

명세서

발명의 명칭: 저산소 환경 하에서 높은 적응력을 가지는 세포 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 저산소 조건에서 높은 적응력을 갖는 세포 및 이의 제조 방법 및 상기 세포를 유효성분으로 함유하는 세포치료제에 관한 것이다. 최근 배아줄기세포, 성체줄기세포 등의 줄기세포를 다양한 세포로 분화시킴으로써, 세포치료법(cell therapy)으로서의 활용 가능성에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 다분화능이 있는 배아줄기세포는 다양한 세포로 분화됨으로써 세포치료제로 주목되었지만 배아줄기세포를 활용함에 있어 윤리적인 문제점 때문에 실질적으로 세포치료로 사용하기에 어려움을 가지고 있다. 이러한 윤리적인 문제점을 회피하기 위하여 성체줄기세포를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[2]

배경기술

- [3] 저산소환경에서 놓인 세포에서는 생존하기 위하여 HIF1(Hypoxia- Inducible Factor 1) 단백질의 발현이 많이 된다는 사실이 알려져있다. HIF1 단백질이란 저산소 환경에서 혈관신생(angiogenesis, vascularization), 에너지대사(energy metabolism) 등에 관여하여 세포가 생존할 수 있는 환경을 만드는 역할을 하는 유전자의 전사조절인자(transcriptional regulator)로서, 서브 유닛으로 HIF1 α 및 HIF1 β 가 있다. HIF1 α 및 HIF1 β 는 각각 HIF1A 및 HIF1B 유전자에 의하여 암호화된다.

- [4] [선행기술문헌]

- [5] Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes Dev. 2001;15(20):2675-2686. doi:10.1101/gad.924501.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 명세서에서는 저산소 환경 하에서 높은 적응력을 가지는 세포를 제공하고자 한다.
- [8] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물을 제공하고자 한다.
- [9] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작 방법을 제공하고자 한다.
- [10] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 용도를

제공하고자 한다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 명세서에서는 다음을 포함하는 조작된 세포를 제공한다: HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및 PAI1로 이뤄진 군에서 선택된 야생형 유전자 내에 인텔을 가지는, 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자, 이때, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 상기 야생형 유전자의 서열과 다르고, 상기 조작된 세포 내에서, 상기 야생형 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현수준은 야생형 세포에 비해 더 낮은 것을 특징으로 하고, 상기 조작된 세포 내에서, HIF α 의 발현 수준은 상기 야생형 세포에 비해 더 높은 것을 특징으로 함.
- [13] 일 실시예로, 상기 조작된 세포가 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 HIF1AN 유전자 내의 인텔은 상기 HIF1AN 유전자의 엑손 1 영역 내에 위치하고, 상기 조작된 세포가 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 HIF3A 유전자 내의 인텔은 상기 HIF3A 유전자의, 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 및 엑손 6으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역 내에 위치하고, 상기 조작된 세포가 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 PHD2 유전자 내의 인텔은 상기 PHD2 유전자의 엑손 1 영역 내에 위치하고, 상기 조작된 세포가 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 TLR4 유전자 내의 인텔은 상기 TLR4 유전자의, 엑손 1, 엑손 2, 및 엑손 3으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역 내에 위치하고, 상기 조작된 세포가 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 PAI1 유전자 내의 인텔은 상기 PAI1 유전자의 엑손 2 영역 내에 위치하는 조작된 세포를 제공한다.
- [14] 일 실시예로, 상기 조작된 세포가 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 9로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 조작된 세포가 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 10 내지 34로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 조작된 세포가 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 35 내지 38로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 조작된 세포가 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 39 내지 59로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 조작된 세포가 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은

서열번호 60 내지 71로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는, 조작된 세포를 제공한다.

- [15] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 조작된 세포를 제공한다.
- [16] 일 실시예로, 상기 HIF1AN 유전자 내의 인텔은 HIF1AN 유전자의 엑손 1 내에 위치하는 조작된 세포를 제공한다.
- [17] 일 실시예로, 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 9로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 조작된 세포를 제공한다.
- [18] 일 실시예로, 상기 조작된 세포 내의 FIH-1의 발현 수준은 상기 야생형 세포 내의 FIH-1 발현 수준의 70%보다 낮은, 조작된 세포를 제공한다.
- [19] 일 실시예로, 상기 조작된 세포가 분비하는 VEGF 및 IL-8의 분비 수준은 상기 야생형 세포가 분비하는 상기 VEGF 및 IL-8의 수준보다 높은, 조작된 세포를 제공한다.
- [20] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 조작된 세포를 제공한다.
- [21] 일 실시예로, 상기 HIF3A 유전자 내의 인텔은 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 및 엑손 6으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역에 위치하는, 조작된 세포를 제공한다.
- [22] 일 실시예로, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 10 내지 34로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 조작된 세포를 제공한다.
- [23] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 조작된 세포를 제공한다.
- [24] 일 실시예로, 상기 PHD2 유전자 내의 인텔은 상기 PHD2 유전자의 엑손 1 영역에 위치하는, 조작된 세포를 제공한다.
- [25] 일 실시예로, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 35 내지 38로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 조작된 세포를 제공한다.
- [26] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 조작된 세포를 제공한다.
- [27] 일 실시예로, 상기 TLR4 유전자 내의 인텔은 엑손 1, 엑손 2, 및 엑손 3으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역에 위치하는, 조작된 세포를 제공한다.
- [28] 일 실시예로, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 39 내지 59로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 조작된 세포를 제공한다.
- [29] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 조작된 세포를 제공한다.
- [30] 일 실시예로, 상기 PAI1 유전자 내의 인텔은 상기 PAI1 유전자의 엑손 2 영역에

위치하는, 조작된 세포를 제공한다.

- [31] 일 실시예로, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 서열번호 60 내지 71로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 조작된 세포를 제공한다.
- [32] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 골수, 지방 조직, 탭줄, 태반, 양수, 및 제대혈로 이뤄진 군에서 선택된 조직 유래의 중간엽 줄기세포인 조작된 세포를 제공한다.
- [33] 일 실시예로, 상기 조작된 세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포인 조작된 세포를 제공한다.
- [34] 본 명세서에서는 다음을 포함하는 조작된 세포를 제공한다: 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자, 엔지니어링 된 HIF3A 유전자, 엔지니어링 된 PHD2 유전자, 엔지니어링 된 TLR4 유전자, 및 엔지니어링 된 PAI1 유전자로 이뤄진 군에서 선택된 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자, 이때, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 9에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자의 서열은 서열번호 10 내지 34에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자의 서열은 서열번호 35 내지 38에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자의 서열은 서열번호 39 내지 59에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않고, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자의 서열은 서열번호 60 내지 71에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않음.
- [35] 본 명세서에서는 다음을 포함하는 유전자 편집용 조성물을 제공한다: 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 또는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA; 및 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA, 이때, 상기 가이드 RNA는 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열을 가짐.
- [36] 일 실시예로, 상기 조성물은 상기 Cas9 단백질 및 상기 가이드 RNA를 리보뉴클레오프로테인(RNP) 형태로 포함하는 유전자 편집용 조성물을 제공한다.
- [37] 일 실시예로, 상기 조성물은 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA 및 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA를 단일 벡터 형태로 포함하는 유전자 조작용 조성물을 제공한다.
- [38] 일 실시예로, 상기 단일 벡터는 플라스미드, AAV 등으로 이뤄진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 유전자 편집용 조성물을 제공한다.
- [39] 본 명세서에서는 세포 내 유전자를 편집하는 방법으로, 다음을 포함하는 방법을 제공한다: 유전자 조작용 조성물을 세포 내로 도입하는 것, 이때, 상기 유전자 조작용 조성물은 다음을 포함함: 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 또는 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA; 및 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA,

이때, 상기 가이드 RNA는 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열을 가짐.

[40] 일 실시예로, 상기 조성물은 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA 및 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA를 벡터 형태로 포함하는, 세포 내 유전자를 편집하는 방법을 제공한다.

[41] 본 명세서에서는 세포 내에서 표적 DNA를 포함하는 유전자를 편집하기 위한 방법으로, 다음을 포함하는 방법을 제공한다: CRISPR/Cas9 복합체를 상기 표적 DNA를 포함하는 유전자에 접촉시키는 것, 이때, 상기 CRISPR/Cas9 복합체는 다음을 포함함: 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질; 및 상기 표적 DNA를 표적하는 가이드 RNA, 이때, 상기 가이드 RNA는 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열을 가짐.

[42]

발명의 효과

[43] 본 명세서에서는 저산소 환경 하에서 높은 적응력을 가지는 세포, 및 이의 제조 방법이 제공된다. 상기 저산소 환경 하에서 높은 적응력을 가지는 세포는 저산소 환경에서 높은 적응력 및 생존율을 보이므로, 상기 세포를 세포 치료제 용도로 사용하는 데 적합하다.

[44]

도면의 간단한 설명

[45] 도 1은 hHIF3A 유전자의 뉴클레오타이드 서열 일부를 타겟으로 하는 유전자 조작용 조성물을 처리한 뒤, 유전자 조작 여부를 확인한 실험데이터이다.

구체적으로, 가이드 핵산을 달리한 때 인델(InDel) 발생비율을 확인한 것이다.

[46] 도 2은 hTLR4 유전자의 뉴클레오타이드 서열 일부를 타겟으로 하는 유전자 조작용 조성물을 처리한 뒤, 유전자 조작 여부를 확인한 실험데이터이다.

구체적으로, 가이드 핵산을 달리한 때 인델(InDel) 발생비율을 확인한 것이다.

[47] 도 3은 hPAI1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 일부를 타겟으로 하는 유전자 조작용 조성물을 처리한 뒤, 유전자 조작 여부를 확인한 실험데이터이다.

구체적으로, 가이드 핵산을 달리한 때 인델(InDel) 발생비율을 확인한 것이다.

[48] 도 4은 hHIF1AN 유전자의 뉴클레오타이드 서열 일부를 타겟으로 하는 유전자 조작용 조성물을 처리한 뒤, 유전자 조작 여부를 확인한 실험데이터이다.

구체적으로, 가이드 핵산을 달리한 때 인델(InDel) 발생비율을 확인한 것이다.

[49] 도 5은 hPHD2 유전자의 뉴클레오타이드 서열 일부를 타겟으로 하는 유전자 조작용 조성물을 처리한 뒤, 유전자 조작 여부를 확인한 실험데이터이다.

구체적으로, 가이드 핵산을 달리한 때 인델(InDel) 발생비율을 확인한 것이다.

[50] 도 6 및 도 10은 유전자 조작용 조성물을 MSC에 처리한 뒤, Miseq를 통해 본 실험에 적합한 세포를 스크리닝 한 것이다.

[51] 도 7 내지 도9, 및 도 11 내지 도 13은 각각 도 6 및 도 10에서 Miseq를 통해

- 선별된 세포 내에서 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 비교한 자료이다.
- [52] 도 14는 hHIF1AN 유전자 조작용 조성물을 MSC에 처리한 뒤, deep sequencing을 통해 본 실험에 적합한 세포를 스크리닝 한 것이다.
- [53] 도 15는 도 10에서 deep sequencing을 통해 선별된 세포 내에서 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 비교한 자료이다.
- [54] 도 16은 저산소의 상황에서 흔히 발생하는 산화적 스트레스(Reactive-Oxygen stress)로부터 MSC의 증식 능력 변화를 측정한 자료로서, CCK8 assay를 통해 생존 세포의 수를 측정한 자료이다.
- [55] 도 17은 저산소의 상황에서 흔히 발생하는 산화적 스트레스(Reactive-Oxygen stress)로부터 MSC의 증식 능력 변화를 측정한 자료로서, hHIF1AN 유전자가 녹아웃 된 MSC와 대조군 MSC의 살아있는 세포의 수를 H₂O₂의 농도가 0uM일 때와 500uM 일때 각각 측정한 데이터이다.
- [56] 도 18은 실험예에 따라 중간엽 줄기세포의 HIF1AN 유전자를 조작한 후, 딥시퀀싱으로 인텔 효율, 및 Out-of-frame 비율을 비교한 그래프이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, SHS231 KO는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포, AAVS1은 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 SHS231 KO 및 AAVS1은 컨트롤로 사용되었다.
- [57] 도 19는 실험예에 따라 중간엽 줄기세포의 HIF1AN 유전자를 조작한 후, qRT-PCR로 HIF1AN mRNA 발현 수준을 비교한 그래프이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, SHS231 KO는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포, AAVS1은 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 SHS231 KO 및 AAVS1은 컨트롤로 사용되었다.
- [58] 도 20은 실험예에 따라 제조한 HIF1AN 유전자를 조작한 중간엽 줄기세포의 SNAP (Reactive nitrogen species)에 대한 생존능을 CCK-8 assay로 확인한 결과를 나타낸다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포를 나타낸다.
- [59] 도 21 내지 도 22는 실험예에 따라 제조한 HIF1AN 유전자를 조작한 중간엽 줄기세포의 특징을 확인하기 위해 BrdU 세포 증식 분석을 수행한 결과이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, SHS231 KO는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 SHS231 KO는 컨트롤로 사용되었다.
- [60] 도 23 내지 도 25는 실험예에 따라 제조한 HIF1AN 유전자를 조작한 중간엽 줄기세포의 MSC marker를 확인하기 위해 FACS 분석을 수행한 결과이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, SHS231 KO는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 SHS231 KO는 컨트롤로 사용되었다.
- [61] 도 26 내지 도 27은 각각 실험예에 따라 제조한 HIF1AN 유전자를 조작한

중간엽 줄기세포의 PDL (Population Doubling Level) 및 PDT(Population Doubling Time)을 측정한 결과이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, SHS231 KO는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포, AAVS1은 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 SHS231 KO 및 AAVS1은 컨트롤로 사용되었다.

- [62] 도 28는 실험예에 따라 제조한 HIF1AN 유전자를 조작한 중간엽 줄기세포의 배양배지 내 Cytokine 분비량을 비교한 결과이다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, AAVS1은 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 AAVS1은 컨트롤로 사용되었다.
- [63] 도 29 내지 도 30은 실험예의 결과 재현성을 확인하기 위하여 새로운 MSC Stock에서 실험예 3의 실험을 수행한 결과를 나타낸다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, Mock H₂O₂ 300μM+는 유전자 조작되지 않은 세포에 H₂O₂ 300μM를 첨가하여 산화적 스트레스 상황을 유발한 것, HIF1AN KO는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, HIF1AN KO H₂O₂ 300μM+는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포에 H₂O₂ 300μM를 첨가하여 산화적 스트레스 상황을 유발한 것이다. A: HIF1AN mRNA 발현 수준을 비교한 그래프. B: Cytokine(VEGF 및 IL-8) mRNA 발현량을 비교한 그래프.
- [64] 도 31은 실험예 4-1의 Western blot 결과를 나타낸다. Mock은 유전자 조작되지 않은 세포, sgHIF1AN는 HIF1AN 유전자가 조작된 세포, sgAAVS1은 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포를 나타내며, 상기 sgAAVS1은 컨트롤로 사용되었다.

[65]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[66] 용어의 정의

[67] 약

[68] 본 명세서에서 사용되는 "약"이라는 용어는 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[69] A, T, C, G 및 U의 의미

[70] 본 명세서에서 사용되는 A, T, C, G 및 U 기호는 당업계 통상의 기술자가 이해하는 의미로 해석된다. 문맥 및 기술에 따라 DNA 또는 RNA 상에서 염기, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드로 적절히 해석될 수 있다. 예를 들어, 염기를 의미하는 경우는 각각 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G) 또는 우라실(U) 자체로 해석될 수 있고, 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 각각 아데노신(A), 티민(T), 시티딘(C), 구아노신(G) 또는 유리딘(U)으로 해석될 수 있으며, 서열에서 뉴클레오타이드를 의미하는 경우는 상기 각각의

뉴클레오사이드를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[71] 엔지니어링 된

[72] 본 명세서에서 사용되는 "엔지니어링 된"이란 용어는 자연계에 이미 존재하는 구성을 가진 물질, 분자 등과 구분하기 위해 사용하는 용어로, 상기 물질, 분자 등에 인위적인 변형이 가해진 것을 의미한다. 예를 들어, "엔지니어링 된 유전자"의 경우, 자연계에 존재하는 유전자의 구성에 인위적인 변형이 가해진 유전자를 의미한다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[73] 야생형의

[74] "야생형"은 자연적으로 발생하는 염기서열을 포함하는 유전자 및 그 유전자로부터 발현되는 단백질이 정상적인 기능적 특성을 지니는 것을 의미한다. 야생형 유전자는 집단에서 가장 빈번하게 관찰된다. 본 명세서에서 "야생형"이라는 용어가 인위적으로 조작된(엔지니어링 된) 유전자, 및/또는 세포와 대비해 사용된다면, 이는 인위적으로 조작된 유전자, 및/또는 세포와 상응하는 동종의 "인위적으로 조작되지 않은" 자연적으로 발생하는 염기서열을 포함하는 유전자 및 이를 가지는 세포를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[75] 넉아웃(knock-out)

[76] 본 명세서에서 사용되는 "넉아웃", 혹은 "넉아웃된 유전자"라는 표현은, 야생형 유전자가 발현하는 단백질을 전사 및/또는 번역 과정을 거쳐 생성하지 못하는 것을 의미한다. 예를 들어, 넉아웃된 유전자 A를 포함하는 세포는 야생형 유전자 A에 의해 발현되는 mRNA 및/또는 단백질을 발현하지 못하는 것일 수 있다. 넉아웃된 A 유전자를 포함하는 세포란 세포 내 존재하는 유전자 A 중 하나만 넉아웃된 것일 수 있고, 두 개 이상 넉아웃된 것일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[77] 넉다운(knock-down)

[78] 본 명세서에서 사용되는 "넉다운", 혹은 "넉다운된 유전자"라는 표현은, 야생형 유전자보다 적은 양으로 물질을 발현하는 것을 의미한다. 예를 들어, 넉다운된 유전자 A를 포함하는 세포는 야생형 유전자 A에 의해 발현되는 mRNA보다 적은 양의 mRNA를 발현하는 것일 수 있다. A 유전자가 넉다운된 세포란 세포 내 존재하는 유전자 A 중 하나만 넉다운된 것일 수 있고, 두 개 이상 넉다운된 것일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[79] 발현 수준(expression level)

[80] 본 명세서에서 사용되는 "발현 수준"이라는 용어는, 특정 유전자로부터 발현된

산물, 예를 들어 mRNA 및/또는 단백질이 얼마나 잘 발현되는지를 의미한다. 일반적으로 세포 내 특정 유전자의 발현 수준이 높은 경우, 세포 내에 포함된 상기 특정 유전자로부터 발현된 mRNA 및/또는 특정 단백질의 양, 또는 세포질 내 상기 발현 산물의 농도가 높은 것으로 나타난다. 반대로 세포 내 특정 유전자의 발현 수준이 낮은 경우, 세포 내에 포함된 상기 특정 유전자로부터 발현된 mRNA 및/또는 특정 단백질의 양, 또는 세포질 내 상기 발현 산물의 농도가 낮은 것으로 나타난다. 본 명세서에서 "발현 수준이 높다" 혹은 "발현 수준이 낮다"고 쓰는 경우, 비교 대상이 달리 명시되지 않는 한, 그 비교 대상은 동종의, 야생형의 세포라고 해석할 수 있다. 또한, 비교 기준이 되는 정량적인 지표는 문맥 상 가장 적합한 것으로 해석되어야 한다. 예를 들어, 각 세포의 절대량, 상대량, 및/또는 농도가 비교 기준이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 제1 세포 내에서 a 유전자의 발현 수준이, 제2 세포 내에서 a 유전자의 발현 수준보다 높다고 표현하는 경우, 제1 세포 내의 a 유전자의 발현 산물(mRNA, 단백질 등)이 제2 세포 내의 a 유전자의 발현 산물보다 절대량이 더 많거나, 상대량이 더 많거나, 및/또는 농도가 더 높을 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

[81]

[82] 배경기술 - 저산소환경 하 세포의 생존에 영향을 미치는 인자[83] HIF1 단백질

[84] 저산소환경에서 놓인 세포는 생존하기 위하여 다량의 HIF1(Hypoxia- Inducible Factor 1) 단백질을 발현한다는 사실이 알려져 있다. HIF1 단백질이란 저산소 환경에서 혈관신생(angiogenesis, vascularization), 에너지대사(energy metabolism) 등에 관여하여 세포가 생존할 수 있는 환경을 만드는 역할을 유전자의 전사조절인자(transcriptional regulator)로서, 서브 유닛으로 HIF1 α 및 HIF1 β 가 있다. HIF1 α 및 HIF1 β 는 각각 HIF1A 및 HIF1B 유전자에 의하여 암호화된다. 따라서, 저산소 환경 하 세포가 생존하기 위해서는, HIF1 단백질, 또는 그 서브 유닛들의 발현 수준이 높거나, 그 활성이 높게 유지되어야 한다.

[85] HIF1 단백질 기능을 저해하는 인자 - FIH1

[86] FIH-1은 HIF1AN 유전자에 의하여 암호화된 단백질이고 HIF1 α 의 post-translational control에 관여하는 단백질이다. 보다 구체적으로 FIH-1은 Asparaginyl hydroxylase이다. FIH-1은 HIF1 α 와 핵수용체활성화인자인 p300/CBP 사이에 상호작용하는 것을 방해함으로써 HIF1의 활성을 감소시키는 역할을 한다. 또한, FIH-1은 HIF1 α 가 합성된 이후, 상기 HIF1 α 가 세포 내에서 분해(degradation)되도록 유도 하는 역할을 한다. 심지어 FIH-1는 심한 저산소(severe hypoxia) 환경 하에서도 작동하므로 저산소환경하에서 세포의 생존과 직결된 단백질에 해당한다.

- [87] HIF1 단백질 기능을 저해하는 인자 - PHD2
- [88] PHD2는 FIH-1과 함께 HIF1 α 의 post-translational control에 관여하는 단백질이다. 보다 구체적으로, PHD2는 Prolyl hydroxylase이다. PHD2는 HIF1 α 가 합성된 이후, 상기 HIF1 α 가 세포 내에서 분해(degradation)되도록 유도 하는 역할을 한다.
- [89] HIF1 단백질 기능을 저해하는 인자 - HIF3A
- [90] HIF3A는 HIF1 α 의 transcription control에 관여하는 단백질로, HIF1 α 유전자의 전사(transcription)를 방해하는 역할을 한다.
- [91] 기타 저산소환경 하 세포의 생존에 영향을 미치는 인자
- [92] TLR4는 상처에 대한 선천성 면역 반응(innate immune response)에 관여하는 인자로 알려져 있다. 저산소 환경 하, 활성화 된 TLR4는 pro-apoptotic signaling을 유도하는 기능을 하며, 결과적으로 세포 사멸(apoptosis)을 유도한다. PAI1은 중간엽 줄기세포(MSC)의 세포 외 기질 부착(extracellular matrix attachment)을 억제하는(negatively regulate) 인자이다. 상기 PAI1은 저산소 환경 하 발현이 증가되는 것으로 알려져 있고, 줄기세포의 자가이식 생존율(Autograft survival)에 영향을 미치는 것으로 알려졌다.
- [93]
- [94] 배경기술 - CRISPR/Cas 시스템
- [95] 개관
- [96] CRISPR/Cas 시스템은 원핵생물 유기체에서 발견되는 면역 시스템의 일종이며, Cas 단백질, 및 가이드 RNA를 포함한다. Cas 단백질, 또는 가이드 RNA의 자세한 구성에 대해서는 공개문헌인 WO2018/231018(국제공개번호)에 자세히 설명되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 "Cas 단백질"이라는 용어는 CRISPR/Cas 시스템에서 이용되는 것으로 해석될 수 있는 뉴클레이즈(nuclease)를 총칭하는 용어이다. 다만, 설명의 편의를 위해, 이하에서는 가장 일반적으로 쓰이는 CRISPR/Cas9 시스템의 DNA 절단 과정을 예를 들어 간략히 설명한다.
- [97] Cas9 단백질
- [98] CRISPR/Cas9 복합체에서, 핵산을 절단하는 뉴클레이즈(nuclease) 활성을 가지는 단백질을 Cas9 단백질이라 한다. 상기 Cas9 단백질은 CRISPR/Cas 시스템 분류 상 Class 2, Type II에 해당하며, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*) 유래 Cas9 단백질 등이 있다. 이 중 연구 용도로 가장 일반적으로 쓰이는 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질이다.

- [99] 가이드 RNA
- [100] CRISPR/Cas9 복합체에서, 표적 핵산에 포함된 특정 서열을 인식하도록 CRISPR/Cas9 복합체를 유도하는 기능을 가지는 RNA를 가이드 RNA라 한다. 상기 가이드 RNA의 구성을 기능적으로 나눈다면 크게, 1) 스캐폴드 서열 부분, 및 2) 가이드 서열 부분으로 나눌 수 있다. 상기 스캐폴드 서열 부분은 Cas9 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas9 단백질과 결합하여 복합체를 이룰 수 있도록 하는 부분이다. 일반적으로, 상기 스캐폴드 서열 부분은 tracrRNA, crRNA 반복 서열 부분을 포함하며, 상기 스캐폴드 서열은 어떤 Cas9 단백질을 사용하느냐에 따라서 결정된다. 상기 가이드 서열 부분은, 표적 핵산 내 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열 부분과 상보적으로 결합할 수 있는 부분이다. 상기 가이드 서열 부분은 인위적으로 변형할 수 있는 염기 부분으로, 관심 있는 표적 뉴클레오타이드 서열에 의해 결정된다.
- [101] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하는 과정
- [102] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산에 접촉하여 Cas9 단백질이 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열을 인식하고, 가이드 RNA의 일부(상기 가이드 서열 부분)가 상기 PAM 서열과 인접한 부분과 상보적으로 결합하는 경우, CRISPR/Cas9 복합체에 의해 상기 표적 핵산이 절단된다.
- [103] 이때, Cas9 단백질이 인식하는 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열은 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM) 서열이라 하며, 이는 Cas9 단백질의 종류나 기원에 따라 결정되는 서열이다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질은 표적 핵산 내 5'-NGG-3' 서열을 인식할 수 있다. 이때, 상기 N은 상기 N은 아데노신(A), 티미딘(T), 사이티딘(C), 구아노신(G) 중 하나이다.
- [104] CRISPR/Cas9 복합체가 표적 핵산을 절단하기 위해서는 가이드 RNA의 가이드 서열 부분이 PAM 서열에 인접한 서열 부분과 상보적으로 결합해야 하므로, 상기 가이드 서열 부분은 표적 핵산의 서열, 구체적으로는 PAM 서열과 인접한 서열 부분에 맞추어 결정된다.
- [105] CRISPR/Cas9 복합체가 상기 표적 핵산을 절단할 때, 표적 핵산의 PAM 서열 부분 및/또는 상기 가이드 서열과 상보적으로 결합하는 서열 부분 내 임의의 위치가 절단되게 된다.
- [106] 표적 가닥, 비표적 가닥
- [107] CRISPR/Cas9 복합체는 이중가닥 DNA에 대한 절단 활성을 가진다. 상기 이중가닥 DNA에서, 상기 가이드 서열 부분과 결합하는 프로토스페이서(protospacer)가 있는 가닥을 표적 가닥(Target strand, TS)이라 한다. 상기 표적 가닥과는 상보적인 가닥으로, 상기 가이드 서열 부분과 결합하지 않는 프로토스페이서(protospacer)가 있는 가닥을 비표적 가닥(Non-target strand, NTS)라 한다. 상기 가이드 서열 부분은 이중가닥 DNA의 표적 가닥(TS)에 포함된 프로토스페이서 서열 부분과 상보적으로 결합할 수

있다. 상기 가이드 서열 및 이중가닥 DNA의 비표적 가닥(NTS)에 포함된 프로토스페이서 서열은 동등한(equivalent) 서열이다. 구체적으로, 가이드 서열은 RNA 서열이고, 비표적 가닥(NTS)에 포함된 프로토스페이서 서열은 이에 대응되는 DNA 서열이라는 차이가 있을 뿐이다.

[108]

[109] 종래 기술의 한계점

[110] 최근 질병의 치료, 진단, 및/또는 예방 등의 목적으로 세포 그 자체를 치료제로서 사용하는 이른바 "세포 치료제"가 많이 연구되고 있다. 세포 치료제로 사용되는 세포는 치료물질을 발현할 수 있는 세포 또는 본래 기능을 온전히 가지는 세포로, 이를 질병 부위, 또는 망가진 조직 또는 기관 부위에 직접 투여하여 해당 질병의 치료, 망가진 조직 또는 기관의 재생을 꾀한다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 세포 치료제로써 투여된 세포가 투여된 부위에서 오랜 기간 생존하여 정상적인 기능을 수행해야 한다. 그러나, 체외에서 치료 등을 위한 세포를 선별, 증식하여 세포 치료제를 만든 후, 이를 체내에 투여하는 경우, 상기 세포들이 체내 환경에 적응하지 못하고 빠른 시일 내에 사멸하는 문제가 있다. 세포가 사멸하는 이유는 i) 체외에서 배양되는 환경과 체내의 환경이 서로 다르거나, ii) 체내가 저산소환경(hypoxia)이거나, iii) 체내의 영양분이 부족하거나, iv) 투여된 세포가 체내의 ECM에 정착(attachment)하지 못하거나, v) 면역반응이 발생하기 때문이며, 그 중에서도 저산소환경에 의해 세포가 사멸되는 것이 대표적이다. 이러한 이유로, 종래에 사용되던 세포 치료제는 체내에서 충분한 생존 시간을 담보하지 못해 질병의 치료, 조직의 재생 등의 목적을 달성하기 힘든 문제가 있었다.

[111]

[112] 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포[113] 개관

[114] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 개시한다. 상기 세포는 세포 치료제 용도로 이용될 수 있는 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않는다. 상기 세포는 HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질을 발현하는 야생형의 유전자가 인위적으로 조작된 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 상기 세포는 HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질(negative regulator of HIF1 expression)의 발현량이 야생형의 세포보다 감소되어 있다. 결과적으로, 세포 내에서 유지되는 HIF1 단백질의 발현 수준 및/또는 활성 수준이 야생형의 세포보다 높다는 특징을 보인다. 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 저산소 환경 하 높은 적응력 또는 생존력을 가져 세포 치료제 용도에 적합하다는 특징을 가진다.

[115] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 조작된 세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 조작된 세포는 조작된 중간엽 줄기세포일 수 있다.

- [116] 일 구현예로, 상기 조작된 세포는 HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질을 발현하는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및 PAI1으로 이뤄진 군에서 선택된 야생형 유전자 내에 인델을 가지는, 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자를 가질 수 있다. 일 구현예로, 상기 조작된 세포 내에서, 상기 야생형 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 조작된 세포 내에서, 상기 HIF α 의 발현 수준은 야생형 세포에 비해 더 높을 수 있다.
- [117] 일 구현예로, 상기 조작된 세포는 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자, 엔지니어링 된 HIF3A 유전자, 엔지니어링 된 PHD2 유전자, 엔지니어링 된 TLR4 유전자, 및 엔지니어링 된 PAI1 유전자로 이뤄진 군에서 선택된 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자를 포함할 수 있다.
- [118] 세포의 종류
- [119] 일 구현예로, 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 체세포, 예를 들면 난구세포, 상피세포, 섬유아세포, 신경세포, 각질세포, 조혈세포, 멜라닌 세포, 연골세포, 마크로파지, 단구세포, 근육세포, B 림프구, T 림프구, 수지상세포, NK세포, 조절 T 세포, 생식세포, 배아 줄기세포, 신경 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 성체 줄기세포, 예를 들면 지방, 자궁, 골수, 간, 근육, 태반, 신경, 제대혈 또는 피부(상피) 등의 조직 유래 줄기세포, 및/또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC) 일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 중간엽 줄기세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 골수, 지방 조직, 태줄, 태반, 양수, 및/또는 제대혈 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [120] 세포의 유전자형 1 - 엔지니어링 대상 유전자
- [121] 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1 단백질의 전사, 발현, 및/또는 활성을 저해하는 물질을 발현하는 야생형 유전자가 인위적으로 편집된 것을 특징으로 한다. 달리 표현해, 상기 세포는 엔지니어링 된, HIF1 단백질의 전사, 발현, 및/또는 활성을 저해하는 물질을 발현하는 유전자를 포함한다.
- [122] 일 구현예로, 상기 인위적으로 편집된 야생형 유전자는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및/또는 PAI1 유전자일 수 있다. 이때, 상기 야생형 유전자는 인간 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 HIF1AN, 엔지니어링 된 HIF3A, 엔지니어링 된 PHD2, 엔지니어링 된 TLR4, 및/또는 엔지니어링 된 PAI1 유전자를 포함할 수 있다. 이때, 상기 엔지니어링 된 유전자의 서열은 이와 대응되는 야생형 유전자의 서열과 다르다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN의 서열은 야생형의 HIF1AN의 서열과 다르다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 HIF3A의 서열은 야생형의 HIF3A의 서열과 다르다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 PHD2의 서열은 야생형의 PHD2의 서열과 다르다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 TLR4의 서열은 야생형의 TLR4의 서열과 다르다. 구체적으로, 상기 엔지니어링 된 PAI1의

서열은 야생형의 PAI1의 서열과 다르다.

[123] 세포의 유전자형 2 - 엔지니어링 된 대상 유전자의 특징

[124] 상기 엔지니어링 된 유전자는 야생형의 유전자와 다른 서열을 가지는 것을 특징으로 한다. 상기 엔지니어링 된 유전자는 엔지니어링 되지 않은 야생형의 유전자가 발현하는 물질을 발현하지 못할 수 있다. 상기 엔지니어링 된 유전자는 야생형의 유전자가 발현되는 물질을 야생형의 유전자에 비해 더 적게 발현될 수 있다.

[125] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 유전자는 야생형의 유전자의 돌연변이(mutation) 형태일 수 있다. 이때, 상기 돌연변이 형태는 자연계에 이미 존재하는 돌연변이가 아닌, 인위적으로 생성된 돌연변이 일 수 있다.

[126] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 유전자는 이와 대응되는 야생형 유전자가 킥아웃(knock-out) 된 것일 수 있다.

[127] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 유전자는 이와 대응되는 야생형 유전자가 킥다운(knock-down) 된 것일 수 있다.

[128] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 유전자는 이와 대응되는 야생형 유전자와 비교해 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입, 결실, 치환, 및/또는 역위된 것일 수 있다.

[129] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 된 유전자는 이와 대응되는 야생형 유전자 내에 인델을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 상기 인델은 세포 내의 NHEJ(Non-homologous end joining) 메커니즘에 의해 발생하는 것으로, 상기 NHEJ 메커니즘에 의해 상기 야생형 유전자 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입, 결실, 및/또는 치환될 수 있다. 이때, 상기 "유전자 내에 인델을 포함한다"는 표현은 상기 야생형 유전자 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입, 결실, 및/또는 치환된 것, 및/또는 그 결과물을 일컫는다.

[130] 예를 들어, 야생형의 A 유전자 내에 인델을 포함하는, 엔지니어링 된 A 유전자는 상기 야생형의 A 유전자의 임의의 위치에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입된 것일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 야생형의 A 유전자 내에 인델을 포함하는, 엔지니어링 된 A 유전자는 상기 야생형의 A 유전자 내 임의의 위치의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 결실된 것일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 야생형의 A 유전자 내에 인델을 포함하는, 엔지니어링 된 A 유전자는 상기 야생형의 A 유전자 내 임의의 위치의 하나 이상의 뉴클레오타이드가 다른 것으로 치환된 것일 수 있다.

[131] 세포의 유전자형 3 - 대상 유전자 내 엔지니어링 영역 예시

[132] 상기한 바, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1 단백질의 전사, 발현, 및/또는 활성을 저해하는 물질을 발현하는 야생형 유전자가 인위적으로 편집된 것을 특징으로 하며, 이는 상기 야생형 유전자 내의 하나 이상의 영역이 엔지니어링 된 것을 의미한다. 이때, 상기 야생형 유전자 내의, 엔지니어링 된 영역은 상기한 목적을 달성할 수 있는

영역이라면 특별히 제한되지 않는다.

- [133] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 상기 야생형 유전자 내 엑손 영역, 인트론 영역 및/또는 조절 영역이 편집된 것일 수 있다. 이때, 상기 야생형 유전자는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및 PAI1로 이뤄진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [134] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및 PAI1 유전자로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 야생형 유전자의, 엑손 1, 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 꺾, 및 엑손 N에서 선택된 하나 이상의 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 유전자를 포함할 수 있다. 이때, 상기 N은 임의의 정수이다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및 PAI1 유전자로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 야생형 유전자의, 인트론 1, 인트론 2, 인트론 3, 인트론 4, 인트론 5, 꺾, 및 인트론 M에서 선택된 하나 이상의 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 유전자를 포함할 수 있다. 이때, 상기 M은 임의의 정수이다.
- [135] 일 구현예로, 상기 세포는 야생형의 HIF1AN 유전자 내의 엑손 1 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 야생형의 HIF3A 유전자 내의 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 및 엑손 6으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 HIF3A 유전자를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 야생형의 PHD2 유전자 내의 엑손 1 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 PHD2 유전자를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 야생형의 TLR4 유전자 내의 엑손 1, 엑손 2, 및 엑손 3으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 TLR4 유전자를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 야생형의 PAI1 유전자 내의 엑손 2 영역이 인위적으로 편집된, 엔지니어링 된 PAI1 유전자를 포함할 수 있다.
- [136] 일 구현예로, 상기 조작된 세포가 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 HIF1AN 유전자 내의 인텔은 상기 HIF1AN 유전자의 엑손 1 영역에 위치할 수 있다. 상기 조작된 세포가 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 HIF3A 유전자 내의 인텔은 상기 HIF3A 유전자의, 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 및 엑손 6으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역 내에 위치할 수 있다. 상기 조작된 세포가 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 PHD2 유전자 내의 인텔은 상기 PHD2 유전자의 엑손 1 영역 내에 위치할 수 있다. 상기 조작된 세포가 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는 엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 TLR4 유전자 내의 인텔은 상기 TLR4 유전자의, 엑손 1, 엑손 2, 및 엑손 3으로 이뤄진 군에서 선택된 하나 이상의 영역 내에 위치할 수 있다. 상기 조작된 세포가 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는

엔지니어링 된 유전자를 포함하는 경우, 상기 PAI1 유전자 내의 인텔은 상기 PAI1 유전자의 엑손 2 영역 내에 위치할 수 있다.

[137] 세포의 유전자형 4 - 엔지니어링 대상 서열 예시

[138] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN 유전자 내 서열번호 1 내지 9에서 선택된 하나 이상의 서열이 인위적으로 편집된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함하고, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 9에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자의 서열 중 서열번호 1 내지 9에서 선택된 하나 이상의 서열과 일치하는 서열은 존재하지 않을 수 있다.

[139] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF3A 유전자 내 서열번호 10 내지 34에서 선택된 하나 이상의 서열이 인위적으로 편집된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 HIF3A 유전자를 포함하고, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자의 서열은 서열번호 10 내지 34에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자의 서열 중 서열번호 10 내지 34에서 선택된 하나 이상의 서열과 일치하는 서열은 존재하지 않을 수 있다.

[140] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 PHD2 유전자 내 서열번호 35 내지 38에서 선택된 하나 이상의 서열이 인위적으로 편집된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 PHD2 유전자를 포함하고, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자의 서열은 서열번호 35 내지 38에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자의 서열 중 서열번호 35 내지 38에서 선택된 하나 이상의 서열과 일치하는 서열은 존재하지 않을 수 있다.

[141] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 TLR4 유전자 내 서열번호 39 내지 59에서 선택된 하나 이상의 서열이 인위적으로 편집된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 TLR4 유전자를 포함하고, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자의 서열은 서열번호 39 내지 59에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자의 서열 중 서열번호 39 내지 59에서 선택된 하나 이상의 서열과 일치하는 서열은 존재하지 않을 수 있다.

[142] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 PAI1 유전자 내 서열번호 60 내지 71에서 선택된 하나 이상의 서열이 인위적으로 편집된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 세포는 엔지니어링 된 PAI1 유전자를 포함하고, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자의 서열은 서열번호 60 내지 71에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다. 달리 표현해, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자의 서열 중 서열번호 60 내지 71에서 선택된 하나 이상의 서열과 일치하는 서열은 존재하지 않을 수 있다.

- [143] 세포의 표현형 1 - 엔지니어링 대상 유전자의 발현 산물 감소
- [144] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는, HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질을 발현하는 야생형의 유전자가 인위적으로 조작되어, 상기 야생형의 유전자가 발현하는 물질을 발현하지 못하거나, 더 적게 발현하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 세포는 HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질(negative regulator of HIF1 expression)의 발현량이 야생형의 세포보다 감소되어 있다.
- [145] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및 PAI1 유전자로 이뤄진 군에서 선택된 유전자 내에 인텔을 가지는, 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 이때, 상기 엔지니어링 된 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 HIF3A 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 HIF3A 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 PHD2 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 TLR4 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 PAI1 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 상이할 수 있다.
- [146] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및 PAI1 로 이뤄진 군에서 선택된 유전자 내에 인텔을 가지는, 적어도 하나의 엔지니어링 된 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 이때, 상기 엔지니어링 된 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 유전자에서 발현되는

mRNA의 발현 수준은 상기 야생형 세포에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 HIF1AN 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포 내의, 야생형 HIF1AN 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 HIF3A 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 HIF3A 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 HIF3A 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 HIF3A 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포 내의, 야생형 HIF1A 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 PHD2 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 PHD2 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포 내의, 야생형 PHD2 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 TLR4 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 TLR4 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포 내의, 야생형 TLR4 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준에 비해 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형 PAI1 유전자 내에 인텔을 가지는, 엔지니어링 된 PAI1 유전자를 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열은 상기 야생형 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 서열과 동일하고, 이때, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, 상기 엔지니어링 된 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포 내의, 야생형 PAI1 유전자에서 발현되는 mRNA의 발현 수준에 비해 더 낮을 수 있다.

- [147] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 mRNA 양이 감소된

세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 mRNA의 발현 수준은 야생형 세포에 비해 더 낮을 수 있다.

- [148] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 단백질 양이 감소된 세포일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 내에서, HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준은 야생형 세포에 비해 더 낮을 수 있다.
- [149] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN 유전자 내에 인델을 가지는, 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함할 때, 상기 세포 내 포함된 HIF1AN으로부터 발현되는 mRNA 및/또는 FIH-1의 농도는 야생형 세포 내 포함된 농도보다 더 낮을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN 유전자 내에 인델을 가지는, 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함할 때, 상기 세포 내 HIF1AN으로부터 발현되는 mRNA 및/또는 FIH-1의 발현 수준은 야생형 세포 내 발현 수준보다 더 낮을 수 있다.
- [150] 세포의 표현형 2 - 엔지니어링 대상 유전자의 발현 산물 감소 관련 정량 지표 예시
- [151] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 mRNA의 발현 수준이 야생형의 세포에 비해 약 0.9배, 약 0.85배, 약 0.8배, 약 0.75배, 약 0.7배, 약 0.65배, 약 0.6배, 약 0.55배, 약 0.5배, 약 0.45배, 약 0.4배, 약 0.35배, 약 0.3배, 약 0.25배, 약 0.2배, 약 0.15배, 약 0.10배, 약 0.05배, 약 0.04배, 약 0.03배, 약 0.02배, 또는 약 0.01배 이하일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 mRNA 발현 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 약 0.6배 내지 약 0.7배의 mRNA 발현 수준을 나타낼 수 있다.
- [152] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4 및/또는 PAI1 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 야생형의 세포에 비해 약 0.9배, 약 0.85배, 약 0.8배, 약 0.75배, 약 0.7배, 약 0.65배, 약 0.6배, 약 0.55배, 약 0.5배, 약 0.45배, 약 0.4배, 약 0.35배, 약 0.3배, 약 0.25배, 약 0.2배, 약 0.15배, 약 0.10배, 약 0.05배, 약 0.04배, 약 0.03배, 약 0.02배, 또는 약 0.01배 이하일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 단백질 발현 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 약 0.6배 내지 약 0.7배의 단백질 발현 수준을 나타낼 수 있다.

- [153] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 FIH-1 발현 수준이 야생형의 세포에 비해 약 0.9배, 약 0.85배, 약 0.8배, 약 0.75배, 약 0.7배, 약 0.65배, 약 0.6배, 약 0.55배, 약 0.5배, 약 0.45배, 약 0.4배, 약 0.35배, 약 0.3배, 약 0.25배, 약 0.2배, 약 0.15배, 약 0.10배, 약 0.05배, 약 0.04배, 약 0.03배, 약 0.02배, 또는 약 0.01배 이하일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 FIH-1 발현 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 약 0.6배 내지 약 0.7배의 FIH-1 발현 수준을 나타낼 수 있다.
- [154] 세포의 표현형 3 - HIF α 발현 관련
- [155] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 세포 내 HIF1 α 발현 수준이 높거나, HIF1 α 의 활성이 높게 나타난다.
- [156] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포에 비해 HIF1 α 발현 수준이 높을 수 있다. 이때, 상기 HIF1 α 발현 수준은 세포 내 HIF1 α 의 양, 및/또는 농도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포에 비해 HIF1 α 의 활성이 높게 나타날 수 있다.
- [158] 세포의 표현형 4 - HIF1 α 발현 관련 정량 지표 예시
- [159] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1 α 의 발현 수준이 야생형의 세포에 비해 약 1.1배, 약 1.2배, 약 1.3배, 약 1.4배, 약 1.5배, 약 1.6배, 약 1.7배, 약 1.8배, 약 1.9배, 약 2.0배, 약 2.1배, 약 2.2배, 약 2.3배, 약 2.4배, 약 2.5배, 약 2.6배, 약 2.7배, 약 2.8배, 약 2.9배, 또는 약 3.0배 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 HIF1 α 발현 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 약 1.1배 내지 약 1.5배의 HIF1 α 발현 수준을 나타낼 수 있다.
- [160] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 HIF1 α 의 활성 수준이 야생형의 세포에 비해 약 1.1배, 약 1.2배, 약 1.3배, 약 1.4배, 약 1.5배, 약 1.6배, 약 1.7배, 약 1.8배, 약 1.9배, 약 2.0배, 약 2.1배, 약 2.2배, 약 2.3배, 약 2.4배, 약 2.5배, 약 2.6배, 약 2.7배, 약 2.8배, 약 2.9배, 또는 약 3.0배 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 HIF1 α 활성 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 약 1.1배 내지 약 1.5배의 HIF1 α 활성 수준을 나타낼 수 있다.
- [161] 세포의 특징 1 - 저산소 환경 하 높은 생존율
- [162] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 저산소 환경에서 개선된 적응력, 또는 생존력을 보이는 것을 특징으로 한다. 이때, "저산소 환경"이란 낮은 농도의 산소(O₂)를 포함하는 기체환경 하에 있는 것을

의미한다. 결과적으로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포가 살아있는 유기체(예를 들어, 인간)의 체내에 주입되는 경우, 개선된 적응력 또는 생존력을 보인다.

- [163] 일 구현예로, 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 저산소 환경 하 야생형의 세포보다 더 오랜 기간 생존하는 것을 특징으로 한다.
- [164] 세포의 특징 2 - 저산소 환경 하 높은 생존율의 정량 지표 예시
- [165] 일 구현예로, 상기 저산소 환경은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 또는 약 21% 이하의 O₂ 퍼센트농도를 가지는 기체 환경을 의미할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경은 인위적으로 상기 저산소환경을 모방한(mimetic) 환경일 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경은 H₂O₂를 처리하여 인위적으로 상기 저산소 환경에서 흔히 발생하는 산화적 스트레스(reactive oxidative stress; ROS)를 유도한 환경일 수 있다.
- [166] 일 구현예로, 하나 이상의, 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 및 야생형의 세포를 동일한 저산소 환경 하 일정 시간 두었을 때, 살아남은 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 수가 살아남은 상기 야생형의 세포의 수에 비해 약 1.01배, 약 1.02배, 약 1.03배, 약 1.04배, 약 1.05배, 약 1.06배, 약 1.07배, 약 1.08배, 약 1.09배, 약 1.1배, 약 1.15배, 약 1.2배, 약 1.25배, 약 1.3배, 약 1.35배, 약 1.4배, 약 1.45배, 약 1.5배, 약 1.55배, 약 1.6배, 약 1.65배, 약 1.7배, 약 1.75배, 약 1.8배, 약 1.85배, 약 1.9배, 약 1.95배, 약 2.0배, 약 2.1배, 약 2.2배, 약 2.3배, 약 2.4배, 약 2.5배, 약 2.6배, 약 2.7배, 약 2.8배, 약 2.9배, 약 3.0배, 약 4배, 약 5배, 또는 약 10배 이상일 수 있다. 일 구현예로, 상기 살아남은 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 수는 상기 살아남은 야생형 세포의 수에 비해 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 이내의 숫자일 수 있다. 예를 들어, 상기 살아남은 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 수는 상기 살아남은 야생형 세포 수의 약 1.5배 내지 약 2.5배일 수 있다.
- [167] 일 구현예로, 상기 일정 시간은 약 10분, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 6시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간, 약 98시간, 약 120시간, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 또는 약 한 달 이상의 기간일 수 있다. 일 구현예로, 상기 일정 시간은 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 이내의 기간일 수 있다. 예를 들어, 상기 일정 시간은 약 3시간 내지 약 12시간일 수 있다.
- [168] 세포의 특징 3 - 사이토카인 분비
- [169] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 특정 사이토카인(cytokine), 또는 특정 성장인자(growth factor)를 많이 분비하는 세포일 수 있다.

- [170] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 사이토카인(cytokine)의 분비(secretion) 수준이 높을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 VEGF 및/또는 IL-8의 분비 수준이 높을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함하고, 야생형의 세포와 비교해 VEGF 및/또는 IL-8의 분비 수준이 높을 수 있다.
- [171] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 상기 저산소 환경 하에서 사이토카인(cytokine)의 분비(secretion) 수준이 높을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해 상기 저산소 환경 하에서 VEGF 및/또는 IL-8의 분비 수준이 높을 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 엔지니어링 된 HIF1AN 유전자를 포함하고, 야생형의 세포와 비교해 상기 저산소 환경 하에서 VEGF 및/또는 IL-8의 분비 수준이 높을 수 있다.
- [172] 세포의 특징 4 - 사이토카인 분비에 대한 정량 지표 예시
- [173] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해, 특정 사이토카인(cytokine)을 약 1.1배, 약 1.2배, 약 1.3배, 약 1.4배, 약 1.5배, 약 1.6배, 약 1.7배, 약 1.8배, 약 1.9배, 약 2.0배, 약 2.1배, 약 2.2배, 약 2.3배, 약 2.4배, 약 2.5배, 약 2.6배, 약 2.7배, 약 2.8배, 약 2.9배, 또는 약 3.0배의 양으로 분비할 수 있다. 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 야생형의 세포와 비교해, 특정 사이토카인을 바로 이전 문장에서 선택된 두 수치범위 내의 양으로 분비할 수 있다. 예를 들어, 약 1.1배 내지 약 1.5배일 수 있다. 이때, 상기 특정 사이토카인은 VEGF 및/또는 IL-8일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [174] 세포의 용도
- [175] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 세포 치료제 용도로 이용될 수 있다.
- [176] 일 구현예로, 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 암, 알츠하이머 병, 관절염, 예를 들면 노화에 의해 발병하는 퇴행성 관절 질환 (degenerative joint disease)인 골관절염(osteoarthritis), 그 외 자가 면역질환인 류마티스성 관절염 (rheumatoid arthritis)과 건선성 관절염 (psoriatic arthritis), 감염에 의한 패혈성 관절염 (septic arthritis) 등의 예방, 증상완화, 재생, 또는 치료용으로 사용될 수 있다. 또 다른 일 구현예로, 당뇨병성 망막증, 손상된 뼈, 연골, 피부 및 심근 등의 기관, 골형성부전증 (Osteogenesis imperfecta, OI), 크론성 누공(Crohn's fistula), 당뇨병성족부궤양, 심근경색증(Myocardial infarction), 헌팅턴 병, 파킨슨 병, 루게릭 병, 활동성 구루병, 뼈의 파열병(변형성 골염), 진행성 골화섬유형성이상, 전선성 관절병증, 장병증성 관절염증 등의 예방, 증상완화, 재생, 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

[177]

[178] 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물

[179] 개관

[180] 본 명세서에서 개시되는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 세포 내 엔지니어링 대상 유전자를 편집할 수 있는 구성을 가진다. 상기 유전자 조작용 조성물은 전술한 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 유전자형, 및/또는 표현형을 나타낼 수 있도록, 적합한 세포 내 표적 서열을 인지하고 이를 편집할 수 있도록 설계된 것이다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물은 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA, 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질일 수 있다. 일 구현예로, 상기 가이드 RNA의 서열은 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열일 수 있다.

[181] CRISPR/Cas 시스템 구성 요소 1 - Cas9 단백질

[182] 본 명세서에서 개시되는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물은 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함한다. 이때, 상기 Cas9 단백질은 자연계에 존재하는 Cas9 단백질이거나, 자연계에 존재하는 Cas9 단백질에서 하나 이상의 도메인이 인위적으로 변형된 Cas9 단백질일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas9 단백질은 상기 Cas9 단백질에 포함된 일부 또는 전부 도메인의 기능이 불활성화된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질일 수 있다.

[183] CRISPR/Cas 시스템 구성 요소 2 - 가이드 RNA

[184] 본 명세서에서 개시되는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물은 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함한다. 이때, 상기 가이드 RNA는 상기 Cas9 단백질과 결합하여 CRISPR/Cas 복합체를 이룰 수 있는 것이다. 상기 가이드 RNA의 구성은 크게 스키펴 부분, 및 가이드 서열 부분으로 나눌 수 있다. 상기 스키펴 부분은 상기 Cas9 단백질과 상호작용하여 상기 Cas9 단백질과 결합할 수 있는 부분으로, 그 구성은 상기 유전자 조작용 조성물에 포함된 Cas9 단백질의 종류에 따라 달라질 수 있다. 상기 가이드 서열 부분은 세포에 포함된 엔지니어링 대상 유전자 내 특정 서열 부분과 상보적인 결합을 형성할 수 있는 부분으로, CRISPR/Cas 복합체가 상기 특정 서열 부분, 및/또는 이와 인접한 부분을 편집하도록 한다. 상기 가이드 서열 부분은 미리 결정된 표적 서열과 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된다.

[185] 일 구현예로, 상기 엔지니어링 대상 유전자는 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4

및/또는 PAI1 유전자일 수 있다.

- [186] 일 구현예로, 상기 스캐폴드 부분은 tracrRNA 및 crRNA 반복 서열 부분을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 tracrRNA의 서열은 서열번호 144의 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 tracrRNA의 서열은 서열번호 144의 서열과 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 일치하는 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 crRNA 반복 서열은 서열번호 145의 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 crRNA 반복 서열은 서열번호 145의 서열과 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 일치하는 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 스캐폴드 부분의 서열은 서열번호 143의 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 스캐폴드 부분의 서열은 서열번호 143의 서열과 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 일치하는 서열일 수 있다.
- [187] 일 구현예로, 상기 가이드 서열 부분은 상기 엔지니어링 대상 유전자 내에 포함된 proto-spacer adjacent motif(PAM) 서열과 인접한 DNA 서열에 상응하는 RNA 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 PAM 서열은 5'-NGG'-3'일 수 있다.
- [188] 가이드 RNA 서열 예시
- [189] 일 구현예로, 상기 가이드 RNA에 포함된 가이드 서열 부분은 서열번호 72 내지 142로 이뤄진 군에서 선택된 서열일 수 있다. 일 구현예로, 상기 가이드 RNA의 서열은 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열일 수 있다.
- [190] CRISPR/Cas 시스템 구성요소의 포함 형태
- [191] 상기 유전자 조작용 조성물 내에 포함된 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성요소의 형태는 상기 유전자 조작용 조성물이 세포 내에 도입되는 경우, CRISPR/Cas 복합체가 형성되어 대상 유전자를 인위적으로 조작할 수 있도록 하는 형태라면 특별히 제한되지 않는다.
- [192] 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질 및 상기 가이드 RNA가 결합된 리보뉴클레오프로틴(RNP, ribonucleoprotein)을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA 및 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA가 포함된 벡터를 가지고 있을 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물은 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA 및 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA가 포함된 단일 벡터를 가지고 있을 수 있다. 일 구현예로, 상기 단일 벡터는 플라스미드 및/또는 바이러스 벡터일 수 있다. 일 구현예로, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있다.
- [193]
- [194] 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 세포 내 유전자 조작 방법
- [195] 개관
- [196] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한

세포 내 유전자 조작 방법을 개시한다. 구체적으로, 전술한 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위해, HIF1 단백질의 발현을 저해하는 물질을 발현하는 유전자를 편집하여 목적하는 상기 세포를 얻는 방법이다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법은 유전자 조작용 조성물을 표적 유전자를 포함하는 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 유전자 조작용 조성물은 "저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물" 단락에서 설명된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법은 CRISPR/Cas9 복합체를 표적 유전자에 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 CRISPR/Cas9 복합체는 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 및 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열을 가지는 가이드 RNA가 복합체를 이루고 있는 것일 수 있다.

[197] 유전자 조작 방법 수행 환경

[198] 이때, 상기 유전자 조작 방법은 생체외(in vitro)에서 수행될 수 있다. 또한, 전술한 바 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 세포 치료제로 사용될 수 있으므로, 상기 유전자 조작 방법은 유기체에서 분리된 세포에 대해(ex vivo) 수행될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법은 생체외(in vitro)에서, 유기체에서 분리된 세포에 대해(ex vivo) 수행될 수 있다. 이때, 상기 유기체는 인간 또는 동물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[199] 표적 유전자

[200] 상기 유전자 조작 방법에서 유전자 조작의 목표가 되는 유전자를 표적 유전자로 지칭한다. 상기 유전자 조작 방법의 대상이 되는 유전자는 HIF1 단백질의 전사, 발현, 및/또는 활성을 저해하는 물질을 발현하는 야생형 유전자가 된다. 상기 표적 유전자는 "세포의 유전자형 1 - 엔지니어링 대상 유전자" 단락에서 설명된 유전자일 수 있다.

[201] 유전자 조작용 조성물

[202] 본 명세서에서 개시되는 상기 유전자 조작 방법에 사용되는 유전자 조작용 조성물은 "저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작용 조성물" 단락에서 설명된 것일 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법에 사용되는 유전자 조작용 조성물은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA, 및 서열번호 146 내지 216로 이뤄진 군에서 선택된 서열을 가지는, 하나 이상의 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함할 수 있다.

[203] 유전자 조작용 조성물 도입 수단 예시

[204] 본 명세서에서 개시되는 상기 유전자 조작 방법에서 세포 내로 상기 유전자 조작용 조성물을 도입하는 것은 다양한 방법으로 수행될 수 있으며, CRISPR/Cas 복합체에 의해 표적 유전자를 편집한다는 목적을 달성할 수 있는 방법이면 특별히 제한되지 않는다.

[205] 일 구현예로, 세포 내로 상기 유전자 조작용 조성물을 도입하는 것은

전기천공법, 리포펙션, 미세 주입법, 유전자청, 리포솜, 양성 리포솜, 엔진아씨 전달 비히클(EnGeneIC delivery vehicles: EDV), 플라스미드, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles), PTD(Protein translocation domain) 융합 단백질 방법, 면역리포솜, 다양이온 또는 지질: 핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제 항상 흡수 방법 중에 선택된 하나 이상의 수단으로 수행될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물이 Cas9 단백질 및 가이드 RNA가 결합한 리보뉴클레오프로틴(ribonucleoprotein)을 포함하는 경우, 상기 유전자 조작용 조성물은 전기충격 또는 전기천공법으로 세포 내 도입될 수 있다.

[206] CRISPR/Cas 시스템 각 구성요소의 개별 도입

[207] 상기 유전자 조작용 조성물에 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성요소가 독립적으로 포함된 경우, 상기 유전자 조작 방법은 CRISPR/Cas 시스템의 각 구성 요소를 개별적으로 세포 내에 도입하는 과정을 포함할 수 있다. 이때, CRISPR/Cas 시스템의 각 구성 요소는 동시에, 또는 임의의 순서로 순차적으로 세포 내로 도입될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물이 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 개별적인 구성 요소로 포함하는 경우, 상기 유전자 조작 방법은 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 동시에 세포 내로 도입하는 과정을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물이 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 개별적인 구성 요소로 포함하는 경우, 상기 유전자 조작 방법은 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 임의의 순서로 순차적으로 세포 내로 도입하는 과정을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물이 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 암호화하는 DNA를 둘 이상의 상이한 벡터 내에 포함하는 경우, 상기 유전자 조작 방법은 각각의 벡터를 동시에 세포 내로 도입하는 과정을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작용 조성물이 상기 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 및 가이드 RNA를 암호화하는 DNA를 둘 이상의 상이한 벡터 내에 포함하는 경우, 상기 유전자 조작 방법은 각각의 벡터를 임의의 순서로 순차적으로 세포 내로 도입하는 과정을 포함할 수 있다.

[208] 유전자 조작용 조성물 도입

[209] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작 방법은, 상기 유전자 조작용 조성물을 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[210] CRISPR/Cas 복합체와 표적 유전자 접촉

[211] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작 방법은, CRISPR/Cas 복합체를 표적 유전자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

[212] 유전자 조작 방법 수행 결과 1 - 유전자 편집 위치

[213] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를

제조하기 위한 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 표적 유전자의 특정 부분에서 유전자 편집이 일어난다. 이때, 상기 "특정 부분에서 유전자 편집이 일어난다"는 표현은, 상기 특정 부분, 및/또는 이와 인접한 부분이 CRISPR/Cas 복합체에 의해 편집된다는 의미이다.

[214] 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 상기 표적 유전자 내의 표적 서열 부분, 또는 이와 인접한 부분에서 유전자 편집이 일어날 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및/또는 PAI1 유전자 내에 포함된 표적 서열 부분, 또는 이와 인접한 부분에서 유전자 편집이 일어날 수 있다.

[215] 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및/또는 PAI1 유전자 내 엑손 영역, 인트론 영역, 및/또는 조절 영역에서 유전자 편집이 일어날 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및/또는 PAI1 유전자 내의, 엑손 1, 엑손 2, 엑손 1, 엑손 2, 엑손 3, 엑손 4, 엑손 5, 꺾, 엑손 N에서 선택된 하나 이상의 영역에서 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이때, 상기 N은 임의의 정수이다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 HIF1AN, HIF3A, PHD2, TLR4, 및/또는 PAI1 유전자 내의, 인트론 1, 인트론 2, 인트론 3, 인트론 4, 인트론 5, 꺾, 및 인트론 M에서 선택된 하나 이상의 영역에서 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이때, 상기 M은 임의의 정수이다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 표적 유전자에 포함된 서열번호 1 내지 71로 이뤄진 군에서 선택된 서열 부분에서 유전자 편집이 일어날 수 있다.

[216] 유전자 조작 방법 수행 결과 2 - 유전자 편집 양상

[217] 본 명세서에서 개시하는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 제조하기 위한 유전자 조작 방법의 수행 결과, 세포 내 표적 유전자의 특정 부분에서 유전자 편집이 일어난다. 상기 유전자 편집이 일어난 결과, 상기 표적 유전자의 발현 산물의 발현 수준이 야생형의 세포보다 낮아지게 된다. 이때 상기 발현 산물은 mRNA, 또는 특정 단백질일 수 있다.

[218] 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 표적 유전자 내의 특정 부분 및/또는 이와 인접한 부분에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드가 삽입되거나, 결실되거나, 다른 뉴클레오타이드로 치환되거나, 및/또는 역위될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 표적 유전자 내의 특정 부분 및/또는 이와 인접한 부분에서 인델이 발생할 수 있다. 이때, 상기 특정 부분은 "유전자 조작 방법 수행 결과 1 - 유전자 편집 위치" 단락에서 예시된 부분일 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 표적 유전자가 녹아웃(knock-out) 될 수 있다. 일 구현예로, 상기 유전자 조작 방법의 수행 결과, 표적 유전자가 녹다운(knock-down) 될 수 있다.

[219]

[220] 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 포함하는 약학적 조성물

- [221] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 포함하는 약학적 조성물을 개시한다. 상기 약학적 조성물은 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 유효성분으로 포함하며, 대상질환의 진단, 증상완화, 재생, 및/또는 치료용으로 사용될 수 있다.
- [222] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물은 체내에 투여되어 손상된 세포를 대체하거나, 손상된 조직 또는 기관을 치료 또는 재생하는 등 당업자가 용이하게 이용할 수 있는 용도로 사용될 수 있다.
- [223] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 약학적으로 허용되는 담체는 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 및/또는 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [224] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물 또는 약학적 조성물의 유효 성분인 세포는 저산소환경에서 배양된 것 일 수 있다. 구체적으로, *in vitro* 또는 *in vivo* 상의 저산소환경에서 *pre-conditioning* 된 것 일 수 있다.
- [225] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물은 비경구 투여 형태로 제형화 될 수 있다. 이때, 비경구 투여는 비강 투여, 점안 투여, 정맥 내 주입, 근육 주입, 복강주입, 경피 투여, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 뇌조직 내 주사, 해마(hippocampus) 내 주사, caudate putamen(CPu) 내 주사, 관절 내 주사, 연골 내 주사 또는 흉부 내 주입하는 방법 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [226] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물을 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 유효 성분인 세포를 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조할 수 있다. 더 나아가 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 일 구현예로, 상기 약학적 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화 할 수 있다.
- [227]
- [228] 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 이용한 치료 방법
- [229] 본 명세서에서는 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 이용한 치료 방법을 개시한다. 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포는 살아있는 대상(예를 들어, 인간)의 체내에 투여되는 경우, 투여 부위의 저산소 환경에서 오랜 기간 생존하면서 현저한 치료효과를 제공할 수 있다. 이때, 상기 치료효과는 1회 투여량을 줄이거나, 투여 반복주기를 늘이는 것일 수 있다.

- [230] 본 명세서에서는 상기 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 목적부위에 투여(injection) 함으로써 대상질환 진단, 증상완화, 재생 또는 치료용으로 사용하는 방법을 제공한다.
- [231] 일 구현예로, 상기 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [232] 일 구현예로, 상기 약학적 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 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [233]

발명의 실시를 위한 형태

- [234] 실험예
- [235] 이하, 실험예 및 실시예를 통해 본 명세서가 제공하는 발명에 대해 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위한 것으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [236]
- [237] 실험예 1 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포 제조
- [238] 실험예 1-1 중간엽 줄기세포 배양
- [239] 인간 골수로부터 유래한 MSC는 Lonza (Walkersville, Maryland, USA)로부터 구매하였다. MSC는 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco) 및 Gentamicin 0.05 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) 이 포함되어 있는 MEM alpha 1x media (Gibco, Rockville, MD) 배지를 37°C 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.
- [240] 실험예 1-2 가이드 RNA 제조
- [241] RNA는 MEGA short script T7 kit (Ambion)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 생체 외 전사하였다. sgRNA에 대한 주형 (template)은 두 상보적인 올리고 뉴클레오타이드의 결합 (annealing) 및 신장 (extension)을 통해 제조하였다.
- [242] 각각의 표적 별 sgRNA의 가이드 도메인은 다음 표 1 내지 표 5에 나타난 바와 같다.

[243] [표 1]

Label	Guide Domain (5' to 3')	SEQ ID NO.	PAM	Indel (%)	Target Sequence Location (Exon)
Sp-hHIF1AN sgRNA1	GAAGCUAUAACUGCG CAACU	72	GGG	51.8	1
Sp-hHIF1AN sgRNA2	GGAAGCUAUAACUGC GCAAC	73	UGG	9.5	1
Sp-hHIF1AN sgRNA3	GCAGUUAUAGCUUCC CGACU	74	AGG	14.3	1
Sp-hHIF1AN sgRNA4	GACGCGGAAUGGGCC UAGUC	75	GGG	2	1
Sp-hHIF1AN sgRNA5	AGACGCGGAAUGGGC CUAGU	76	CGG	7.3	1
Sp-hHIF1AN sgRNA6	CUCUGACUCAGACGC GGAAU	77	GGG	7.2	1
Sp-hHIF1AN sgRNA7	GGGUCGCUCUGACUC AGACG	78	CGG	20.6	1
Sp-hHIF1AN sgRNA8	GUCUGAGUCAGAGCG ACCCC	79	CGG	26.5	1
Sp-hHIF1AN sgRNA9	CAAUAAGCUCCUCUG CCCGG	80	GGG	59.8	1

[244] [표 2]

Label	Guide Domain (5' to 3')	SEQ ID NO.	PAM	Indel (%)	Target Sequence Location (Exon)
Sp-hHIF3A sgRNA1	GGUACAGCACCUCGGU CUCC	81	UGG	4.1	2
Sp-hHIF3A sgRNA2	GACCGAGGUGCUGUAC CAGC	82	UGG	13	2
Sp-hHIF3A sgRNA3	GCAUGAUAGAGGCCUU GUCC	83	AGG	10.8	2
Sp-hHIF3A sgRNA4	GAUGGUGAGGCGCAU GAUAG	84	AGG	3.7	2
Sp-hHIF3A sgRNA5	GUGCAUGCGCAGGUAG CUGA	85	UGG	6.4	2
Sp-hHIF3A sgRNA6	CAUCCACCCCUGUGAC CAAG	86	AGG	13.1	4
Sp-hHIF3A sgRNA7	GCUCCUCUUGGUCACA GGGG	87	UGG	6.4	4
Sp-hHIF3A sgRNA8	GGGCGUCCUGAAGCUC CUCU	88	UGG	3.3	4
Sp-hHIF3A sgRNA9	AGGAGAAGCACCGCUC CGUG	89	GGG	1	5

[245] [표 3]

Label	Guide Domain (5' to 3')	SEQ ID NO.	PAM	Indel (%)	Target Sequence Location (Exon)
Sp-hPHD2 sgRNA1	AAUGACAGCGGCGGGC CCGG	106	CGG	65.4	1
Sp-hPHD2 sgRNA2	AUGACAGCGGCGGGCC CGGC	107	GGG	37.1	1
Sp-hPHD2 sgRNA3	ACUGCCGGUCUCGCUC GCUC	108	GGG	90.6	1
Sp-hPHD2 sgRNA4	UACUGCCGGUCUCGCU CGCU	109	CGG	50.1	1

[246] [표 4]

Label	Guide Domain (5' to 3')	SEQ ID NO.	PAM	Indel (%)	Target Sequence Location (Exon)
Sp-TLR4 sgRNA1	UGGUCUCACGCAGGAGA GGA	110	AGG	1.1	1
Sp-hTLR4 sgRNA2	CCUGCGUGAGACCAGAA AGC	111	UGG	1.3	1
Sp-hTLR4 sgRNA3	CCAGCUUUCUGGUCUCA CGC	112	AGG	3.2	1
Sp-hTLR4 sgRNA4	CUGCGUGAGACCAGAAA GCU	113	GGG	2.9	1
Sp-hTLR4 sgRNA5	GGUUGAGAAGGGGAGG UUGU	114	AGG	1.2	2
Sp-hTLR4 sgRNA6	GUCCAGGUUCUUGGUUG AGA	115	AGG	1.1	2
Sp-hTLR4 sgRNA7	GGGGAUUAAGCUCAG GUCC	116	GGG	8.8	2
Sp-hTLR4 sgRNA8	ACCUGAGCUUUAUCCC CUG	117	AGG	0	3
Sp-hTLR4 sgRNA9	UAGCUGCCUAAAUGCCU CAG	118	AGG	5.1	3
Sp-hTLR4 sgRNA10	AUGCCCCAUCUUCAAU GUC	119	AGG	2.9	3
Sp-hTLR4 sgRNA11	CUGUCAUAUUAAGGU AGAG	120	AGG	0.1	2
Sp-hTLR4 sgRNA12	CUCUCUACCUAAUAU GAC	121	AGG	15.1	2
Sp-hTLR4 sgRNA13	GGGGUUUCCUGUCAUA UUA	122	AGG	0.1	3
Sp-hTLR4 sgRNA14	CCCCAUCCAGAGUUUAG CCC	123	UGG	18.5	3
Sp-hTLR4	CCAGGGCUAAACUCUGG	124	GGG	4.7	3

sgRNA15	AUG				
Sp-hTLR4 sgRNA16	AGGCUCCCAGGGCUAAA CUC	125	UGG	26.6	3
Sp-hTLR4 sgRNA17	UAGUCCAGAAAAGGCUC CCA	126	GGG	23	3
Sp-hTLR4 sgRNA18	UAAACUUGAUAGUCCAG AAA	127	AGG	3	3
Sp-hTLR4 sgRNA19	AUCAAGUUUACAGAAGC UGG	128	UGG	26.3	3
Sp-hTLR4 sgRNA20	UUUACAGAAGCUGGUG GCUG	129	UGG	22.4	3
Sp-hTLR4 sgRNA21	UCUCUAGAGAACUUCCC CAU	130	UGG	23.3	3

[247] [표5]

Label	Guide Domain (5' to 3')	SEQ ID NO.	PAM	Indel (%)	Target Sequence Location (Exon)
Sp-hPAI1 sgRNA1	AGCCCUCACCUGCCUAG UCC	131	UGG	5.6	2
Sp-hPAI1 sgRNA2	GCCCUCACCUGCCUAGU CCU	132	GGG	22.1	2
Sp-hPAI1 sgRNA3	UGGCCCUCUGUCUUUGGU GAA	133	GGG	21.2	2
Sp-hPAI1 sgRNA4	GCACCAUCCCCCAUCCUA CG	134	UGG	50	2
Sp-hPAI1 sgRNA5	AGGUGGGCCACGUAGGA UGG	135	GGG	11.6	2
Sp-hPAI1 sgRNA6	CCAGGUGGGCCACGUAG GAU	136	GGG	8.6	2
Sp-hPAI1 sgRNA7	GCCCACCUGGGCCUCAGA CUU	137	CGG	1.2	2
Sp-hPAI1 sgRNA8	UCACCCCGAAGUCUGAG GCC	138	AGG	12	2
Sp-hPAI1 sgRNA9	CACCCUCACCCCGAAGUC UG	139	AGG	5.4	2
Sp-hPAI1 sgRNA10	AACCACGUUGCGGUCCU UGG	140	AGG	73.1	2
Sp-hPAI1 sgRNA11	GAAAACCACGUUGCGGU CCU	141	UGG	7.6	2
Sp-hPAI1 sgRNA12	AGGGUGAGAAAACCACG UUG	142	CGG	56.2	2

[248]

[249]

각각의 가이드 도메인과 연결된 뉴클레오타이드(crRNA 반복 서열, 링커(GAAA), 및 tracrRNA)의 서열은

5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA
CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT-3'(서열번호 143)이다.

[250] 상기 sgRNA의 전장 서열은 다음 표 6 내지 표 12에 나타난 바와 같다.

[251] [표 6]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hHIF1A N sgRNA1	GAAGCUAUAACUGCGCAACUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	146
Sp-hHIF1A N sgRNA2	GGAAGCUAUAACUGCGCAACGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	147
Sp-hHIF1A N sgRNA3	GCAGUUAUAGCUUCCCCGACUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	148
Sp-hHIF1A N sgRNA4	GACGCGGAAUGGGCCUAGUCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	149
Sp-hHIF1A N sgRNA5	AGACGCGGAAUGGGCCUAGUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	150
Sp-hHIF1A N sgRNA6	CUCUGACUCAGACGCGGAAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	151
Sp-hHIF1A N sgRNA7	GGGUCGCUCUGACUCAGACGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	152
Sp-hHIF1A N sgRNA8	GUCUGAGUCAGAGCGACCCCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	153

Sp-hHIF1A N sgRNA9	CAAUAAGCUCCUCUGCCCCGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U	154
-----------------------	--	-----

[252]

[253] [7]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hHIF 3A sgRNA1	GGUACAGCACCUCGGUCUCCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	155
Sp-hHIF 3A sgRNA2	GACCGAGGUGCUGUACCAGCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	156
Sp-hHIF 3A sgRNA3	GCAUGAUAGAGGCCUUGUCCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	157
Sp-hHIF 3A sgRNA4	GAUGGUGAGGCGCAUGAUAGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	158
Sp-hHIF 3A sgRNA5	GUGCAUGCAGGAGGUAGCUGAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	159
Sp-hHIF 3A sgRNA6	CAUCCACCCCUGUGACCAAGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	160
Sp-hHIF 3A sgRNA7	GCUCCUCUUGGUCACAGGGGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	161
Sp-hHIF 3A sgRNA8	GGGCGUCCUGAAGCUCCUCUGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	162
Sp-hHIF 3A sgRNA9	AGGAGAAGCACCGCUCCGUGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	163

[254]

[255] [표 8]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hHIF 3A sgRNA1 4	UUCAGGUAGCAGGCAUCCAGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	168
Sp-hHIF 3A sgRNA1 5	ACUGGAUGCCUGCUACCUGAGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	169
Sp-hHIF 3A sgRNA1 6	CACCAUGACGAAGCCCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	170
Sp-hHIF 3A sgRNA1 7	CGUCAUGGUGCUCACCGCCGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	171
Sp-hHIF 3A sgRNA1 8	GCUCACCGCCGAGGGAGACAGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	172
Sp-hHIF 3A sgRNA1 9	GGGAGACAUGGCUUACCUGUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	173
Sp-hHIF 3A sgRNA2 0	GUUUGCUGACAUUCUCCGACGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	174
Sp-hHIF 3A sgRNA2 1	AGUCUGCGCAGGUGGCUUGUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU	175

Sp-hHIF 3A sgRNA2 2	GCUGGAGAAGUCUGCGCAGGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	176
Sp-hHIF 3A sgRNA2 3	CCUGCGCAGACUUCUCCAGCGUUUUAGAGCUAGAAA AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	177
Sp-hHIF 3A sgRNA2 4	CCAGCUGGAGAAGUCUGCGCGUUUUAGAGCUAGAAA AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	178
Sp-hHIF 3A sgRNA2 5	UGGCUUCGCAGAUGAGCACCGUUUUAGAGCUAGAAA AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	179

[256]

[257] [259]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hPH D2 sgRNA1	AAUGACAGCGGCGGGCCCGGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	180
Sp-hPH D2 sgRNA2	AUGACAGCGGCGGGCCCGGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	181
Sp-hPH D2 sgRNA3	ACUGCCGGUCUCGCUCGCUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	182
Sp-hPH D2 sgRNA4	UACUGCCGGUCUCGCUCGCUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	183

[258]

[259] [표 10]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hTLR 4 sgRNA1	UGGUCUCACGCAGGAGAGGAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	184
Sp-hTLR 4 sgRNA2	CCUGCGUGAGACCAGAAAGCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	185
Sp-hTLR 4 sgRNA3	CCAGCUUUCUGGUCUCACGCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	186
Sp-hTLR 4 sgRNA4	CUGCGUGAGACCAGAAAGCUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	187
Sp-hTLR 4 sgRNA5	GGUUGAGAAGGGGAGGUUGUGUUUUAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	188
Sp-hTLR 4 sgRNA6	GUCCAGGUUCUUGGUUGAGAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	189
Sp-hTLR 4 sgRNA7	GGGGAUUAAAGCUCAGGUCCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	190
Sp-hTLR 4 sgRNA8	ACCUGAGCUUUAAUCCCCUGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	191
Sp-hTLR 4 sgRNA9	UAGCUGCCUAAAUGCCUCAGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	192
Sp-hTLR 4 sgRNA10	AUGCCCCAUCUUCAAUUGUCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	193

[260]

[261] [표 11]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hTLR 4 sgRNA1 1	CUGUCAAUUUAAGGUAGAGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	194
Sp-hTLR 4 sgRNA1 2	CUCUCUACCUUAAUUAUUGACGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	195
Sp-hTLR 4 sgRNA1 3	GGGGUUUCCUGUCAAUUUAAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	196
Sp-hTLR 4 sgRNA1 4	CCCCAUCCAGAGUUUAGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	197
Sp-hTLR 4 sgRNA1 5	CCAGGGCUAAACUCUGGAUGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	198
Sp-hTLR 4 sgRNA1 6	AGGCUCCCAGGGCUAAACUCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	199
Sp-hTLR 4 sgRNA1 7	UAGUCCAGAAAAGGCUCCCAGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	200
Sp-hTLR 4 sgRNA1 8	UAAACUUGAUAGUCCAGAAAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	201

Sp-hTLR 4 sgRNA1 9	AUCAAGUUUACAGAAGCUGGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	202
Sp-hTLR 4 sgRNA2 0	UUUACAGAAGCUGGUGGCUGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	203
Sp-hTLR 4 sgRNA2 1	UCUCUAGAGAACUCCCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	204

[262]

[263] [표 12]

Label	Guide RNA (5' to 3')	SEQ ID NO.
Sp-hPAI 1 sgRNA1	AGCCCUCACCUGCCUAGUCCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	205
Sp-hPAI 1 sgRNA2	GCCCUCACCUGCCUAGUCCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	206
Sp-hPAI 1 sgRNA3	UGGCCCUGUCUUUGGUGAAGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	207
Sp-hPAI 1 sgRNA4	GCACCAUCCCCAUCCUACGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	208
Sp-hPAI 1 sgRNA5	AGGUGGGCCACGUAGGAUGGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	209
Sp-hPAI 1 sgRNA6	CCAGGUGGGCCACGUAGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	210
Sp-hPAI 1 sgRNA7	GCCCACCUGGCCUCAGACUUGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	211
Sp-hPAI 1 sgRNA8	UCACCCCGAAGUCUGAGGCCGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	212
Sp-hPAI 1 sgRNA9	CACCCUCACCCCGAAGUCUGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	213
Sp-hPAI 1 sgRNA10	AACCACGUUGCGGUCCUUGGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	214
Sp-hPAI	GAAAACCACGUUGCGGUCCUGUUUUAGAGCUAGAAAU	215

1 sgRNA1 1	AGCAAGUUA AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	
Sp-hPAI 1 sgRNA1 2	AGGGUGAGAAAACCACGUUGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUA AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	216

[264]

[265]

[266] 실험예 1-3 형질도입 (Transfection)

[267] MSC는 제조사의 지침에 따라 Program EW-104를 이용하여 Amaxa P1 Primary Cell 4D Nucleofector kit로 형질도입 하였다. 구체적으로, 4×10^5 개의 세포에 생체 외 전사된 sgRNA (4 μ g)와 함께 미리 혼합된 Cas9 단백질 (4 μ g)을 상온에서 10분동안 인큐베이션한 후 형질도입 하였다.

[268] 실험예 1-4 표적화 딥시퀀싱 (Targeted deep sequencing)

[269] Phusion polymerase (New England BioLabs)를 이용하여 표적 및 잠재적인 비표적 위치를 포괄하는 유전체 DNA 절편 (segment)을 증폭시켰다. Illumina MiSeq를 이용하여 상기 PCR 앰플리콘 산물을 쌍-말단 서열분석 (paired-end sequencing)하였다.

[270] 실험예 1-5 qRT-PCR

[271] Total RNA 샘플은 RNeasy Mini Kit(Qiagen) 를 이용하여 얻었고, 이 중 1 μ g total RNA를 ReverTra Ace qPCR RT Kit(toyobo) 를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)와 StepOnePlus Real Time PCR system(Applied biosystems)을 이용해 quantitative RT-PCR을 수행하였다. PCR 온도와 시간 및 cycle 수는 다음과 같다. DNA denaturation 95°C 10분, primer annealing 55-60°C 30초, polymerization 72°C 30초 동안 수행하였으며, 40 cycle 반복으로 증폭하였다. Normalization control로는 beta-actin(ACTB)를 사용하였다.

[272]

[273] 실험예 2 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 생존율(Viability) 측정

[274] 실험예 2-1 산화적 스트레스 환경 하 생존율(Viability) 측정

[275] 저산소의 상황에서 흔히 발생하는 산화적 스트레스(reactive oxidative stress: ROS)로부터 MSC의 증식 능력 변화를 측정하였다. ROS를 유도하는 H₂O₂ (hydrogen peroxide)를 처리하기 24시간 전 96well plate의 각 well에 1×10^4 의 세포로 배양하였다. 24시간 후에 serum free 배지에 500 μ M의 H₂O₂를 첨가하여 배양하였다. H₂O₂처리 24시간 후 세포의 생존율을 보기 위해 CCK-8 cell proliferation kit (Dojindo®, USA)를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다.

- [276] 상기 실험 결과가 도 16에 도시되어 있다.
- [277] 실험예 2-2 SNAP (Reactive nitrogen species)에 대한 세포 생존율 측정
- [278] S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP, N3398) (Sigma)의 농도에 따른 생존세포를 확인하기 위해 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)을 이용하여 각 군의 생존세포를 측정하였다. 96-well plate에 키운 세포에 SNAP을 0 내지 500 μ M의 농도로 처리하고, 24h 동안 배양한 후, 각 well 당 CCK-8 용액을 10 μ L씩 첨가하고 2h 동안 반응시켰다. ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [279] 상기 실험 결과가 도 20에 도시되어 있다.
- [280]
- [281] 실험예 3 저산소 환경 하 높은 적응력을 가지는 세포의 특징 확인
- [282] 실험예 3-1 실험 대상 세포
- [283] 실험 대상 세포는 실험예 1-1에서 배양된 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에, 실험예 1-2 에서 제조한 hHIF1AN 유전자 조작용 조성물을 처리한 후, 딥시퀀싱을 통해 본 실험에 적합한 세포를 스크리닝하여 사용하였다. 본 실험의 컨트롤로는 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포(SHS231 KO), 및/또는 AAVS1 유전서열 위치가 조작된 세포(AAVS1)를 사용하였다.
- [284] 실험예 3-2 BrdU 세포 증식 분석
- [285] 실험예 3-1에서 선별된 세포를 harvest하기 전에 1시간 동안 10 μ M BrdU를 처리하였다. BrdU를 처리한 후 PBS에 희석된 3% 포름알데히드로 4°C에서 1시간 고정시킨 뒤, harvest하여 1% Triton X-100를 실온에서 5분간 처리하였다. 다시 세포를 원심분리하여 PBS로 washing하고, 4N HCL을 10분간 실온에서 처리하여 DNA 이중가닥을 풀어준 뒤 PBS로 washing 하였다. 실온에서 30분간 blocking 용액 (30% FBS, 1% BSA, 0.01% Tween 20 in PBS)을 처리한 뒤 harvest하였다. PBS에 100배 희석한 anti-BrdU mouse IgG를 30분간 4°C에서 반응시켰다. 이를 PBS에 희석된 0.2% tween 20으로 씻어 원심분리한 후 모아진 세포를 마지막으로 PBS로 희석하여 유세포 분석기로 분석하였다.
- [286] 상기 BrdU 세포 증식 분석 결과가 도 21 내지 도 22에 도시되어 있다.
- [287] 실험예 3-3 FACS 분석
- [288] 실험예 3-1에서 선별된 MSC를 phosphate buffer saline (PBS)로 2회 세척 후 0.05% trypsin-EDTA 를 사용해 세포를 떼어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 100ul의 FACS staining buffer로 cell을 suspension 시키고 antibody 를 혼합하여 1시간동안 4°C에서 반응 후 PBS로 2회 washing 하고, 500ul의 PBS로 부유시켜 FACS analysis 하였다.
- [289] 상기 FACS 분석 결과가 도 23 내지 도 25에 도시되어 있다.
- [290] 실험예 3-4 Cytokine array를 통한 단백질 체학 데이터 검증
- [291] Human XL Cytokine Array Kit (Cat. no.ARY022, R & D systems, USA)를 사용하여 Cytokine array를 수행했다. 수행 방법은 제조사의 지시를 따랐다.

어레이 멤브레인은 우선 어레이 버퍼 6에서, 4 well multi-dish에 담겨 rocking platform shaker에서 한 시간동안 블로킹되었다. 블로킹 후, 상기 어레이 멤브레인은 원하는 샘플량으로 2-8°C에서 rocking platform shaker 내에서 밤새(overnight) 배양되었다. 그 후, 상기 어레이 멤브레인은 1X 세척 버퍼로 3회 10분동안 세척되었다. 그 후, 웰당 1.5 mL의 희석된 검출 항체 카테일이 첨가되었고, shaker에서 1시간 동안 배양되었다. 그 후, 상기 어레이 멤브레인은 1X 세척 버퍼로 다시 3회 세척되었다. 세척 후, 상기 어레이 멤브레인은 2 mL의 1X Streptavidin-HRP와 함께 30분동안 배양되었다. 마지막으로, Chemi Reagent mix 1 mL이 각 멤브레인에 균등하게 도포되었고, 자기방사법(autoradiography)이 수행되었다. X-ray 필름의 픽셀 밀도는 이미지 분석 소프트웨어(Image J)를 사용하여 스캔 및 분석되었다.

[292] 상기 분석 결과가 도 28에 도시되어 있다.

[293] 실험예 3-5 PDL(Population Doubling Level), PDT(Population Doubling Time) 확인

[294] 세포의 성장을 알아보기 위해 세대 전, 후 세포 수를 측량하였다. Harvest cell count수(C_t)를 Seeding cell count(C_i)수로 나눈 값을 Growth rate로 보고, PDL(N)이를 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[295]

$$2^n = \frac{C_t}{C_i}$$

[296] 위의 배양 시간(hr)을 PDL으로 나눈 값을 Population Doubling time (PDT)로 표시 하였다.

[297] 상기 PDL, PDT 확인 결과가 도 26 내지 도 27에 도시되어 있다.

[298]

[299] 실험예 4 결과 재현 실험

[300] 실험예 4-1 결과 재현 실험

[301] 실험예 3 결과의 재현성을 확인하기 위하여, 새로운 MSC stock으로부터 실험예 1 내지 실험예 3의 실험을 반복하였다. 반복 실험 결과는 도 29 내지 도 30에 도시되어 있다.

[302] 실험예 4-2 Western blot 분석

[303] 저산소환경을 유도하기 위해, 줄기세포(MSC)가 1% O₂ 농도를 유지하는 저산소 챔버에서 배양되었다. Western blot을 수행하기 위해, 상기 MSC를 수집하였고, 이후 PBS를 포함하는 lysis buffer, 1% Triton X-100, 및 Phosphatase Inhibitor Cocktail II, III, 및 complete protease inhibitor 혼합물로 처리되었다. 상기 처리 후 용해물은 100,000g, 4°C에서 20분 동안 원심분리 되었다. 상기 원심분리 결과물의 상등액 (nonionic detergent-insoluble)이 수집되었다. 총 용해물의 경우, 세포가 수집되었고, PBS로 2회 세척하였으며, Pierce RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% NP40, 1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate, and a protease inhibitor mixture; Thermo Scientific)로 얼음에서 30분동안 용해시켰다.

단백질 농도는 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. 동일한 양의 단백질(10-20 µg)이 8% 내지 16% SDS-PAGE에 용해되었고, 니트로셀룰로오스(nitrocellulose, NC) 멤브레인으로 옮겨졌다. TBST (Tris-buffer solution-Tween20; 10 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20)로 세척한 후, 상기 멤브레인은 5% 탈지유(skim milk)로 1시간 동안 차단되었고, 적절한 1차 항체와 함께 공급 업체가 권장하는 희석액에서 배양되었다. 상기 멤브레인을 TBST로 세척하였고, 상기 1차 항체는 HRP-콘주게이트 된 2차 항체(HRP-conjugated secondary antibody)로 검출되었다. Immunoblot 신호는 Chemiluminescence (Pierce, USA)로 시각화되었다.

[304] 상기 Western blot 결과는 도 31에 도시되어 있다.

[305]

산업상 이용가능성

[306] 본 명세서에서는 저산소 조건에서 높은 적응력을 갖는 세포 및 이의 제조 방법을 제공한다. 상기 저산소 조건에서 높은 적응력을 갖는 세포는 세포 치료제로 사용될 수 있다. 상기 저산소 조건에서 높은 적응력을 갖는 세포의 제조 방법을 통해 산업상 이용이 가능한 저산소 조건에서 높은 적응력을 갖는 세포를 제조할 수 있다.