



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0106715
(43) 공개일자 2022년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0656 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(21) 출원번호 10-2022-0009646

(22) 출원일자 2022년01월24일

심사청구일자 2022년01월24일

(30) 우선권주장

1020210009575 2021년01월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

성영훈

서울시 강북구 도봉로 47길 26, 401호(미아동, 오봉예체뜰안)

강병철

서울특별시 종로구 대학로 103 서울대학교 의과대학 융합관404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

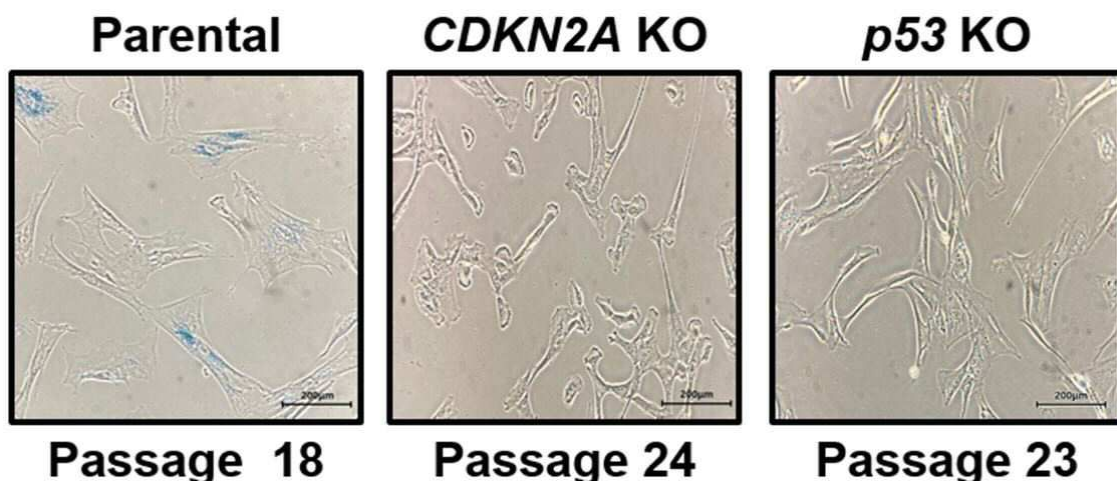
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 불멸화된 마모셋 세포주 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 불멸화된 마모셋 유래 세포주 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 INK4A/ARF 또는 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된 불멸화된 마모셋 유래 세포주, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 불멸화 세포주 확립 기술은 INK4A/ARF 및 p53 유전자 중 필요에 따라 벗어나 유전형질을 선택할 수 있고 CRISPR-Cas9 시스템뿐만 아니라 특정 유전자의 조작 (genetic engineering)이 가능한 기술을 적용하여 일부 변형이 가능하며, 피부 섬유아세포뿐만 아니라 다양한 조직유래 1차 세포에 확장하여 적용할 수 있는바, 이를 통해 연구 목적에 맞게 다양한 조직유래의 불멸화 세포주를 제조할 수 있으며, 이들 세포주는 신약개발에 필요한 다양한 독성실험이나 효능평가 연구에 활용이 가능하다. 특히, 제조된 세포주는 마모셋을 활용한 연구의 안전성을 보장하고 발전시키는 데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

C12N 2510/04 (2013.01)

C12N 2740/15043 (2013.01)

(72) 발명자

정연주

서울특별시 동대문구 사가정로12길 26(전농동)

조정인

전라남도 목포시 영산로535번길 6, 102동 501호(상동, 호반리젠시빌)

곽진아

서울특별시 중로구 대학로 103 서울대학교 의과대학 융합관404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711113404

과제번호

2018R1A2B6002192

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

중견연구자지원사업

연구과제명

CRISPR-Cpf1 Knockin 마우스 제작을 통한 새로운 질환모델마우스 확립 전략에 관한

연구

기 여 율

1/2

과제수행기관명

울산대학교 산학협력단

연구기간

2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711110568

과제번호

2020R1A2C2013101

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

개인기초연구(중견연구)

연구과제명

첨단바이오의약품 개발을 위한 비임상연구용 SCID Rat 및 SCID 마모셋원숭이 모델의

확립과 그 활용 연구

기 여 율

1/2

과제수행기관명

서울대학교 산학협력단

연구기간

2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 기탁번호 KCLRf-BP-00505인 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 CDKN2A 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 INK4A 및 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이가 유도된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기서열로 표시되는 가이드 RNA가 도입된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 6

p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 기탁번호 KCLRf-BP-00504인 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가이드 RNA가 도입된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 9

제1항 또는 제6항에 있어서,

상기 세포주는 마모셋의 피부 섬유아세포에서 유래된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이가 유도된 것을 특징으로 하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주.

청구항 11

마모셋 유래 1차 세포에서 INK4A 및 ARF 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법.

청구항 12

마모셋 유래 1차 세포에서 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 단계는 INK4A와 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2를 표적하는 CRISPR-Cas9 편집 시스템을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 단계는 INK4A 및 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 단계는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프를 암호화하는 엑손 7을 표적하는 CRISPR-Cas9 편집 시스템을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 단계는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 불멸화된 마모셋 세포주 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 INK4A/ARF 또는 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 차단 또는 정상적 활성이 억제된 돌연변이 단백질의 발현으로 불멸화된 마모셋 세포주, 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비인간 영장류는 인간과 가장 가까운 생물학적 특성을 가지고 있으며, 특히 해부, 생리, 질병, 인지 등의 영역에서 상당 부분이 인간과 유사하다. 따라서 비인간 영장류는 인간을 대신한 실험동물 모델로서 쥐와 같은 실험동물 등과 견줄 수 없을 만큼 유용한 실험동물이며, 이러한 이유로 원숭이는 사람과 유사성이 있는 생의학 및 행동학의 연구에 많이 이용되고 있다. 예컨대, 실험동물로써 원숭이의 사용은 뇌과학 연구에 있어서 중요하게 이용되고 있는데, 인간의 뇌를 이해하고 뇌 질환을 극복하고자 인간의 전두엽 피질 및 행동 특성이 비슷한 원숭이를 뇌연구에 이용하고 있다. 또한, 인간에 대한 시험물질의 독성을 예측하고 자료를 확보하기 위한 안전성 평가 및 효능 평가를 진행하며, 장기이식, 줄기세포 연구 등에도 이용된다.

[0004] 이러한 비인간 영장류 모델로써 기존에는 필리핀 원숭이 (Cynomolgus monkey)나 붉은털원숭이 (Rhesus monkey) 등 macaque류 원숭이가 연구에 많이 사용되어 왔다. 그러나 모델 동물의 크기로 인한 전용 사육시설의 확보, 취급기술의 어려움, 인수공통감염증의 대책, 멸종위기 동식물 사용에 대한 문제 (CITES)가 있으며, 또한 유래의 불안정성 등에 대한 문제점들이 있었다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방안으로 최근 소형 원숭이인 마모셋 (common marmoset)이 주목받고 있다.

[0005] 마모셋 (명주원숭이)은 비단원숭이과 (Callitrichidae)에 속하고 하위의 피그미마모셋속 (Cebuella), 루스말렌 난쟁이마모셋속 (Callibella), 비단마모셋속 (Callithrix) 및 미코속 (Mico)에 포함되는 21종의 신세계원숭이의 총칭이다. 사람과 유사한 영장류임에도 비교적 사육이 간단하고 취급이 용이하다. 또한, 질병이 적으며, 인공번식이 용이하고 실험동물로써 안정적인 생산과 공급이 가능하다는 장점이 있다. 더욱이, 성체 체중이 200~500g 정도로써 최근 신약개발, 의료기기의 효능/안전성 연구분야 뿐만 아니라, 세포치료제 및 장기이식 연구에도 유용하여 선진각국에서 질환 모델동물로서 저변이 확대되고 있는 추세이다.

[0006] 마모셋을 이용한 연구가 보다 보편화되기 위해서는 동물실험에 들어가기 전에 다양한 세포주를 이용한 실험이 선행되어야만 한다. 인간의 경우 다양한 암으로부터 유래된 불멸화된 암세포주가 널리 사용되지만, 마모셋의 경우 현재로써는 불멸화된 세포주의 종류가 매우 제한적이다. 최근에는 piggyBac transposon을 이용하여 인간의 telomerase catalytic subunit (hTERT) 유전자를 마모셋의 피부 섬유아세포에 주입하여 불멸화시킬 수 있음이 보고된바 있으나, 아직까지도 극소수의 세포주만이 개발되어 있는바, 본 발명자들은 외부 유전자의 도입 없이 마모셋의 다양한 조직 유래 세포에 적용 가능한 불멸화 세포주 제작 기술을 확립하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) PLoS One. 2018 Sep 27;13(9):e0204580.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 외부 유전자의 도입 없이 마모셋의 다양한 조직 유래 세포에 적용 가능한 불멸화 세포주의 제작 기술을 확립하기 위해 유전자 녹아웃을 이용한 불멸화 세포 제작 시스템에 근거하여 연구노력한 결과, CRISPR-Cas9 유전자 편집 기술을 이용해 마모셋 유래 일차 피부 섬유아세포에서 INK4A/ARF 또는 p53 유전자의 녹아웃을 유도하여 불멸화된 마모셋 세포주를 확립하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 이에, 본 발명의 목적은 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 세포주는 마모셋의 피부 섬유아세포에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 기탁번호 KCLRF-BP-00505 또는 기탁번호 KCLRF-BP-00504인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기서열로 표시되는 가이드 RNA가 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 CDKN2A 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가이드 RNA가 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 INK4A와 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이가 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이가 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 마모셋 유래 1차 세포에서 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계는 INK4A 및 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2를 표적하는 CRISPR-Cas9 편집 시스템을 이용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단계는 INK4A 및 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이

를 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 또한, 본 발명은 마모셋 유래 1차 세포에서 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프를 암호화하는 엑손 7을 표적하는 CRISPR-Cas9 편집 시스템을 이용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단계는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이를 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에서는 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 마모셋 유래 피부 섬유아세포에서 INK4A/ARF 또는 p53을 각각 녹아웃시킴으로써 외래 유전자의 도입 없이 마모셋 유래 불멸화 세포주를 확립하였다. 본 발명에 따른 불멸화 세포주 확립 기술은 INK4A/ARF 및 p53 유전자 중 필요에 따라 녹아웃 유전형을 선택할 수 있고 CRISPR-Cas9 시스템뿐만 아니라 특정 유전자의 조작 (genetic engineering)이 가능한 기술을 적용하여 일부 변형이 가능하며, 피부 섬유아세포뿐만 아니라 다양한 조직유래 1차 세포에 확장하여 적용할 수 있다. 이를 통해 연구 목적에 맞게 다양한 조직유래의 불멸화 세포주를 제조할 수 있으며, 이들 세포주는 신약개발에 필요한 다양한 독성실험이나 효능평가 연구에 활용이 가능하다. 특히, 제조된 세포주는 마모셋을 활용한 연구의 안전성을 보장하고 발전시키는 데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1a 내지 도 1d는 마모셋 1차 세포에서 CRISPR-Cas9을 이용하여 p53 locus를 녹아웃 시킨 결과를 나타낸 것이다. 도 1a는 p53 단백질의 DNA-binding motif를 암호화하는 exon 7 부위를 공략할 수 있는 sgRNA를 디자인한 것이다. 도 1b는 CRISPR-Cas9에 의한 p53 locus 타겟팅 후 혼합 세포 군집(population)에서의 T7E1 assay 결과를 나타낸 것으로 빨간 화살표는 T7E1에 의해 잘린 부분을 나타낸다. (-), parental skin fibroblasts; (+), p53 KO. 도 1c는 Colony picking을 통한 다양한 클론을 생산하여, 생어시퀀싱을 통해 p53 locus의 genotype 조사 결과를 나타낸 것이다(빨간색: Spacer, 파란색: PAM(protospacer adjacent motif)). 도 1d는 p53 KO 세포주에서의 p53 단백질 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2e는 마모셋 1차 세포에서 CRISPR-Cas9을 이용하여 INK4A/ARF locus 녹아웃 시킨 결과를 나타낸 것이다. 도 2a는 INK4A와 ARF 유전자에 공통적으로 존재하는 exon 2를 공략하는 sgRNA를 디자인한 것이다. 도 2b는 CRISPR-Cas9에 의한 INK4A/ARF locus 타겟팅 후 혼합 세포 군집(population)에서의 T7E1 assay 결과를 나타낸 것으로 빨간 화살표는 T7E1에 의해 잘린 부분을 나타낸다. 도 2c는 Colony picking을 통한 다양한 clone을 생산하여, 생어시퀀싱을 통해 INK4A/ARF locus의 genotype 조사 결과를 나타낸 것이다(빨간색: Spacer, 파란색: PAM). 도 2d는 INK4A와 ARF KO 세포주에서 p16^{INK4A} 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 2e는 INK4A와 ARF KO 세포주에서 p14^{ARF} RNA의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 INK4A/ARF KO 마모셋 세포주와 p53 KO 세포주의 세포수 배가 수준(population doubling level; PDL) 및 세포노화, 즉 불멸화를 확인한 결과이다. 도 3a는 모세포주, INK4A/ARF KO, p53 KO 풀링 세포 및 클론 세포주를 배양하여 세포수 배가 수준을 측정한 결과이다. 도 3b는 노화가 진행된 세포의 핵에 특이적으로 염색이 되는 SA β -gal assay를 통하여 모세포에만 특이적으로 염색된 것을 확인한 것이다.

도 4a 내지 도 4f는 INK4A/ARF KO 세포주 및 p53 KO 세포주의 p53 반응성을 조사한 결과이다. 도 4a는 내독성 스트레스(endotoxin stress)에 대한 마모셋 세포의 반응성을 확인하기 위해 모세포주(parental), INK4A/ARF KO, 및 p53 KO 마모셋 세포주에 아드리아마이신(Adr)을 200 ng씩 4시간 동안 처리한 후, p53과 p53 표적유전자로 알려진 MDM2와 p21^{WAF1} 단백질의 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 측정한 결과이다. 도 4b는 도 4a와 동일한 방식으로 진행된 샘플로 RNA를 추출한 후 RNA의 수준을 반정량적 RT-PCR을 통해 측정한 결과이다. 도 4c는 내독성 스트레스에 대한 마모셋 세포주의 반응성을 확인하기 위해, 모세포주, INK4A/ARF KO, 및 p53 KO 마모셋 세포주에 에토포사이드(Etop)를 0.5 μ M씩 4시간 동안 처리한 후, p53과 p53 표적유전자로 알려진 MDM2와 p21^{WAF1} 단

백질의 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 측정한 결과이다. 도 4d는 도 4c와 동일한 방식으로 진행된 샘플로 RNA를 추출한 후 RNA의 수준을 반정량적 RT-PCR을 통해 측정한 결과이다. 도 4e는 유전자 독성 스트레스 (Genotoxic stress)에 대한 마모셋 유래 세포의 반응성을 확인하기 위해 모세포주 및 INK4A/ARF KO 세포에 시스플라틴 (Cisp) 또는 에토포사이드 (Etop)를 각각 처리한 후, p53 및 p53의 표적 유전자인 EI24와 p21^{CIP1} 단백질의 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 측정한 결과이다. 도 4f는 p53 KO 세포 클론에서 p53 수준을 확인한 결과로써 p53 KO 클론 #4에 시스플라틴 (Cisp) 또는 에토포사이드 (Etop)를 각각 처리한 후, p53 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 측정한 결과이다.

도 5a 및 도 5b는 모세포주, INK4A/ARF KO 세포주의 cDNA를 이용하여 마모셋 p14^{ARF} 서열을 확인한 것이다. 도 5a는 p14^{ARF}의 엑손 및 인트론을 표시한 것이다. 도 5b는 p14^{ARF} 마모셋 서열을 알아내기 위해 모세포주, 및 INK4A/ARF KO 세포주의 cDNA를 이용하여 p14^{ARF} 부분을 RT-PCR한 뒤 그 생산물을 이용하여 TA 클로닝을 진행한 결과이다. 그 결과, 마모셋 p14^{ARF}의 염기서열 변화가 있음을 확인하였다.

도 6은 마모셋 개체별 p14^{ARF}의 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다. 실험에 사용한 개체 뿐만 아니라 부모형제 모두 다른 개체의 gDNA를 이용하여 p14^{ARF} 부분을 시퀀싱한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명은 불멸화된 마모셋 유래 세포주 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명자들은 CRISPR-Cas9 유전자 편집 기술을 이용해 마모셋 유래 일차 피부 섬유아세포에서 INK4A/ARF 또는 p53 유전자를 각각 녹아웃시켜 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 확립하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.
- [0037] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0039] 본 발명은 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된, 불멸화된 마모셋 유래 세포주를 제공한다.
- [0041] 본 발명에서, '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.
- [0042] 본 발명에서, '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)' 또는 '핵산'은 단일 또는 이중 가닥의 형태로 된 데옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid, RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 일반적으로 DNA는 아데닌(adenine, A), 구아닌(guanine, G), 시토신(cytosine, C), 티민(thymine, T) 등 네 가지 염기로 구성되어 있으며, RNA는 티민 대신 우라실(Uracil, U)을 가지고 있다. 핵산 이중 가닥에서 A는 T 또는 U, C는 G 염기와 수소결합을 이루는데, 이러한 염기의 관계를 '상보적(complementary)'이라고 한다.
- [0043] 한편, 'mRNA(messenger RNA 또는 전령 RNA)'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 리보솜(ribosome)으로 전달하여 폴리펩티드 합성(단백질 번역, translation)의 청사진 역할을 하는 RNA이다. 유전자를 주형(template)으로 하여 단일 가닥의 mRNA가 전사(transcription) 과정을 통하여 합성된다.
- [0044] 상기 마모셋은 마모셋원숭이 또는 명주원숭이라고도 하며, 현재 미국, 유럽, 일본 등에서 뇌질환 연구를 비롯한 다양한 분야에서 실험동물로 이용되고 있다. 마모셋은 실험용 설치류인 랫트와 유사한 크기로 소형이면서 성품이 온순해 관리가 쉽고 번식력이 좋다는 장점이 있어, 일본에서는 유전자 변형 마모셋을 제작하여 파킨슨, 알츠하이머, 면역부전 등의 연구에 활용하고 있으며, 최근 국내에서도 마모셋을 이용한 비인간 영장류 모델에 관심이 높아지고 있다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "INK4A"는 CDK4 또는 CDK6 억제제의 패밀리에 속하는 하나로서, ARF/INK4b 유전자좌와

함께 3개의 유전자(p15^{INK4b}, ARF, 및 p16^{INK4a})를 암호화한다. P16^{INK4a} 및 ARF는 엑손 2 및 엑손 3이 동일하며, 이들에 접합된 서로 다른 엑손 1을 가지고 있다. 엑손 2 및 엑손 3은 p16^{INK4a}와 ARF가 공유하지만, 단백질은 동형이 아니며 아미노산 상동성을 공유하지 않는다. p16 및 p14^{arf} 둘 다 세포주기를 조절하여 종양 억제 인자로 작용한다. p16은 사이클린 의존성 키나제 4 및 6(CDK4 및 CDK6)을 억제하여 G1에서 S기로의 횡단을 차단하는 단백질의 망막모세포종(Rb) 패밀리를 활성화시킨다. p14^{ARF}(마우스에서는 p19^{ARF}로 알려짐)는 p53 종양 억제인자를 활성화한다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어, "CDKN2A" 유전자는 INK4 계열 패밀리 멤버인 p16(또는 p16^{INK4a}) 및 p14^{arf}를 포함한 두 개의 단백질을 코딩한다. 본 발명의 일 실시예에서는 INK4A 및 ARF를 Nickout 시킴에 따라 CDKN2A가 Nickout됨을 확인하였다 (도 2b 및 도 3b 참조).

[0047] 본 발명에서 사용되는 용어, "p53"은 세포자멸(apoptosis)라는 복잡한 신호 경로를 통해 손상된 세포에 메시지를 표시하고 세포주기에 영향을 주는 단백질로서, 대표적인 암 억제 단백질이다. 본 발명의 일 실시예에서는 마모셋 유래 세포주에서 p53을 Nickout (KO) 시킴에 따라 세포주가 불멸화됨을 확인하였다.

[0048] 본 발명에 있어서, CDKN2A 유전자는 NCBI Reference Sequence: XM_035306720의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명에 있어서, p53 유전자는 NCBI Reference Sequence: XM_002747948의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어, "세포주"는 마모셋의 조직에서 세포를 분리하여 연속적인 계대 배양을 통하여 세포주화한 세포를 의미하며, "주화세포" 및 "세포"와 혼용하여 사용한다.

[0051] 본 발명에서 사용되는 용어, "불멸화 세포주"란 정상세포로 무한 증식할 수 있는 능력을 지닌 세포주로, 바람직하게는 영양이 공급되는 조건에서 무한히 증식할 수 있는 세포를 의미하는 것으로, 보다 바람직하게 본 발명에 따른 불멸화 세포주는 마모셋 조직, 더욱 바람직하게는 마모셋의 피부 섬유아세포가 불멸화된 세포를 의미한다.

[0052] 본 명세서에서, "계대(passage)"는 희석하거나 하지 않고, 또는 희석함 없이, 하나의 배양 용기로부터 다른 용기로 세포를 전달하는 것을 의미한다. 세포가 한 용기에서 다른 용기로 이송될 때마다, 세포의 특정 부분이 걸릴 수 있으므로, 의도되었던 또는 의도되지 않았던 간에 세포의 희석이 일어날 수 있다. 이 용어는 용어 "2차 배양(subculture)"과 같은 의미이다. 계대 배양의 수는 세포가 배양되는 횟수로서, 새로운 용기 내로 2차 배양되거나 이송되어 현탁액 또는 부착 상태로 성장한다. 이 용어는 개체군 배가 또는 세포 개체군이 복제하는데 필요한 시간, 즉 세포 집락 중 개개의 세포가 복제하는데 대체로 걸리는 시간과 동의어가 아니다.

[0053] 본 명세서에서, 상기 세포주는 20 내지 45℃, 23 내지 40℃, 27 내지 40℃, 30 내지 40℃, 33 내지 40℃, 35 내지 40℃, 35 내지 39℃, 36 내지 38℃, 또는 약 37℃의 배양 온도에서 배양되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에서는, 마모셋으로부터 분리된 일차 피부 섬유아세포를 수득한 뒤, INK4A/ARF 유전자 또는 p53 유전자의 엑손 부위에 돌연변이를 유도하였다. 이에 INK4A/ARF KO 세포주 및 p53 KO 세포주가 23회의 계대 이상으로 배양되었음에도 불구하고 노화되지 않을 뿐만 아니라 모세포주와 비교하여 더블링 되는 속도가 유의미하게 증가되었음을 확인하였다(실시예 4 참조). 따라서, 본 발명의 마모셋 유래 세포주가 불멸화되었음을 확인하였다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어, "유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된"은 INK4A/ARF 유전자 또는 이의 단백질, 또는 p53 유전자 또는 이의 단백질의 기능이 저해 또는 방해되는 것을 의미한다. 이와 같은 저해 또는 방해는 상기 각각의 유전자의 전사를 방해하거나, 또는 각각의 유전자 mRNA의 번역을 저해함으로써 이루어질 수 있다. 또는 각 단백질의 활성 부위에 특이적으로 결합하거나, 단백질 구조 변형을 일으킴으로써, 각 단백질의 활성을 감소 또는 불활성화시킬 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 INK4A와 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이가 유도된 것일 수 있으며, 바람직하게는 삽입결실 돌연변이가 발생하여 상기 유전자가 Nickout (knock-out)된 것일 수 있다.

[0057] 상기 "Nickout(knock-out, KO)"은 외부에서 DNA의 유전자 결손을 유발하여 정상 유전자에 완전 불활성화를 유도

하는 것을 의미한다. 본 발명에서는 INK4A 및 ARF 유전자; 또는 p53 유전자를 녹아웃시킴으로써, 마모셋 유래 세포주의 불멸화를 유도한 것이다.

- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이가 유도된 것일 수 있으며, 바람직하게는 삽입결실 돌연변이가 일어나 야생형 p53의 정상적 기능이 소실되어 불활성화가 유도된 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기서열로 표시되는 가이드 RNA가 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 불멸화된 마모셋 유래 세포주는 서열번호 3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가이드 RNA가 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 가이드 RNA의 도입은 표적 유전자 타겟용 가이드 RNA를 포함하는 발현백터를 사용하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 여기서, '발현 벡터'란 적당한 숙주세포에서 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 단백질의 발현을 조절할 수 있는 조절 서열(control sequences)이 작동 가능하도록 연결된 DNA 서열 및 기타 유전자 조작을 용이하게 하거나 단백질의 발현을 최적화하거나 또는 벡터의 복제에 필요한 서열들을 함유하는 DNA 구조물(DNA construct)을 말한다. 상기 조절 서열에는 전사를 조절하기 위한 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위해 선택적으로 부가된 오퍼레이터(operator), 적절한 mRNA 리보솜 결합 부위 및 전사/번역의 종료를 조절하는 서열들이 포함된다.
- [0063] 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 마모셋 유래 1차 세포에서 CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 표적 유전자의 녹아웃을 실시하여 불멸화 특성을 갖는 세포주를 확립하였다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서는, p53 유전자 내 DNA-결합 모티프의 exon 7을 표적하는 sgRNA를 디자인하고 이를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 제작하여 동일한 방법으로 세포를 감염시키고 클론 세포를 확립하여 염기서열 분석을 실시한 결과, 다양한 형태의 삽입결실 돌연변이가 발생했음을 알 수 있었다 (실시예 2 참조).
- [0065] 또한, 확립된 클론 세포주 #4의 세포수 배가 수준을 측정한 결과, 모세포주와 비교하여 1.5배 이상 잘 자람을 확인하였으며, SA β -gal 선별 분석 결과 20 계대 이상에서도 세포의 노화가 일어나지 않음을 확인하였다 (실시예 4 참조).
- [0066] 또한, 확립된 클론 세포주에 아드리아마이신, 시스플라틴, 또는 에토포사이드를 각각 처리하고 p53, p53 표적 유전자인 p21, 및 MDM2의 발현수준을 분석한 결과 야생형 보다 작은 크기의 p53 단백질이 일정하게 높은 수준으로 발현되는 것을 통해 기능이 소실된 돌연변이 p53 단백질이 발현되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 불멸화된 마모셋 세포주가 확립된 것을 알 수 있었다 (실시예 5 참조). 이에, 상기 과정을 통해 확립된 세포주 "Marmoset p53 KO #4"를 한국세포주연구재단 (Korean Cell Line Research Foundation; KCLRF)에 기탁번호 KCLRF-BP-00504로 기탁하였다.
- [0067] 본 발명의 다른 실시예에서는, INK4A/ARF locus의 exon 2를 표적하는 sgRNA를 디자인하고 이를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 제작하였다. 상기 벡터를 Cas9 발현 벡터와 함께 마모셋 유래 피부 섬유아세포에 감염시키고, 바이러스에 감염된 세포만을 선별한 후 클론 세포를 확립한 다음 sgRNA의 표적 영역에 대하여 T7E1 어레이 및 염기서열 분석을 실시하여 상기 표적 영역에 다양한 형태의 삽입결실 돌연변이가 발생한 것을 확인하였다 (실시예 3 참조).
- [0068] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 INK4A/ARF의 녹아웃을 유도한 세포의 불멸화 특성을 확인하기 위해 지속적으로 계대배양을 실시한 결과, 5회의 계대배양 후 더 이상 증식하지 않은 마모셋 유래 일차 피부 섬유아세포와는 달리 상기 녹아웃을 유도한 세포의 경우 지속적으로 왕성하게 분열하는 것으로 나타났다. 또한, 항암제인 아드리아마이신, 시스플라틴, 또는 에토포사이드를 각각 처리한 결과 p53 및 이의 표적 유전자인 E124 및 p21^{CIP1} 단백질의 축적이 관찰되었으며, 이를 통해 마모셋 유래 1차 세포에서 INK4A/ARF를 녹아웃시킴으로써 불멸화 세포주를 확립할 수 있음을 확인하였다 (실시예 5 참조). 이에, 상기 과정을 통해 확립된 세포주 "Marmoset INK4A KO #1"을 한국세포주연구재단 (Korean Cell Line Research Foundation; KCLRF)에 기탁번호 KCLRF-BP-00505로 기탁하였다.
- [0069] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 마모셋 유래 1차 세포에서 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하

는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법을 제공한다.

- [0070] 본 발명은 마모셋 유래 1차 세포에서 p53 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계를 포함하는, 불멸화된 마모셋 유래 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 마모셋 유래 1차 세포는 마모셋의 피부 섬유아세포일 수 있으나, 마모셋의 조직에서 분리된 1차 세포라면 구체적으로 제한되지 않고 적용 가능하다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 INK4A 및 ARF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 또는 p53 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 또는 활성을 억제시키는 단계는 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 수행될 수 있으나, 특정 유전자 영역을 표적하여 녹아웃, 편집 (editing) 등의 유전적 조작 (genetic engineering)이 가능한 기술이라면 당업자가 적절히 선택하여 적용 및 변형이 가능하다.
- [0073] 본 발명에서, 상기 단계는 INK4A 및 ARF 유전자에 공통으로 존재하는 엑손 2 (exon 2)에 돌연변이를 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 돌연변이는 서열번호 9로 표시되는 exon 2 서열에 1개 이상의 염기가 삽입 또는 결실된 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 실시예에서 사용된 INK4A/ARF KO 클론 세포주 #1는 모세포주와 비교하여 1개 이상의 염기가 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, INK4A/ARF KO 클론 세포주 #1는 서열번호 9로 표시되는 염기서열의 6번째 내지 20번째 염기가 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 단계는 p53 유전자 내 DNA-결합 모티프 (DNA-binding motif)를 암호화하는 엑손 7 (exon 7)에 돌연변이를 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 돌연변이는 서열번호 10으로 표시되는 exon 7 서열 중에서 삽입 또는 결실된 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 실시예에서 사용된 p53 KO 클론 세포주 #4는 모세포주와 비교하여 1개 이상의 염기가 삽입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, p53 KO 클론 세포주 #4는 서열번호 10으로 표시되는 염기서열의 17번째 염기 T와 18번째 염기 G 사이에 1개 이상의 염기, 바람직하게는 염기 T 1개가 삽입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명에서 사용되는 용어, 상기 "CRISPR-Cas9 시스템"이란, "CRISPR-Cas9 (Cas9 단백질)과 가이드 RNA"로 구성된다. CRISPR-Cas9은 3세대 유전자가위로써 이용하고자 하는 특정 염기서열을 인식하여 절단하고 편집하며, 게놈의 목적 장소에 특정 유전자를 삽입하거나 특정 유전자의 활동을 정지시키는 조작을 간단하고 신속하고 효율성 있게 실시하는데 유용하다. Cas9 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, Cas9 단백질은 그 목적에 따라 당업자가 추가적인 도메인을 적절하게 연결할 수 있다. 본 발명에 있어서, Cas9 단백질은 야생형 Cas9 뿐만아니라, 유전자 편집을 위한 핵산분해효소의 기능을 갖는 것이라면 Cas9의 변이체를 모두 포함할 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명에서 Cas9 단백질은 그 유래가 제한되지 않으며, 비제한적인 예시로서 스트렙토코커스 피오제네스 (*Streptococcus pyogenes*), 프란시셀라 노비시다 (*Francisella novicida*), 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*), 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*), 리스테리아 이노큐아 (*Listeria innocua*), 또는 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*) 유래일 수 있고, 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.
- [0077] 상기 "가이드 RNA (guide RNA; gRNA)"란 편집하고자 하는 표적하는 특정 DNA의 위치를 찾아내어 Cas 단백질을 표적 DNA로 인도하는 역할을 하는 단일 가닥의 RNA로서, 상기 가이드 RNA는 PAM (protospacer adjacent motif) 자리와 인접하며, 편집하려는 DNA의 10~25bp의 염기 서열과 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 표적 DNA 서열의 상보적 사슬과 염기쌍을 형성할 수 있는 서열의 5' 부위 앞에 1 내지 3개의 추가적인 뉴클레오타이드, 보다 구체적으로 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 또한 가이드 RNA는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열을 가지는 부분 (이를 Spacer region, Target DNA recognition sequence, base pairing region 등으로도 명명함) 및 Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열을 가지는 부분, Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조 및 Terminator 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 CRISPR-Cas9 시스템을 세포 내로 도입하는 방법은 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus), 렌티바이러스(Lenti virus) 등을 포함하는 벡터를 사용하여 수행될 수 있으나, 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서는 렌티

바이러스 벡터를 이용하였으나, 표적 유전자의 불활성화가 가능한 방법이라면 구체적으로 제한되지 않으며 당업자가 공지된 방법 중 적절한 것을 선택하여 이용할 수 있다.

[0079] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 INK4A/ARF 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질, 또는 p53 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성이 억제된 세포만을 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0080] 상기 선별을 위한 방법은 구체적으로 제한되지 않으며, 예컨대 본 발명에서는 항생제 내성을 이용하여 puromycin이 첨가된 배지에서 배양하는 방법을 이용하였으나, 구체적인 방법은 이것으로 제한되는 것은 아니며 당업자가 공지의 방법을 적절히 이용할 수 있다.

[0081]

[0082] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0083] [실시예]

[0084] 실시예 1. 실험방법

[0085] 1-1. sgRNA 클로닝, 세포주 확립 및 분석

[0086] 본 발명의 실시예에서는 sgRNA (single guide RNA)를 클로닝하기 위하여 푸로마이신 (Puromycin) 내성 렌티바이러스 (lentivirus) 벡터인 lentiCRISPRv2 (Addgene #98290)에 sgRNA를 메뉴얼에 따라서 클로닝하였다.

[0087] INK4A/ARF locus 특이적인 sgRNA를 생산하기 위해 사용된 oligomer는 다음과 같다: 5' -CACCGACCGTTTCACGACGCTGCCC-3' (서열번호 1) 및 5' -AAACGGGCAGCGTCGTGAACCGGTC-3' (서열번호 2). 또한, p53에 특이적인 sgRNA를 생산하기 위해 사용된 oligomer는 다음과 같다: 5' -CACCGTGAACAGTTCCTGCATGGG-3' (서열번호 3) 및 5' -AAACCCATGCAGGAAGTGTACAC-3' (서열번호 4). 사용된 모든 올리고머 (oligomer)는 (주)마크로젠에서 합성하였다.

[0088] 이후 렌티바이러스 벡터를 psPAX2 (Addgene #12260) 및 pMD2.G (Addgene #12259)와 함께 Lipofectamine Plus Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 제작사의 메뉴얼에 따라서 293TA 세포로 형질감염 (transfection)시켜 렌티바이러스 입자 (particle)를 제작하였다. 다음으로, 마모셋으로부터 분리된 일차 피부 섬유아세포 (primary skin fibroblast)에 4 µg/ml 폴리브렌 (polybrene) (Sigma)과 함께 상기 제작된 렌티바이러스를 24시간 동안 배양하여 감염시킨 후 남은 바이러스를 제거하고 2 µg/ml의 푸로마이신 (puromycin)이 첨가된 배지에서 상기 바이러스에 감염되지 않은 세포가 모두 제거될 때까지 배양하였다.

[0089] 상기 배양 과정을 통한 푸로마이신 선별과정 후, 세포 배양에서 genomic DNA 샘플을 준비하여 PCR로 각 sgRNA의 표적 영역을 증폭시켰다. 이후 제조사의 메뉴얼에 따라 증폭된 PCR 산물에 대한 heteroduplex를 생성하고 T7 Endonuclease I (T7E1; NEB)를 처리한 후 아가로오스 겔 (agarose gel)에서 전개하여 절단되는지 여부를 확인하였다. 상기 PCR에 이용된 유전자 특이적 프라이머 서열은 하기 표 1에 정리된 바와 같다. 또한, 혼합 세포 집단 또는 세포 클론으로부터 얻어진 PCR 산물을 (주)솔젠트에서 생산된 T-blunt TA 클로닝 벡터를 이용하여 클로닝한 후에 (주)마크로젠사에서 생어 염기서열분석 (Sanger sequencing)을 수행하였다.

표 1

[0090]

유전자	방향	서열 (5'-3')	서열번호
INK4A/ARF	Forward	TTGTCCTTGCTCACAGGGC	5
	Reverse	CTGATGATTGGCGGATTGG	6
p53	Forward	TTGACCTCCCATAATTCCA	7
	Reverse	TCGTCCTTTCTGGAGCCTAA	8

표 2

[0092]

Locus	타겟 서열 (5'-3')	서열번호
INK4A/ARF exon 2	ACCGTTCACGACGCTGCCC	9

p53 exon 7	TGTAACAGTTCCTGCATGGG	10
---------------	----------------------	----

[0094] 1-2. 웨스턴 블롯 분석

[0095] 세포에 대한 시스플라틴 (cisplatin, Sigma-Aldrich #PHR1642) 및 에토포사이드 (etoposide, Sigma-Aldrich #E1383) 처리와 SDS-PAGE 샘플 준비 및 웨스턴 블롯 분석은 기존에 보고된 방법에 따라 수행하였으며, 상기 분석에 이용된 항체들은 다음과 같다: EI24 (Atlas antibodies #HPA047165), p21^{CIP1} (Cell Signaling #2947), p53 (SantaCruz #SC-126), β -actin (SantaCruz #SC-47778).

[0096] 세포에 대한 아드리아마이신 (adriamycin, Sigma-Aldrich #D1515) 및 에토포사이드 (etoposide, Sigma-Aldrich #E1383)에 대한 웨스턴 블롯도 기존에 보고된 방법에 따라 수행하였다. 사용된 항체들은 다음과 같다: p21^{Waf1/Cip1/CDKN1A} (SantaCruz #SC-6246), p53 (SantaCruz #SC-126), MDM2 (SantaCruz #SC-13161), GAPDH (Cell signaling #2118).

[0098] 1-3. 반정량적 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)

[0099] TRIzol 시약 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)을 이용하여 RNA를 추출하였으며, SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen, Waltham, MA)을 이용하여 cDNA합성을 진행하였다. 반정량적 RT-PCR을 진행하기 위해 사용된 프라이머는 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

표 3

[0100]

유전자	방향	서열 (5'-3')	서열번호
p21 ^{WAF1} (125 bp)	Forward	GATCTGCCTTCCCAAGGGC	14
	Reverse	AGTGAGGCATTAGGGTGCAA	15
MDM2 (142 bp)	Forward	ACCCTGTGCAAGACCTACAG	16
	Reverse	TGGCGTTTCTTTGCCGTC	17
GAPDH (181 bp)	Forward	TCGGAGTCAACGGATTGGTC	18
	Reverse	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	19
p14ARF (583 bp)	Forward	gctgctcacctctggtgcca	20
	Reverse	ttcaatcggggacgtctgag	21

[0102] 1-4. 세포 계수 (cell counting) 및 SA- β -갈락토시다아제 (SA β -gal) 선별 분석법

[0103] 3×10^5 개로 세포를 분주하고, 3일에 한번씩 트리판 블루 (Trypan blue)를 사용하여 세포를 염색하였다. 염색한 후 Countess II cell counter (Invitrogen)를 사용하여 계수를 진행하였다. 이때 배지는 DMEM(HyClon #SH30243.01)에 10% FBS (GenDEPOT #F0600-050), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco #15140122)을 이용하였으며, 세포를 떼어내기 위해서 0.25% 트리판 EDTA를 (Gibco #25200056) 0.05%로 희석하여 3분 동안 처리하였다.

[0104] 한편, SA β -gal 선별 분석을 진행하기 위하여 5×10^5 개로 세포를 분주하고 24 시간 후 Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling #9860)를 이용하여 실험을 진행 하였다. 실험은 CO₂가 없는 37 °C에서 최소 4일 이상 관찰하였다. 4일 후부터 염색된 세포가 조금씩 관찰되기 시작하였으며, 7일 정도 경과하면 노화가 일어난 거의 모든 세포가 염색이 되었다. Nikon eclipse Ts2 microscope (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 7일 동안 염색된 세포를 관찰하였고, CMOS 디지털카메라 및 HKBASIC Software를 이용하여 사진을 찍었다.

[0106] 실시예 2. p53 녹아웃을 통한 마모셋 유래 불멸화 세포주의 제작

[0107] 마모셋 1차 피부 섬유아세포에서 p53 유전자를 녹아웃 시킬 경우 불멸화가 유도되어 세포주 확립이 가능한지 확인하였다. p53 단백질의 DNA-binding motif는 돌연변이가 가장 많이 생기는 부위로 알려져 있으며, 돌연변이 p53 단백질은 발현이 되더라도 p53의 기능을 잃게 된다. 이를 토대로 마모셋 p53 유전자에서 DNA-binding motif를 암호화하는 exon 7 부위를 공략할 수 있는 sgRNA를 디자인하였다(도 1a 참조).

[0108] 먼저, 렌티바이러스 벡터를 이용해서 Cas9과 더불어 마모셋 1차 피부 섬유아세포에 발현시킨 후, 푸로마이신 선별을 수행했다. 이렇게 얻어진 mixed cell population으로부터 genomic DNA를 얻어 타겟 염기서열 부위를 PCR로 증폭한 후 T7E1 assay를 수행해서 Cas9에 의한 돌연변이(insertion and deletion, in-del)이 일어났는지 여부를 확인했다.

[0109] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 녹아웃 시키지 않은 마모셋 유래의 일차 피부 섬유아세포 (-)와는 달리 p53 locus 녹아웃된 세포 (+)의 경우에는 T7E1에 의해 잘린 단편이 밴드 (화살표)로 나타난 것을 확인하였으며, 이를 통해 Cas9에 의한 삽입결실 돌연변이가 일어났음을 알 수 있었다.

[0111] 한편, Cas9에 의한 돌연변이가 일어났음을 확인했기 때문에 세포를 드문드문 뿌려서 콜로니(colony)를 형성시킨 후 picking하여 다수의 클론 세포를 확립하였다. 이들 클론들의 p53 locus를 시퀀싱한 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이, 다양한 삽입 및 결실 돌연변이가 발생했음을 알 수 있었다.

[0112] 여러 클론 세포들 중에서 마모셋 p53 KO #4 세포주를 이용하여 p53 단백질 발현을 확인하였다.

[0113] 도 1d에 나타난 바와 같이, p53 단백질보다 작은 크기의 단백질이 발현되는 것을 볼 수 있었으며 이는 Cas9을 이용해서 생성된 돌연변이를 통해서 돌연변이 p53 단백질이 발현되고 있는 것이며, p53의 기능이 소실되어 불멸화된 마모셋 세포가 확립되었음을 확인하였다.

[0115] 실시예 3. INK4A/ARF 녹아웃을 통한 마모셋 유래 불멸화 세포주의 제작

[0116] 본 발명자들은 마모셋 세포에서 INK4A/ARF locus (NCBI Gene ID: 100394189)를 녹아웃 시키기 위해서 genbank로부터 genomic DNA 서열을 얻어 유전자 구조를 분석하였다. 아직까지 마모셋의 p14^{ARF} 유전자가 등록되어 있지 않았기 때문에 본 발명자들은 인간의 p14^{ARF} 유전자 정보를 바탕으로 분석하여 도 2a에 도시된 바와 같이 그 구조를 파악하였고, 구조가 인간의 INK4A/ARF locus와 동일함을 확인하였다. 이어서 상기 유전자 구조를 기반으로 INK4A와 ARF 유전자에 공통적으로 존재하는 exon 2를 표적으로 하기 위하여, CDKN2A locus를 표적으로 하는 sgRNA를 디자인하였다. CDKN2A locus는 INK4A/ARF locus를 포함하고 있어, INK4A/ARF locus가 KO되었는지 확인하기에 적합하다.

[0117] 먼저, 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Cas9과 더불어 마모셋 1차 피부 섬유아세포에서 발현시킨 후, 푸로마이신 선별을 수행하였다. 선별 후 살아남은 세포들을 이용하여 genomic DNA를 얻어 타겟 염기서열 부위를 PCR로 증폭한 후 T7E1 assay를 수행해서 Cas9에 의한 돌연변이(insertion and deletion, in-del)이 일어났는지 여부를 확인하였다.

[0118] 그 결과 도 2b에 나타난 바와 같이, 녹아웃 시키지 않은 마모셋 유래의 일차 피부 섬유아세포 (-)와는 달리 CDKN2A locus 녹아웃된 세포 (+)의 경우에는 T7E1에 의해 잘린 단편이 밴드 (화살표)로 나타난 것을 확인하였으며, 이를 통해 Cas9에 의한 삽입결실 돌연변이가 일어났음을 알 수 있다.

[0119] 이에 본 발명자들은 삽입결실 돌연변이에 의한 구체적인 염기서열 변화를 확인하기 위하여 세포를 드문드문 뿌려서 콜로니를 형성시킨 후 picking하여 다수의 클론 세포들을 확립한 다음, 상기 클론들의 INK4A/ARF locus를 서열분석 하였다.

[0120] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이, 다양한 삽입결실 돌연변이들이 발생하였음을 확인하였다.

[0122] 이에 더하여, 본 발명자들은 도 2c의 마모셋 INK4A/ARF KO #1 세포주에서 p14^{ARF} 및 p16^{INK4A}의 발현을 확인하였

다. 웨스턴 블롯을 통해 p16^{INK4A}의 발현을, RT-PCR을 통해 p14^{ARF} 발현을 확인하였다.

[0123] 도 2d 및 도 2e에 나타난 바와 같이, 모세포주를 양성 대조군으로 사용하였다. 모세포주와 비교하였을 때, p16^{INK4A}의 발현은 소실되었음을 확인하였고, p14^{ARF}는 결실된 밴드를 확인 할 수 있었다. 이로부터 불멸화된 마모셋 세포주가 확립되었음을 확인할 수 있었다.

[0125] 실시예 4. 마모셋 유래 세포주의 불멸화 특성 확인

[0126] 4-1. 세포 수 배가 수준 측정

[0127] 타겟 유전자가 KO되었을 때 불멸화된 마모셋 세포가 확립된 것이 맞는지를 확인하고자 세포 수 배가 수준 (population doubling level; PDL)을 측정하였다. 세포주는 마모셋 유래 1차 섬유아세포 (Parental), INK4A/ARF KO 풀링 (pooling) 세포주, p53 KO 풀링 세포주, 클론 세포주 2가지, 총 5가지 세포주를 사용하였다.

[0128] 그 결과 도 3a에 나타난 바와 같이, INK4A/ARF KO 세포주는 풀링 세포주와 클론 세포 둘 다 모세포주에 비해 3배 이상 잘 자라는 모습을 나타내었다. 또한, p53 KO 풀링 세포주와 클론 세포는 모세포주에 비해 1.5배 정도 잘 자람을 확인하였다.

[0129] 구체적으로, 모세포주는 더블링하는 속도가 늦어 5일에 한번씩 계대배양을 진행한 반면, INK4A/ARF KO, p53 KO 풀링 및 클론 세포들은 3일에 한번씩 계대배양을 진행하였다. 추후에 계대(Passage)를 더 넘기다 보면 모세포주는 노화가 진행되어 자라는 속도가 더욱 늦어질 것이므로 보다 큰 차이를 보일 것으로 예상된다.

[0130] 한편, 세포주의 특성을 확인한 결과, INK4A/ARF KO 세포주의 경우 길쭉하게 자라는 특성을 보이며, 디쉬에 세포가 어느 정도 자라게 되면 동그랗게 말려서 자라는 것을 관찰할 수 있었다. p53 KO 세포주의 경우, 길쭉하게 자라는 INK4A/ARF KO 세포주와 달리 넓적하게 퍼져서 자라는 특성이 있었다.

[0132] 4-2. SA-β-갈락토시다아제 (SA β-gal) 선별 분석

[0133] 불멸화의 여부를 확실히 확인하기 위해 노화가 일어난 세포주에만 특이적으로 염색이 되는 β-gal 염색을 진행하였다.

[0134] 도 3b에 나타난 바와 같이, 모세포주, INK4A 및 ARF를 포함하는 CDKN2A KO 세포주, p53 KO 세포주 모두 비슷한 계대를 사용하였음에도 불구하고, 노화가 진행된 모세포주만 염색되었으며, CDKN2A KO 세포주 및 p53 KO 세포주는 염색이 되지 않음을 확인하였다. 특히 KO 세포주는 모세포주보다 사용된 계대수가 각각 24 및 23으로 훨씬 높았으나, 염색이 되지 않았다.

[0135] 따라서, INK4A/ARF KO 세포주 및 p53 KO 세포주가 불멸화된 세포주로서 확립되었음을 확인하였다.

[0137] 실시예 5. 불멸화된 마모셋 세포주의 p53 반응성 확인

[0138] 불멸화된 세포주들은 다양한 항암제를 개발하는 데에 널리 사용되는데, 이때 p53의 활성화 유무가 중요한 이슈가 된다.

[0139] 이에, 실시예 1에서 제작한 불멸화된 마모셋 세포주를 이용하여 아드리아마이신과 에토포사이드를 처리한 후 p53 표적 유전자인 p21, 및 MDM2 RNA와 단백질 발현을 분석하였다.

[0140] 그 결과, 도 4b 및 도 4d에 나타난 바와 같이, INK4A/ARF KO 마모셋 세포주에서는 아드리아마이신과 에토포사이드에 반응하여 p21, 및 MDM2의 유전자 발현이 증가함을 확인하였다.

[0141] 또한, 도 4a 및 도 4c에 나타난 바와 같이, 모세포주에서는 아드리아마이신과 에토포사이드에 반응하여 p53 단백질이 축적되지만, p53 KO 세포주에서는 도 1d와 마찬가지로 본래의 p53 단백질보다 작은 크기의 단백질이 항암제의 처리와 관계없이 비교적 일정하게 높은 비율로 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한, 나머지 p53 타겟 유전자인 p21과 MDM2도 INK4A/ARF KO 마모셋 세포주에서는 p53의 발현이 증가함에 따라 이들도 함께 증가하는 모습을 확인하였다.

- [0142] 또한, 본 발명자들은 대표적 항암제인 시스플라틴 (cisplatin; Cisp)과 에토포사이드 (etoposide; Etop)에 대한 INK4A/ARF KO 세포주 또는 p53 KO 세포주의 반응성을 알아보기 위해 상기 세포주에 시스플라틴 또는 에토포사이드 각각을 18시간 동안 처리하였다.
- [0143] 그 결과, 도 4e에 나타난 바와 같이, 마모셋 유래 일차 피부 섬유아세포와는 달리 INK4A/ARF 녹아웃 세포주에서 상기 항암제 각각에 반응하여 p53 단백질이 축적되고, 이와 연동하여 p53 표적유전자로 알려진 E124 및 p21^{CIP1} 단백질의 수준이 증가한 것을 확인하였다.
- [0144] 또한, 도 4f에 나타난 바와 같이, p53 녹아웃 마모셋 세포주 (p53 KO)에서는 상기 항암제 처리와 관계없이 본래의 p53 단백질보다 작은 크기의 단백질이 비교적 일정하게 높은 수준으로 발현된 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 CRISPR/Cas9을 통해 유발된 DNA-결합 모티프 영역 내 돌연변이를 통해서 돌연변이 p53 단백질이 발현되고 있는 것이며, 이를 통해 p53의 기능이 소실되어 불멸화된 마모셋 세포가 확립되었음을 보여준다.
- [0145] 이에, 상기 결과들은 마모셋 유래 1차 세포에서 INK4A/ARF 또는 p53을 녹아웃시킴으로써 불멸화 세포주를 제작 및 확립할 수 있음을 보여준다.
- [0146] 본 발명자들에 의하여 개발된 방법은 마모셋에서 얻어질 수 있는 다양한 1차 세포들을 불멸화시켜 연구목적에 적합한 수많은 세포주를 확립하는 데에 기여할 것으로 여겨진다. 또한, INK4A/ARF locus와 p53 유전자 녹아웃 중 필요에 따라 유전형을 선택할 수 있는 것도 큰 장점이 될 것으로 여겨진다.
- [0148] **실시예 6. 마모셋 p14^{ARF} 서열 시퀀싱**
- [0149] 기존에 보고된 바가 없는 마모셋 p14^{ARF} 서열을 알아내기 위해 서열분석을 진행하였다.
- [0150] 도 5a 에 나타난 바와 같이, 갈색으로 표시된 부분은 p14^{ARF}의 1 β exon이고, 청록색으로 표시된 부분은 exon2이다.
- [0151] 모세포주와 INK4A/ARF KO세포주의 cDNA를 이용하여 p14^{ARF} 부분을 RT-PCR하여 TA 클로닝을 진행한 후 시퀀싱하였다.
- [0152] 도 5b에 나타난 바와 같이, 시퀀싱 결과 INK4A/ARF KO 세포주에서는 파란색 박스로 표시된 부분이 결실 (deletion)된 것을 볼 수 있었으며, exon2번 위 빨간색으로 표시된 염기가 G에서 A로 바뀌는 것을 볼 수 있었다. 이로 인해 아미노산 또한 글라이신에서 세린으로 치환되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0153] 이에, 본 발명자들은 실험에 사용한 마모셋 뿐만 아니라 다른 개체에서도 서열이 바뀌는지를 확인하였다. 실험에 사용한 마모셋 개체 (15cj04) 뿐만 아니라 다른 개체의 (부모 형제가 모두 다름) gDNA를 이용하여 시퀀싱을 진행한 결과 G와 A 염기 둘 다 가지고 있는 이형 접합체 (heterozygote)인 개체 (17cj03, 20cj08)도 있고, 본 발명자들이 실험에 사용한 개체 15cj04처럼 A 염기만 가지고 있는 동형 접합체 (homozygote)인 개체 (15cj04, 20cj08)도 있었다.
- [0155] 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.

수탁번호

[0157]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRF-BP-00505

수탁일자 : 20210115

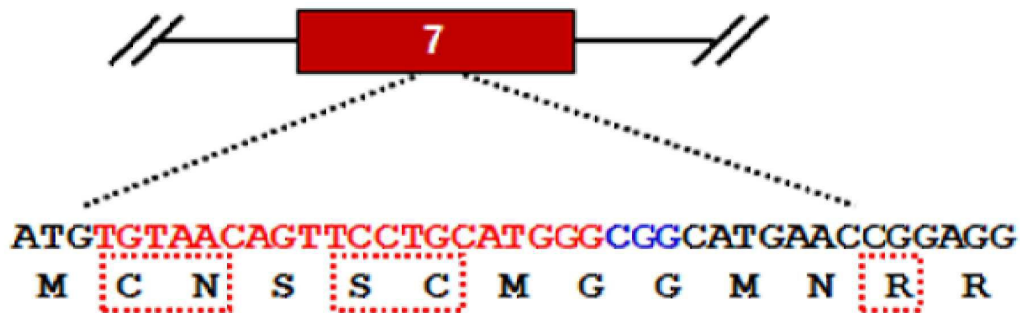
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRF-BP-00504

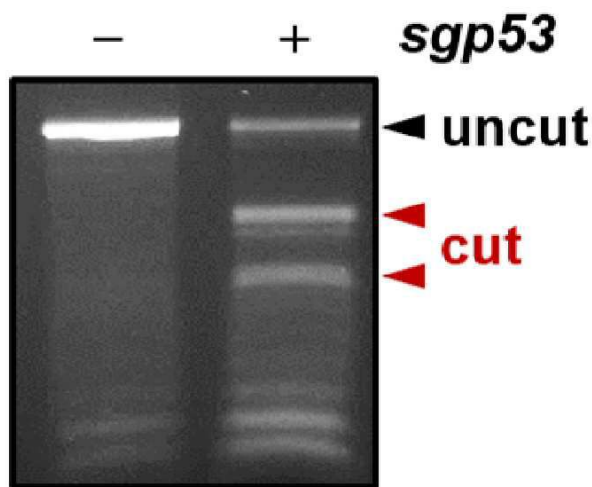
수탁일자 : 20210121

도면

도면1a



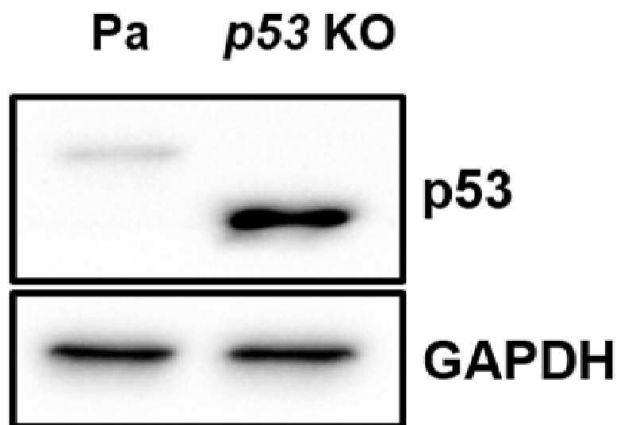
도면1b



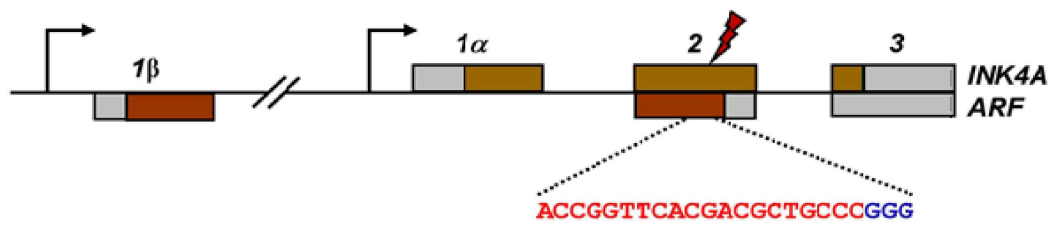
도면1c

clones	Pa	TACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCC	
		Y M C N S S C M G G M N R R P	
	#1	TACATGTGTAACAGTTCCTGCATcatGGGCGGCATGAACCGGAGG	+3
		TACATGTGTAACAGTTCCTGCATtGGGCGGCATGAACCGGAGGCC	+1
	#2	TACATGTGTAACAGT-----CCC	-27
	#3	TACATGTGTAACAGTTCCTGCATtGGGCGGCATGAACCGGAGGCC	+1
		TACATGTGTAACAGTTCCTG--TGGGCGGCATGAACCGGAGGCC	-2
	#4	TACATGTGTAACAGTTCCTGCATtGGGCGGCATGAACCGGAGGCC	+1

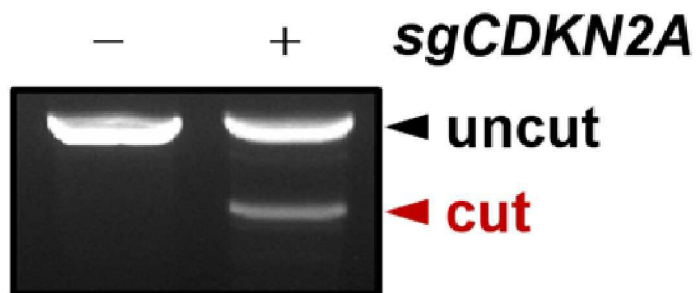
도면1d



도면2a



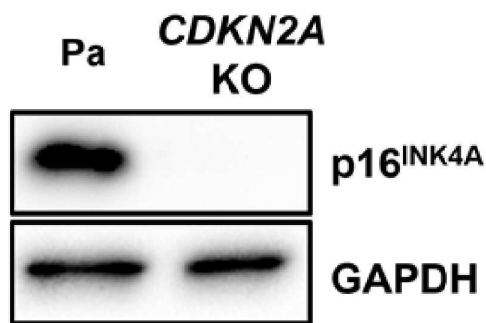
도면2b



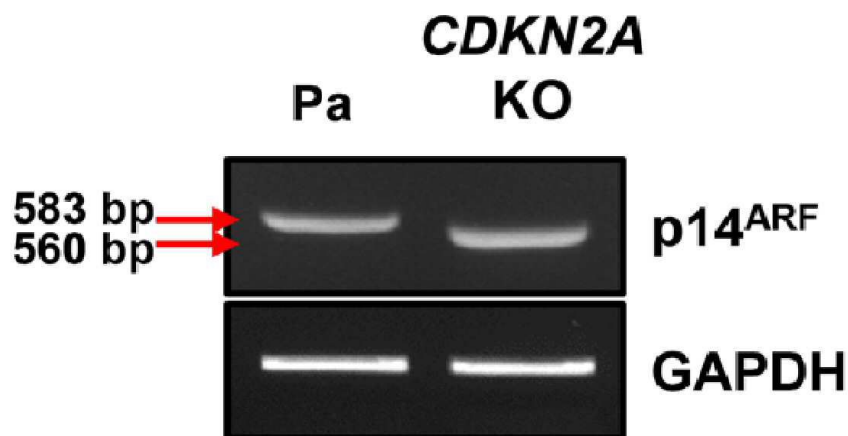
도면2c

Ref	CACCCGACCGGTTACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA	
Pa	CACCCGACCAGTTACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA	
#1	CACCCGACCAG-----TTCCTGGA	-23
	CACCCGACCgG-----TTCCTGGA	-23
#2	CACCCGACCAG-----TTCCTGGA	-23
	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1
#3	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1
	CACCCGAac-----TTCCTGG	-26+2
#4	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1
#6	CACCCGACCAG-----TTCCTGGA	-23
	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1
	CACCCGACCGGTTTC-----CTGGA	-23
#14	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27
	CACCCGACCAGTTACGACcagttca-----CGGGAGGGCT	-5+6
#15	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1
#17	CACCCGACCAGTTACGACcagttca-----CGGGAGGGCT	-5+6
#18	CACCCGACCAG-----TTCCTGGA	-23
#19	CACCCGAa-----TTCCTGG	-27+1

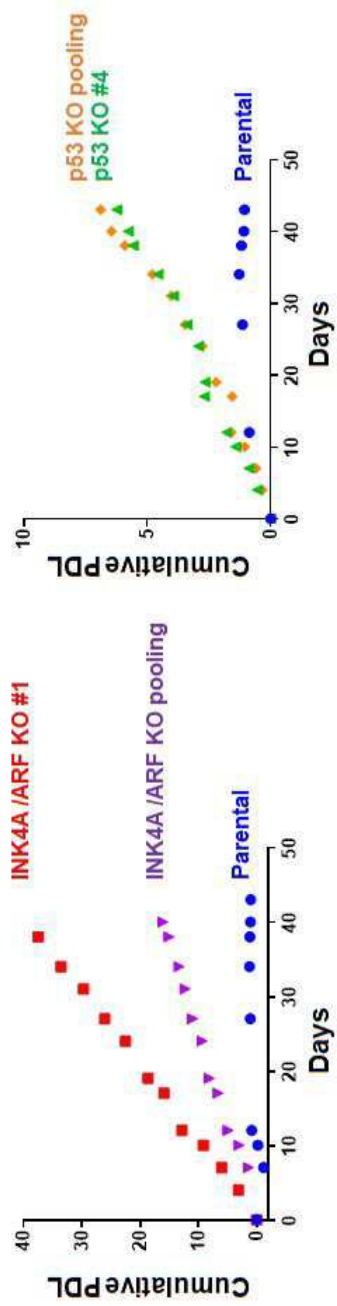
도면2d



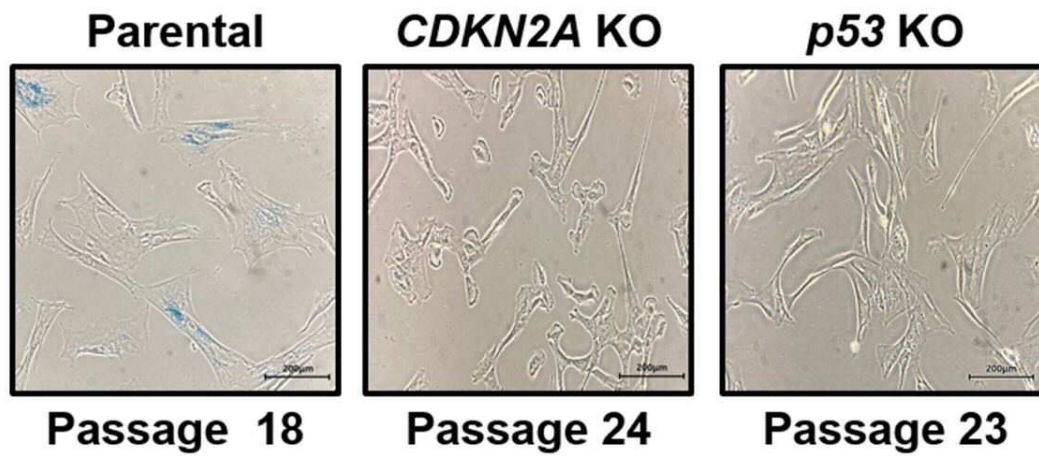
도면2e



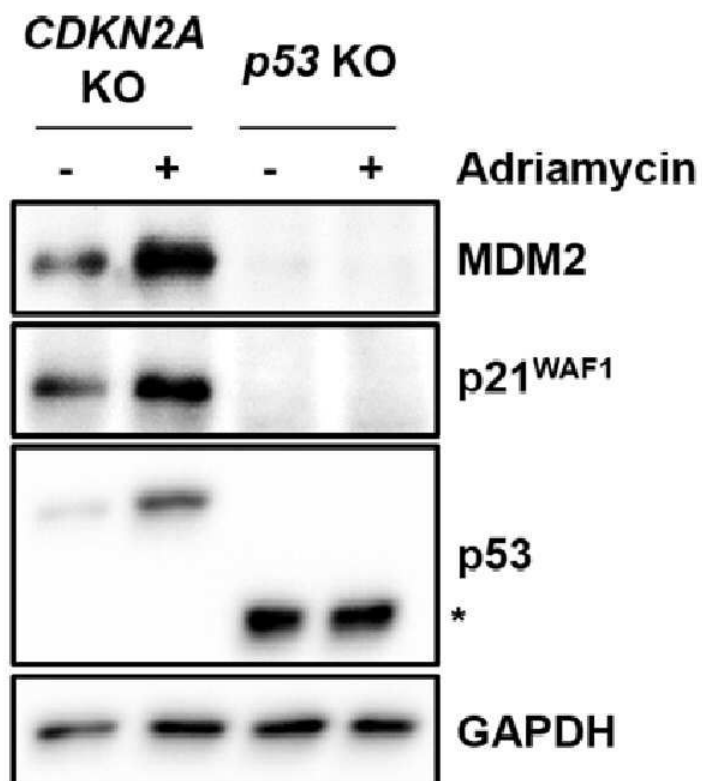
도면3a



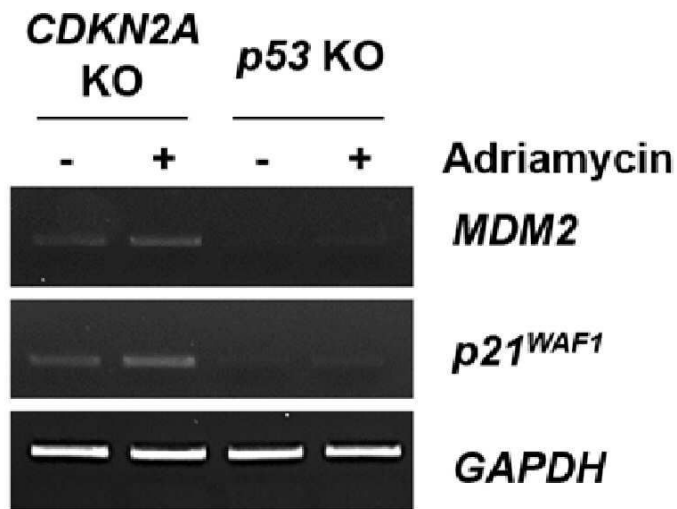
도면3b



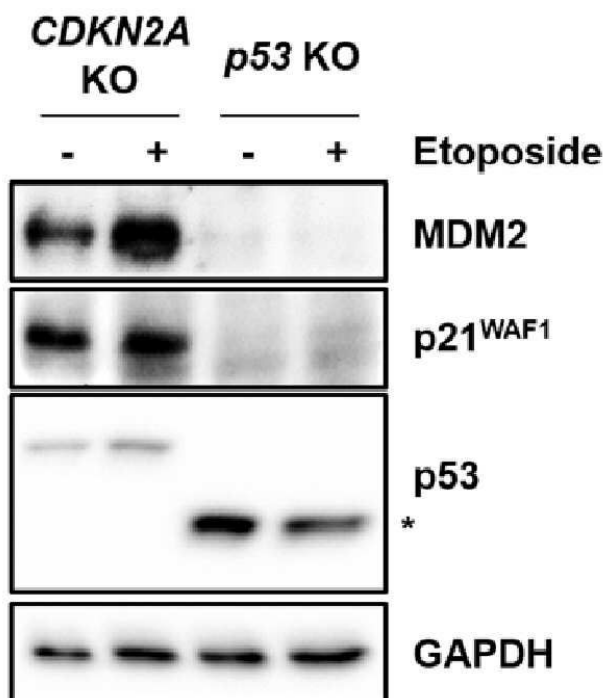
도면4a



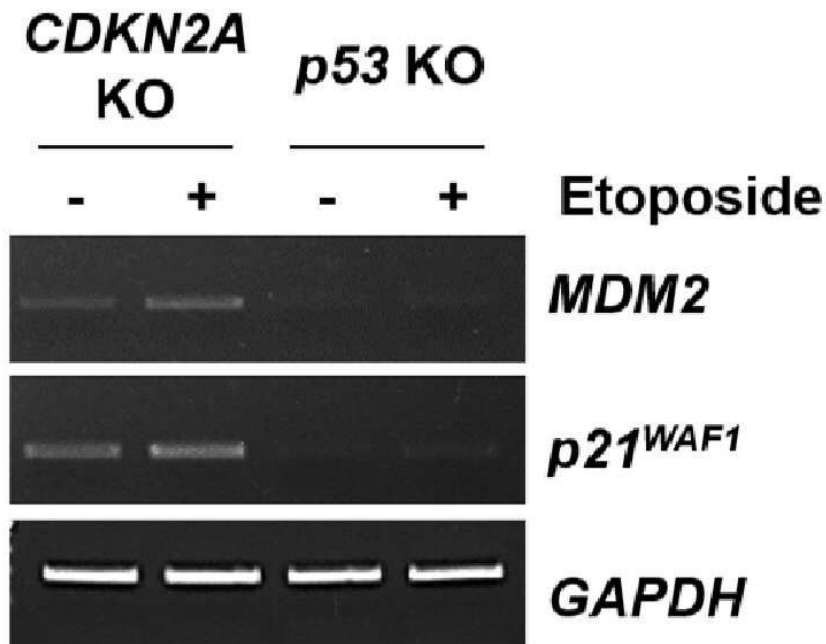
도면4b



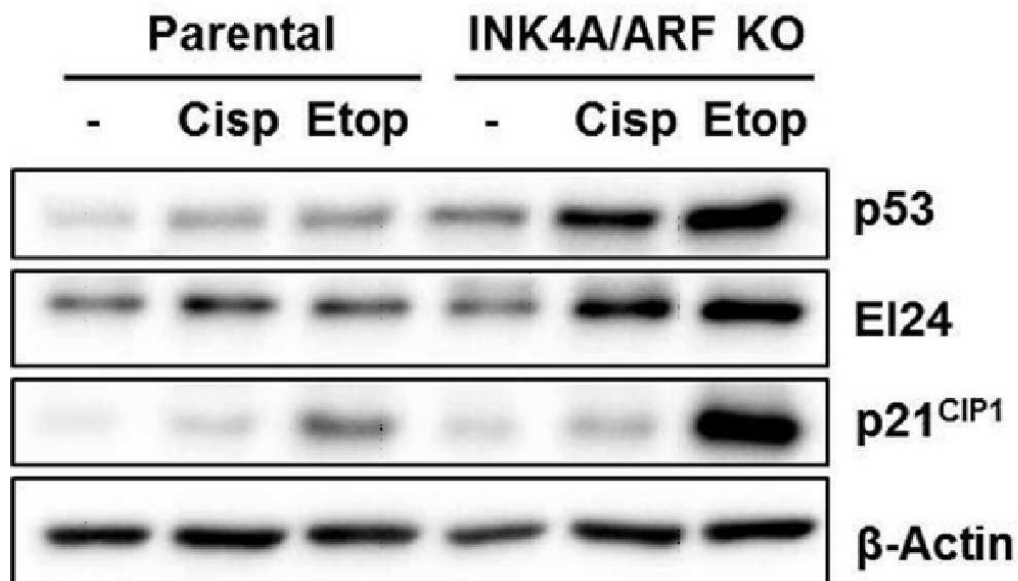
도면4c



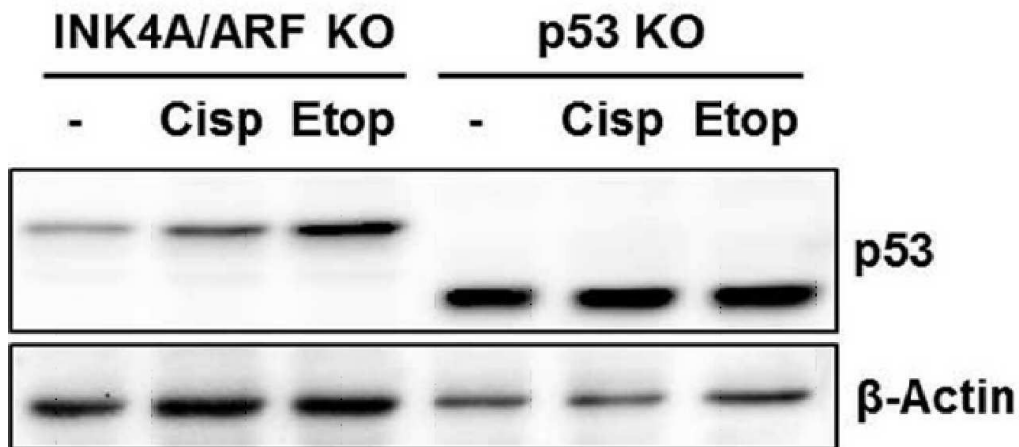
도면4d



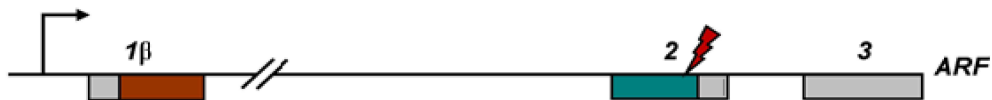
도면4e



도면4f



도면5a



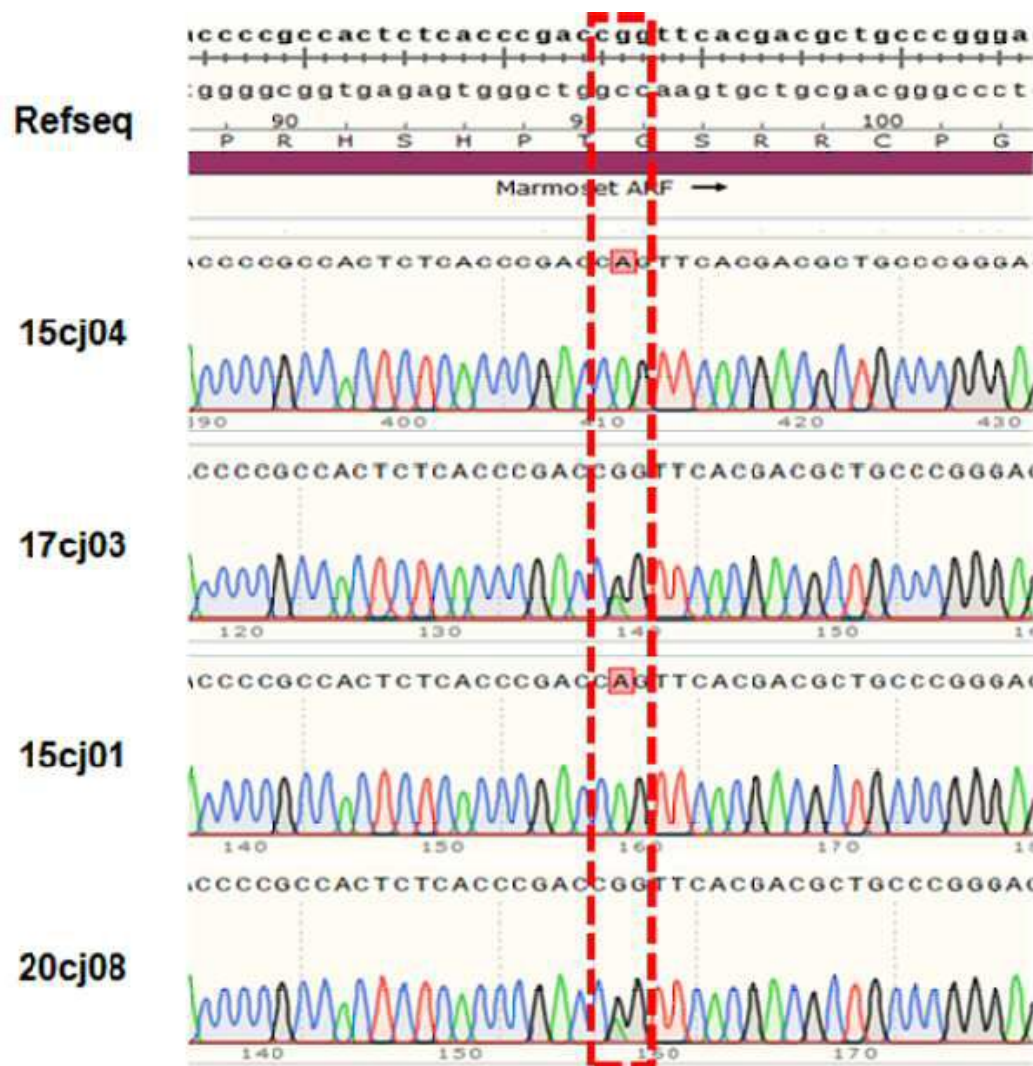
도면5b

```

atggtgcgcaggttcttgggtgaccctccgaattcggcgctcgtgtggcctccgcgagtg
M V R R F L V T L R I R R S C G P P R V
agagttttcgaggttcacatcccgcggctcgcgagggagtgggcagcgccaggggcaccc
R V F E V H I P R L A R E W A A P G A P
tccgctgtggcctcgtgctgatgctactgaggagccagcgtctagggcagcagccgcat
S A V A L V L M L L R S Q R L G Q Q P H
cctagaagaccaggtcatgatgatgggcagtgccgcgtggcagagctgctgctgcttca
P R R P G H D D G Q C P R G R A A A A S
cggcgcggagcccaactgcgcggaccccgccactctcaccgaccgttcacgacgctgc
R R G A Q L R G P R H S H P T S S R R C
ccgggaggggttctctggacacgctggtggcgctgcaccgggcccggggcgcggtggacgt
P G G L P G H A G G A A P G R G A A G R
gcgcgatgcctggggccgtctgcccggtggacctgggtga
A R C L G P S A R G P G *

```

도면6



서열목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
SNU R & DB FOUNDATION
- <120> Immortalized marmoset cell line and preparation method thereof
- <130> MP22-005P1
- <150> KR 10-2021-0009575
- <151> 2021-01-22
- <160> 21
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> INK4A/ARF locus_sgRNA

<400> 1

caccgaccgg ttcacgacgc tgccc

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> INK4A/ARF locus_sgRNA

<400> 2

aaacgggcag cgtcgtgaac cggtc

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p53_sgRNA

<400> 3

caccgtgtaa cagttcctgc atggg

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p53_sgRNA

<400> 4

aaaccccatg caggaactgt tacac

25

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> INK4A/ARF_Forward

<400> 5

ttgtccttgt ctcacagggc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INK4A/ARF_Reverse
 <400> 6
 ctgatgattg gcgcgattgg 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> p53_Forward
 <400> 7
 ttgacctccc cataattcca 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> p53_Reverse
 <400> 8
 tcgtcctttc tggagcctaa 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INK4A/ARF EXON2
 <400> 9
 accggttcac gacgctgccc 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> p53 EXON7
 <400> 10
 tgtaacagtt cctgcatggg 20

<210> 11

<211> 4104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cas9

<400> 11

atggacaaga agtacagcat cggcctggac atcggcacca actctgtggg ctgggccgtg	60
atcaccgacg agtacaaggt gcccagcaag aaattcaagg tgctgggcaa caccgaccgg	120
cacagcatca agaagaacct gatcggagcc ctgctgttcg acagcggcga aacagccgag	180
gccacccggc tgaagagaac cgccagaaga agatacaca gacggaagaa cggatctgc	240
tatctgcaag agatcttcag caacgagatg gccagggtgg acgacagctt cttccacaga	300
ctggaagagt cttctctggt ggaagaggat aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc	360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgagaaag	420
aaactggtgg acagcaccga caaggccgac ctgctggctga tctatctggc cctggcccac	480
atgatcaagt tccggggcca cttctgtatc gagggcgacc tgaaccccga caacagcgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggaaaacccc	600
atcaacgcca gggcggtgga cgccaaggcc atcctgtctg ccagactgag caagagcaga	660
cggctggaaa atctgatcg ccagctgccc ggcgagaaga agaattggcct gttcggaaac	720
ctgattgccc tgagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag	780
gatgccaac tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacg cgacctgttt ctggccgcca agaacctgtc cgacgccatc	900
ctgctgagcg acatcctgag agtgaacacc gagatcacca agccccctt gagegcctct	960
atgatcaaga gatagcaga gcaccaccag gacctgaccc tgctgaaagc tctcgtgcgg	1020
cagcagctgc ctgagaagta caaagagatt ttcttcgacc agagcaagaa cggctacgcc	1080
ggctacattg acggcggagc cagccaggaa gatttctaca agttcatcaa gcccatcctg	1140
gaaaagatgg acggcaccca ggaactgctc gtgaagctga acagagagga cctgctgcgg	1200
aagcagcgga ctttcgacaa cggcagcatc ccccaccaga tccacctggg agagctgcac	1260
gccattctgc ggcggcagga agatttttac ccattcctga aggacaaccg ggaaaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttccg catcccctac tacgtgggcc ctctggccag gggaaacagc	1380
agattcgctt ggatgaccag aaagagcgag gaaacatca cccctggaa cttcgaggaa	1440
gtggtggaca agggcgcttc cgcccagagc ttcacgagc ggatgaccaa cttcgataag	1500
aacctgcca acgagaaggt gctgccaag cacagcctgc tgtacgagta cttaccgtg	1560

tataacgagc tgaccaaagt gaaatacgtg accgagggaa tgagaaagcc cgccttcctg	1620
agcggcgagc agaaaaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaagtgacc	1680
gtgaagcagc tgaagagga ctacttcaag aaaatcgagt gcttcgactc cgtggaaatc	1740
tccggcgtgg aagatcggtt caacgcctcc ctgggcacat accacgatct gctgaaaatt	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaatgag gaaaacgagg acattctgga agatatcgtg	1860
ctgaccctga cactgtttga ggacagagag atgatcgagg aacggctgaa aacctatgcc	1920
cacctgttcg acgacaaagt gatgaagcag ctgaagcggc ggagatacac cggctggggc	1980
aggctgagcc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agtccggcaa gacaatcctg	2040
gatttcctga agtccgacgg cttcgccaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
agcctgacct ttaaagagga catccagaaa gcccggtgt cggccaggc cgatagcctg	2160
cacgagcaca ttgccaatct ggccggcagc cccgccatta agaaggcat cctgcagaca	2220
gtgaaggtgg tggacgagct cgtgaaagt atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg	2280
atcgaatgg ccagagagaa ccagaccacc cagaaggagc agaagaacag ccgcgagaga	2340
atgaagcga tcgaagagg catcaaagag ctgggcagcc agatcctgaa agaacacccc	2400
gtggaaaaca cccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaatgggcgg	2460
gatatgtacg tggaccagga actggacatc aaccggctgt ccgactacga tgtggacat	2520
atcgtgcctc agagctttct gaaggacgac tccatcgaca acaagggtgt gaccagaagc	2580
gacaagaacc ggggcaagag cgacaacgtg ccctccgaag aggtcgtgaa gaagatgaag	2640
aactactggc ggacgtgct gaacccaag ctgattacc agagaaagt cgacaatctg	2700
accaaggccg agagaggcgg cctgagcgaa ctggataagg ccggcttcat caagagacag	2760
ctggtggaaa cccggcagat cacaaagcac gtggcacaga tcctggactc ccggtgaac	2820
actaagtacg acgagaatga caagctgatc cgggaagtga aagtgatcac cctgaagtec	2880
aagctggtgt ccgatttccg gaaggatttc cagttttaca aagtgcgca gatcaacaac	2940
taccaccag cccacgacg ctacctgaac gccgtcgtgg gaaccgcct gatcaaaaag	3000
taccctaagc tggaaagcga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag	3060
atgatcgcca agagcgagca ggaaatcggc aaggctaccg ccaagtactt cttctacagc	3120
aacatcatga actttttcaa gaccgagatt accctggcca acggcgagat ccggaagcgg	3180
cctctgatcg agacaaacgg cgaaaccggg gagatcgtgt gggataaggg ccgggatttt	3240
gccaccgtgc ggaagtgct gagcatgcc caagtgaata tcgtgaaaaa gaccgaggtg	3300

cagacaggcg gcttcagcaa agagtctatc ctgccaaga ggaacagcga taagctgac 3360
gccagaaaga aggactggga ccctaagaag tacggcggct tcgacagccc caccgtggcc 3420
tattctgtgc tgggtgtggc caaagtggaa aagggaagt ccaagaaact gaagagtgtg 3480
aaagagctgc tgggatcac catcatggaa agaagcagct tcgagaagaa tcccatcgac 3540
tttctggaag ccaagggcta caaagaagtg aaaaaggacc tgatcatcaa gctgcctaag 3600
tactccctgt tcgagctgga aaacggccgg aagagaatgc tggcctctgc cggcgaactg 3660
cagaaggga acgaactggc cctgccctcc aaatatgtga acttcctgta cctggccagc 3720

cactatgaga agctgaaggg ctccccgag gataatgagc agaaacagct gtttgtggaa 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagtctc caagagagtg 3840
atcctggccg acgctaactt ggacaaagtg ctgtccgctt acaacaagca ccgggataag 3900
cccatcagag agcaggccga gaatatcatc cacctgttta cctgaccaa tctgggagcc 3960
cctgccgctt tcaagtactt tgacaccacc atcgaccgga agaggtagac cagcaccaaa 4020
gaggtgctgg acgccacct gatccaccag agcatcaccg gcctgtacga gacacggatc 4080
gacctgtctc agctgggagg cgac 4104

<210> 12
<211> 241
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> U6 promoter

<400> 12
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaat ggactatcat 180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tataatctt gtggaaagga 240
c 241

<
210> 13
<211> 212
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EF1a-promoter
<400> 13

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgat 60

ccggtgccta gagaagggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120

gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180

tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac ag 212

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p21WAF1_Forward

<400> 14

gatctgcctt cccaaagggc 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p21WAF1_Reverse

<400> 15

agtgaggcat tagggtgcaa 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MDM2_Forward

<400> 16

accctgtgca agacctacag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MDM2_Reverse

<400> 17

tggcgttttc ttgcccgttc 20

<210> 18

<211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH_Forward	
<400>	18	
	tcggagtcaa cggatttggt c	21
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH_Reverse	
<400>	19	
	ttcccgttct cagccttgac	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	p14ARF_Forward	
<400>	20	
	gctgctcacc tctggtgcca	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	p14ARF_Reverse	
<400>	21	
	ttcaatcggg gacgtctgag	20