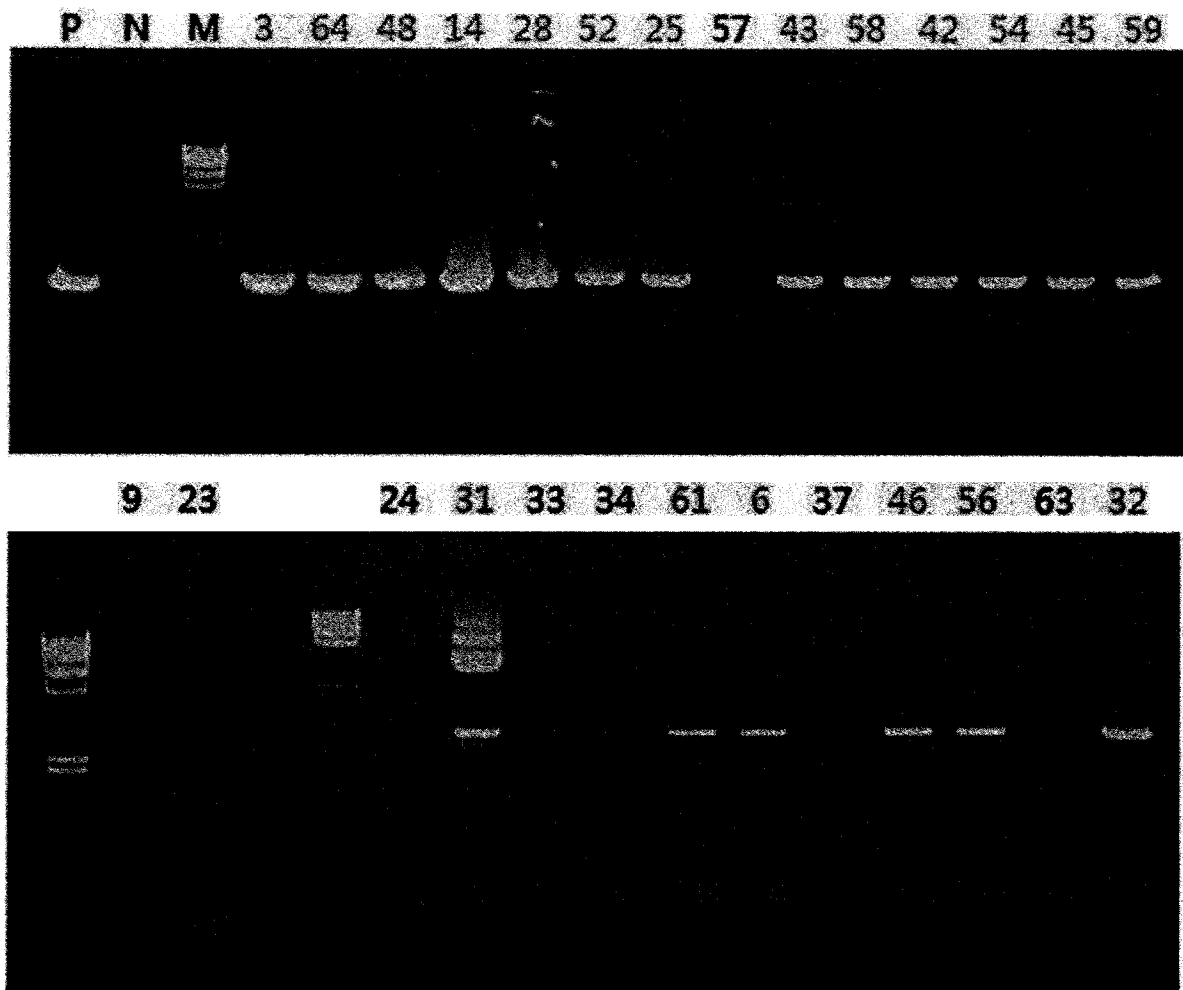
[Fig. 5]

TGCTCCATGAGAGCAGGGACCTGCTTTATCTTTGCTGGCCACTGTATTCACAGTGCTAGAACTACGCTGGCAGCATAGTAGGTGCTCAATAAATATCGATCAAATG
 AAAGATGAGCAAAAGCAACAAATGAACAACAATGTGAGGTAGGCATCATGATTCCATTCAACAGAGGAGAAAACAGACTTAAGGAAATTGAAGTGTGGAGCTGCAT
 TTGATCTTGACTGACTCGAACATCGATGCTCTTGACCAAGTGCACTCCAGAGGTAAAGAACATACCTTTAGTTTATATTTCCACCAAAATAACAAAGCCATGCG
 CCATGTTAGTAGAGGTTAATCGACAGTGGCTTAAATATGCATGCCACAGGATACAACTATGCATGCTGGCTGTGTTTTCAGTTGGAACGAAATGAATTGCG
 GTAAACAAAGGGGGGATTCATGCTTTGAGTAGTTTGGGATATTTCCTAGTAACCAAGTTTGCAAAATAAAGCCACTAATGACAGGAGCTTTGTTCTACTTCT
 GCATCACTCAACTGTCAATTTTATCTCTTGCAAGACTTTCTAATCTAGTAGAATTTTGTCTTCTGTGATTTCTGAACAGAGAGCTAAACGAAACCGCTGTGAT
 TCCAGAGGAATGGAAGAGCCCAATTCATTAAACAGAGAGGAAAGAACTCTGAAATTCACAGGCTAGGGGAGGCGCTTTTCCAGAGCAGTCTGGAGCATGGGCTT
 TAGCAGCCCGGCTGGGCAGTTGGGCGTACAGAGTGCGCTGTGGCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCGCCCTT
 CGCGCCAGCTTCTACTCTCCCTAGTCAGGAGTTCCCGCCCGCCCGCAGCTCGCTGCTGTGAGGAGGTGACAAATGGAGATAGCACTCTCACTAGTCTCGTG
 CAGATGGAAGCAAGCCCTGAGCAATGGAAGCGGTAGGCTTTGGGGAGCGGCCAAAGCAGCTTTGCTCTTCCGTTCTGGGTCAGAGCTGGGAAAGGGGTG
 GGTCGGGGCGGCTCAGGGGCGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCCGAAAGTCTCCGAGGCGCGGCAATTCGACAGCTTCAAGAGCGAGCTGTGCGCGCT
 GTTCTCTCTTCCGATCTCCGGGCTTGGAGCTGAGGCAATAAGGATCGGCAATGAACAGAGTGAATGACGCGAGCTTCTCCGGCGCTTGGGTGGAGAG
 GCTATTCGGCTATGACTGGGCAACAAGACAATCGGCTGCTGATGCGCGCTGTTCCGCTGTGAGCGCAGGGGCGCGGTTCTTTTGTCAAGAGCGAGCTG
 TCGGTGCGCTGAATGAAGTGGAGGAGAGGAGCGCGGCTATGGTGGCTGGCAGAGCGGGCTTCCGCGCAGCTGTGCTCGAGTTGTCATGAGAGGGGAA
 GGAGCTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGGGGGCAAGATCTGTGATCTCAGCTGGCTCTGGGAGAGGTAATATCATGATGGTGAATGAATGGGGGCT
 GCATAGCTTGGATCGGCTACCTGCGCAATTCGACCAACAAGCAACAATGCATCGAGGAGCAGCTACTCGAATGAAGCGGCTTGTGCGATCAGGATGATCTG
 GACGAGAGCATCAGGGGCTGGCGCAGCGCAAGTGTTCGCGAGGCTCAAGGGCGGCTAGCGGAGCGGAGGATCTGCTGATGAGGATGCTGCTTGC
 CGAATATCATGCTGGAAGAAAGCGGCTTTTCGGATTCATGAGCTGTGGCGGGCTGGGTGTTGGGGAGCGCTATCAGGAGATAGGCTTGGTACCGGTGATATGCG
 TGAAGAGCTTGGCGCGGAAAGGCTGAGCGCTTCTCTGCTTTAAGGATCGCGGCTCCGATTCGAGGCGCATGGCTTCTATCGGCTTCTTGTGAGGTTCTTTC
 TGAGGGGATCGGATCGCGTGAAGTCTGGAGAAATGATGAATCTATTAAAGAAATGAATGAGTGGCACTAAATGGAGAGTTTTCCTGTGATCTTTGTTAAGAGAG
 GTGAGAGCAGAGTACCTACATTTTGAATGGAAGGATGGAGCTAGGGGCTGGGCTGGGCTGGGATTAGAATAAGCGCTGCTCTTACTGAAGGCTCTTACTAT
 TGCTTATGATAAATGTTATAGTTGATATCAATTTTAAACAGCAAAACCAATTAAGGGCAGCTCAATTCCTCCACTCATGATCTATAGATCCCTCGAGCC
 TACAACCCAGAAATTAAGTGGCTTTCGCTGGGTAATTCGAGGATCCACCCAGCAGACAGATATGGCTGGATAATTTATATAAGGTGTTTACGCAATAGTTAATA
 TAGCTGAATGAGTGAATTTAGCTGTGAACAACAAGAAAGAGAAAGATGATTAGTGGGCTGTGAGCTTATTTAACAGCAGCCGGAAGACAGAGATATGA
 ATAAAAAATTAATACCATAGTGCTGATTAACCAATTATGTATATAGTCTTATACATCTAAGTTCAATTCGAATCGATATATGCTTATCTAAAAAAGAGT
 ATAGAGCCAGCTTCTTTGACTAACAGCTCTTCCCTAGTCAGGACATAGCTCAAGTATAGTCTTTATTTTCCTGGGTAAGAAAGAGGATGGGAGTAGG
 AAAGCAAGAAATAAAAAATAATGTCATGTTCAAAAGAGAAATGTCATCTGAAAATAAAGTGGCTTACATGGGAATGCTCTTATTTGTGAGGATATTAAGGA
 AACAAACATCAAAATGACCAATGAAGTCAACATCTTATCAAGAGAAATTCGAGGTGGTAACTGGACCCAGAGCTGAGGCCACTTGTATCGGGTAGGA
 TGCTAAGGAGCCACAGAGAGGTTGACTTGAAATTTACAGGGAGCAAAATGATTCGAATTTTTCATGTTTATGAGAGAAATAAGGGCATACTATGGCG
 TCTTGGCAGGTCCCTGTGGTACG

[Fig. 6]

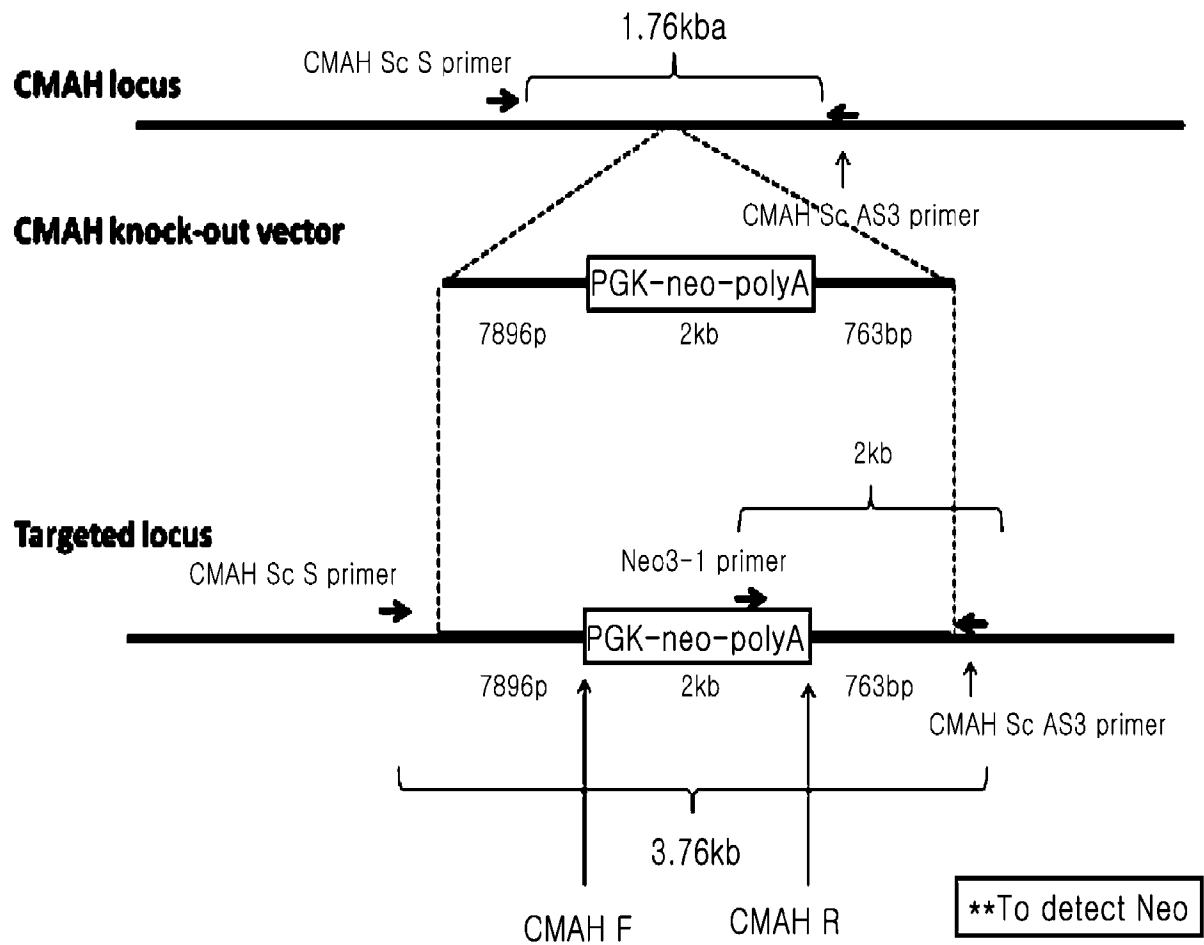
Screening Strategy of CMAH knock-out somatic cells in porcine

[Fig. 7]

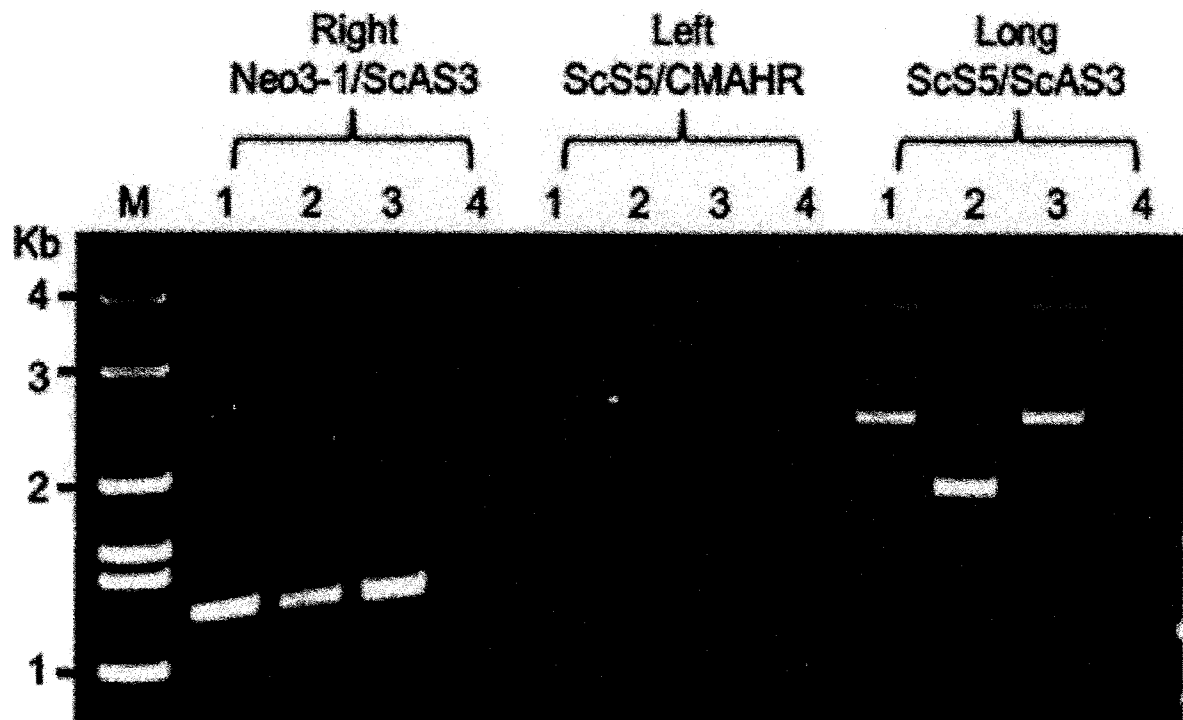


P; Positive control, N; Negative control, M; Marker

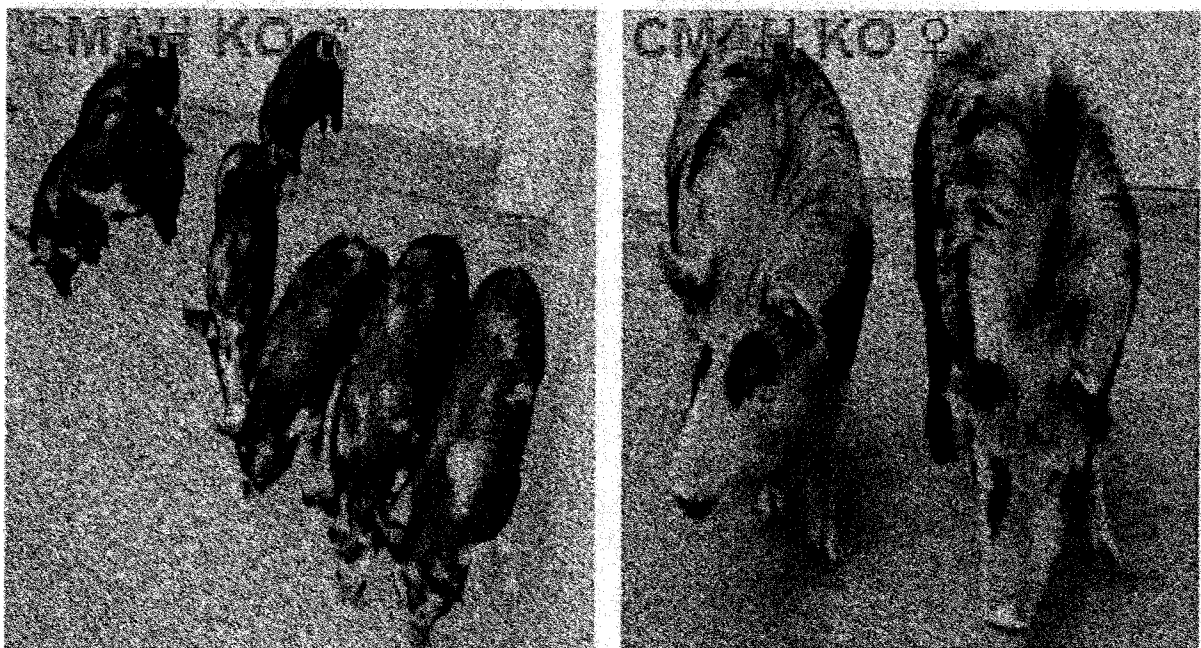
[Fig. 8]



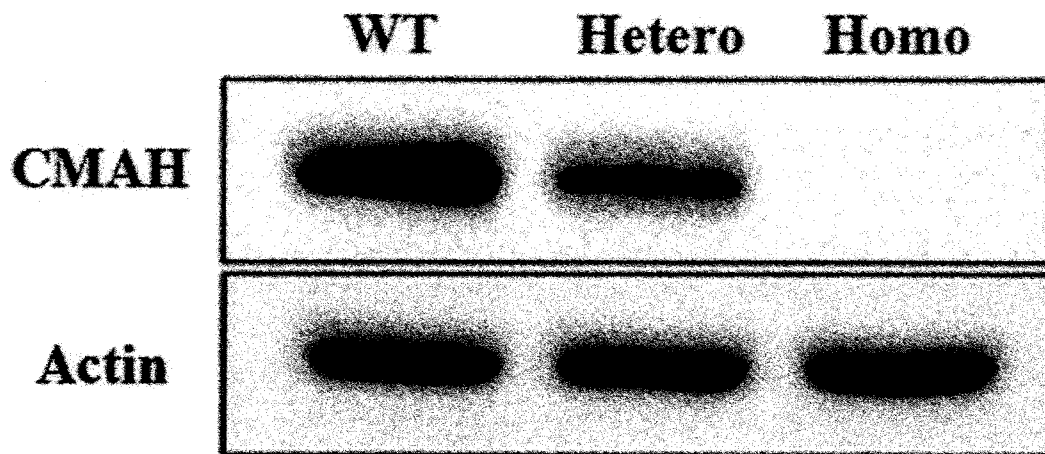
[Fig. 9]



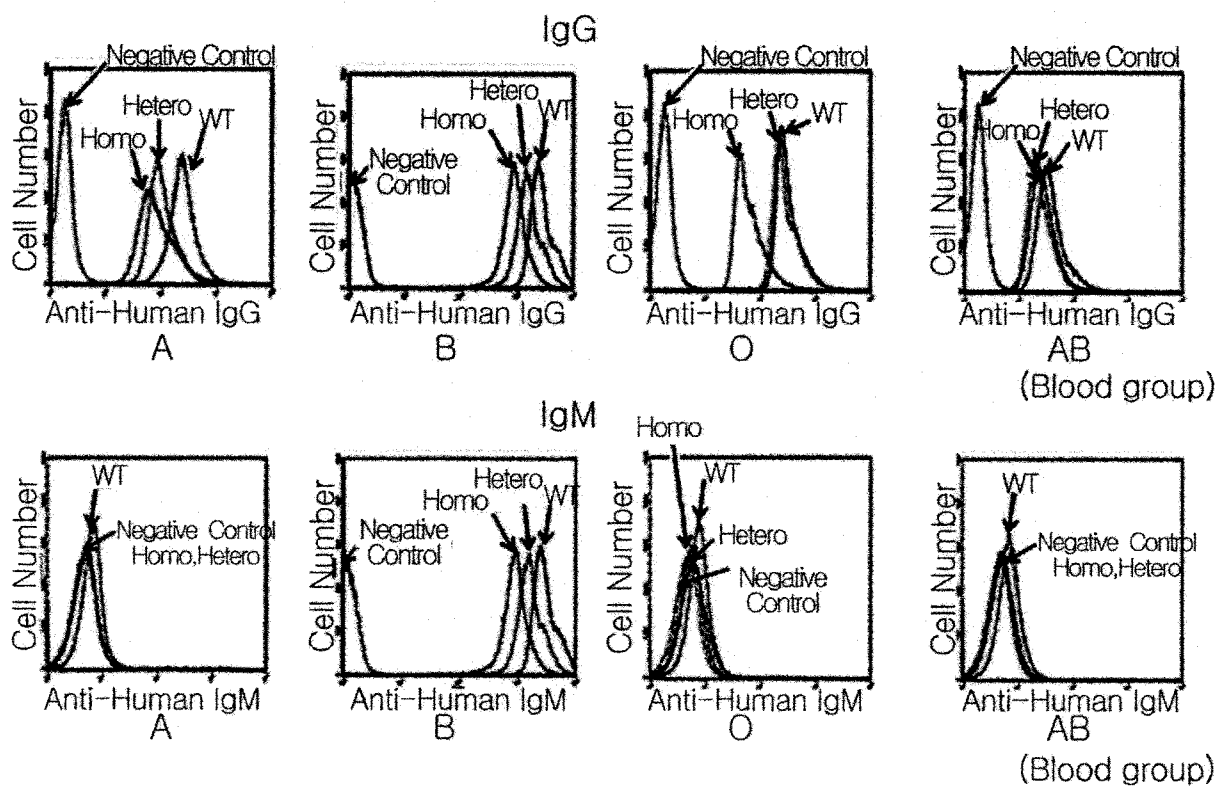
[Fig. 10]



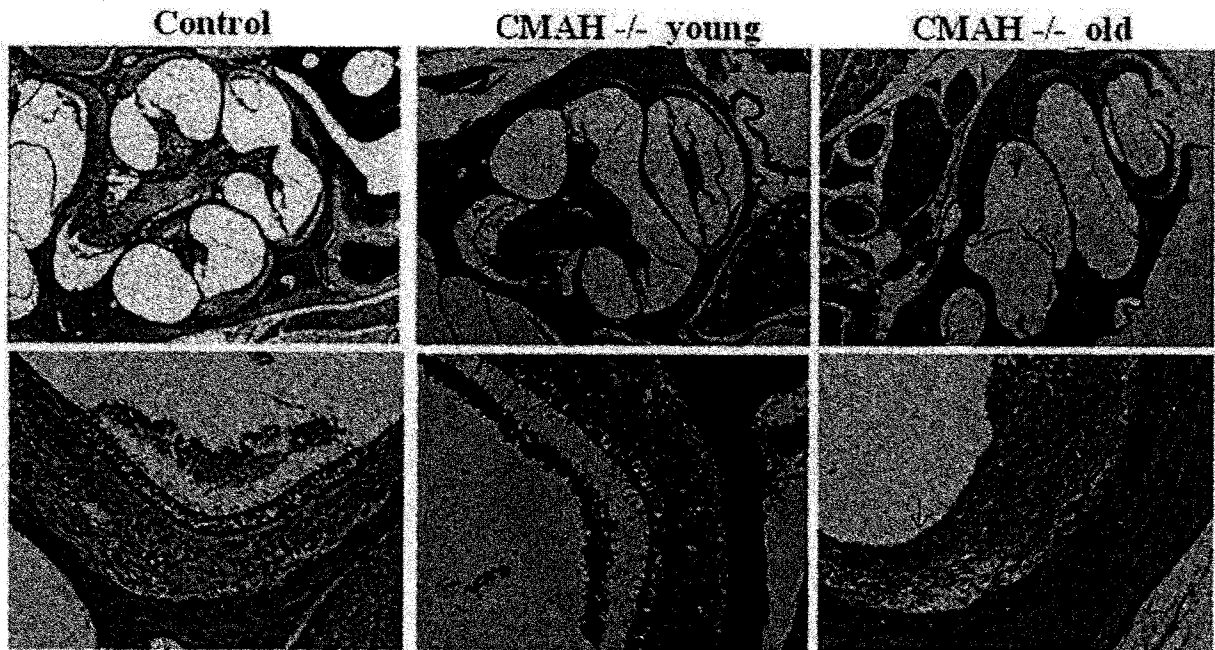
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007592**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/53(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63; C07H 21/04; C12P 21/00; C12N 5/10; C12N 15/89; C12N 9/02; C12N 15/09; A01K 67/027; C12N 15/53; C12N 9/00; C12N 15/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: targeting vector, CMP-acetylneuraminic acid hydroxylase, PGKneopolyA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, S. et al., "236 Gene targeting using zinc finger nucleases (ZFN) in the porcine fibroblast", Reproduction, Fertility and Development, 06 December 2011, vol.24, no.1, p.230 See abstract.	1-5
A	US 2009-0049562 A1 (KOIKE, Chihiro) 19 February 2009 See the entire document.	1-5
A	US 2006-0068479 A1 (KOIKE, Chihiro) 30 March 2006 See the entire document.	1-5
A	WO 2005-033303 A1 (KERYOS S.P.A.) 14 April 2005 See the entire document.	1-5
A	US 2013-0004992 A1 (LIN, Nan et al.) 03 January 2013 See the entire document.	1-5
PX	KR 10-2013-0048649 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP) 10 May 2013 See the entire document.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JANUARY 2014 (22.01.2014)

Date of mailing of the international search report

24 JANUARY 2014 (24.01.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007592

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KWON, DEUG-NAM et al., "Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs", Scientific Reports, 13 June 2013, vol. 3, no. 1981, pp. 1-10 See the entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007592

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **7-12**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 7 to 12 refer to claims 6, 8, and 10, which do not meet the requirement of PCT Rule 6.4(a), and unclear claims using the same. Thus, a meaningful international search cannot be carried out since the matter to be claimed is unclear.

3. ☒ Claims Nos.: **6, 8, 10**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/007592

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0049562 A1	19/02/2009	AU 2004-246022 A1 CA 2528500 A1 EP 1639083 A2 JP 2007-525955 A US 2005-223418 A1 US 7368284 B2 WO 2004-108904 A2 WO 2004-108904 A3	16/12/2004 16/12/2004 29/03/2006 13/09/2007 06/10/2005 06/05/2008 16/12/2004 08/02/2007
US 2006-0068479 A1	30/03/2006	AU 2005-243169 A1 CA 2565986 A1 EP 1745128 A2 US 7732180 B2 WO 2005-111204 A2 WO 2005-111204 A3	24/11/2005 24/11/2005 24/01/2007 08/06/2010 24/11/2005 30/10/2008
WO 2005-033303 A1	14/04/2005	EP 1668121 A1 US 2007-0154982 A1	14/06/2006 05/07/2007
US 2013-0004992 A1	03/01/2013	WO 2013-003767 A2	03/01/2013
KR 10-2013-0048649 A	10/05/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/53(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; C07H 21/04; C12P 21/00; C12N 5/10; C12N 15/89; C12N 9/02; C12N 15/09; A01K 67/027; C12N 15/53; C12N 9/00; C12N 15/85

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 타겟팅 벡터, CMP-아세틸뉴라미닌산 히드록실라아제, PGKneopolyA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, S. 외 4명, '236 Gene targeting using zinc finger nucleases (ZFN) in the porcine fibroblast', Reproduction, Fertility and Development, 06 December 2011, Vol.24, No.1, p.230 초록 참조.	1-5
A	US 2009-0049562 A1 (KOIKE, CHIHIRO) 2009.02.19. 전체 문헌 참조.	1-5
A	US 2006-0068479 A1 (KOIKE, CHIHIRO) 2006.03.30. 전체 문헌 참조.	1-5
A	WO 2005-033303 A1 (KERYOS S.P.A.) 2005.04.14. 전체 문헌 참조.	1-5
A	US 2013-0004992 A1 (LIN, NAN 외 5명) 2013.01.03. 전체 문헌 참조.	1-5
PX	KR 10-2013-0048649 A (건국대학교 산학협력단) 2013.05.10. 전체 문헌 참조.	1-5

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 01월 22일 (22.01.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 01월 24일 (24.01.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

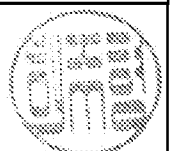
 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KWON, DEUG-NAM 외 13명, 'Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs', Scientific Reports, 13 June 2013, Vol.3. No.1981, pp.1-10 전체 문헌 참조.	1-5

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0049562 A1	2009/02/19	AU 2004-246022 A1 CA 2528500 A1 EP 1639083 A2 JP 2007-525955 A US 2005-223418 A1 US 7368284 B2 WO 2004-108904 A2 WO 2004-108904 A3	2004/12/16 2004/12/16 2006/03/29 2007/09/13 2005/10/06 2008/05/06 2004/12/16 2007/02/08
US 2006-0068479 A1	2006/03/30	AU 2005-243169 A1 CA 2565986 A1 EP 1745128 A2 US 7732180 B2 WO 2005-111204 A2 WO 2005-111204 A3	2005/11/24 2005/11/24 2007/01/24 2010/06/08 2005/11/24 2008/10/30
WO 2005-033303 A1	2005/04/14	EP 1668121 A1 US 2007-0154982 A1	2006/06/14 2007/07/05
US 2013-0004992 A1	2013/01/03	WO 2013-003767 A2	2013/01/03
KR 10-2013-0048649 A	2013/05/10	없음	

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 7-12
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제7항 내지 제12항은 PCT 규칙 제6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 청구항 제6, 8, 10항 및 이를 인용하는 불명료한 청구항을 인용하고 있어 청구하는 바가 불명료하므로 유효한 국제조사를 할 수 없습니다(PCT 제6조).
3. ☒ 청구항: 6, 8, 10
이 청구항은 종속청구항이나 PCT 규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.