



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131508
(43) 공개일자 2024년09월02일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/873 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2024.01)
C12N 15/113 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0024304
(22) 출원일자 2023년02월23일
심사청구일자 2023년02월23일</p> | <p>(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
공일근
경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 101동 2102호</p> <p>(74) 대리인
위병갑</p> |
|--|--|

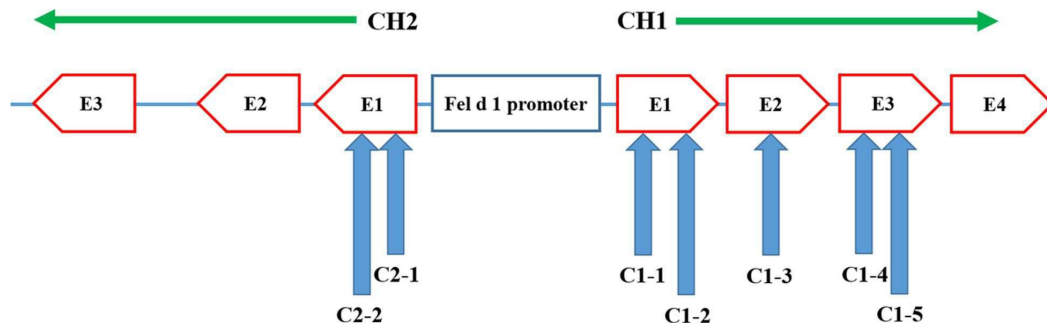
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이 생산 방법 및 세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)을 통한 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이 복제 방법에 관한 것으로, 본 발명은 Fel d 1 유전자 녹아웃(knockout)을 위한 높은 효율의 sgRNA를 개발하고, 세포질 미세주입법을 이용한 효율적인 형질전환 고양이 생산기술을 확립하였다. 따라서 본 발명의 방법에 따라 생산된 형질전환 고양이는 실내 알레르겐(Felis Domesticus Allergen)인 Fel d 1 단백질의 분비를 억제하여 사람의 고양이 알레르기 유발 빈도를 낮추는 효과가 있어 반려동물 시장에서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)

C12N 15/873 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/10 (2013.01)

A01K 2267/02 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 공여자 암컷 고양이(donor female cat)로부터 채취한 난모세포를 체외 성숙(IVM) 배지에서 배양하는 단계;
- (b) (a) 단계의 성숙한 난모세포 및 수컷 고양이로부터 채취한 정자를 시험관(in vitro)에서 체외 수정(IVF)하여 고양이 배아를 제조하는 단계;
- (c) Fel d 1 단백질의 CH1 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA, Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 혼합물을 상기 (b) 단계의 고양이 배아의 세포질에 형질주입(transfection)하는 단계;
- (d) 상기 (c) 단계의 형질전환된 배아를 체외 배양(IVC) 배지에서 배양하여 배반포(blastocystis)까지 발달시키는 단계; 및
- (e) 상기 (d) 단계의 배반포를 수여자 암컷 고양이(recipient female cat)의 난관에 이식하여 1세대 형질전환 고양이를 생산하는 단계;를 포함하는 Fel d 1 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 배양은 30내지 45℃에서 3내지 5시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 체외수정은 30내지 45℃에서 5내지 7시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 Fel d 1 단백질의 CH1 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 배아는 단세포 단계의 접합체(zygote)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 형질주입은 미세주입(microinjection)법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계의 배양은 30 내지 45℃에서 5 내지 7시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 방법은

(f) 상기 1세대 형질전환 고양이 중 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 대하여 $CH2^{Mosaic}$ 유전자형을 갖는 형질전환 고양이 및 $CH2^{+/-}$ 유전자형을 갖는 형질전환 고양이를 선별한 후, 교배하여 2세대 형질전환 고양이를 생산하는 단계; 및

(g) (f) 단계의 2세대 형질전환 고양이의 유전자형을 분석하여 Fel d 1 단백질에 대한 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)를 선별하는 단계;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)는 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 대하여 $CH2^{-/-}$ 유전자형을 갖는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 알레르기 유발 단백질은 실내 알레르겐(Allergen)인 것을 특징으로 하는, 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 실내 알레르겐은 Fel d 1 단백질인 것을 특징으로 하는, 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이.

청구항 14

제11항의 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이에서 분리된 체세포로부터 세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)을 이용하여 복제 배아를 제작하는 단계; 및

상기 복제 배아를 수여자 암컷 고양이의 난관에 이식하는 단계;를 포함하는 Fel d 1 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 복제 고양이의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이 생산 방법 및 세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)을 통한 알레르기 유발 단백질 저분비 고양이 복제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 고양이 (Felis Catus; Fel d)는 질병 모델 동물뿐만 아니라 반려 동물로서 인간에게 매우 중요하고 유용한 동물이다.

[0004] 한편, 고양이는 8 가지 종류의 실내 알레르겐(Felis Domesticus Allergen)인 Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, Fel d 6, Fel d 7 및, Fel d 8을 생성하고, 고양이 알레르겐에 민감한 인간에게 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염 및 생명을 위협하는 아토피 천식을 유발한다 (T. Virtanen et al., Mammalian Allergens, Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual and Oral (fifth edition), 217-233 (2014)).

[0005] 특히, 주요 알레르겐인 Fel d 1에 대한 IgE 매개 감작은 서구 세계 인구의 약 10 %에 영향을 미친다(S. K. Chan, D. Y. M. Leung, Allergy Asthma Immunol. Res. 10(2), 97-105 (2018)).

[0006] Fel d 1은 고양이 알레르겐에 민감한 사람의 알레르기 반응의 88 ~ 95 %를 일으켜 인간에게 가장 심각한 알레르기 반응을 유발시키며, 모발의 피지선, 침샘에서 생성된다. Fel d 1은 피부(pelt)와 모발을 손질하면 고농도의 Fel d 1가 옮겨진다. Fel d 1은 작은 크기로 공기 중에, 타액 및 비듬으로 고양이 털에서 실내로 옮겨져 민감한 개인에게 감작을 유발하고, 의류, 카펫 및 가구 등의 표면에 부착될 수 있다.

[0007] 동물 모델로 가장 흔히 사용되는 마우스(mouse) 및 랫(rat)과 비교하여, 고양이는 더 긴 수명, 특정 사람 조직과의 높은 유사성 등을 포함하여 여러 독특한 장점을 갖는다. 따라서 여러 연구 그룹들은 고양이를 유전적으로 변형시키기 위해 많은 노력을 기울여 왔으나, 제한된 난자수 및 배아에서 기인한 한계성이 있는 고양이 번식 기전으로 인해 형질전환 고양이의 생산에 어려움이 있다는 문제점이 있다.

[0008] 한편, 1987년 일본학자인 Yoshizumi Ishino에 의해 대장균에서 CRISPR가 발견된 이래 DNA를 절단하는 핵산분해 효소(Nuclease)인 Cas9과 결합해서 만들어진 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 새로운 방식으로 다양한 형질전환 동물을 생산하는 기술이 개발되었다. 박테리아와 고세균(archaea)의 CRISPR(clustered, regular interspaced, short palindromic repeats)/Cas9(CRISPR-associated 9) 시스템은 1987년에 외부 플라스미드와 바이러스의 분해와 관련된 ‘면역 시스템’으로 처음 발견되었다. 그 이후로 상기 시스템은 여러 응용이 가능하고 매우 효율적인 유전체 편집 기술로 널리 사용되어져 왔다. 이는 흔히 유전자 가위라 불리는 endonuclease splicing 기술로서 1세대인 Zinc-Finger Nucleases(ZFNs)와, 2세대인 Transcription Activator-like Effector Nucleases(TALENs)보다 효율적이고 손쉽게 유전자를 조작할 수 있는 이점이 있다. 이러한 CRISPR/Cas9 시스템은 특정 유전자 내에 target site와 동일한 단일 가이드 RNA(single guide RNA; sgRNA)의 유도에 의해 Cas9의 특정 유전자 내 target site를 공격하여 유전자 삽입과 손실을 일으켜 유전자의 기능을 무력화하는 원리로 작동한다. 이와 같이 만약 염색체 내 특정 부분에 위치한 유전자에 인위적으로 삽입, 손실, 변형 등을 유도할 수 있다면 유전학 및 분자 생물학 연구뿐만 아니라 특정 유전자와 관련된 질병 연구에도 널리 활용될 수 있다. 하지만

위 CRISPR/Cas9 시스템은 아직까지 단지 몇몇의 가축 및 설치류 동물의 배아에만 직접 미세주입하는 방식으로 사용되어져 왔다.

[0009] 이에 본 발명자들은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 대한 높은 knockout 효율을 가지는 sgRNA를 개발하였으며, 상기 sgRNA가 포함된 CRISPR/Cas9 시스템을 고양이 접합체(zygote)의 세포질(Cytoplasm) 내에 미세주입하여 CH2 유전자가 녹아웃(knockout)된 형질전환 고양이를 제작하였다. 뿐만 아니라, 상기 형질전환 고양이의 혈통 유지를 위하여 세포질 주입 클로닝 기술(CICT)을 통한 형질전환 복제 고양이를 생산하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2018-0022465호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 생산된 알러지 유발 단백질 저분비 고양이를 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 복제 고양이의 생산 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 공여자 암컷 고양이(donor female cat)로부터 채취한 난모세포를 체외 성숙(IVM) 배지에서 배양하는 단계; (b) (a) 단계의 성숙한 난모세포 및 수컷 고양이로부터 채취한 정자를 시험관(in vitro)에서 체외 수정(IVF)하여 고양이 배아를 제조하는 단계; (c) Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA, Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 혼합물을 상기 (b) 단계의 고양이 배아의 세포질에 형질주입(transfection)하는 단계; (d) 상기 (c) 단계의 형질전환된 배아를 체외 배양(IVC) 배지에서 배양하여 배반포(blastocystis)까지 발달시키는 단계; 및 (e) 상기 (d) 단계의 배반포를 수여자 암컷 고양이(recipient female cat)의 난관에 이식하여 1세대 형질전환 고양이를 생산하는 단계;를 포함하는 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 상기 방법은 (f) 상기 1세대 형질전환 고양이 중 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 대하여 CH2 knock out 유전자형을 갖는 형질전환 고양이들을 선별한후 형질전환 고양이를 생산하는 단계; 및 (g) (f) 단계의 2세대 형질전환 고양이의 유전자형을 분석하여 CH2 유전자에 대한 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)를 선별하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 이어서, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 알러지 유발 단백질 저분비 고양이를 제공한다.

[0019] 나아가, 본 발명은 상기 알러지 유발 단백질 저분비 고양이에서 분리된 체세포로부터 세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)을 이용하여 복제 배아를 제작하는 단계; 및 상기 복제 배아를 수여자 암컷 고양이의 난관에 이식하는 단계;를 포함하는 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 복제 고양이의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 CH2 유전자 녹아웃(knockout)을 위한 높은 효율의 sgRNA를 개발하고, 세포질 미세주입법을 이용한 효

올직한 형질전환 고양이 생산 기술을 확립하였다. 따라서 본 발명의 방법에 따라 생산된 형질전환 고양이는 실내 알레르겐인 Fel d 1 단백질의 분비를 억제하여 사람의 고양이 알레르기 유발 빈도를 낮추는 효과가 있어 반려동물 시장에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Fel d 1 단백질의 CH1 및 CH2 유전자에서 sgRNA 후보의 위치를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH1 유전자를 타겟하는 sgRNA 후보의 체외 검증(In vitro validation) 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH2 유전자를 타겟하는 sgRNA 후보의 체외 검증(In vitro validation) 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, Fel d 1 단백질에 대한 유전자 편집 고양이 생산과정을 간략히 나타낸 순서도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, CRISPR/Cas9 시스템에 의해 Fel d 1 단백질 CH2 유전자 녹아웃(knockout)된 1세대 형질전환 고양이 생산 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 1세대 형질전환 고양이(KS-M-001 및 KS-F-011)의 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이(1세대 및 2세대)의 가계도 및 유전자형 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 2세대 형질전환 고양이 M-008의 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이(1세대 및 2세대)의 타액 및 털 샘플의 Fel d 1 단백질에 대한 ELISA 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 1세대 및 2세대 형질전환 고양이 및 형질전환 복제 고양이가 생산 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 1세대 및 2세대 형질전환 고양이 및 형질전환 복제 고양이의 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH2 게놈 동형접합 고양이(M-008)에 대한 오프 타겟팅 분석을 위한 PCR 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 있어서, CH2 게놈 동형접합 고양이(M-008)에 대한 오프 타겟팅 분석을 위한 Sanger sequencing analysis 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025]

또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026]

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/

고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

- [0027] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0029] 일 측면에서, 본 발명은 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법에 관한 것이다.
- [0030] 상기 방법은 (a) 공여자 암컷 고양이(donor female cat)로부터 채취한 난모세포를 체외 성숙(IVM) 배지에서 배양하는 단계;
- [0031] (b) (a) 단계의 성숙한 난모세포 및 수컷 고양이로부터 채취한 정자를 시험관(in vitro)에서 체외 수정(IVF)하여 고양이 배아를 제조하는 단계;
- [0032] (c) Fel d 1 단백질의 CH1 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA, Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 혼합물을 상기 (b) 단계의 고양이 배아의 세포질에 형질주입(transfection)하는 단계;
- [0033] (d) 상기 (c) 단계의 형질전환된 배아를 체외 배양(IVC) 배지에서 배양하여 배반포(blastocystis)까지 발달시키는 단계; 및
- [0034] (e) 상기 (d) 단계의 배반포를 수여자 암컷 고양이(recipient female cat)의 난관에 이식하여 1세대 형질전환 고양이를 생산하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (a) 단계의 체외 성숙(IVM) 배지는 FBS, 에스트라디올-17 β , 난포자극호르몬(FSH), 시스테인(cystein), 피루브산나트륨(sodium pyruvate) 및 페니실린-스트렙토마이신(penicillin G/streptomycin)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 30 내지 45℃에서 3 내지 5시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 단계의 체외 수정은 30 내지 45℃에서 5 내지 7시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (c) 단계의 Fel d 1 단백질의 CH1 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 (c) 단계의 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 특이적으로 결합하는 sgRNA는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어 “Fel d 1”은 2개의 이성질체인 CH1(Chain 1/Field 1-A)과 CH2(Chain 2/Field 1-B)로 구성된 36 kDa의 당단백질을 말한다. CH1은 70개의 아미노산으로 구성된 8kDa 단백질이고, CH2는 90개 또는 92개의 아미노산으로 구성된 10kDa의 단백질이다.
- [0041] 또한, 상기 Fel d 1 단백질의 CH1 유전자는 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 Fel d 1 단백질의 CH1 유전자를 발현 가능한 경우 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자는 구체적으로 서열번호 4의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 4의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자를 발현 가능한 경우 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 CH1 및 CH2는 2 개의 역평행 폴리펩티드로서, 8kDa 주요 알레르겐 1인 폴리펩티드 사슬 1(polypeptide chain 1, CH1)(서열번호 3) 및 10kDa 주요 알레르겐 1인 폴리펩티드 사슬 2(polypeptide chain 2, CH2)(서열번호 4)를 포함하며, 이는 삼중 안테나 구조를 위한 중요한 N- 글리코실화 부위를 보존한다.
- [0044] 두 개의 폴리펩티드 사슬은 피부와 타액선 모두에서 공동 발현되며, CH2의 약간 짧은 버전은 피지선에서 우선적으로 발견되는 반면, CH2의 더 긴 버전은 타액선에서 발현된다. CH1에는 70 개의 아미노산 잔기가 포함되어 있는 반면, CH2에는 90 개의 아미노산(짧은 버전) 및 92 개의 아미노산(긴 버전)의 두 가지 버전의 아미노산 잔기

가 있다. 2 개의 폴리 펩타이드 사슬은 3 개의 사슬 간 이황화 결합에 의해 공유 적으로 연결된다. CH1(아미노산 25 ~ 38, 아미노산 46 ~ 59)에는 인간에 대한 감각에 중요한 2 개의 IgE 결합 부위가 존재하고, CH2(아미노산 15 ~ 28)에는 1 개의 IgE 결합 부위가 존재한다. 두 개의 폴리펩티드 단백질도 T 세포 반응성 에피토프(CH1에 46 ~ 53 번 아미노산, CH2에 23 ~ 30 번 아미노산)를 가지고 있다.

- [0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (c) 단계의 배아는 단세포, 2세포기, 4세포기, 8세포기 또는 상실배 단계의 접합체(zygote)일 수 있고, 바람직하게는 단세포 단계의 접합체(zygote)일 수 있다. 상기 단세포 단계는 수정 직후 분열되지 않은 상태를 말한다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (c) 단계의 형질주입(transfection)은 미세주입(microinjection)법에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (d) 단계의 체외 배양(IVC) 배지는 44 $\mu\text{g/ml}$ 의 피루브산나트륨, 14.6 $\mu\text{g/ml}$ 의 글루타민, 10 $\mu\text{l/ml}$ 의 페니실린/스트렙토마이신, 3 mg/ml 의 BSA(소 혈청 알부민, A6003) 및 310 $\mu\text{g/ml}$ 의 글루타티온을 포함하는 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (d) 단계의 배양은 30 내지 45°C에서 5 내지 7시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 방법은 (f) 상기 1세대 형질전환 고양이 중 Fe1 d 1 단백질의 CH2 유전자에 대하여 CH2^{Mosaic} 유전자형을 갖는 형질전환 고양이 및 CH2^{+/-} 유전자형을 갖는 형질전환 고양이를 선별한 후, 교배하여 2세대 형질전환 고양이를 생산하는 단계; 및 (g) (f) 단계의 2세대 형질전환 고양이의 유전자형을 분석하여 Fe1 d 1 단백질에 대한 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)를 선별하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)는 Fe1 d 1 단백질의 CH2 유전자에 대하여 CH2^{-/-} 유전자형을 갖는 것일 수 있다.
- [0052] 일 측면에서, 본 발명은 상기 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법으로 생산된 알러지 유발 단백질 저분비 고양이에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명의 알러지 유발 단백질 저분비 고양이는 상술한 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 CH2 유전자 녹아웃(knockout) 형질전환 고양이 생산 방법과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0054] 본 발명에 일 실시예에 있어서, 상기 알레르기 유발 단백질은 알레르겐(Allergen)일 수 있으며, 상기 실내 알레르겐은 Fe1 d 1 단백질일 수 있다.
- [0056] 일 측면에서, 본 발명은 Fe1 d 1 단백질 녹아웃(knockout) 형질전환 복제 고양이의 생산 방법에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명에 일 실시예에 있어서, 상기 방법은 형질전환 고양이에서 분리된 체세포로부터 세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)을 이용하여 복제 배아를 제작하는 단계; 및 상기 복제 배아를 수여자 암컷 고양이의 난관에 이식하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 사용되는 용어 “세포질 주입 클로닝 기술(cytoplasm injection clone technology)”은 체세포 복제 기술(SCNT)의 일종으로, 종래 체세포 복제 기술의 단점인 낮은 리프로그래밍(Reprogramming) 효율을 극복하기 위해 개발된 것으로, 핵이 제거된 난자에 추가적인 세포질을 주입 후 융합 시켜 세포질 양을 복원시키는 기술이다.
- [0059] 본 발명에서는 복제배아의 리프로그래밍 효율을 향상시키기 위하여 (a) 난모세포의 제일 극체 및 그 주위 세포질을 흡입하여 탈핵시켜 세포질이 소실된 탈핵된 난모세포를 준비하고, 복제하고자 하는 체세포와 함께 다른 난모세포로부터 추출한 세포질을 상기 탈핵된 난모세포의 난황 주위공간에 주입하였다.
- [0060] 구체적으로, 복제배아의 리프로그래밍 효율을 향상시키기 위한 방법은 (a) 복제하고자 하는 체세포를 가진 개체로부터 복제하고자 하는 체세포를 추출하는 단계; (b) 체외 성숙시킨 난모세포로부터 세포질의 20~40 부피%와

핵이 제거된 탈핵된 난모세포를 준비하는 단계; (c) 공여자 난모세포로부터 20~40 부피%의 세포질을 추출하는 단계; (d) 상기 복제하고자 하는 체세포를 가진 개체로부터 추출된 체세포와 공여자 난모세포로부터 추출한 세포질을 상기 (b) 단계의 탈핵된 난모세포에 주입하는 단계; 및 (e) 상기 체세포 및 세포질이 주입된 난모세포를 융합시키는 단계를 포함한다.

이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

<실시예 1> 실험의 준비

1-1. 시약 준비

특별히 언급되지 않는 한 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

1-2. 동물모델의 준비

국내 공여자 암컷 고양이와 수여자 암컷 고양이는 1.86M x 0.73M x 0.65M(W x D x H)로 측정된 스테인리스 스틸 케이지에 개별적으로 수용되었으며 건조 사료와 물을 임의로 제공하여 유지되었다. 21-25℃의 온도 범위에 있는 제어실은 14D:10N의 광주기로 순환되었다. 모든 수술 절차는 경상대학교 동물관리위원회(GNU-170727-T0034)의 승인을 받았다. 모든 고양이는 FeLV(Feline Leukemia Virus), FIV(Feline Immunodeficiency Virus) 및 FIP(Feline Infectious Peritonitis)에 대한 바이러스 프리 고양이를 사용하였으며, 고양이 헤르페스 바이러스(feline herpes virus), 칼리시 바이러스(calici virus), 범백혈구감소증 바이러스(panleukopenia virus), 앵무병 클라미디아(Chlamydia psittaci) 백신을 투여하여 사용하였다.

<실시예 2> CH1 및 CH2 sgRNA에 대한 설계

고양이 종에 따라 CH1 및 CH2 게놈에 심각한 변이가 있기 때문에 난모세포 기증자로 사용한 고양이의 CH1 및 CH2 게놈 염기서열은 Microgen(Seoul, Republic of Korea)에서 PCR 증폭하여 분석하였으며, PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다. 그 결과, PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)에서 CH1(NCBI accession number: X62477) 및 CH2(NCBI accession number: X62478)와 정렬 및 확인되었다. 상기 고양이 CH1 및 CH2 게놈 서열을 기반으로 PAM(Protospacer Adjacent Motif) 서열에 인접한 sgRNA 후보들은 Zhang-Lab Guide Design Resources(<https://zlab.bio/guide-design-resources>) 또는 CHOPCHOP(<https://chopchop.cbu.uib.no/>)를 사용하여 개발하였다(도 1 참조). 이에 따라 CH1과 CH2 게놈 염기서열을 기반으로 7개의 sgRNA 후보(C1-1, C1-2, C1-3, C1-4, C1-5, C2-1, 및 C2-2)를 디자인하고 Integrated DNA Technologies(IDT)를 이용하여 sgRNA를 합성 구매하였다(표 1). sgRNA의 PAM(protospacer adjacent motif) 서열은 굵은 볼드체로 표시하였다.

표 1

Genes		Sequence (5' -> 3')	Size (bp)
CH1	1 st PCR	Forward primer: AGAGGATCCTGCCCACACATA	308
		Reverse primer: GGTGTTTGAACCCCTGGAGAA	
	2 nd PCR	Forward primer: AGGGTCAGCTTGTCTTTGTGT	339
		Reverse primer: TTCTCCTCCCAGATCCCAGG	
CH2	PCR	Forward primer: TCTTAACAGCCAAGGGTTGAG	296
		Reverse primer: GGAGGTGAAGGAGTGAGATAGA	

표 2

sgRNA	target domain	Sequence(5' -> 3')
C1-1	CH1	CCACCCTGCCCTACTGTTGCGGC
C1-2		CCCTGCCCTACTGTTGCGGCCAC
C1-3		GGCTGCCTTGCTCTTGATCTCGG
C1-4		GATGTTGACCTATTCCTGACGGG
C1-5		GGAGAATGCTCTCAGCGTGCTGG
C2-1	CH2	GAGGGGGGCACTGCTTGTGCTGG
C2-2		ACTGCTTGTGCTGGCATTGCTGG

[0077] <실시예 3> CH1/CH2 및 Cas9의 CH1 및 CH2 sgRNA 준비

[0078] pX330(pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 plasmid, Addgene plasmid number 42230, provided by Feng Zhang)을 제한효소 BbsI(NEB R0539S)로 절단 하고 1% 아가로스 겔 전기영동을 통해 확인한 후 겔을 정제하였다. 상기 표 2에 기재된 sgRNA의 올리고뉴클레오타이드를 각각 T4 DNA ligase(NEB M0202S)에 의해 선형화된 벡터 pX330에 annealing하고 ligate하였다. 이어서, 라이게이션(ligation)된 pX330-CH1 플라스미드와 pX330-CH2 플라스미드를 Qiagen miniprep 키트(Qiagen 27106)를 사용하여 형질전환 및 정제하였다.

[0080] <실시예 4> sgRNA의 시험관내 검증

[0081] 우리는 Mehravar et al.에 기재된 방법으로 IDT(Integrated DNA Technologies)에서 상기 표 2에 기재된 CH1 및 CH2 도메인을 타겟하는 sgRNA 후보를 합성한 후, 체외 검증을 위해 최적화된 프라이머(표 1)로 PCR product를 준비하고, 각 후보물질에 대한 적중 절단(on-targeting cleavage) 효과를 평가하였다. PCR은 Phusion high-fidelity DNA polymerase(Thermo Scientific F530L)를 사용하여 수행되었다. PCR product의 순도는 SYBR nucleic acid gel stain(Thermo Scientific S7580)으로 관찰하였다. 2% agarose gel 전기영동 후 EnGen® Spy Cas9 NLS cas9 단백질은 NEB에서 구입하였다.

[0082] 구체적으로, 30nM sgRNA(IDT), 10X NEB 버퍼 r3.1(NEB) 및 1μM EnGen® Spy Cas9 NLS cas9 단백질을 혼합하고 25℃에서 10분 동안 배양한 후, PCR 생성물을 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 proteinase K를 첨가하고 65℃에서 10분 동안 배양하였다. 배양된 반응을 2% 아가로스 겔 전기영동으로 시각화하고 유효성을 ImageJ 프로그램으로 분석하였다.

[0083] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이 모든 CH1 sgRNA 후보 중에서 C1-1은 0%, C1-2는 61%, C1-3는 91%, C1-4는 86%, C1-5는 100%의 절단 효율을 가지는 것으로 나타났다(도 2). 따라서 합리적인 절단 효율을 가지면서 다른 후보 sgRNA보다 시작 코돈에 더 가까운 C1-2를 CH1 sgRNA의 최종 후보로 선정하였다. 또한, CH2 sgRNA 후보인 C2-1 및 C2-2는 유사한 절단 효율(81% 대 85%)을 보였다(도 3). 따라서 시작 코돈에 더 가까운 C2-1을 CH2 sgRNA의 최종후보로 선정하였다.

[0084] 이러한 결과는 sgRNA 후보 중 C1-2(서열번호 1) 및 C2-1(서열번호 2)이 고양이 Fel d 1 유전자의 CH1 및 CH2 도메인에서 게놈 편집을 효과적으로 도입할 수 있음을 시사한다.

[0086] <실시예 5> 시험관 내 전사(In vitro transcription)

[0087] CH1 sgRNA(C1-2) 및 CH2 sgRNA(C2-1)에 대한 mRNA는 단세포 단계 배아의 세포질로의 미세 주입을 위해 Cas9 mRNA와 함께 시험관 내에서 전사하였다.

[0088] XbaI에 의한 linearization 후 Cas9 mRNA의 합성을 위한 DNA template과 T7 프로모터 영역 옆에 있는 프라이머를 사용하여 PCR에 의한 시험관 내 C1-2 및 C2-1의 전사를 위한 DNA template을 증폭하였다. CH1 및 CH2 sgRNA mRNA 합성을 위한 PCR 프라이머는 표 3에 나타내었다. Qiagen PCR clean-up 키트를 사용하여 아가로스 겔 전기영동에서 PCR 산물을 정제하고 관찰하였으며, 그 후, 각각 전사 합성 키트 MEGashortscript T7(Ambion AM1334)과 mMESSAGE mMACHINE mRNA(Ambion AM1344)에 의해 체외에서 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9

mRNA를 전사했다. 합성된 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA는 모두 MEGAclean kit(Ambion AM1908)에 의해 정제되었다.

표 3

Name	Sequence (5' -> 3')
CH1 sgRNA F	TAATACGACTCACTATAAGGTGGCCGCAACAGTAGGGCAGGG
CH2 sgRNA F	TAATACGACTCACTATAAGGAGGGGGGCACTGCTTGTGCTGG
gRNA R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC
Cas9 F	TAATACGACTCACTATAAGGAGAATGGACTATAAGGACCACGAC
Cas9 R	GCGAGCTCTAGGAATTCCTAC

<실시예 6> 난모세포 수집 및 체외성숙(IVM)

공여자 고양이(donor cat)는 체중 2~4kg 정도의 2~4세 암컷 고양이 5마리로, 각각의 고양이에게 200 IU eCG(말 융모성 성선자극호르몬, Daesung, Seoul, Republic of Korea)를 주사하고, 4일 후에 100 IU hCG(인간 융모성 성선자극호르몬, Daesung, Seoul, Republic of Korea)를 투여하였다. 경상국립대학교 동물병원에서 hCG 처리 24 시간 후 난소 노출을 위한 개복술을 시행하였다. 전신 마취 하에 1ml 주사기에 부착된 18G 바늘로 난소에서 미성숙 난모세포를 수집하였다. 수집된 미성숙 난모세포를 IVM(*in vitro* Maturation) 배양액(10%(v/v) FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA; 카탈로그 번호.16000-044), 1μg/ml 에스트라디올-17β (E2758), 10μg/ml FSH(난포자극호르몬, Prospec HOR-285), 0.6mM 시스테인(C7352), 0.2 mM 피루브산나트륨(sodium pyruvate, Gibco 11360-070) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin, P4333))에서 5% CO₂, 38.5℃에서 4시간 동안 배양하였다.

<실시예 7> 정액 수집 및 냉동 보존

고양이 정액은 artificial virginal method으로 수집되었다. 간단히 말해서 티저퀸(teaser queen)의 발정은 100IU eCG 주입에 의해 유도되었다. 채취한 정액을 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco 14190-250)로 세척하고, 200 xg 에서 5분간 원심분리한 후 동결보존 프로토콜에 의해 동결되었다. Ext I(Extender I)은 20% 난황(egg yolk) 및 1% 페니실린-G/스트렙토마이신으로 Tris-buffer를 보충하여 제조하였으며, Ext II(Extender II)는 Ext I에 8% 글리세롤, 1.0% Equex STM을 보충하여 제조하였다. Ext I로 희석된 정액을 10ml 튜브(SPL Life sciences, Seoul, Republic of Korea)에 넣고 냉장고에서 37℃의 따뜻한 물 150ml 에 2 시간 이상 담가 천천히 5℃로 냉각한다. 그 다음 적어도 1시간 동안 Ext II로 단계적으로 희석하였다. 마지막으로 냉각된 정액을 5℃ 냉장실에서 0.25ml straw에 포장하고 액체 질소 증기로부터 5cm 위에서 보존한 다음 장기 보관을 위해 액체 질소에 직접 담가두었다.

<실시예 8> 체외수정(IVF) 및 체외배양(IVC)

알려지 유발 단백질 저분비 고양이의 발생 과정에서 단세포 단계의 배아를 발달시키기 위한 IVF 및 IVC의 최적조건을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

먼저, 상기 실시예 6 및 7에 기재된 바와 같이 수집된 성숙한 난모세포와 동결정자를 이용하여 체외수정(IVF) 및 체외배양(IVC-1 및 IVC-2)을 수행하였으며, IVF 단계와 IVC-1 단계의 배양시간을 달리하여 총 4 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다(표 4).

표 4

Group	Number of Oocytes	IVF (h)	IVC1 (h)	IVC2 (h)
1 st Group	9	4	4	72

2 nd Group	8	5	3	72
3 rd Group	11	6	6	72
4 th Group	16	18	10	72

[0104] 구체적으로 해동된 정자를 D-PBS에 희석하여 200 xg로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 펠릿화된 정자를 20 µg/ml 헤파린 500 µl로 15분간 희석하여 정자의 수정능획득(capacitation)을 유도하였다. 성숙한 난모세포는 1-2x10⁶ cells/ml 용량화된 정자로 4, 5, 6, 18시간 동안 시험관 내에서 수정시켜 진행하였다. 접합체(Presumed zygotes)는 44 µg/ml의 피루브산나트륨, 14.6 µg/ml의 글루타민, 10 µl/ml의 페니실린/스트렙토마이신, 3 mg/ml의 BSA(소 혈청 알부민, A6003) 및 310 µg/ml의 글루타티온을 포함하는 CR1-aa 배지로 구성된 50 µl drop IVC-1(in vitro Culture-1) 배양액에서 4, 3, 6, 10 시간 동안 배양되었으며, 그 후 IVC-2(in vitro Culture-2) 배지에서 3일 동안 배양되었다. IVC-2 배지는 IVC-1 배지에서 BSA를 10% FBS로 대체하여 제조하였다. IVF, IVC-1 및 IVC-2 단계는 최대 습도, 38.5℃, 5% CO₂의 인큐베이터에서 수행되었다.

[0105] 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이 IVF 6h+IVC1 6h 그룹의 배반포 비율은 27.3%로 나타났으며, IVF 18h+IVC1 10h 그룹의 유사한 배반포 비율은 25%로 나타난 반면, IVF 4h+IVC1 4h 그룹의 배반포 비율은 0%로 고양이 배아에 대한 발달 능력을 전혀 나타내지 않는다는 것을 발견하였다. IVF 6h + IVC1 6h 그룹의 배반포 비율은 27.3%로, 가장 높은 배반포 발달률을 가지며 배반포 단계에 도달할 만큼 충분히 큰 배아를 성공적으로 생산하는 것으로 나타났다.

[0106] 따라서 체외수정(IVF) 및 체외배양(IVC-1, IVC-2)의 최적조건을 각각 6시간 6시간 및 72 시간으로 선정하였다.

표 5

Group	Blastocysts(%)
1 st Group	0 (0)
2 nd Group	1 (12.5)
3 rd Group	3 (27.3)
4 th Group	4 (25.0)

[0110] <실시예 9> 고양이 배아 내 CH1 및 CH2 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 형질주입

[0111] Fel d 1 단백질이 녹아웃(knockout)된 형질전환 고양이 배아를 제작하기 위하여 미세주입법을 이용하여 접합체의 세포질 내로 CH1 및 CH2 sgRNA 및 Cas9 mRNA의 혼합물을 주입하고, CRISPR/Cas9 시스템이 미세주입된 접합체를 배반포 단계에 도달할 때까지 배양하여 고양이 배아 발달 과정에서 CH1 sgRNA(C1-2) 및 CH2 sgRNA(C2-1)가 미치는 영향을 평가하였다.

[0112] 구체적으로, 접합체(presumed zygote, 일세포기 배아)를 0.003 µg/ml BSA가 보충된 TCM199로 세척하고 따듯하게 데운 현미경 스테이지 위에 올려 두었다. 수술용 피펫(pipette)은 접합체를 올려두기 전에 현미경 아래에 설치되었고 배아는 고정 피펫(holding pipette)의 흡입력으로 극체가 6시 또는 12시 방향에 위치하도록 한 상태에 고정이 된 후 정렬이 되었다. 그 다음, micro injection 기술(Femtojet system, Eppendorf, Germany)을 사용하여 100 ng/µl의 CH1 sgRNA(C1-2), 100 ng/µl의 CH2 sgRNA(C2-1) 및 200 ng/µl의 Cas9 mRNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템을 체외수정(IVF)이 완료된 단세포 단계의 접합체(zygote)의 세포질에 미세주입하였다. 이후, 상기 CRISPR/Cas9 시스템이 미세주입된 접합체는 IVC-1 배지 및 IVC-2 배지에서 배반포 단계에 도달할 때까지 최대습도, 38.5℃, 5% CO₂의 배양조건으로 배양되었으며, 배반포로 발달한 배아의 수 및 배반포 발달률을 측정하였다..

[0113] 그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA가 도입된 고양이가 배아의 배반포 비율은 22.7%로 나타났으며, 상기 실시예 8의 결과와 비교하였을 때 최적조건인 IVF 6h+IVC1 6h 그룹과 유사한 배반포 비율을 나타내었다. 이러한 결과는 CH1 sgRNA(C1-2) 및 CH2 sgRNA(C2-1)가 IVC-2 단계 이후 고양이가 배아의 발달 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[0114] 따라서, 본 발명에서 개발된 CH1 sgRNA(C1-2) 및 CH2 sgRNA(C2-1)은 배아의 발달 능력에 영향을 미치지 않으므로, 이를 사용하여 Fe1 d 1 게놈 편집 고양이(알러지 유발 단백질 저분비 고양이)를 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.

표 6

난모세포의 수	IVF (h)	IVC-1 (h)	미세주입된 난모세포의 수	IVC-2 (h)	배반포의 수 (%)
110	6	6	105	72	24 (22.7)

[0118] <실시예 10> 수여자 암컷 고양이의 발정 주기 동기화 및 배아 이식

[0119] 이어서, 도 4를 참조하여 Fe1 d 1 유전자 편집 고양이를 생산하기 위하여 세포질에 CRSPR/Cas9 시스템이 미세주입된 접합체(zygote)를 최대 습도, 38.5℃, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배반포 단계에 도달할 때까지 IVC-1 배지에서 1시간 동안 배양한 후, 수여자 고양이의 난관에 직접 이식하여 1세대 형질전환 고양이를 생산하였다(도 5)

[0120] 구체적으로, 앞서 설명한 바와 같이 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA가 미세주입된 20개의 배아를 수술실에서 발정 동기화(estrous-synchronized)된 수여자 암컷 고양이의 난관에 각각 이식하였으며, 4일간격으로 200 IU eCG와 100 IU hCG를 주사하여 발정 주기의 단계를 동기화하였다. 수술 전, 메테토미딘(10 µg/kg; 피하주사; Domitor, Orion Pharma, Espoo, Finland), 아트로핀(0.04 mg/kg; 피하주사; Jeil Pharmaceutical Co., Daegu, Republic of Korea), 아세프로마진(0.1 mg/kg; 피하주사; Samu Med., Seoul, Republic of Korea), 세파졸린(25 mg/kg, 정맥(IV)주사; Chong Kun Dang Pharm Co., Seodaemun-Gu, Republic of Korea)을 수여자 암컷 고양이에게 사전 투약하였다. 2 mg/kg 에토미데이트(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)를 정맥 투여하여 고양이를 마취시키고, 기관내 튜브(endotracheal tube)를 통해 산소와 함께 2.5% isoflurane을 주입하여 마취 상태를 유지하였으며, 수술 내내 식염수를 10ml/kg/h로 정맥 투여하였다. 이어서, 컬럼(column)을 만들기 위해 배아를 약 0.5ml의 배지가 있는 카테터(catheter)에 로드(load)하였다. 그런 다음, 20개의 배아를 4마리의 발정 동기화된 수여자 고양이에 외과적으로 이식하였다. 세포질 미세 주입 및 배아 이식은 일주일에 두 번씩 2주 동안 수행되었다. 배아 이식 후 30 일경에 초음파(Xario® SSA-660A, TOSHIBA, Hamamatsucho, Japan)를 이용하여 임신 여부를 확인하였고, 4마리 수여자 암컷 고양이 중 단 한 마리만 임신이 확인되었다(표 7). 임신한 고양이는 새끼를 낳을 때까지 별도의 클린룸에서 돌보았으며, 임신 60 일째에 가임된 수혜자 암컷 고양이는 두 마리의 새끼 고양이를 낳았다.

표 7

수여자 암컷 고양이	이식된 배아의 수	새끼(Pups)
1 st	20	2 Kittens
2 nd	20	No birth
3 rd	20	No birth
4 th	20	No birth

[0124] <실시예 11> 유전자형 분석 및 T7E1 분석

[0125] Puregene Core Kit(Qiagen 158445)를 사용하여 상기 실시예 10에서 태어난 두 마리 새끼고양이 귀에서 게놈 DNA를 분리하였다. CH1 및 CH2 표적 영역을 포함하는 게놈 단편(genomic fragment)은 상기 표 1의 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증폭되었다. PCR product는 SYBR green dye로 염색된 2% 아가로스 겔에서 시각화한 다음, PCR product를 T7E1 분석에 적용하고 pcDNA3.1 클로닝 벡터(Invitrogen V79020)에 클로닝한 후, NEB 5-alpha competent *E. coli*(NEB C2987H)에 형질전환 하였다. 이어서, 상기 *E. coli*를 평판도말(spreading) 하고 밤새 배양(overnight culture)한 후, 무작위로 20개의 콜로니를 수집하고 성장시키고, 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA의 염기서열을 분석하고, 서열화 된 대립 유전자를 야생형 대립 유전자에 align하여 돌연변이 여부를 확인하였다.

[0126] 도 6은 본 발명에서 제작된 1세대 형질전환 고양이(KS-M-001 및 KS-F-011)의 T7E1 분석 결과를 나타낸 도이다.

[0127] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 1세대 형질전환 고양이 2마리 중 첫 번째 고양이(수컷, 식별 번호: KS-M-001, 이름: Heavy)의 유전자형은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 모자이크 돌연변이를 가지는 모자이크형(Mosaic genotype)으로 확인되었으며($CH1^{+/+}/CH2^{Mosaic}$; male), 두 번째 고양이(암컷, 식별 번호: KS-F-011, 이름: Arong)의 유전자형은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에서 단일대립형질에 유전자 편집이 일어난 이형접합체(heterozygote)로 확인되었다($CH1^{+/+}/CH2^{+/-}$; female).

[0128] 이와 같이 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA의 세포질 미세주입을 통해 생산된 모든 고양이에서 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에 돌연변이가 나타났으므로, CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1)의 knockout 효율은 100%로 확인되었다.

[0130] <실시예 12> Fel d 1 게놈 편집 고양이의 교배를 통한 세대(Generation) 생산

[0131] 이어서, Fel d 1 게놈 편집 고양이 KS-M-001과 KS-F-011이 성적으로 성숙한 이후 두 고양이를 교배시켰으며, 총 6마리의 2세대 형질전환 고양이(M-003(수컷), M-004(수컷), M-005(수컷), M-006(암컷), M-007(수컷) 및 M-008(수컷))가 생산되었다. 자손 고양이 중 M-003, M-004, M-007 및 M-008에 대한 유전자형 및 T7E1 분석을 수행하였다(도 7 참조).

[0132] 그 결과, 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, M-008의 유전자형은 Fel d 1 단백질의 CH2 유전자에서 이중대립형질에 유전자 편집이 일어난 동형접합체(homozygote)로 확인되었고($CH1^{+/+}/CH2^{-/-}$, 도 8) M-003, M-004 및 M-007은 Fel d 1 유전자의 CH2 도메인에서 단일대립형질에 유전자 편집이 일어난 이형접합체(heterozygote) 것으로 확인되었다($CH1^{+/+}/CH2^{+/-}$).

[0133] 이러한 결과는 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA가 미세주입된 배아를 이용하여 유전자 편집 고양이를 생산하는 경우 Fel d 1 CH2 도메인에 대하여 모자이크 돌연변이 또는 이형접합 돌연변이를 가지는 고양이 생산되며, 상기 CH1 sgRNA(C1-2), CH2 sgRNA(C2-1) 및 Cas9 mRNA를 이용한 유전자 편집 방법으로 생산된 고양이를 부모 개체로 자손을 생산하는 경우 CH2 도메인에 동형접합 돌연변이를 가지는 고양이를 생산할 수 있다는 것을 의미한다.

[0135] <실시예 13> Fel d 1 단백질에 대한 ELISA 분석

[0136] 본 발명에서 제작된 Fel d 1 CH2 게놈 편집 고양이의 타액과 털 샘플에 대한 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석을 수행하여 Fel d 1 단백질 수준을 측정하였다.

[0137] 먼저, 타액 및 털 샘플은 세척 전(W-1), 세척 후 24시간(W+1day), 96시간(W+4day) 및 168시간(W+7day)에 수집하였다. 타액은 마이크로 피펫으로, 털은 그루밍 장갑으로 수집하였다. 고양이의 세척은 수의사의 지시에 따라 야생형 고양이(WT)와 Fel d 1 CH2 게놈 편집 고양이(KS-M-001, KS-F-011 및 M-008)를 고양이 전용 샴푸로 세척한 다음 따뜻한 물로 행구고 자연 건조한 후 야생형 고양이와 Fel d 1 CH2 게놈 편집 고양이를 일반 동물실로 옮겨 개별적으로 수용하였다.

[0138] Fel d 1 ELISA 2.0 kit-Single Plate(Indoor Biotechnologies EPC-FD1-1)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에

따라 Fel d 1 단백질의 생산 수준을 분석하였다. 구체적으로, 1mg의 털과 30 μ l의 타액을 3ml의 물에 넣고 실온에서 24시간 동안 Fel d 1의 분비를 유도하였다. ELSIA의 희석 계수는 1/10이며 Fel d 1을 정확하게 감지하도록 최적화하였다. MyAssays(myassays.com)의 온라인 곡선 피팅(mycurvefit.com)을 통해 표준 곡선을 분석하였으며, 그런 다음 Myassays에서 Four Parameter Logistic(4PL) curv fit을 사용하여 ELISA 결과에서 도출된 symmetrical sigmoidal calibrator의 농도를 계산하고 분석하였다. ELISA용 그래프와 표는 마이크로소프트 엑셀을 통해 생성되었다.

[0139] 그 결과, 표 8 내지 표 11 및 도 9에 나타난 바와 같이 세척 여부와 관계없이 타액 샘플 및 털 샘플에서 Fel d 1 CH2 게놈 유전자 편집 고양이(KS-M-001, KS-F-011 및 M-008)은 야생형 고양이(WT)와 비교하여 낮은 수준의 Fel d 1 단백질이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 특히, KS-F-011과 M-008은 세척 후 샘플(W+1, W+4 및 W+7)에서 Fel d 1 단백질이 거의 포함되지 않은 것으로 나타났다. 또한, 야생형 고양이, KS-M-001 및 KS-F-011는 대체적으로 세척 후 Fel d 1 단백질 수준이 감소하였다가 시간이 경과할수록 단백질 수준이 다시 회복되는 경향을 보였으나, M-008은 세척 후 시간이 경과하여도 Fel d 1 단백질 수준이 지속적으로 감소하여 세척 전날(W-1) 대비 최대 97.4%(타액 샘플), 90%(털 샘플)가 감소하였다.

표 8

[0141]

Days	WT Male (μ g/ml)	KS-M-001 (μ g/ml)	M-008 (μ g/ml)
W-1	16.11 $\pm$ 0.18	12.20 $\pm$ 0.81*	5.86 $\pm$ 0.33
W+1	17.61 $\pm$ 0.97	6.77 $\pm$ 0.54**	0.31 $\pm$ 0.04
W+4	18.00 $\pm$ 1.81	12.70 $\pm$ 2.12*	2.04 $\pm$ 0.36
W+7	10.69 $\pm$ 3.55	9.21 $\pm$ 1.17	0.15 $\pm$ 0.02

표 9

[0143]

Days	WT Female (μ g/ml)	KS-F-011 (μ g/ml)
W-1	16.80 $\pm$ 2.63	6.35 $\pm$ 0.99*
W+1	13.49 $\pm$ 0.47	0.33 $\pm$ 0.00**
W+4	17.06 $\pm$ 0.59	1.52 $\pm$ 0.13**
W+7	11.81 $\pm$ 0.84	1.51 $\pm$ 0.10**

표 10

[0145]

Days	WT Male (μ g/ml)	KS-M-001 (μ g/ml)	M-008 (μ g/ml)
W-1	13.60 $\pm$ 1.47	11.73 $\pm$ 0.25	3.75 $\pm$ 0.08
W+1	7.91 $\pm$ 0.35	3.10 $\pm$ 0.39	0.71 $\pm$ 0.15
W+4	10.38 $\pm$ 0.43	6.42 $\pm$ 0.29	0.24 $\pm$ 0.11
W+7	13.06 $\pm$ 4.03	8.46 $\pm$ 1.06	0.10 $\pm$ 0.01

표 11

[0147]

Days	WT Female (μ g/ml)	KS-F-011 (μ g/ml)
W-1	7.03 $\pm$ 0.65	5.92 $\pm$ 0.16

W+1	4.73 ± 0.05	1.51 ± 0.16
W+4	5.43 ± 0.65	1.86 ± 0.18
W+7	6.05 ± 0.63	1.34 ± 0.16

[0149] 상기와 같은 결과를 통해 Fe1 d 1 CH2 도메인에 대한 동형접합 돌연변이를 가지는 M-008는 이형접합 돌연변이를 가지는 KS-F-011 모자이크 돌연변이를 가지는 KS-M-001에 비해 Fe1 d 1 단백질의 분비가 억제되는 것을 확인하였다.

[0150] 이러한 결과는 Fe1 d 1 CH2 도메인에 동형접합 돌연변이가 일어나는 경우, 모자이크 돌연변이 또는 이형접합 돌연변이가 일어나는 경우에 비해 Fe1 d1 단백질 분비가 현저히 억제된다는 것을 의미한다.

[0152] <실시예 14> 세포질 주입 클로닝 기술(CICT)을 통한 복제 고양이의 생산

[0153] 상기 실시예 11에서 CH2 도메인에 동형접합 돌연변이를 가지는 것으로 확인된 자손 고양이(식별번호: M-008, 이름: Alsik)의 귀 조직에서 핵 공여 세포(nuclear donor cell)를 분리한 다음 15% FBS(Gibco), 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 및 1% penicillin-streptomycin이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM(Gibco)에 넣었다. recipient embryo는 2-4 kg의 공여자 암컷 고양이로부터 수집하였으며, 핵 이식은 실시예 11에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0154] 간단히 말해서, 성숙 난모세포는 1차 극체와 중기 2기 염색체를 포함하는 인접한 난자질을 제거함으로써 제핵(enucleated)되었다. 공여자 난모세포에서 유래한 세포질의 약 30%와 함께 Sendai Virus(SV; Cosmo Bio, Tokyo, Japan)에 침지되어 있는 핵 공여 세포는 난모세포가 핵분열되기 전에 발생한 세포질 부피를 회복하기 위해 핵분열된 수용체 난모세포의 주변세포 공간에 동시 주입(co-inject)되었다. 재구성된 난모세포는 Sendai Virus 매개 융합을 통해 융합된 후 2시간 동안 modified synthetic oviduct fluid(mSOF) 배양액에서 2시간 동안 배양되었다. 재구성된 난모세포(복제 배아)를 5분 동안 5 M ionomycin 에서 활성화한 후, 5% CO₂, 38.5℃에서 4시간 동안 최대 습도를 유지하면서 2 mM 6-dimethylaminopurine에서 배양하였다. 그리고 나서, 이 복제 배아들을 발정 동기화된 수여자 암컷 고양이들의 난관에 이식하였으며, 이후에는 실시예 10과 동일한 방법으로 임신 여부를 확인하고, 임신이 확인된 수여자 암컷 고양이는 새끼를 낳을 때 까지 개별적으로 수용하였다. M-008로부터 CICT 기술을 이용하여 복제된 형질전환 복제 고양이는 식별번호 KS-M-004를 부여하였다(도 10d).

[0155] 세포질 주입 복제 기술(CICT)을 통해 M-008로부터 복제된 고양이는 KS-M-004의 식별번호를 부여하였으며, 상기 복제 고양이가 본 발명에서 제조된 Fe1 d 1 유전자 편집 고양이들과 동일한 염기서열을 가지는지 확인하기 위하여 야생형(WT), KS-M-001(Hetero), KS-F-011(Hetero), M-008(Homo) 및 KS-M-004(Homo)에 대한 sequencing analysis를 수행하였다.

[0156] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 형질전환 복제 고양이(식별 번호: KS-M-004, 이름: Alsik)는 CH2 도메인 동형접합 고양이(식별 번호: M-008)는 CH2 도메인의 염기서열이 서로 동일한 것으로 확인되었다.

[0157] 또한, KS-M-001은 야생형 고양이(WT)와 비교하여 CH2 도메인에서 25개의 뉴클레오티드가 삭제되고, 각각 1개씩 2개의 뉴클레오티드가 삽입되어 있는 것을 확인하였으며(도 11a, b), KS-F-011은 CH2 도메인에서 하나의 뉴클레오티드가 삽입된 이형접합 돌연변이로 확인되었고(도 11a, c), M-008 및 KS-M-004는 CH2 도메인에서 하나의 뉴클레오티드 삽입된 동형접합 돌연변이로 확인되었다(도 11a, d).

[0159] <실시예 15> 혈통 분석

[0160] 혈통 분석은 Yin et al. 에 의해 수행된 혈통 분석 절차에 따라 분석을 수행하였다.

[0161] CICT 복제 고양이(식별 번호: KS-M-004, 이름: Alsik) 및 CH2 게놈 동형접합 고양이(식별 번호: M-008)의 혈통을 식별하기 위해 9개의 고양이 DNA microsatellite marker(FCA229, FCA290, FCA305, FCA441, FCA078, FCA201, FCA224, FCA170, FCA304)를 사용하였다. microsatellite marker를 분석하기 위해 CICT 복제 고양이(식별 번호: KS-M-004), CH2 게놈 동형접합 고양이(식별 번호: M-008) 및 야생형 고양이(WT)의 게놈 DNA를 사용하였고, 이에

대한 프라이머는 Macrogen(Seoul, Republic of Korea)에서 제공받았다(표 12). 각 정방향 프라이머는 6-FAM으로 표시되었으며, 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 사용하여 모든 PCR 결과를 평가하였고, GeneScan Version 5(Applied Biosystems)는 대립 유전자 크기를 계산하는 데 사용하였다.

그 결과, 표 13에 나타낸 바와 같이 복제된 고양이 KS-M-004와 CH2 게놈 동형접합 편집 고양이 M-008는 서로 동일한 미세부수체(microsatellite)를 가지는 것으로 나타났다.

표 12

Candidates	Primers (5' -> 3')
FCA078	Forward primer; TGAAGTGAAGTCAGATGCTTAACC
	Reverse primer; CGGAATCAGCTATTTTACGG
FCA170	Forward primer; CAAGGCGTTTGGTATTTTGG
	Reverse primer; TTTACAGTCTCCCTCCTGATGC
FCA201	Forward primer; TCTGCAGGACCAGTCAGATG
	Reverse primer; AGCATACACAAATTGATGCTGG
FCA224	Forward primer; CTGGGTGCTGACAGCATAGA
	Reverse primer; TGCCAGAGTTGTATGAAAGGG
FCA229	Forward primer; CAAACTGACAAGCTTAGAGGGC
	Reverse primer; GCAGAAGTCCAATCTCAAAGTC
FCA290	Forward primer; GTAAGGTCCCTGCCACACAT
	Reverse primer; GTATCTGCCCATTTGAGAAAGG
FCA304	Forward primer; TCATTGGCTACCACAAAGTAGG
	Reverse primer; CTGCATGCCATTGGGTAAC
FCA305	Forward primer; GGGTATTTACCCAAGAACATGG
	Reverse primer; TGTTCATACATACCTGCGC
FCA441	Forward primer; ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG
	Reverse primer; GCTTGCTTCAAATTTTCAC

표 13

Microsatellite	PCR product range (bp)	WT (bp)	M-008 (bp)	KS-M-004 (bp)
FCA078	182-205	186/192	187/201	187/201
FCA170	103-117	110/116	110/116	110/116
FCA201	135-158	138/155	138/151	138/151
FCA224	154-175	157/172	159/159	159/159
FCA229	160-172	168/170	166/168	166/168
FCA290	206-220	212/212	216/216	216/216
FCA304	100-115	112/112	108/108	108/108
FCA305	185-201	194/194	197/197	197/197
FCA441	153-162	155/159	155/159	155/159

<실시예 16> CRISPR 비표적 감지

CH2 게놈 호모 접합 편집 고양이(M-008)와 복제 고양이(KS-M-004)에서 표적 외 이벤트가 발생했는지 여부를 확인하기 위해 잠재적인 오프 타겟팅 후보에 대한 PCR 및 sequencing analysis를 수행하였다.

구체적으로, CRISPR design tool(<http://CRISPR.mit.edu/>) 또는 CRISPR RGEN tools(rgenome.net)를 사용하여 고양이 게놈에서 비표적 영역(off-targeting region)의 가능성을 평가하였으며, 4개의 오프타겟팅(off-targeting) 후보를 선정하였다(표 14). 이후, 선정된 4개의 후보에 대한 PCR 및 Sanger sequencing analysis를

수행하여 오프 타겟 이벤트 발생 여부를 평가하였다.

[0171] 그 결과, 도 12, 13에 나타난 바와 같이 sgRNA에 의한 Indel은 발견되지 않았다.

표 14

[0173]

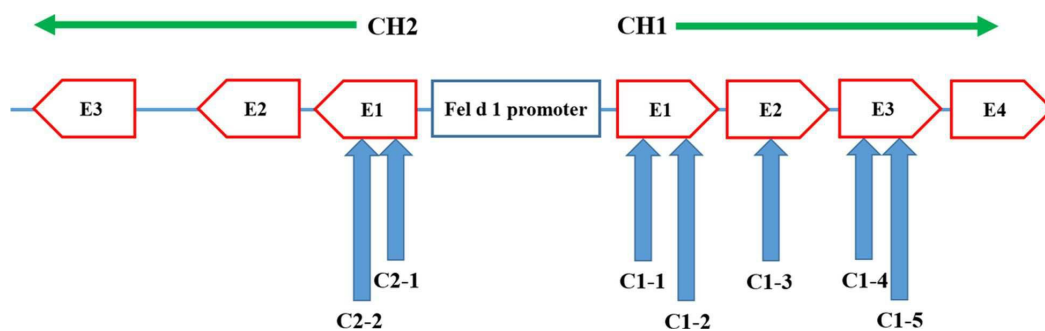
Candidates (PCR product size)	Name	Sequence (5' -> 3')
CH20TC1 (353 bp)	Target sequence	GAGGGaGGCACTGCTatTGCAGG
	Forward primer	CTCAAATGGTGTGGCAAGTTC
	Reverse primer	TGGAGCAGCCTGATACAAAG
CH20TC2 (727 bp)	Target sequence	GAGaGGGtCACTcCTTGTGCAGG
	Forward primer	TCTTCCACGGCACCAATAAA
	Reverse primer	GTTAATGACCCTCCTCGCATAG
CH20TC3 (650 bp)	Target sequence	GaGGGGGCACTGtTTcTGCTGG
	Forward primer	TTTCTGTGGCCTTGGATATAG
	Reverse primer	CATCAACCATTACGCACCATTC
CH20TC5 (283 bp)	Target sequence	GgGGGGGCACTGCcTGTgGGG
	Forward primer	GCGAATTTCTTTGTGTCGGGT
	Reverse primer	GGATACCGAAGGCAAAGGGG

[0175]

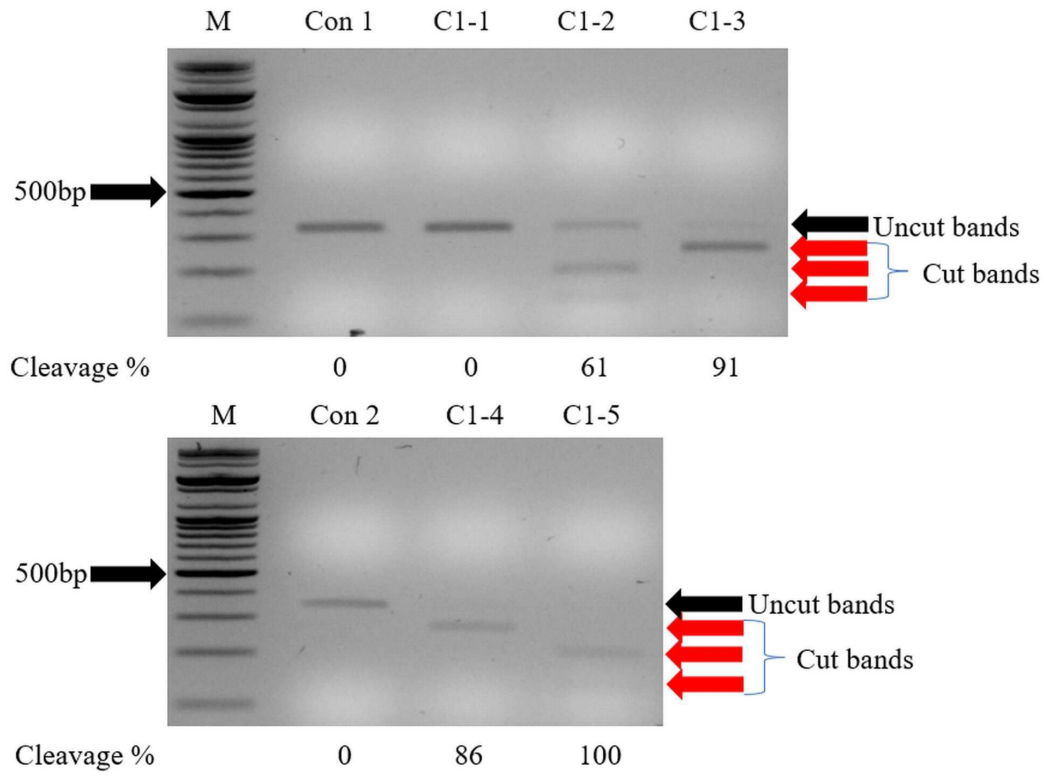
이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

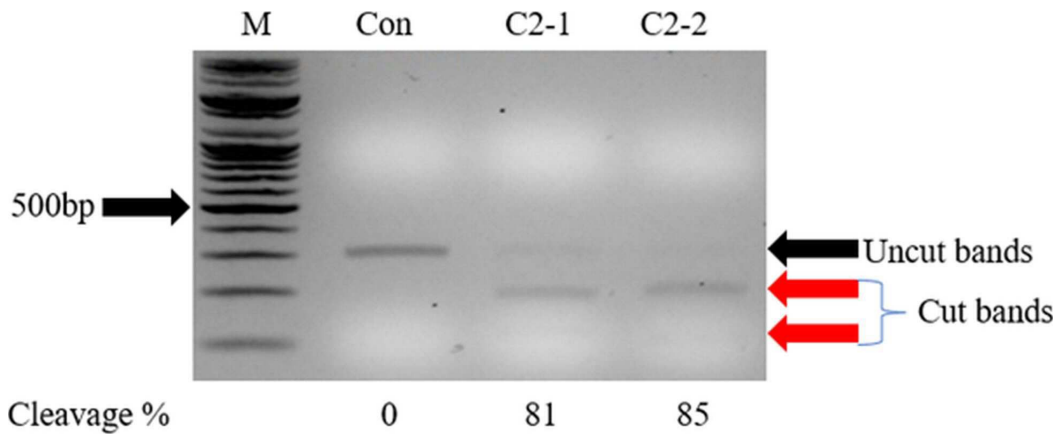
도면1



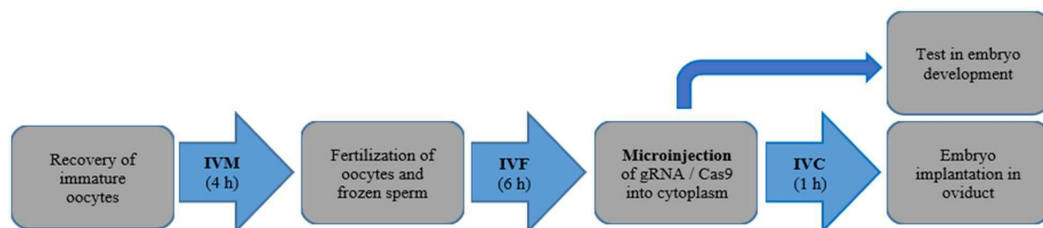
도면2



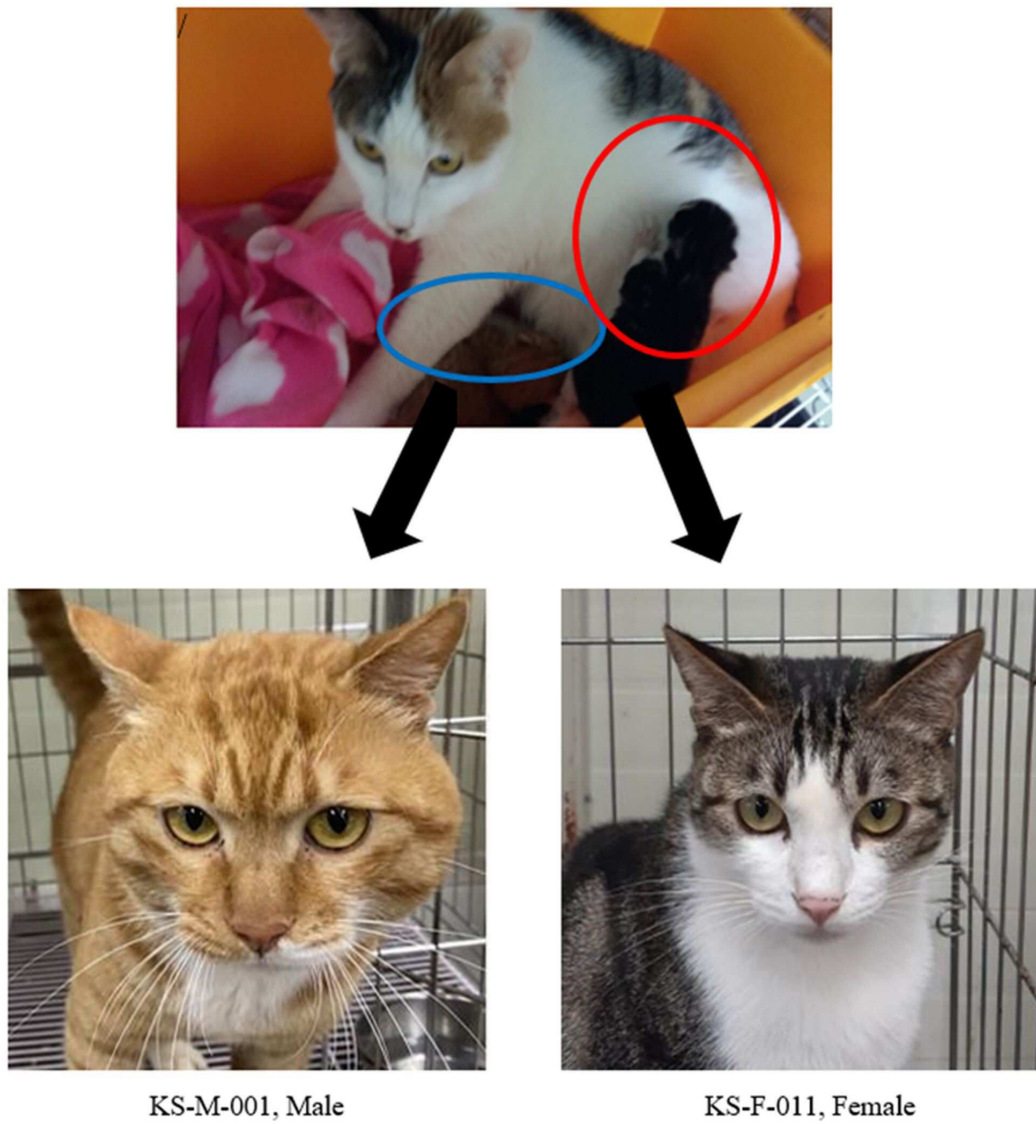
도면3



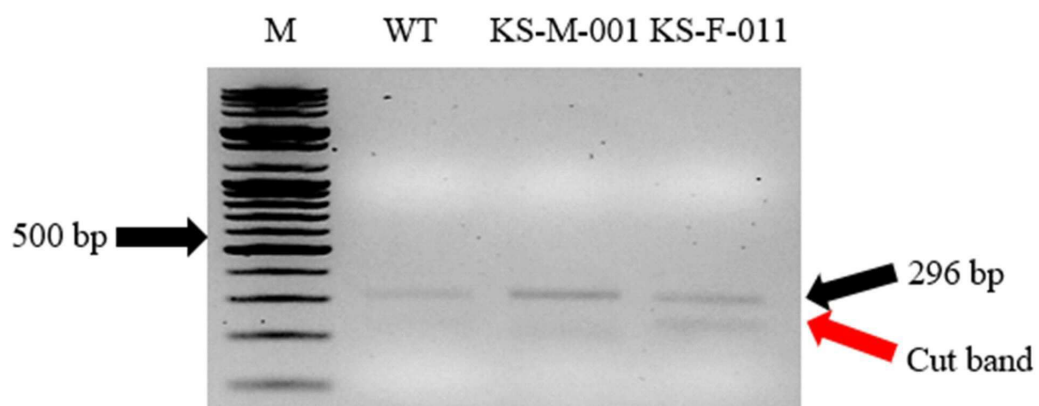
도면4



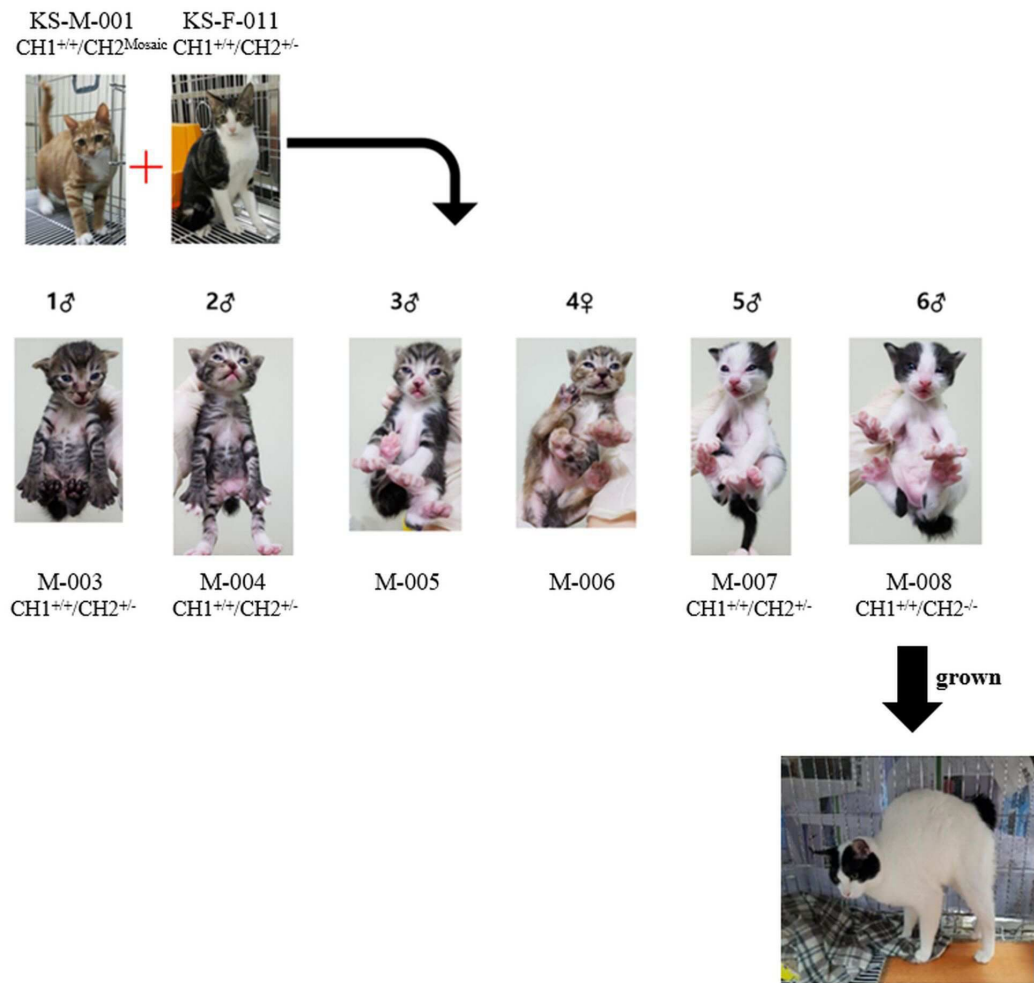
도면5



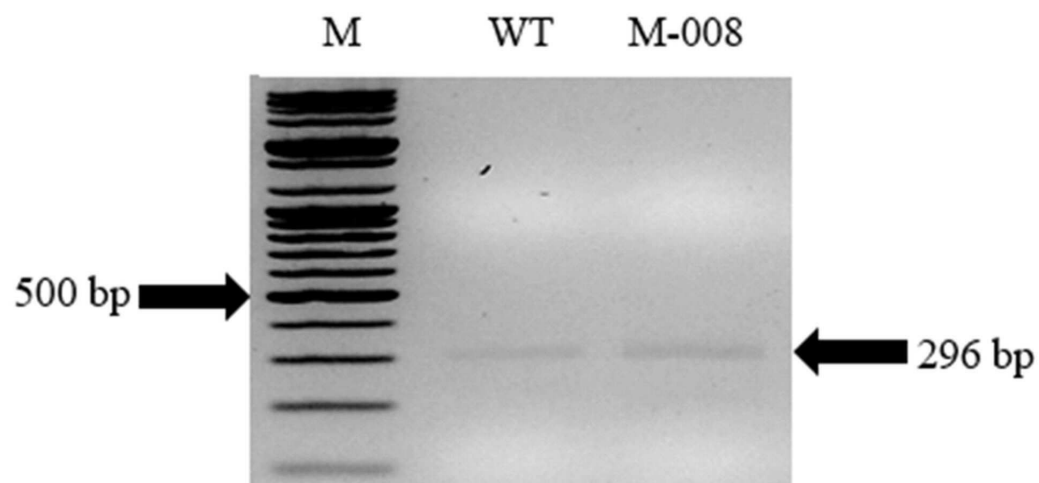
도면6



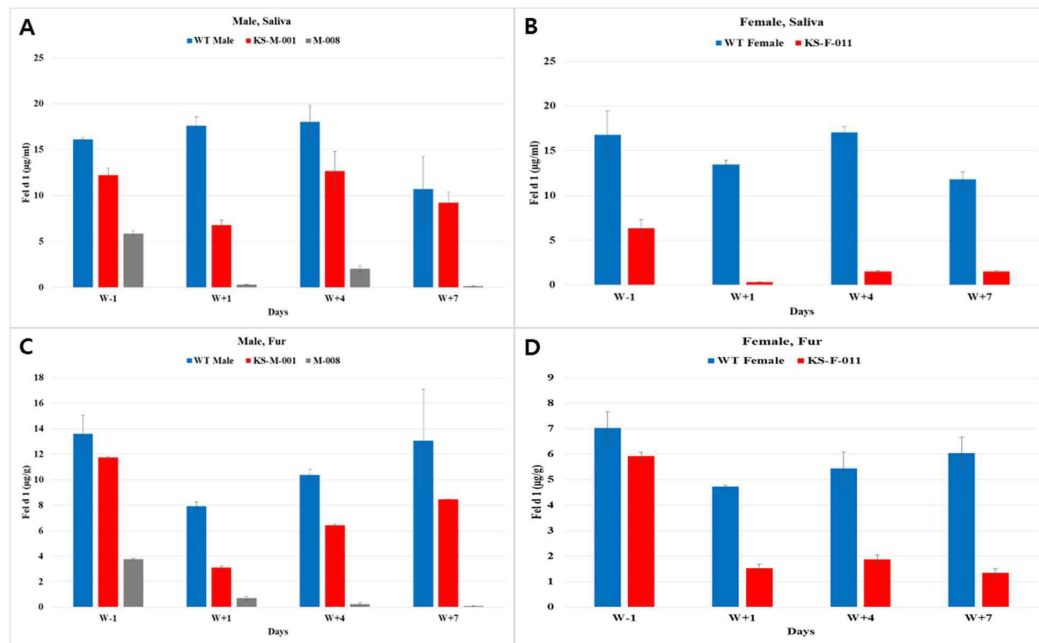
도면7



도면8



도면9



도면10

a KS-M-001



b KS-F-011



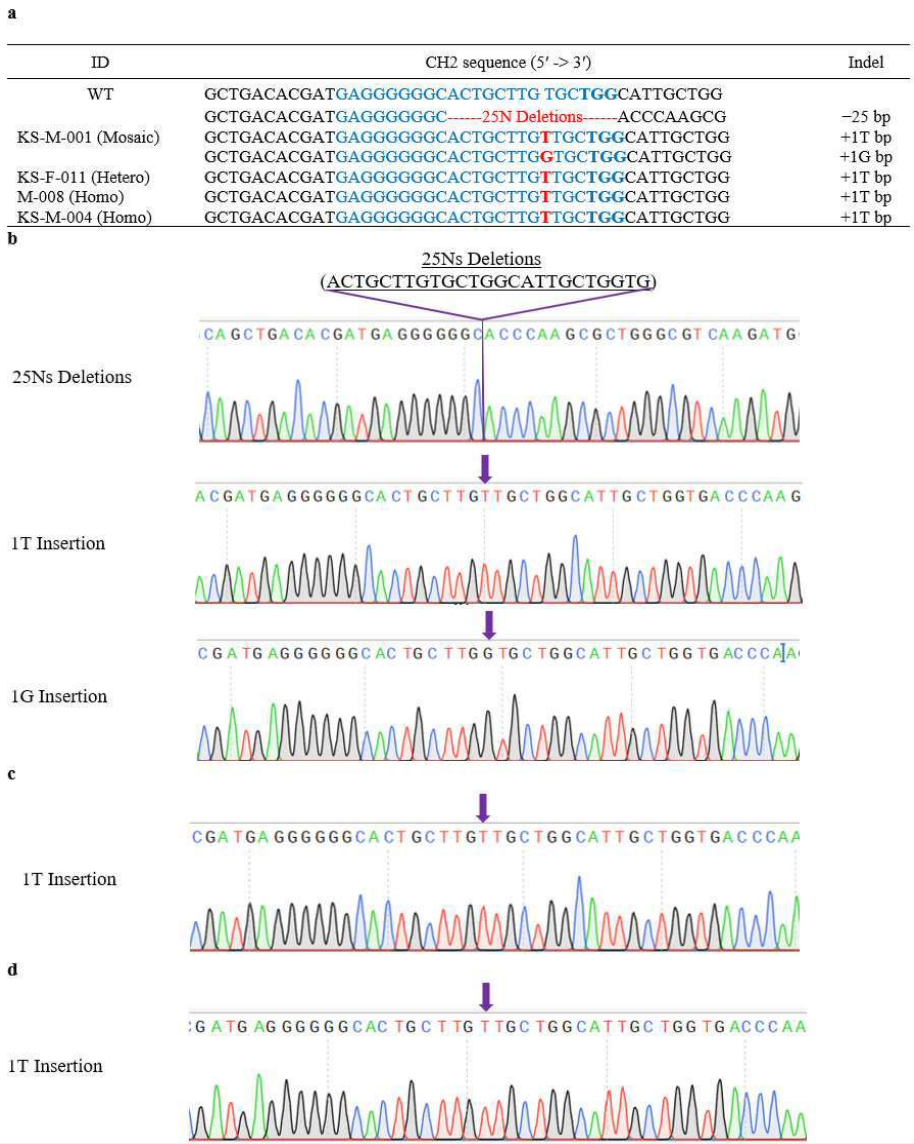
c M-008



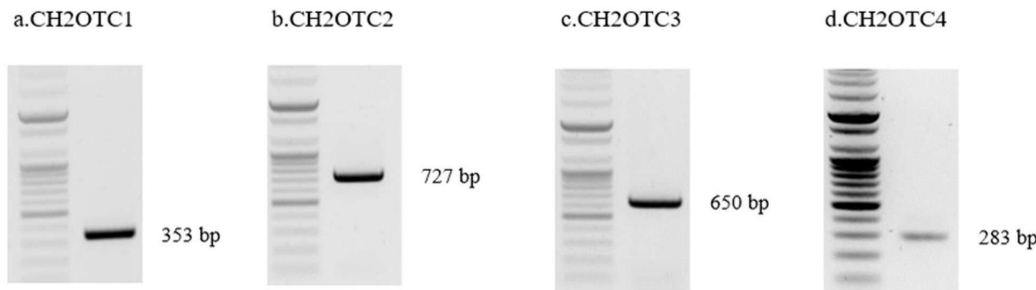
d KS-M-004



도면11

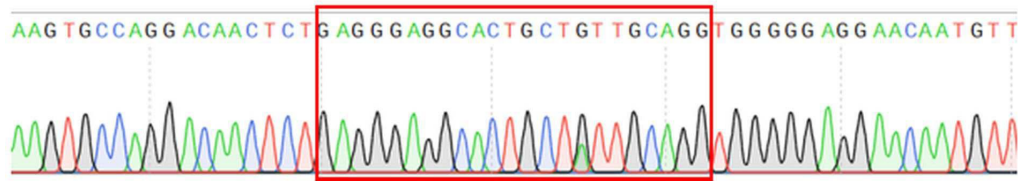


도면12

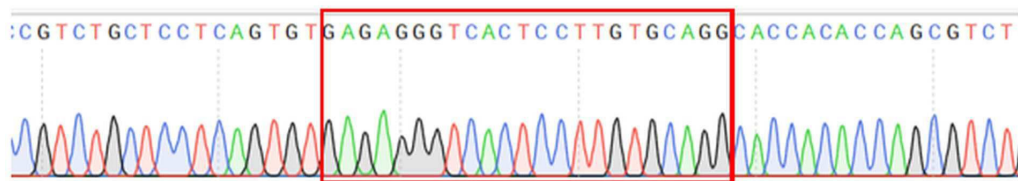


도면13

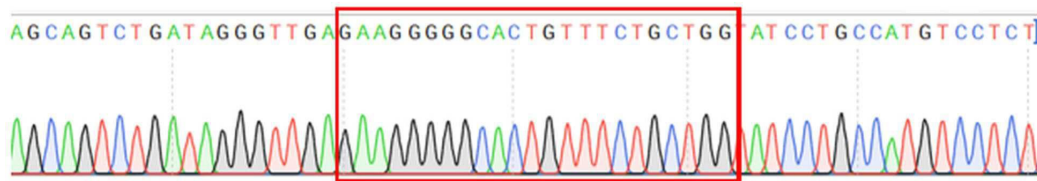
a. CH2OTC1



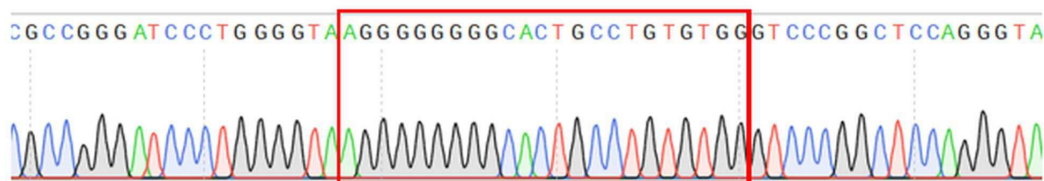
b. CH2OTC2



c. CH2OTC3



d. CH2OTC4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.