



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월20일
(11) 등록번호 10-1667363
(24) 등록일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 35/12 (2015.01)
C07K 14/755 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 35/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0001392
(22) 출원일자 2015년01월06일
심사청구일자 2015년02월23일
(65) 공개번호 10-2016-0084959
(43) 공개일자 2016년07월15일
(56) 선행기술조사문헌
W02014089541 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 유성대로1689번길 70 (전민동, KT대덕2연구센터)
(72) 발명자
김동욱
서울특별시 마포구 신수로 107 102동 702호 (신수동, 신촌삼익아파트)
박철용
서울특별시 서대문구 이화여대8길 62 106동 805호 (북아현동, 두산아파트)
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 정의준

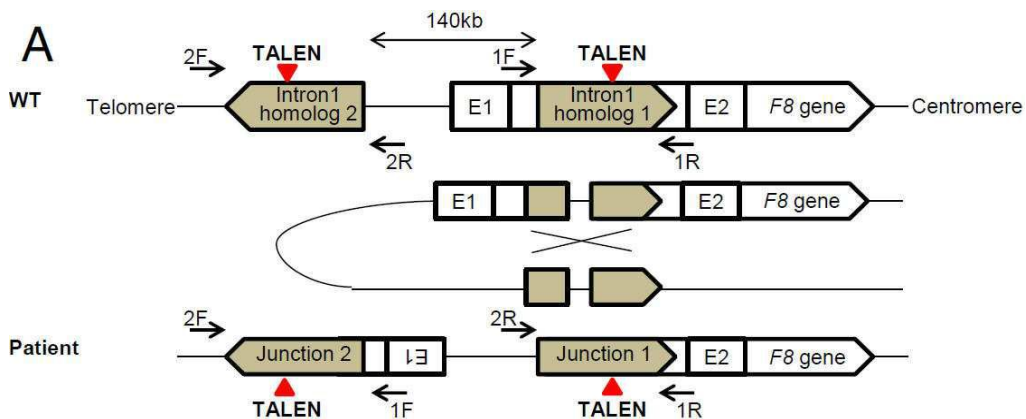
(54) 발명의 명칭 **혈액 응고인자 VIII 유전자를 타겟으로 하는 엔도뉴클레아제 및 이를 포함하는 혈우병 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 정상 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 유발 방법, 역위가 발생한 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 교정 방법 및 이를 이용하여 제작된 역위가 교정된 A형 혈우병 환자-유래 유도만능 줄기세포에 관한 것이다.

본 발명의 방법은 중증 A형 혈우병의 원인 중 하나인 F8 유전자의 인트론 1의 역위를 효율적으로 재현함으로써, A형 혈우병의 발병기작 연구 및 치료제 스크리닝을 위한 리서치 툴(research tool)로서 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법으로 제작된 역위-교정 유도만능 줄기세포는 정상 유전자 또는 단백질 전달을 통한 제한적인 방법에 의하지 않고 돌연변이가 발생한 유전자형을 야생형과 같은 상태로 복구시킴으로써, A형 혈우병에 대한 효율적이고 근원적인 치료가 가능하게 한다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C07K 14/755 (2013.01)

C12N 5/0696 (2013.01)

C12N 9/16 (2013.01)

(72) 발명자

김진수

서울특별시 관악구 관악로 1 자연과학대학 화학부
503동 121호 (신림동, 서울대학교)

김정은

서울특별시 성북구 길음로9길 50 912동 2801호 (길음동, 길음뉴타운9단지아파트)

권지연

서울 관악구 관악로15길 23-16, 401호(봉천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B4028631

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 전분화능 줄기세포로부터 중뇌 흑질부 특이적 도파민 신경세포의 효율적 분화법 개발을 통한 신경계 질환 세포치료 원천기술 개발

기여율 40/100

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120254

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 배아줄기세포의 고효율 신경세포분화법을 통한 파킨슨병과 척수손상 임상적용 핵심기술 개발(역분화줄기세포 유래 세포를 대조군으로한 안전성 유효성 비교 평가)

기여율 30/100

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2015.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C7050126

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 환자유래 역분화 줄기세포 이용 질병 모델 개발 및 신경계 분화세포로 약효 독성 평가 플랫폼 개발

기여율 30/100

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 인간 유래의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)에서의 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 교정용 조성물:

(a) 한 쌍의 FokI 엔도뉴클레아제; 및

(b) 상기 엔도뉴클레아제 중 하나에 각각 연결되고, F8 유전자의 역위 발생 부위를 특이적으로 인식하는 아미노산 서열을 포함하는 한 쌍의 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인; 그리고,

상기 F8 유전자의 역위는 F8 유전자의 1번 인트론에서의 역위이며, 상기 한 쌍의 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인은 각각 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열 내에 포함되는 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하고, 상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 각각 15-25 bp 길이를 가지면서 서로 10-20bp 떨어져 있으며,

상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1서열 및 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이고,

상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 포함하며,

상기 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

다음 단계를 포함하는 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위가 교정된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)의 제조방법:

(a) A형 혈우병 환자로부터 분리된 체세포를 역분화시켜 유도만능 줄기세포를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 유도만능 줄기세포를 제 1 항의 조성물과 접촉시키거나 상기 조성물이 삽입된 유전자 전달체로 형질전환시키는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 상기 A형 혈우병 환자로부터 분리된 체세포에 OCT4, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4 및 c-MYC로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 형질전환함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항의 방법에 의하여 제조된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell).

청구항 10

제 9 항의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 유효성분으로 포함하는 A형 혈우병 치료용 조성물.

청구항 11

다음을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 인간 유래의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)에서의 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 유도용 조성물:

- (a) 한 쌍의 FokI 엔도뉴클레아제;
 - (b) 상기 (a)중의 하나에 연결되고, F8 유전자 상의 제1 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열을 포함하는 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인; 및
 - (c) 상기 (a)중의 하나에 연결되고, F8 유전자 상의 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열을 포함하는 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인으로서, 상기 제1 위치 및 제2 위치는 각각 15-25 bp 길이를 가지며 서로 10-20bp 떨어져 있고,
- 상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열 내에 포함되며,
- 상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지고,
- 상기 제1 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 각각 서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함하며,
- 상기 F8 유전자의 역위는 F8 유전자의 1번 인트론에서의 역위이다.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액 응고인자 VIII 유전자를 타겟으로 하는 엔도뉴클레아제를 이용한 A형 혈우병 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] A형 혈우병(Hemophilia A)은 전 세계적으로 남성 5000명 당 1명의 유병률을 가지는 흔한 유전적 출혈질환(Bleeding Disorder) 중의 하나이다(1). 이 질환은 X-연관 응고인자 VIII(F8)에서의 대량 삭제, 삽입, 역위 및 점 돌연변이를 포함하는 유전자 변이에 의해 유발된다(Haemophilia A mutation, Structure, Test and Resource Site; <http://hadb.org.uk>); 총 1,492개의 서로 다른 돌연변이가 A형 혈우병을 유발한다고 알려졌다. 임상적 증상은 유전자형에 따라 다양하다(2). A형 혈우병은 환자 혈장의 F8의 상대적 활성정도에 따라 중증(<1% 활성), 보통(1-5% 활성) 또는 경증(5-30% 활성)으로 나뉠 수 있다(1). 중증 A형 혈우병의 약 50%가 F8 유전자의 일부를 포함하는 두 가지 타입의 염색체 역위에 의해 유발된다(3-5).

[0003] 현재, A형 혈우병의 현실적인 치료방법은 개발되지 못한 상태이다. 재조합 F8 단백질을 사용하여 치료를 시도 하였으나, F8-불활성화 항체의 형성, 높은 비용 및 잦은 투여빈도로 인해 한계가 있었다. 유전자 치료는 혈우병 치료를 위한 유망한 선택이다. Nathwani 등은 보다 드문 X-연관 출혈 질환인 B형 혈우병을 가진 6명의 환자에게 AAV(adeno-associated virus) 벡터로 혈액 응고인자 IX를 인코딩하는 F9 cDNA를 전달하였다(6). 그러나, 불행하게도 AAV는 크기가 큰 F8 cDNA(~8 kbp)가 탑재될 수 없어 이 벡터는 A형 혈우병 환자에게 전장 F8 cDNA를 전달하는 데에 이용될 수 없다. 반면, F9 cDNA는 보다 작다(~1.4 kbp). 나아가, 유전자 치료는 내생의 조절 메커니즘에 의해 통제되지 않는 기능성 유전자를 전달하는 것 보다 유전적 결함을 고치는 데에 보다 이상적으로 적용될 수 있다.

[0004] 환자 유래 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)는 혈우병 치료를 위한 또 다른 유망한 방법이 될 수 있다. 그러나, 환자유래 iPSCs 자체는 유전적 결함을 그대로 가지고 있으므로 세포 치료에 사용할 수 없다. 중요한 것은, 결함이 있는 유전자는 ZFNs(zinc finger nucleases)(7-10), TALENs(transcription activator-like effector nucleases)(11-13) 및 CRISPR(clusters of regularly interspaced palindromic repeats)/Cas-유래 RGENs(RNA-guided endonucleases)(14-21) 등의 프로그램 가능한 뉴클레아제(programmable nucleases, 유전자 가위)를 이용하여 고쳐질 수 있다. 이들 유전자 가위는 염색체 DNA의 특정 부위를 타겟팅하여 절단함으로써 DNA 이중가닥 절단(DNA double-strand breaks, DSBs)을 유발하며, 이는 HR(homologous recombination) 또는 NHEJ (nonhomologous end-joining)로 알려진 내재적 메커니즘을 통해 고쳐질 수 있다. 이러한 유전자 가위는 타겟팅된 돌연변이 생성 및 삭제(22, 23), 중복 및 역위(24)와 같은 염색체 재배열을 일으킨다. 유전자-교정된 iPSC는 이후 적절한 체세포로 분화되어 환자에게 이식된 후 교정된 유전자를 발현함으로써 환자에서의 테라토마 형성을 방지할 수 있다.

[0005] 본 발명자들은 TALEN이 인간 iPSC의 140-kbp 염색체 분절에 역위를 일으켜 A형 혈우병의 가장 흔한 유전자형을 모방하는 A형 혈우병 모델 세포주를 제작하고, 상기 역위부위를 flip-flop하여 야생형으로 되돌리는 데에 이용될 수 있음을 발견하였다. 무엇보다도, F8 mRNA가 혈우병 모델 iPSC에서 분화된 세포가 아닌 귀선 유전된(reverted), 즉 유전자 교정된 iPSC로부터 분화된 세포에서 발현되었다. 이는 유전자 가위가 iPSC의 큰 유전자 분절을 재배열하고 이러한 유전자 재배열을 함유하는 클론을 분리하는 데에 사용될 수 있음을 보고하는 최초의 연구결과이며, 이는 iPSC의 유전자 재배열로 야기된 유전적 결함을 교정하는 원리 증명을 제공한다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 혈액 응고인자 VIII(F8)에서의 유전자 변이에 의해 유발되는 A형 혈우병에 대한 효율적이고 근원적인 치료방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, F8 유전자의 역위 발생 부위를 타겟팅하는 TAL 이펙터 도메인 및 상기 도메인과 각각 결합하여 상기 도메인에 의해 타겟팅된 유전자 부위를 절단하는 한 쌍의 엔도뉴클레아제를 이용하여 성공적으로 복구(correction)될 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 교정용 조성물 및 이를 이용한 역위 교정 방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위가 교정된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 유도만능 줄기세포 및 이를 유효성분으로 포함하는 A형 혈우병 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 교정용 조성물:
- [0012] (a) 한 쌍의 엔도뉴클레아제; 및
- [0013] (b) 상기 엔도뉴클레아제 중 하나에 각각 연결되고, F8 유전자의 역위 발생 부위를 특이적으로 인식하는 아미노산 서열을 포함하는 한 쌍의 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인.
- [0014] 본 발명자들은 혈액 응고인자 VIII(F8)에서의 유전자 변이에 의해 유발되는 A형 혈우병에 대한 효율적이고 근원적인 치료방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, F8 유전자의 역위 발생 부위를 타겟팅하는 TAL 이펙터 도메인 및 상기 도메인과 각각 결합하여 상기 도메인에 의해 타겟팅된 유전자 부위를 절단하는 한 쌍의 엔도뉴클레아제를 이용하여 성공적으로 복구(correction)될 수 있음을 발견하였다.
- [0015] 본 발명에 따르면, 본 발명은 F8 유전자의 역위 발생 부위를 특이적으로 인식하는 TAL 이펙터 도메인을 이용하여 타겟 부위가 가이드 되며, 상기 부위를 상기 도메인과 결합한 엔도뉴클레아제가 정확하게 절단함으로써 역위로 인해 뒤집힌 유전자 부분의 양끝 부위가 절단된다. 절단된 유전자 부위는 일정 빈도로 재역위를 일으킴으로서 결과적으로 역위의 교정(correction)이 달성되게 된다.
- [0016] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0017] 본 발명에서 용어 “특이적으로 인식”은 본 발명의 타겟 서열과의 상호작용에 의하여 이를 선택적으로 인식하는 것을 의미하며, 이에 “특이적으로 결합(binding)”과 동일한 의미로 사용된다. 본 발명에서 이용되는 TAL 이펙터는 34개 아미노산으로 이루어진 중심 반복 도메인(central repeat domain)을 가지면서, 12 및 13번째 아미노산 잔기는 다양한 아미노산으로 이루어져 있어 RVD(repeat variable diresidue)로 불리운다. 각각의 RVD는 특정 DNA의 염기를 식별하는 역할을 하며, NI = A, NN = G, NG = T, 및 HD = C를 인식하여 이와 특이적으로 결합한다(Boch J, et al. *Science* 326 (5959):1509-1512(2009)). 따라서, 타겟 DNA 서열에 대한 정보가 있을 경우 이러한 코드에 기초하여 타겟 DNA 서열과 특이적으로 결합하는 TAL 이펙터 아미노산 서열을 결정할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 교정되는 F8 유전자의 역위는 F8 유전자의 1번 인트론에서의 역위이며, 상기 한 쌍의 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인은 각각 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열 내에 포함되는 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하고, 상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 각각 15-25 bp 길이를 가지면서 서로 10-20bp 떨어져 있다.

본 발명에 따르면, 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열은 F8 유전자의 1번 인트론의 상동체 1의 뉴클레오타이드 서열(약 1kb)이다. 따라서, 제1 위치 및 제2 위치는 각각 좌측 TAL 이펙터 및 우측 TAL 이펙터가 결합하게 되고, 여기에 각각 연결된 한쌍의 엔도뉴클레아제는 제1 위치 및 제2 위치 사이의 10-20bp (스페이스) 부분을 정확하게 절단하게 된다.

- [0019] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제1 위치 및 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1 서열 및 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0020] 보다 구체적으로는, 본 발명의 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0021] 보다 구체적으로는, 본 발명의 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열은 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 엔도뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제이다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 본 발명의 엔도뉴클레아제 및 TAL 이펙터는 각각 단백질의 형태로 이용될 수도 있고, 이들을 각각 코딩하는 DNA가 탑재된 벡터로 형질전환함으로써 목적 세포에 전달될 수도 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위가 교정된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)의 제조방법을 제공한다:
- [0025] (a) A형 혈우병 환자로부터 분리된 체세포를 역분화시켜 유도만능 줄기세포를 수득하는 단계; 및
- [0026] (b) 상기 유도만능 줄기세포를 본 발명의 상술한 조성물과 접촉시키거나 상기 조성물이 삽입된 유전자 전달체로 형질전환시키는 단계.
- [0027] A형 혈우병 환자로부터 분리된 체세포를 역분화시켜 수득한 유도만능 줄기세포는 환자 고유의 역위된 유전자를 간직하고 있으며, 이는 상술한 본 발명의 방법을 통해 인 비트로에서 교정될 수 있다. 즉, 역위가 발생한 부분을 조사한 뒤 상기 역위발생 부위를 특이적으로 인식하는 TAL 이펙터 도메인을 이용한다면, 일정 빈도로 역위가 교정되어 야생형과 동일한 유전자형을 가지는 환자 맞춤형 유도만능 줄기세포를 수득할 수 있는 것이다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)”는 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포를 지칭하며, 역분화 유도만능 줄기세포로도 지칭된다. 유도만능 줄기세포는 배아줄기세포와 거의 같은 특성을 가지며, 구체적으로 세포 외형, 유전자, 단백질 발현 패턴이 유사하고, 인 비트로 및 인 비보에서 전분화능을 가지며, 테라토마(teratoma)를 형성하고, 유전자의 생식선 전이(germline transmission)가 가능하다. 본 발명의 유도만능 줄기세포로는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등의 모든 포유류 유래의 역분화 유도만능 줄기세포를 포함하나, 구체적으로는 인간 유래의 유도만능 줄기세포이며, 가장 구체적으로는 A형 혈우병 환자로부터 유래한 유도 만능 줄기세포이다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “역분화”는 존재하는 분화 세포들을 미분화 상태로 되돌려 새로운 분화 조직 형성이 가능하도록 하는 후성학적인 역행과정을 의미하는 것으로 리프로그래밍 과정이라고도 말하며 세포 유전체의 후성학적인 변형(epigenetic changes)의 가역성에 기초한 것이다. 본 발명에서의 목적에 따라, 상기 “역분화”란 0% 이상 내지 100% 미만의 분화능을 가지는 분화된 세포들을 미분화 상태로 되돌리는 과정이라면 모두 이에 포함되고 예를 들어 0%의 분화능을 가지는 분화된 세포를 1%의 분화능을 가지는 분화된 세포로 미분화시키는 과정도 이에 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 역분화는 이미 분화된 세포의 분화능을 회복시킬 수 있는 당업계에서 알려진 다양한 방법을 통해 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 A형 혈우병 환자로부터 분리된 체세포에 OCT4, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4 및 c-MYC로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 형질전환함으로써 이루어질 수 있다.
- [0031] 유도만능 줄기세포를 얻기 위해 인간 체세포를 배양하는 데에 이용되는 배지는 통상적인 어떠한 배지도 포함한다. 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지(Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640(Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's

medium, Dulbecco, R. et al., *Virology* 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:255(1980)), Way-mouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. *Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., *In Vitro* 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서에서 용어 “유전자 전달체”는 원하는 타겟 유전자를 대상 세포에 도입하여 발현시키기 위한 매개체를 의미한다. 이상적인 유전자 전달체는 인체 또는 세포에 무해하고 대량생산이 용이하며 효율적으로 유전자를 전달할 수 있어야 한다.

[0033] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달”은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포내 침투 (transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달체는 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.

[0034] 본 발명의 유전자 전달체를 제조하기 위해, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트 (expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 리택신 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대 CMV(포유동물 사이토 메갈로 바이러스) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, U6 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 프로모터는 CMV 프로모터 및/또는 U6 프로모터이다.

[0035] 본 발명의 유전자 전달체는 다양한 형태로 제작할 수 있는 데, 이는 (i) 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작할 수 있다.

[0036] 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 동물 형질전환에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스(Lockett LJ, et al., *Clin. Cancer Res.* 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스(Gunzburg WH, et al., *Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 렌티바이러스 (Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., *Proc. Natl. Act. Sci USA* 92:1411-1415(1995)), 배시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999)), 리포솜(*Methods in Molecular Biology*, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오솜에 적용될 수 있다. 가장 구체적으로는, 본 발명의 유전자 전달체는 플라스미드이다.

[0037] 본 발명에서, 유전자 전달체가 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 상기 접촉시키는 단계는 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.

[0038] 본 발명에서 유전자 전달체가 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 유전자를 세포내로 도입시킬 수 있으며,

가장 구체적으로는 전기 천공법을 이용할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 한 쌍의 TAL 이펙터 도메인은 각각 F8 유전자 상에서 절단하고자 하는 부위를 사이에 두고 10-20 bp 떨어져 있으며, 보다 구체적으로는 12-16 bp 떨어져 있고, 가장 구체적으로는 12-14 bp 떨어져 있다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 A형 혈우병은 F8 유전자의 1번 인트론에서 역위가 발행한 A형 혈우병이며, 상기 한 쌍의 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인은 각각 서열목록 제1서열 및 제 2 서열의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0041] 본 구현예는 A형 혈우병 중 F8 유전자의 1번 인트론에서 역위가 발생한 A형 혈우병의 역위가 교정된 유도만능 줄기세포를 제작하기 위한 구현예이며, 이의 각 구성 및 단계는 이미 상술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 방법에 의하여 제조된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 유효성분으로 포함하는 A형 혈우병 치료용 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 유도만능 줄기세포는 혈우병 환자의 유전자 역위가 교정된 세포로써, 이후 적절한 체세포로 분화되어 환자에게 이식된 후 교정된 유전자를 발현함으로써 난치병인 A형 혈우병에 대한 유용한 세포치료용 조성물이 될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 직접 체내 이식된 채 인 *비보*에서 목적세포로 분화를 유도할 수도 있고, 혹은 인 *비트로*에서 목적세포로 분화를 완료한 뒤 체내에 이식할 수도 있다.
- [0045] 구체적으로는, 본 발명에서 치료하고자 하는 A형 혈우병은 중증 A형 혈우병이다. 본 명세서에서 용어 “중증 A형 혈우병(severe hemophilia A)”은 혈액 응고인자 VIII(F8)의 활성이 정상인의 1% 미만인 경우를 의미한다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a)질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b)질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c)질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 A형 혈우병에 걸린 개체에서 교정되어 야생형과 동일한 유전자를 발현함으로써 유전자 역위로 유발되었던 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 A형 혈우병의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다. 따라서, 용어 “투여하다”는 본 발명의 유효성분인 유도만능 줄기세포 또는 이를 재분화시킨 성체세포를 주입 또는 이식(transplantation)하는 것을 포함하므로, 용어 “투여하다”는 “주입하다” 또는 “이식하다”와 같은 의미로 사용된다.
- [0048] 조성물의 “치료적 유효량”은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 추출물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은 털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0049] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0051] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 혈관 내(intravascular) 투여를 할 수 있다.

- [0052] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 1일 당 10^2 - 10^{10} 세포이다.
- [0053] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 유도용 조성물을 제공한다:
- [0055] (a) 한 쌍의 엔도뉴클레아제;
- [0056] (b) 상기 (a)중의 하나에 연결되고, F8 유전자 상의 제1 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열을 포함하는 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인; 및
- [0057] (c) 상기 (a)중의 하나에 연결되고, F8 유전자 상의 제2 위치의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 아미노산 서열을 포함하는 TAL(transcription activator-like) 이펙터 도메인으로서, 상기 제1 위치 및 제2 위치는 각각 15-25 bp 길이를 가지며 서로 10-20bp 떨어져 있는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [0058] 본 발명에서 이용되는 각 구성에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0059] 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법을 역위가 발생한 환자 세포를 출발물질로 사용할 경우 발생한 역위의 재역위, 즉 교정을 유도할 수 있으나, 반대로 정상인의 세포를 출발물질로 이용할 경우 역위를 유도할 수 있다. 따라서, 정상 유전자형을 가지는 세포를 출발 세포로 이용함으로써 본 발명은 인위적 혈우병 세포를 효율적으로 수득하는 유용한 리서치 툴(research tool)이 될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 정상인의 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 유도 방법을 제공한다.
- [0061] 본 발명에서 이용되는 각 조성물 및 단계에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0062] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0063] (a) 본 발명은 정상 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 유발 방법, 역위가 발생한 혈액 응고인자 VIII(F8) 유전자의 역위 교정 방법 및 이를 이용하여 제작된 역위가 교정된 A형 혈우병 환자-유래 유도만능 줄기세포를 제공한다.
- [0064] (b) 본 발명의 방법은 중증 A형 혈우병의 원인 중 하나인 F8 유전자의 인트론 1의 역위를 효율적으로 재현함으로써, A형 혈우병의 발병기작 연구 및 치료제 스크리닝을 위한 리서치 툴(research tool)로서 유용하게 이용될 수 있다.
- [0065] (c) 본 발명의 방법으로 제작된 역위-교정 유도만능 줄기세포는 정상 유전자 또는 단백질 전달을 통한 제한적인 방법에 의하지 않고 돌연변이가 발생한 유전자형을 야생형과 같은 상태로 복구시킴으로서, A형 혈우병에 대한 효율적이고 근원적인 치료가 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 에피솜 리프로그래밍 벡터를 이용하여 HDF로부터 iPSC 클론을 제작한 결과를 나타낸 그림이다. 도 1a는 확장된 인간 iPSC(Epi3 클론)의 형태를 보여주는 그림이다(스케일 바, 200 μ m). 도 1b는 iPSC(Epi3 클

론)에 대한 알칼린 포스파타아제 염색결과이다(스케일 바, 500 μ m). 도 1c는 확립된 iPSC 세포주(Epi1tEpi8)에 남아있는 에피솜 벡터(EBNA-1) 서열을 검출한 결과를 보여준다. GAPDH 유전자는 분리된 전체 DNA에 대한 대조군으로 사용되었다. 전기천공 전(na)과 후(6일)에 세포로부터 분리된 전체 DNA가 각각 에피솜 벡터 DNA에 대한 음성 및 양성 대조군으로 각각 사용되었다. 레트로바이러스-유래 야생형 iPSC 세포주(iPSC1)도 음성 대조군으로서 분석되었다. 도 1d는 면역세포화학을 통해 인간 ESC-특이적 마커인 OCT4 및 SSEA-4의 발현을 검출한 결과를 보여준다. DAPI 신호는 이미지 내 전체 세포를 나타낸다(스케일 바, 100 μ m). 도 1e는 OCT4, SOX2, LIN28, NANOG 및 GAPDH의 전사 수준을 측정하기 위해 유전자-특이적 프라이머(표 3)를 이용하여 RT-PCR 분석을 한 결과를 나타낸다. mRNA 수준은 HDFs, 인간 ES 세포주(H9), 야생형 iPSC 세포주(WT-iPSC) 및 WT-iPSC Epi3 세포주(1, HDFs; 2, H9; 3, WT-iPSC; 4, Inv 1; 5, Inv 2)에서 유래한 역위 클론(Inv 1 및 Inv 2) derived from the WT-iPSC Epi3 세포주(1, HDFs; 2, H9; 3, WT-iPSC; 4, Inv 1; 5, Inv 2)에서 측정하였다. 도 1f는 qPCR을 통해 각 세포에서의 OCT4, SOX2 및 LIN28 mRNA를 정량화한 결과로서, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. 도 1g는 외배엽(Nestin), 중배엽[α -SMA(α -smooth muscle actin)], 및 내배엽[AFP(α -fetoprotein)] 마커 단백질의 발현을 보여준다(스케일 바, 50 μ m).

도 2는 HEK 293T 세포에서의 F8 유전자의 TALEN-매개 역위를 보여주는 그림이다. 도 2a는 A형 혈우병 환자에서 나타나는 염색체 역위의 예상 메카니즘이다. F8 유전자에 해당하는 140-kbp 염색체 분절의 역위는 반대방향에서 유래한 두 개의 상동부위(F8 유전자의 1번 인트론에 위치한 homolog 1 및 140-kbp 업스트림 부위에 위치한 homolog 2)와 관련되어 있다. 붉은색 삼각형은 TALEN 타겟부위를, 화살표는 140-kbp 역위를 검출하기 위해 설계된 프라이머를 각각 나타낸다. 도 2b는 11개 TALEN 쌍의 T7E1 분석결과를 나타낸다. T7E1에 의해 절단된 DNA 밴드의 예상 위치는 별표로 표시하였다.

도 3은 iPSC의 F8 좌위의 TALEN-매개 역위를 보여주는 그림이다. 도 3a는 4개의 역위 클론의 지놈 DNA에 대한 PCR 분석결과를 나타낸다. A형 혈우병 환자 세포(Pa) 및 야생형 iPSC(WT)에서 분리한 지놈 DNA 시료를 각각 역위 또는 정상 유전자형에 대한 양성 대조군으로 이용하였다. 도 3b는 역위 클론의 변곡점 연결부(breakpoint junction)의 DNA 서열을 나타내는 그림이다. TALEN 결합부위는 붉은색(homolog 1) 또는 파란색(homolog 2)으로 표시하였다.

도 4는 F8 유전자 역위의 복구(reversion)를 보여주는 그림이다. 세 개의 반복 클론으로부터 수득한 지놈 DNA에 대해 PCR 분석을 수행하였다(도 4a). A형 혈우병 환자 세포(Pa) 또는 야생형 iPSC(WT)로부터 분리한 지놈 DNA를 역위 또는 정상 유전자형을 위한 양성 대조군으로 각각 사용하였다. 도 4b는 반복 클론에서의 변곡점 연결부(breakpoint junction) DNA 서열을 보여주는 그림이다. TALEN 결합부위는 붉은색(junction 1) 또는 파란색(junction 2)로 나타내었다. 대쉬는 삭제된 염기를 나타낸다. 도 4c는 반복 클론(클론 1 및 3)에서 두 개의 TALEN 결합부위 사이의 서열(각각 상동체 1 및 2)에 대한 크로마토그램을 각각 나타낸다.

도 5는 역위 및 반복 클론의 특성을 분석한 결과를 보여주는 그림이다. 도 5a는 역위 및 반복 클론에서 유래된 세포에서의 F8 유전자 발현을 보여준다. PCR을 통해 야생형 iPSCs(WT), 역위 클론(Inv 1 및 2) 및 반복 클론(Rev 1, 2, 및 3)에서 유래된 세포에서의 F8 및 외배엽 마커 유전자(FOXA2 및 Sox17)의 발현을 검출하였다. GAPDH를 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 5b는 역위 및 반복 클론에서 분화된 상피세포의 F8 단백질 발현을 보여주는 그림이다. 분화된 세포를 고정하고 지시된 항체로 염색하였다. DAPI 신호는 이미지 내 전체 세포를 나타낸다(FVIII, F8 단백질; vWF, von Willebrand factor(성숙 상피마커 단백질); 스케일 바, 100 μ m).

도 6은 에피솜 리프로그래밍 벡터를 이용하여 제작된 인간 iPSCs의 특성을 분석한 결과를 나타내는 그림이다. 핵형 분석은 10계대(Epi3) 및 12계대(Epi8)의 WT-iPSC 세포주의 염색체에 대하여 수행하였다(도 6a). 인간 ESC-특이적 표면 마커인 Nanog 및 TRA-1-60의 발현을 면역세포화학 분석을 통해 측정하였다(도 6b). DAPI 신호는 이미지 내 전체 세포를 나타낸다(스케일 바, 100 μ m). 도 6c는 외배엽(Pax6), 중배엽(Brachyury) 및 내배엽(HNF3 β) 표지 단백질의 발현을 보여준다(스케일 바, 50 μ m).

도 7은 타겟팅된 역위의 빈도를 보여주는 그림이다. 타겟팅된 역위의 빈도를 디지털 PCR을 이용하여 측정하였다(도 7a). TALEN-인코딩 플라스미드로 형질전환된 세포에서 분리한 지놈 DNA 시료를 순차적으로 희석하여 디지털 PCR 분석을 수행하였다. ZFNs(zinc-finger nucleases) 또는 TALEN으로 유발된 염색체 역위의 빈도를 측정하였다(도 7b). Z10은 F8 유전자의 1번 인트론 상동체를 타겟팅하는 ZFN 쌍이다. 140-kbp 역위의 빈도는 디지털 PCR로 측정하였다. 상한과 하한은 신뢰구간 95%를 나타낸다.

도 8은 TALEN 오프-타겟 효과를 분석한 결과를 보여주는 그림이다. 본 발명에서 설계된 TALEN의 잠재적인 오프-타겟 부위는 인 실리코에서 탐색하였다. TALEN 타겟 부위와 가장 유사한 3개의 잠재적인 오프-타겟 부위를

선정하여 T7E1 분석을 수행함으로써 이들 부위에서의 오프-타겟 절단여부를 확인하였다.

도 9는 역위 및 반복 클론에서의 인간 ES 마커의 발현을 보여주는 그림이다. 야생형 iPSC 세포주(WT-iPSCepi3), 역위 클론(Inv 1) 및 반복 클론(Rev 1, 2 및 3)의 Oct4, Sox2 및 Lin28 mRNA 수준을 정량적 PCR (qPCR)로 측정하였다. GAPDH mRNA를 표준화에 사용하였다.

도 10은 역위 및 반복 클론의 인 비트로 분화를 보여주는 그림이다. 마커 단백질의 발현은 각각 역위 클론(상단) 및 반복 클론(하단)에서의 외배엽(β III-튜불린), 중배엽[α -SMA(α -smooth muscle actin)] 및 내배엽[AFP (α -feto단백질) 및 HNF3 β]을 나타낸다(스케일 바, 50 μ m).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0068] **실시예**

[0069] **실험방법**

[0070] *플라스미드 인코딩 TALEN.*

[0071] 본 발명에서 이용되는 TALEN 플라스미드는 원-스탑 Golden-Gate 어셈블리를 위해 구축된 TAL 이펙터 어레이 플라스미드를 이용하여 종래에 보고된 방법으로 합성하였다(12). 각각의 TALEN 플라스미드는 RVD 모듈의 어레이인 AvrBs3의 N-말단 135 아미노산, 4개의 RVD halfrepeats 중의 하나, 그리고 Sharkey FokI 도메인을 인코딩한다(45). TALEN 사이트는 F8 유전자의 1번 인트론 상동체를 타겟팅하도록 설계되었다; 잠재적인 오프-타겟 사이트는 종래 보고된 방법에 따라 동정하였다(12).

[0072] *A형 혈우병 환자로부터 지놈 DNA의 분리.*

[0073] 서울대학교 연구윤리 심의위원회의 승인 하에 A형 혈우병 환자의 혈액 세포를 분석하였다. 혈액 시료는 한국 혈우재단에서 제공받았으며, 지놈 DNA는 종래에 보고된 방법으로 분리하였다(24).

[0074] *타겟팅된 역위의 빈도 측정.*

[0075] 타겟팅된 역위의 빈도를 디지털 PCR 분석을 통해 종래에 보고된 방법으로 측정하였다(23). TALEN 플라스미드로 형질전환된 세포에서 분리한 지놈 DNA 시료를 순차적으로 희석하고, 희석한 시료에 대해 적절한 프라이머를 사용하여 nested PCR을 수행하였다(표 1). 각 희석 시점에서의 양성 밴드의 분절을 카운팅하였고, 결과를 Extreme Limiting Dilution Analysis 프로그램을 이용하여 분석하였다(46).

표 1

본 발명에서 사용된 프라이머

[0076]

프라이머 명칭	서열(5' to 3')	사용된 실험
homolog 1-1F	AAATCACCCAAGGAAGCACA	Inversion and Reversion
homolog 1-1R	TGGCATTAACGTATTACTTGGAGA	Inversion and Reversion
homolog 2-2F	GGCAGGGATCTTGTGGTAAA	Inversion and Reversion
homolog 2-2R	TGCTGAGCTAGCAGGTTTAATG	Inversion and Reversion
GAPDH-F	CCCCTCAAGGCATCCTGGGCTA	qPCR and RT-PCR
GAPDH-R	GAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA	qPCR and RT-PCR
Oct4-F	CCTCACTTCACTGCACTGTA	qPCR
Oct4-R	CAGGTTTCTTCCCTAGCT	qPCR
Sox2-F	CCCAGCAGACTTCACATGT	qPCR
Sox2-R	CCTCCATTCCCTCGTTTT	qPCR

<i>Lin28-F</i>	AGCCAAGCCACTACATTC	qPCR
<i>Lin28-R</i>	AGATACGTCATTTCGCACA	qPCR
<i>Nanog-F</i>	TGAACCTCAGCTACAAACAG	qPCR
<i>Nanog-R</i>	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG	qPCR
<i>F8-F</i>	CTGCTTTAGTGCCACCAGAAGA	RT-PCR
<i>F8-R</i>	GACTGACAGGATGGGAAGCC	RT-PCR
<i>FOXA2-F</i>	CTACGCCAACATGAACTCCA	RT-PCR
<i>FOXA2-R</i>	AAGGGGAAGAGGTCATGAT	RT-PCR
<i>Sox17-F</i>	AGCGCCCTTCACGTGTACTA	RT-PCR
<i>Sox17-R</i>	CTTGACACGAAGTGCAGAT	RT-PCR
<i>GAPDH-F</i>	GAACATCATCCCTGCCTCTACTG	iPS generation (PCR)
<i>GAPDH-R</i>	CAGGAAATGAGCTTGACAAAGTGG	iPS generation (PCR)
<i>EBNA-1-F</i>	ATGGACGAGGACGGGAAGA	iPS generation (PCR)
<i>EBNA-1-R</i>	GCCAATGCAACTGGACGTT	iPS generation (PCR)
293-F	GAGCAGGGAGGCAAGAATTA	TALENs activity screening
293-R	TGAGGGAAAACGCATCTAGG	TALENs activity screening

[0077] 세포 배양

[0078] HEK 293T/17(ATCC; CRL-11268) 및 성인 HDFs(Invitrogen; C-004-5C)를 FBS(10% vol/vol) 및 항생제(1%)가 보충된 DMEM에서 배양하였다. WiCell에서 구입한 인간 ESC(hESC) 세포주(H9), 레트로바이러스-유래 야생형 iPSCs(iPSC1), 및 본 발명에서 제작한 iPSC는 20%(vol/vol) 녹아웃 혈청 대체물(Invitrogen), 4.5 g/L L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 0.1 mM 2-머캅토에탄올 및 4 ng/mL bFGF(basic fibroblast growth factor, PeproTech)가 보충된 DMEM/F12 배지로 구성된 hESC 배양액에서 종래에 보고된 방법대로 유지하였다(47, 48).

[0079] HEK 293T 세포에서 F8 좌위를 타겟팅하는 TALEN의 확인

[0080] 본 발명에서 설계된 TALEN의 유전자-조작 활성을 확인하기 위하여, 각각의 TALEN 쌍을 HEK 293T 세포에 형질전환하고, 이들의 활성을 T7E1 분석을 통해 측정하였다(10). F8 좌위를 타겟팅하는 TALEN에 의해 유도된 역위의 빈도를 측정하기 위하여, HEK 293T/17 세포를 80% 킨플루언시로 씨딩하고 이후 리포팩타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 TALEN-인코딩 플라스미드로 형질전환하였다. 지놈 DNA 시료를 분리하고 종래 보고된 방법으로 PCR 분석을 하여 염색체 역위를 확인하였다(23).

[0081] iPSC의 제작 및 세 개의 배엽으로의 인 비트로 분화

[0082] 특정 리프로그래밍 인자를 인코딩하는 에피솜 벡터를 보고된 방법에 따라 사용하였다(49). 요약하면, 10% FBS가 보충된 DMEM에서 자란 HDF를 미세천공 시스템(Neon; Invitrogen)을 통해 제조사의 설명서에 따라 에피솜 벡터(총 3 µg)를 전기천공하였다. 1,650볼트 전압으로 10분간 3회 펄스를 가한 뒤, 세포를 DMEM(10% FBS 포함)에서 추가로 배양하였다. 형질전환 7일 뒤, 세포를 피더 층으로 옮겼다. hESC와 유사한 형태를 보이는 iPSC 콜로니를 기계장치로 집어들려 특성분석을 위해 더 배양하였다.

[0083] iPSC는 인 비트로에서 공지의 방법을 이용하여 세 개의 배엽으로 분화시켰다(50, 51). IV형 콜라게나아제(Invitrogen)를 통해 부분적으로 iPSC를 분리시킴으로써 형성된 배아체(Embryoid bodies, EBs)를 초저흡착 플레이트(Ultralow attachment plate, Corning)으로 옮기고 20%(vol/vol) 녹아웃 혈청(Invitrogen), 4.5 g/L L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 0.1 mM 2-머캅토에탄올 및 5% FBS가 보충된 DMEM/F12 (1:1) 배지에서 배양하였다. 상기 조건에서 1주일 간 배양 후, EB를 매트릭셀-코팅 디쉬에 부착시키고 10일간 더 배양하였다. EB가 세가지 배엽을 대표하는 세포로 자발적으로 분화되는지 여부는 적절한 항체를 이용한 면역염색을 통해 조사하였다.

[0084] iPSC의 분화.

[0085] 종래 보고된 방법에 따라 iPSC를 내배엽 계열로 분화시켰다(52). 요약하면, iPSC 콜로니를 mTeSR-1 hESC 성장 배지(StemCell Technology)에서 무 지지세포 환경(feeder free)으로 배양하였다. 확실한 내배엽 세포를 수득

하기 위해 미분화 iPSC를 100 ng/mL 액티빈 A(PeproTech) 및 5 μM 포스파티딜이노시톨 3-카이네이즈 억제제(LY-294002; Sigma)가 보충된 RPMI/B27 (RPMI-1640는 Sigma, B27은 Invitrogen에서 구입) 배지에서 5일 간 배양하였다. 내배엽으로 분화된 세포를 채집하여 총 RNA를 분리하고, cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다.

[0086] 종래 보고된 방법을 조금 변형하여 iPSC를 내배엽 상피 세포로 분화시켰다(54). 요약하면, EB를 20 ng/mL BMP4(bone morphogenic protein 4, R&D Systems) 및 10 ng/mL 액티빈 A(PeproTech)가 보충된 hESC 배지에서 배양하고, EB 형성 3일 후에 EB를 매트릭셀-코팅된 디쉬에 부착시킨 후 10일간 100 ng/mL VEGF(PeproTech) 및 50 ng/mL basic FGF(R&D Systems)가 보충된 배지에서 상피 세포로의 분화를 유도하였다.

[0087] *iPSC의 역위 및 복구 유도를 위한 TALEN 형질전환*

[0088] IV형 콜라겐을 처리함으로써 배양된 iPSC를 수집하였다. PBS로 세척한 뒤, 세포를 Accutase(Invitrogen)로 추가적으로 처리하여 단일세포 부유물을 생성하였다(55). 이들 단일 세포는 TALEN-인코딩 플라스미드(5 μg의 각각의 플라스미드)와 혼합하여 850 전압으로 30분 동안 펄스를 가하였다. 이후 세포를 피더 세포에 세포를 씨앗하고 10일간 배양하였다. 지놈 역위 또는 복구를 검출하기 위하여, 각각의 콜로니에서 얻은 세포를 라이시스 완충액[프로티네이즈 K를 함유하는 1× Ex-taq 완충액(pH 8.0)]에서 3시간 동안 56°C에서 파쇄하였다. 프로티네이즈 K를 불활성화한 뒤, 2 μL 지놈 DNA 용액을 Ex-taq DNA 중합효소(Takara) 및 특이적 프라이머를 이용하여 PCR을 하였다. PCR 산물은 아가로스젤 전기영동으로 분석하였으며, 사용된 프라이머는 표 3에 표시하였다.

[0089] *세포의 클로날 퍼플레이션의 분리, PCR 분석 및 변곡점의 DNA 시퀀싱.*

[0090] 역위(또는 반복) 세포의 클로날 퍼플레이션을 분리하기 위하여, PCR을 통해 원하는 유전자 변형이 이루어진 것으로 동정된 각 콜로니를 공지된 방법을 통해 콜라게나아제 및 Accutase를 이용하여 단일 세포로 분리하고, 리플레이팅하였다. 세 번의 계대배양 후, 몇몇 클론(역위 6 클론 및 복구 4 클론)을 선정하여 시퀀싱 및 추가실험을 진행하였다. 서열 결정을 위하여, 증폭된 PCR 산물을 전기영동하고, Gel Extraction kit(SolGent)을 이용하여 아가로스젤에서 용출하고, pGEM-T 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 클로닝된 PCR 산물은 T7 프라이머를 이용하여 시퀀싱하였다.

[0091] *RNA 분리, RT-PCR 및 qPCR.*

[0092] TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 세포로부터 전체 RNA를 정제하였다. DiaStar cDNA 합성 키트(SolGent)을 이용하여 총 RNA(1 μg)로부터 cDNA를 합성하였다. Factor VIII, FOXA2, Sox17 및 GAPDH의 발현을 확인하기 위하여, 합성된 cDNA를 주형으로 Ex-Taq (Takara)를 이용하여 PCR을 수행하였다. qPCR을 위하여, 제조사의 설명서에 따라 SYBR Premix Ex-Taq (Takara)을 사용하였다. RT-PCR 또는 qPCR을 위한 특이적 프라이머는 표 3에 나열하였다.

[0093] *알칼린 포스파타아제 염색 및 면역염색*

[0094] 백혈구 알칼린 포스파타아제 염색 키트(Sigma)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 알칼린 포스파타아제 활성을 측정하였다. 다능성 줄기세포 마커 염색을 위해, 세포를 4% 포름알데히드 용액에 고정시키고 0.2% Triton X-100로 투과화시켰다. PBS로 세척한 뒤, 세포를 5% 정상고트 혈청 및 2% BSA를 포함하는 PBS 용액에서 배양하였다. 이후 세포를 1차 항체와 함께 2시간 동안 상온에서 배양하고, PBS로 세척한 뒤, 상온에서 1시간 동안 형광-접합 2차 항체(Alexa Fluor 488 or 594; Invitrogen)와 함께 배양하였다. 핵을 시각화하기 위해 세포를 DAPI(Vector Laboratories)를 포함하는 안티페이드 마운팅 배지에 마운팅하였다. 이미지를 캡처하여 Olympus IX71 현미경 또는 FSX 시스템을 통해 분석하였다.

[0095] *DNA 지문분석 및 핵형 분석.*

[0096] iPSC 세포주의 피부 섬유아세포 기원을 확인하기 위하여, Gene-Analysis Institute of Human Pass Inc.에서

PCR-기반 STR(short tandem repeat) 분석을 수행하였다. 요약하면, iPSC 세포주 및 이들의 부모세포로부터 분리된 지놈서 PCR-료로부터 AmpFISTR PCR 시스템(Applied Biosystems)을 이용하여 STR 좌위를 증폭하였다. 증폭 산물은 ABI PRISM 3130XLSTR P분석기 및 Genemapper(Version 3.2; Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다. 핵형 조사를 위해, 염색체를 Giemsa로 염색하여 G-밴딩 분석을 하였으며, 분석에는 Chromosome Image Processing System을 사용하였다.

[0097] 통계적 분석

[0098] 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 통계적 분석에 스튜던트 t 검정을 적용하였으며, P<0.05인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다.

[0099] 실험결과

[0100] 인간 iPSCs의 제작 및 특성분석.

[0101] 네가지 Yamanaka 인자를 인코딩하는 에피솜 백터를 전기천공하여 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDFs)로부터 야생형 iPSCs를 수득하였다. 배아줄기세포(ESC)-유사 콜로니는 형질전환된 세포를 피더 세포층에 리플레이팅한 후 10일 뒤에 나타났다. 알칼린 포스파타아제 활성을 가지는 총 8개의 콜로니(Epi1-Epi8로 명명)를 선정하였다(도 1a 및 1b). 7 또는 8 계대 후 이들 클론에 에피솜 백터가 존재하지 않음을 확인하기 위하여, 백터 내 EBNA-1 서열에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다. 하나의 클론(Epi1)만이 EBNA-1 서열을 함유하였으며, 이에 이후 분석에서 제외되었다(도 1c). 다음으로, 두 개의 iPSC 세포주(Epi3 및 Epi8)의 핵형을 확인하였으며, 도 6a에서 보는 바와 같이 이들은 정상적인 핵형을 가졌다. 이들 iPSC가 부모 HDF로부터 유래한 것인지를 확인하기 위하여 DNA 지문 분석을 수행하였다(표 2). 이러한 초기 특성분석 후, 본 발명자들은 Epi3 세포주를 추가 실험의 대상으로 선정하였다.

표 2

[0102] iPS 세포주에 대한 STR(short tandem repeat) 분석

좌위/세포주	HDF	Epi3	Epi4	Epi8
D8S1179	11 15	11 15	11 15	11 15
D21S11	29 30	29 30	29 30	29 30
D7S820	10 11	10 11	10 11	10 11
CSF1PO	11 13	11 13	11 13	11 13
D3S1358	16 18	16 18	16 18	16 18
TH01	8 9	8 9	8 9	8 9
D13S317	8 10	8 10	8 10	8 10
D16S539	9 13	9 13	9 13	9 13
D2S1338	20 23	20 23	20 23	20 23
D19S433	13 14	13 14	13 14	13 14
vWA	14 18	14 18	14 18	14 18
TPOX	8 11	8 11	8 11	8 11
D18S51	14 24	14 24	14 24	14 24
D5S818	12 12	12 12	12 12	12 12
FGA	23 26	23 26	23 26	23 26

[0103] 이 iPSC 세포주는 OCT4, NANOG, SSEA-4 및 TRA-1-60와 같은 전형적인 ESC 마커 단백질을 발현하였다(도 1d 및 도 6b). RT-PCR 및 정량적 PCR(qPCR) 분석결과 인간 ESC 세포주인 H9보다 Epi3 세포주에서 다능성 마커 유전자 고발현됨을 알 수 있었다(도 1e 및 1f). 다음으로, Epi3 세포주의 분화 능력을 조사하였다. 배아체를 수득하여 젤라틴-코팅 배양접시에 부착시켜 인 비트로에서 3개의 배엽으로 자발적으로 분화되도록 하였다. 예상대로, 외배엽(Nestin 및 Pax6), 중배엽[α -SMA(α -smooth muscle actin) 및 Brachyury] 및 내배엽[AFP(α -feto단백질) 및 HNF3 β (hepatocyte nuclear factor 3- β)] 계열의 마커 단백질들이 분화된 세포에서 발현되었다(도 1g 및 도 6c). 이들 데이터는 성인 HDF로부터 유래된 Epi3 세포주가 다능성을 가짐을 보여준다.

[0104] TALEN 쌍을 이용한 iPSCs의 F8 좌위의 타겟팅된 역위.

[0105] 역위(역위)와 같은 구조 변이(Structural variations, SVs)는 A형 혈우병을 포함하는 유전적 질환과 관련이 있다(25). 거의 절반에 달하는 중증 A형 혈우병은 X-연관 F8 유전자를 손상시키는 두 개의 서로 다른 역위에 의해 유발된다. 이들 역위는 1번 인트론(중증 A형 혈우병의 1-4%) 또는 22번 인트론(중증 A형 혈우병의 약 50%) 내의 서열을 포함하는 비대립성 HR(nonallelic HR, NAHR) 및 이들의 상응하는 상동 서열(각각 1번 또는 2번 인트론 역위로 명명)로부터 발생한다(3, 4). 본 발명자들은 1번 인트론 역위에 초점을 맞추어 1번 인트론 상동체를 타겟으로 하는 11쌍의 TALEN을 구축하였다(도 2a). 이들 TALEN의 유전자 조작 활성을 T7E1(T7 endonuclease I) 분석을 이용하여 HEK 293T 세포를 통해 시험하였다(10) (도 2b). 타겟 부위에서 33%의 빈도로 돌연변이를 유도하여 가장 활성이 높은 TALEN 쌍(TALEN 01이라 명명)을 선정하였다. 상기 TALEN은 1.9%의 빈도로 HEK 293T 세포에서 1번 인트론 상동체를 포함하는 140-kb 역위를 유도하였다(도 7). 다음으로, 본 발명자들은 상기 TALEN이 상동성이 높은 부위에서 오프-타겟 효과를 보이는지를 조사한 결과, T7E1 분석을 통해 이들 부위에서 오프-타겟 돌연변이가 검출되지 않음을 확인하였다(도 8 및 표 3).

표 3

[0106] TALEN 01의 잠재적인 오프-타겟 부위

염색체 번호	유전자 명칭	Left-half 사이트 (5' to 3')	스페이서(bp)	Right-half 사이트 (5' to 3')
chr .9	N/A	TATAGATTGCCAtTtTCTC	13	TAAAaTATAaGAAAaGtTtT
chr .14	PRKDI	TgTAGATTGGtCAGtGtCTC	12	aAAAGcAaAcTcAAAaCTGT
chr .4	N/A	TtTtGATTGGCCAGcCTCTC	12	aAAAGaAaAcTGAAAaCaGa

[0107] 이후 본 발명자들은 혈우병 모델 세포주를 제작하기 위하여 동일한 TALEN 쌍을 이용하여 iPSC에서 140-kb 역위를 유도하였다. 야생형 iPSC에 TALEN 플라스미드를 전기천공하여 10일 간 배양함으로써 콜로니를 형성시켰다. 역위를 검출할 수 있는 특이적 프라이머를 이용하여 각 콜로니에서 분리된 지놈 DNA 시료에 대한 PCR을 수행하였다. 432개 중 6개 콜로니(1.4%, HEK 293 세포에 필적)가 두 개의 역위 변곡점 연결부(breakpoint junction)에서 양성 PCR 밴드를 나타냈다. 4개의 콜로니를 추가적으로 배양하여 단일세포 클론을 만들었다. 이들 클론은 140-kb 역위의 진단기준이 되는 PCR 밴드를 형성하였으나, 야생형의 유전자형에 해당하는 PCR 밴드를 생성하지는 않았다(도 3a). 다음으로, 본 발명자들은 이들 PCR 산물을 클로닝하여 DNA 서열을 조사함으로써 역위 유전자형을 확인하였다. TALEN의 타겟 부위에서 indel(삽입 혹은 삭제)은 발견되지 않았으며(도 3b), 이는 1번 또는 2번 인트론 유사체에서 TALEN에 의해 유도된 단일 DSB가 무오류(error-free) NAHR를 통해 DNA 역위를 촉발하였음을 시사한다. 그러나, TALEN이 인트론 상동체 1에서 하나, 상동체 2에서 또 하나로 총 2개의 DSB를 생성하고 이들 DSB가 2차 돌연변이를 남기지 않은 채 NHEJ에 의해 끊어진 사이사이로 결합하였을 가능성을 배제할 수 없다.

[0108] iPSC 시스템에서의 역위 분절의 타겟팅된 역위.

[0109] 앞선 연구에서, 본 발명자들은 ZFN 쌍을 이용하여 HEK 293 세포의 1번 인트론 상동체를 포함하는 타겟팅된 염색체 역위를 유도하여 역위를 가지는 이형접합 클론을 분리한 바 있다(24). 그러나, HEK 293 세포는 F8 유전자를 발현하지 않으며 세포치료에 사용될 수 없다. 나아가, HEK 293 세포는 세 카피의 X 염색체를 가진다. 이러한 한계는 역위 부위를 복구하여 F8 유전자의 발현을 회복시킴으로써 치료적 적용을 하려는 시도에 장애가 된다.

[0110] 본 발명자들은 혈우병 모델 iPSC 세포주의 역위 140-kbp 분절이 TALEN 쌍을 이용한 복구(reversion)에 의해 교정될 수 있는지를 조사하였다(TALEN 부위는 질환모델 세포주에서 완전히 보존된다). TALEN 플라스미드를 역위를 포함하는 두 개의 iPSC 클론(이하 “역위 클론”)에 형질전환하였고, 몇몇 콜로니로부터 분리한 지놈 DNA 시료에 대해 PCR 분석을 함으로써 반복 세포를 동정하고자 하였다. 본 발명자들은 총 300개의 콜로니를 스크리닝한 뒤 각각의 iPSC 클론으로부터 두 개의 반복 클론을 수득하였다. 따라서, 복구 빈도는 1.3% (300 중 4)

였으며, 이는 역위 빈도와 동일하다. PCR 분석을 통해 이들 반복 클론의 유전자형이 야생형으로 복구된 유전자형과 일치함을 알 수 있었다: 이들 클론의 시료에서는 역위 특이적 PCR 밴드는 검출되지 않았다(도 4a). 이후 상동체 1 및 2를 포함하는 이들 PCR 산물을 클로닝하고 시퀀싱하였다. 두 클론에는 추가적인 돌연변이가 없었으나, 나머지 두 클론에는 상동체 1 및 2 모두에서 두 TALEN 부위에 2-bp 삭제가 일어났다(도 4b). 이러한 결과는 중증 A형 혈우병에서 나타나는 역위 유전자형이 질환 모델을 생성하는 데 사용된 것과 동일한 TALEN 쌍을 이용하여 교정될 수 있음을 보여준다.

[0111] 뿐만 아니라, 본 발명자들은 인간 ES 마커를 발현하는지 및 이들이 3가지 1차 배엽으로 분화하는 능력을 가지는지를 확인함으로써 역위 클론 및 반복 클론이 여전히 다능성 세포로 남아있는지를 조사하였다. 이들 클론은 줄기세포 마커를 야생형 iPSC에 필적하는 수준으로 발현하였으며(도 1f 및 S4), 인 비트로에서 3개의 배엽으로 분화하였다(도 10). 이러한 결과는 TALEN-매개 유전체 공학이 iPSC의 다능성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 보여준다.

[0112]

반복 iPSC로부터 분화된 세포에서의 F8 유전자 발현.

[0113]

[0114] F8 유전자는 각각 내배엽 및 중배엽에서 유래하는 간세포 및 상피 세포에서 발현된다(26-29). 우선, 본 발명자들은 F8 유전자가 야생형 및 반복 iPSC 클론에서 유래하는 내배엽 세포에서 발현될 수 있는지를 조사하였다. iPSC를 내배엽으로 분화시킨 후 RT-PCR 분석하여 F8 mRNA를 측정하는 결과, 예상대로 F8 mRNA가 야생형 및 반복 iPSC 클론으로부터 분화된 세포에서 검출되었다(도 5a). 반면, 역위를 가지는 iPSC로부터 분화된 세포에서는 야생형 및 반복 iPSC 만큼 효율적으로 내배엽으로 분화되었음에도 불구하고 F8 mRNA는 검출되지 않았다. 다음으로, F8 단백질의 주 생산원인 상피 세포에서의 F8 단백질 발현을 조사하였다(28). iPSC를 상피 세포로 분화시킨 뒤 F8 단백질 검출을 위한 면역염색을 수행하였다. 예상대로, 야생형 및 반복 iPSC 클론에서 분화된 세포는 F8 단백질을 발현하였다(도 5b). 그러나, 역위 클론에서 분화된 세포는 이들 iPSC가 성공적으로 상피 세포로 분화하였음이 성숙 상피세포 표지 단백질인 von Willebrand 인자의 발현을 통해 확인되었음에도 F8 단백질을 발현하지 않았다. 이러한 결과는 F8 유전자의 보전성이 반복 iPSC에서 유지됨을 입증하는 것이다.

[0115] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0116] **참고문헌**

[0117] 1. Graw J, et al. (2005) Haemophilia A: From mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 6(6):488-501.

[0118] 2. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ (2003) Haemophilias A and B. *Lancet* 361(9371):1801-1809.

[0119] 3. Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 5(3):236-241.

[0120] 4. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F (1993) Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 2(11):1773-1778.

[0121] 5. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F (2002) Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 99(1):168-174.

[0122] 6. Nathwani AC, et al. (2011) Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365(25):2357-2365.

[0123] 7. Porteus MH, Baltimore D (2003) Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300(5620):763.

[0124] 8. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003) Enhancing gene targeting with designed zinc

finger nucleases. *Science* 300(5620):764.

- [0125] 9. Urnov FD, et al. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435(7042):646-651.
- [0126] 10. Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS (2009) Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res* 19(7): 1279-1288.
- [0127] 11. Miller JC, et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29(2):143-148.
- [0128] 12. Kim Y, et al. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol* 31(3):251-258.
- [0129] 13. Kim YK, et al. (2013) TALEN-based knockout library for human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 20(12):1458-1464.
- [0130] 14. Cho SW, Lee J, Carroll D, Kim JS, Lee J (2013) Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics* 195(3):1177-1180.
- [0131] 15. Sung YH, et al. (2014) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA guided endonucleases. *Genome Res* 24(1):125131.
- [0132] 16. Cho SW, et al. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24(1):132-141.
- [0133] 17. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31(3):230-232.
- [0134] 18. Cong L, et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121):819-823.
- [0135] 19. Hwang WY, et al. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31(3):227-229.
- [0136] 20. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31(3):233-239.
- [0137] 21. Mali P, et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121):823-826.
- [0138] 22. Lee HJ, Kim E, Kim JS (2010) Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res* 20(1):81-89.
- [0139] 23. Kim S, Lee HJ, Kim E, Kim JS (2010) Analysis of targeted chromosomal deletions induced by zinc finger nucleases. *Cold Spring Harb Protoc* 10.1101/pdb.prot5477.
- [0140] 24. Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS (2012) Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res* 22(3): 539-548.
- [0141] 25. Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7(2):85-97.
- [0142] 26. Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T (1985) Ultrastructural localization
[0143] of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature*
[0144] 317(6039):729-730.
- [0145] 27. Hollestelle MJ, et al. (2001) Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo
- [0146] 28. Shahani T, et al. (2010) Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood* 115(23):4902-4909.
- [0147] 29. Terraube V, O' 'Donnell JS, Jenkins PV (2010) Factor VIII and von Willebrand factor interaction:

Biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 16(1):3-13.

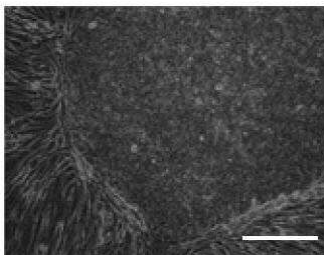
- [0148] 30. Iafrate AJ, et al. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9):949-951.
- [0149] 31. Redon R, et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118):444-454.
- [0150] 32. Stankiewicz P, Lupski JR (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 61:437-455.
- [0151] 33. Carlson DF, et al. (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(43):17382-17387.
- [0152] 34. Gupta A, et al. (2013) Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome Res* 23(6):1008-1017.
- [0153] 35. Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15(5):321-334.
- [0154] 36. Kim S, Lee MJ, Kim H, Kang M, Kim JS (2011) Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat Methods* 8(1):7.
- [0155] 37. Kim E, et al. (2012) Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res* 22(7):1327-1333.
- [0156] 38. Kim Y, Kweon J, Kim JS (2013) TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nat Methods* 10(3):185.
- [0157] 39. Sung YH, et al. (2013) Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 31(1):23-24.
- [0158] 40. Kim H, et al. (2011) Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat Methods* 8(11):941-943.
- [0159] 41. Kim H, et al. (2013) Magnetic separation and antibiotics selection enable enrichment of cells with ZFN/TALEN-induced mutations. *PLoS ONE* 8(2):e56476.
- [0160] 42. Ramakrishna S, et al. (2014) Surrogate reporter-based enrichment of cells containing RNA-guided Cas9 nuclease-induced mutations. *Nat Commun* 5:3378.
- [0161] 43. Nikiforova MN, et al. (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 290(5489):138-141.
- [0162] 44. Bondeson ML, et al. (1995) Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 4(4):615-621.
- [0163] 45. Guo J, Gaj T, Barbas CF, 3rd (2010) Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol* 400(1):96-107.
- [0164] 46. Hu Y, Smyth GK (2009) ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* 347(1-2):70-78.
- [0165] 47. Kim DS, et al. (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* 6(2):270-281.
- [0166] 48. Jang J, et al. (2012) Disease-specific induced pluripotent stem cells: A platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med* 44(3):202-213.
- [0167] 49. Okita K, et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409-412.
- [0168] 50. Sugii S, et al. (2010) Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction

of pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 107(8): 3558-3563.

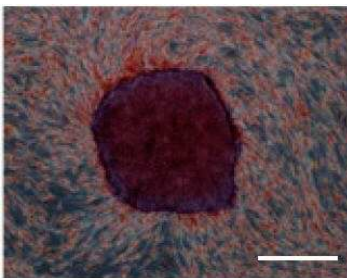
- [0169] 51. Jang J, et al. (2011) Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. Ann Neurol 70(3):402-409.
- [0170] 52. Si-Tayeb K, et al. (2010) Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology 51(1):297-305.
- [0171] 53. Jia F, et al. (2010) A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. Nat Methods 7(3):197-199.
- [0172] 54. Yoo CH, et al. (2013) Endothelial progenitor cells from human dental pulp-derived iPS cells as a therapeutic target for ischemic vascular diseases. Biomaterials 34(33):8149-8160.
- [0173] 55. Desbordes SC, et al. (2008) High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell 2(6):602-612.

도면

도면1a



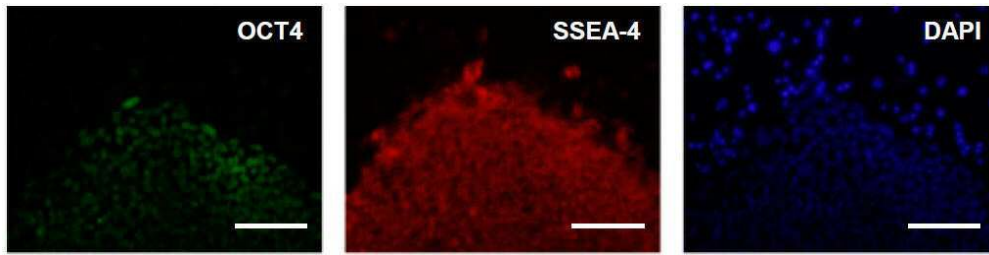
도면1b



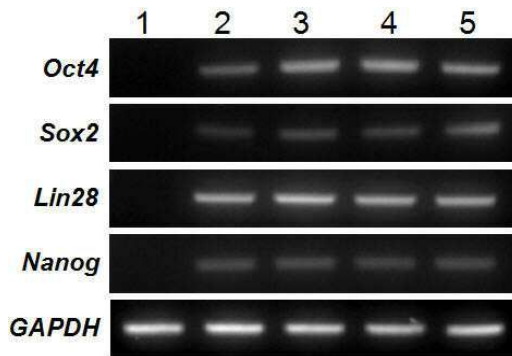
도면1c



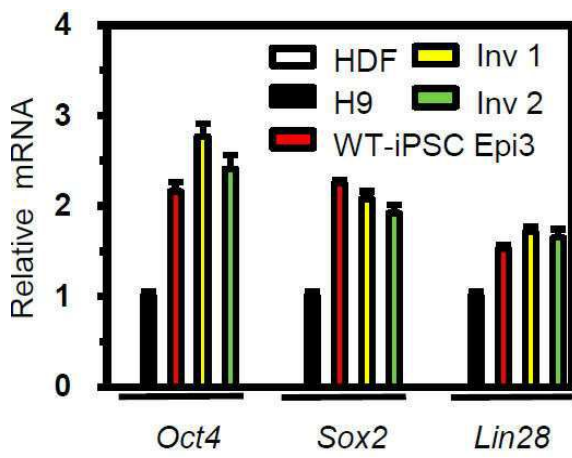
도면1d



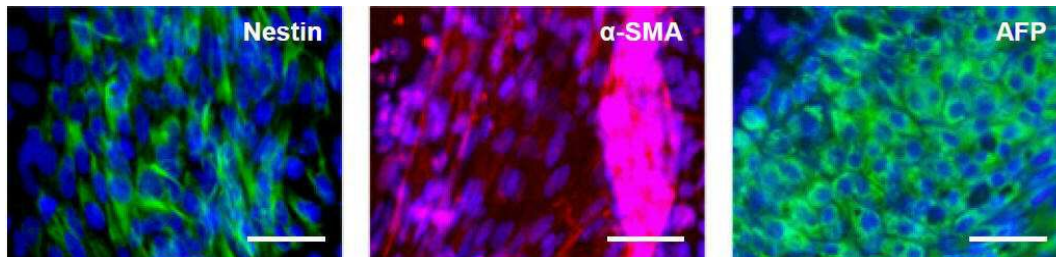
도면1e



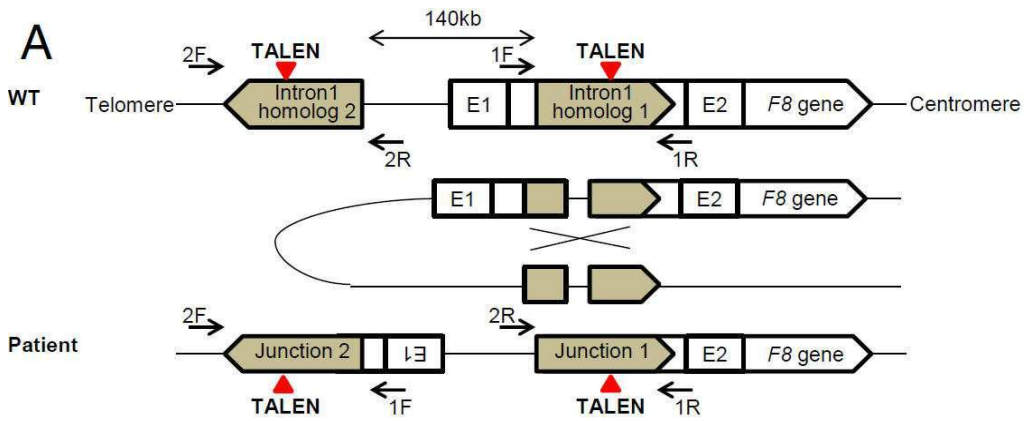
도면1f



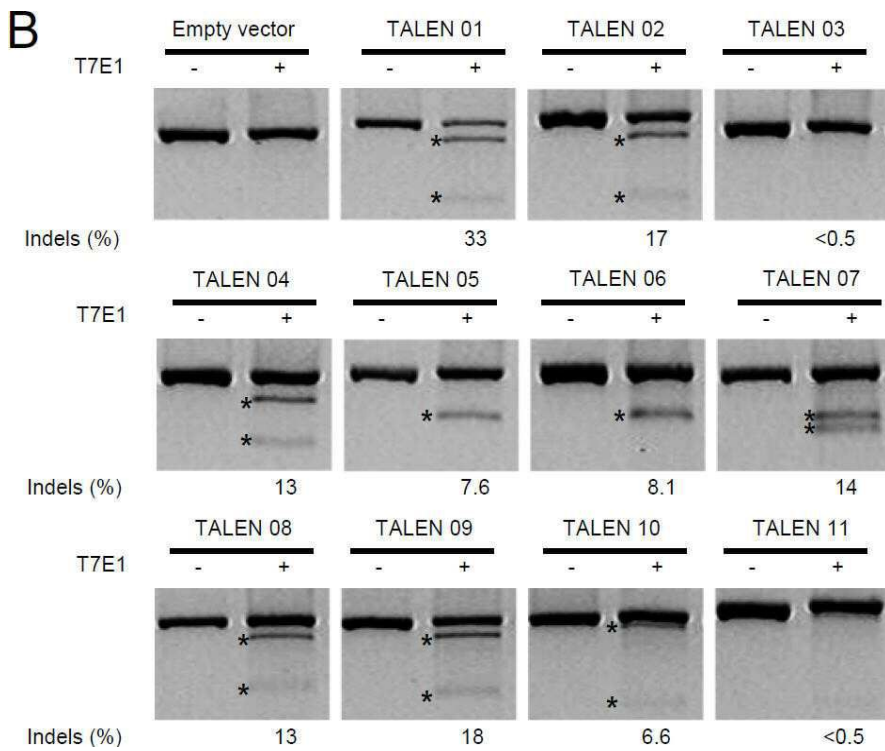
도면1g



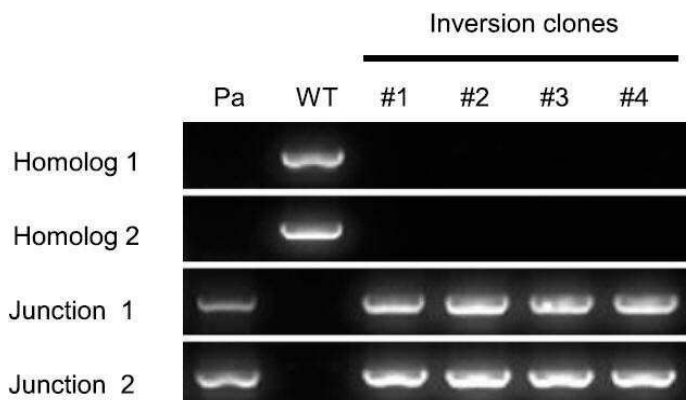
도면2a



도면2b



도면3a



도면3b

TALEN target site (Homolog 1)

WT ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...

Breakpoint Junction 1

Clone 1 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 2 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 3 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 4 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...

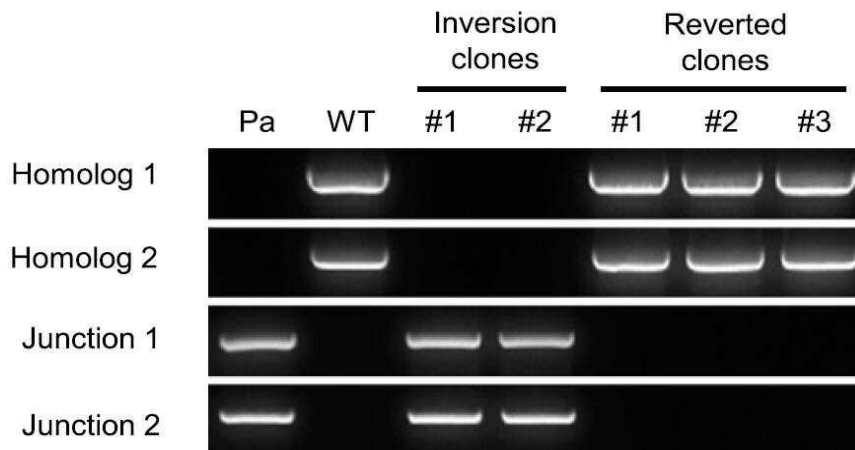
TALEN target site (Homolog 2)

WT acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...

Breakpoint Junction 2

Clone 1 acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 2 acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 3 acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 4 acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...

도면4a



도면4b

TALEN target site (Junction 1)

Inversion

Clone 1 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...

Reverted

Homolog 1 (Breakpoint)

Clone 1 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggac--acaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 2 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggac--acaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 3 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...
 Clone 4 ...caTAAAGTATAATGAAAAC**TGT**tggacacacaagGAGAGACTGGCCAATCTATAgt...

TALEN target site (Junction 2)

Inversion

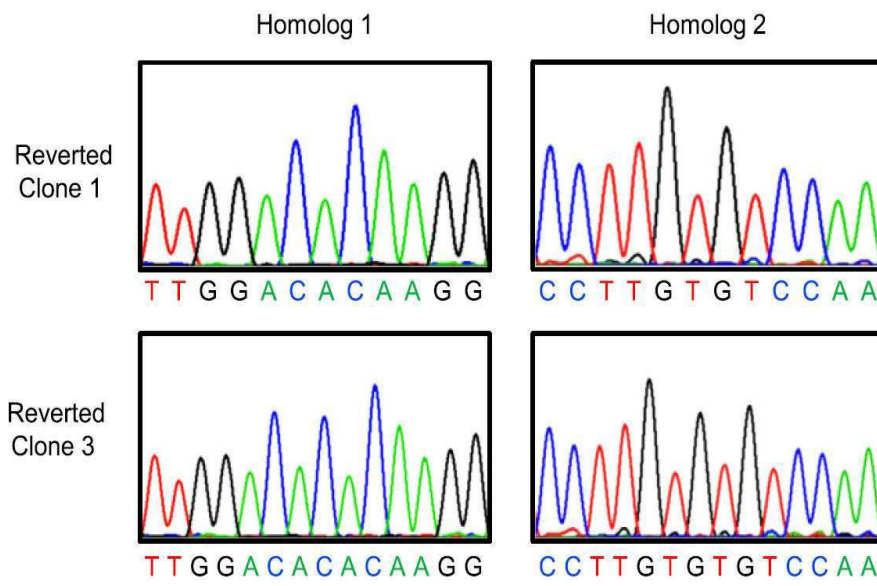
Clone 1 ...acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...

Reverted

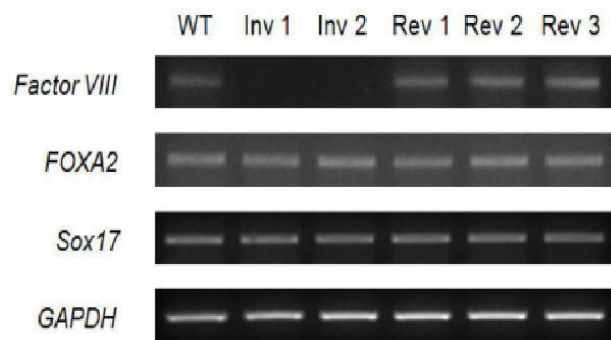
Homolog 2 (Breakpoint)

Clone 1 ...acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgt--gtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 2 ...acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgt--gtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 3 ...acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...
 Clone 4 ...acTATAGATTGGCCAGTCTCTCcttgtgtgtccaACAGTTTTTCATTATACTTTATgt...

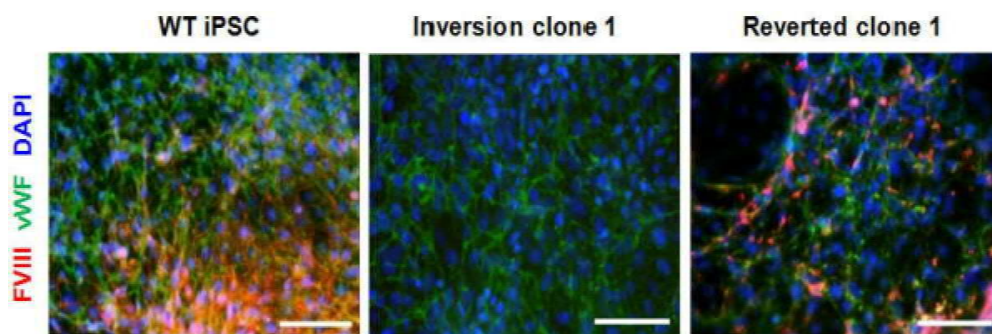
도면4c



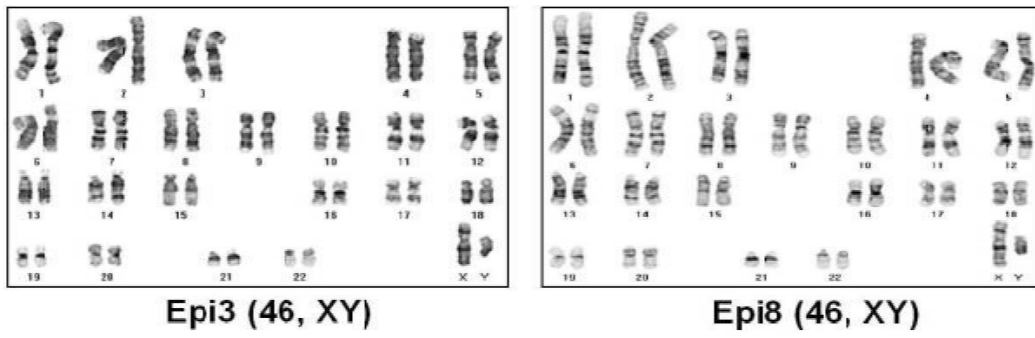
도면5a



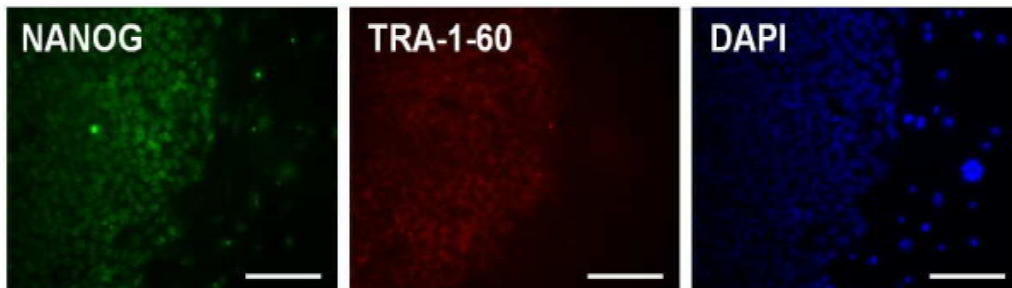
도면5b



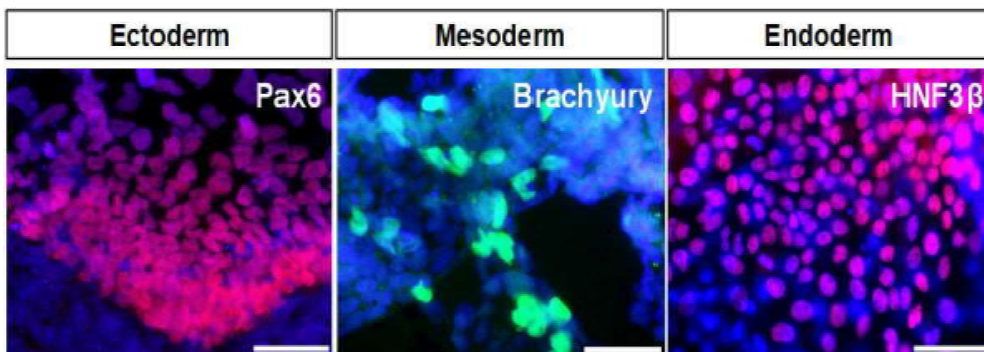
도면6a



도면6b



도면6c



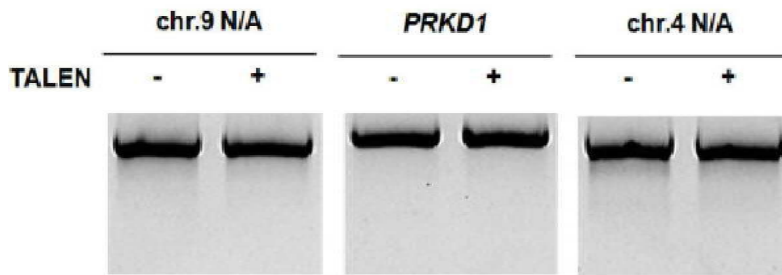
도면7a



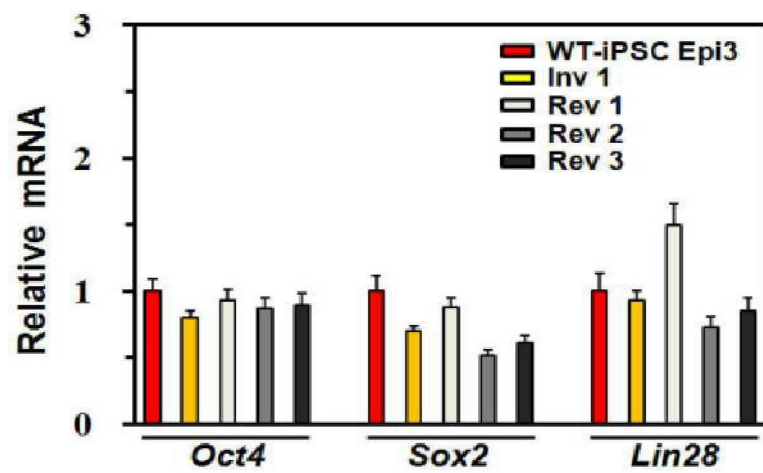
도면7b

Nucleases	Frequency (%)		
	Estimate	Upper limits	Lower limits
ZFN-224	5	7	3
Z10	0.25	0.4	0.2
TALEN 01	1.9	2.8	1.2

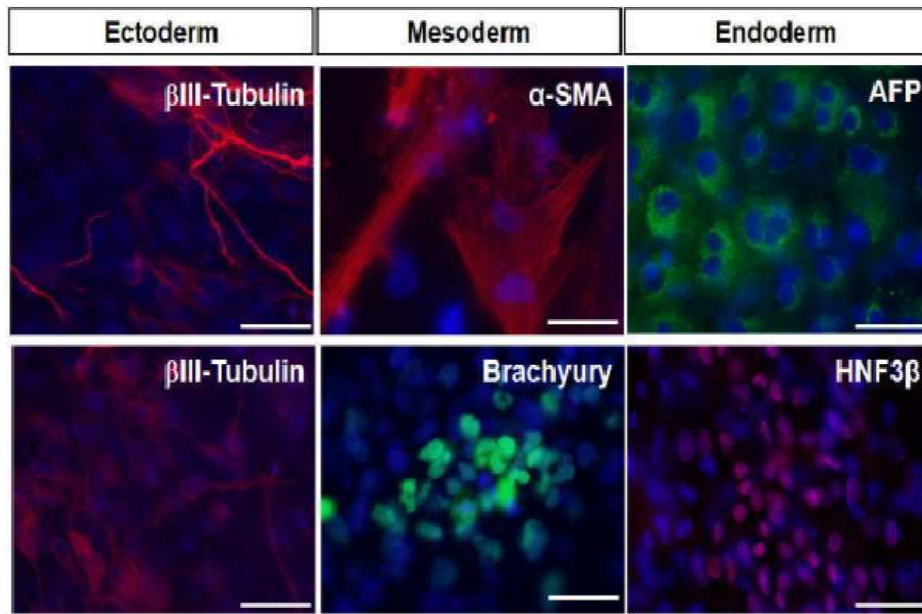
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Industry Academia Cooperation Foundation Yonsei University

<120> Endonuclease for Targeting blood coagulation factor 8 and
Composition for Treating Hemophilia Comprising the Same

<130> PN140653

<160> 31

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

taaagtataa tgaaaactgt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

gagagactgg ccaatctata 20

<210> 3

<211> 650

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> left TAL effector

<400> 3

Leu Asn Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

1 5 10 15

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

20 25 30

Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

35 40 45

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

50 55 60

Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala

65 70 75 80

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

85 90 95

Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala

100 105 110

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

115 120 125

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val

130 135 140

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

145 150 155 160

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

165 170 175

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

180 185 190

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

195 200 205

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

210 215 220

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 225 230 235 240
 Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 245 250 255
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp
 260 265 270

 His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 290 295 300
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 305 310 315 320
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 325 330 335
 Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala
 340 345 350
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 355 360 365
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala
 370 375 380
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 385 390 395 400
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val
 405 410 415

 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 420 425 430
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Ala
 435 440 445
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 450 455 460
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 465 470 475 480

Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala

485 490 495

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly

500 505 510

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

515 520 525

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

530 535 540

His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

545 550 555 560

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

565 570 575

Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

580 585 590

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

595 600 605

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

610 615 620

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu

625 630 635 640

Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu

645 650

<210> 4

<211> 648

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> right TAL effector

<400> 4

Leu Asn Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

1 5 10 15

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 275 280 285
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 290 295 300
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 305 310 315 320

 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 325 330 335
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala
 340 345 350
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 355 360 365
 Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala
 370 375 380
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

 385 390 395 400
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val
 405 410 415
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 420 425 430
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Ala
 435 440 445
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 450 455 460

 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
 485 490 495
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 500 505 510
 Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 515 520 525

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

530 535 540

His Gly Leu Thr Pro Ala Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

545 550 555 560

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

565 570 575

Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

580 585 590

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

595 600 605

Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

610 615 620

Ser Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg

625 630 635 640

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu

645

<210> 5

<211> 1041

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

cagttgtcag tatgtgaaca atgttgaaa catgttattt tgtctgattt cctttgggag 60

aattcattgc cagctataaa tctgtggaaa cgctgccaca caatcttagc acacaagatt 120

ggcagaaaat cgcttagaaa cactgaaaac atgtgacaaa gtgctttccg tgaaaagggt 180

ggatgcgaag cagtaaggac ccccttcatg aagcacgagg tcaccctca gccaccagaa 240

ccagaggaac gctgtggtaa ctgagggaaa acgcatctag gcacacgtca cgggtggcacc 300

ttccagcagg tccccgggtg tgtgccctg gagctctgac aaagagtgtg gcccggaat 360

gtgatgtttg gactgcaagt tttggtgaga aataacaatg catcaggttg cagacaaagc 420

agaccctgct ctgtgcgttt atgggagccg cgcccaacag gaaccacagg gaatgatcga 480

aaggagaggg acggacacaa acagacacac cagagagagg ttctcaggag gaggctctgt 540

ggcctccaga ccacgtcaaa gcccaaggcag aaaggatgaa ctgaggaaag gaggaaaatt 600

tccccttaag gaaggtaaaa tccagaaggg atccctaaaa tggtagcag tttaaccta 660
 gcagttttgc attaattcac ataaagtata atgaaaactg ttggacacac aaggagagac 720
 tggccaatct atagtcacag aggaagacct tcacaccct tcacaggatc tcgcagcaga 780
 ttggctgaaa agtctccttg aaactgcaga cctctctcaa ggagaccac tgagttgggc 840
 aaagtgggg cgcacttaat tcttgctcc ctgctctccc acgtaccct gcatttact 900
 ccattccagg gtttctggga cacccgagaa agcacgtagt ccaggagca cgtctgcaa 960

ctgaaggcct tgacaaatga ctttctgtac tggctgaggg ccagggccca gcgtactgat 1020
 aaggaagctc ttccagaaaa a 1041

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> homolog 1-1F

<400> 6
 aaatcaccca aggaagcaca 20

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> homolog 1-1R

<400> 7
 tggcattaac gtattacttg gaga 24

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> homolog 2-2F

<400> 8
 ggcaggatc ttgttgtaa a 21

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> homolog 2-2R
 <400> 9
 tgctgagcta gcaggtttaa tg 22
 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-F
 <400> 10
 cccctcaagg gcatcctggg cta 23

 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-R
 <400> 11
 gaggtccacc accctgttgc tgta 24
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oct4-F
 <400> 12
 cctcacttca ctgcactgta 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oct4-R
 <400> 13
 caggttttct ttcctagct 20

 <210> 14
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sox2-F
 <400> 14
 cccagcagac ttcacatgt 19
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sox2-R
 <400> 15
 cctcccattt cctcgtttt 20
 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lin28-F
 <400> 16
 agccaagcca ctacattc 18

 <210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lin28-R
 <400> 17
 agatacgtca ttgcaca 18
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nanog-F
 <400> 18
 tgaacctcag ctacaaacag 20
 <210> 19

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nanog-R
 <400> 19
 tggtagtagg aagagtaaag 20

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F8-F
 <400> 20
 ctgcttagt gccaccagaa ga 22

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F8-R
 <400> 21
 gactgacagg atgggaagcc 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOXA2-F
 <400> 22
 ctacccaac atgaactcca 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOXA2-R
 <400> 23

aaggggaaga ggtccatgat	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sox17-F	
<400> 24	
agcgccttc acgtgtacta	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sox17-R	
<400> 25	
cttgcacacg aagtgcagat	20
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH-F for iPSC generation	
<400> 26	
gaacatcctc cctgcctcta ctg	23
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH-R for iPSC generation	
<400> 27	
caggaaatga gcttgacaaa gtgg	24
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> EBNA-1-F

<400> 28

atggacgagg acggggaaga 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EBNA-1-R

<400> 29

gccaatgcaa cttggacgtt 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 293-F

<400> 30

gagcaggag gcaagaatta 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 293-R

<400> 31

tgaggaaaa cgcacttagg 20