



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월14일
(11) 등록번호 10-2276940
(24) 등록일자 2021년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0080310
(22) 출원일자 2019년07월03일
심사청구일자 2019년07월15일
(65) 공개번호 10-2021-0005363
(43) 공개일자 2021년01월14일
(56) 선행기술조사문헌
Nature Reviews Cancer. 2012, 12:51-58.*
Human Gene Therapy, 2019 Jul 1,
30(7):814-828.
Frontiers in Plant Science. 26 Jun 2014,
5:302.
Stem Cells Translational Medicine. 2019 March
19, 8:627-638.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국(질병관리청장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(오송생명과학단지 보건의료행정타운)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대
학교)
주식회사 틀젠
서울특별시 금천구 가산디지털1로 219, 제1204호,
제1205호, 제1206호 (가산동, 벽산디지털밸리6차)
(72) 발명자
김봉조
세종특별자치시 조치원읍 섬골길 59, 107동 180
6호(e-편한세상 세종)
문상훈
충청남도 천안시 동남구 청수로 136-8, 101동 90
1호(구성동, 구성아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

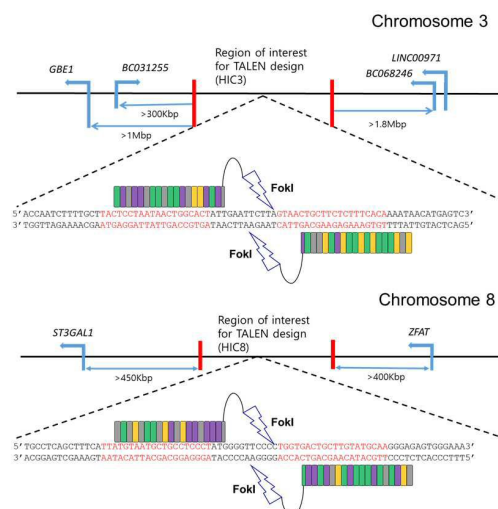
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 신규한 유전체 세이프 하버 및 이의 용도

(57) 요약

신규한 유전체 세이프 하버를 이용하여 세포에서 외래 폴리뉴클레오티드를 발현하는 방법, 이를 이용한 세포의 유전체에 외래 폴리뉴클레오티드가 삽입된 유전적으로 변형된 세포, 및 세포의 유전적 변형을 위한 조성물을 제공한다. 이에 따르면, 외래 유전자를 세포 내 유전체에 안전하게 도입하면서 인접 유전자 교란을 최소화시킬 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

김형범

서울특별시 마포구 토정로18길 11, 107동 1702호(
현석동, 래미안웰스트림)

이은서

서울특별시 마포구 양화로 56, 919호(서교동)

과쿠다드 아부 본스라

파크빌 3052 비크 로얄 칠드런스 হাসপিটال ফ্লেমিং
টর্ন রোড মেরুদেও চিলড্রেন্স রিসার্চ ইনস্টিটিউট

김석중

서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 501동 1812
호(서초동, 우성아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 외래 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 방법으로서,

세포에 하나 이상의 핵산분해효소(nuclease)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 상기 세포에서 핵산분해효소를 발현시키는 단계로서,

상기 핵산분해효소는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 특이적으로 결합하는 것인 단계; 및

상기 세포에 외래 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하고,

상기 핵산분해효소가 상기 세포의 유전체 내의 상기 제1 핵산 영역, 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합을 절단하고, 상기 외래 폴리뉴클레오티드를 유전체의 절단 부위에 삽입하며,

상기 방법은 in vitro 또는 ex vivo에서 수행되는 것인 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에서, 상기 세포는 체세포, 생식세포, 줄기세포, 암세포, 또는 세포주인 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에서, 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기능적 폴리리보뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 폴리펩티드는 항체, 항원, 효소, 성장인자, 세포 표면 수용체, 핵 수용체, 호르몬, 림포카인(lymphokine), 사이토카인(cytokine), 리포터(reporter), 이의 단편, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 기능적 폴리리보뉴클레오티드는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpon ribonucleic acid: shRNA), 마이크로 RNA(micro ribonucleic acid: miRNA), 작은 핵 RNA(small nuclear ribonucleic acid: snRNA), 작은 인 RNA(small nucleolar ribonucleic acid: snoRNA), 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 열린 해독틀(open reading frame: ORF), 프로모터, 폴리(A) 꼬리, 하나 이상의 상동성 영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 핵산분해효소는 아연 핑거 핵산분해효소(zinc finger nuclease: ZFN), TALEN(Transcription activator-like effector nuclease), 및 RGEN(RNA-guided endonuclease)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 핵산분해효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 DNA-결합 도메인, 절단 도메인, 가이드 RNA(guide RNA), 또는 이들의 조합을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 상기 세포에 가이드 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 핵산분해효소는 Fok I 엔도뉴클레아제(endonuclease), Cas 엔도뉴클레아제, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 인간 유전체는 인간 Hg18 또는 Hg19 유전체인 것인 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 외래 폴리뉴클레오티드를 유전체의 절단 부위에 삽입하는 것은 상동성 의존적 방법에 의한 것인 방법.

청구항 14

하나 이상의 핵산분해효소에 의해 세포의 유전체에 외래 폴리뉴클레오티드가 삽입된 세포로서,

상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 삽입된 것인 세포.

청구항 15

하나 이상의 핵산분해효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포의 유전적 변형을 위한 조성물로서,

상기 폴리뉴클레오티드는 DNA-결합 도메인 또는 가이드 RNA; 및 절단 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 DNA-결합 도메인 또는 가이드 RNA는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 특이적으로 결합하는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 카피수 변이 분석에 기반하여 동정된 신규한 유전체 세이프 하버(genomic safe harbor: GSH) 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명공학 분야에서 중요한 요구 사항 중 하나는 유전자를 파괴하지 않고, 전사를 교란(perturb)시키지 않으면서 인간 유전체에 기능적 외래 유전자(transgene)를 삽입하는 것으로, 숙주 세포의 생물학적 특성을 잠재적으로 변화시킬 수 있다. 레버 선천 흑내장(Leber's congenital amaurosis), 부신백질이영양증(adrenoleukodystrophy), 파킨슨 병과 같은 여러 질병이 치료 유전자의 안정적인 도입에 의해 성공적으로 치료되었다.

[0003] 한편, 외래 유전자의 무작위적 통합은 인접 유전자들의 발현 수준을 변화시켜 삽입 돌연변이를 유발시킬 수 있다. 인간 세포에서 외래 유전자를 통합하는 가장 일반적인 방법은 전사적으로 활성인 유전자의 주변에 선호도를 갖는 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것이다. 그러나, 조절되지 않은 삽입 돌연변이의 유발은 암 유전자나 종양 억제자를 교란시켜 백혈병이나 림프종과 같은 암을 야기할 수 있다. 또한, 외래 유전자가 인간 염색체의 무작위적 영역에 통합될 경우, 통합 위치에 따라 이들 외래 유전자의 발현이 침묵되거나 예측불가능하게 될 수 있

다.

[0004] 바이러스 벡터 대신에, 조작된 핵산분해효소(nuclease)인 징크 핑거 핵산분해효소(Zinc Finger Nuclease: ZFN), TALEN(Transcription Activator-Like Effector nuclease) 및 CRISPR-Cas 시스템이 대안적으로 사용되고 있다. 이러한 핵산분해효소는 ssODN 또는 공여자 DNA의 존재시 표적 위치에 위치-특이적 이중가닥 절단을 유도하고, 상동성-직접 수선(homology-directed repair: HDR) 메카니즘에 의해 고도로 정밀한 유전체 표적 위치 편집을 유도할 수 있다.

[0005] 이러한 핵산분해효소의 개발에도 불구하고, 동정되고 검증된 유전체 세이프 하버(genomic safe harbor: GSH)는 거의 알려진 것이 없다. GSH는 인접 유전자 교란을 최소화시키면서 예측가능한 외래 유전자의 발현을 뒷받침할 수 있는 유전자 내/외의 영역을 말한다. 인간의 경우, 19번 염색체의 AAVS1 위치는 여러 세포 유형에서 외래 유전자 발현이 가능한 GSH이지만, AAVS1 유전자자리(locus)가 DNA 메틸화를 포함한 메카니즘에 의해 침묵될 수 있다는 것이 알려져 있다(Smith et al., Stem Cells, 2008. 26(2): p.496-504).

[0006] 따라서, 외래 유전자의 안전한 도입을 위해, AAVS1 위치 외에 신규한 GSH 후보를 발굴할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 신규한 유전체 세이프 하버를 이용하여 세포에서 외래 폴리뉴클레오티드를 발현하는 방법을 제공한다.

[0008] 신규한 유전체 세이프 하버를 이용하여 세포의 유전체에 외래 폴리뉴클레오티드가 삽입된 유전적으로 변형된 세포를 제공한다.

[0009] 신규한 유전체 세이프 하버를 이용하는 세포의 유전적 변형을 위한 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 세포에서 외래 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 방법으로서,

[0011] 세포에 하나 이상의 핵산분해효소(nuclease)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 상기 세포에서 핵산분해효소를 발현시키는 단계로서,

[0012] 상기 핵산분해효소는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 특이적으로 결합하는 것인 단계; 및

[0013] 상기 세포에 외래 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하고,

[0014] 상기 핵산분해효소가 상기 세포의 유전체 내의 상기 제1 핵산 영역, 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합을 절단하고, 상기 외래 폴리뉴클레오티드를 유전체의 절단 부위에 삽입하는 것인 방법을 제공한다.

[0015] 상기 세포는 생체 내 세포 또는 분리된 세포일 수 있다. 상기 세포가 생체 내 세포인 경우, 상기 방법은 생체 내(in vivo)에서 수행될 수 있다. 상기 세포가 분리된 세포인 경우, 상기 방법은 생체 외(ex vivo) 또는 시험관 내(in vitro)에서 수행될 수 있다.

[0016] 상기 세포는 체세포, 생식세포, 줄기세포, 암세포, 또는 세포주일 수 있다. 상기 세포는 암세포, 줄기세포, 혈관내피 세포, 백혈구, 면역 세포, 상피 세포, 생식 세포, 섬유아세포, 근육 세포, 골수 세포, 표피 세포, 골아 세포, 및 신경세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 세포는 인간 세포일 수 있다.

[0017] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 통상은 세포에 존재하지 않지만 하나 이상의 유전공학적 방법, 생화학적 방법, 또는 기타 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 유전체 편집을 위한 표적 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 단편 또는 표적 핵산일 수 있다.

[0018] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드 또는 기능적 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 항체, 항원, 효소, 성장인자, 세포 표면 수용체, 핵 수용체, 호르몬, 림포카인(lymphokine), 사이토카인(cytokine), 리포터(reporter), 이의 단편, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 기능적 폴리뉴클레오티드는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin ribonucleic acid: shRNA), 마이크로 RNA(micro ribonucleic acid: miRNA), 작은 핵 RNA(small nuclear ribonucleic acid: snRNA), 작은 인

RNA(small nucleolar ribonucleic acid: snoRNA), 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [0019] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 열린 해독틀(open reading frame: ORF), 프로모터, 폴리(A) 꼬리, 하나 이상의 상동성 영역, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트(expression cassette)일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 5' 말단으로부터 상동성 영역, 프로모터, ORF, 폴리(A) 꼬리, 및 상동성 영역의 순서로 배열된 것일 수 있다. 상기 프로모터는 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(chicken beta actin: CAG), 바이러스 기원 SFFV(spleen focus forming virus) 프로모터, U6 폴리머라제 III 프로모터, 신장 인자 1 α 프로모터, H1 프로모터, 사이토메갈로바이러스의 프로모터, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 상동성 영역은 상기 제1 핵산 영역 또는 제2 핵산 서열의 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 용어 "발현(expression)"은 유전자에 포함된 정보를 유전자 산물로 변환하는 것을 말한다. 유전자 산물은 유전자의 전사 산물(예, mRNA, tRNA, 안티센스 RNA) 또는 mRNA의 번역에 의해 생산되는 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다.
- [0021] 상기 핵산분해효소는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역("CNVR7 위치"로 명명함), 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역("CNVR22 위치"로 명명함), 또는 이들의 조합에 특이적으로 결합하는 것이다. 상기 제1 핵산 영역 또는 제2 핵산 서열은 유전체 세이프 하버(genomic safe harbor: GSH)로서 불릴 수 있다. 상기 제1 핵산 영역 또는 제2 핵산 서열은 복제수 변이(copy number variation: CNV) 부위일 수 있다. 상기 복제수 변이는 약 50bp 내지 수십 Mb까지 범위의 DNA 단편이 증폭되거나 결실되는 물리적인 변화가 있는 부위일 수 있다. 상기 인간 유전체는 인간 Hg18 또는 Hg19 유전체일 수 있다.
- [0022] 상기 핵산분해효소는 유전체 편집 또는 유전자 편집에 이용되는 단백질일 수 있다. 상기 핵산 분해효소는 아연 핑거 핵산분해효소(zinc finger nuclease: ZFN), TALEN(Transcription activator-like effector nuclease), 및 RGEN(RNA-guided endonuclease)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. RGEN은 CRISPR-Cas(clustered regularly interspaced repeat-CRISPR-associated) 시스템으로도 불릴 수 있다.
- [0023] 상기 핵산분해효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 DNA-결합 도메인, 절단 도메인, 가이드 RNA(guide RNA), 또는 이들의 조합을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 용어 "가이드(guide) RNA"는 RNA 편집(editing)을 통해 세포내에서 표적 DNA를 절단, 삽입, 또는 연결시키는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 가이드 RNAsms 단일-사슬 가이드 RNA(single-chain guide RNA: sgRNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 표적 핵산 서열에 특이적인 crRNA(CRISPR RNA)일 수 있다.
- [0024] 상기 방법은 상기 세포에 가이드 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 도입은 통합(integration), 형질전환(transformation), 형질도입(transduction), 형질감염(transfection), 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기 도입은 일시적(transient) 또는 안정한(stable) 도입일 수 있다.
- [0026] 상기 핵산분해효소는 Fok I 엔도뉴클레아제(endonuclease), Cas 엔도뉴클레아제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 Cas 엔도뉴클레아제는 예를 들어 스트렙토코커스 속(예, *Streptococcus pyogens*), 네이세리아 속(예, *Neisseria meningitidis*), 파스테우렐라 속(예, *Pasteurella multocida*), 프란시셀라 속(예, *Francisella novicida*), 또는 캄필로박터 속(예, *Campylobacter jejuni*)의 세균으로부터 유래된 엔도뉴클레아제일 수 있다. 상기 Cas 엔도뉴클레아제는 야생형 Cas 폴리펩티드, 또는 돌연변이 Cas 폴리펩티드일 수 있다. 상기 Cas 엔도뉴클레아제는 Cas9 폴리펩티드 또는 Cpf1 폴리펩티드일 수 있다.
- [0027] 상기 핵산분해효소는 제1 핵산 영역, 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합을 절단시킬 수 있다. 상기 핵산분해효소는 CNVR7 위치에서 82951465 내지 82955620 번째 핵산 또는 CNVR22 위치에서 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째 핵산 중 어느 위치든지 절단할 수 있다. 상기 절단은 유전체 DNA의 이중가닥의 절단일 수 있다. 상기 절단은 평활 말단(blunt end) 또는 접착 말단(sticky end)일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산분해효소는 CNVR7 위치의 82951500번째 핵산과 82951501번째 핵산 사이를 평활 말단으로 이중가닥 DNA를 절단할 수 있다.
- [0028] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 핵산분해효소에 의해 절단된 제1 핵산 영역, 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합의 영역에 삽입될 수 있다.
- [0029] 상기 외래 폴리뉴클레오티드를 유전체의 절단 부위에 삽입하는 것은 상동성 의존적 방법에 의한 것일 수 있다.

상기 상동성 의존적 방법은 상동 재조합(homologous recombination) 또는 상동성-직접 수선(homology-directed repair: HDR)일 수 있다.

- [0030] 다른 양상은 하나 이상의 핵산분해효소에 의해 세포의 유전체에 외래 폴리뉴클레오티드가 삽입된 유전적으로 변형된 세포로서,
- [0031] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 삽입된 것인 세포를 제공한다.
- [0032] 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 외래(exogenous) 프로모터 또는 내재적(endogenous) 프로모터에 의해 발현이 유도될 수 있다.
- [0033] 다른 양상은 하나 이상의 핵산분해효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포의 유전적 변형을 위한 조성물로서,
- [0034] 상기 핵산분해효소는 상기 세포의 유전체에서 인간 유전체의 염색체 3에서 82951465 내지 82955620 번째의 제1 핵산 영역, 인간 유전체의 염색체 8에서 135127147 내지 135140206 번째의 제2 핵산 영역, 또는 이들의 조합에 특이적으로 결합하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 조성물은 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo), 또는 생체 내(in vivo) 투여용일 수 있다.
- [0036] 상기 조성물은 암과 같은 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0037] 상기 암은 원발성 종양 또는 전이성 종양일 수 있다. 상기 암은 예를 들어 췌장암, 대장암, 폐암, 유방암, 피부암, 두경부암, 결장직장암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병 (Hodgkin's Disease), 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0038] 상기 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0039] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 풍미제, 유효제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들면, 경구 투여 제형(예, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 알약, 또는 과립), 또는 비경구 제형(예, 주사제)으로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전신 제형 또는 국부 제형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 피하, 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다.
- [0041] 상기 약학적 조성물은 일 양상에 따른 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 이들의 조합을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 유효한 양은 당업자가 선택되는 세포 또는 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 사용된 조성물과 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 0.1 μ g 내지 약 2 g, 약 0.5 μ g 내지 약 1 g, 약 1 μ g 내지 약 500 mg, 약 10 μ g 내지 약 100 mg, 또는 약 100 μ g 내지 약 50 mg일 수 있다.

[0042] 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

[0043] 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 암을 앓거나 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.

발명의 효과

[0044] 신규한 유전체 세이프 하버를 이용하여 세포에서 외래 폴리뉴클레오티드를 발현하는 방법, 이를 이용한 세포의 유전체에 외래 폴리뉴클레오티드가 삽입된 유전적으로 변형된 세포, 및 세포의 유전적 변형을 위한 조성물에 의하면, 외래 유전자를 세포 내 유전체에 안전하게 도입하면서 인접 유전자 교란을 최소화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1a는 GSH 위치를 선별하기 위해 시료를 선별하는 과정을 나타낸 흐름도이고, 도 1b는 사용된 연관 연구 및 어세이의 흐름도를 나타내고, 도 1c는 다양한 CNV를 스크리닝한 방법을 나타낸 흐름도이고, 도 1d는 선별된 CNV 영역의 유전자형을 도시한 그래프이고, 도 1e는 CNV tools에 의해 생성된 2개의 후보 CNV 영역의 히스토그램 및 클러스터 플롯을 나타낸 그래프이다.

도 2a는 유전체 상에서 GSH 후보 위치를 나타낸 개략도이고, 도 2b는 발현 카세트(녹색 상자), 그 양옆으로 상동성 서열(검정색 상자)을 포함한 표적 컨스트럭트(공여자 EGFP)의 구조를 나타낸 모식도이다(CAGp: CAG 프로모터, BGHpA: 소 성장호르몬 유전자 유래 폴리(A) 위치).

도 3a는 K562 세포에서 각 표적 유전자자리에서 eGFP+ 분류된 클론 중 표적 통합 퍼센트를 나타내고, 도 3b는 K562 세포에서 eGFP+ 공여자 카세트와 TALEN 컨스트럭트의 형질감염 3주 후 위치-특이적 통합 PCR로 확인된 단일 클론의 MFI(세포 당 평균 발현의 값)를 나타내는 산점도(Scattered dot plot)이고($P = 0.0256$, Bonferroni 다중 비교 사후-검정으로 일원 분산분석(one-way Anova), 평균±표준 오차), 도 3c는 Huh 7.5 세포에 대해 eGFP+ 공여자 카세트와 TALEN 컨스트럭트의 형질감염 3주 후 위치-특이적 통합 PCR로 확인된 단일 클론의 MFI를 나타내는 산점도이다($P = 0.0032$, $*P = 0.0092$, Bonferroni 다중 비교 사후-검정으로 일원 분산분석(one-way Anova), 평균±표준 오차).

도 4a 내지 도 4c는 유전체 영역에서 각각 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치와 인접 유전자들의 위치를 나타낸 모식도(위), 및 K562 세포에서 각각 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치에 외래 유전자(transgene)의 도입에 의한 인접 유전자들의 발현 변화를 상대적 발현 배수(\log_{10})로 나타낸 그래프이고, 도 4d는 Huh 7.5 세포에서 각각 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치에 외래 유전자의 도입에 의한 인접 유전자들의 발현 변화를 상대적 발현 배수(\log_{10})로 나타낸 그래프이다(점선: mock-처리된 세포에서의 참조값 표시, 평균±표준 오차).

도 5a 및 도 5b는 각각 K562 세포 및 Huh 7.5 세포에서 각 표적 유전자자리에서 eGFP+ 분류된 클론 중 표적 통합 퍼센트 및 SFFV 프로모터를 이용한 경우 위치-특이적 통합 PCR로 확인된 단일 클론의 MFI를 나타내는 산점도($P = 0.0079$, $*P = 0.0464$, Bonferroni 다중 비교 사후-검정으로 일원 분산분석, 평균±표준 오차)이고, 도 5c는 K562 세포에서 각각 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치에 외래 유전자의 도입에 의한 인접 유전자들의 발현 변화를 상대적 발현 배수(\log_{10})로 나타낸 그래프이다(점선: mock-처리된 세포에서의 참조값 표시, 평균±표준 오차).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1. 유전체 세이프 하버(genomic safe harbor)의 선별 및 검증

[0048] (1) 대규모 유전체 서열분석 및 역학 데이터를 이용한 GSH 후보 영역의 선별

[0049] 유전체의 특정 영역의 결실로 인해 신생물(neoplasm)을 포함한 비정상적인 건강 이상이 발생하지 않은 경우, 세이프 하버의 후보가 될 수 있다고 가정하였다. 환자가 노화할 때 유전적 차이의 표현형이 관찰될 수 있으므로,

암 병력이 없는 4,964 명의 남성 및 여성에게서 수집한 유전체 서열을 분석하였다. 안전성 문제를 고려하여, 세이프 하버 후보를 동정하기 위해 하기와 같은 기준을 설정하였다:

(i) 단백질-암호화 유전자, 마이크로RNA, 또는 기능이 보고된 비암호화 요소의 5' 말단에서 300kb 이상 떨어져 있을 것

(ii) 암-관련 유전자 또는 마이크로 RNA에서 500kb 이상 떨어져 있을 것

(iii) 유전자 전사 단위의 밖

(vi) 초(ultra)-보존된 영역의 밖

(2) GSH 후보 영역 선별을 위한 시료의 선별

적당한 GSH 위치를 찾기 위해, 10,004 명의 대상자를 선별하였다. 선별된 대상자 중 낮은 유전자형 콜 비율(call rate)(n = 401), 시료 오염(n = 11), 성 불일치(n = 41), 난해한(cryptic) 관련성(n = 608) 및 임의의 종류의 암(n = 101)을 갖는 대상자를 제외한 후, 연관 연구를 위해 Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 5.0을 사용하여 8,842 명의 대상자의 시료에서 얻은 유전체의 유전자형을 인실리코(in silico) 방법으로 분석하였다. 8842 개의 시료 중, 4,694개의 시료(2210 명 남성 및 2484 명 여성)에서 복제수변이(copy number variation: CNV) 유전자형을 분석하였다(도 1a).

분석에 사용된 4,694개의 시료의 임상적 특징은 표 1에 나타내었다.

표 1

특징		총 수 (N=4,694)
연령(연)		54.0 ± 9.04
성별	남성	2210 (47.08%)
	여성	2484 (52.92%)
키 (cm)		159.5 ± 8.92
BMI (kg/m ²)		24.7 ± 3.20
SBP (mmHg)		121.3 ± 19.31
DBP (mmHg)		77.2 ± 11.91
심박수 (BPM)		64.2 ± 7.98
WHR		0.89 ± 0.07
ALT (IU/L)		28.9 ± 32.94
AST (IU/L)		30.2 ± 20.09
GGT (IU/L)		37.0 ± 63.69
FPG (mg/dl)		82.6 ± 8.34
ALB (g/dl)		4.26 ± 0.33
BUN (mg/dl)		14.5 ± 3.86
HDL-C (mg/dl)		44.7 ± 10.09
LDL-C (mg/dl)		116.5 ± 33.03
TG (mg/dl)		165.9 ± 106.01

[정규 분포가 아닌 경우, 연속 변수는 분석 전 로그로 변환하였음. 평균±SD, 체질량지수(Body mass index: BMI), 수축기 혈압(Systolic blood pressure: SBP), 이완기 혈압(Diastolic blood pressure: DBP), 허리둘레 비율(Waist-hip ratio: WHR), 알라닌 아미노전이효소(Alanine aminotransferase: ALT), 아스파르테이트 아미노전이효소(Aspartate aminotransferase: AST), 감마 글루타밀 전이효소(Gamma glutamyl transferase: GGT), 공복 혈당(Fasting plasma glucose: FPG), 알부민(Albumin: ALB), 혈액 요소 질소(Blood urea nitrogen: BUN), 고농도 지질단백질 콜레스테롤(High density lipoprotein cholesterol: HDL-C), 저농도 지질단백질 콜레스테롤(Low protein lipoprotein cholesterol: LDL-C), 트리글리세리드(Triglyceride: TG)].

4,694개의 시료에 대해 CNV 검출 및 연관 분석을 위해 NimbleGen HD2 3x720K 어레이 비교 유전체 혼성화(CNV 검출 및 연관 연구(array comparative genomic hybridization: aCGH)를 도 1b에 나타난 흐름도와 같이 수행하였다(Moon, S. et al., KGVDDB: a population-based genomic map of CNVs tagged by SNPs in Koreans. Bioinformatics, 29 (2013) 1481-1483). CNV tools를 이용하여 CNV 유전형을 클러스터링하여, 3,601개의 다제

층(multi-class) CNV를 선별하였다. 정확한 유전형 분류를 위해 다계층 CNV를 선별하였고, 이를 이용하여 연관성 분석을 수행하면 질환과의 연관성을 보다 더 정확히 파악할 수 있다.

[0060] 3,601개의 다계층(multi-class) CNV에 대해 빈도 분석을 수행하여 5% 내지 25%의 빈도율을 갖는 290개의 CNV를 선별하고, 유전자 사막 영역(gene desert region) 상의 CNV를 선별하여 54개의 CNV(30개의 CNV 영역)을 선별하였다. 그 후, 연관 결과가 없고 GSH 선별 기준을 만족하는 CNV 영역을 선별하여, 최종 2개의 CNV 영역을 선별하였다(도 1c). 유전자 사막 영역에 있는 30개의 CNV 영역의 목록을 표 2에 나타내었다. 하기 표 2에서 염색체 및 핵산 번호는 인간 Hg18 유전체를 기준으로 한다.

표 2

CNVRID	염색체	시작	끝	빈도		
				클러스터 1	클러스터 2	클러스터 3
CNVR1	2	41091503	41105475	92.35	7.52	0.13
	2	41091926	41095029			
	2	41091926	41110876			
CNVR2	2	107383090	107385789	83.66	15.76	0.58
CNVR3	2	107633827	107644568	80.17	18.79	1.04
	2	107640592	107644729			
	2	107641774	107644004			
CNVR4	2	130094781	130097703	95.01	4.88	0.11
CNVR5	2	194397392	194400503	80.14	19.86	-
	2	194397392	194403581			
	2	194399479	194403581			
	2	194401599	194403581			
CNVR6	2	195688911	195690761	84.17	15.02	0.81
CNVR7	3	82951465	82955620	90.82	8.95	0.23
CNVR8	3	112723878	112730315	85.28	14.23	0.49
CNVR9	4	25899244	25903905	81.85	17.53	0.62
	4	25900330	25903009			
CNVR10	4	52355328	52358561	86.39	13.61	-
	4	52355328	52360772			
	4	52355328	52378210			
	4	52356185	52360772			
CNVR11	4	61182975	61184206	90.84	8.97	0.19
CNVR12	4	61668290	61696232	88.13	11.53	0.34
CNVR13	4	64376477	64399338	75.48	23.11	1.41
	4	64376893	64389954			
	4	64376893	64402277			
	4	64381512	64384210			
	4	64386390	64392883			
CNVR14	4	138310481	138323629	76.01	22.09	1.90
	4	138311724	138316056			
	4	138315738	138319841			
CNVR15	5	57361273	57365938	75.16	24.84	-
CNVR16	5	97961273	97963268	93.52	6.35	0.13
CNVR17	6	14853578	14855073	93.69	6.31	-
CNVR18	6	95345973	95348593	92.99	6.84	0.17
CNVR19	7	86077403	86080393	86.13	13.23	0.64
CNVR20	7	144547892	144552203	93.95	5.99	0.06
	7	144549963	144552203			
CNVR21	8	2626786	2640303	89.84	9.91	0.26
CNVR22	8	135127147	135140206	83.85	15.53	0.62
CNVR23	8	138195052	138196533	89.18	10.57	0.26
CNVR24	8	142926455	142932099	94.91	5.0	0.04

CNVR25	9	81218373	81223517	86.39	12.95	0.66
	9	81219657	81222228			
	9	81220275	81223087			
	9	81221187	81222270			
CNVR26	10	58571948	58610908	91.63	8.24	0.13
CNVR27	10	91988373	91992382	92.91	6.99	0.11
CNVR28	13	49967437	49970106	76.48	23.52	-
	13	49967836	49969229			
CNVR29	13	103074226	103077048	92.16	7.71	0.13
	13	103074677	103076638			
CNVR30	18	62928265	62929768	94.95	4.92	0.13

[0062] 표 2에서, 최종 선별된 2개의 CNV 영역인 CNVR7 및 CNVR22은 굵은 글자로 나타내었다. 각 클러스터의 빈도는 가장 가까운 백분율로 반올림하였다.

[0063] CNV 유전자형은 3개의 카피수 클래스로 이루어져 있고, 이를 도 1d에 나타내었다. 도 1d에서, 회색선은 정상적인 카피 수(2 카피) 클래스를 나타내는 반면에, 파란색 및 빨간색 선은 이형접합 결실(1 카피) 및 동형접합 결실(0 카피) 클래스를 각각 의미한다. 2개의 CNV 영역인 CNVR7(chr3, locus 3p12.2: 82951465-82955620) 및 CNVR22(chr8, locus 8q24.22: 135127147-135140206)이 선별되었고, CNV 영역(chr8: 135127147-135140206)은 CNV 영역(chr8: 135022654-135140206)과 비교하여 카피 수 변화가 없었다.

[0064] CNV tools를 사용하여 생성된 2개의 후보 CNV 영역의 히스토그램 및 클러스터 플롯을 도 1e에 나타내었다. log2 비율 플롯과 마찬가지로, 히스토그램 및 클러스터 플롯은 2개의 후보 CNV 영역의 유전형 클래스가 3임을 나타내었다(PCA: Principal Components Analysis).

[0065] (3) AAVS1, CNVR7 및 CNVR22 위치로 eGFP 카세트의 도입 및 발현

[0066] 인간 체세포 세포주에서 AAVS1, CNVR7 및 CNVR22를 표적으로 하는 TALEN 쌍을 디자인하였다(도 2a). 표적 공여자 카세트(targeting donor cassette)로서, eGFP(enhanced GFP) 발현 카세트는 CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(chicken beta actin: CAG) 및 바이러스 기원 SFFV(spleen focus forming virus) 프로모터와 5' 말단의 소 성장호르몬(bovine growth hormone gene: BGH) 유전자 유래 폴리(A) 위치의 사이에 위치하였다(도 2b).

[0067] AAVS1, CNVR7 및 CNVR22의 필요한 유전자자리(locus)에서 효율적인 상동 재조합을 촉진시키기 위해, 각각의 표적 공여자 카세트는 ≥ 0.8 킬로베이스(kb)의 상 동성 서열로 구성되었다.

[0068] 사람 골수성 백혈병 세포주 K562 세포 및 사람 간암 세포주인 Huh 7.5 세포를 준비하였다. K562 세포는 RPMI(GIBCO) 배지에서 배양하고, Huh 7.5 세포는 DMEM-고농도 포도당(GIBCO) 배지에서 배양하였고, 모든 배지에 10%(v/v) FBS, 페니실린(100 U/ml) 및 스트렙토마이신 (100 μ g/ml)을 보충하였다.

[0069] 1.5×10^6 개의 K562 세포와 4×10^5 개의 Huh 7.5 세포에 TALEN 왼쪽 : TALEN 오른쪽 : eGFP 공여자 DNA를 1 : 1 : 4의 비율로 조합하고, 전기천공법으로 일시적으로 형질감염시켰다(Neon-invitrogen). eGFP+ 소팅된(sorted) 세포들에서 단일 클론을 분리하고, 위치-특이적 도입 PCR 분석을 수행하여 상동성 재조합(homologically directed repair)에 의한 표적 위치에서의 외래 유전자(transgene) 도입을 확인하였다. 형질감염되지 않은 세포는 대조군으로 사용하였다.

[0070] K562 세포로부터 AAVS1, CNVR7 및 CNVR22에 대해 각각 총 252개, 184개 및 223개의 클론을 선별하고, eGFP+ 클론을 소팅하였다. 소팅된 세포는 96웰 플레이트의 웰당 0.25 세포가 되도록 희석하여 단일 세포-유래된 클론을 수득하였다. 2주 동안 배양한 후 단일 클론 유래 세포의 웰을 선별하고, 세포를 증폭시켜 유세포 분석-FACS Cantos (MFI) 및 분자생물학적 분석을 수행하였다. 또한, 단일 세포 및 콜로니의 클론 분석은 세포 소팅 전후 마우스 피펫을 사용하여 현미경 하에서 단일 세포를 분리하였다. 세포의 클론 집단을 수득하기 위해, 소팅하거나 소팅하지 않은 세포를 100 mm 접시 당 1000개의 세포의 밀도로 접종하고, 2주 후 수동으로 콜로니를 선택하였다.

[0071] eGFP+ 클론 중 표적이 통합된 클론은 AAVS1, CNVR7 및 CNVR22에서 각각 78.6%, 73.1% 및 79%로 나타났다(도 3a). 통합 효율(eGFP+ 세포의 비율)은 표적 위치에 영향받지 않았고, eGFP의 평균 형광 강도(MFI, 세포 당 평균 발현의 값)은 프로모터와 표적 유전자자리 모두에 의존하였다. 또한, eGFP의 MFI가 AAVS1과 CNVR22 위치간에 유

의성이 없었지만, $P = 0.0256$ 으로 CNVR7보다 우수한 점에서 유사한 결과(각 컨스트럭트에 대해 확인된 외래 유전자(transgene) 통합 클론의 70% 초과)가 나왔다(도 3b, ns: 유의성 없음). 그럼에도 불구하고, 통합 효율은 TALEN 활성화에 의존적이었다(데이터 미공개).

[0072] 또한, Huh 7.5 세포에 대해서도 AAVS1, CNVR7 및 CNVR22에 대해 각각 총 23개, 18개 및 20개의 클론을 선별하였다. FACSaria II (BD Biosciences)를 사용하여 유세포 분석법을 수행한 결과, eGFP+ 클론 중 표적이 통합된 클론은 AAVS1, CNVR7 및 CNVR22에서 각각 약 47.8%, 약 17.8% 및 약 26.1%로 나타났다(도 3c). eGFP의 MFI는 AAVS1과 CNVR7 위치간에 $P = 0.0032$ 및, CNVR7과 CNVR22 위치 간에 $P=0.0092$ 로 유의성을 나타내었다.

[0073] **(4) CNVR7 및 CNVR22 위치로 외래 유전자의 도입에 의한 인접 유전자의 조절 여부의 확인**

[0074] AAVS1 위치는 AAVS1 위치로 외래 유전자의 도입이 인접 유전자의 상향 조절없이 안정한 발현을 유도할 수 있는 세이프 하버로 알려져 있다. AAVS1 위치처럼, CNVR7 및 CNVR22로의 도입이 표적 유전자자리로부터 상류 및 하류 300kb 이상에서 유전자 교란없이 다른 세포주에서 안정되고 신뢰할 수있는 발현을 유도할 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0075] K562 세포에서 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치에 외래 유전자를 도입하고, 300kb 상류 및 하류에서 확인된 AAVS1에 대해 9개, CNVR7에 대해 5개, 및 CNVR22에 대해 8개의 인접 유전자들의 발현 변화를 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)로 분석하였다. 각 세포에서 트리졸-클로로포름 방법으로 총 RNA를 추출하고, RT-&GO Mastermix(MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd) 프로토콜에 따라 무작위(random) 프라이머를 이용하여 역전사시켰다. CFX96 실시간 PCR 검출 시스템(C1000 real-time PCR thermal cycler-Bio-Rad)에서 TOPreal qPCR 2X PreMIX(SYBR Green-Enzymomics; cat number-RT500M)로 약 50 내지 400 ng의 cDNA를 분석하였다. 각 유전자의 상대적 발현 수준은 대조군으로 B2M 및 YWHAZ 발현(하우스키핑 유전자)에 대해 보정하고, mock-처리된 시료에 대한 변화 배수로 나타내었다. 실시간 PCR Miner 소프트웨어(www.miner.ewindup.info)을 이용하여 각 유전자에 대한 평균 PCR 증폭 효율을 산출하였고, qBase 소프트웨어 프로그램(www.biogazelle.com)을 이용하여 각 유전자에 대한 상대적 발현을 측정하였다. Ct 값과 미가공 형광의 미가공 데이터를 추출하기 위해 SDS 2.2.1 소프트웨어를 사용하였고, Ct 값이 37 이상인 유전자는 분석에서 제외하였다.

[0076] AAVS1 표적 세포에서 9개 유전자 중 5개는 유의한 하향조절을 나타내는 반면, 표적 통합 지점에서의 PPP1R12C(즉, AAVS1 유전자자리)는 가장 가파른 하향조절을 나타냈다(도 4a).

[0077] 세이프 하버 기준을 만족하기 위해, CNVR7 및 CNVR22는 도입 위치의 300kb 상류 및 하류의 범위 내에서 가장 인접한 유전자를 포함하지 않는 것으로 확인되었다. AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치와 인접 유전자 자리의 거리는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Hg18				Distance from target locus
AAVS1 Chr19	NLRP2	60169583	60204317	114,423
	GP6	60216887	60241444	77,296
	RDH13	60247521	60272709	46,031
	EPS8L1	60279033	60291103	27,637
	PPP1R12C	60294093	60320739	
	TNNT1	60335973	60352418	17,222
	DNAAF3	60361841	60369902	43,090
	PTPRH	60384428	60412654	65,677
	BRSK1	60487346	60515715	168,595
CNVR7 Chr3	ROBO2	77171984	77779353	5,172,379
	ROBO1	78729080	79721751	3,229,981
	GBE1	81621540	81893640	1,058,092
	Safe Harbor	82951465	82955620	
	CADM2	85858322	86200640	2,906,858
	CHMP2B	87359103	87387388	4,407,639
CNVR22 Chr8	EFR3A	132985541	133094953	2,038,249
	TG	133948387	134216325	916,877
	WISP1	134272494	134310753	822,449
	ST3GAL1	134540325	134653344	479,858
	Safe Harbor	135127147	135140206	
	ZFAT	135559213	135794463	426,000
	PTK2	141737683	142080514	6,604,470
	PTP4A3	142501189	142510802	7,367,976
	FOXH1	145670317	145672526	10,537,104

[0078]

[0079]

표 3에 나타난 바와 같이, CNVR7과 CNVR22에서 가장 가까운 유전자자리는 각각 GBE1과 ZFAT이고, 표적 유전자자리로부터의 거리는 각각 약 1.05 mb 및 약 426 kb이었다.

[0080]

CNVR7에서, CAG 프로모터는 CADM2의 상향 조절 및 ROBO1의 실질적인 하향 조절을 초래하였다(도 4b). 또한, CNVR7에서 분자적으로 확인된 표적 통합을 갖는 6 개의 단일 세포-유래 클론을 분석하여 유사한 결과를 나타낸다는 것을 확인하였고(데이터 미표시), 유전자자리의 전사 상향 조절은 eGFP 발현의 수준과 무관하다는 것을 확인하였다. CNVR22 위치에서, 분자적으로 확인된 표적 도입과 함께 단일 세포-유래 클론에 대해 동일한 분석을 수행한 결과, 인접 유전자의 이상조절(dysregulation)은 나타나지 않았다(도 4c).

[0081]

한편, K562 세포에서 뿐만 아니라, Huh 7.5 세포에서도 동일하게 분석하였다. AAVS1 표적 세포에서 9개의 인접 유전자 중 4개의 발현에 있어서 심각한 교란이 나타났고, CNVR7 표적 세포에서는 5개의 인접 유전자 중 1개의 발현에 있어서 교란이 있었고, CNVR22 표적 세포에 대해서는 다른 유전자 자리에서만 교란이 일어나지 않았지만 TG 유전자에 대해서는 약 13.5배의 하향 조절이 나타났다(도 4d).

[0082]

따라서, CNVR7과 CNVR22의 세이프 하버 후보는 AAVS1에 비해 특정 표적 도입에 따라 안정하고 강력한 외래 유전자 발현이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0083]

(5) 발현 프로모터에 의한 인접 유전자의 조절 여부의 확인

[0084]

세이프 하버 후보에 의한 인접 유전자의 발현 교란이 발현 프로모터 의존적인 것인지 여부를 확인하기 위해, CAG 프로모터에 비해 더 강력한 프로모터인 SFFV(spleen focus forming virus) 프로모터를 포함한 eGFP 카세트

를 제작하였다.

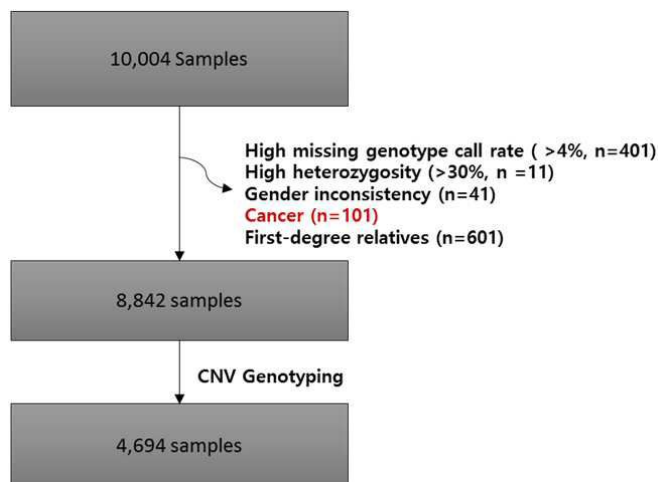
[0085] 실시예 1(3)에 기재된 바와 같이, K562 세포의 단일 세포 유래 클론에서 위치-특이적 통합 PCR 분석을 수행하였다. eGFP+ 표적 도입된 클론은 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22에 대해 각각 64.4%(29 클론/총 45 클론), 39.1%(9 클론/총 23 클론) 및 48.8%(39 클론/총 80 클론)이었다(도 5a). 프로모터 유형이 표적 도입 효율에 영향을 미치지 않는 않지만, CAG 프로모터를 이용한 경우에 비해 SFFV 프로모터를 이용한 경우에 MFI가 더 높았다. eGFP+ 세포의 MFI는 AAVS1과 CNVR7 간에 $P = 0.0079$ 의 유의성을 나타내었고, CNVR7과 CNVR22 간에 $P = 0.0464$ 로 나타났다. 한편, Huh 7.5 세포에 SFFV 프로모터를 포함한 발현 카세트르르 도입한 경우에도 이와 유사한 결과가 나타났다(도 5b).

[0086] 실시예 1(4)에 기재된 바와 같이, SFFV 프로모터를 이용하여 AAVS1, CNVR7, 및 CNVR22 위치로 외래 유전자를 도입시킨 경우, 인접 유전자들의 발현 변화를 확인하였다. CAG 프로모터를 이용한 경우와 유사하게, 가장 큰 교란은 AAVS1 표적 세포에서 나타났다. CNVR7 및 CNVR22 위치의 경우, TG를 제외하고 유의한 유전자 이상조절이 나타나지 않았다.

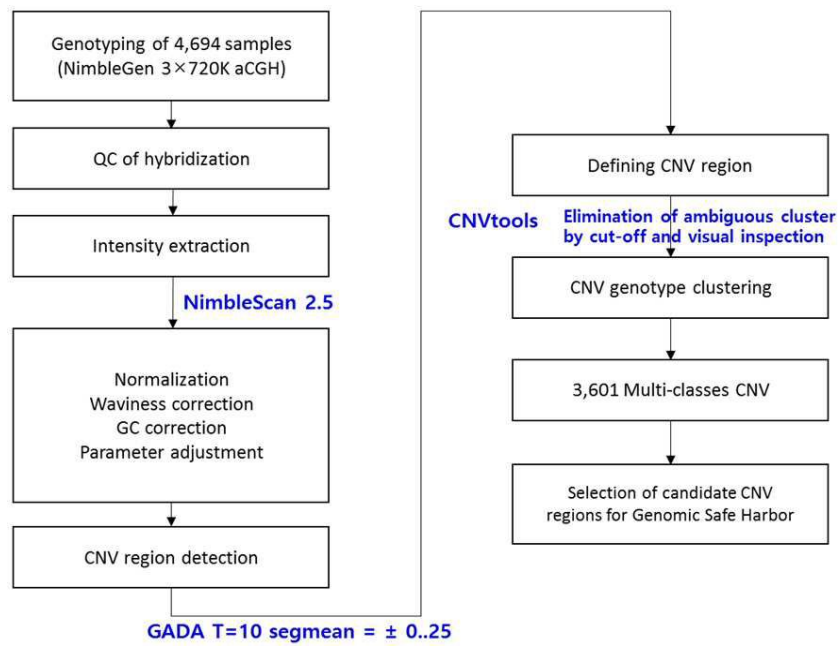
[0087] 따라서, 프로모터 종류를 변경하는 것은 인접 유전자 이상조절에 검출가능한 변화를 유도하지 않고, CNVR7 위치 및 CNVR22 위치는 AAVS1에 비해 인접 유전자의 발현에 영향이 거의 없다는 점에서 우수한 유전체 세이프 하버인 것으로 확인되었다.

도면

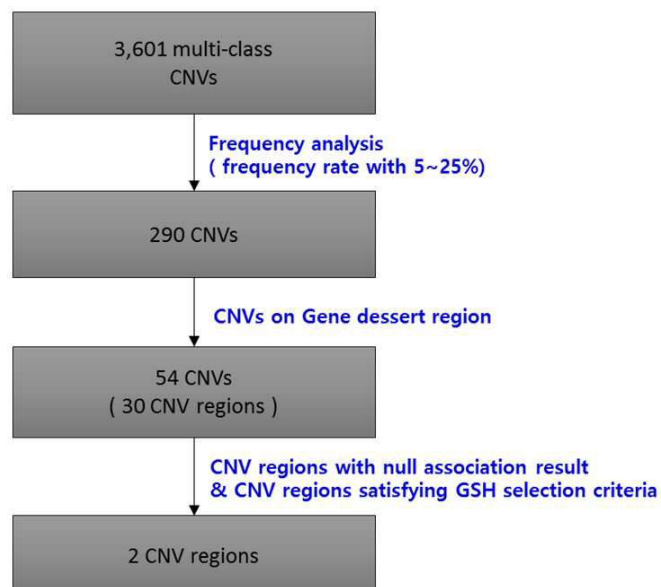
도면1a



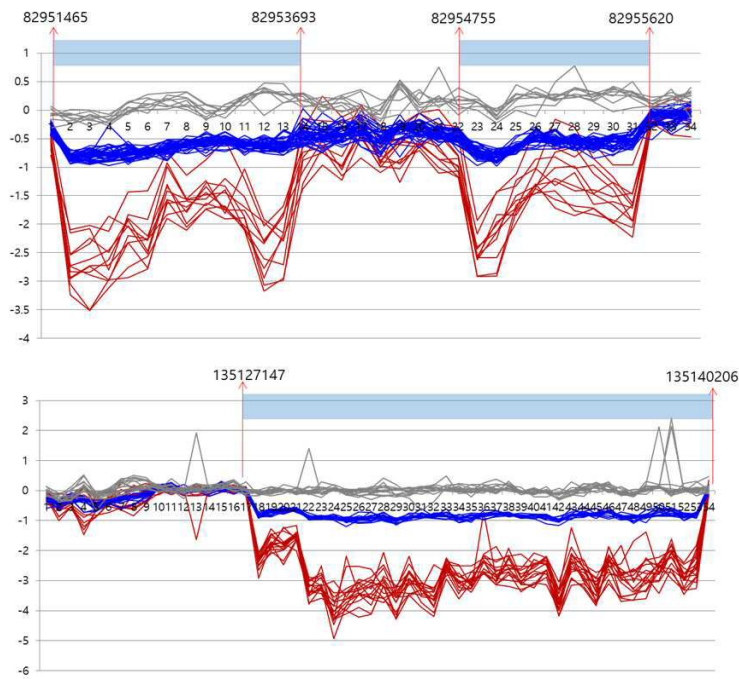
도면1b



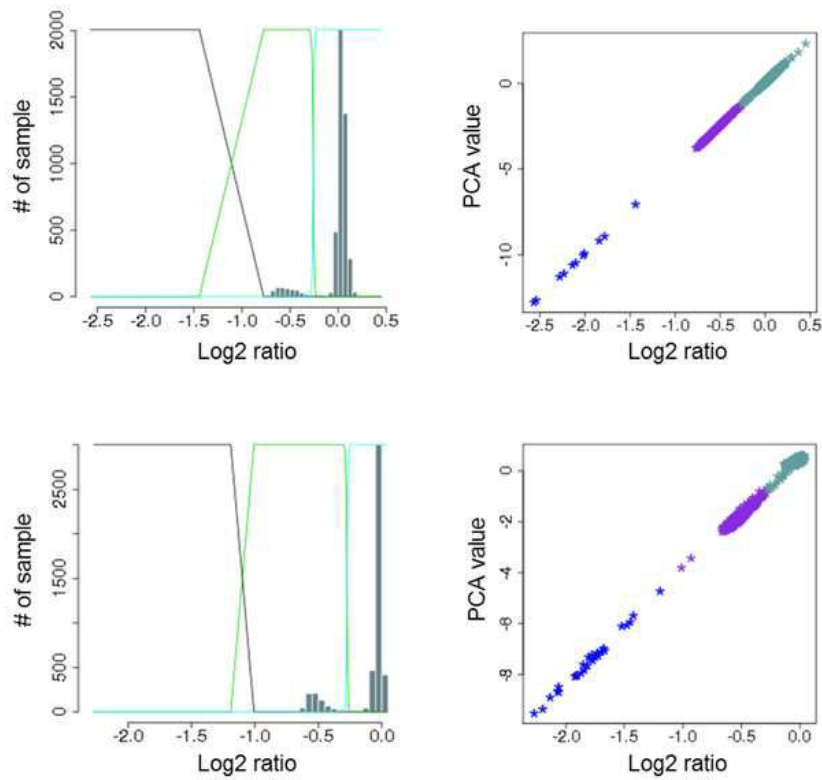
도면1c



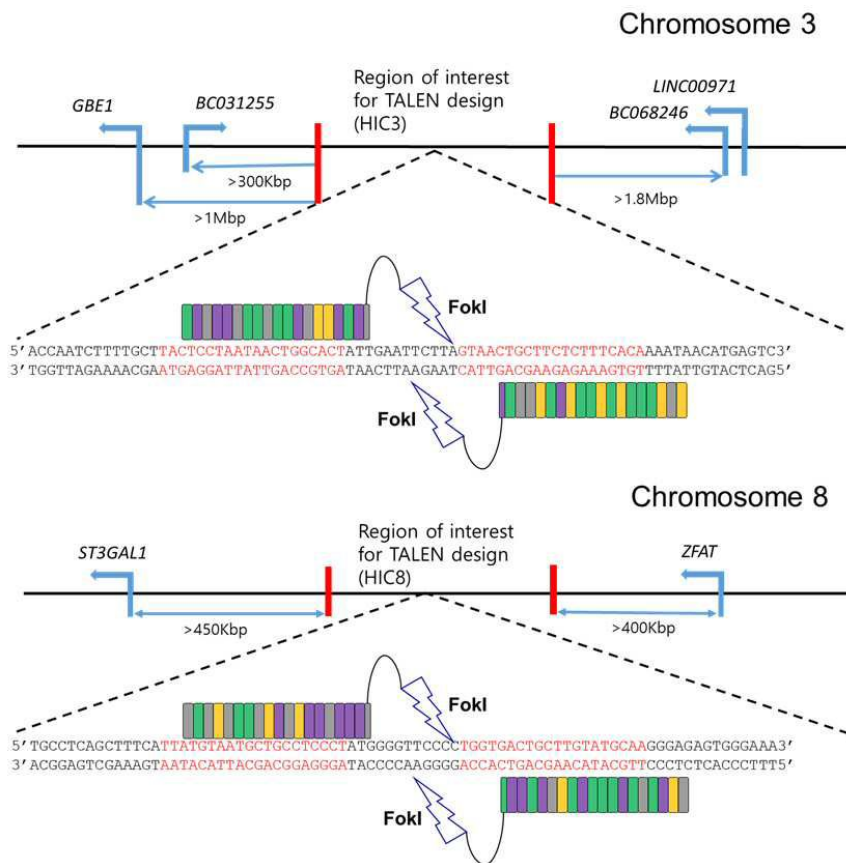
도면1d



도면1e



도면2a



도면2b

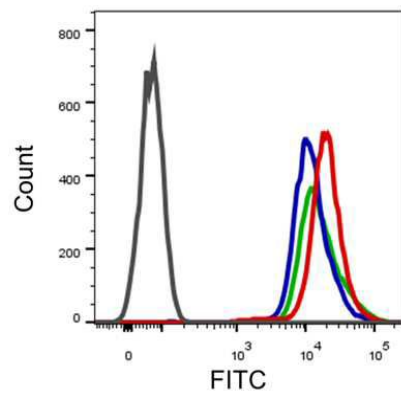
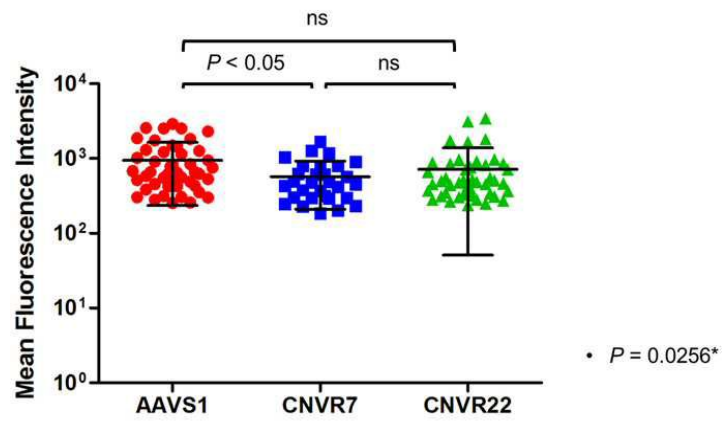


도면3a

	GFP+ clones	Integrated Clones	Percentage (%)
AAVS1	61	48	78.6
CNVR7	41	30	73.1
CNVR22	58	46	79

도면3b

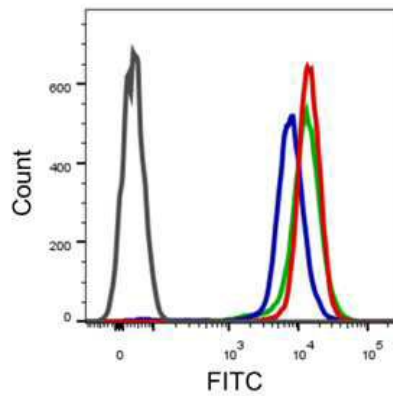
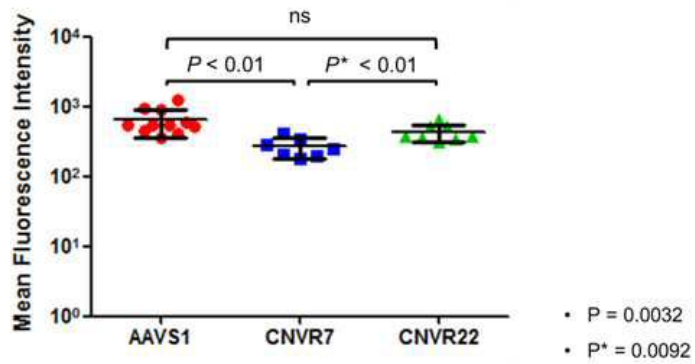
MFI of confirmed site integrated Clones – K562



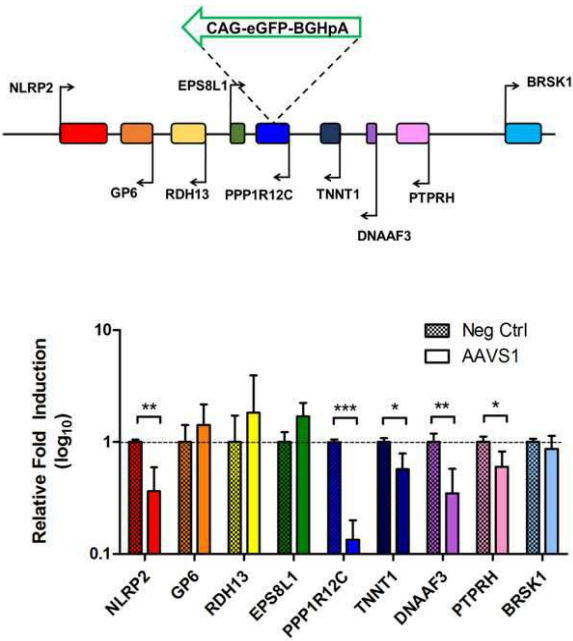
도면3c

	GFP+ clones	Integrated Clones	Percentage (%)
AAVS1	23	11	47.8
CNVR7	18	4	17.8
CNVR22	20	6	26.1

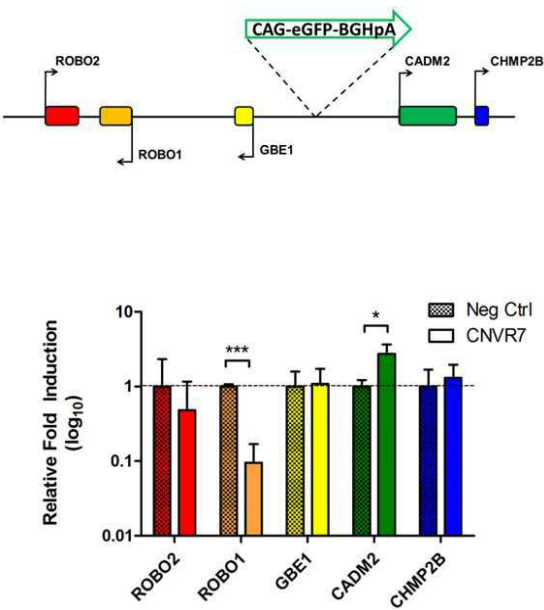
MFI of confirmed site integrated Clones – Huh 7.5



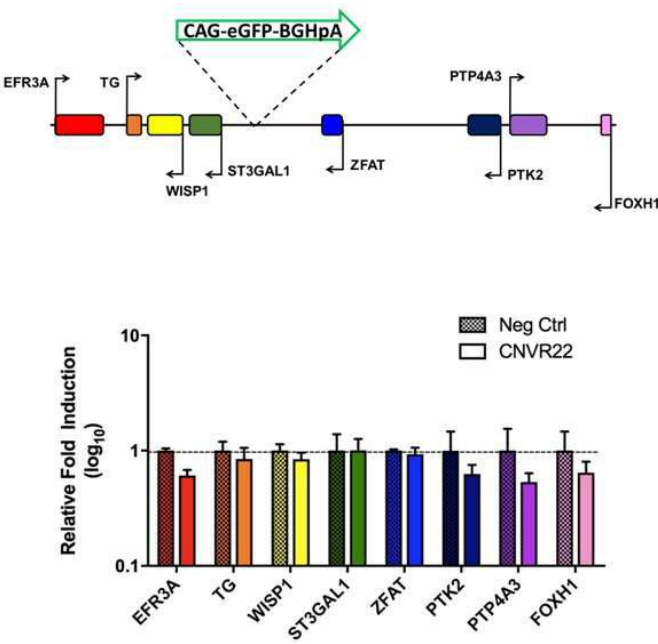
도면4a



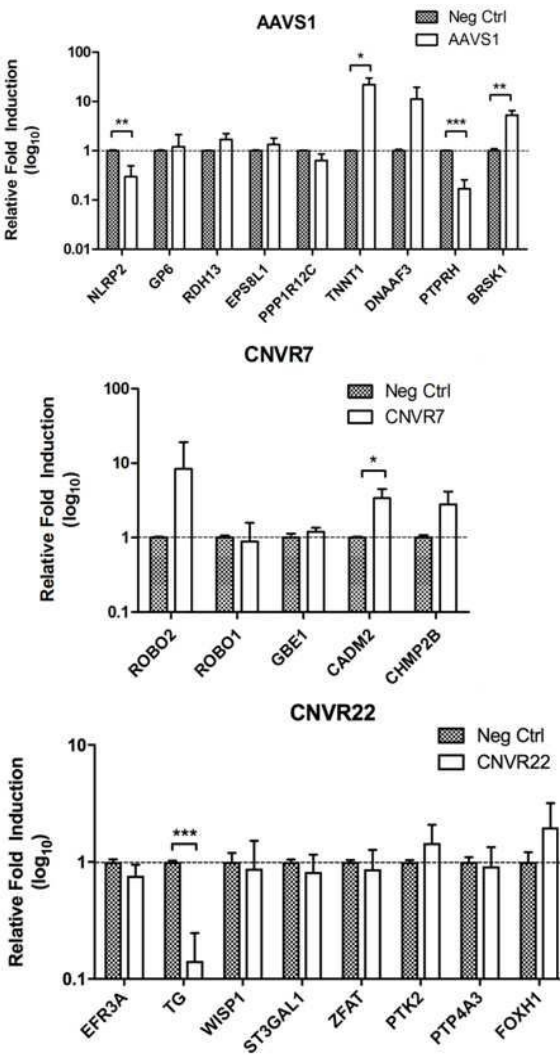
도면4b



도면4c



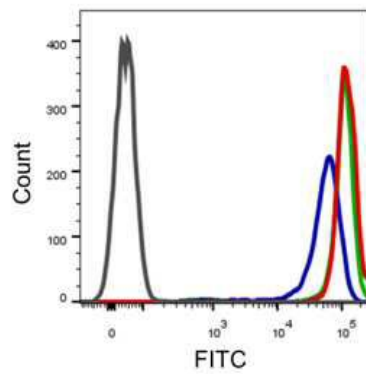
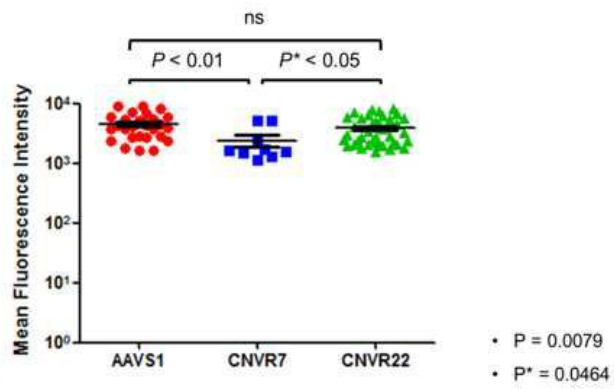
도면4d



도면5a

	GFP+ clones	Integrated Clones	Percentage (%)
AAVS1	45	29	64.4
CNVR7	23	9	39.1
CNVR22	80	39	48.8

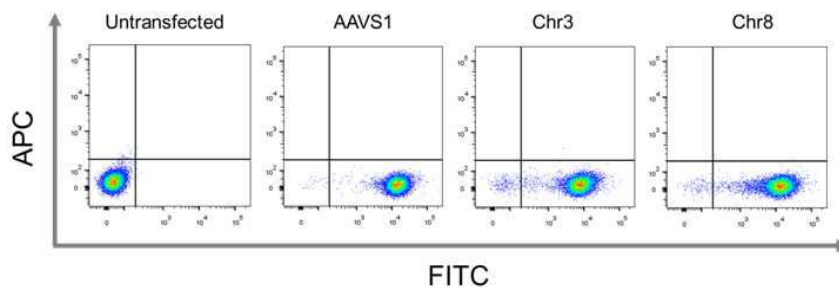
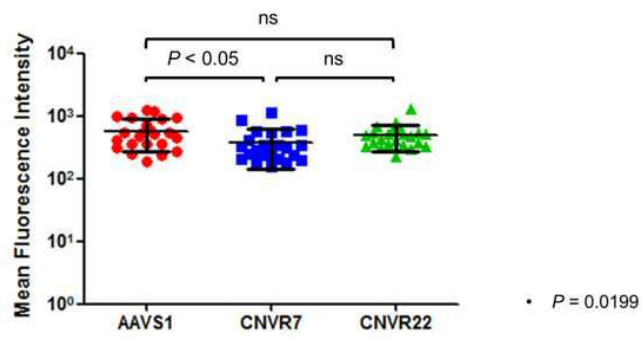
MFI of SFFV confirmed site integrated clones – K562



도면5b

	Total clones	GFP+ clones	Percentage (%)
AAVS1	240	23	9.6
CNVR7	360	18	5.0
CNVR22	317	20	6.3

MFI of selected clones - Huh 7.5



도면5c

