

명세서

발명의 명칭: 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포, 이의 제조방법 및 용도

기술분야

- [1] Nrf2의 음성 조절인자(negative regulator)인 KEAP1의 발현 또는 활성 수준이 감소 또는 억제되어 Nrf2의 활성도가 증가함으로써 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포, 이의 제조방법 및 용도가 제공된다.

배경기술

- [2] 중간엽 줄기세포는 자가증식능, 다분화능(multy-potency)을 가지고 있으며, 다양한 종류의 전구세포들이 있기 때문에 줄기세포주를 확보하기가 쉽고, 다분화성 줄기세포로서, 배아줄기세포 등의 만능줄기세포에 비해 훨씬 유전적으로 안정화되어 있다는 장점을 지니고 있다. 또한 항염증능, 면역조절능 때문에 연골재생, 심근경색 치료, 이식편대숙주질환의 치료 등을 위한 세포 치료제로 개발되어 왔다.
- [3] 그러나 허혈(ischemic), 염증(inflammatory)과 같은 체내 병변 환경에서는 혈액 공급이 잘 안되어서 산소 농도가 낮거나(Hypoxia), 활성산소(Reactive Oxygen Species: ROS)에 의한 산화적 스트레스가 높아져 중간엽 줄기세포의 체내 생존율이 낮아진다. 또한 산화적 스트레스 환경에서는 줄기세포의 자가분열(self-renewal)이 저해되어 세포 노화가 축적되며, 노화된 중간엽 줄기세포는 낮은 치료 효과를 보인다.
- [4] 이렇게 체내 생존율이 낮아진 중간엽 줄기세포에 대한 치료 효과를 지속시키고 증진시키기 위해서는 반복 투여가 이루어져야 하나, 반복투여는 환자에게 부담이 될 수 있으며 생산율도 높아야 하는 문제가 있다.
- [5] 활성산소(ROS)는 세포대사과정에서 자연적으로 생산되는 분자로 세포의 정상적인 기능과 신호전달시스템에서 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 ROS의 생산은 산화스트레스를 유도하고 세포 내 분자들의 손상을 일으켜 세포의 정상적인 기능과 역할을 방해한다. 세포는 과도한 활성산소(ROS)로 인한 세포 내 스트레스와 독성을 완화하는 조절시스템을 가지고 있으며 대표적인 것이 nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2)/Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1) 신호 전달체계이다. Nrf2의 주요 조절 역할을 하는 Keap1은 인체 내 항산화 시스템을 조절하는 단백질로 존재하며, 세포질에서 Nrf2-Keap1의 단백질-단백질 상호작용(protein-protein interaction, PPI)은 염증 및 염증 매개체에 의해 야기되는 많은 병리학적 상태를 일으키는 항산화 경로 조절에 중요한 요소이다. Nrf2는 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 전사인자로 정상적인 상태에서는 세포질에서 Keap1과 복합체를 형성하다가 세포 독성제나 산화적 스트레스로 인해 Keap1이 비활성화되면 Nrf2가 방출되어

- 핵 내로 진입하게 된다. 이후 Nrf2는 HO-1, SOD, catalase 및 GPx-1/2 등의 항산화 효소를 활성화시켜 산화 손상으로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.
- [6] (특허문헌 1) 대한민국공개특허 10-2019-0069238호
- [7] (비특허문헌 1) Xiaozhen Dai et al., Trends Mol Med. 2020 Feb;26(2):185-200, Nrf2: Redox and Metabolic Regulator of Stem Cell State and Function
- [8] (비특허문헌 2) D S Yoon et al., Cell Death & Disease volume 7, pagee2093 (2016), Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis
- [9] (비특허문헌 3) Yiling Hu et al., Front. Neurol., 18 February 2020, CRISPR/Cas9-Induced Loss of Keap1 Enhances Anti-oxidation in Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells
- [10] (비특허문헌 4) Mohammad Mohammadzadeh et al., Cell Stress and Chaperones volume 17, pages553-565 (2012), Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity
- [11] (비특허문헌 5) Shouqin Zhang et al., J Cell Biochem. 2018 Feb;119(2):1627-1636, Nrf2 transfection enhances the efficacy of human amniotic mesenchymal stem cells to repair lung injury induced by lipopolysaccharide

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 과제는 허혈(ischemic), 염증(inflammatory)과 같은 체내 병변 환경에서 활성산소(Reactive Oxygen Species: ROS)에 의해 높아진 산화적 스트레스에 대한 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 치료제를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기한 과제를 달성하기 위해, 본 발명은
- [14] 과도한 활성산소(ROS)로 인한 세포 내 스트레스와 독성을 완화하는 조절시스템인 Nrf2-Keap1 경로에서 Nrf2와 결합하여 분해를 일으키는 KEAP1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제된 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [15] 또한 본 발명은 인위적으로 조작된 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자를 포함하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포로서, 상기 인위적으로 조작된 Keap1 유전자는 야생형 중간엽 줄기세포의 Keap1 유전자 서열과 다르고, 상기 인위적으로 조작된 Keap1 유전자는 핵산 서열 내에 하나 이상의 인델(indel)을 포함하고, 이때, 상기 인델은 Keap1 유전자의 엑손 제2영역 또는 엑손 제3영역에서 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer-Adjacent Motif, PAM) 서열 내, 또는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단과 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열 내에 위치하고, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 산화 스트레스 저항성이 향상된 것을 특징으로 하는

인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 제공한다.

- [16] 또한 본 발명은 중간엽 줄기세포의 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적 서열을 표적화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 에디터 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 제공한다.
- [17] 또한 본 발명은 (1) 상기한 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 분리된 중간엽 줄기세포에 도입하는 단계; 및 (2) 상기 중간엽 줄기세포의 게놈 내에 위치한 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적서열에 인델을 발생시킴으로써, Keap1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제되도록 Keap1 유전자를 편집하는 단계를 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [18] 또한 본 발명은 상기한 산화스트레스 저항성을 갖도록 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [19] 또한 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 상기한 산화스트레스 저항성을 갖도록 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 투여하는 것을 포함하는 허혈성 질환의 치료방법을 제공한다.
- [20] 본 발명은 또한 포유동물에서 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기한 산화스트레스 저항성을 갖도록 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 NrF2와 결합하여 분해(degradation)를 일으키는 Keap1 단백질을 암호화하는 유전자를 유전자 가위 기술로 인위적으로 변형하여, Keap1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제됨으로써, NrF2의 활성도가 증가될 수 있다. 상기 Keap1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제된 중간엽 줄기세포는 허혈(ischemic), 염증(inflammatory)과 같은 체내 병변 환경에서 활성산소(Reactive Oxygen Species: ROS)에 의해 높아진 산화적 스트레스에 대한 저항성을 나타내며, 체내에서 생존율이 증가하고 노화가 억제되어 허혈성 질환에 대해 개선된 치료효과를 갖는 세포 치료제로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 Keap1 유전자의 서열번호 1 내지 15의 표적서열을 표적화하는 각각의 가이드 RNA에 대한 인델 효율을 표적화 심층 시퀀싱 방법을 통해 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [23] 도 2는 KEAP1 유전자의 표적서열 중 서열번호 15(sgKeap1-BR-#5) 위치에서 인위적으로 조작된 KEAP1 KO MSC의 표적화 심층 시퀀싱을 수행하였고,

대표적 시퀀싱 결과에서 상위 서열 패턴을 나타낸 것이다.

- [24] 도 3은 스크리닝한 Keap1 target sgRNA를 사용하여 KEAP1 유전자가 녹아웃된 중간엽 줄기세포에서 인텔 빈도와 KEAP1 mRNA의 발현 정도를 보여주는 그래프, 및 유전자 편집에 따른 중간엽 줄기세포의 세포 성장을 비교한 사진을 나타낸 것이다.
- [25] 도 4는 NRF2 유전자의 표적서열에 대한 sgRNA의 인텔 효율을 표적화 심층 시퀀싱 방법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [26] 도 5는 Keap1 유전자의 서열번호 49 내지 56의 표적서열을 표적화하는 각각의 가이드 RNA에 대한 인텔 효율을 표적화 심층 시퀀싱 방법을 통해 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 6은 KEAP1 유전자의 각 표적서열을 표적화하는 sgRNA를 사용하여 KEAP1 유전자가 녹아웃된 중간엽 줄기세포에서 KEAP1 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 정도를 qRT-PCR을 이용하여 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 7은 KEAP1 유전자 내 서열번호 15와 서열번호 50의 표적서열을 나타낸 것이다.
- [29] 도 8은 KEAP1 녹아웃된 중간엽 줄기세포 P6에서 서열번호 15와, 서열번호 50의 표적서열을 표적화하는 각 가이드 RNA에 대한 각 표적서열의 인텔 효율(도 8(a))과, KEAP1 녹아웃된 중간엽 줄기세포 P6 및 P7에서 qRT-PCR을 이용하여 측정한 KEAP1 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 정도(도 8(b))를 나타낸 것이다.
- [30] 도 9는 CCK8 분석을 이용한 일반 환경(도 9(a))과 산화적 스트레스 환경(도 9(b))에서의 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [31] 도 10은 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포와 KEAP1 interacting domain인 NRF2 exon 2가 skip editing 된 중간엽 줄기세포의 산화적 스트레스 환경에서의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [32] 도 11은 표적서열에 차이에 따른 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포의 산화적 스트레스 환경에서의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [33] 도 12는 서열번호 15 및 서열번호 50을 표적서열로 한 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포 P7의 산화적 스트레스 환경에서의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [34] 도 13은 서열번호 15(sgKeap1-BR#5)과 서열번호 50(sgKEAP1-exon3-#23)의 표적서열을 녹아웃한 줄기세포의 생존률(도 13(a)), 성장률(도 13(b)), PDL (Population Doubling Level)(도 13(c)) 및 Population Doubling time (PDT)(도 13(d))를 보여주는 그래프이다. 도 14는 BrdU 분석으로 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포의 세포 증식 정도와 세포 주기를 관찰한 그래프이다.
- [35] 도 15는 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포의 텔로미어 길이 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [36] 도 16은 사이토카인 분석을 통해 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포에서 발현이 증가한 사이토카인을 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.

- [37] 도 17은 mice에 KEAP1 녹아웃 MSC를 IV로 투여한 뒤 폐조직을 채취하여 염색하고 분석한 결과를 나타낸 사진, 그래프이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [38] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [39] 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.
- [40] 본 명세서에서 사용되는 "인위적으로 조작된"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, "인위적으로 조작된 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.
- [41] 본 명세서에서 사용되는 "야생형"은 자연적으로 발생하는 염기서열을 포함하는 유전자 및 그 유전자로부터 발현되는 단백질이 정상적인 기능적 특성을 지니는 것을 의미한다. 야생형 유전자는 자연적 또는 인위적 돌연변이가 발생하지 않은 형태를 가지며, 집단에서 가장 빈번하게 관찰된다. 본 명세서에서 "야생형"이라는 용어가 인위적으로 조작된 유전자, 및/또는 인위적으로 조작된 세포와 대비해 사용된다면, 이는 인위적으로 조작된 유전자, 및/또는 인위적으로 조작된 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.
- [42] 본 명세서에서 사용되는 "녹아웃(knock-out)", 혹은 "녹아웃된 유전자"라는 표현은, 야생형 유전자에 돌연변이 또는 인위적 변형이 발생하여, 그 결과 야생형 유전자가 발현하는 단백질이 전사 및/또는 번역 과정을 거쳐 생성되지 못하는 것을 의미한다. 예를 들어, 녹아웃된 유전자 A를 포함하는 세포는 야생형 유전자 A에 의해 발현되는 mRNA 및/또는 단백질을 발현하지 못하는 것일 수 있다. 녹아웃된 A 유전자를 포함하는 세포란, 세포 내 존재하는 유전자 A 중 하나만 녹아웃된 것일 수 있고, 두 개 이상 녹아웃된 것일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.
- [43] 본 명세서에서 사용되는 "녹다운(knock-down)", 혹은 "녹다운된 유전자"라는 표현은, 야생형 유전자에 돌연변이 또는 인위적 변형이 발생하여, 그 결과 야생형 유전자보다 적은 양으로 물질을 발현하는 것을 의미한다. 예를 들어, 녹다운된 유전자 A를 포함하는 세포는 야생형 유전자 A에 의해 발현되는

mRNA보다 적은 양의 mRNA를 발현하는 것일 수 있다. 또 다른 예로, 억다운된 유전자 A를 포함하는 세포는 야생형 유전자 A에 의해 발현되는 단백질보다 적은 양의 단백질을 발현하는 것일 수 있다. A 유전자가 억다운된 세포란 세포 내 존재하는 유전자 A 중 하나만 억다운된 것일 수 있고, 두 개 이상 억다운된 것일 수 있다. 또한, 상기 용어는 당업계 통상의 기술자가 인식할 수 있는 의미를 모두 포함하며, 문맥에 따라 적절히 해석될 수 있다.

- [44] 본 명세서에 있어서, "발현 감소"는 야생형에서 측정된 mRNA 및/또는 단백질의 발현 수준보다 낮은 정도의 발현을 나타내는 것을 의미한다. 상기 감소는 유전적 변형을 갖지 않은 세포 또는 야생형 세포에 비하여 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 또는 약 100% 이상 감소된 것일 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 사용된 용어 "활성 감소", 또는 "감소된 활성"은 단백질 또는 효소의 활성을 측정하였을 때, 상대적인 활성의 감소를 의미할 수 있다. 구체적으로, "활성 감소", 또는 "감소된 활성"은 주어진 모세포 또는 야생형 세포에 비해 더 낮은 수준의 단백질, 또는 효소의 활성을 의미한다.
- [46] 본 명세서에 있어서, "줄기세포(stem cell)"란 여러 종류의 신체 조직 세포로 분화할 수 있는 능력, 즉, 줄기세포성(stemness)을 가진 미분화 세포를 총칭하는 광의의 개념을 말한다. 이때 상기 줄기세포는 유도 만능줄기세포, 배아줄기세포, 및 성체 줄기세포일 수 있다. 또한, 상기 세포는 인간 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본 명세서에 있어서, "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대(태줄) 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포, 양수 유래 중간엽 줄기세포, 출산전후 조직(perinatal tissue) 유래 중간엽 줄기세포 또는 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.
- [48] 본 발명은 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제된 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [49] 상기 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제된 중간엽 줄기세포는 과도한 활성산소(ROS)로 인한 세포 내 스트레스와 독성을 완화하는 조절시스템인 Nrf2-Keap1 경로에서 Nrf2와 결합하여 분해를 일으키는 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제되어, Nrf2의 활성이 증가하게 되고, 허혈(ischemic), 염증(inflammatory)과 같은 체내 병변 환경에서 활성산소(Reactive Oxygen Species: ROS)에 의해 높아진 산화적 스트레스에 대한 저항성을 나타내어, 상기 KEAP1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제된 중간엽

줄기세포를 세포 치료제로 사용시, 중간엽 줄기세포의 체내 생존율이 증가하고 노화가 억제되어, 야생형 중간엽 줄기세포 또는 종래 기술로 선별된 중간엽 줄기세포보다 개선된 치료효과를 나타낼 수 있다.

- [50] 구체적으로, 본 발명은 중간엽 줄기세포의 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자를 인위적으로 조작하여, KEAP1 mRNA 및/또는 KEAP1 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제됨으로써, 산화적 스트레스 환경에서 높은 생존성을 가지는 것을 특징으로 하는 산화스트레스 저항성을 갖는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [51] 본 발명은 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 핵산 서열이 인위적으로 변형된 것을 포함하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [52] 본 발명에서, 유전자 핵산 서열의 "인위적인 변형" 또는 "인위적인 조작"은 유전자를 구성하는 핵산 서열의 변형 또는 단일 염기의 화학적 변형을 통해 이루어질 수 있다. 이는 유전자의 일부 또는 전부가 변이, 치환, 삭제되거나 상기 유전자에 하나 이상의 염기가 삽입되는 것에 의한 것일 수 있으며, CRISPR-enzyme system 등의 유전자 가위 기술을 이용하여 이루어질 수 있다. 일 예로, 상기 유전자 핵산 서열의 인위적인 변형은 비-상동적인 말단연결(non-homologous end joining, NHEJ) 또는 상동 재조합 수리(homology directed repair, HDR) 기작에 의해 이루어질 수 있다.
- [53] 일 예로, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자가 녹아웃(knock out)된 것 일 수 있다.
- [54] 본 명세서에 있어서, "비-상동적인 말단연결(Non-homologous end joining, NHEJ)"은 절단된 이중 가닥 또는 단일 가닥의 양 말단이 함께 결합함으로써 DNA 내 이중 가닥 파손을 수복 또는 수선하는 방법으로, 일반적으로 이중 가닥의 파손(예를 들어, 절단)에 의해 형성된 2개의 적합성 말단이 빈번한 접촉을 반복하여 2개의 말단이 완전히 결합되는 경우 파손된 이중 가닥이 복구된다.
- [55] 상기 NHEJ를 이용한 손상된 유전자 또는 핵산의 수복 과정에서 NHEJ 수선 부위에 핵산 서열의 일부 "삽입(insertion) 및/또는 결실(deletion)"(또는 "인델", InDel)이 발생할 수 있으며, 인델이 발생한 유전자는 야생형 유전자와 동일한 서열을 가지지 않는다. 이러한 삽입 및/또는 결실은 유전자의 리딩 프레임을 변경시키고, 프레임쉬프트 된 전사체 mRNA를 만들어내며, 결과적으로 넌센스-매개 붕괴(nonsense mediated decay)를 겪거나 정상적인 단백질을 합성하는데 실패함으로써 본래의 기능을 상실하게 된다. 또는 추가적으로, 리딩 프레임을 유지하지만, 상당한 양의 서열을 삽입 또는 결실시키는 돌연변이를 초래해 단백질의 기능성을 파괴할 수 있다. 또 다른 예시로, 유전자의 프로모터 영역 또는 인핸서 영역과 같은 전사조절영역에 인델이 발생하는 경우, mRNA가 전사되지 않거나, 전사량이 감소되며, 이에 따라 단백질이 발현되지 않거나, 발현량이 감소될 수 있다. 또는 NHEJ의 돌연변이 발생 기전을 활용하여, 특이적

최종 서열의 생성이 필요하지 않은 경우, 일부 서열 모티프만 결실시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 엑손의 5' 및 3' 부분의 인트론 부위를 각각 표적하는 둘 이상의 가이드 RNA를 이용하여 각 인트론 부분에 이중 가닥 절단을 일으키고, NHEJ에 의해, 유전자의 엑손 일부만 결실되면, 다른 부분은 정상적으로 발현되어 단백질의 주요한 기능성은 유지될 수 있다.

- [56] 이러한 NHEJ를 이용하면, 유전자 가위 기술을 활용하여 목적하는 유전자를 특이적으로 녹아웃(knock-out)하거나 녹다운(knock-down)할 수 있다.
- [57] 예를 들어, 유전자 가위의 일종인 Cas9 또는 Cpf1과 같은 CRISPR 효소를 이용하여 표적 유전자 또는 표적 핵산의 이중 가닥 또는 두 개의 단일 가닥을 절단하고, 파손된 표적 유전자 또는 파손된 표적 핵산의 이중 가닥 또는 두 개의 단일 가닥은 NHEJ에 의해 인텔이 생성되며, 이를 통해 표적 유전자 또는 핵산의 특이적 녹아웃(knock-out) 또는 녹다운(knock-down)을 유도할 수 있다.
- [58] 일 예로, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자가 녹다운(knock-down)된 것일 수 있다.
- [59] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 keap1 유전자는 핵산 서열 내에 하나 이상의 인텔(indel)을 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인텔은 Keap1 유전자의 엑손 제2영역 또는 엑손 제3영역에서 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer-Adjacent Motif, PAM) 서열 내, 또는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단과 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열 내에 위치할 수 있다.
- [61] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 Keap1 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 15 및 서열번호 49 내지 56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않을 수 있다.
- [62] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 Keap1 mRNA의 발현이 일어나지 않는 것일 수 있다.
- [63] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 인위적으로 조작된 Keap1 유전자로부터 전사되는 mRNA는 야생형 중간엽 줄기세포의 Keap1 유전자로부터 전사되는 mRNA 수준과 비교하여, 그 mRNA의 발현수준이 더 낮을 수 있다.
- [64] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 야생형 줄기세포와 비교하여, Keap1 mRNA 서열이 다를 수 있다.
- [65] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 야생형 줄기세포와 비교하여, Keap1 단백질의 발현 또는 활성이 감소된 것일 수 있다. 이를 통해 본 발명의 줄기세포는 Keap1 단백질의 기능이 저하 또는 상실될 수 있다.
- [66] 즉, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포에 있어서 Keap1 단백질의 발현 또는 활성이 야생형 중간엽 줄기세포의 발현 또는 활성보다 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 75%

- 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 100% 감소된 것일 수 있다.
- [67] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 Keap1 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 단계를 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포 제조방법을 제공한다.
- [68] 상기 KEAP1 단백질의 발현 또는 활성의 증가, 감소는 KEAP1 유전자의 인위적인 변형에 의해 이루어질 수 있으며, 일 예로 유전자 가위 기술을 이용할 수 있다.
- [69] 일 예로, 상기 유전자 가위 기술은 TAL 이펙터(transcription activator-like effector 또는 TALE) 도메인과 절단 도메인이 융합된 TALEN(transcription activatorlike effector nuclease), 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), 또는 미생물 면역체계인 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)에서 유래한 CRISPR-enzyme system을 활용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [70] 상기 TALEN과 관련하여 국제공개특허 WO2012/093833호 또는 미국공개특허 2013-0217131호에 개시된 내용 전문이 본 명세서에 참고자료로서 포함된다. 상기 ZFN과 관련하여 Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al, (2001) Nature Biotechnol. 19: 656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol.10:411-416, 미국특허등록 7,888,121, 8,409,861, 6,479,626, 6,903,185, 7,153,949 이 본 명세서에 참고자료로서 포함될 수 있다.
- [71] 상기 "CRISPR-enzyme system"은 가이드 핵산 및/또는 에디터 단백질로 구성된다.
- [72] "가이드 핵산"은 표적 핵산, 표적 유전자 또는 표적 염색체를 인지하고, 에디터 단백질과 상호작용할 수 있는 핵산을 의미한다. 이때, 상기 가이드 핵산은 표적 핵산, 표적 유전자 또는 표적 염색체 내의 일부 뉴클레오타이드와 상보적인 결합을 형성할 수 있다.
- [73] 상기 가이드 핵산은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA, 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA 또는 DNA/RNA 혼합의 형태 일 수 있다.
- [74] 상기 가이드 핵산은 가이드 RNA일 수 있다. 일 예로, "가이드 RNA"는 생체 외(in vitro) 전사된 것일 수 있고, 특히 올리고뉴클레오타이드 이중가닥, 또는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 가이드 RNA는 벡터의 형태로 암호화될 수 있고, *ex vivo* 또는 *in vivo* 환경에서 세포 내로 전달되어 벡터로부터 전사된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [75] 상기 가이드 RNA의 설계 및 구성은 당업자에게 공지되어 있으며, 한국등록특허 10-1656236, 10-1656237, 10-1706085, 10-2052286, 10-2182847에 상세하게 설명되며, 상기 등록특허 전문이 본 발명의 참고자료로서 본 명세서에 포함된다.
- [76] 상기 가이드 핵산은 스캐폴드 서열 부분과 가이드 서열 부분을 포함할 수 있다.

상기 스캐폴드 서열 부분은 Cas 단백질과 상호작용하는 부분으로, Cas 단백질과 가이드 핵산이 결합하여 복합체(ribonucleoprotein, RNP)를 이룰 수 있도록 한다. 일반적으로, 상기 스캐폴드 서열 부분은 tracrRNA와 crRNA의 일부 서열부분을 포함하며, 상기 스캐폴드 서열은 어떤 Cas 단백질을 사용하느냐에 따라서 결정된다.

- [77] 상기 "가이드 서열 부분"은, 표적 유전자 또는 핵산의 이중 가닥 중 어느 하나 가닥의 일부 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 부분이며, 인위적으로 변형할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 부분으로, 관심 있는 표적 뉴클레오타이드 서열에 의해 결정된다. 이때 상기 가이드 서열은 표적 유전자 또는 표적 핵산의 가이드 핵산 결합 서열과 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보성을 가지거나 또는 완전한 상보성을 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 상기 가이드 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 서열일 수 있다.
- [78] 상기 가이드 서열 부분은 crRNA에 포함될 수 있다. 일 예로, 상기 가이드 핵산은 두 개의 RNA, 즉, crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 구성요소로 포함하는 이중 RNA(dual RNA)일 수 있다.
- [79] 다른 일 예로, 상기 가이드 핵산은 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분이 연결된 형태인 sgRNA(single-chain guide RNA) 일 수 있다.
- [80] 상기 표적 서열은 표적 유전자 또는 표적 핵산 내에 존재하는 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열로, 구체적으로는 표적 유전자의 조절 영역(regulatory region), 암호화 영역(coding region; 또는 CDS, coding sequence) 또는 비 암호화영역(non-coding region; 또는 UTR, untranslated region)으로 구분되는 표적 영역 내의 일부 뉴클레오타이드 서열이거나, 상기 표적 영역들의 조합에서 선택되는 하나 이상의 일부 뉴클레오타이드 서열들일 수 있다. 상기 표적 서열은 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체(RNP)의 타겟이 될 수 있다.
- [81] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 표적서열은 야생형 KEAP1 유전자의 엑손 제2영역 또는 엑손 제3영역에 포함된 서열일 수 있다.
- [82] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 표적서열은 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 15 중 선택된 하나 이상의 서열이다.
- [83] 상기 표적 서열은 에디터 단백질이 인식하는 프로토스페이스 인접 모티프(proto-spacer-adjacent motif, PAM) 서열과 인접한 주변의 뉴클레오타이드 서열로, PAM의 전체 또는 일부를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 표적서열이라 함은 두 가지의 뉴클레오타이드 서열 정보 모두를 의미하는 용어로 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 유전자의 경우, 표적 서열은 표적 유전자 DNA의 transcribed strand의 서열 정보를 의미하는 것일 수도 있고, 또는 non-transcribed strand의 뉴클레오타이드 서열 정보를 의미하는 것일 수도 있다.
- [85] 표적서열은 가이드 핵산 결합서열 또는 가이드 핵산 비결합 서열을 포함한다. "가이드 핵산 결합 서열"은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드

서열과 일부 또는 완전한 상보성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로, 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보적인 결합을 할 수 있다. 표적 서열 및 가이드 핵산 결합 서열은 표적 유전자 또는 핵산에 따라, 즉 유전자 조작 또는 교정하고자 하는 대상에 따라 달라질 수 있는 뉴클레오타이드 서열로, 가이드 핵산은 표적 유전자 또는 표적 핵산에 따라 다양하게 설계될 수 있다.

- [86] "가이드 핵산 비결합 서열"은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 일부 또는 완전한 상보성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로, 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함되는 가이드 서열과 상보적인 결합을 할 수 없다. 또한, 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산 결합 서열과 상보성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로, 가이드 핵산 결합 서열과 상보적인 결합을 할 수 있다. 가이드 핵산 결합 서열은 표적 서열 중 일부 뉴클레오타이드 서열로, 표적 서열의 두 가지 서로 다른 서열순서를 가지는 뉴클레오타이드 서열, 즉, 서로 상보적인 결합을 할 수 있는 두 가지의 뉴클레오타이드 서열 중 한 가지 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이때, 가이드 핵산 비결합 서열은 표적 서열 중 가이드 핵산 결합 서열을 제외한 나머지 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [87] 가이드 핵산 결합 서열은 표적 서열, 즉, transcribed strand와 동일한 뉴클레오타이드 서열 및 non-transcribed strand와 동일한 뉴클레오타이드 서열 중 선택된 하나의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 이때, 가이드 핵산 비결합 서열은 표적 서열 중 가이드 핵산 결합 서열, 즉, transcribed strand와 동일한 뉴클레오타이드 서열 및 non-transcribed strand와 동일한 뉴클레오타이드 서열 중 선택된 하나의 뉴클레오타이드 서열을 제외한 나머지 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [88] 가이드 핵산 결합 서열은 표적 서열의 길이와 동일할 수 있다. 가이드 핵산 비결합 서열은 표적 서열 또는 가이드 핵산 결합 서열의 길이와 동일할 수 있다. 가이드 핵산 결합 서열은 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [89] 일 구체예로서 상기 가이드 핵산 결합 서열은 16개의 뉴클레오타이드 서열, 17개의 뉴클레오타이드 서열, 18개의 뉴클레오타이드 서열, 19개의 뉴클레오타이드 서열, 20개의 뉴클레오타이드 서열, 21개의 뉴클레오타이드 서열, 22개의 뉴클레오타이드 서열, 23개의 뉴클레오타이드 서열, 24개의 뉴클레오타이드 서열 또는 25개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 가이드 핵산 비결합 서열은 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [90] 일 구체예로서 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 16개의 뉴클레오타이드 서열, 17개의 뉴클레오타이드 서열, 18개의 뉴클레오타이드 서열, 19개의 뉴클레오타이드 서열, 20개의 뉴클레오타이드 서열, 21개의 뉴클레오타이드 서열, 22개의 뉴클레오타이드 서열, 23개의 뉴클레오타이드 서열, 24개의 뉴클레오타이드 서열 또는 25개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [91] 가이드 핵산 결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열과 일부 또는 완전한 상보적인 결합을 할 수 있으며, 상기 가이드 핵산 결합

서열의 길이는 가이드 서열의 길이와 동일할 수 있다.

- [92] 상기 가이드 핵산 결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [93] 일 예로, 상기 가이드 핵산 결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상보적이지 않은 1 내지 8개의 뉴클레오타이드 서열을 가지거나 또는 포함할 수 있다.
- [94] 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열과 일부 또는 완전한 상동성을 가질 수 있으며, 상기 가이드 핵산 비결합 서열의 길이는 가이드 서열의 길이와 동일할 수 있다. 일 예로, 상기 가이드 서열은 가이드 핵산 비결합 서열과 상동성을 가지는 서열을 기반으로 설계될 수 있다.
- [95] 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상동성을 가진 뉴클레오타이드 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가지거나 또는 완전하게 상동성을 가지는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [96] 일 예로, 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산의 가이드 도메인에 포함된 가이드 서열에 상동적이지 않은 1 내지 8개의 뉴클레오타이드 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산 결합 서열과 상보적 결합을 할 수 있으며, 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산 결합 서열의 길이와 동일할 수 있다.
- [97] 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산 결합서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있으며, 예를 들어 최소한 90% 또는 95% 이상의 상보적이거나 또는 완전하게 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [98] 일 예로, 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 가이드 핵산 결합 서열에 상보적이지 않은 1 내지 2개의 뉴클레오타이드 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 상기 가이드 핵산 결합 서열은 에디터 단백질이 인식할 수 있는 뉴클레오타이드 서열(PAM 서열)과 상보적인 서열에 근접한 위치의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [99] 일 예로, 상기 가이드 핵산 결합 서열은 에디터 단백질이 인식할 수 있는 뉴클레오타이드 서열(PAM 서열)과 상보적인 서열의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [100] 또한, 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 에디터 단백질이 인식할 수 있는 뉴클레오타이드 서열(PAM 서열)에 근접한 위치의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [101] 일 예로, 상기 가이드 핵산 비결합 서열은 에디터 단백질이 인식할 수 있는 뉴클레오타이드 서열(PAM 서열)의 5' 말단 또는/및 3' 말단에 인접하여 위치하는

연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

- [102] "에디터 단백질"은 핵산과 직접적으로 결합하거나, 또는 직접 결합하지는 않지만 상호작용할 수 있는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미한다. 상기 에디터 단백질에 대해서 개념적으로 "인위적으로 조작된 뉴클레아제" 또는 RGEN(RNA-Guided Endonuclease)으로 칭하기도 한다.
- [103] 일 구체예에서, 상기 에디터 단백질은 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 효소일 수 있다. "CRISPR 효소"는 CRISPR-enzyme 시스템의 주요 단백질 구성 요소로, "Cas 단백질(CRISPR associated protein)"이라 칭하기도 하며, 가이드 RNA와 혼합 또는 복합체를 형성하여 표적서열을 인지하고 DNA를 절단할 수 있는 뉴클레아제를 말한다.
- [104] CRISPR 효소는 당업자에 공지되어 있으며, 한국등록특허 10-1656236, 10-1656237, 10-1706085, 10-2052286, 10-2182847을 참고한다. 상기 CRISPR 효소는 천연형 단백질 외에도 가이드 RNA와 협동하여 활성화된 엔도뉴클레아제(endonuclease) 또는 니카아제(nickase)로 작용할 수 있는 변이체를 모두 포함하는 개념으로 본 명세서에서 사용된다. 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 니카아제인 경우, 표적 DNA 절단을 가져올 수 있고, 이를 이용하여 유전체 교정을 가지고 올 수 있다. 또한, 불활성화된 변이체인 경우, 이를 이용하여 전사 조절 혹은 목적하는 DNA의 분리를 가져올 수 있다.
- [105] 상기 CRISPR 효소는 CRISPR 효소를 암호화하는 서열을 가지는 핵산 또는 폴리펩타이드(또는 단백질)로, 대표적으로 Type II CRISPR 효소 또는 Type V CRISPR 효소가 많이 사용되며, 상기 Type II CRISPR 효소로는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질이 있다.
- [106] 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus Auricularis*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 등 다양한 미생물로부터 유래된 것일 수 있다.
- [107] Cas9 단백질이 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도하기 위해서는 Cas9 단백질이 일정 길이의 뉴클레오타이드 서열인 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer Adjacent Motif, PAM) 서열을 인식하고, 가이드 RNA의 일부(상기 가이드 서열 부분)가 표적 서열이 위치하는 DNA 단일 가닥(상기 가이드 핵산 비결합 서열)의 상보적인 가닥(상기 가이드 핵산 결합 서열)과 상보적으로 결합해야 한다.
- [108] 이 PAM 서열은 Cas9 단백질의 종류나 기원에 따라 결정되는 서열로, 예를 들어 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질(SpCas9)은 표적 핵산 내 5'-NGG-3' 서열(상보적 서열: 5'-CCN-3')을 인식할 수 있다. 이때, 상기 N은 상기 N은 아데노신(A), 티미딘(T), 사이티딘(C),

구아노신(G)중 하나이다. 또한, 상기 SpCas9은 표적 핵산 내 5'-NAG-3' 서열(상보적 서열:5'-CTN-3')을 낮은 활성으로 인식할 수 있다.

- [109] 또한, 상기 Type V CRISPR 효소로는 Cpf1이 있으며, 상기 Cpf1은 *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Nitratifactor*, *Staphylococcus*, *Parvibaculum*, *Roseburia*, *Neisseria*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Sphaerochaeta*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Corynebacter*, *Carnobacterium*, *Rhodobacter*, *Listeria*, *Paludibacter*, *Clostridium*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiaridium*, *Leptotrichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Alicyclobacillus*, *Methanomethyophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroidetes*, *Helcococcus*, *Letospira*, *Desulfovibrio*, *Desulfonatronum*, *Opitutaceae*, *uberibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Methylobacterium* 또는 *Acidaminococcus* 유래의 Cpf1일 수 있다.
- [110] 상기 Cas9 또는 Cpf1 단백질 등의 CRISPR 효소는 자연상태에서 존재하는 미생물에서 분리된 것 또는 재조합적 방법 또는 합성적 방법으로 비자연적으로 생산된 것일 수 있다. 상기 Cas 단백질은 또한 세포 내로 도입되기에 용이한 형태일 수 있다. 그 예로 Cas 단백질은 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인(protein transduction domain)과 연결될 수 있다. 상기 단백질 전달 도메인은 폴리-아르기닌 또는 HIV 유래의 TAT 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인은 상기 기술된 예 외에도 다양한 종류가 당업계에 공지되어 있으므로, 당업자는 상기 예에 제한되지 않고 다양한 예를 본 명세서에 적용할 수 있다. 또한 상기 Cas 단백질은 NLS(nuclear localization sequence or signal)과 같은 기능적 도메인과 융합될 수 있다. 또한 상기 Cas9 단백질은 벡터의 형태로 암호화되어, 세포 내에서 발현되는 것일 수 있다.
- [111] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적 서열을 표적화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 에디터 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 제공한다.
- [112] 또한, 상기 조성물은 삽입을 원하는 특정 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 도너 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 선택적으로 더 포함할 수 있다.
- [113] 상기 도너(donor)는 특정 펩타이드 또는 단백질을 발현시킬 수 있는, 외인성 뉴클레오타이드 서열(exogenous nucleotide sequences)를 의미하며, 상동 재조합 수리(homology directed repair, HDR)을 통해 게놈 DNA로 삽입될 수 있다.
- [114] 상기 도너는 이중가닥 핵산 또는 단일가닥 핵산일 수 있다. 상기 도너는 선형 또는 원형일 수 있다.
- [115] 상기 도너는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드)의 형태일 수 있다.
- [116] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다. 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA)

- 바이러스 일 수 있다. 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.
- [117] 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 렌티바이러스(Lentivirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), 백시니아바이러스(Vaccinia virus), 폭스바이러스(Poxvirus) 및 단순포진 바이러스(Herpes simplex virus, HSV)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.
- [118] 상기 표적 서열은 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체의 타겟이 될 수 있고, 상기 표적 서열은 에디터 단백질이 인식하는 PAM(protospacer-adjacent motif) 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119] 상기 가이드 핵산은 조성물은 KEAP1 유전자의 표적 서열을 표적화할 수 있는 가이드 도메인을 포함할 수 있다.
- [120] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물의 상기 표적 서열은 서열번호 1 내지 15 중 선택된 하나 이상의 서열인 것일 수 있다.
- [121] 본 명세서에서, 가이드 핵산, 에디터 단백질 또는 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체(리보뉴클레오프로테인, RNP) 및/또는 도너는 다양한 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [122] 이때 "대상"은 가이드 핵산, 에디터 단백질 또는 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체가 도입되는 유기체; 가이드 핵산, 에디터 단백질 또는 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체가 작동하는 유기체; 또는 유기체로부터 획득한 검체 또는 시료를 의미한다.
- [123] 상기 대상은 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체의 표적 유전자, 표적 핵산 또는 표적 염색체를 포함하는 유기체일 수 있다.
- [124] 상기 유기체는 동물, 동물의 조직 또는 동물 세포일 수 있다. 이때 상기 조직은 안구, 피부, 간, 신장, 심장, 폐, 뇌, 근육 또는 혈액일 수 있다.
- [125] 상기 세포는 줄기세포, 간세포, 심근세포, 내피세포 또는 체장세포일 수 있다.
- [126] 상기 검체 또는 시료는 침, 혈액, 간조직, 뇌조직, 간세포, 신경세포, 식세포, 대식세포, T 세포, B 세포, 성상 교세포, 암세포 또는 줄기세포 등 표적 유전자, 표적 핵산 또는 표적 염색체를 포함하는 유기체에서 획득한 것 일 수 있다.
- [127] 상기 가이드 핵산, 에디터 단백질 또는 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [128] 이때, 가이드 핵산 및/또는 에디터 단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [129] 또는, 가이드 핵산 및/또는 에디터 단백질을 암호화하는 DNA, RNA 또는 이의 혼합의 형태는 벡터, 비벡터 또는 이들의 조합에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [130] 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드)일 수

있다.

- [131] 상기 바이러스는 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스일 수 있다. 이때, 상기 DNA 바이러스는 이중가닥 DNA(dsDNA) 바이러스 또는 단일가닥 DNA(ssDNA) 바이러스일 수 있다. 이때, 상기 RNA 바이러스는 단일가닥 RNA(ssRNA) 바이러스일 수 있다.
- [132] 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택되는 1이상일 수 있다.
- [133] 상기 비벡터는 네이키드 DNA, DNA 복합체 또는 mRNA일 수 있다.
- [134] 본 발명의 일 구현예로, 상기 가이드 핵산 및/또는 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 1 이상의 벡터의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [135] 상기 벡터는 가이드 핵산 및/또는 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 벡터는 가이드 핵산과 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 동시에 포함할 수 있다. 다른 일 예로, 상기 벡터는 가이드 핵산을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 핵산 서열은 하나의 벡터에 모두 포함되거나 또는 가이드 핵산을 암호화하는 핵산 서열이 분할되어 여러 개의 벡터에 포함시킬 수 있다. 다른 일 예로, 상기 벡터는 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 에디터 단백질의 경우, 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 하나의 벡터에 포함되거나 또는 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 분할되어 여러 개의 벡터에 포함될 수 있다.
- [136] 상기 에디터 단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [137] 상기 에디터 단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태로 당업계에 공지된 방법에 의해 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [138] 상기 가이드 핵산 및 에디터 단백질은 핵산-단백질 혼합의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [139] 상기 가이드 핵산 및 에디터 단백질은 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다. 예를 들어, 상기 가이드 핵산은 DNA, RNA 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 상기 에디터 단백질은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 형태일 수 있다. 일 예로, 가이드 핵산 및 에디터 단백질은 RNA 형태의 가이드 핵산과 단백질 형태의 에디터 단백질이 가이드 핵산-에디터 단백질 복합체, 즉 ribonucleoprotein(RNP)의 형태로 대상 내로 전달 또는 도입될 수 있다.
- [140] 또한 본 발명은 (1) 상기한 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 분리된 중간엽 줄기세포에 도입하는 단계; 및 (2) 상기 중간엽 줄기세포의 개능 내에 위치한 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적서열에 인텔을 발생시킴으로써, Keap1 단백질의 발현 또는 활성이

감소 또는 억제되도록 KEAP1 유전자를 편집하는 단계를 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

- [141] 이때, 상기 "도입"은 전기천공법(Electroporation), 리포펙션(lipofection), 미세 주입법, 유전자칭, 리포솜, 양성 리포솜, 플라스미드, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles), PTD(Protein translocation domain) 융합 단백질 방법, 면역리포솜, 다양이온 또는 지질: 핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 DNA의 제제 향상 흡수 방법 중 선택된 하나 이상의 수단으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [142] 본 발명의 일 구현예로, 상기한 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 분리된 중간엽 줄기세포에 전기천공법으로 도입하여 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포를 제조할 수 있다.
- [143] 본 발명의 일 구현예로, 상기 중간엽 줄기세포의 게놈 내에 위치한 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자에, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 및 Keap1 유전자의 표적서열을 표적화 할 수 있는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 복합체를 접목시킴으로써 인델을 발생시킬 수 있다.
- [144] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 표적서열은 서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 서열일 수 있다.
- [145] 본 발명의 산화스트레스 저항성을 갖는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는, 허혈성 심장질환(Ischemic heart diseases), 말초동맥질환(Peripheral artery disease) 임계 하지허혈(critical limb ischemia, CLI), 폐색성혈전혈관염(thromboangitis obliteran), 당뇨병성 말초혈관병증, 골괴사(osteonecrosis), 장간막 허혈 (mesenteric ischemia), 허혈성 대장염 (ischemic colitis), 허혈성 장염 (ischemic enteritis), 급성 신장손상 (acute kidney injury), 허혈성 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 간염(ischemic hepatitis), 허혈성 췌장염(ischemic pancreatitis), 허혈 시신경병(ischemic optic neuropathy), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), COVID-19 감염증, 신생아 저산소성 허혈성 뇌증(neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy), 뇌졸중(stroke)과 같은 허혈성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물의 유효성분으로 포함되어 세포 치료제로 이용될 수 있다.
- [146] 상기 허혈성 재관류 손상은 일반적으로 장기 또는 조직으로의 혈액 공급이 중단되어 조직으로의 산소 공급이 저하되는 허혈 손상과 허혈 상태에서 재관류에 의한 혈액 순환을 재개할 때 발생하며, 급성 염증 반응이 유발되는 재관류 손상의 연속된 복합 결과이다.
- [147] 본 명세서에 있어서, "세포 치료제"는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여

살아있는 자가, 동종, 또는 이종 세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

- [148] 본 발명의 세포 치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [149] 상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [150] 또한, 상기 조성물은 세포 치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.
- [151] 본 발명의 세포 치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포 치료제를 포함할 수 있다. "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다.
- [152] 본 발명의 조성물에 포함되는 세포 치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포 치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 줄기세포의 1일 투여량은 1.0×10^5 내지 1.0×10^{30} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^{10} 내지 1.0×10^{20} 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에

비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [153] 또한, 본 발명의 세포 치료제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 직장, 정맥내(intravenous therapy, i.v), 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [154] 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 투여하는 것을 포함하는 허혈성 질환의 치료방법을 제공한다. 여기에서 사용된 용어 포유동물은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다. 이때 허혈성 질환은 상기한 바를 따른다.
- [155] 본 발명은 또한 포유동물에서 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기한 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 용도를 제공한다. 이때 허혈성 질환은 상기한 바를 따른다.

발명의 실시를 위한 형태

- [156] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [157] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 자명할 것이다.
- [158]
- [159] **실시예 1: KEAP1 녹아웃된 중간엽 줄기세포 제조**
- [160] **sgRNA 설계**
- [161] KEAP1 유전자를 녹아웃하기 위해, <http://www.rgenome.net/cas-designer/>에서 예측된 가이드 서열 중 비표적효과(off-target effect)가 적게 예상되는 mismatch 1,0,0인 가이드 RNA의 표적서열을 선별하였다.
- [162] KEAP1 유전자의 표적서열은 아래 표 1에 정리하여 나타내었다.

[163] [표1]

구분	Exon	RGEN Target (5' to 3'direction) with PAM(<u>underlined</u>)	Indel (%)
sgKeap1-#1	2	TGCAGTCACAGTGCCCTGAG <u>GGG</u> (서열번호 1)	18
sgKeap1-#2	2	GAAGGTGCGGTTGCCATGCT <u>GGG</u> (서열번호 2)	17.5
sgKeap1-#3	2	TGAAGGTGCGGTTGCCATGCT <u>TGG</u> (서열번호 3)	7.9
sgKeap1-#4	2	GATCATACCAAGCAGGCCTT <u>TGG</u> (서열번호 4)	55
sgKeap1-#5	2	TTGGCATCATGAACGAGCTG <u>CGG</u> (서열번호 5)	18.8
sgKeap1-#6	2	TGAGGCCAGCACCTTGT <u>GGG</u> (서열번호 6)	14.3
sgKeap1-#7	2	CATGGCCTTGAAGACAGGGCT <u>TGG</u> (서열번호 7)	43.5
sgKeap1-#8	2	GTGAACATGGCCTTGAAGAC <u>AGG</u> (서열번호 8)	79.5
sgKeap1-#9	2	CCATGTTACCAACGGGCTG <u>CGG</u> (서열번호 9)	1.7
sgKeap1-#10	2	ATGGAGGTGGTGTCCATTG <u>AGG</u> (서열번호 10)	81.3
sgKeap1-BR-# 1	3	CCAGGTAGCTGAGCGACTGT <u>CGG</u> (서열번호 11)	22.1
sgKeap1-BR-# 2	3	GAGGCTTACAACCCAGTGAC <u>CGG</u> (서열번호 12)	61.9
sgKeap1-BR-# 3	3	TCATGGGGTTGTAACAGTCC <u>AGG</u> (서열번호 13)	49.7
sgKeap1-BR-# 4	3	ACAACCCCATGACCAATCAGT <u>TGG</u> (서열번호 14)	59.9
sgKeap1-BR-# 5	3	CTGCATCCACCACAACAGTGT <u>TGG</u> (서열번호 15)	79

- [164] 상기 서열번호 1 내지 15의 표적서열을 표적화하는 각각의 가이드 RNA를 합성하여 이후 실험에 사용하였다. 각 가이드 RNA에 대한 각 표적서열의 인텔 효율은 하기 표적화 심층 시퀀싱 방법을 통해 측정하였고, 그 결과는 도 1에 나타내었다.
- [165] 가이드 RNA는 MEGA short script T7 kit(Ambion)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 생체 외 전사하였다. sgRNA에 대한 주형(template)은 두 상보적인 올리고 뉴클레오티드의 결합(annealing) 및 신장(extension)을 통해 제조하였다.
- [166]
- [167] RNP(Ribonucleoprotein) 전달
- [168] RNP 복합체는 4D-Nucleofector (Lonza)를 이용하여 전기천공법으로 도입되었다. 구체적으로, RNP 복합체는 4ug Cas9 단백질과 *in vitro* transcribed sgRNA(T7 polymerase (New England BioLabs)를 활용, 제조사 프로토콜에 따라 제작) 4ug을 혼합하여 형성하고, 실온에서 10분 동안 혼합물을 인큐베이팅하였다. 상기 RNP 복합체는 20ul Primary P1 buffer 처리된 4×10^5 Human Bone marrow MSC(Lonza, Cat. No. PT-2501)와 함께 핵소체 프로그램(nucleofector program) EW-104을 사용하여 전기천공을 수행하였다. 그 결과 KEAP1 유전자가 녹아웃(Knock-out)된 중간엽 줄기세포(KEAP1 KO MSC)를 획득하였다.
- [169] 본 명세서에서 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 대조군으로 SHS231 유전서열 위치가 조작된 세포를 사용하였다. 구체적으로 SHS231 표적서열 5'-GATGTGCTCACTGAGTCTGAAGG-3'(서열번호 16)(밑줄: PAM 서열)을 표적화할 수 있는 가이드 RNA를 전술한 실험방법에 따라 합성하고, 중간엽 줄기세포에 RNP 형태로 가이드 RNA와 Cas9 단백질을 도입하여, SHS231 유전서열이 조작된 MSC를 획득하였다.
- [170]
- [171] 표적화 심층 시퀀싱(Targeted deep sequencing)
- [172] 획득한 KEAP1 KO MSC에 Blood Genomic DNA Extraction Kit(Favorgen)를 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 genomic DNA(gDNA)를 추출하였다. 표적 부위 증폭을 위해 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase PCR Polymerase (NEB)을 사용하여 100ng genomic DNA(gDNA)를 증폭시켰다. 심층 시퀀싱 라이브러리 생성을 위해 TruSeq HT Dual Index Primers(Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 앰플리콘을 한 번 더 증폭시켰다. Illumina Miniseq System을 이용하여 Paired-end sequencing을 수행하였고, 인텔 빈도는 'http://www.rgenome.net/'에서 계산하였다.
- [173] 표적화 심층 시퀀싱 결과, 각 표적서열에 대한 KEAP1 KO MSC의 변이 위치는 야생형 KEAP1 유전자의 서열을 기준으로 표시하였다. 일 예로, 서열번호 15(sgKeap1-BR-#5)의 표적화 심층 시퀀싱 결과는 도 2와 같이 나타났다.
- [174] 표적화 심층 시퀀싱에 사용한 각 표적서열에 대한 primer 서열은 표 2 내지 4에

나타내었다.

[175]

[176] [표2]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
sgKeap1-#1	AGCCAGATCCCAGGCCTAGC (서열번호 17)	CCGGTGCATCCTGGTACTT G (서열번호 18)
sgKeap1-#2		
sgKeap1-#3		
sgKeap1-#4		
sgKeap1-#5		
sgKeap1-#6	TTGGCATCATGAACGAGCTG (서열번호 19)	ACTTCTCGCCCATGGAGAT G (서열번호 20)
sgKeap1-#7		
sgKeap1-#8		
sgKeap1-#9		
sgKeap1-#10	TGCCCCACAAGGTGGTGCTG (서열번호 21)	GGACAACGCTGTCTGATCT GG (서열번호 22)
sgKeap1-BR-#1	CCTGGTCAAGATCTTCGAGG (서열번호 23)	GAGTTGTTCTGCGCCCA C (서열번호 24)
sgKeap1-BR-#2		
sgKeap1-BR-#3	GTGGGCGGCAGGAACAACCTC (서열번호 25)	TCCCTGAAGACAGGAAGA GG (서열번호 26)
sgKeap1-BR-#4		
sgKeap1-BR-#5		

[177] [표3]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
sgNRF2-#1	ACATGAGCTCTCTCCTTCCT (서열번호 27)	GGGAGAAATTCACCTG TCTCTT (서열번호 28)
sgNRF2-#2		
sgNRF2-#3		
sgNRF2-#4		
sgNRF2-#5	CAAGTGATTAGAATGGATGGCTA TG (서열번호 29)	GGAAGGAGAGAGCTC ATGTTT (서열번호 30)
sgNRF2-#6		
sgNRF2-#7		
sgNRF2-#8	CAACTAGATGAAGAGACAGGTGA A (서열번호 31)	GAGGCTGAGGTTGGAA AGTAG (서열번호 32)
sgNRF2-#9		
sgNRF2-#10		

[178] [표4]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
SHS231- DS	ACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTCCGATCTGACTACAGTAG TTAATCATC (서열번호 33)	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTCAGATACAAA AAGGGTTCTC (서열번호 34)

[179]

[180] KEAP1 mRNA qRT-PCR Assay

[181] Total RNA 샘플은 RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 얻었고, 이 중 1ug total RNA에 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 Human GAPDH를 사용하였다. qRT-PCR에 사용한 각 유전자에 대한 primer 서열은 표 5 내지 6에 나타내었다.

[182] [표5]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Keap1	CCTCAATCGTCTCCTTTATGCC (서열번호 35)	GATCATTCGCCACTCGTTC C (서열번호 36)

[183] [표6]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
NRF2	CACATCCAGTCAGAAACCAGT GG (서열번호 37)	GGAATGTCTGCGCCAAAAG CTG (서열번호 38)

[184]

[185] 스크리닝한 Keap1 target sgRNA에 의해, Keap1 유전자 내 표적서열(서열번호 15) 위치에서의 인텔이 높게 잘 나타났으며, KEAP1 mRNA의 발현 또한 0에 가깝게 낮아진 것으로 나타났다. 또한, WT 및 Control과 Keap1 KO MSC를 비교하였을 때, 외관상으로도 spindle-like and fibroblast-like shape의 큰 차이를 보이지 않았다(도 3 참조).

[186]

[187] **비교예 1: NRF2가 에디팅된 중간엽 줄기세포 제조**

[188] NRF2 단백질을 암호화하는 NFE2L2 유전자의 exon 2는 KEAP1 interacting domain과 관련되어 있으며, 상기 NFE2L2 exon2가 결실되는 돌연변이가 발생하면, Nrf2의 표적유전자가 활성화된다는 것이 알려져있다(Leonard D Goldstein et. al., Cell Rep. 2016 Sep 6;16(10):2605-2617.). KEAP1 KO MSC의 산화스트레스 저항성이 KEAP1 KO으로 인한 것인지, Nrf2의 활성 증가로 인한 것인지 확인하고자 비교실험을 수행하였다. Nrf2 활성 모델 세포를 제작하고자 유전자 편집을 수행하여 NRF2의 exon 2가 skip된 중간엽 줄기세포(Nrf2 edited MSC)를 제조하였고, KEAP1 KO MSC와 Nrf2 edited MSC의 H₂O₂(산화 스트레스) 저항성 비교 실험을 진행하였다.

[189] 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[190] **sgRNA 설계**

[191] NRF2 유전자를 표적하기 위해, Off-target profile상 1-0-0 mismatches(0, 1, 2)에 해당하면서 intron 1 또는 intron 2를 표적할 수 있는 가이드 RNA를 선별하였다.

[192] NRF2 유전자의 표적서열은 아래 표 7에 정리하여 나타내었다.

[193] [표7]

구분	RGEN Target (5' to 3' direction), with PAM(underlined)
sgNRF2-#1	ATTTGATTGACATACTTTGG <u>AGG</u> (서열번호 39)
sgNRF2-#2	TGGAGGCAAGATATAGATCTT <u>GG</u> (서열번호 40)
sgNRF2-#3	TATTTGACTTCAGTCAGCGAC <u>GG</u> (서열번호 41)
sgNRF2-#4	GCGACGGAAAGAGTATGAGCT <u>GG</u> (서열번호 42)
sgNRF2-#5	CACTGTTGATGGTGGGAAGT <u>GGG</u> (서열번호 43)
sgNRF2-#6	ATTATGCCACTGTTGATGGT <u>GGG</u> (서열번호 44)
sgNRF2-#7	CATTATGCCACTGTTGATGGT <u>GG</u> (서열번호 45)
sgNRF2-#8	GTACAGAGTACTCAGTTCTT <u>GGG</u> (서열번호 46)
sgNRF2-#9	GTTCTTGGGAAAGTTATGGC <u>AGG</u> (서열번호 47)
sgNRF2-#10	GGAAAGTTATGGCAGGTTTA <u>AGG</u> (서열번호 48)

[194]

[195] sgNRF2#1~#4는 NRF2 exon2(KEAP1 interacting exon)를 표적 부위로 하며, sgNRF2#5~#10는 NRF2 intron site(#6, #9를 동시에 사용하여 NRF2 exon2의 large deletion을 유도함)를 표적 부위로 한다.

[196] 상기 표적서열 중 서열번호 43 내지 48을 각각 표적하는 sgRNA들을 합성하여, 상기 실시예 1과 동일한 표적화 심층 시퀀싱 방법으로 NRF2 유전자에 대한 인텔 효율을 측정하였고, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[197] 상기 표적서열 중 서열번호 44 및 서열번호 47의 표적서열을 각각 표적화할 수 있는 2종의 in-vitro transcribed sgRNA를 상기 실시예 1과 동일한 전기천공 방법을 활용하여 하나의 중간엽 줄기세포에 상기 2종의 sgRNA를 에디터 단백질과 동시에 도입함으로써, Nrf2 유전자의 exon2가 skip된 MSC를 제조하였다.

[198]

[199] 실시예 2: **KEAP1** 녹아웃된 중간엽 줄기세포 제조

[200] sgRNA 설계

[201] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 KEAP1 유전자의 표적서열을 선별하고 아래 표 8에 나타내었다.

[202] [표8]

구분	Exon	RGEN Target (5' to 3'direction) with PAM(<u>underlined</u>)	Indel (%)
sgKeap1_#31	2	GTACGCCTCCACTGAGTGCA <u>AGG</u> (서열번호 49)	20.5 %
sgKeap1_#23	3	ACAGCGACGGTTCTACGTCC <u>AGG</u> (서열번호 50)	69.7 %
sgKeap1_#32	3	GCAGTCCGACTCCCGCTGCA <u>AGG</u> (서열번호 51)	26.2 %
sgKeap1_#59	3	CTGTCGGAAGTAGCCGCCCG <u>GCGG</u> (서열번호 52)	7.2 %
sgKeap1_#89	3	CTGTCGGAAGTAGCCGCCCG <u>GGG</u> (서열번호 53)	9.0 %
sgKeap1_#108	3	GTTACGGGGCACGCTCATGG <u>GGG</u> (서열번호 54)	41.3 %
sgKeap1_#114	3	CGTGCCCCGTAACCGCATCG <u>GGG</u> (서열번호 55)	29.1 %
sgKeap1_#117	3	CCCACCCCGATGCGGTTACG <u>GGG</u> (서열번호 56)	14.9 %

[203] RNP(Ribonucleoprotein) 전달, 표적화 심층 시퀀싱(Targeted deep sequencing) 및 KEAP1 mRNA qRT-PCR Assay

[204] RNP(Ribonucleoprotein) 전달, 표적화 심층 시퀀싱(Targeted deep sequencing) 및 KEAP1 mRNA qRT-PCR Assay는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[205] 표적화 심층 시퀀싱에 사용한 각 표적서열에 대한 primer 서열은 표 9에 나타내었다.

[206] [표9]

구분	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
sgKeap1_#31	AGCCAGATCCCAGGCCTAG C (서열번호 17)	CCGGTGCATCCTGGTACTT G (서열번호 18)
sgKeap1_#23	CTGAACGTGCGCTGCGAGT C (서열번호 57)	AGATCAGGCGGCCCCACCTT G (서열번호 58)
sgKeap1_#32		
sgKeap1_#59	CCTGGTCAAGATCTTCGAG G (서열번호 23)	GAGTTGTTCTGCGCCCA C (서열번호 24)
sgKeap1_#89	GACAGTCGCTCAGCTACCT G (서열번호 59)	GCGACCACTGATTGGTCAT G (서열번호 60)
sgKeap1_#108	GTGGGCGGCAGGAACAAC TC (서열번호 25)	CTCAGTGTCTTGGGACTTG C (서열번호 61)
sgKeap1_#114		
sgKeap1_#117		

[207] 상기 서열번호 15와, 서열번호 49 내지 56의 표적서열을 표적화하는 각 가이드 RNA에 대한 각 표적서열의 인텔 효율은 하기 표적화 심층 시퀀싱 방법을 통해 측정하였고, 그 결과는 도 5에 나타내었다(도 5에서 #BR5는 합성 sgRNA(synthego)이고 나머지는 생체 외 전사된 RNA(IVT-RNA)이다).

[208] 도 6은 KEAP1 유전자의 각 표적서열을 표적화하는 sgRNA를 사용하여 KEAP1 유전자가 녹아내려진 중간엽 줄기세포에서 KEAP1 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 정도를 qRT-PCR을 이용하여 비교하여 나타낸 그래프이다.

[209] KEAP1 녹아내려진 중간엽 줄기세포 P6에서 상기 서열번호 15와, 서열번호 50의 표적서열을 표적화하는 각 가이드 RNA에 대한 각 표적서열의 인텔 효율(도 8(a))과, KEAP1 녹아내려진 중간엽 줄기세포 P6 및 P7에서 qRT-PCR을 이용하여 측정한 KEAP1 유전자로부터 전사되는 mRNA의 발현 정도(도 8(b))는 도 8에 나타내었다.

[210]

[211] 실험예 1: 세포 생존성 및 성장률 분석[212] CCK8 Cell Viability assay under oxidative stress

[213] 산화 스트레스(Oxidative stress)에 따른 세포의 생존률을 확인하기 위해 Cell

Counting Kit-8(CCK-8)을 이용하여 각 군의 생존세포를 측정하였다. 구체적으로, 96-well plate에서 배양된 세포에 H₂O₂를 농도별로 처리하고, 24h 동안 더 배양한 후, 각 well 당 CCK-8 용액을 10μL씩 첨가하고 2h 동안 반응시켰다. 이후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[214] PDL (Population Doubling Level), PDT (Population Doubling Time)

[215] 세포의 성장도를 알아보기 위해 계대배양 전, 후 세포 수를 측정하였다. Harvest cell count수(C_t)를 Seeding cell count수(C_i)로 나눈 값을 Growth rate로 보고, PDL(n)을 다음 수학적 식 1과 같은 공식으로 계산하였다.

[216]

[217] [수식1]

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

[218] 배양 시간(hr)을 PDL으로 나눈 값을 Population Doubling time (PDT)로 표시하였다.

[219] 성장률은 KEAP1 KO MSC가 WT에 비해 다소 높은 것으로 관측되었지만, 일반환경에서의 생존성은 큰 차이를 보이지 않았다(도 9(a) 참조). 반면, 과산화수소의 농도를 점점 높여서 첨가한 결과(산화적 스트레스 환경 조성) KEAP1 KO MSC는 과산화수소가 상당히 많이 투여되었을 때도(450μM) 높은 생존성을 보여주었다(도 9(b) 참조).

[220] NRF2 exon2 skip edited MSC(sgNRF2-#6+#9 동시표적)는 KEAP1 KO MSC(sgKeap1-BR#5 표적)와 같이 H₂O₂ 400μM까지 유사한 생존 효과를 보였으나 H₂O₂ 450μM에서는 KEAP1 KO MSC가 더 높은 생존 효과를 나타냈다. 이는 KEAP1 녹아웃은 NRF2 활성화 뿐만 아니라 H₂O₂ 저항성에 대한 다른 생존 효과가 있는 것으로 보여진다(도 10 참조).

[221] KEAP1 표적 서열에 따른 H₂O₂ 저항성을 비교해본 결과, 서열번호 15(sgKeap1-BR#5)의 표적서열을 녹아웃한 중간엽 줄기세포가 높은 농도의 H₂O₂에서 상대적으로 더 높은 생존 효과를 나타내었다(도 11, 도 12 참조).

[222] 서열번호 15(sgKeap1-BR#5)과 서열번호 50(sgKEAP1-exon3-#23)의 표적서열을 녹아웃한 줄기세포의 생존률(도 13(a)), 성장률(도 13(b)), PDL (Population Doubling Level)(도 13(c)) 및 Population Doubling time (PDT)(도 13(d))를 도 13에 나타내었다.

[223]

[224] 실험예 2: 세포주기 분석

[225] BrdU(Bromodeoxyuridine) Assay

- [226] 배양된 세포를 harvest하기 전에 1시간 동안 10uM 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 4도씨에서 반응시켰다. 이를 PBS에 희석된 0.2% tween 20으로 씻어 원심분리한 후 모아진 세포를 마지막으로 PBS로 희석하여 유세포 분석기로 분석하였다.
- [227] FACS analysis
- [228] 앞서 BrdU 처리된 KEAP1 KO MSC를 phosphate buffer saline (PBS)로 2회 세척 후 0.05% trypsin-EDTA 를 사용해 세포를 걸쳐 플레이트에서 떼어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 100ul의 FACS staining buffe로 cell을 suspension 시키고 antibody를 혼합하여 1시간 동안 4도에서 반응 후 PBS로 2회 washing 하고, 500ul의 PBS로 부유시켜 FACS analysis 하였다.
- [229]
- [230] BrdU Assay로 세포 주기를 관측한 결과, KEAP1 KO MSC는 S phase가 빈번히 관측되어 세포증식이 활발하게 일어남을 알 수 있었다(도 14 참조).
- [231]
- [232] 실험예 3: 텔로미어 길이 분석(Telomere length qPCR)
- [233] KEAP1 KO MSC의 genomic DNA(gDNA) 샘플은 Blood Genomic DNA Extraction Kit(FAVORGEN) 를 이용하여 얻었고, 이 중 5ng gDNA를 Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit(Sciencell)를 사용하여 Telomere Length 값을 측정하였다. Kit 내 Reference human genomic DNA와 실험 gDNA sample을 StepOnePlus Real Time PCR system(Applied biosystems)을 이용해 quantitative RT-PCR을 수행하여 그 길이를 비교하였다. PCR 온도와 시간 및 cycle 수는 다음과 같다. DNA denaturation 95 °C 10분, primer annealing 52 °C 20초, polymerization 72 °C 45초 동안 수행하였으며, 32 cycle 반복으로 증폭하였다.
- [234] 텔로미어 길이 분석 결과, KEAP1 녹아웃에 의한 항노화 작용의 결과로 세포 증식이 활발함과 동시에, 텔로미어 길이가 길어진 것을 알 수 있었다(도 15 참조).
- [235]
- [236] 실험예 4: 사이토카인 분석을 사용한 프로테오믹스 데이터 검증
- [237] 사이토카인 분석은 Human XL Cytokine Array Kit (Cat. no.ARY022, R & D systems, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 먼저 어레이 분리막을 4 well multi-dish에 넣고 array buffer 6과 함께 rocking platform shaker에서 한 시간 동안 blocking시켰다. blocking 한 후, 분리막은 KEAP1 KO MSC 배양액 샘플과 함께 rocking platform shaker에서 2 내지 8 °C를 유지하면서 밤새(overnight) 인큐베이팅하였다. 이후 분리막은 1X wash buffer로 10분씩 3회

세척하였다. 희석된 Detection Antibody Cocktail을 각 well당 1.5 ml씩 넣고 shaker에서 1시간 인큐베이팅하였다. 이후 1X wash buffer로 3번 세척하였다. 세척 후, 2ml Streptavidin-HRP를 각 well에 넣고 30분간 반응시켰다. 마지막으로, 1ml Chemi Reagent Mix 용액을 각 분리막에 균일하게 분사한 후 자가방사분석을 수행하였다. 수득한 X-레이 필름을 스캔하고, 필름 상의 픽셀 밀도를 이미지 분석 소프트웨어(Image J)를 이용하여 분석하였다.

[238]

[239] KEAP1 KO MSC는 오스테오펀틴(Osteopontin, OPN), 안지오포이에틴(Angiopoietin), IL-8, VEGF, uPAR과 같은 여러 사이토카인의 발현이 증가하였으며, 그 중 오스테오펀틴(Osteopontin)과 안지오포이에틴(Angiopoietin)의 발현이 크게 증가되었다(도 16 참조). 오스테오펀틴(OPN)의 일시적 증가는 혈관신생을 촉진시켜서 상처 치료에 이점을 보이며, 또한, 발현이 크게 증가된 안지오포이에틴-1은 혈장누수/혈관염증/내피세포 괴사 방지 등 강력한 혈관보호 효과를 나타내므로, 각종 심혈관계 질환에 긍정적인 영향을 줄 것으로 예상된다.

[240]

[241] **실험예 5: in vivo 생존능 확인**

[242] MSC는 IV(intravenous) 투여 시 주로 폐에 축적되므로, 일반 mice에 KEAP1 녹아웃 MSC를 IV로 투여하여, 폐조직을 채취하여 염색하고 분석한 결과를 도 11에 나타내었다. 구체적으로, 대조군 및 KEAP1 KO MSC는 *in vivo*에서 IV경로 투여 시의 체내 각 부에 축적되는 정도를 tracking하기 위해 Vybrant DiD cell-labeling solution을 통해 염색되었다(ThermoFisher). 각 실험그룹의 염색된 MSC는 2×10^5 cells만큼 각각 6-8주령 C57Bl/6 mouse(Orient Bio)에 tail vein을 통해 혈관주사 되었다. 주사 후 1일차 및 2일차에 각각 마우스의 폐를 적출하여 DiD에 대한 *ex vivo* imaging을 FOBI Fluorescence In vivo imaging system (CELLGENTEK)을 이용하여 진행하였다. DiD fluorescence intensity측정을 통해 MSC의 잔존도를 측정하였다.

[243]

[244] 도 17을 참조하면, KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포는 비교 대상들에 비해, *in vivo* 환경에서 뛰어난 생존능을 보였다. 이렇게 뛰어난 효과를 보이는 KEAP1 녹아웃 중간엽 줄기세포는 심장, 혈관, 폐, 뇌 등 생체 내 환경에서, 다양한 허혈성 질환 및 염증성 질환들에 치료에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

청구범위

- [청구항 1] 인위적으로 조작된 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자를 포함하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포로서,
상기 인위적으로 조작된 Keap1 유전자는 야생형 중간엽 줄기세포의 Keap 1 유전자 서열과 다르고,
상기 인위적으로 조작된 Keap1 유전자는 핵산 서열 내에 하나 이상의 인델(indel)을 포함하고,
이때, 상기 인델은 Keap1 유전자의 엑손 제2영역 또는 엑손 제3영역에서 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer-Adjacent Motif, PAM) 서열 내, 또는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단과 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열 내에 위치하고,
상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 산화 스트레스 저항성이 향상된 것을 특징으로 하는
인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 인위적으로 조작된 Keap1 유전자의 서열은 서열번호 1 내지 15 및 서열번호 49 내지 56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포 내에서,
상기 인위적으로 조작된 Keap 1 유전자로부터 전사되는 mRNA는 야생형 중간엽 줄기세포의 Keap 1 유전자로부터 전사되는 mRNA 발현 수준과 비교하여, 그 mRNA 발현수준이 더 낮거나 또는 서열이 상이한 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 인위적으로 조작된 줄기세포는 산화적 스트레스 환경에서 높은 생존성을 가지는 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포는 지방, 골수, 탯줄, 태반, 양수, 양막, 조직, 제대혈 또는 출산전후 조직(perinatal tissue) 유래인 것을 특징으로 하는 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포.
- [청구항 6] 중간엽 줄기세포의 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적 서열을 표적화할 수 있는 가이드 서열을 포함하는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및
에디터 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물.

- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 표적서열은 서열번호 1 내지 15 및 서열번호 49 내지 56 으로 이루어진 군에서 선택된 선택된 하나 이상의 서열인 것을 특징으로 하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 조성물은
상기 에디터 단백질 및 상기 가이드 핵산을 리보뉴클레오프로테인(RNP) 형태로 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 조성물은
상기 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 핵산 서열을 1 이상의 벡터 형태로 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물.
- [청구항 11] (1) Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적 서열을 표적화할 수 있는 가이드 핵산 또는 이를 암호화하는 핵산 서열; 및 에디터 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포 제조용 조성물을 분리된 중간엽 줄기세포에 도입하는 단계; 및
(2) 상기 중간엽 줄기세포의 게놈 내에 위치한 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적서열에 인델을 발생시킴으로써, Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 단백질의 발현 또는 활성이 감소 또는 억제되도록 Keap1 유전자를 편집하는 단계를 포함하는 산화스트레스 저항성을 갖는 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 표적서열은 서열번호 1 내지 15 및 서열번호 49 내지 56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 서열인 것을 특징으로 하는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 인델은 Keap1 유전자의 엑손 제2영역 또는 엑손 제3영역에서 프로토스페이스 인접 모티프(Protospacer-Adjacent Motif, PAM) 서열 내, 또는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단과 인접하여 위치하는 연속하는 5 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열 내에 위치하도록 발생시키는, 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,

상기 조성물은 상기 에디터 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 상기 가이드 서열을 암호화하는 핵산 서열을 1 이상의 벡터 형태로 포함하는, 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법.

- [청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 중간엽 줄기세포의 게놈 내에 위치한 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 표적서열에, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래 Cas9 단백질 및 Keap1 유전자의 표적서열을 표적화 할 수 있는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 복합체를 접촉시킴으로써 인텔을 발생시키는 산화스트레스 저항성을 갖는 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 허혈성 질환은
허혈성 심장질환(Ischemic heart diseases), 말초동맥질환(Peripheral artery disease) 임계 하지허혈(critical limb ischemia, CLI), 폐색성혈전혈관염(thromboangitis obliteran), 당뇨병성 말초혈관병증, 골괴사(osteonecrosis), 장간막 허혈 (mesenteric ischemia), 허혈성 대장염 (ischemic colitis), 허혈성 장염 (ischemic enteritis), 급성 신장손상 (acute kidney injury), 허혈성 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 간염(ischemic hepatitis), 허혈성 췌장염(ischemic pancreatitis), 허혈 시신경병(ischemic optic neuropathy), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), COVID-19 감염증, 신생아 저산소성 허혈성 뇌증(neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy), 또는 뇌졸중(stroke)인 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포를 투여하는 것을 포함하는, 허혈성 질환의 치료방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 허혈성 질환은
허혈성 심장질환(Ischemic heart diseases), 말초동맥질환(Peripheral artery disease) 임계 하지허혈(critical limb ischemia, CLI), 폐색성혈전혈관염(thromboangitis obliteran), 당뇨병성 말초혈관병증, 골괴사(osteonecrosis), 장간막 허혈 (mesenteric ischemia), 허혈성 대장염 (ischemic colitis), 허혈성 장염 (ischemic enteritis), 급성 신장손상 (acute kidney injury), 허혈성 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 간염(ischemic hepatitis), 허혈성 췌장염(ischemic pancreatitis), 허혈 시신경병(ischemic optic neuropathy), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic

obstructive pulmonary disease), 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), COVID-19 감염증, 신생아 저산소성 허혈성 뇌증(neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy), 또는 뇌졸중(stroke)인 것인 허혈성 질환의 치료방법.

[청구항 20] 포유동물에서 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 용도.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환(Ischemic heart diseases), 말초동맥질환(Peripheral artery disease) 임계 하지허혈(critical limb ischemia, CLI), 폐색성혈전혈관염(thromboangitis obliteran), 당뇨병성 말초혈관병증, 골괴사(osteonecrosis), 장간막 허혈 (mesenteric ischemia), 허혈성 대장염 (ischemic colitis), 허혈성 장염 (ischemic enteritis), 급성 신장손상 (acute kidney injury), 허혈성 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 간염(ischemic hepatitis), 허혈성 췌장염(ischemic pancreatitis), 허혈 시신경병(ischemic optic neuropathy), 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), COVID-19 감염증, 신생아 저산소성 허혈성 뇌증(neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy), 또는 뇌졸중(stroke)인 것인 인위적으로 조작된 중간엽 줄기세포의 용도.